

FLÁVIO BARCELLOS CARDOSO

**COMPOSIÇÃO DE Δ^5 -ESTERÓIS, ATIVIDADE DE H⁺-ATPASE E
EXSUDAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS EM DOIS GENÓTIPOS
DE MILHO, SUBMETIDOS A NÍVEIS TÓXICOS DE ALUMÍNIO**

Tese apresentada à
Universidade Federal de
Viçosa, como parte das
exigências do Programa de
Pós-Graduação em Fisiologia
Vegetal, para obtenção do
título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

C268c
2013
Cardoso, Flávio Barcellos, 1979-
Composição de [delta]5-esteróis, atividade de
H⁺-ATPase e exsudação de ácidos orgânicos em dois
genótipos de milho, submetidos a níveis tóxicos de alumínio
/ Flávio Barcellos Cardoso. - Viçosa, MG, 2013.
xi, 65 f. : il. ; 29 cm.

Orientador : José Cambraia.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 54-65.

1. Milho - Efeito do alumínio. 2. Esteróis. 3. Células
-Membranas. 4. Ácidos orgânicos. I. Universidade Federal
de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de
Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22.ed. 633.15821

FLÁVIO BARCELLOS CARDOSO

**COMPOSIÇÃO DE Δ^5 -ESTERÓIS, ATIVIDADE DE H⁺-ATPASE E
EXSUDAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS EM DOIS GENÓTIPOS
DE MILHO, SUBMETIDOS A NÍVEIS TÓXICOS DE ALUMÍNIO**

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Fisiologia Vegetal, para
obtenção do título de *Doctor
Scientiae*.

APROVADA: 18 de outubro de 2013.

Prof. Juraci Alves de Oliveira
(Co-Orientador)

Prof. Cleberson Ribeiro
(Co-Orientador)

Prof^a. Hermínia Emília Prieto Martinez

Prof. Paulo Henrique Pereira Peixoto

Prof. José Cambraia
(Orientador)

“É melhor tentar, que preocupar-se e ver a vida passar. É melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final”.

Martin Luther King

Deus, luz dos bons caminhos;
Aos meu pais, Maria da Graça e Laércio,
pela confiança e pelo apoio incondicional
às decisões da minha vida;
Aos meus irmãos, Patrick e Vinicius;
Ao meu lindo e amado sobrinho Igor.

AGRADECIMENTOS

A Deus;

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fisiologia Vegetal pela oportunidade concedida;

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de estudo;

Ao Prof. José Cambraia, por me acolher e conduzir com serenidade e sabedoria ao título de doutor e pela forma especial de conviver com seus orientados, principalmente no meu caso, por ser o último orientado;

Aos professores Juraci Alves de Oliveira, Cleberson Ribeiro e a Prof^ª. Hermínia Emília Prieto Martinez da UFV, e, ao Prof. Paulo Henrique Pereira Peixoto, da Universidade Federal de Juiz de Fora, pelas críticas e sugestões apresentadas;

Ao Prof. Fabio Murilo DaMatta, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal – UFV, pelos conselhos, pelo incentivo e principalmente pela amizade;

Ao técnico José Bhering, sem o qual eu jamais teria conseguido conduzir meus experimentos ao longo de todo o meu doutorado. Sua amizade será eterna. Muito obrigado;

A estudante do curso de Biologia – UFV e estagiária, Isabela, pela amizade, companheirismo, carinho, risadas no laboratório por conta do Bhering e Carlos e, principalmente, pela ajuda incansável no laboratório. Meu muito obrigado;

Aos amigos de curso Adnan, Fernanda Farnese, Fernanda Vidal, Cristiane, Regiane, Alyne, Tânia e Alice Godoy pela ajuda na hora de montar e desmontar meus experimentos. Sou eternamente grato a todos;

A Patricia que nessa reta final foi amiga, companheira e conselheira em todos os momentos, principalmente, nas horas de desesperos por experimentos que não deram certos quando meu tempo já era curto. E por escutar meus desabaços com muita paciência e sempre me dando bons conselhos e me acalmando. Jamais esquecerei o que você fez por mim;

Aos colegas de curso, pelo apoio e pela amizade;

Aos funcionários do Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da UFV, em especial a Karla Ribeiro que se disponibilizou a ajudar;

Aos colegas de república que tive ao longo desses 9 anos de Viçosa, Reinaldo Lopes Morata, Aldo Narici, Davi Dornellas, Lívio Guilherme, Aurélio Vaz de Melo, Leandro Torrez, Heder Braun, Tarso Murilo, João Vitor e Caio Hotz, pelos incentivos e companheirismo;

Aos amigos do Futebol da Violeira que me acolheram ao longo desses 9 anos com muita amizade e companheirismo.

BIOGRAFIA

FLÁVIO BARCELLOS CARDOSO - filho de Laércio Inácio Cardoso e Maria da Graça Barcellos Cardoso - nasceu em 3 de novembro de 1979, na cidade de Brasília, Distrito Federal.

Iniciou o curso de Agronomia nas Faculdades Integradas da Terra de Brasília, em Brasília – DF no ano de 1999, colando grau em agosto de 2004.

Em agosto de 2005 iniciou o curso de Pós-Graduação em Fitotecnia na Universidade Federal de Viçosa, defendendo sua dissertação em 18 de julho de 2007.

Foi professor substituto da Universidade Federal de Viçosa, Campus Florestal, no ano de 2008, onde lecionou as disciplinas de Solos e Nutrição Mineral de Plantas e Máquinas e Mecanização Agrícola para o curso Técnico em Agropecuária.

Em março de 2009 iniciou o curso de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se a defesa de tese em 18 de outubro de 2013.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO GERAL	7
2.1. Objetivos específicos	8
3. MATERIAL E MÉTODOS	8
3.1 Obtenção do material vegetal e condições de crescimento	8
3.2 Efeito de diferentes concentrações de paclobutrazol sobre o alongamento radicular	9
3.3 Determinação dos efeitos do alumínio e do paclobutrazol sobre o alongamento radicular	10
3.4 Determinação dos teores de alumínio em ápices radiculares	10
3.5 Localização histoquímica do alumínio nas raízes	10
3.6. Determinação do efeito do alumínio e do paclobutrazol sobre a composição de esteróis	11
3.6.1. Extração e quantificação dos Δ^5 -esteróis	11
3.7 Determinação do efeito do alumínio e do paclobutrazol sobre o extravasamento de eletrólitos pela membrana plasmática	12
3.8 Determinação do efeito do alumínio e do paclobutrazol sobre os teores de ácidos orgânicos em ápices radiculares e sobre a exsudação de ácidos orgânicos para a solução externa	13
3.9 Determinação do efeito do alumínio e do paclobutrazol sobre a atividade da H^+ -ATPase em frações purificadas de membrana plasmática	14
3.9.1. Isolamento e purificação de membranas plasmática de ápices radiculares	15
3.9.2. Determinação da atividade da H^+ -ATPase	16
3.9.3. Avaliação " <i>in vivo</i> " do efluxo de prótons	16
3.10 Delineamento experimental e análise estatística	17
4. RESULTADOS	18
4.1 Efeitos do alumínio e do paclobutrazol sobre o alongamento radicular	18
4.2 Teores de alumínio nos ápices radiculares	20
4.3 Acúmulo e localização do alumínio em ápices radiculares pela técnica da hematoxilina	21
4.4 Efeitos do alumínio e do paclobutrazol sobre os teores de esteróis em ápices radiculares	22
4.5 Efeitos do alumínio e do paclobutrazol sobre o extravasamento de eletrólitos totais	27

4.6 Efeito do alumínio e do paclobutrazol sobre os teores de ácidos orgânicos em ápices radiculares e sobre a exsudação desses ácidos para a solução de cultivo... 28	
4.7 Efeito do alumínio e do paclobutrazol sobre a atividade da H ⁺ -ATPase em frações purificadas de membrana plasmática isoladas de pontas de raízes 36	
4.8 Efeito do alumínio e do paclobutrazol sobre o efluxo de prótons em plantas intactas..... 37	
5. DISCUSSÃO.....	39
6. RESUMO E CONCLUSÕES.....	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

RESUMO

CARDOSO, Flávio Barcellos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2013. **Composição de Δ^5 -esteróis, atividade de H^+ -ATPase e exsudação de ácidos orgânicos em dois genótipos de milho, submetidos a níveis tóxicos de alumínio.** Orientador: José Cambraia. Coorientadores: Juraci Alves de Oliveira e Cleberson Ribeiro.

Neste trabalho, plântulas de dois genótipos de milho com tolerância diferencial ao alumínio (Al), UFVM-100 (sensível) e UFVM-200 (tolerante), foram expostas ao Al, nas concentrações de 0 e 50 μ M, e ao paclobutrazol (PBZ), nas concentrações de 0 e 0,6 μ M, aplicados isoladamente ou em combinação, em solução de $CaCl_2$ 0,5 mM, pH 4,0. Após 24 horas, avaliaram-se os efeitos do Al e, ou do PBZ sobre o crescimento radicular, o acúmulo/localização do Al, o extravasamento de eletrólitos totais, a exsudação de ácidos orgânicos para a solução externa, os teores de esteróis e de ácidos orgânicos e a atividade da H^+ -ATPase de membrana plasmática de pontas de raízes. O tratamento das plântulas com Al resultou em maior acúmulo desse elemento nas raízes do genótipo UFVM-100 e, também, em maior inibição no alongamento da raiz principal nesse genótipo. Observou-se, também, redução nos teores de campesterol, estigmasterol e β -sitosterol e nos teores totais dos Δ^5 -esteróis nos ápices radiculares dos dois genótipos de milho, mas com maior intensidade no genótipo UFVM-100. O extravasamento de eletrólitos, também, foi maior nesse genótipo. Os teores de ácido cítrico e málico nas raízes foram aproximadamente iguais nos dois genótipos, mas a exsudação de ácido cítrico foi maior no genótipo UFVM-200, enquanto a de ácido málico foi maior no genótipo UFVM-100. A exsudação total de ácidos orgânicos pelas raízes, entretanto, foi consideravelmente maior no genótipo UFVM-200. A atividade da H^+ -ATPase sofreu redução no genótipo UFVM-100, mas aumento no genótipo UFVM-200. A excreção de prótons foi similar nos dois genótipos em todos os tratamentos, exceto no tratamento combinado de Al + PBZ em que foi maior no genótipo UFVM-200. Nesse tratamento observou-se aumento no teor de Al nos ápices radiculares e na inibição do alongamento radicular apenas no genótipo UFVM-200, eliminando as diferenças entre os dois genótipos. Nessa mesma condição, também, observou-se redução nos teores de campesterol, estigmasterol, β -sitosterol e teores totais dos Δ^5 -esteróis nos dois genótipos.

Como essa redução foi maior no genótipo UFVM-200, as diferenças que existiam na presença apenas do Al desapareceram. O tratamento combinado de Al + PBZ ocasionou aumento no extravasamento de eletrólitos no genótipo UFVM-200 e pequena redução no genótipo UFVM-100, diminuindo a diferença entre esses dois genótipos em relação ao tratamento apenas com Al. Além disso, o tratamento com Al + PBZ aumentou o teor de ácido cítrico apenas no genótipo UFVM-100 e de ácido málico nos dois genótipos. Nessa mesma condição ocorreu aumento na exsudação de ácido cítrico nos dois genótipos e de ácido málico apenas no genótipo UFVM-200. A exsudação desses ácidos orgânicos, entretanto, foi menor quando comparada à exsudação observada no tratamento com apenas Al. A atividade da H^+ -ATPase aumentou nos dois genótipos, sendo o aumento maior no genótipo UFVM-200. Na presença apenas de Al, o genótipo UFVM-200 apresentou menores teores deste elemento nos ápices radiculares, menor inibição no crescimento da raiz principal, maiores teores dos esteróis campesterol, estigmasterol e β -sitosterol na membrana plasmática e maior atividade da H^+ -ATPase e, paralelamente, aumento na exsudação de ácido cítrico, indicando que este genótipo possui mecanismos de tolerância ao Al mais eficientes. O tratamento com PBZ, na presença de Al, de modo geral, reduziu a tolerância do genótipo UFVM-200 ao Al em relação ao genótipo UFVM-100.

ABSTRACT

CARDOSO, Flávio Barcellos, D.Sc, Universidade Federal de Viçosa, october, 2013. **Δ^5 -sterol composition and H⁺-ATPase of plasma membrane and organic acid root exudation by two maize genotypes, exposed to toxic levels of aluminum.** Adviser: José Cambraia. Co-Advisers: Juraci Alves de Oliveira and Cleberson Ribeiro.

In this study, seedlings of two maize genotypes with differential tolerance to aluminum (Al), UFVM-100 (sensitive) and UFVM-200 (tolerant) were exposed to 0 or 50 μ M Al and 0 or 0.6 μ M paclobutrazol (PBZ), applied solely or in combination, in 0.5 mM CaCl₂, pH 4.0. After 24 hours, the effects of Al and/or PBZ treatment were evaluated on root elongation, Al accumulation/localization, total electrolyte leakage, organic acids exudation to the external solution and Δ^5 -sterols and organic acids contents and H⁺-ATPase activity of plasma membranes of roots tips. Seedlings of the UFVM-100 treated with Al showed higher Al content in the roots and also lower root elongation. Campesterol, stigmasterol, β -sitosterol and total Δ^5 -sterols contents decreased in the root tips of both maize genotypes, but with higher intensity in the UFVM-100 genotype. The total electrolyte leakage was also higher in this genotype. The citric and malic acid contents in the roots were similar in the two genotypes, but citric acid exudation was higher in the UFVM-200 genotype, while malic acid exudation was higher in the UFVM-100 genotype. Nevertheless, the roots of the UFVM-200 genotype exuded higher amount of total organic acid to the growth medium. The activity of the H⁺-ATPase decreased in the UFVM-100, but increased in the UFVM-200 genotype. The proton excretion by the roots was similar in both genotypes, increasing only in UFVM-200 after exposure to the Al + PBZ treatment. Under this treatment it was observed also an increase in Al contents in the root tips and inhibition of root elongation only in the UFVM-200 eliminating genotype differences. Under this condition, campesterol, stigmasterol, β -sitosterol and total Δ^5 -sterols contents decreased in both genotypes. Since these reductions were greater in the UFVM-200, genotypes differences observed in plants treatment with solely Al disappeared. The electrolyte leakage increased in the UFVM-200 but decreased in the UFVM-100 genotype in response to the combined treatment Al + PBZ, reducing the genotypic differences. The Al + PBZ treatment increased the citric and malic

acid contents in the root apices in both genotypes. Under this treatment, there was an increase in citric acid in both genotypes but of malic acid only in the UFVM-100 genotype. The total exudation of these organic acids, however, was lower than in the presence of solely Al. The activity of H⁺-ATPase increased in both genotypes, mainly in the UFVM-200 genotype. In the presence only of Al, the UFVM-200 genotype showed lower Al contents in the root tips, higher root elongation, higher campesterol, stigmasterol and β-sitosterol contents and higher H⁺-ATPase activity and also higher citric acid exudation, exhibiting a more efficient mechanism of Al tolerance. In general, plant treatment with PBZ reduced the Al-tolerance of the UFVM-200 genotype relative to the UFVM-100 genotype.

1. INTRODUÇÃO

A toxidez por alumínio (Al) é um fator limitante para o crescimento e desenvolvimento das plantas em solos ácidos (Horst et al., 2010). No Brasil, mais de 50% dos solos agricultáveis são ácidos e apresentam níveis elevados de Al, resultando em perdas significativas na produtividade das culturas (Lopes e Guilherme, 1994).

O Al é o metal mais abundante e o terceiro elemento mais comum na crosta terrestre (Kochian, 1995), correspondendo a aproximadamente 7% da massa total do planeta (Delhaize e Ryan, 1995). A toxidez por Al nos sistemas aquáticos e terrestres, entretanto, não está correlacionada com a concentração total de Al (7% dos solos minerais), mas sim, com a concentração da fração solúvel e biologicamente ativa.

A maior parte do Al nos solos existe nas formas de alumino-silicatos e, ou óxidos que em $\text{pH} \leq 4,5$ se solubiliza, atingindo concentrações tóxicas na solução do solo (Ma e Furukawa, 2003). Entre as espécies solúveis de Al na solução do solo estão às formas inorgânicas monoméricas, em particular a forma trivalente do Al (Al^{3+}), sendo considerada a mais fitotóxica (Kinraide et al. 1992).

Os primeiros efeitos da toxidez por Al ocorrem logo após exposição das plantas a concentrações tóxicas desse metal (Horst et al., 2010), seguindo-se efeitos secundários que se manifestam após várias horas ou dias depois (Doncheva et al., 2005).

O sintoma primário e mais evidente da toxicidade por Al em plantas é a inibição do alongamento radicular (Matsumoto, 2000). O ápice da raiz, especificamente, a região da zona de transição, é apontado como o local primário das injúrias causadas pelo Al (Sivaguru e Horst, 1998; Kollmeier et al., 2000). Como o primeiro contato do Al com as plantas se faz através das raízes, os sintomas de sua toxicidade se expressam neste órgão de forma mais acentuada, produzindo raízes curtas, grossas e quebradiças, com poucas ramificações finas e pouco eficientes na absorção de água e nutrientes do solo.

Segundo Le Van et al. (1994), na parede celular o Al pode se ligar aos grupos carboxílicos das pectinas e das proteínas causando aumento na

concentração de polissacarídeos da parede celular. Recentemente, foi demonstrado que cerca de 75% de todo o Al adsorvido à parede celular está ligado à fração hemicelulose (HC1) (Yang et al., 2011), resultando em diminuição na extensibilidade da parede celular e, conseqüentemente inibição no alongamento radicular (Ma et al., 2004).

O Al, entretanto, afeta não somente as propriedades da parede celular, mas, também, as da membrana plasmática (Ishikawa e Wagatsuma, 1998). A membrana plasmática, rica em fosfolipídios, é alvo potencial da ação tóxica do alumínio. O Al interage com lipídios e proteínas da membrana modificando sua estrutura molecular, aumentando a densidade de empacotamento dos lipídios e, conseqüentemente, sua rigidez (Krtková et al., 2012) e, portando, reduzindo sua fluidez (Chen et al., 1991; Verstraeten et al., 2002). Há, em consequência disso, aumento na permeabilidade das membranas, tornando possível a passagem de não-eletrólitos e de permeadores lipídicos (Zhao et al., 1987).

A ligação do Al na membrana plasmática, também, altera a negatividade de sua superfície (Kinraide, 2006) causando rápida despolarização (Ahn et al., 2004; Bose et al., 2010). Isso pode estar relacionado à inibição da atividade da H⁺-ATPase, impedindo a formação e manutenção do gradiente de prótons (Ahn et al., 2001; Ahn et al., 2004), ou ao aumento do influxo de H⁺ através da membrana plasmática do meio externo para o interior da célula (Bose et al., 2010).

Embora Sasaki et al., (1995) tenham observado decréscimo na atividade da H⁺-ATPase da membrana plasmática de raízes de trigo tratadas com Al, eles não observaram diferenças entre cultivares tolerantes e sensíveis. Em experimentos com cevada, os autores sugeriram a formação de uma camada carregada positivamente em torno da membrana, o que permitiria o transporte de ânions (Nichol et al., 1993). Neste mesmo trabalho, foi observado, ainda, maior despolarização do potencial de membrana com o aumento da concentração interna citossólica de Al no cultivar tolerante comparativamente ao sensível.

Os mecanismos de tolerância ao Al em plantas superiores ainda não foram completamente elucidados e, até o momento, têm sido classificados em duas categorias, os de exclusão e os de tolerância. Nos mecanismos de

exclusão, o Al é 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 do aumento do pH da rizosfera (Yang et al., 2011), ou, ainda, ao ser complexado por compostos orgânicos produzidos e exsudados pelas plantas (Ma et al., 2001; Shen et al., 2002; Ying Li et al., 2009), antes dele alcançar o simplasma.

Nos mecanismos de tolerância ou mais recentemente denominados de “mecanismos de tolerância interna”, embora o Al alcance o simplasma, ele é imobilizado ou complexado por ácidos orgânicos e, ou compostos fenólicos e, ou compartimentalizado ou, então, ocorrem mudanças no metabolismo da planta para desenvolver tolerância a esse íon (Kochian et al., 2004).

Dentre os mecanismos de exclusão, o mais aceito atualmente envolve a biossíntese e exsudação de certos ácidos orgânicos, principalmente malato, citrato e oxalato (Kochian et al., 2004). Esses ácidos orgânicos seriam capazes de complexar a forma monomérica e mais tóxica do Al, diminuindo ou eliminando sua fitotoxicidade. Confirmando essa hipótese, vários trabalhos mostram elevada correlação entre a exsudação de ácidos orgânicos por ápices radiculares em diferentes espécies de plantas com tolerância ao Al (Ma, 2007; Stass et al., 2008; Ying Li et al., 2009; Liu et al., 2009).

Alguns estudos fisiológicos foram conduzidos, na tentativa de compreender a natureza da exsudação de ácidos orgânicos em raízes de plantas sob estresse por Al (Ma et al. 2001; Kochian et al., 2005). A exsudação de ácidos orgânicos, principalmente citrato, malato e oxalato, por raízes de plantas submetidas a estresse por Al, tem recebido aceitação generalizada de ser o principal mecanismo de tolerância ao Al em plantas. Em relação ao tempo de exposição ao Al e à concentração desse metal, as plantas podem apresentar diferenças entre as formas de ácidos orgânicos exsudados e o tipo de padrão de exsudação (Ma, 2000). Além disso, em resposta ao Al, algumas espécies de plantas tolerantes podem exsudar mais de um tipo de ácido orgânico (Dong et al., 2008; Khan et al., 2009a; Yang et al., 2011b).

A exsudação dos ácidos orgânicos é mediada por canais aniônicos ou transportadores (Sasaki et al., 2004). Aparentemente, cada ácido orgânico utiliza um canal específico, podendo existir mais de um canal na membrana

para estabelecer o mecanismo de tolerância da espécie. No caso do trigo, por exemplo, sugere-se o funcionamento de um canal para malato e um canal para citrato (Ryan et al., 2009). Recentemente, foram descobertos transportadores da família “MATE” (Multi-antimicrobial extrusion protein) que podem estar envolvidos na exsudação de citrato e, ou malato (Sasaki et al., 2004; Furukawa et al., 2007; Wang et al., 2007; Magalhães et al., 2010).

A exsudação de ácidos orgânicos para o apoplasto pode se dar basicamente de dois modos. Quando ocorre imediatamente após a exposição das plantas ao Al é chamada exsudação “padrão I”, que, segundo alguns autores, requer apenas a ativação de canais aniônicos preexistentes na membrana plasmática (Ma et al., 2001), não sendo necessária a indução de genes para síntese de novos transportadores (Ma, 2005). Quando a exsudação do ácido orgânico ocorre algum tempo depois, às vezes até várias horas, após a exposição das plantas ao Al, considera-se que ela segue o “padrão II”. Admite-se que, neste caso, ocorre síntese *de novo* de proteínas, provavelmente, envolvidas no metabolismo ou no transporte dos ácidos orgânicos (Ma, 2000).

A H⁺-ATPase da membrana plasmática regula a homeostase de íons e o fluxo de H⁺. Ela é uma enzima essencial para a sobrevivência das plantas sob várias condições de estresse, incluindo por Al. Pesquisas têm demonstrado sua participação também na regulação do pH da rizosfera (Ahn et al. 2002; Yang et al., 2011). Embora os mecanismos de tolerância das plantas ao Al ainda não sejam totalmente compreendidos, relatos da literatura sugerem a inibição da atividade da H⁺-ATPase *in vitro* e *in vivo* por esse metal (Cabraia e Calbo, 1980; Sasaki et al., 1995).

Vários autores verificaram que a aplicação do Al diretamente ao meio de reação resulta em inibição da atividade da H⁺-ATPase em raízes de diversas culturas como milho (Façanha e de Meis, 1995), sorgo (Cabraia e Calbo, 1980), trigo (Ahn et al., 2002 e Yang et al., 2011), soja (Kim et al., 2010) e beterraba (Lindberg e Griffiths, 1993). Segundo considerações de Lindberg e Griffiths (1993), a inibição da atividade da H⁺-ATPase é, aparentemente, decorrente da ligação do Al ao complexo enzima-substrato via resíduos -SH do sítio ativo e, também, aos fosfolipídios das membranas, o que provoca

alterações no microambiente da enzima e, conseqüentemente, modificações na conformação e na atividade enzimática.

Mais recentemente, várias pesquisas têm procurado correlacionar os efeitos do Al sobre a estrutura e função das membranas com sua composição lipídica. Tanto a análise dos lipídios da membrana plasmática (Huynh et al., 2012) quanto a utilização de inibidores da biossíntese de esteróis indicam que a composição de lipídios da membrana plasmática desempenha importante função na tolerância ao Al (Khan et al., 2009b).

Em um estudo realizado com dois cultivares de sorgo submetido a níveis tóxicos de Al, diferenças foram observadas quanto à composição dos ácidos graxos da membrana plasmática, às relações ácido graxo insaturado/saturado, ácido linoléico/ácido palmítico (C18:2/C16:0) e ácido linoleico/ ácido linolênico (C18:2/C18:3), e ao índice de ligações duplas, indicando redução na fluidez dos lipídios da membrana plasmática no cultivar sensível, mas, em contraste, aumento no cultivar tolerante ao Al (Peixoto et al., 2001).

Os esteróis vegetais, denominados fitosteróis, constituem fração importante dos lipídios de membrana e acredita-se que eles possam influenciar diretamente na estabilidade da bicamada de lipídios durante perturbações físico-químicas da membrana (Piironen et al., 2000). Os representantes mais comuns dos fitosteróis são o β -sitosterol, o estigmasterol e o campesterol (Fig. 1). A maioria dos esteróis de plantas apresenta uma ligação Δ^5 , isto é, uma ligação dupla no carbono 5, sendo comumente chamados de Δ^5 -esteróis.

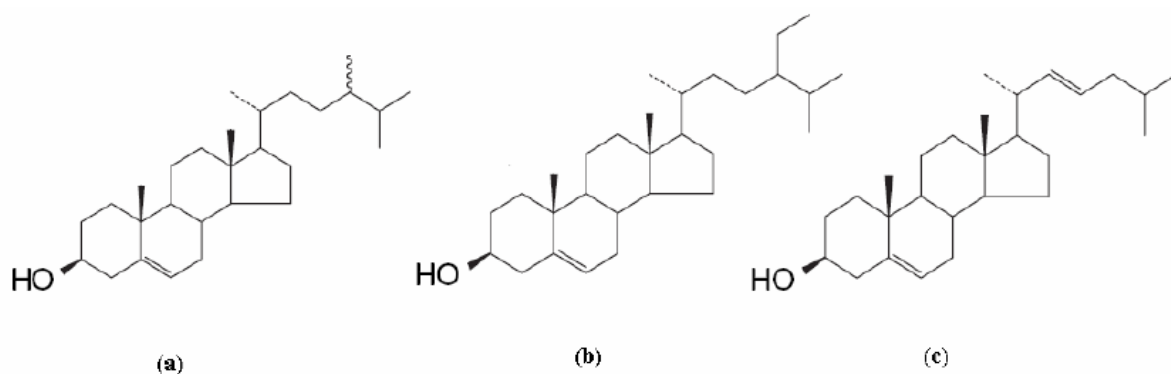


Figura 1. Esteróis mais comuns em plantas: (a) Campesterol; (b) Sitosterol; (c) Estigmasterol

Resultados recentes realizados com arroz indicam que a quantidade relativa de Δ^5 -esteróis é importante fator na tolerância ao AI (Khan et al., 2009a). O cultivar tolerante (Rikuu-132) apresentou menor relação fosfolípido/ Δ^5 -esterol do que o cultivar sensível (Rikuu-20) indicando que a membrana plasmática do tolerante estava com menor intensidade de cargas negativas e menos permeável do que o sensível. Zhang et al. (1997), também, mostraram que em um cultivar de trigo tolerante ao AI houve redução da relação fosfolípido/ Δ^5 -esterol, enquanto no sensível nenhum efeito do AI foi observado. Em face ao limitado conhecimento em relação à influência da composição lipídica nas funções das membranas, segundo os autores, estabelecer uma correlação entre a toxicidade e, ou tolerância das plantas ao AI com as mudanças observadas na composição dos Δ^5 -esteróis é muito difícil.

Recentemente foi verificado que o paclobutrazol e outros triazóis reduziram a tolerância de um cultivar tolerante de arroz (Khan et al., 2009b) e que esta ação pode estar ligada ao seu efeito sobre abundância relativa de Δ^5 -esteróis na membrana plasmática de pontas de raízes (Khan et al., 2009a).

Os triazóis destacam-se um grupo de compostos desenvolvidos para o controle de fungos, mas que têm sido usados como retardantes de crescimento vegetal.

Dentre os triazóis existentes, o paclobutrazol (PBZ) [(2RS,3RS)-1-(4-clorofenil)-4, 4-dimetil-2-(1,2,4- triazol)-3-pentanol] e o uniconazol são os produtos mais efetivos em retardar o crescimento de plantas (Fletcher et al., 2000).

O PBZ interfere na atividade da ent-kaureno oxidase na via de oxidação do ent-kaureno, levando a uma diminuição nos níveis endógenos de giberelinas biologicamente ativas (Rademacher, 2000). Além disso, o PBZ inibe fortemente a isomerase do ciclopropil esterol que catalisa a abertura do anel ciclopropano do cicloeucalenol essencial para a biossíntese de esteróis (Benaviste, 2004).

Desde sua descoberta o PBZ tem sido amplamente estudado na agricultura e seus efeitos têm sido relatados em inúmeras espécies vegetais, com diferentes padrões de crescimento. O PBZ pode reduzir o alongamento do caule função da inibição da biossíntese de ácido giberélico (Rademacher,

2000), inibir a síntese de clorofila (Still e Pill, 2004) e modificar a partição de fotoassimilados (Tekalign e Hammes, 2005). Dependendo da espécie vegetal e da concentração aplicada, o PBZ pode, também, induzir modificações anatômicas na raiz (Tsegaw et al., 2005).

Apesar de vários trabalhos terem demonstrado a importância da membrana plasmática e da sua composição lipídica e, ou da produção e, ou exsudação de ácidos orgânicos para a solução de cultivo como fatores fundamentais na tolerância diferencial das plantas ao Al, ainda não se conhece o modo como esses fatores se relacionam em espécies de valor econômico como o milho, principalmente em genótipos nacionais. Como o PBZ interfere na biossíntese de esteróis e na tolerância ao Al, a presente pesquisa, portanto, teve como objetivo investigar as possíveis interrelações entre Al e PBZ e suas consequências sobre a composição lipídica, especialmente em esteróis, a atividade de H⁺-ATPase e a exsudação de ácidos orgânicos em ápices radiculares de plântulas de dois genótipos de milho com tolerância diferencial ao Al.

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo do trabalho foi verificar a influência do Al e do PBZ sobre a composição de Δ^5 -esteróis, a atividade da H⁺-ATPase da membrana plasmática em ápices radiculares e a produção e exsudação de ácidos orgânicos em dois genótipos de milho com tolerância diferencial ao Al: UFVM-100 (sensível) e UFVM-200 (tolerante), na expectativa de contribuir para o esclarecimento dos mecanismos de tolerância ao Al.

2.1. Objetivos específicos

Os objetivos específicos foram avaliar os efeitos do Al isoladamente e, ou combinado com o PBZ sobre o (a):

- 1) Crescimento da raiz principal;
- 2) Localização histoquímica do Al em ápices radiculares;
- 3) Composição de Δ^5 -esteróis em ápices radiculares;
- 4) Extravasamento de eletrólitos;
- 5) Produção/acúmulo de ácidos orgânicos em ápices radiculares e exsudação para a solução externa;
- 6) Atividade da bomba de prótons (H^+ -ATPase) em frações purificadas da membrana plasmática, isoladas de ápices radiculares;
- 7) Efluxo de prótons.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do material vegetal e condições de crescimento

Nos experimentos foram utilizados dois genótipos de milho (*Zea mays* L.) com tolerância diferencial ao Al: UFVM-100 e UFVM-200, considerados sensível e tolerante ao Al, respectivamente, fornecidos pelo Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, MG.

As sementes, selecionadas quanto ao tamanho e forma, foram tratadas com ácido sulfúrico 70% (v/v) durante 1 minuto para acelerar a germinação e lavadas em água desmineralizada. Em seguida, as sementes foram desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio 3% (v/v) por 15 minutos, sendo lavadas, novamente, em água desmineralizada. As sementes foram, então, colocadas para germinar em cartuchos de papel “germiteste”, pH

neutro, mergulhados em solução de CaCl_2 0,5 mM, pH 4,0, em câmara úmida a 25 °C. Cinco dias após a semeadura, as plântulas foram selecionadas, quanto à uniformidade de tamanho e forma, e transplantadas para recipientes de polietileno contendo solução de CaCl_2 0,5 mM, pH 4,0, e submetidas aos tratamentos. O cultivo das plantas, tanto na fase preliminar quanto durante a aplicação dos tratamentos, foi realizado em sala de crescimento com temperatura controlada (25 ± 1 °C), sob irradiância de $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas.

3.2 Efeito de diferentes concentrações de paclobutrazol sobre o alongamento radicular

Nos experimentos, foi utilizado o PBZ [(2RS,3RS)-1-(4-clorofenil)-4, 4-dimetil-2-(1,2,4- triazol)-3-pentanol] (Fig. 2), da marca GAMASOLUB. Para o preparo do PBZ (0,6; 1,2 e 1,8 μM), o mesmo foi dissolvido em água morna desmineralizada, sob agitação constante.

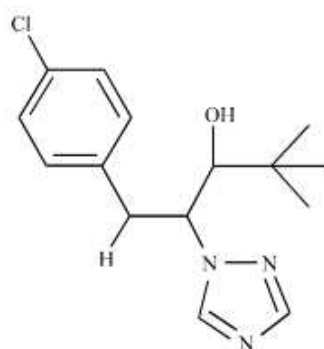


Figura 2 – Estrutura química do 2RS, 3RS-Paclobutrazol.

Plântulas dos dois genótipos de milho obtidas e selecionadas conforme item 3.1 foram transferidas, em número de quatro para vasos de polietileno contendo 1,2 L de solução de CaCl_2 0,5 mM, pH 4,0, e submetidas aos tratamentos com paclobutrazol nas concentrações: 0, 0,6, 1,2 e 1,8 μM , durante 24 h. O comprimento da raiz principal foi mensurado imediatamente antes e após o tratamento das plântulas e o resultado expresso na forma de alongamento relativo (%controle).

3.3 Determinação dos efeitos do alumínio e do paclobutrazol sobre o alongamento radicular

Visando minimizar as diferenças entre os dois genótipos, a concentração de PBZ 0,6 μM foi utilizada nos estudos subsequentes.

Plântulas dos dois genótipos de milho obtidas e selecionadas conforme item 3.1 foram transferidas, em número de quatro para vasos de polietileno contendo 1,2 L de solução de CaCl_2 0,5 mM, pH 4,0, e submetidas por 24 horas aos seguintes tratamentos: controle (CaCl_2 0,5 mM, pH 4,0), controle + paclobutrazol 0,6 μM , controle + AlCl_3 50 μM , controle + paclobutrazol 0,6 μM + AlCl_3 50 μM . O alongamento radicular relativo foi avaliado conforme descrito no item 3.2.

3.4 Determinação dos teores de alumínio em ápices radiculares

Ápices radiculares de aproximadamente 1 cm, pesando cerca de 0,2 g de massa fresca, removidos de plântulas que receberam os tratamentos descritos no item 3.3, foram incubados em 4 mL de solução de HCl 2 M por 48 horas (Wang e Yang, 2005). As amostras foram filtradas e o teor de Al no extrato foi, então, determinado por espectrofotometria óptica com plasma indutivamente acoplado – ICP-OES, no comprimento de onda 394,401 nm. As concentrações foram estimadas com base em curva de calibração.

3.5 Localização histoquímica do alumínio nas raízes

Após exposição aos tratamentos durante 24 h (item 3.3), foram selecionadas, aleatoriamente, seis plântulas, cujas raízes foram mergulhadas em solução de hematoxilina férrica 0,2% (m/v) em KIO_3 0,02% (m/v), durante 15 minutos (Polle et al., 1978). As raízes foram, então, lavadas em água

desmineralizada, sob aeração, por 15 minutos, secas em papel absorvente e analisadas e fotografadas em estereomicroscópio (Zeiss Stemi, modelo DV4).

3.6. Determinação do efeito do alumínio e do paclobutrazol sobre a composição de esteróis

Plântulas dos dois genótipos de milho, expostas aos tratamentos conforme descrito no item 3.3, durante 24 h, tiveram os ápices radiculares removidos (aproximadamente 1 cm), perfazendo 1,0 g de massa fresca, os quais foram armazenados em ultrafreezer a -70°C até o momento das análises.

3.6.1. Extração e quantificação dos Δ^5 -esteróis

A extração de Δ^5 -esteróis foi realizada conforme descrito por Toivo et al., (2001) com pequenas modificações. As amostras de 1 g de ápices radiculares foram homogeneizadas em nitrogênio líquido. Em seguida, adicionou-se 2 mL de etanol absoluto contendo 50 μg de α -colestano (padrão interno), completando-se a homogeneização. O homogeneizado foi transferido para tubo de ensaio, contendo 5 mL de HCl 6 N, agitou-se por 1 min e incubou-se em banho-maria a 80°C , por 1 h, sob agitação constante. Decorrido este tempo e com o tubo já resfriado, adicionou-se 5 mL de etanol absoluto, seguido de agitação mecânica, adição de 10 mL da mistura hexano-éter dietílico (1:1; v/v) e nova agitação por 10 min. Uma alíquota de 7 mL da fase orgânica superior foi removida e evaporada até seca a 40°C sob jato de nitrogênio. A fase orgânica foi redissolvida em 8 mL de pirogalol 3% (p/v) em etanol absoluto, adicionou-se 0,5 mL de KOH 1,3% (w/v) e incubou-se em banho-maria, sob agitação, a 80°C , por 10 min. Com o tubo já frio, adicionou-se 10 mL de ciclohexano e 6 mL de água desmineralizada agitando-se bem e centrifugando-se em seguida a 1000 xg por 10 minutos. Após a centrifugação, foram removidas alíquotas de 8 mL da fase orgânica as quais foram evaporadas até seca a 40°C , sob jato de nitrogênio. Em seguida foram adicionados 100 μL

de piridina, 100 µL de BSTFA (N,O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida) – TMCS (trimetilclorosilano) (99:1) e 300 µL de DCM (diclorometano).

Os Δ^5 -esteróis foram determinados injetando-se 1,0 µL de amostra em cromatógrafo a gás, Shimadzu (Tóquio, Japão), modelo GC2014, equipado com detector de ionização de chama. Na separação cromatográfica foi utilizada coluna capilar Rtx-5 (5% difenil / 95 % dimetil polisiloxano) (Restek), de 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno. As temperaturas do injetor, da coluna (isotérmica) e detector foram: 305, 300 e 305°C, respectivamente. Nitrogênio ultra puro foi utilizado como gás de arraste, na velocidade linear de 31,2 cm/s, fluxo total de 20,1 mL/min e razão de “split” de 1:18. As concentrações dos Δ^5 -esteróis nas amostras foram estimadas por comparação com padrões autênticos Sigma-Aldrich e expressas em µmol g⁻¹ MF de ápices radiculares.

3.7 Determinação do efeito do alumínio e do paclobutrazol sobre o extravasamento de eletrólitos pela membrana plasmática

Amostras de 0,2 g de ápices radiculares, de aproximadamente 1 cm, removidos de plântulas dos dois genótipos de milho, após exposição por 24 horas aos tratamentos, conforme descritos no item 3.3, foram lavadas cinco vezes em água desmineralizada e, imersos em 10 mL de água desmineralizada, em tubos com tampa rosqueada, onde permaneceram por 6 h à temperatura ambiente. A condutividade da solução externa foi, então, medida com condutímetro Digimed, modelo DM31 (Santo Amaro, Brasil), representando o extravasamento inicial de eletrólitos. Em seguida, os tubos foram incubados à temperatura de 90 °C, por 2 h. Após o resfriamento, a condutividade da solução externa foi novamente medida, representando o extravasamento total de eletrólitos. O extravasamento relativo de eletrólitos, estimado pela razão entre o extravasamento inicial e total, foi expresso na base percentual em relação ao extravasamento inicial.

3.8 Determinação do efeito do alumínio e do paclobutrazol sobre os teores de ácidos orgânicos em ápices radiculares e sobre a exsudação de ácidos orgânicos para a solução externa

Plântulas dos dois genótipos de milho, obtidas e selecionadas conforme item 3.1 foram transferidas em número de dez para vasos de polietileno contendo 250 mL de solução de CaCl_2 0,5 mM, pH 4,0, e submetidas aos tratamentos conforme item 3.3. No início (tempo zero) e no final do tratamento (24 h após) as plantas foram removidas e lavadas sucessivamente em HCl 0,1 N, em água corrente e desmineralizada. As raízes foram, então, fragmentadas e tratadas com 30 mL de etanol 80 % (v/v) fervente e, em seguida, armazenadas em freezer a -20°C , até o momento das análises químicas. As soluções de cultivo foram coletadas, liofilizadas e, posteriormente, retomadas em 3 mL de água desmineralizada, congeladas e armazenadas em freezer a -20°C .

As amostras vegetais, após descongelamento e homogeneização no próprio solvente de armazenamento (etanol 80%), passaram por um processo de remoção de lipídios e pigmentos (Cabraia et al., 1983). Então, os extratos foram liofilizados e retomados em 3 mL de etanol 80%. Os extratos vegetais e as soluções de cultivo tiveram o pH ajustado para 3, sendo em seguida, aplicados em coluna trocadora de cátions (Dowex AG50-WX8, 200-400 mesh, na forma H^+). Os eluatos foram aplicados em coluna trocadora de ânions (Dowex AG1-X8, 200-400 mesh, na forma de formato) (Cabraia et al., 1983). Nessa coluna, os ácidos orgânicos foram eluídos “em massa” com 20 mL de ácido fórmico 2 M. Os eluatos foram novamente liofilizados, retomados em 3 mL de etanol absoluto e receberam uma quantidade conhecida de ácido tartárico (0,666 μmol), que foi utilizado como padrão interno. Após evaporação até *secura*, os ácidos orgânicos foram transformados em derivados trimetilsililados por reação com 100 μL de piridina e 100 μL de bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA), durante 30 min à 50°C , sendo o volume completado para 0,5 mL com diclorometano (Jham et al., 2002).

Os ácidos orgânicos dos extratos de ápices radiculares ou das soluções de cultivo foram separados e quantificados por cromatografia em fase gasosa. Para isso, injetou-se 1 µL de amostra em cromatógrafo a gás, Shimadzu (Tóquio, Japão), modelo GC2014, equipado com detector de ionização de chama. Na separação cromatográfica foi utilizada coluna capilar Rtx-1 (100 % dimetil polisiloxano) (Restek) com 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno. A temperatura inicial da coluna foi de 100 °C (durante 2 min), aumentando 10°C/min até atingir a temperatura final de 250°C. As temperaturas do injetor e do detector foram ajustadas para 300°C. Nitrogênio ultra puro foi utilizado como gás de arraste, na velocidade linear de 31,2 cm/s, fluxo total de 10,2 mL/min e razão de “split” de 1:10.

As concentrações dos ácidos orgânicos nas amostras foram estimadas por comparação com padrões autênticos Sigma-Aldrich.

3.9 Determinação do efeito do alumínio e do paclobutrazol sobre a atividade da H⁺-ATPase em frações purificadas de membrana plasmática

Plântulas dos dois genótipos de milho, obtidas e selecionadas conforme item 3.1, após cinco dias da semeadura, foram transferidas em número de 160, para bandejas de polietileno contendo 13 L de solução de CaCl₂ 0,5 M, pH 4,0, e submetidas aos tratamentos conforme descrito no item 3.3 durante 24 h. Decorrido esse tempo, as raízes foram lavadas em água desmineralizada e secas em papel toalha para retirar o excesso de água da superfície das raízes. Amostras de 1 g de ápices radiculares (aproximadamente 1 cm) foram removidos e armazenados em ultrafreezer a -70°C, até o momento do isolamento e purificação da fração de membranas plasmática.

3.9.1. Isolamento e purificação de membranas plasmática de ápices radiculares

Amostras de pontas de raízes (aproximadamente 1 cm) com 1 g de massa fresca, foram trituradas em almofariz de porcelana na presença de meio de homogeneização constituído de sacarose 250 mM, EDTA 2 mM e ditioneitol 1 mM em tampão de Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, na proporção de 6 mL/g de matéria fresca. O macerado foi filtrado através de quatro camadas de gaze e, posteriormente, centrifugado a 10.000 xg por 10 min, descartando-se o precipitado. O sobrenadante foi novamente centrifugado a 30.000 xg por 1 h, coletando-se, em seguida, o precipitado. O resíduo foi ressuspensão em 2,5 mL de meio de preparação constituído de sacarose 330 mM e KCl 3 mM em tampão de fosfato de potássio 5 mM, pH 7,8, originando a fração microsomal. Em seguida, 2,33 mL dessa fração foram adicionados a 7 g de um sistema aquoso de duas fases de polímeros preparado conforme Larsson et al. (1987) para ter a seguinte concentração final: Dextran T-500 6,2% (p/p), polietileno glicol (PEG-3350) 6,2% (p/p), sacarose 330 mM e KCl 3 mM em tampão de fosfato de potássio 5 mM, pH 7,8. O sistema foi misturado com 20 inversões do tubo e, em seguida, centrifugado a 1.500 xg por 5 min em rotor do tipo “balde-oscilante”. Aproximadamente 90% da fase superior (S₁) foi, cuidadosamente removida e adicionada a 4 mL de fase inferior (Larsson et al., 1987), misturada com 20 inversões do tubo e, em seguida, centrifugado a 1.500 xg por 5 min em rotor do tipo “balde-oscilante”. O esquema foi repetido por mais uma vez, obtendo-se a fase superior final S₃. À fase inferior da 1ª separação (que ainda continha cerca de 10% de membrana plasmática) adicionou-se 4 mL de fase superior (Larsson et al., 1987), misturou-se com 20 inversões do tubo e centrifugou-se a 1.500 xg por 5 min em rotor do tipo “balde-oscilante”. Aproximadamente 90% da fase superior (S₄) foi removida e misturada com a fase S₃. Adicionou-se 20 mL de solução de sacarose 330 mM em tampão de fosfato de potássio 5 mM, pH 7,8 e o sistema foi centrifugado a 75.000 xg durante 1 h. O resíduo obtido foi ressuspensão em 1,0 mL de uma solução constituída de glicerol 20% (v/v), EDTA 2 mM, PMSF 1 mM, DTT 2 mM em tampão BTP-MES 5 mM, pH 6,5, congelado imediatamente em nitrogênio líquido e armazenado a -70°C até o momento da determinação da atividade da H⁺-ATPase.

3.9.2. Determinação da atividade da H⁺-ATPase

A atividade da H⁺-ATPase foi determinada pelo método proposto por Sorgonà et al. (2011), com pequenas modificações. A 0,8 mL do meio de reação constituído de BTP–MES (pH 6.5) 50 mM, MgSO₄ 5 mM, ATP 5 mM, Na₂MoO₄ 0,6 mM, KNO₃ 100 mM, NaN₃ 1,5 mM e Triton X-100 0,02% (v/v), com ou sem vanadato 100 µM, adicionou-se 0,1 mL da suspensão da fração isolada de membranas plasmáticas. O sistema foi agitado suavemente e deixado em banho de gelo por 10 min. Os tubos foram, então, transferidos para banho-maria a 38°C por 1 min. A reação iniciou-se pela adição de 0,1 mL de ATP 50 mM. Após 30 min paralisou-se a reação pela adição de 2,0 mL de uma solução constituída de triton X-100 3%, ácido ascórbico 3% e molibdato de amônio 0,5% em H₂SO₄ 0,6 M. Após 10 min foi lida a absorvância a 705 nm. A quantidade de Pi foi determinada com base em curva de calibração. A atividade da H⁺-ATPase foi estimada pela porção da atividade total inibida por vanadato 100 µM e expressa em (nmol Pi/h/µg de proteína).

3.9.3. Avaliação “*in vivo*” do efluxo de prótons

A avaliação *in vivo* do efluxo de prótons foi realizada conforme descrito por França et al., (2006), com pequenas modificações. As plântulas dos dois genótipos de milho, após exposição aos tratamentos conforme descrito no item 3.3, tiveram suas raízes lavadas em água desmineralizada e foram transferidas para vasos de polietileno contendo 250 mL de solução de CaCl₂ 0,5 mM, pH 6,0. Após 24 horas, o experimento foi encerrado. As plântulas foram retiradas e, após vigorosa homogeneização das soluções, o pH foi determinado. A quantidade de prótons livres exsudados para a solução externa de cultivo foi estimada pela fórmula: $\text{pH} = -\log[\text{H}^+]$ e expressa em µmol H⁺ vaso⁻¹.

3.10 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado em todos os experimentos foi o de blocos casualizados, em esquema fatorial, com três repetições. No caso da avaliação do efeito do paclobutrazol (PBZ) sobre o alongamento radicular utilizou-se esquema fatorial (2x4): dois genótipos de milho (UFVM-100 e UFVM-200) e quatro concentrações de PBZ (0; 0,6; 1,2 e 1,8 μM). Para o restante dos experimentos utilizou-se esquema fatorial (2x2x2): dois genótipos de milho (UFVM-100 e UFVM-200), duas concentrações de Al (0 e 50 μM) e duas concentrações de PBZ (0 e 0,6 μM). Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo agrupamento Newman-Keuls a 5% de probabilidade e os fatores quantitativos analisados por análises de regressão. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa Sisvar (Ferreira, 1999).

4. RESULTADOS

4.1 Efeitos do alumínio e do paclobutrazol sobre o alongamento radicular

As raízes das plântulas dos dois genótipos de milho expostas ao tratamento com Al apresentaram aspecto quebradiço na região dos ápices radiculares, com lesões causadas pelo rompimento de parte da epiderme e pelo rasgamento de células da região mais externa do meristema fundamental, similar aos resultados encontrados por Souza (2012), sintomas esses que se intensificaram em resposta ao tratamento conjunto com o paclobutrazol (PBZ). Ocorreu, também, redução no volume do sistema radicular e inibição no desenvolvimento de pelos radiculares e de ramificações laterais.

O paclobutrazol, aplicado isoladamente, reduziu linearmente o alongamento da raiz principal nos dois genótipos (Fig.3). O genótipo UFVM-100 sofreu redução ligeiramente menor do alongamento radicular relativo em comparação ao UFVM-200. Após 24 horas de exposição das plantas, na concentração mais elevada de paclobutrazol, os alongamentos radiculares relativos dos genótipos UFVM-100 e UFVM-200 foram: 86,7 e 81,8%, respectivamente. Optou-se pelo uso de paclobutrazol na concentração de 0,6 μM nos demais experimentos uma vez que, nessa concentração, as diferenças entre os genótipos foi menor que 1%.

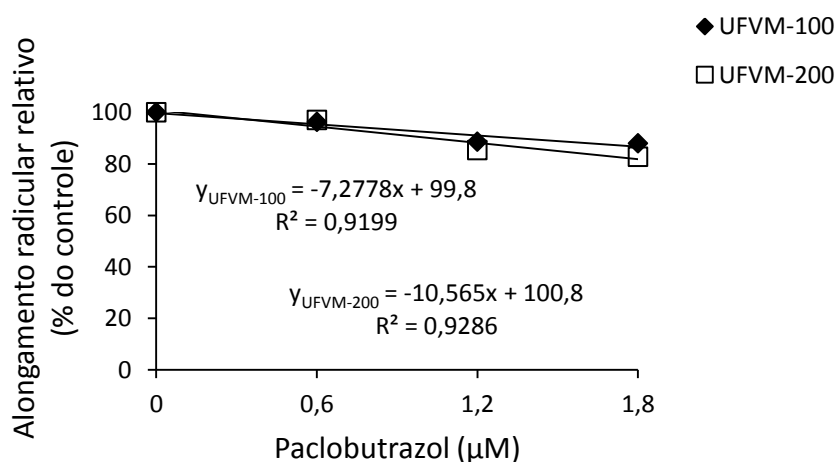


Figura 3 – Efeito de concentrações crescentes de paclobutrazol sobre o alongamento radicular relativo em dois genótipos de milho, após 24 horas de tratamento.

Na ausência de Al, o tratamento com paclobutrazol na concentração de 0,6 μM não resultou em diferença estatística no alongamento radicular relativo nos dois genótipos de milho em relação às plantas-controle (-Al e -PBZ) (Fig. 4). O tratamento com Al, no entanto, reduziu o alongamento radicular em 40,4 e 21,2% no genótipo UFVM-100 e UFVM-200, respectivamente. Após tratamento com Al, o alongamento radicular no genótipo UFVM-200 passou a ser cerca de 32% mais elevado do que no UFVM-100. No tratamento conjunto de Al + PBZ observou-se redução adicional no alongamento radicular apenas no genótipo UFVM-200, que passou a não diferir estatisticamente do genótipo UFVM-100.

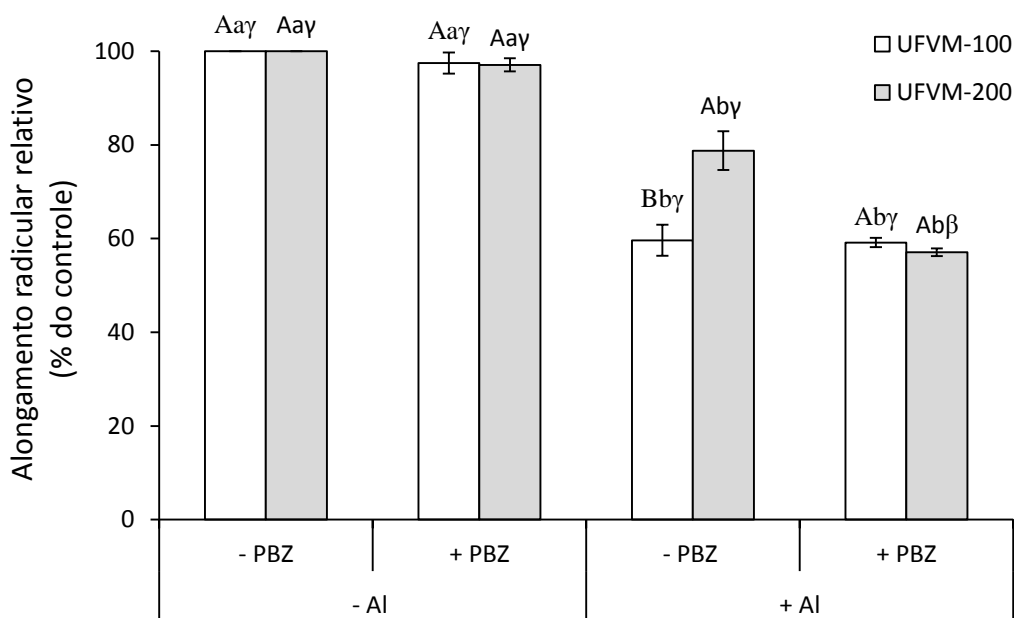


Figura 4 – Alongamento radicular relativo em dois genótipos de milho, após 24 horas de tratamento com alumínio 50 μM (+Al) e do paclobutrazol 0,6 μM (+PBZ) ou a combinação Al + PBZ.

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre genótipos dentro do mesmo nível de alumínio e de paclobutrazol e pela mesma letra minúscula entre níveis de Al dentro do mesmo nível de paclobutrazol e genótipo e pela mesma letra grega entre níveis de paclobutrazol dentro do mesmo nível de Al e genótipo não diferem significativamente pelo teste de Newman-Keuls ao nível de 5% de probabilidade.

4.2 Teores de alumínio nos ápices radiculares

Na ausência de Al e, também, na ou ausência/presença de paclobutrazol, não foram observadas diferenças significativas em relação aos teores de Al entre os genótipos de milho, após 24 h de tratamento (Fig. 5). Os tratamentos das plantas com Al ou com Al + PBZ, resultaram em aumentos significativos nos teores de Al nos ápices radiculares dos dois genótipos de milho. Na ausência de paclobutrazol, o tratamento com Al resultou em aumento significativo nos teores de Al nos ápices radiculares, sendo que o genótipo UFVM-100 apresentou teor de Al cerca de 22% mais elevado do que o verificado nos ápices radiculares do genótipo UFVM-200. No tratamento combinado de Al + PBZ, os teores de Al nos ápices radiculares, em comparação ao tratamento contendo apenas Al, aumentaram cerca de 12% apenas no genótipo UFVM-200. Mesmo assim, o teor de Al no genótipo UFVM-100 ainda se manteve significativamente maior, cerca de 9%, do que no UFVM-200.

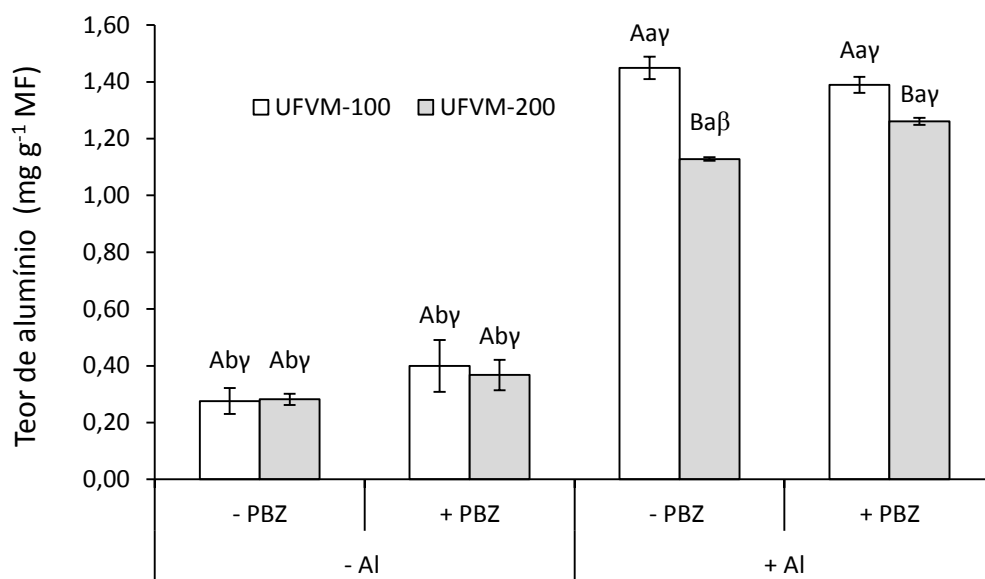


Figura 5 – Teores de alumínio em ápices radiculares de plantas de dois genótipos de milho expostas ao alumínio 50 μ M e paclobutrazol (PBZ) 0,6 μ M, após 24 horas de tratamento.

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre genótipos dentro do mesmo nível de alumínio e de paclobutrazol e pela mesma letra minúscula entre níveis de Al dentro do mesmo nível de paclobutrazol e genótipo e pela mesma letra grega entre níveis de paclobutrazol dentro do mesmo nível de Al e genótipo não diferem significativamente pelo teste de Newman-Keuls ao nível de 5% de probabilidade.

4.3 Acúmulo e localização do alumínio em ápices radiculares pela técnica da hematoxilina

As pontas de raízes principais das plântulas dos dois genótipos, após tratamento com Al ou com a combinação de Al + PBZ, apresentaram coloração arroxeada escura, característica da reação da hematoxilina com o Al (Fig. 6). Essa coloração ocorreu ao longo das pontas das raízes das plântulas tratadas com o Al, isto é, nas regiões meristemáticas e de alongamento, mas com maior intensidade nos ápices radiculares (cerca de 2 mm a partir da ponta da raiz). O tratamento combinado Al + PBZ resultou em intensificação na coloração da hematoxilina, resultante do maior acúmulo de Al somente no genótipo UFVM-200. As raízes das plantas-controle ou tratadas apenas com PBZ não apresentaram a coloração típica da reação do Al com a hematoxilina.

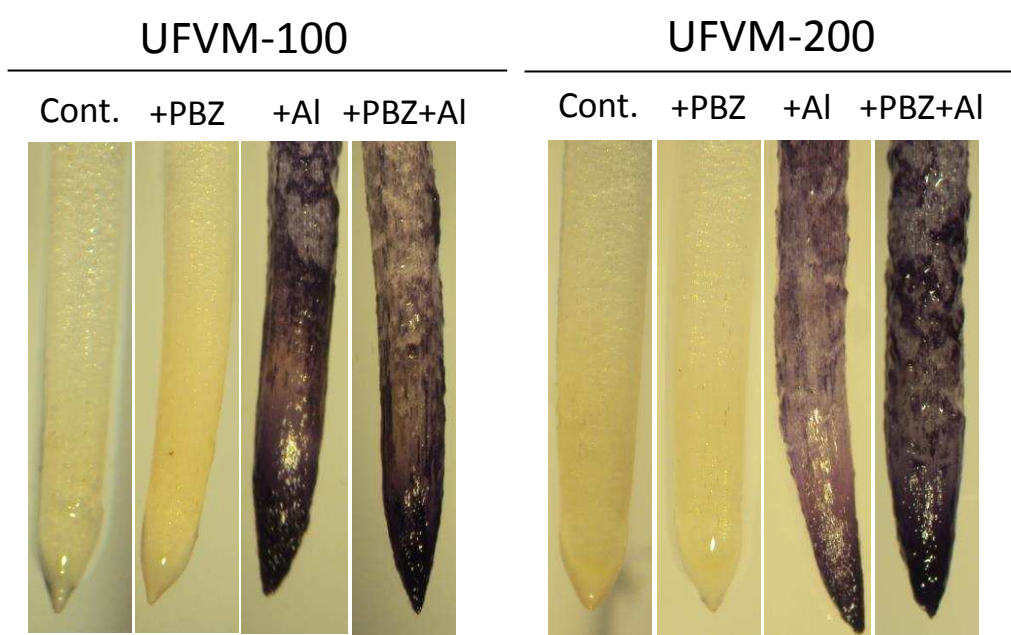


Figura 6 – Acúmulo de alumínio nas pontas da raiz principal de dois genótipos de milho, UFVM-100 e UFVM-200, revelado pela técnica da coloração com hematoxilina, após 24 h de exposição aos tratamentos com Al 50 μ M (+Al), paclobutrazol 0,6 μ M (+PBZ) ou a combinação Al + PBZ; Controle (Cont.); (N=5).

4.4 Efeitos do alumínio e do paclobutrazol sobre os teores de esteróis em ápices radiculares

Nas pontas das raízes dos dois genótipos de milho foram detectados, identificados e quantificados apenas três Δ^5 -esteróis: campesterol, estigmasterol e β -sitosterol (Figura 7A e 7B), cujas concentrações variaram de 0,26 a 0,36, 0,09 a 0,13 e 0,08 a 0,13 $\mu\text{mol g}^{-1}$ de matéria fresca, respectivamente (Figura 8).

Na ausência de Al, observou-se diferença significativa entre os tratamentos com PBZ e entre os genótipos quanto aos teores de campesterol e estigmasterol nos ápices radiculares (Fig. 8A e 8B). A resposta das plantas quanto aos teores desses dois esteróis foi essencialmente similar. Nos tratamentos controle (-Al e -PBZ), as concentrações de campesterol e estigmasterol nos ápices radiculares do genótipo UFVM-100 foram cerca de 18 e 8% maiores do que no genótipo UFVM-200, embora essa diferença tenha sido significativa apenas para o campesterol (Fig. 8A e 8B). O tratamento com PBZ causou redução de cerca de 31 e 38% na concentração de campesterol e estigmasterol, respectivamente, mas apenas no genótipo UFVM-100. Nessa condição, as concentrações de campesterol e estigmasterol, no genótipo UFVM-200, ficaram cerca de 22% mais elevada que no genótipo UFVM-100 (Fig. 8A e 8B).

Na presença de Al, isoladamente, houve redução de cerca de 31% na concentração de campesterol apenas no genótipo UFVM-100, enquanto a concentração de estigmasterol sofreu redução de cerca de 38 e 25% nos genótipos UFVM-100 e UFVM-200, respectivamente. A ação combinada do Al + PBZ causou redução na concentração de campesterol e de estigmasterol em relação ao tratamento com Al isoladamente apenas no genótipo UFVM-200, passando os dois genótipos a apresentarem essencialmente, a mesma concentração desses dois esteróis.

Não houve diferença significativa entre os genótipos para o β -sitosterol na ausência de Al (Fig. 8C). O tratamento das plantas com paclobutrazol resultou em redução média de 22% na concentração de β -sitosterol em relação aos seus controles (Fig. 8C). Nenhuma diferença significativa entre os genótipos foi observada. Na presença de Al, isoladamente, observou-se redução na concentração de β -sitosterol nos dois genótipos de milho, mas com

maior intensidade no genótipo UFVM-100, que passou a ter uma concentração cerca de 12,5% inferior à do genótipo UFVM-200. A adição combinada de AI + PBZ reduziu a concentração de β -sitosterol apenas no genótipo UFVM-200, eliminando a diferença entre os genótipos

As plantas-controle dos dois genótipos de milho apresentaram essencialmente a mesma concentração de Δ^5 - esteróis totais ($0,58 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF de ápices radiculares) (Fig. 8D). O tratamento das plantas com PBZ resultou em redução de aproximadamente 18% nos teores totais de Δ^5 - esteróis, embora não tenha sido detectada diferença significativa entre os genótipos.

Na presença de AI, isoladamente, também se observou diminuição no teor total de Δ^5 -esterol em cerca de 24 e 12% nos genótipos UFVM-100 e UFVM-200, respectivamente. Nessa condição, o genótipo UFVM-200 apresentou um teor total de Δ^5 - esteróis cerca de 16 % mais elevado do que o genótipo UFVM-100. A adição de PBZ às plantas tratadas com AI reduziu o teor total de Δ^5 - esteróis em cerca de 15% apenas no genótipo UFVM-200, eliminando as diferenças entre os dois genótipos. A combinação AI + PBZ resultou numa redução média de 33% nos teores de Δ^5 - esteróis nos ápices radiculares dos dois genótipos de milho, comparativamente ao controle (- AI e - PBZ).

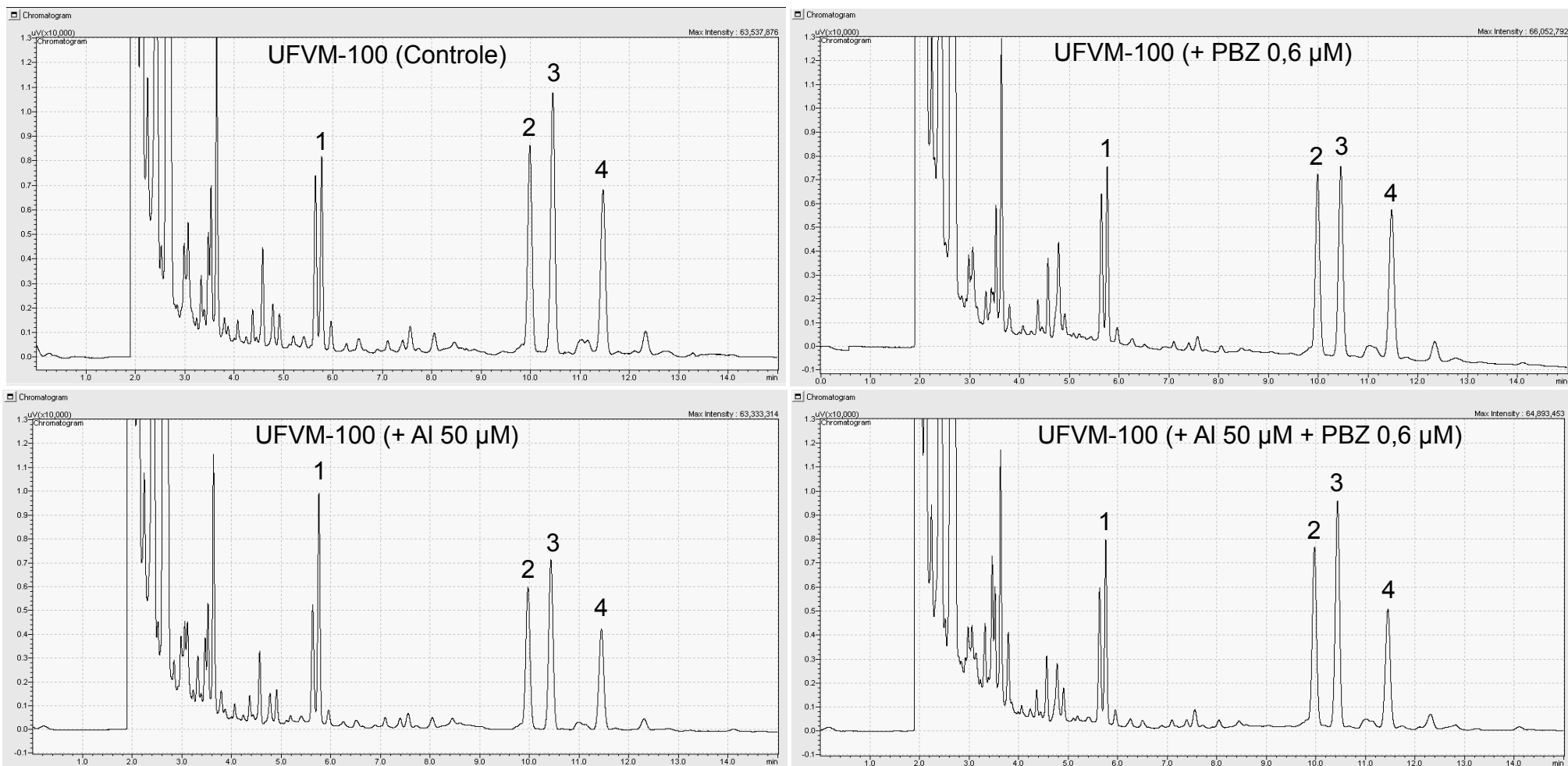


Figura 7A - Perfil cromatográfico da análise de Δ^5 -esteroides em raízes do genótipo de milho, UFVM-100, após 24 h de tratamento: Al 50 μ M; PZB 0,6 μ M. Δ^5 -esteroides encontrados: 1 – α -colestano (padrão interno); 2 – campesterol; 3 – estigmasterol e 4 – β -sitosterol.

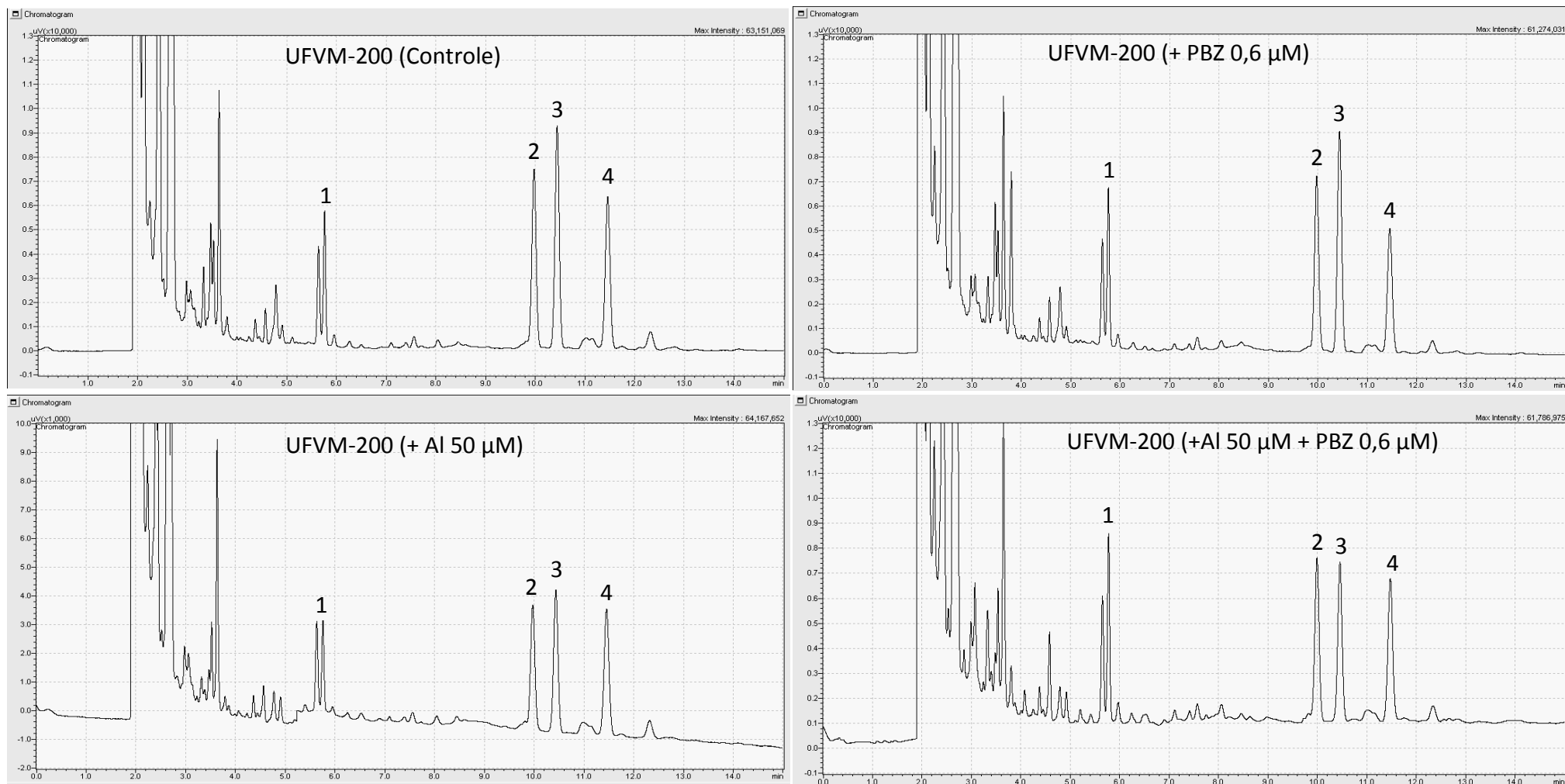


Figura 7B - Perfil cromatográfico da análise de Δ^5 -esteróis em raízes do genótipo de milho, UFVM-200, após 24 h de tratamento: Al 50 μM ; PZB 0,6 μM . Δ^5 -esteróis encontrados: 1 – α -colestano (padrão interno); 2 – campesterol; 3 – estigmasterol e 4 – β -sitosterol.

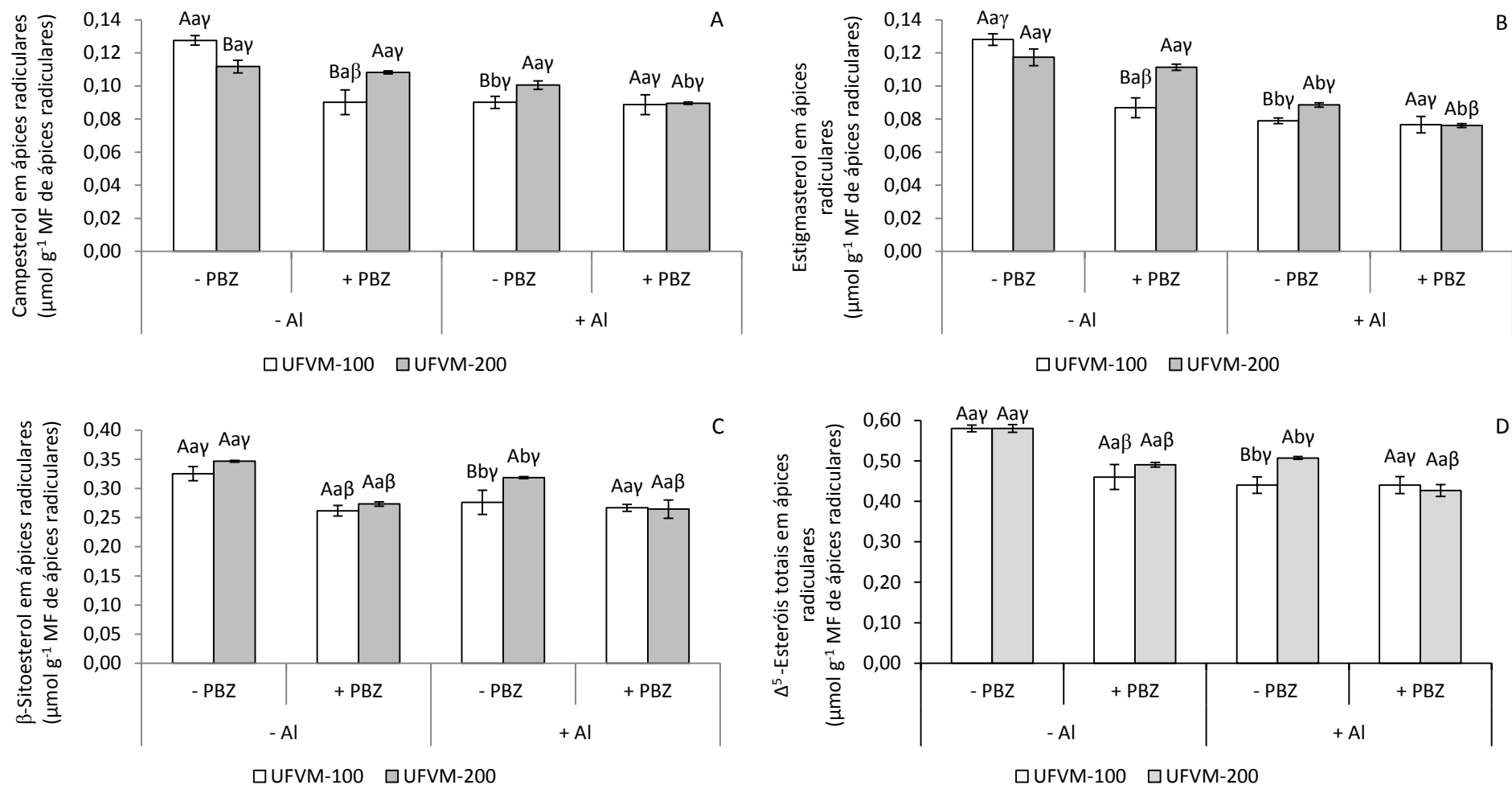


Figura 8 - Teores de Δ^5 -esteróis em ápices radiculares de dois genótipos de milho, após 24 horas de tratamento com alumínio 50 μM (+AI), paclobutrazol 0,6 μM (+PBZ) ou a combinação AI + PBZ.

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre genótipos dentro do mesmo nível de alumínio e de paclobutrazol e pela mesma letra minúscula entre níveis de AI dentro do mesmo nível de paclobutrazol e genótipo e pela mesma letra grega entre níveis de paclobutrazol dentro do mesmo nível de AI e genótipo não diferem significativamente pelo teste de Newman-Keuls ao nível de 5% de probabilidade.

4.5 Efeitos do alumínio e do paclobutrazol sobre o extravasamento de eletrólitos totais

As plantas-controle (-Al e - PBZ) apresentaram extravasamento médio de cerca de 24% dos eletrólitos totais (Fig. 9). A aplicação de PBZ resultou em aumento médio de 33% no extravasamento de eletrólitos nos dois genótipos em relação aos seus controles, que não diferiram estatisticamente entre si.

Na presença de Al, observou-se um aumento no extravasamento de eletrólitos de aproximadamente 86% em relação ao controle, mas apenas no genótipo UFVM-100. Nessa condição, esse genótipo chegou a apresentar um extravasamento de eletrólitos 95% superior ao do genótipo UFVM-200. A aplicação de PBZ às plantas tratadas com Al resultou em redução de cerca de 12% no extravasamento de eletrólitos no genótipo UFVM-100, mas aumento no genótipo UFVM-200 de cerca de 22%. Apesar disso, entretanto, o genótipo UFVM-100 ainda apresentou uma porcentagem de extravasamento de eletrólitos cerca de 40% superior à do genótipo UFVM-200.

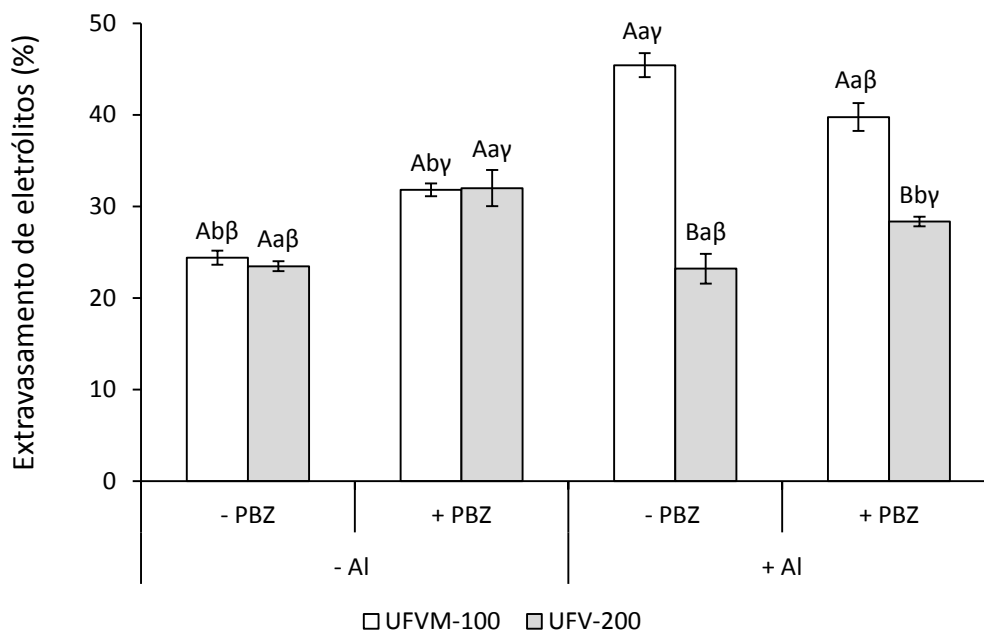


Figura 9 – Extravasamento de eletrólitos de ápices radiculares de dois genótipos de milho, após 24 horas de tratamento com alumínio 50 μ M (+Al), paclobutrazol 0,6 μ M (+PBZ) ou a combinação Al + PBZ.

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre genótipos dentro do mesmo nível de alumínio e de paclobutrazol e pela mesma letra minúscula entre níveis de Al dentro do mesmo nível de paclobutrazol e genótipo e pela mesma letra grega entre níveis de paclobutrazol dentro do mesmo nível de Al e genótipo não diferem significativamente pelo teste de Newman-Keuls ao nível de 5% de probabilidade.

4.6 Efeito do alumínio e do paclobutrazol sobre os teores de ácidos orgânicos em ápices radiculares e sobre a exsudação desses ácidos para a solução de cultivo

Nos ápices radiculares dos dois genótipos de milho foram identificados os ácidos succínico, fumárico, málico, tartárico, t-aconítico e cítrico (Fig. 10A e 10B). Também foi encontrado, um pico bastante evidente no tempo de retenção (tR) 8,498 min. Porém não foi compatível com o tR de nenhum dos ácidos orgânicos utilizados como referência na análise cromatográfica (oxálico, malônico, maleico, succínico, fumárico, glutárico, málico, oxalacético, ceto-glutárico, tartárico, t-aconítico e cítrico). Esse composto desconhecido não variou significativamente sua concentração com os tratamentos e nem entre os genótipos.

As raízes dos dois genótipos exsudaram para a solução de cultivo os ácidos succínico, málico, tartárico e cítrico (Fig. 11A e 11B). Os dois ácidos orgânicos encontrados em maiores concentrações e que sofreram modificações significativas com os tratamentos aplicados foram o ácido cítrico e o málico.

Na ausência de Al ou de PBZ, o genótipo UFVM-200 apresentou um teor de ácido cítrico nos ápices radiculares cerca de 48% mais elevado do que o genótipo UFVM-100 (Fig. 12). O tratamento com paclobutrazol isoladamente reduziu o teor de ácido cítrico em cerca 16% apenas no genótipo UFVM-200, mas mesmo assim esse genótipo manteve um teor desse ácido orgânico cerca de 28% superior ao do genótipo UFVM-100. O tratamento com Al, isoladamente, resultou em redução no teor de ácido cítrico apenas no genótipo UFVM-200, passando os dois genótipos a terem essencialmente o mesmo teor deste ácido orgânico. O tratamento das plantas com a combinação Al + PBZ resultou em aumento aproximado de 21% no teor de ácido cítrico nos ápices radiculares em relação ao tratamento apenas com Al nos dois genótipos, que não diferiram entre si.

O teor de ácido málico nos ápices radiculares nas plantas-controle (-Al e -PBZ) não se modificou com o tratamento com PBZ isoladamente e os dois genótipos não diferiram estatisticamente entre si, tanto na ausência como na presença deste retardante de crescimento (Fig. 13). Na presença de Al, observou-se aumento no teor de ácido málico em cerca de 53 e 21% nos genótipos UFVM-100 e UFVM-200, respectivamente. Nesta condição, o genótipo UFVM-100 apresentou um teor de ácido málico cerca de 14% mais elevado do que o UFVM-200. O tratamento

simultâneo de Al + PBZ resultou em aumento no teor de ácido málico apenas no genótipo UFVM-200, eliminando as diferenças genotípicas, passando os dois genótipos a apresentar o mesmo teor deste ácido.

As raízes das plantas-controle (-Al e - PBZ) ou daquelas tratadas apenas com PBZ exsudaram para a solução de cultivo apenas 21 nmol de ácido cítrico por g de matéria fresca e não foram observadas diferenças estatísticas entre os genótipos (Fig. 14). Após exposição ao Al, as raízes das plantas dos genótipos UFVM-100 e UFVM-200 passaram a exsudar 3,8 e 8,2 vezes mais ácido cítrico do que as plantas controle. A adição de paclobutrazol ao tratamento com Al, reduziu as quantidades de ácido cítrico exsudado em cerca de 38,5 e 44,8% nos genótipos UFVM-100 e UFVM-200, respectivamente, em relação ao tratamento com apenas Al. Nesta condição, mesmo com maior redução na quantidade exsudada pelo genótipo UFVM-200, esse genótipo exsudou 90% mais ácido cítrico do que o genótipo UFVM-100.

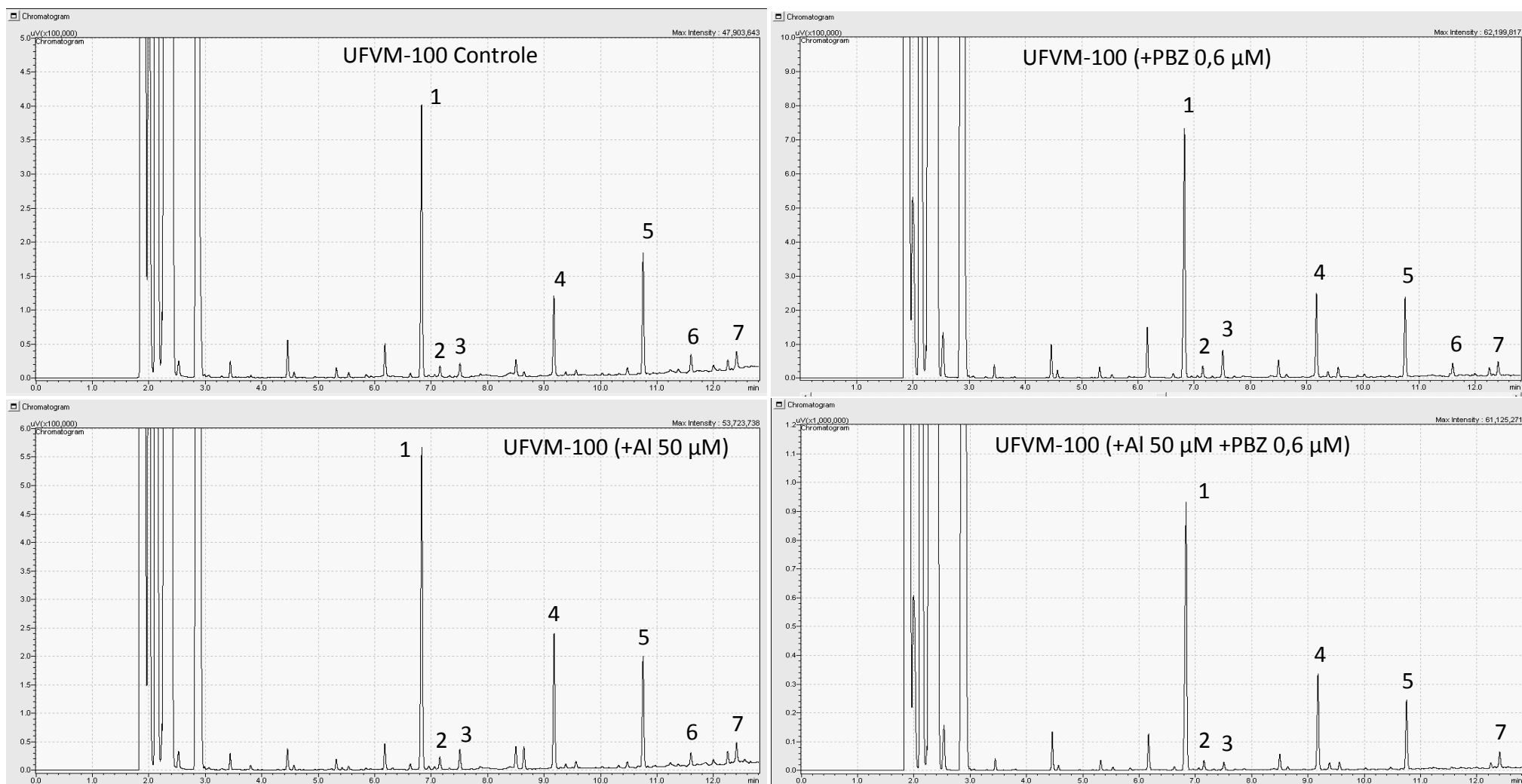


Figura 10-A - Perfil cromatográfico da análise de ácidos orgânicos em raízes do genótipo de milho, UFVM-100, após 24 h de tratamento: Al 50 μM; PZB 0,6 μM. ácidos encontrados: 1 – não-identificado; 2 – succínico; 3 – fumárico; 4 – málico; 5 – tartárico (padrão interno); 6 – t-aconítico e 7 – cítrico.

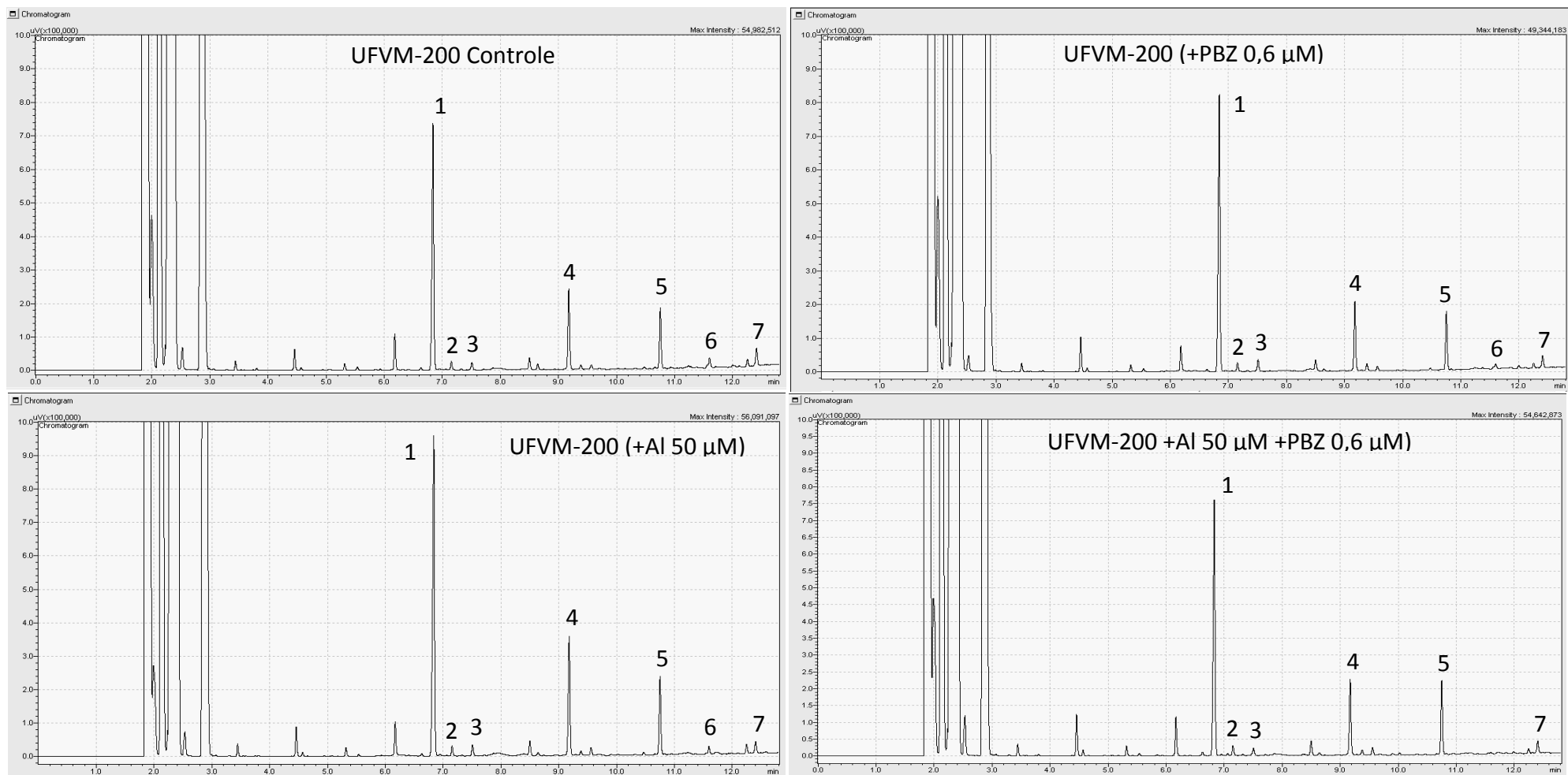


Figura 10-B - Perfil cromatográfico da análise de ácidos orgânicos em raízes do genótipo de milho, UFVM-200, após 24 h de tratamento: Al 50 μM ; PZB 0,6 μM . ácidos encontrados: 1 – não-identificado; 2 – succínico; 3 – fumárico; 4 – málico; 5 – tartárico (padrão interno); 6 – t-aconítico e 7 – cítrico.

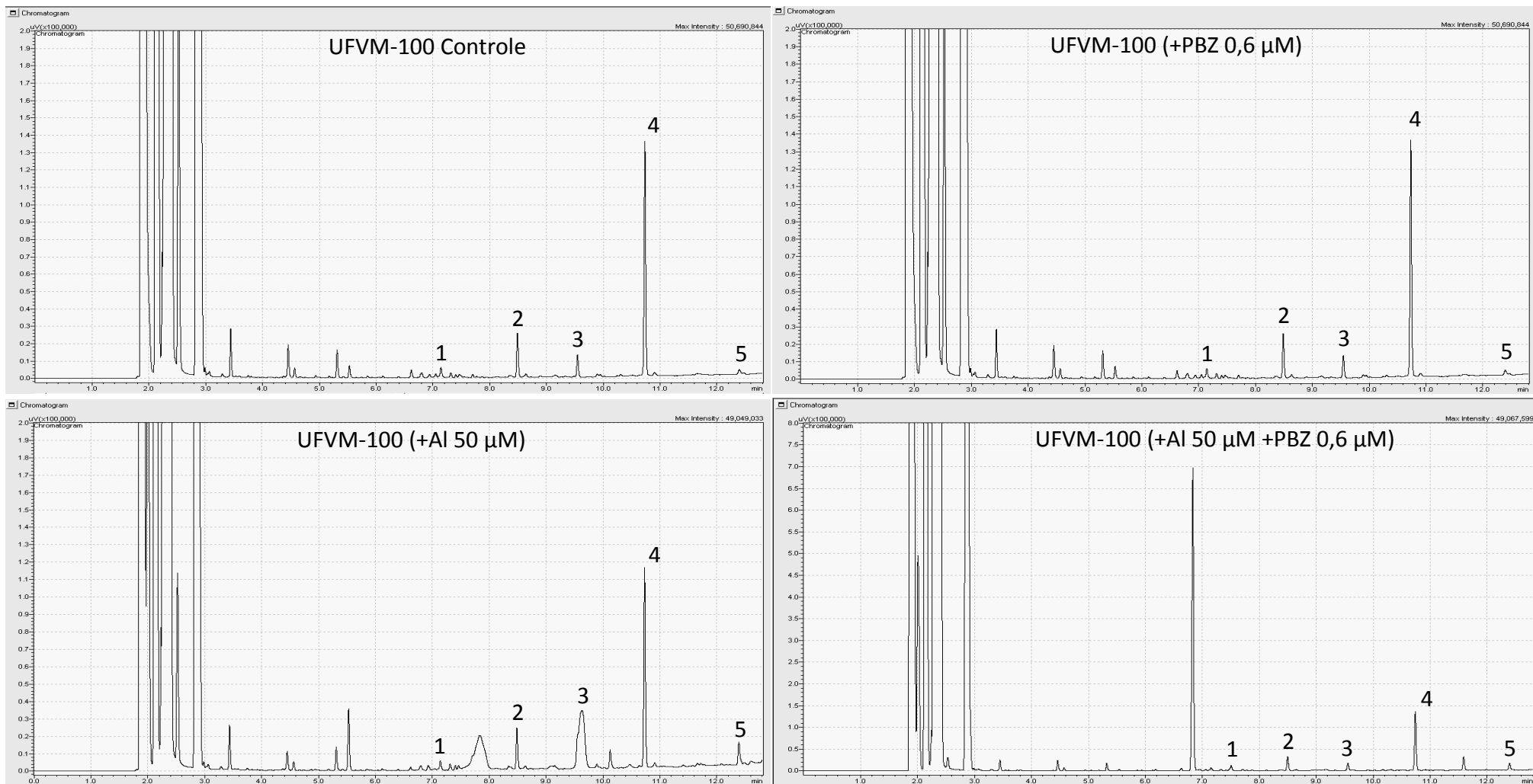


Figura 11-A - Perfil cromatográfico da análise de ácidos orgânicos exsudados pelo genótipo de milho, UFVM-100, após 24 h de tratamento: AI 50 μM; PZB 0,6 μM. ácidos encontrados: 1 – succínico; 2 – não-identificado; 3 – málico; 4 – tartárico (padrão interno); 5 – cítrico.

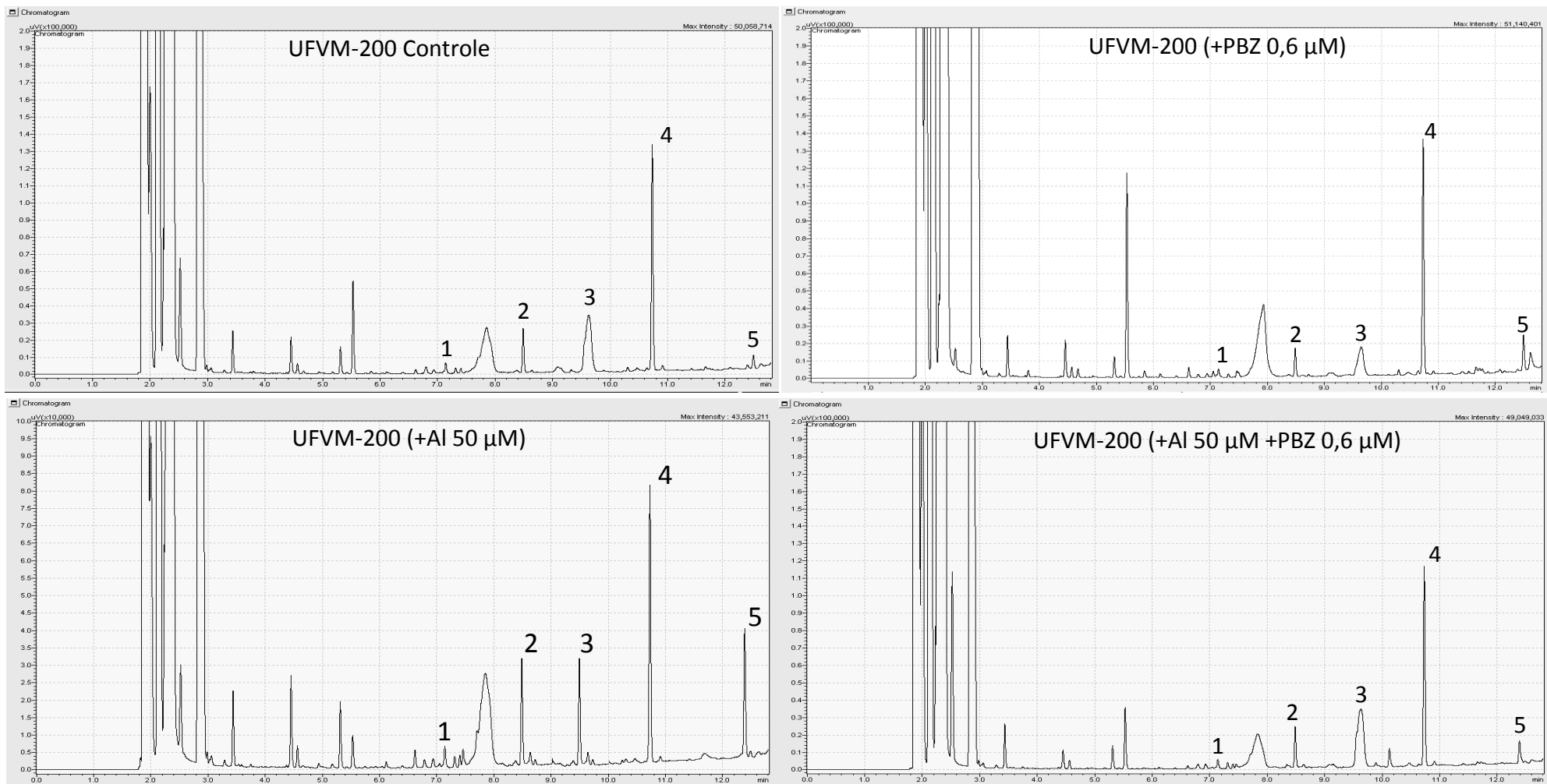


Figura 11-B - Perfil cromatográfico da análise de ácidos orgânicos exsudados pelo genótipo de milho, UFVM-200, após 24 h de tratamento: AI 50 μM; PZB 0,6 μM. ácidos encontrados: 1 – succínico; 2 – não-identificado; 3 – málico; 4 – tartárico (padrão interno); 5 – cítrico.

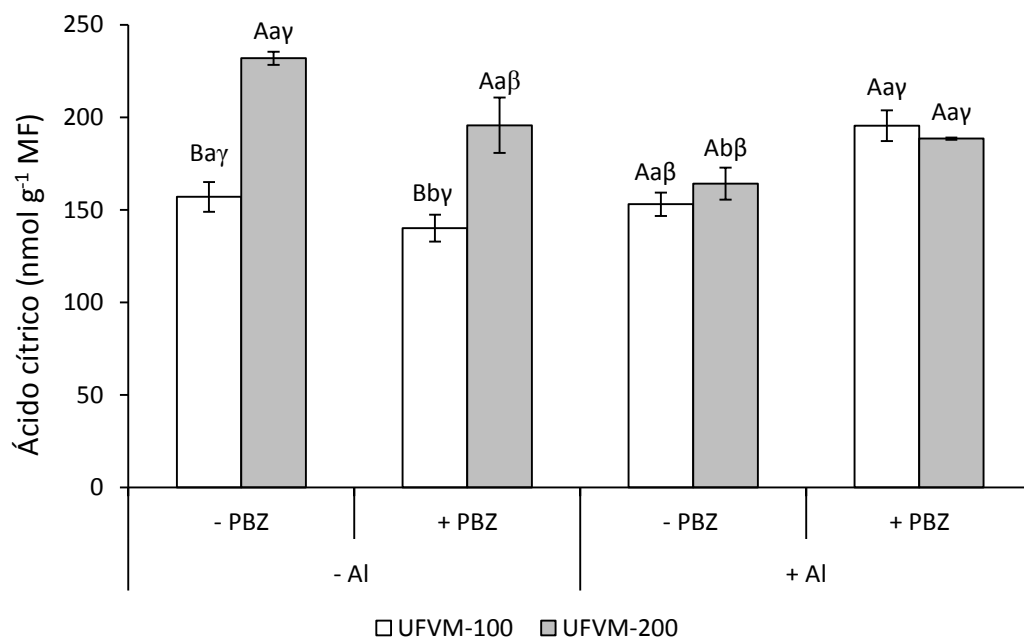


Figura 12 – Teor de ácido cítrico em ápices radiculares de dois genótipos de milho, após tratamento por 24 h com Al 50 μ M (+Al), paclobutrazol 0,6 μ M (+PBZ) ou a combinação Al + PBZ.

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre genótipos dentro do mesmo nível de alumínio e de paclobutrazol e pela mesma letra minúscula entre níveis de Al dentro do mesmo nível de paclobutrazol e genótipo e pela mesma letra grega entre níveis de paclobutrazol dentro do mesmo nível de Al e genótipo não diferem significativamente pelo teste de Newman-Keuls ao nível de 5% de probabilidade.

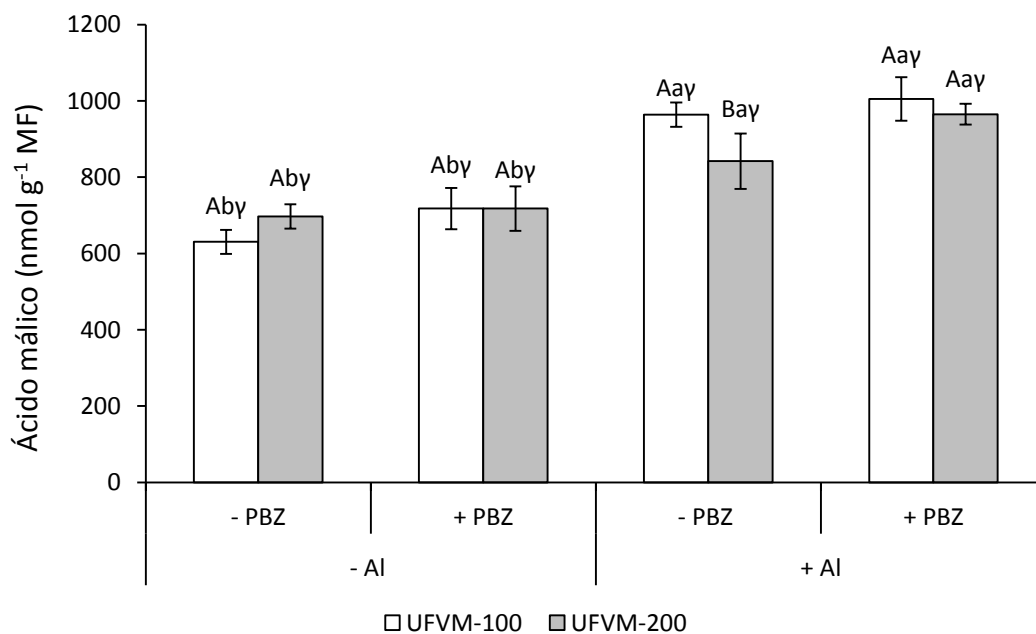


Figura 13 – Teor de ácido málico em ápices radiculares de dois genótipos de milho, após tratamento por 24 h com Al 50 μ M (+Al), paclobutrazol 0,6 μ M (+PBZ) ou a combinação Al + PBZ.

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre genótipos dentro do mesmo nível de alumínio e de paclobutrazol e pela mesma letra minúscula entre níveis de Al dentro do mesmo nível de paclobutrazol e genótipo e pela mesma letra grega entre níveis de paclobutrazol dentro do mesmo nível de Al e genótipo não diferem significativamente pelo teste de Newman-Keuls ao nível de 5% de probabilidade.

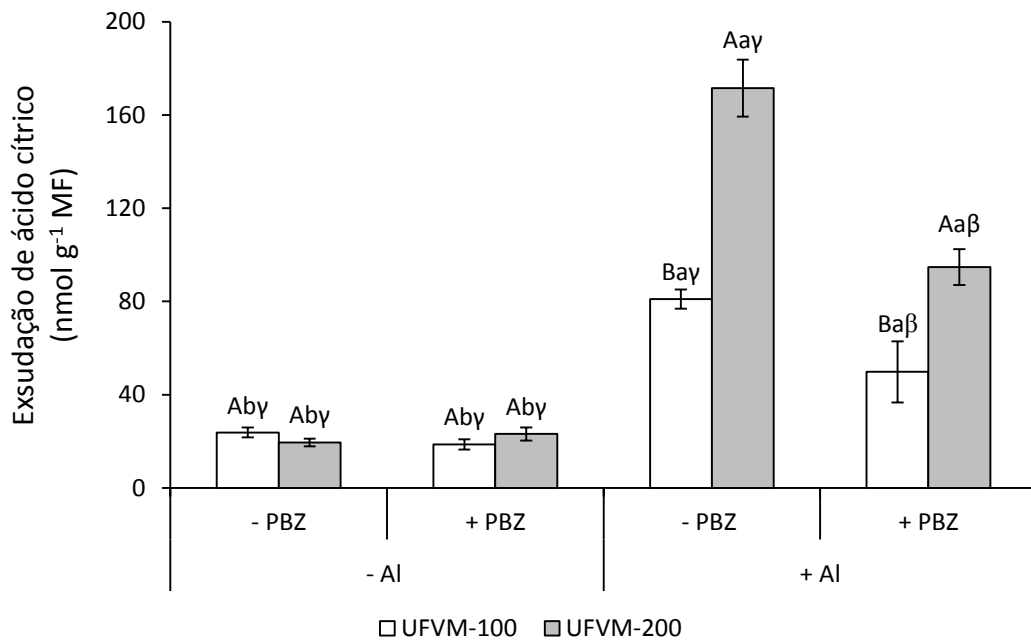


Figura 14 – Exsudação de ácido cítrico para a solução externa pelas raízes de plântulas intactas de dois genótipos de milho tratadas com alumínio (+Al), paclobutrazol (+PBZ) ou a combinação, após 12 e 24 horas de tratamento. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre genótipos dentro do mesmo nível de alumínio e de paclobutrazol e pela mesma letra minúscula entre níveis de Al dentro do mesmo nível de paclobutrazol e genótipo e pela mesma letra grega entre níveis de paclobutrazol dentro do mesmo nível de Al e genótipo não diferem significativamente pelo teste de Newman-Keuls ao nível de 5% de probabilidade.

No tratamento controle (-Al e -PBZ), não foram detectadas diferenças significativas entre os genótipos quanto à exsudação de ácido málico (Fig. 15). Entretanto, a exsudação de ácido málico pelas plantas-controle (-Al e -PBZ) foi 3,8 vezes maior do que a de ácido cítrico. O tratamento com PBZ isoladamente reduziu a exsudação de ácido málico apenas no genótipo UFVM 200, que ficou com um teor deste ácido cerca de 38% mais baixo do que o genótipo UFVM-100. O tratamento com Al, por outro lado, aumentou a exsudação de ácido málico nos dois genótipos de milho. No genótipo UFVM-100 o aumento foi de 1,6 vezes e no genótipo UFVM-200 de 1,2 vezes em relação às plantas-controle. Na presença desse elemento, o genótipo UFVM-100 apresentou uma exsudação 44% mais elevada que o genótipo UFVM-200. Ao se adicionar o paclobutrazol às plantas tratadas com Al, observou-se redução adicional de 42 % na exsudação em relação ao tratamento com Al isoladamente apenas no cultivar UFVM-100, eliminando as diferenças genotípicas.

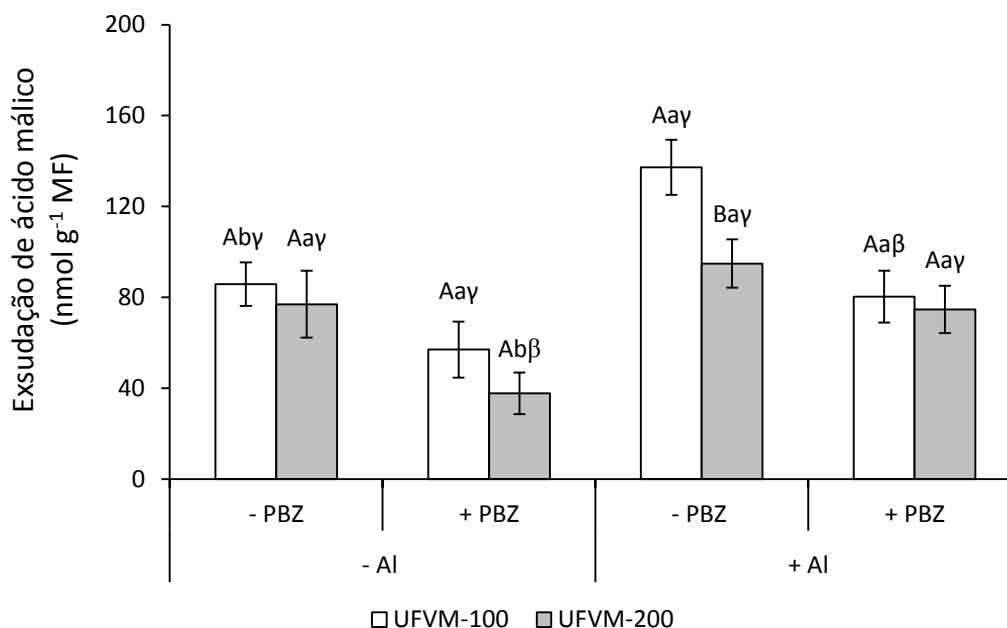


Figura 15 – Exsudação de ácido málico para a solução externa pelas raízes de plântulas intactas de dois genótipos de milho tratadas com alumínio (+Al), paclobutrazol (+PBZ) ou a combinação, após 12 e 24 horas de tratamento.

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre genótipos dentro do mesmo nível de alumínio e de paclobutrazol e pela mesma letra minúscula entre níveis de Al dentro do mesmo nível de paclobutrazol e genótipo e pela mesma letra grega entre níveis de paclobutrazol dentro do mesmo nível de Al e genótipo não diferem significativamente pelo teste de Newman-Keuls ao nível de 5% de probabilidade.

4.7 Efeito do alumínio e do paclobutrazol sobre a atividade da H⁺-ATPase em frações purificadas de membrana plasmática isoladas de pontas de raízes

Na ausência de Al, não se observou diferença significativa na atividade da H⁺-ATPase entre os genótipos (Fig. 16). Nessa condição a atividade da H⁺-ATPase no genótipo UFVM-100 foi cerca de 13% maior do que no UFVM-200. O tratamento com PBZ aumentou a atividade da H⁺-ATPase apenas no genótipo UFVM-200, que passou a apresentar uma atividade estatisticamente igual à do genótipo UFVM-100.

Na presença do Al, observou-se redução de 19% na atividade da H⁺-ATPase no genótipo UFVM-100, mas aumento de 19% no genótipo UFVM-200. Nessa condição o genótipo UFVM-200 passou a ter atividade da H⁺-ATPase mais elevada que o genótipo UFVM-100. O tratamento combinado de Al + PBZ aumentou a atividade da H⁺-ATPase em cerca de 16% em relação ao tratamento com Al isoladamente nos dois genótipos, mantendo-se, entretanto, a diferença entre os mesmos.

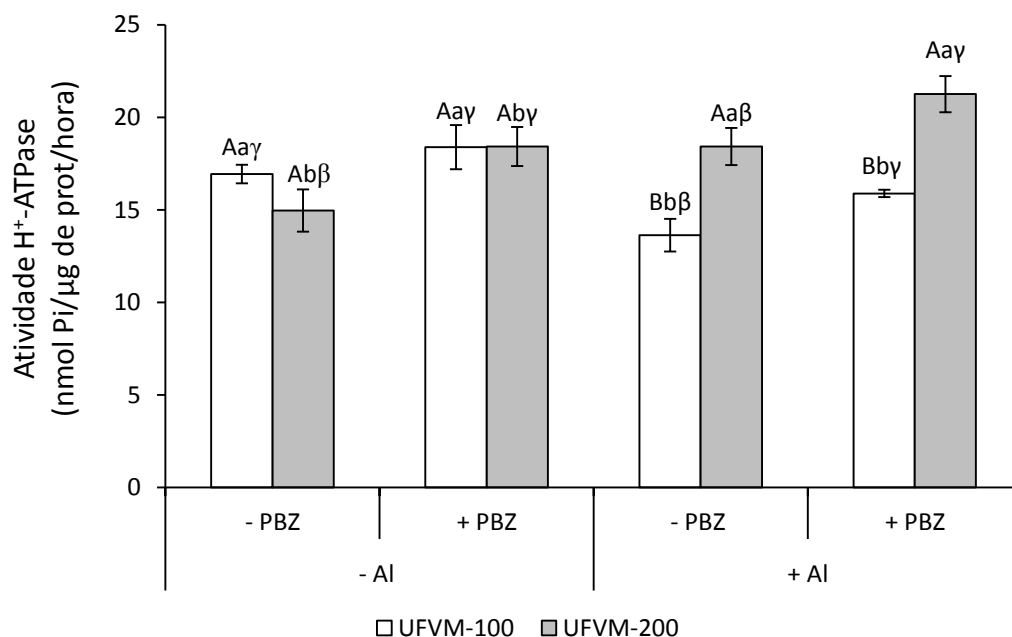


Figura 16- Atividade da H⁺-ATPase da membrana plasmática isolada de ápices radiculares de dois genótipos de milho, após 24 horas de tratamento com alumínio 50 μM (+Al), paclobutrazol 0,6 μM (+PBZ) ou a combinação Al + PBZ.

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre genótipos dentro do mesmo nível de alumínio e de paclobutrazol e pela mesma letra minúscula entre níveis de Al dentro do mesmo nível de paclobutrazol e genótipo e pela mesma letra grega entre níveis de paclobutrazol dentro do mesmo nível de Al e genótipo não diferem significativamente pelo teste de Newman-Keuls ao nível de 5% de probabilidade.

4.8 Efeito do alumínio e do paclobutrazol sobre o efluxo de prótons em plantas intactas

Na ausência de Al e de PBZ, as plantas alteraram o pH da solução de cultivo de 6,0 para um valor médio de 4,78, não havendo diferença significativa entre os tratamentos e nem entre os genótipos, após 24 h de tratamento. Na presença de Al, o pH decresceu para o valor de 4,60, o que significou um aumento médio de 55% na concentração total de prótons (H⁺) livres na solução de cultivo em relação ao pH do tratamento controle, após 24 h de tratamento (Fig. 17), mas os genótipos não diferiram significativamente entre si. O tratamento combinado de Al e PBZ reduziu a excreção de H⁺ em cerca de 14% no genótipo UFVM-100, mas a aumentou em cerca de 10% no genótipo UFVM-200, em relação ao tratamento contendo apenas Al. Nessa condição, o genótipo UFVM-200 excretou cerca de 31% mais H⁺ do que o genótipo UFVM-100.

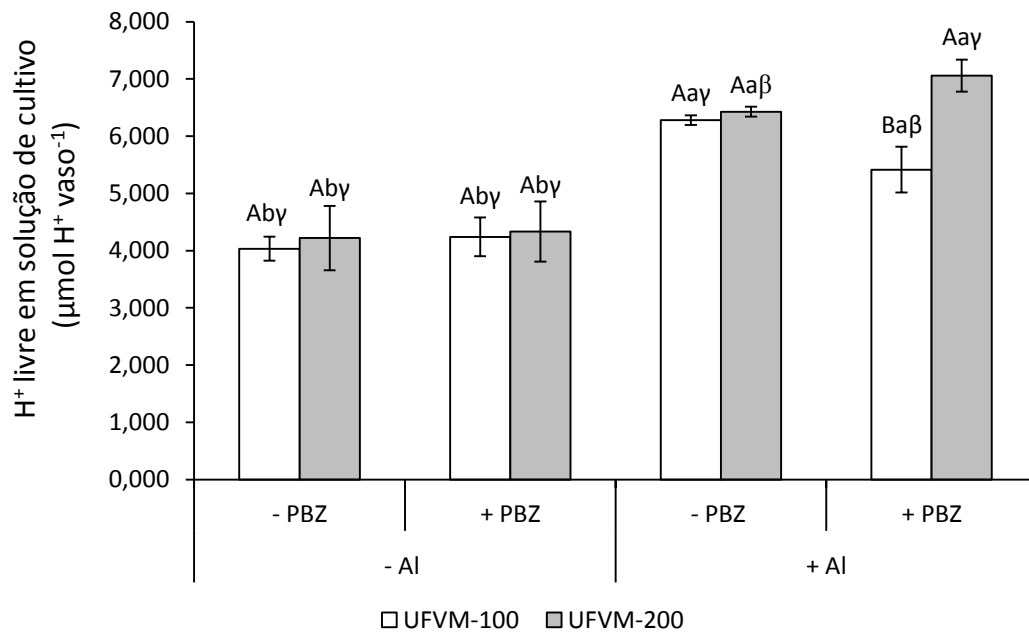


Figura 17 - Concentração total de prótons livre (U_H^+) em solução nutritiva após cultivo de plantas de dois genótipos de milho tratadas com alumínio 50 μ M (+Al), paclobutrazol 0,6 μ M (+PBZ) ou a combinação Al + PBZ, por 24 h.

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre genótipos dentro do mesmo nível de alumínio e de paclobutrazol e pela mesma letra minúscula entre níveis de Al dentro do mesmo nível de paclobutrazol e genótipo e pela mesma letra grega entre níveis de paclobutrazol dentro do mesmo nível de Al e genótipo não diferem significativamente pelo teste de Newman-Keuls ao nível de 5% de probabilidade.

5. DISCUSSÃO

A toxidez por alumínio (Al) é um fator limitante de grande importância para o crescimento e produtividade das plantas em solos ácidos (Horst et al., 2010). Não somente no Brasil, mas em todo o mundo existe uma grande proporção de solos agricultáveis, mas que apresentam elevada acidez e níveis elevados de Al, resultando em perdas significativas no rendimento das culturas.

Os mecanismos de tolerância ao Al em plantas superiores ainda não são totalmente conhecidos. Muitas hipóteses têm sido apresentadas na literatura, mas, devido à amplitude dos efeitos do Al, o real mecanismo de tolerância ainda permanece especulativo. Duas ideias básicas, entretanto, têm prevalecido: 1) A exsudação de ácidos orgânicos, provavelmente, está envolvida em mecanismos de “exclusão” do Al de sítios sensíveis nas plantas; 2) A membrana plasmática, fundamental para o controle da entrada e saída de metabólitos, deve estar envolvida.

Nesse aspecto, sabe-se que o Al interage com lipídios e proteínas da membrana, modificando sua estrutura molecular, aumentando a densidade de empacotamento dos lipídios e, conseqüentemente, reduzindo sua fluidez (Chen et al., 1991). Assim, na tentativa de compreender melhor o modo de ação do Al decidiu-se estudar os efeitos isolados e combinados do Al e do paclobutrazol (PBZ), um conhecido inibidor da síntese de Δ^5 -esteróis, sobre a produção e exsudação de ácidos orgânicos, além de alguns aspectos da composição e funcionamento da membrana plasmática em ápices radiculares de dois genótipos de milho com tolerância diferencial ao Al.

O PBZ é um retardante de crescimento de plantas de largo espectro, que apresenta potencial de utilização bastante amplo na agricultura. Apresenta a fórmula empírica $C_{15}H_{20}ClN_3O$ e o nome químico [(2RS,3RS)-1-(4-clorofenil)-4, 4-dimetil-2-(1,2,4- triazol)-3-pentanol].

Compostos triazólicos têm sido usados como fungicidas, mas podem também regular o crescimento das plantas. O PBZ é um derivado triazol que interfere na atividade da *ent*-kaureno oxidase na via de oxidação do *ent*-kaureno, levando à diminuição nos níveis endógenos de giberelinas biologicamente ativas (Rademacher, 2000). Além disso, o PBZ inibe fortemente a isomerase do ciclopropil

esterol, enzima que catalisa a abertura do anel ciclopropano do cicloeucalenol essencial para a biossíntese de esteróis (Benaviste, 2004). Dependendo da espécie de planta e da concentração aplicada, o PBZ pode, também, induzir modificações anatômicas na raiz (Tsegaw et al., 2005).

O aumento na concentração de PBZ, aplicado isoladamente, reduziu linearmente o alongamento da raiz principal nos dois genótipos de milho. Na faixa de concentração estudada, o genótipo UFVM-100 sofreu redução do alongamento radicular ligeiramente menor do que o genótipo UFVM-200. Redução no crescimento radicular também foi observado em *Dendrobium nobile* tratado com PBZ 2,7 μM (Wen et al., 2013). Adicionalmente, os autores observaram aumento no diâmetro da raiz, especialmente no ápice radicular, provavelmente devido ao aumento no número de camadas de células e no tamanho das células corticais.

Shani et al., (2013), também observaram inibição no crescimento radicular em plantas de *Arabidopsis* tratadas com PBZ 10 μM , o que foi acompanhado por redução nos níveis de giberelinas. Resultados como esses confirmam o efeito inibitório do PBZ sobre a biossíntese de giberelinas (Hedden e Graebe, 1985) e suas consequências sobre o crescimento radicular. No presente trabalho, foi utilizada uma concentração muito menor (0,6 μM), escolhida na faixa de concentração entre 0 a 1,8 μM , buscando evitar um efeito muito diferenciado entre os genótipos de milho utilizados.

O tratamento com Al reduziu o alongamento radicular nos dois genótipos de milho, mas com maior intensidade no UFVM-100, considerado sensível ao Al. Com o tratamento concomitante de Al + PBZ observou-se uma redução adicional do alongamento radicular, mas apenas no genótipo UFVM-200, que passou a ter estatisticamente o mesmo crescimento radicular do genótipo UFVM-100.

A absorção e o acúmulo do Al afetam as plantas em nível celular, fisiológico e bioquímico, principalmente na região radicular (Wagatsuma et al., 1995). A extensão da inibição no crescimento radicular depende da concentração de Al^{3+} disponível, do tempo de exposição das plantas ao Al^{3+} e da sensibilidade das plantas (Ciamporová et al., 2002). O crescimento radicular é, geralmente, fortemente inibido, sendo considerado o sintoma primário da toxidez por alumínio (Al^{3+}) (Ciamporová et al., 2002). Estudos mostram que o alvo primário de ação tóxica do Al é o ápice radicular (Hartwing et al., 2007), especialmente a região da zona de transição (Kollmeier et

al., 2000), havendo, inicialmente, comprometimento do alongamento celular e, posteriormente, da divisão celular (Kochian, 2004).

Os efeitos do PBZ combinado com o Al, eliminando as diferenças genotípicas em termos de crescimento, podem ser atribuídos à inibição na biossíntese de giberelinas, o que, por sua vez, resulta na redução do crescimento radicular (Hedden e Graebe, 1985). Entretanto, como esse fitoregulador foi utilizado em concentração muito baixa (0,6 μM), na qual os genótipos praticamente não diferiram entre si (Figura 1), é possível que essa redução no crescimento tenha sido causada por modificações na composição lipídica e, por consequência, pelo aumento na permeabilidade da membrana plasmática (Khan et al., 2009), permitindo a entrada de maior quantidade de Al nas células radiculares.

Corroborando essa hipótese, o genótipo UFVM-100 (sensível) apresentou teor de Al nos ápices radiculares superior ao encontrado no genótipo UFVM-200 (tolerante). Os resultados, também, confirmam a observação de Matsumoto (2000) de haver uma correlação direta entre o teor de Al nos tecidos radiculares e a sensibilidade das plantas ao estresse por Al. No presente estudo, o genótipo UFVM-100 apresentou teor de Al nos ápices radiculares 22% maior, além de redução no alongamento radicular 32% mais elevada do que o genótipo UFVM-200. Resultados semelhantes foram encontrados por Amenós et al., (2009), utilizando duas variedades de milho com tolerância diferencial ao Al. Eles encontraram maior teor de Al nos ápices radiculares da variedade de milho 16x36 (sensível) em relação à variedade Cateto (tolerante) quando elas, foram expostas a solução nutritiva contendo Al 50 μM .

Nas plantas tratadas com Al, o teor desse elemento nos ápices radiculares aumentou com o tratamento adicional de PBZ apenas no genótipo UFVM-200. Mesmo assim, o teor de Al no genótipo UFVM-100 ainda se manteve significativamente maior (cerca de 9%) do que no UFVM-200. Esse resultado confirma a hipótese de ter o PBZ aumentado a permeabilidade da membrana plasmática, principalmente, do genótipo UFVM-200, o que facilitou a entrada de mais Al, eliminando as diferenças genotípicas.

Em ápices radiculares do cultivar de arroz Rikuu-132 (tolerante) exposto ao Al 20 μM + fenpropimorfo (também, denominado PBZ) 0,66 μM e ao Al 20 μM + uniconazol-P 1,02 μM foi observado aumento nos teores de Al (Khan et al., 2009).

Esses autores atribuíram o aumento no teor de Al na presença de fenpropimorfo e de uniconazol-P, ambos inibidores da síntese de Δ^5 -esteróis, ao fato desses inibidores modificarem a composição dos lipídios da membrana plasmática das células do ápice radicular, aumentando sua permeabilidade e provocando maior acúmulo de Al no cultivar tolerante, em relação ao cultivar Rikuu-20 (sensível).

A razão desse efeito diferencial do inibidor ainda não foi completamente elucidada, mas pode estar ligada à modificação na composição de esteróis, com consequente modificação na permeabilidade das membranas celulares, conforme sugerido por diferentes autores (Hartmann, 1998; Khan et al., 2009).

O acúmulo diferencial do Al nos ápices radiculares dos dois genótipos após tratamento com esse elemento foi confirmado pela técnica de coloração com hematoxilina. A hematoxilina é um corante orgânico, de caráter básico, que ao complexar o Al promove a formação de uma cor arroxeada escura no ápice radicular (Baker, 1962). Como esse corante é específico para Al, a coloração indica, com boa margem de precisão, a presença deste elemento nos tecidos. Por essa razão, a técnica tem sido utilizada como ferramenta na discriminação de genótipos quanto à tolerância diferencial ao Al (Yamamoto et al., 2001; Zhen et al., 2009; Khan et al., 2009; Castilhos et al., 2011).

No tratamento apenas com Al, observou-se coloração mais intensa no ápice radicular do genótipo UFVM-100 em relação ao UFVM-200, indicando maior acúmulo de Al nos tecidos daquele genótipo. O aumento no teor de Al após tratamento combinado de Al + PBZ, foi confirmado pela intensificação na coloração apenas no genótipo UFVM-200, mostrando ser a técnica sensível e confiável na detecção do Al.

Como a extração e a quantificação do Al pelo método químico e a visualização do Al por reação com hematoxilina acessam apenas o Al mais externo, provavelmente mantido no apoplasto radicular, essas técnicas podem não definir, de modo inequívoco, a tolerância das plantas ao Al. Em alguns casos, mesmo apresentando teores de Al iguais ou mais elevados nas raízes, a resposta da planta em termos de crescimento é superior a de outra que apresentou teores mais baixos (Yang et al., 2011; Ribeiro et al., 2012). Isso se deve ao fato de uma parte significativa do Al estar no apoplasto, mas formando complexo com fósforo ou outra

estrutura da parede celular e, portanto, tendo pouco ou nenhum efeito sobre o metabolismo celular (Yang et al., 2011a; Yang et al. 2011b).

No presente estudo, entretanto, sob as condições avaliadas, os resultados foram similares aos obtidos pela maioria dos autores, havendo correlação direta entre o teor de Al nos ápices radiculares e o alongamento radicular, ou seja, o genótipo UFVM-200, considerado mais tolerante, acumulou menor quantidade de Al no ápice radicular e sofreu menos os efeitos tóxicos desse elemento. Resultados similares foram obtidos com outras espécies e, ou genótipos como em milho (Giannakoula et al., 2010; Amenós et al., 2009), arroz (Khan et al., 2009), trigo (Ye et al., 2011) e soja (Long Guo et al., 2013).

O tratamento combinado de Al + PBZ, além de ter resultado em maior acúmulo de Al nos ápices radiculares causou redução adicional no alongamento radicular apenas no genótipo UFVM-200, que passou a não diferir estatisticamente do genótipo UFVM-100. Esse aumento na inibição do alongamento radicular, apenas no genótipo UFVM-200, pode estar ligado a uma modificação na permeabilidade da membrana plasmática permitindo maior absorção de Al. O PBZ tem efeito reconhecido na biossíntese de esteróis, alterando a composição desses lipídios e, conseqüentemente, as propriedades da membrana (Khan et. al, 2009a,b)

Os lipídios da membrana plasmática de ápices radiculares são importantes alvos da toxidez por Al e várias alterações na composição desses lipídios foram detectadas em milho (Huynh et al., 2012), arroz (Khan et al., 2009), sorgo (Peixoto et al. 2001), trigo (Zhang et al. 1997) e beterraba (Lindberg e Griffiths, 1993). Outra forma de se analisar os efeitos do Al na composição de lipídios da membrana plasmática tem sido a utilização de inibidores da biossíntese de esteróis (Khan et al., 2009b). Nesse sentido, resultados recentes mostram que em arroz, a quantidade relativa de Δ^5 -esteróis é importante fator na tolerância dessas plantas ao Al (Khan et al., 2009a).

Os esteróis constituem fração importante dos lipídios de membrana e acredita-se que eles apresentem fundamental importância na manutenção da estabilidade da bicamada de lipídios durante perturbações físico-químicas das membranas (Piironen et al., 2000). Os esteróis de plantas, também denominados fitoesteróis, incluem mais de 250 tipos diferentes de esteróis e, ou derivados. Os representantes mais comuns são o β -sitosterol, o estigmasterol e o campesterol.

No presente estudo, além dos três tipos de esteróis terem sido encontrados nos ápices radiculares dos dois genótipos de milho, diferenças na composição de Δ^5 -esteróis da membrana plasmática entre os genótipos de milho UFVM-100 (sensível) e UFVM-200 (tolerante) foram observadas (Fig. 7). O tratamento das plantas com Al resultou em diminuição nos teores de campesterol, estigmasterol e β -sitosterol nos dois genótipos. Na presença de Al, o genótipo UFVM-200 apresentou sempre nos seus ápices radiculares maiores teores de β -sitosterol, estigmasterol, campesterol e teor total de Δ^5 -esteróis do que genótipo UFVM-100. A aplicação de PBZ às plantas tratadas com Al, por outro lado, reduziu o teor total de Δ^5 -esteróis, passando os dois genótipos, a apresentar teores totais de Δ^5 -esteróis praticamente idênticos.

Os teores mais elevados de Δ^5 -esteróis no genótipo UFVM-200 podem ser a explicação para sua maior tolerância ao Al em relação ao genótipo UFVM-100. Esteróis são importantes componentes da membrana plasmática e a modificação de sua proporção relativa na composição lipídica pode alterar não apenas a fluidez da membrana, mas a sua permeabilidade (Grandmougin et al., 1989; Grandmougin-Ferjani et al., 1997) e, portanto, a tolerância das plantas a vários tipos de estresses abióticos. A influência dos esteróis na tolerância à deficiência hídrica (Sankar et al., 2007), salinidade (Kerkeb et al., 2001; López-Pérez et al., 2009), aclimatação ao frio (Bohn et al., 2007) e ao Al já foram relatadas (Khan et al., 2009a,b).

O tratamento com PBZ, reconhecido inibidor da síntese de Δ^5 -esteróis (Khan et al., 2009a,b), por outro lado, reduziu o teor de campesterol, estigmasterol, β -sitosterol e teor total de Δ^5 -esteróis apenas no genótipo UFVM-200 eliminando as diferenças de tolerância entre os dois genótipos. Paralelamente a essa modificação nos teores de esteróis, observou-se aumento no teor de Al, constatado pela análise química ou pela intensificação na coloração roxa escura observada após reação com hematoxilina, além da redução no alongamento radicular, eliminando as diferenças entre os dois genótipos. Os resultados, portanto, indicam que o tratamento com PBZ, realmente, provoca mudanças na composição dos esteróis da membrana plasmática favorecendo a um aumento na sua permeabilidade, justificando, assim, o aumento no teor de Al nos ápices radiculares observado no presente estudo.

Recentemente, foi verificado que em arroz a quantidade relativa de Δ^5 -esteróis é importante fator na tolerância ao Al (Khan et al., 2009a). O cultivar tolerante Rikuu-132 apresentou menor relação fosfolípido/ Δ^5 -esterol do que o cultivar sensível (Rikuu-20), sugestivo de ter a membrana plasmática do cultivar tolerante menor intensidade de carga negativa superficial e menor permeabilidade do que o sensível. Zhang et al. (1997), também encontraram redução na relação fosfolípido/esterol em raízes de um cultivar de trigo tolerante, mas nenhum efeito no sensível após tratamento com Al. Por outro lado, plantas de *Arabidopsis thaliana* geneticamente modificadas para alteração na composição dos lipídios da membrana plasmática apresentaram maior tolerância ao Al (Ryan et al., 2007).

A membrana plasmática, que constitui a barreira de permeabilidade mais externa da célula, é um dos principais alvos dos danos causados por estresses ambientais (Dupont et al., 2011). Diversos tipos de estresses abióticos como salinidade (Salama et al., 2007; López-Pérez et al., 2009), déficit hídrico (Martins Júnior et al., 2008), níveis tóxicos de Al (Peixoto et al., 2001) e PBZ (Grandmougin et al., 1989) são capazes de modificar sua composição, estrutura e permeabilidade. Danos causados por diversos agentes estressantes, como, por exemplo, a toxicidade por Al, têm sido avaliados pelo extravasamento de eletrólitos. No presente estudo, o tratamento com Al resultou em aumento no extravasamento de eletrólitos apenas no genótipo UFVM-100. Nessa condição, esse genótipo chegou a apresentar um extravasamento de eletrólitos 95% superior ao do genótipo UFVM-200. Esse maior extravasamento de eletrólitos no genótipo UFVM-100, considerado mais sensível ao estresse por Al, indica que o Al foi capaz de modificar importantes características da membrana plasmática, tornando-a mais permeável.

Aparentemente, os efeitos do Al alteram a organização e a dinâmica de componentes da membrana, que, somadas, resultam na perda de metabólitos celulares. Uma possível explicação seria uma indução à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) e, ou pela inativação de enzimas antioxidativas nas células vegetais causada por níveis tóxicos de Al (Jones et al., 2006; Shamsi et al., 2008). Outra possibilidade seria a modificação da composição lipídica da membrana plasmática. O Al pode modificar a composição de ácidos graxos (Peixoto et al., 2001), de vários tipos de lipídios (Zhang et al., 1997) e, mais recentemente, foi verificado que o Al também pode modificar a composição de Δ^5 -esteróis (Khan et al., 2009).

No presente estudo foi verificado que o tratamento apenas com Al reduziu os teores totais e individuais dos três Δ^5 -esteróis presentes nos ápices radiculares nos dois genótipos de milho, mas o genótipo UFVM-200 apresentou sempre maiores teores totais e de β -sitosterol, estigmasterol e campesterol em relação ao genótipo UFVM-100. Modificações como essas podem alterar a fluidez e a permeabilidade da membrana plasmática, conforme sugere Dupont et al. (2011), resultando em extravasamento diferencial de eletrólitos, como se observou no presente experimento.

A aplicação combinada de PBZ às plantas tratadas com Al resultou em redução no extravasamento de eletrólitos no genótipo UFVM-100, mas em aumento no genótipo UFVM-200. Apesar disso, o genótipo UFVM-100 ainda apresentou uma porcentagem de extravasamento de eletrólitos cerca de 40% maior que do genótipo UFVM-200. Concomitantemente com essas modificações no extravasamento de eletrólitos, ocorreu diminuição nos teores totais de Δ^5 -esteróis, β -sitosterol, estigmasterol e campesterol apenas no genótipo UFVM-200, que passou a apresentar teores praticamente iguais aos encontrados no genótipo UFVM-100. Essa diminuição nos teores desses três esteróis pode justificar o aumento no extravasamento de eletrólitos do genótipo UFVM-200, mas não explica a diferença de tolerância ao Al entre os dois genótipos.

Os mecanismos de tolerância ao Al em plantas superiores ainda não são totalmente conhecidos, mas há uma aceitação generalizada da participação de ácidos orgânicos na tolerância ao Al de várias espécies vegetais (Kochian, 2004). Acredita-se que as plantas tolerantes ao Al possam aumentar a biossíntese e, ou exsudação de certos ácidos orgânicos para o meio de cultivo (Kochian et al., 2004). Esses ácidos orgânicos seriam capazes de complexar a forma monomérica e mais tóxica do Al^{3+} , reduzindo ou eliminando sua fitotoxicidade. Os estudos mostram que as plantas diferem quanto às espécies de ácidos orgânicos produzidos e, ou exsudados, quanto ao padrão de exsudação e, também, quanto à concentração de Al a que as raízes foram expostas (Ma, 2000). Além disso, em resposta ao Al, algumas espécies de plantas tolerantes podem exsudar mais de um tipo de ácido orgânico (Dong et al., 2008; Khan et al., 2009a; Yang et al., 2011a).

No presente estudo, tanto nos ápices radiculares quanto na solução externa de cultivo, foram detectados, basicamente, três ácidos orgânicos: o ácido cítrico, o

ácido málico e o ácido succínico. O teor de ácido succínico, entretanto, além de muito baixo, não variou significativamente com os tratamentos e, portanto, foi considerado de pequena ou nenhuma importância para os mecanismos de tolerância ao Al nesses dois genótipos de milho.

As plantas-controle do genótipo UFVM-200 apresentaram teores de ácido cítrico nos ápices radiculares mais elevados que no genótipo UFVM-100. O tratamento com Al resultou em redução nos teores de ácido cítrico nas raízes dos dois genótipos, mas, principalmente, no UFVM-200, passando os dois genótipos a apresentarem, essencialmente, o mesmo teor desse ácido orgânico. Nessa situação, entretanto, as raízes das plantas do genótipo UFVM-200 passaram a exsudar 2,1 vezes mais ácido cítrico do que as do genótipo UFVM-100. Aparentemente, a redução nos teores radiculares de ácido cítrico foi resultado de sua exsudação através de canais de ânions específicos para esse ácido orgânico (Yang et al., 2006; Yu et al., 2012; Yang et al., 2013). Os resultados obtidos no presente estudo indicam fortemente a participação do ácido cítrico na tolerância ao Al e sugerem que, pelo menos parte da tolerância do genótipo UFVM-200 possa ser atribuída à maior quantidade exsudada deste ácido orgânico.

A aplicação combinada do PBZ e Al resultou em aumento nos teores de ácido cítrico nos ápices radiculares, mas redução nas quantidades exsudadas nos dois genótipos em relação ao tratamento com apenas Al. Nessa condição, entretanto, o genótipo UFVM-200, foi capaz de exsudar mais ácido cítrico do que o genótipo UFVM-100. Como não existem relatos de efeitos do PBZ sobre a biossíntese e, ou atividade dos canais de exsudação de ácido cítrico, os efeitos dessa substância podem estar relacionados à modificação na composição lipídica da membrana e, ou na atividade da H⁺-ATPase (Grandmougin-Ferjani et al., 1997), bomba geradora do gradiente de prótons essencial para a abertura de canais iônicos e para o estabelecimento de um gradiente favorável à exsudação de ânions.

As plantas-controle dos dois genótipos de milho apresentaram teores de ácido málico similares nos ápices radiculares. O tratamento com Al resultou em aumento nos teores de ácido málico nas raízes nos dois genótipos, mas principalmente no UFVM-100, que passou a ter um teor mais elevado desse ácido orgânico. Nessa situação, as raízes das plantas do genótipo UFVM-100 passaram a exsudar 44% mais ácido málico do que o genótipo UFVM-200. Os resultados indicam que o

genótipo UFVM-100, na presença de Al, não apenas produz mais ácido málico, mas, também, o exsuda em maior quantidade.

O tratamento combinado de PBZ com Al resultou em aumento nos teores de ácido málico nos dois genótipos, mas redução na sua exsudação para a solução externa. Aparentemente, o PBZ tem, também, algum efeito inibitório sobre a biossíntese ou atividade do canal de exsudação de malato, reduzindo a liberação deste ácido para a solução externa. Se a ação do PBZ é sobre os Δ^5 -esteróis, ela é mais intensa nas membranas do genótipo UFVM-100.

A questão de qual genótipo se beneficia mais da exsudação desses dois ácidos precisa ser mais bem estudada. O somatório das quantidades dos dois ácidos exsudados para a solução externa mostra que o genótipo UFVM-200 exsudou 22% mais ácidos orgânicos do que o UFVM-100. Vale ressaltar que o ácido cítrico, sendo tricarboxílico (citrato³⁻), apresenta maior capacidade de formar complexo com Al do que o ácido málico (dicarboxílico) (Gonçalves et al., 2005). Aparentemente, no contexto desses dois ácidos orgânicos, o genótipo UFVM-200 apresenta maior capacidade de reduzir os efeitos tóxicos do Al.

Piñeros et al. (2005) avaliando seis genótipos de milho verificaram que o tratamento das plantas com Al 40 μ M por 24 h, estimulou a exsudação apenas de citrato, tendo os genótipos tolerantes exsudados maiores quantidades de citrato para o meio de cultivo. Três outras variedades de milho (Sikuani, Clavito e HS701b), por outro lado, após exposição ao Al 20 μ M, por 24 h, exsudaram cerca de 17 vezes mais oxalato em relação aos seus respectivos controles (Kidd et al., 2001). Jorge et al. (1997) detectaram, na variedade IAC-Taiúba, exsudação de citrato e, também, de ácido málico após exposição das plantas ao Al 50 μ M por 30 h. A natureza do ácido orgânico exsudado, portanto, depende do genótipo em estudo. No presente estudo, apenas dois ácidos orgânicos (cítrico e málico) foram encontrados nos exsudados.

Ficou claro que tanto o Al quanto o PBZ modificam o teor total e a composição dos Δ^5 -esteróis afetando conseqüentemente a permeabilidade da membrana plasmática. Essas mudanças nas características da membrana plasmática parecem interferir na atividade da H⁺ATPase (Grandmoungin-Ferjani et al., 1987). No presente estudo, verificou-se que o tratamento das plantas com Al reduziu a atividade da H⁺-ATPase no genótipo UFVM-100 (sensível), mas aumentou no

genótipo UFVM-200 (tolerante). Resultados semelhantes foram observados em raízes de trigo por Ahn et al., (2004). Esses autores constaram um decréscimo na atividade da H⁺-ATPase nos ápices radiculares do cultivar sensível ES8 e um aumento na atividade da H⁺-ATPase no cultivar tolerante ET8. Em sorgo e em milho, o tratamento com Al, também, reduziu a atividade da H⁺-ATPase (Cambráia e Calbo, 1980; Façanha e de Meis, 1995).

O modo de ação do Al sobre a H⁺-ATPase não é conhecido. Acredita-se que o Al possa se ligar à superfície da membrana plasmática, alterando a eletronegatividade de sua superfície (Kinraide, 2006), causando sua rápida despolarização (Ahn et al., 2004). Resultados semelhantes foram observados em raízes de trigo por Ahn et al., (2004). Esses autores constaram um decréscimo na atividade da H⁺-ATPase nos ápices radiculares do cultivar sensível ES8 e um aumento na atividade da H⁺-ATPase no cultivar tolerante ET8. Outra possibilidade foi levantada por Shen et al., (2005), que observaram aumento na atividade da H⁺-ATPase nas raízes de dois cultivares de soja expostas ao Al. Segundo esses autores, o efeito do Al foi resultado da regulação transcricional e translacional durante a biossíntese da proteína transportadora.

É interessante observar que o aumento na atividade da H⁺-ATPase ocorreu paralelamente ao aumento na exsudação do ácido cítrico pelas raízes do genótipo UFVM-200 (tolerante). Shen et al. (2005) observaram este tipo de correlação em dois cultivares de soja com tolerância diferencial ao Al. Nesse caso, a maior atividade da H⁺-ATPase também coincidiu com a maior excreção de citrato pelo cultivar de soja tolerante ao Al relativamente ao cultivar sensível ao Al. Esse tipo de resultado reforça a hipótese da necessidade do gradiente de prótons gerado pela H⁺-ATPase para o funcionamento dos canais aniônicos necessários à exsudação de ácidos orgânicos pelas raízes das plantas (Yang et al., 2006; Yu et al., 2012; Yang et al., 2013).

Entretanto, no genótipo UFVM-100 (sensível) ocorreu o contrário. Ou seja, na presença de Al, houve uma redução na atividade da H⁺-ATPase, e mesmo assim houve aumento na exsudação de citrato e de malato pelas raízes, principalmente de malato. Esses resultados sugerem que no genótipo UFVM-100, a exsudação de ácidos orgânicos, estimulada pelo Al, depende menos da atividade da H⁺-ATPase do que no genótipo UFVM-200. Yang et al., (2011) analisaram a influência do Al na

exsudação de ácidos orgânicos associada a um possível aumento na atividade da H⁺-ATPase em raízes de tomate (*Lycopersicon esculentum* 'Hezuo903'). Eles constataram que ao aplicarem o vanadato, um inibidor específico da H⁺-ATPase, houve inibição na atividade da enzima, porém sem efeito significativo sobre a exsudação de oxalato estimulado pela toxidez por Al. Ao aplicarem o fenilglioxal, um inibidor de canal de ânions, observaram eliminação da exsudação de oxalato e modificação na atividade da H⁺-ATPase. Resultados semelhantes a este foram observados em raízes de cevada (Matsumoto, 1988), abobora (*Cucurbita pepo*) (Ahn et al., 2001) e feijão (Yang et al., 2007).

A aplicação simultânea de PBZ e Al aumentou a atividade da H⁺-ATPase nos dois genótipos de milho em relação ao tratamento com Al isoladamente, mantendo-se, entretanto, a diferença entre os genótipos. É interessante observar que o PBZ, também, aumentou a excreção de H⁺ nos dois genótipos em relação ao tratamento com Al isoladamente. Há uma boa correlação entre a excreção de prótons e a atividade da H⁺-ATPase para esse tratamento (Figuras 18 e 16), indicando uma relação direta entre essa enzima e a excreção de prótons nos dois genótipos. Assim, o genótipo UFVM-200 excretou mais prótons porque foi capaz de manter maior atividade da H⁺-ATPase. O PBZ aumentou a atividade da H⁺-ATPase em frutos de pimentão (*Capsicum annuum* L) (Lurie et al., 1994), mas os autores não explicam o modo de ação desse composto. O PBZ, entretanto, tem sabidamente influência sobre a composição de esteróis e esses sobre a atividade da H⁺-ATPase (Grandmougin-Ferjani et al., 1997; Khan et al., 2009a,b).

Outra possível explicação para esse aumento na atividade da H⁺-ATPase nos dois genótipos na presença de Al + PBZ poderia ser pelo aumento no teor de carboidratos nas raízes, conforme sugere (Zheng et al., 2012). Esses autores estudando o efeito do PBZ (300 mg L⁻¹) sobre os teores de vários metabólitos em folhas e bulbos de *Lillium*, observaram redução nos teores de giberelinas e aumento nos teores de sacarose. Esse aumento no teor desses carboidratos parece resultar em aumento na fosforilação do C-terminal da H⁺-ATPase e, dessa forma, implementar a interação da proteína 14-3-3 com a H⁺-ATPase fosforilada, aumentando a atividade da H⁺-ATPase (Camoni et al., 2006).

A aplicação adicional do PBZ sobre as plantas tratadas com Al reduziu a exsudação de ácido cítrico nos dois genótipos, especialmente no genótipo UFVM-200. Essa redução ocorreu, também, na exsudação de malato, mas apenas no genótipo UFVM-100. Paralelamente à redução na exsudação desses ácidos orgânicos, houve aumento na atividade da H⁺-ATPase nos dois genótipos, mantendo-se a maior atividade no genótipo UFVM-200. Como não existe na literatura qualquer evidência de que o PBZ atue como inibidor da síntese de canais aniônicos, a única explicação plausível para a redução nas exsudações de citrato e malato pelas raízes dos genótipos de milho estudados relativamente ao tratamento apenas com Al seria pelas mudanças introduzidas na composição de esteróis da membrana (Figura 7), alterando a atividade dos canais de ácidos orgânicos.

Os resultados observados no presente estudo mostram que o genótipo UFVM-200 é realmente mais tolerante ao Al do que o UFVM-100 e, pelo menos parte dessa tolerância está relacionada a características de suas membranas, podendo envolver a composição de Δ^5 -esterol e a atividade da H⁺-ATPase.

6. RESUMO E CONCLUSÕES

A presença de Al 50 μM na solução de cultivo ocasionou maior acúmulo desse elemento nas raízes das plantas do genótipo UFVM-100 (sensível) e, conseqüentemente, maior inibição no alongamento da raiz principal em relação ao genótipo UFVM-200 (tolerante). O Al também causou redução nos teores dos esteróis campesterol, estigmasterol e β -sitosterol e nos teores totais desses Δ^5 -esteróis nos ápices radiculares dos dois genótipos de milho. Porém, essa redução foi menor no genótipo tolerante que apresentou teores desses esteróis maiores em relação ao genótipo sensível. O extravasamento de eletrólitos foi maior no genótipo UFVM-100 na presença de Al, provavelmente devido a maiores danos na membrana plasmática causados pelo maior acúmulo desse elemento em suas raízes. Os teores de citrato e malato nas raízes dos dois genótipos sofreram alterações em resposta ao tratamento com Al. Os teores de ácido cítrico e málico foram aproximadamente iguais nas raízes dos dois genótipos. A exsudação de citrato e malato foi estimulada nos dois genótipos em resposta ao tratamento com Al. A exsudação de citrato foi maior no genótipo UFVM-200 e a de malato no genótipo UFVM-100. Entretanto, a exsudação total de ácidos orgânicos pelas raízes do genótipo UFVM-200 foi maior que a exsudação pelas raízes do genótipo sensível. Observou-se alteração na atividade da H^+ -ATPase nos dois genótipos de milho na presença de Al 50 μM . Esse elemento reduziu a atividade da H^+ -ATPase no genótipo UFVM-100 e, em contraste, aumentou-a no genótipo UFVM-200. Entretanto, mesmo com a diminuição na atividade da H^+ -ATPase no genótipo UFVM-100, a concentração de H^+ livres excretados para a solução de cultivo aumentou nos dois genótipos, sendo praticamente iguais.

A presença do Al juntamente com o PBZ na solução de cultivo ocasionou aumento no teor de Al nos ápices radiculares apenas no genótipo UFVM-200. Como consequência do aumento no teor desse elemento nos ápices radiculares no genótipo tolerante, ocorreu maior inibição do alongamento radicular nesse genótipo, eliminando a diferença entre os dois genótipos. O PBZ, juntamente com o Al, reduziu o teor dos esteróis campesterol, estigmasterol e β -sitosterol e os teores totais dos Δ^5 -esteróis nos dois genótipos. Entretanto, essa redução foi ~~muito~~ maior no genótipo UFVM-200, eliminando, dessa forma as diferenças entre os dois genótipos em

relação ao tratamento apenas com Al. Paralelamente, a presença do PBZ ocasionou aumento no extravasamento de eletrólitos no genótipo UFVM-200 e uma pequena redução no genótipo sensível, diminuindo a diferença entre esses dois genótipos em relação ao tratamento apenas com Al. O PBZ aumentou os teores de ácido cítrico e málico nos dois genótipos. A exsudação de citrato e malato foi inibida nos dois genótipos na presença de Al + PBZ em relação ao tratamento apenas com Al. A inibição na exsudação de citrato foi maior no genótipo UFVM-200, enquanto a inibição na exsudação de malato no genótipo UFVM-100. O tratamento combinado Al + PBZ aumentou a atividade da H⁺-ATPase nos dois genótipos, sendo esse aumento maior no genótipo tolerante, comparativamente ao àquele com apenas Al. Paralelamente, a concentração de H⁺ livres na solução de cultivo aumentou no genótipo UFVM-200, mas reduziu no UFVM-100.

Os resultados do presente estudo comprovam a maior tolerância ao Al apresentada pelo genótipo de milho UFVM-200 em comparação ao UFVM-100 e são sugestivos de que parte da tolerância do genótipo UFVM-200 ao Al pode estar associada à sua capacidade manter níveis mais elevados de Δ^5 -esteróis fundamentais para o funcionamento da membrana plasmática.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHN, S.J.; SIVAGURU, M.; OSAWA, H.; CHUNG, G.C.; MATSUMOTO, H. (2001). Aluminum inhibits the H⁺-ATPase activity by permanently altering the plasma membrane surface potentials in squash roots. **Plant Physiology**, 126, 1381–1390.
- AHN, S.J.; RENGEL, Z.; MATSUMOTO, H. (2004). Aluminum-induced plasma membrane surface potential and H⁺-ATPase activity in near isogenic wheat lines differing in tolerance to aluminum. **New Phytology**, 162, 71–79.
- AMENÓS, M.; CORRALES, I.; POSCHENRIEDER, C.; ILLÉS, P.; BALUSKA, F.; BARCELÓ, J. (2009). Different Effects of Aluminum on the Actin Cytoskeleton and Brefeldin A-Sensitive Vesicle Recycling in Root Apex Cells of Two Maize Varieties Differing in Root Elongation Rate and Aluminum Tolerance. **Plant Cell Physiology**, 50, 528–540.
- STILL, J.R.; PILL, W.G. (2004). Growth and stress tolerance of tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum* Mill) in response to seed treatment with paclobutrazol. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, 79, 197-203.
- BENVENISTE, P. (2004). Biosynthesis and accumulation of sterols. **Annual Review Plant Biology**, 55, 429–457.
- BOHN, M.; LUTHJE, S.; SPERLING, P.; HEINZ, E.; DORFFLING, K. (2007). Plasma membrane lipid alterations induced by cold acclimation and abscisic acid treatment of winter wheat seedlings differing in frost resistance. **Journal of Plant Physiology**, 164: 146-156.
- BOSE, J.; BABOURINA, O.; SHABALA, S.; RENGE, Z. (2010). Aluminium-induced ion transport in Arabidopsis: the relationship between Al tolerance and root ion flux. **Journal of Experimental Botany**, 61, 3163–3175.
- CAMBRAIA, J.; CALBO, A.G. (1980). Efeito do alumínio sobre a absorção e sobre o transporte de fósforo em dois cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench). **Revista Ceres**, 27, 615-625.

- CAMBRAIA, J.; GALVANI, F.R.; ESTEVÃO, M.M.; SANT'ANNA, R. (1983). Effects of aluminum on organic acid, sugar and amino acid composition of the root system of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). **Journal of Plant Nutrition**, 6, 313-322.
- CAMONI, L.; MARRA, M.; GARUFI, A.; VISCONTI, S.; ADUCCI, P. (2006). The maize root plasma membrane H⁺-ATPase is regulated by a sugar-induced transduction pathway. **Plant Cell Physiology**, 47, 743–747.
- CASTILHOS, G.; FARIASB, J.G.; SCHNEIDERA, A.B.; OLIVEIRA, P.H.; NICOLOSO, F.T.; SCHTINGERC, M.R.; DELATORREA, C. A. (2011). Aluminum-stress response in oat genotypes with monogenic tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, 74, 114–121.
- CIAMPOROVÁ, M. (2002). Morphological and structural responses of plant roots to aluminium at organ, tissue, and cellular levels. **Biologia Plantarum**, 45, 161-171.
- CHEN, J.; SUCOFF, E.I.; STADELMANN, E.J. (1991). Aluminum and temperature alteration of cell membrane permeability of *Quercus rubra*. **Plant Physiology**, 96, 644-649.
- DELHAIZE, E.; RYAN, P.R. (1995). Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiology**, 107, 315-321.
- DELHAIZE, E.; RYAN, R. P.; MA, F. J. (2001). Aluminum tolerance in plants and the complexing role of organic acids. **Trends in Plant Science**, 6, 273-278.
- DONCHEVA, S.; AMENOS, M.; POSCHENRIEDER, C.; BARCELÓ, J. (2005). Root cell patterning: a primary target for aluminium toxicity in maize. **Journal of Experimental Botany**, 56, 1213-1220.
- DONG, X.Y.; SHEN, R.F.; CHEN, Z.L.; MA, J.F. (2008). Secretion of malate and citrate from roots is related to high Al resistance in *Lespedeza bicolor*. **Plant and Soil**, 306, 139–147.
- DUPONT, S.; BENEY, L.; FERREIRA, T.; GERVAIS, P. (2011). Nature of sterols affects plasma membrane behavior and yeast survival during dehydration. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1803, 1520-1528.

- FAÇANHA, A.R.; de MEIS, L. (1995). Inhibition of maize root H⁺-ATPase by fluoride and fluoraluminate complexes. **Plant Physiology**, 108, 241-246.
- FERREIRA, D.F. (1999) SISVAR - Sistema de análises estatísticas. Versão 4.3. Lavras: UFLA.
- FLETCHER, R.A.; GILLEY, A.; SANKLA, N.; DAVIS, T.D. (2000). Triazoles as plant growth regulators and stress protectants. **Horticultural Reviews**, 24, 55-138.
- FRANÇA, M.G.C.; ROSSIELLO, R.O.P.; RAMOS, F.T.; ZONTA, E. (2006). Root growth and proton efflux rates of rice seedlings in a greenhouse environment. **Acta Botanica Brasilica**, 20, 25-30.
- FURUKAWA, J.; YAMAJI, N.; WANG, H.; MITANI, N.; MURATA, Y.; SATO, K.; KATSUHARA, M.; TAKEDA, K.; MA, J.F. (2007). An aluminum-activated citrate transporter in barley. **Plant Cell Physiology**, 48, 1081–1091.
- GIANNAKOULA, A.; MOUSTAKASA, M.; SYROS, T.; YUPSANISB, T. (2010). Aluminum stress induces up-regulation of an efficient antioxidant system in the Al-tolerant maize line but not in the Al-sensitive line. **Environmental and Experimental Botany**, 67, 487–494.
- GONÇALVES, J.F.C.; CAMBRAIA, J.; MOSQUIM, P.R.; ARAÚJO, E.F. (2005). Aluminum effect on organic acid production and accumulation in sorghum. **Journal of Plant Nutrition**, 28, 507-520.
- GRANDMOUGIN, A.; BOUVIER-NAVÉ, P.; ULLMANN, P.; BENVENISTE, P.; HARTMANN, M.A. (1989). Cyclopropyl sterols and phospholipid composition of membrane fractions from maize roots treated with fenpropimorph. **Plant Physiology**, 90, 591–597.
- GRANDMOUGIN-FERJANI, A.; SCHULER-MULLER, I.; HARTMANN, M.A. (1997). Sterol modulation of the plasma membrane H⁺-ATPase activity from corn roots reconstituted into soybean lipids. **Plant Physiology**, 113, 163–174.
- HARTMANN, M.A. (1998). Plant sterols and the membrane environment. **Annual Review of Plant Biology**, 3, 170-175.

- HARTWING, I.; OLIVEIRA, A.C.; CARVALHO, F.I.F.; BERTAN, I.; SILVA, J.A.G.; SCHMID, D.A.M.; VALÉRIO, I.P.; MAIA, L.C.; FONSECA, D.A.R.; REIS, C.E.S. (2007). Associated mechanisms of aluminum tolerance in plants. **Ciências Agrárias**, 28, 219-228.
- HEDDEN, P.; GRAEB, J.E. (1985). Inhibition of gibberellin biosynthesis by paclobutrazol cell-free homogenates of *Curcubita maxima* endosperm and *Malus pumila* embryos. **Journal of Plant Growth Regulation**, 4, 111-122.
- HORST, W.J.; WANG, Y.; ETICHA, D. (2010). The role of the root apoplast in aluminium induced inhibition of root elongation and in aluminium resistance of plants: a review. **Annals of Botany**, 106, 185-197.
- HUYNH, V.B.; REPELLINA, A.; FODILA, Y.Z.; ANH, T.P.T. (2012). Aluminum stress response in rice: effects on membrane lipid composition and expression of lipid biosynthesis genes. **Physiologia Plantarum**, 146, 272–284.
- ISHIKAWA, S.; WAGATSUMA, T. (1998). Plasma membrane permeability of root-tip cells following temporary exposure to Al ions is a rapid measure of Al tolerance among plant species. **Plant and Cell Physiology**, 39, 516–525.
- JHAM, G.N.; FERNANDES, S.A.; GARCIA, C.F.; SILVA, A. A. (2002). Comparison of GC and HPLC for the quantification of organic acids in coffee. **Phytochemical Analysis**, 13, 99-104.
- JONES, D.L.; BLANCAFLOR, E.B.; KOCHIAN, L.V.; GILROY, S. (2006). Spatial coordination of aluminium uptake, production of reactive oxygen species, callose production and wall rigidification in maize roots. **Plant Cell and Environment**, 29, 1309-1318.
- JORGE, R.A.; ARRUDA, P. (1997). Aluminum-induced organic acids exudation by roots of an aluminum-tolerance tropical maize. **Phytochemistry**, 48:675-681.
- KHAN, M.S.H.; TAWARAYA, T.; SEKIMOTOB, H.; KOYAMA, H.; KOBAYASHI, Y.; MURAYAMA, T.; CHUBA, M.; KAMBAYASHI, M.; SHIONO, Y.; UEMURA, M.; ISHIKAWA, S.; WAGATSUMA, T. (2009a). Relative abundance of Δ^5 -sterols in plasma membrane lipids of root-tip cells correlates with aluminum tolerance of rice. **Physiologia Plantarum**, 135, 73–83.

- KHAN, M.S.H.; WAGATSUMA, T.; AKHTER, A.; TAWARAYA, K. (2009b). Sterol biosynthesis inhibition by paclobutrazol induces greater aluminum (Al) sensitivity in Al tolerant rice. **American Journal of Plant Physiology**, 4, 89-99.
- KERKEB, L.; DONAIRE, J. P.; RODRIGUEZ-ROSALES, M.P. (2001). Plasma membrane H⁺-ATPase activity is involved in adaptation of tomato calli to NaCl. **Physiologia Plantarum**, 111, 483-490.
- KIDD, P.S.; LIUGANY, M.; POSCHENRIEDER, C.; GUNSÉ, B.; BARCELÓ, J. (2001). The role of root exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L.). **Journal of Experimental Botany**, 52, 1339-1352.
- KIM, Y.S.; PARK, W.; NIAN, H.; SASAKI, T.; EZAKI, B.; JANG, Y.; CHUNG, G.; BAE, H.; AHN, S.J. (2010). Aluminum tolerance associated with enhancement of plasma membrane H⁺-ATPase in the root apex of soybean. **Soil Science and Plant Nutrition**, 56, 140–149.
- KINRAIDE, T.B.; RYAN, P.R.; KOCHIAN, L.V. (1992). Interactive effects of Al³⁺, H⁺, and other cations on root elongation considered in terms of cell-surface electrical potential. **Plant Physiology**, 99, 1461–1468.
- KINRAIDE, T.B. (2006). Plasma membrane surface potential (ψ_{PM}) as a determinant of ion bioavailability: A critical analysis of new and published toxicological studies and a simplified method for the computation of plant ψ_{PM} . **Environmental Toxicology and Chemistry**, 25, 3188-3198.
- KOCHIAN, L.V. (1995). Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Review of Plant Biology**, 46, 237-260.
- KOCHIAN, L.V.; HOEKENGA, O.A.; PIÑEROS, M.A. (2004). How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, 55, 459–493.
- KOCHIAN, L.V.; PINEROS, M.A.; HOEKENGA, O.A. (2005). The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. **Plant and Soil**, 274, 175–195.

- KOLLMEIER, M.; FELLE, H.H.; HORST, W.J. (2000). Genotypic differences in aluminum resistance of maize are expressed in the distal part of the transition zone. Is reduced basipetal auxin flow involved in inhibition of root elongation by aluminum? **Plant Physiology**, 122, 945-956.
- KRTKOVÁ, J.; HAVELKOVÁ, L.; KI REPELOVÁ, A. FI, R.; VOSOLSOBE, S.; NOVOTNÁ, Z.; MARTINEC, J.; SCHWARZEROVÁ, K.R. (2012). Loss of membrane fluidity and endocytosis inhibition are involved in rapid aluminum-induced root growth cessation in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology and Biochemistry**, 60, 88-97.
- LARSSON, C.; WIDELL, S.; KJELBOM, P. (1987). Preparation of high-purity plasma membranes. **Methods in Enzymology**, 148, 558–568.
- LINDBERG, S.; GRIFFITHS, G. (1993). Aluminium effects on ATPase activity and lipid composition of plasma membranes in sugar beet roots. **Journal of Experimental Botany**, 44, 1543-1550.
- LIU, J.; MAGALHAES, J.V.; SHAFF, J.; KOCHIAN, L.V. (2009). Aluminum-activated citrate and malate transporters from the MATE and ALMT families function independently to confer *Arabidopsis* aluminum tolerance. **The Plant Journal**, 57, 389–399.
- LE VAN, H.; KURAUSHI, S.; SAKURAI, N. (1994). Aluminum-induced rapid root inhibition and changes in cell-wall components of squash seedlings. **Plant Physiology**, 106, 971-976.
- LONG GUO, C.L.; CHEN, Q.; ZHAO, X.L.; CHEN, X.Q.; ZHAO, Y.; WANG, L.; LI, K. Z.; YU, Y.X.; CHEN, L.M. (2013). Al-enhanced expression and interaction of 14-3-3 protein and plasma membrane H⁺-ATPase is related to al-induced citrate secretion in an al-resistant black soybean. **Plant Molecular Biology Reporter**, 31, 1012–1024.
- LOPES, A.S.; GUILHERME, L.A.G. (1994). Solos sob cerrado: manejo da fertilidade para a produção agropecuária. **ANDA**, 2^a edição, 62p. (boletim técnico, 5).

- LÓPEZ-PÉREZ, L.; MARTINEZ-BALLESTA, M.C.; MAUREL, C.; CARVAJAL, M. (2009). Changes in plasma membrane lipids, aquaporins and proton pump of broccoli roots, as an adaptation mechanisms to salinity. **Phytochemistry**, 70, 492-500.
- LURIE, S.; LIPSKER, R.Z.; ALONI, B. (1994). Effects of paclobutrazol and chilling temperatures on lipids, antioxidants and ATPase activity of plasma membrane isolated from green bell pepper fruits. **Physiologia Plantarum**, 91, 593-598.
- MA, J.F. (2000). Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants. **Plant and Cell Physiology**, 41, 383–390.
- MA, J.F.; RYAN, P.R.; DELHAIZE, E. (2001). Aluminum tolerance in plants and the complexing role of organic acids. **Trends in Plant Science**, 6, 273-278.
- MA, J.F.; FURUKAWA, J. (2003). Recent progress in the research of external Al detoxification in higher plants: a minireview. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 97, 46-51.
- MA, J.F.; SHEN, R.; NAGAO, S.; TANIMOTO, Eiichi. (2004). Aluminum Targets Elongating Cells by Reducing Cell Wall Extensibility in Wheat Roots. **Plant Cell Physiology**, 45, 583–589.
- MA, J.F. (2005). “Physiological mechanisms of Al resistance in higher plants.” **Soil Science and Plant Nutrition**, 51, 609–612.
- MA, J.F. (2007). Syndrome of aluminum toxicity and diversity of aluminum resistance in higher plants. **International Review of Cytology**, 264, 225–252.
- MAGALHÃES, J.V. (2010). How a microbial drug transporter became essential for crop cultivation on acid soils: aluminium tolerance conferred by the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family. **Annals of Botany**, 106, 199–203.
- MARTINS JÚNIOR, R.R.; OLIVEIRA, M.S.C.; BACCACHE, M.A.; de PAULA, F.M. (2008). Effects of water deficit and rehydration on the polar lipid and membranes resistance leaves of *Phaseolus vulgaris* L. Cv. Pérola. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 51, 361-367.
- MATSUMOTO, H. (2000). Cell biology of aluminium toxicity and tolerance in higher plants. **International Review Cytology**, 200, 1-46.

- NICHOL, B.E.; OLIVEIRA, L.A.; GLASS, A.D.M.; SIDDIQI, M.Y. (1993). The effects of aluminum on the influx of calcium, potassium, ammonium, nitrate, and phosphate in an aluminum-sensitive cultivar of barley (*Hordeum vulgare* L.). **Plant Physiology**, 101, 1263-1266.
- PALMGREN, M.G. (2001). Plant plasma membrane H⁺-ATPases: powerhouses for nutrient uptake. **Annual Review of Biology**, 52, 817–845.
- PEIXOTO, P.H.P.; PIMENTA, D.S.; CAMBRAIA, J. (2007). Alterações morfológicas e acúmulo de compostos fenólicos em plantas de sorgo sob estresse de alumínio. **Bragantia**, 66, 17-25.
- PEIXOTO, P.H.P.; Cambraia, J.; Sant'Anna, R.; Mosquim, P.R.; Moreira, M.A. (2001). Aluminum effects on fatty acid composition and lipid peroxidation of a purified plasma membrane fraction of root apices of two sorghum cultivars. **Journal of Plant Nutrition**, 24, 1061-1070.
- PIÑEROS, M.A.; SHAFF, J.E.; MANSLANK, H.S.; CARVALHO ALVES, V.M. (2005). Aluminum resistance in maize cannot be solely explained by root organic acid exudation. A comparative physiological study. **Plant Physiology**, 137, 231–241.
- PIÑEROS, M.A.; MAGALHAES, J.V.; CARVALHO ALVES, V.M.; KOCHIAN, V. (2002). The physiology and biophysics of an aluminum tolerance mechanism based on root citrate exudation in maize. **Plant Physiology**, 129, 1194–1206.
- PIIRONEN, V.; LINDSAY, D.G.; MIETTINEN, T.A.; TOIVO, J.; LAMPI A.M. (2000). Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 80, 939-966.
- POLLE, E.; KONZAC, C.F.; KITTRICK, J.A. (1978). Visual detection of aluminum tolerance levels in wheat by hematoxylin staining of seedling roots. **Crop Science**, 18, p.823-827.
- RADEMACHER, W. (2000). Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. **Annual Review of Plant Biology**, 51, 501-531.
- RIBEIRO, C.; CAMBRAIA, J.; PEIXOTO, P.H.P.; JÚNIOR, É.M.F. (2012). Antioxidant system response induced by aluminum in two rice cultivars. **Brazilian Journal Plant Physiology**, 24, 107-116.

- RYAN, P.R.; DELHAIZE, E. (2010). The convergent evolution of aluminium resistance in plants exploits a convenient currency. **Functional Plant Biology**, 37, 275-284.
- RYAN, P.R.; RAMAN, H.; GUPTA, S.; HORST, W.H.; DELHAIZE, E. (2009). A second mechanism for aluminum resistance in wheat relies on the constitutive efflux of citrate from roots. **Plant Physiology**, 149, 340–351.
- RYAN, P.R.; LIU, Q.; SPERLING, P.; DONG, B.; FRANKE, S.; DELHAIZE, E. (2007). A higher plant Δ^8 sphingolipid desaturase with a preference for (z)-isomer formation confers aluminum tolerance to yeast and plants. **Plant Physiology**, 144, 1968–1977.
- SALAMA, K.H.A.; MANSOUR, M.M.F.; ALI, F.Z.M.; ABNU-HADID, A.F. (2005). NaCl-induced changes in plasma membrane lipids and proteins of *Zea mays* L. cultivars differing in their response to salinity. **Journal of Plant Nutrition**, 28, 507-520.
- SANKAR, B.; JALEEL, C.A.; MANIVANNAN, P.; KISHIREKUMAR, A.; SOMASUNDARAM, R.; PANNEERSELVAM, R. (2007). Effect of paclobutrazol on water stress amelioration through antioxidants and free radical scavenging enzymes in *Arachis hypogaea* L. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 60, 229-35.
- SASAKI, M., KASAI, M., YAMAMOTO, Y., MATSUMOTO, H. (1995) Involvement of plasma membrane potential in tolerance mechanism of plant roots to aluminium toxicity. **Plant and Soil**, 171, 119-124.
- SASAKI, T.; YAMAMOTO, Y.; EZAKI, B.; KATSUHARA, M.; AHN, S.J.; RYAN, P.R.; DELHAIZE, E.; MATSUMOTO, H. (2004). A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. **Plant Journal**, vol. 37, n.5, 645–653.
- SHANI, E.; WEINSTAINB, R.; ZHANGA, Y.; CASTILLEJOA, C.; KAISERLIC, E.; CHORYC, J.; TSIENB, R.Y.; ESTELLEA, M. (2013). Gibberellins accumulate in the elongating endodermal cells of *Arabidopsis* root. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 110:4834-4839.

- SHAMSI, I.H.; WEI, K.; ZHANG, G.P.; JILANI, G.H.; HASSAN, M.J. (2008). Interactive effects of cadmium and aluminum on growth and antioxidative enzymes in soybean. **Biologia Plantarum**, 52:165-169.
- SHEN, H.; HE, L. F.; SASAKI, T.; YAMAMOTO, Y.; ZHENG, S.J.; LIGABA, A.; YAN, X.L.; AHN, S.J.; YAMAGUCHI, M.; SASAKAWA, H.; MATSUMOTO, H. (2005). Citrate secretion coupled with the modulation of soybean root tip under aluminum stress. Upregulation of transcription, translation, and threonine-oriented phosphorylation of plasma membrane H⁺-ATPase. **Plant Physiology**, 138, 287–296.
- SIVAGURU, M.; HORST, W. (1998). The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize. **Plant Physiology**, 116, 155-163.
- SORGONÀ, A.; LUPINI, A.; MERCATI, F.; DI DIO, L.; SUNSERI, F.; ABENAVOLI, M.R. (2011). Nitrate uptake along the maize primary root: an integrated physiological and molecular approach. **Plant, Cell and Environment**, 34, 1127–1140.
- SOUZA, L.T. (2012). **Papel do óxido nítrico na tolerância ao alumínio em dois genótipos de milho**. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 104f.
- STILL, J.R.; PILL, W.G. (2004). Growth and stress tolerance of tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum* Mill) in response to seed treatment with paclobutrazol. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, 79, 197-203.
- TEKALIGN, T.; HAMMES, P.S. (2005). Growth and biomass production in potato grown in the hot tropics as influenced by paclobutrazol. **Plant Growth Regulation**, 35, 37-46.
- STASS, A.; SMIT, I.; ETICHA, D.; OETTLER, G.; HORST, W.J. (2008). The significance of organic-anion exudation for the aluminum resistance of primary triticale derived from wheat and rye parents differing in aluminum resistance. **Journal Plant Nutrition and Soil Science**, 171, 634–642.
- TOIVO, J.; PHILLIPS, K.; LAMPI, A.M.; PIIRONEN, V. (2001). Determination of sterols in foods: recovery of free, esterified, and glycosidic sterols. **Journal of Food Composition and Analysis**, 14, 631-643.

- TSEGAU, T.; HAMMES, S.; ROBBERTSE, J. (2005). Paclobutrazol-induced leaf, stem, and root anatomical modifications in potato. **Hortscience**, 40, 1343–1346.
- VERSTRAETEN, S.V.; OTEIZA, P.I. (2002). Al³⁺-mediated changes in membrane physical properties participate in the inhibition of polyphosphoinositide hydrolysis, **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 408, 263-271.
- ZHANG, G.; SLASKI, J.J.; ARCHAMBAULT, D.J.; TAYLOR, G.J. (1997) Alteration of plasma membrane lipids in aluminum-resistant and aluminum-sensitive wheat genotypes in response to aluminum stress. **Physiologia Plantarum**, 99, 302-308.
- ZHAO, X-J.; SUCOFF, E.; STADELMANN, E.J. (1987). Al³⁺ and Ca²⁺ alteration of membrane permeability of *Quercus rubra* root cortex cells. **Plant Physiology**, 83, 159-162.
- ZHENG, R.R.; WU, Y.; XIA, Y.P. (2012). Chlorocholine chloride and paclobutrazol treatments promote carbohydrate accumulation in bulbs of *Lilium* Oriental hybrids 'Sorbonne'. **Journal of Zhejiang University-Science B (Biomedicine & Biotechnology)**, 13, 136-144.
- ZHU, Y.; YAN, F.; ZORB, C.; SCHUBERT, S. (2005). A link between citrate and proton release by proteoid roots of white lupin (*Lupinus albus* L.) grown under phosphorus-deficient conditions? **Plant Cell Physiology**, 46, 892–901.
- WAGATSUMA, T.; ISHIKAWA, S.; OBATA, H.; TAWARAYA, K.; KATOHDA, S. (1995). Plasma membrane of younger and outer cells is the primary specific site for aluminium toxicity in roots. **Plant and Soil**, 171, 105-112.
- WANG, J.; RAMAN, H.; ZHOU, M.; RYAN, P.R.; DELHAIZE, E.; HEBB, D.M.; COOMBES, N.; MENDHAM, N. (2007). High-resolution mapping of the Alp locus and identification of a candidate gene HvMATE controlling aluminium tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, 115, 265–276.
- WANG, Y.S.; YANG, Z.M. (2005). Nitric oxide reduces aluminum toxicity by preventing oxidative stress in the roots of *Cassia tora* L. **Plant Cell Physiology**, 46, 1915-1923.

- WEN, Z.Z.; LIN, Y.; LIU, Y.Q.; WANG, M.; WANG, Y.Q.; LIU, W. (2013). Effects of paclobutrazol in vitro on transplanting efficiency and root tip development of *Dendrobium nobile*. **Biologia Plantarum**, 57, 576-580.
- YAMAMOTO, Y.; KOBAYASHI, Y.; MATSUMOTO, H. (2001). Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. **Plant Physiology**, 125, 199-208.
- YANG, J.L.; ZHU, X.F.; PENG, Y.X.; ZHENG, C.; LI, G.X.; LIU, Y.; SHI, Y.Z.; ZHENG, S.J. (2011). Cell wall hemicellulose contributes significantly to aluminum adsorption and root growth in Arabidopsis. **Plant Physiology**, 155, 1885–1892.
- YANG, L.T.; JIANG, H.X.; CHEN, L.S. (2011b). Mechanisms of aluminum-tolerance in two species of citrus: secretion of organic acid anions and immobilization of aluminum by phosphorus in roots. **Plant Science**, 180:521–530.
- YANG, L.T.; QI, Y.P.; JIANG, H.H.; CHEN, L.S. (2013) Roles of organic acid anion secretion in aluminium tolerance of higher plants. **BioMed Research International**, Article ID 173682, 1-16
- YANG, J.L.; ZHANG, L.; LI, Y.Y.; YOU, J.F.; WU, P.; ZHENG, S.J. (2006) Citrate transporters play a critical role in aluminium-stimulated citrate efflux in rice bean (*Vigna umbellata*) roots. **Annals of Botany**, 97, 579-584.
- YANG, J.L.; YOU, J.F.; LI, Y.Y.; WU, P.; ZHENG, S.J. (2007). Magnesium enhances aluminum-induced citrate secretion in rice bean roots (*Vigna umbellata*) by restoring plasma membrane H⁺-ATPase activity. **Plant Cell Physiology**, 48, 66–73.
- YING LI, Y.; ZHANG, Y.J.; ZHOU, Y.; LI YANG, J.; ZHENG, S.J. (2009). Protecting cell walls from binding aluminum by organic acids contributes to aluminum resistance. **Journal of Integrative Plant Biology**, 51, 574–580.
- YU, L.; YAN, J.; GUO, S.; ZHU, W. (2012) Aluminum-induced secretion of organic acid by cowpea (*Vigna unguiculata* L.) roots. **Scientiae Horticulturae**, 135, 52-58.