

DANIELA CASSOL

**PRODUÇÃO, ACÚMULO E EXSUDAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS EM
Stylosanthes, SOB TOXIDEZ DE ALUMÍNIO**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

C345p
2012

Cassol, Daniela, 1987-

Produção, acúmulo e exsudação de ácidos orgânicos em
Stylosanthes, sob toxidez de alumínio / Daniela Cassol. –
Viçosa, MG, 2012.
x, 39f. : il. ; 29cm.

Inclui apêndice.

Orientador: José Cambraia.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 27-35

1. Ácidos orgânicos. 2. *Stylosanthes*. 3. Plantas - Efeito do
alumínio. 4. Solos ácidos. I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

CDD 22. ed. 631.4

DANIELA CASSOL

**PRODUÇÃO, ACÚMULO E EXSUDAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS EM
Stylosanthes, SOB TOXIDAZ DE ALUMÍNIO**

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

Aprovada em: 28 de fevereiro de 2012.

Luzimar Campos da Silva

Cleberson Ribeiro
(Coorientador)

José Cambraia
(Orientador)

Aos meus pais Jorge e Inês,

À minha irmã Daiane,

Dedico.

"Nada no mundo consegue tomar o lugar da persistência. O talento não consegue; nada é mais comum que homens fracassados com talento. A genialidade não consegue; gênios não recompensados é quase um provérbio. A educação não consegue; o mundo é cheio de errantes educados. A persistência e determinação sozinhas são onipotentes."

(Calvin Coolidge)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal pela oportunidade.

Aos grandes Mestres que ministraram as disciplinas de Fisiologia Vegetal, pelos ensinamentos transmitidos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao meu orientador, Professor José Cambraia, pela oportunidade e orientação.

Ao Professor Juraci Alves de Oliveira, pela amizade, pelos momentos descontraídos e apoio nos momentos mais difíceis.

Aos professores Cleberson Ribeiro e Luzimar Campos da Silva pelas valiosas contribuições neste trabalho.

Ao Celso Dornelas Fernandes (Embrapa Gado de Corte) e Marcelo Ayres Carvalho (Embrapa Cerrados) pela atenção e doação das sementes de *Stylosantes*.

Aos funcionários José Antônio Bhering e Luciane de Almeida Fernandes, pela disponibilidade, colaboração e atenção.

Aos técnicos Edmaldo Garcia Júnior e Mário Sérgio Pereira e ao professor Igor Rodrigues de Assis (Departamento de Solos), pela torcida e valiosa ajuda nas análises no ICP-OES.

Ao professor Marcos Rogério Tótola (Departamento de Microbiologia), e Edvaldo Barros (Núcleo de Análise de Biomoléculas), pela disponibilidade e auxílio no uso do liofilizador.

Aos meus queridos amigos e companheiros de trabalho Leandro Torres de Souza e Flávio Cardoso, pela grande contribuição na realização deste trabalho, pela amizade sincera, companhia, pelo encorajamento.

Ao Daniel Martins Canossa da Costa pela ajuda na execução de várias tarefas, em especial ao Kauê Espindola que foi guerreiro até o final. Muito obrigada!

Aos amigos e colegas, os quais estão com carinho em meu coração, em especial, Alyne Baiana, Bel, Dani Brito, Diego, Dudu, Franklin, Giu, Kelem, Leandro Ibiá, Lucilene, Marcelo, Neidi, Samuca, Virgilio, Yesid, pela amizade, companheirismo, convívio e por serem muito importantes para mim.

À “irmã” e grande amiga Gládis de Oliveira Jucoski por ouvir minhas reclamações e novidades por horas, pela torcida, por tudo!

À Bárbara Elias Reis pela amizade agradável, companhia no chimarrão e ajuda imprescindível na reta final. Muito obrigada!

As grandes amizades descobertas e lapidadas em Viçosa, Ivan Zenzen, Flávia Divino, Camila Pinheiro, Carolina Müller, Udi Zobot, Ricardo Santos, muito obrigada pela parceria!

Ao Heder Braun pela prontidão e auxílio nas análises estatísticas.

As gurias da República Cissa e Maria, por toda a paciência, convivência e apoio. Um agradecimento mais que especial para a colega de curso e república, mas acima de tudo amiga de coração Maiana Reis Pimenta. Não tenho palavras para te agradecer!

Aos meus queridos pais, Jorge e Inês por sempre estarem ao meu lado, me motivando a seguir em frente, acreditando em mim, por suportarem a dor da saudade pela distância. À minha irmã Daiane, pela amizade e amor incondicional, pela força e dedicação.

Ao meu querido Alípio, pela agradável companhia, compreensão, conselhos, amizade e amor sincero.

As integrantes do Apê da Felicidade 202 pela importância na minha vida!

Aos grandes amigos, Karine Begnini, Renata Cardoso, Fábio Paulino, Antelmo Ralph Falqueto, Alexandra Morás, Sidnei Deuner, Érica Zobot, por tornarem a minha vida mais alegre e completa, longe ou perto.

Muito obrigada!!

BIOGRAFIA

Daniela Cassol, filha de Jorge Cassol e Inês Comin Cassol, nasceu na Cidade de São Domingos do Sul, RS, no dia 28 de julho de 1987.

Em março de 2005, ingressou no curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil, graduando-se em fevereiro de 2010. Em março do mesmo ano, iniciou o curso de Mestrado em Fisiologia Vegetal, na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, submetendo-se à defesa de dissertação no dia 28 de fevereiro de 2012.

SUMÁRIO

RESUMO-----	vii
ABSTRACT -----	ix
1. INTRODUÇÃO -----	1
2. REVISÃO DE LITERATURA -----	2
2.1. Efeitos tóxicos do alumínio -----	2
2.2. Mecanismos de tolerância ao alumínio em plantas -----	3
2.3. <i>Stylosanthes</i> -----	5
3. MATERIAL E MÉTODOS -----	7
3.1. Obtenção do material vegetal e cultivo das plantas-----	7
3.2. Seleção da espécie mais sensível e mais tolerante de <i>Stylosanthes</i> ao alumínio ---	7
3.3. Avaliação do efeito do alumínio sobre o alongamento radicular em <i>Stylosanthes</i> -----	8
3.4. Determinação do teor de alumínio-----	8
3.5. Avaliação do efeito do alumínio sobre o alongamento radicular em <i>Stylosanthes</i> em função do tempo de exposição a este metal-----	8
3.6. Determinação do efeito do alumínio sobre os teores de ácidos orgânicos na raiz e sobre a exsudação de ácidos orgânicos para a solução externa-----	9
3.7. Efeito de inibidores de canais de ânions e de síntese de proteínas sobre a exsudação de ácidos orgânicos induzida por alumínio -----	10
3.8. Delineamento experimental e análise estatística -----	10
4. RESULTADOS-----	11
4.1. Seleção de duas espécies de <i>Stylosanthes</i> discrepantes quanto à tolerância ao alumínio -----	11
4.2. Efeito de alumínio sobre o alongamento radicular de <i>Stylosanthes</i> -----	12
4.3. Inibição do alongamento radicular de <i>Stylosanthes</i> em função do tempo de exposição ao alumínio -----	14
4.4. Efeito do alumínio sobre a produção e exsudação de ácidos orgânicos -----	15
4.5. Efeito de inibidores de canais de ânions e de síntese de proteínas sobre a exsudação de ácidos orgânicos induzida por alumínio -----	19
5. DISCUSSÃO -----	21
6. CONCLUSÕES-----	26
7. REFERÊNCIAS -----	27
APÊNDICE -----	36

RESUMO

CASSOL, Daniela, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Produção, acúmulo e exsudação de ácidos orgânicos em *Stylosanthes*, sob toxidez de alumínio.** Orientador: José Cambraia. Coorientadores: Cleberson Ribeiro, Juraci Alves de Oliveira.

A toxicidade do alumínio (Al) é um dos principais fatores que limita o crescimento e o desenvolvimento das plantas em solos ácidos. A existência de extensas áreas com problemas de acidez e toxidez de Al, não só no Brasil como no mundo inteiro, desperta grande interesse em se conhecer os mecanismos de tolerância das plantas a este elemento. Dentre os diversos mecanismos propostos, a capacidade das plantas produzirem e exsudarem ácidos orgânicos para o meio de cultivo destaca-se entre as mais importantes. O objetivo do trabalho foi estudar a produção, o acúmulo e a exsudação de ácidos orgânicos em *Stylosanthes* causada por Al. Para isso, foram selecionadas duas espécies de *Stylosanthes*: *S. capitata* e *S. guianensis*. As plantas foram submetidas ao Al nas concentrações de 0 e 200 μM , em solução de CaCl_2 0,5 mM durante 24 horas e, então, determinados o alongamento radicular, os teores radiculares e a exsudação de ácidos orgânicos. As espécies *S. capitata* e *S. guianensis* foram escolhidas, dentre seis espécies de *Stylosanthes*, como a mais sensível e a mais tolerante ao Al, respectivamente. A inibição do alongamento radicular e os teores de Al nas raízes das duas espécies aumentaram com o incremento da concentração de Al na solução de cultivo após 24 horas de tratamento. Esses fatores apresentaram elevada correlação entre si ($r > 0,93$). Para a faixa de concentração estudada, *S. guianensis* sempre mostrou-se mais tolerante ao Al do que *S. capitata*. Os teores de Al na planta aumentaram com o tempo de exposição. Apesar disso, a inibição do alongamento radicular não se intensificou com o prolongamento do tempo após 12 horas de exposição, demonstrando a rapidez dos danos causados pelo Al. Os teores de ácidos orgânicos nas raízes modificaram-se nas duas espécies de *Stylosanthes*. Os teores de ácido malônico e succínico decresceram, enquanto o de ácido trans-aconítico permaneceu constante. Em *S. capitata*, a concentração de ácido oxálico não se modificou, enquanto em *S. guianensis* aumentou significativamente após exposição ao Al. Os teores de ácido cítrico e málico diminuíram nas raízes de ambas as espécies, tendo *S. capitata* apresentado sempre maiores teores desses ácidos orgânicos do que *S. guianensis*, independente do

tratamento aplicado. A exposição das plantas ao Al resultou em aumento na exsudação de ácido cítrico para a solução de cultivo das duas espécies, especialmente em *S. guianensis*. A exsudação do ácido cítrico caracterizou-se por uma fase de latência de 4 horas, após observou-se forte aumento na exsudação com o tempo de exposição ao Al nas duas espécies, sempre com maior intensidade em *S. guianensis*. Os inibidores de canais aniônicos (ácido 9-antraceno carboxílico e ácido niflúmico) e de síntese de proteínas (cicloheximida) reduziram significativamente a exsudação de ácido cítrico para a solução de cultivo, principalmente em *S. capitata*. Os teores de Al na raiz, também aumentaram após tratamento com os inibidores de canais aniônicos e síntese de proteína, indicando a importância da exsudação dos ácidos orgânicos na prevenção da absorção de Al. A maior tolerância ao Al apresentada por *S. guianensis* comparativamente a *S. capitata*, ao que tudo indica, é resultado de sua capacidade de exsudar mais ácido cítrico para o meio de cultivo reduzindo a quantidade Al absorvido pelas plantas.

ABSTRACT

CASSOL, Daniela, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February of 2012. **Production, accumulation and exudation of organic acids in *Stylosanthes*, on toxicity of aluminum.** Adviser: José Cambraia. Co-Advisers: Cleberon Ribeiro and Juraci Alves de Oliveira.

The toxicity of aluminum (Al) is a major factor that limits the growth and development of plants in acid soils. The existence of extensive areas with problems of acidity and Al toxicity, not only in Brazil but worldwide, generates great interest in knowing the mechanisms of plant tolerance to this element. Among the various proposed mechanisms, the ability of plants to produce and exude organic acids to the culture medium stands out from the most important. The aim was to study the production, accumulation and exudation of organic acids in *Stylosanthes* caused by Al. For this, we selected two *Stylosanthes* species: *S. capitata* and *S. guianensis*. The plants were subjected to Al concentrations of 0 and 200 μM in CaCl_2 0.5 mM for 24 hours and then measured the root elongation, the levels of root exudate and organic acids. The species *S. capitata* and *S. guianensis* were chosen from among six species of *Stylosanthes* as a more sensitive and more tolerant to Al, respectively. Inhibition of root elongation and the content of Al in the roots of the two species increased with increasing concentration of Al in the culture solution after 24 hours of treatment. These factors were highly correlated ($r > 0.93$). For the concentration range studied, *S. guianensis* was always more tolerant to Al than *S. capitata*. The contents of Al in the plant increased with exposure time. Nevertheless, inhibition of root elongation is not increased with increasing time after 12 hours exposure, showing the rapidity of damage caused by Al. The organic acids levels in roots changed in the two species of *Stylosanthes*. The contents of malonic acid and succinic decreased, while the trans-aconitic acid remained constant. In *S. capitata*, the oxalic acid concentration did not change, whereas in *S. guianensis* increased significantly after exposure to Al. The contents of citric acid and malic decreased in the roots of both species, and *S. capitata* always presented with higher levels of organic acids than *S. guianensis*, regardless of the treatment. Exposure to Al caused an increase in exudation of citric acid to the solution of two species of cultivation, especially in *S. guianensis*. The exudation of citric acid characterized by a phase lag of 4 hours and after it was observed significant increase in the exudate with the exposure time to Al in the two species

with ever greater intensity *S. guianensis*. Anionic inhibitors channels (9-anthracene carboxylic acid and acid niflumic) and protein synthesis (cycloheximide) significantly reduced the exudation of citric acid to the culture solution, especially *S. capitata*. Aluminum contents in the root, also increased following treatment with inhibitors of channels anionic and protein synthesis, indicating the importance of exudation of organic acids in the prevention of absorption of Al. Most Al tolerance by *S. guianensis* compared to *S. capitata*, it seems, is the result of their ability to exude more citric acid to the culture medium by reducing the number Al absorbed by plants.

1. INTRODUÇÃO

Solos ácidos, com pH inferior a 5,5, limitam significativamente a produção agrícola (Kochian et al., 2004). Em escala global, aproximadamente 50 % dos solos potencialmente aráveis são ácidos, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (Yang et al., 2011). Todos os solos apresentam certo grau de acidez, e cada vez mais estes níveis estão aumentando, em virtude de atividades antrópicas, como a excessiva utilização de fertilizantes amoniacais nas práticas agrícolas ou devido à ocorrência de chuva ácida em áreas poluídas (Ma e Ryan, 2010; Guo et al., 2011).

No Brasil, mais de 500 milhões de hectares são cobertos por solos ácidos (Vitorello et al., 2005), principalmente em solos sob vegetação de cerrado. Os solos destas áreas apresentam elevada acidez potencial (pH médio 4,6), elevados teores de alumínio e de manganês e deficiências de cálcio, magnésio e potássio, levando a queda da produtividade das culturas (Lopes, 1984).

O gênero *Stylosanthes*, pertencente à família Fabaceae, é composto por cerca de 50 espécies e subespécies predominantemente herbáceas, nativas de regiões tropicais e subtropicais da Ásia, África e América, principalmente na América do Sul (Quecini et al., 2002). A introdução de algumas espécies em regiões tropicais para produção de pastagens há muito tempo tem sido relatada com sucesso no norte da Austrália, América do Sul, África e Ásia (Liu et al., 1997; Miller et al., 1997).

As plantas de estilosantes apresentam porte de prostrado a ereto, podendo alcançar até 1,5 m, com folhas trifolioladas, flores pequenas e diversidade morfológica e agrônômica (Stace e Edye, 1984). Devido ao crescimento vigoroso, alta capacidade de enraizamento e de produtividade em solos ácidos e com baixa fertilidade (Barros et al., 2005), as espécies de *Stylosanthes* são utilizadas como banco de proteínas, adubação verde e culturas forrageiras (Lovato e Martins, 1997; Li et al., 2009).

No Brasil, a introdução de leguminosas em pastagens de gramíneas, na forma de consórcio, apresenta-se como estratégia para repor o nitrogênio no solo (Ayarza et al., 1997), reduzindo, os investimentos com insumos agrícolas e minimizando os impactos ambientais. No Brasil, os genótipos mais utilizados são *Stylosanthes guianensis* cv Mineirão e o estilosantes “Campo Grande”, que é uma mistura varietal de *Stylosanthes capitata* e *S. macrocephala*.

Apesar da elevada capacidade de *Stylosanthes* adaptar-se aos solos ácidos e tolerarem vários tipos de estresses abióticos, os mecanismos de tolerância desta espécie ao Al permanecem essencialmente desconhecidos (Li et al., 2009; Du et al., 2009). Somando-se a este fato, há grandes interesses identificam genótipos com elevada tolerância ao Al, objetivando aumento na produtividade agrícola (Doncheva et al., 2005).

O trabalho, portanto, teve como objetivo determinar a produção, o acúmulo e a exsudação de ácidos orgânicos em duas espécies de *Stylosanthes* com tolerância diferencial ao alumínio.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Efeitos tóxicos do alumínio

O alumínio (Al) é o metal mais abundante e o terceiro elemento mais comum na superfície da terra, ocorrendo principalmente na forma de complexos estáveis de aluminossilicatos, formas não tóxicas para os vegetais (Ma e Ryan, 2010). Entretanto, sob condições ácidas, o Al solubiliza-se passando à forma de octaedro hexahidratado ($\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$), também conhecido como Al^{3+} . Esta forma química é fitotóxica, mesmo em baixas concentrações (Delhaize e Ryan, 1995), interferindo em vários processos fisiológicos e moleculares (Kochian et al., 2005).

O alumínio Al^{3+} apresenta alta relação carga/raio atômico, o que permite a formação de ligações eletrostáticas de elevada estabilidade com compostos negativamente carregados, como fosfatos e grupos carboxílicos (Berthon, 1996). Por esta razão, diversas estruturas celulares como parede celular, membrana plasmática, citoesqueleto e núcleo são alvos de sua toxidez (Kochian et al., 2004; Panda et al., 2009).

O sítio primário de acúmulo e toxicidade do Al é o meristema radicular (Yamamoto et al., 2001), especificamente a parte distal da zona de transição (Sivaguru, 1998). A rápida inibição do crescimento radicular após exposição ao Al é indicativo da interrupção da expansão e do alongamento celular, previamente à inibição da divisão celular (Kochian, 1995; Kochian et al., 2005). Recentes estudos mostram que o Al liga-se a componentes da parede celular alterando sua capacidade de troca catiônica (Panda et al., 2009), sua viscoelasticidade (Ma et al., 2004) e outras propriedades, ocasionando mudanças que resultam no bloqueio do crescimento radicular (Ma, 2007; Xue et al., 2008). Além disso, o Al pode alterar a estrutura

do citoesqueleto, através da ligação com os microtúbulos e filamentos de actina (Kochian et al., 2004). Adicionalmente, o Al pode interferir na transdução de sinais, particularmente na sinalização via Ca^{2+} (Rengel e Zhang, 2003). A exposição ao Al pode, também, resultar em aumentos na síntese de calose (β -1,3 glicano) (Jones et al., 2006), obstruindo os plasmodesmas (Sivaguru et al., 2000) e impedindo o afrouxamento da parede celular para a expansão celular (Jones et al., 2006).

Embora a maior parte do Al associado ao sistema radicular seja encontrado no apoplasma (Xue et al., 2008), parte significativa penetra rapidamente e interage com moléculas e estruturas subcelulares do simplasma (Lazof et al., 1996; Taylor et al., 2000), como os núcleos de células da região meristemática do ápice da raiz. Devido à grande afinidade por grupos fosfato (Kiss et al., 1996), o Al liga-se ao DNA, afetando negativamente modificando o processo de divisão celular (Barceló e Poschenrieder, 2002; Kochian et al., 2005).

A membrana plasmática possui carga negativa na superfície, representando alvo sensível a fitotoxicidade do Al (Ma, 2007; Panda et al., 2009). O Al liga-se fortemente aos fosfolipídios (Akeson et al., 1989), modificando a composição lipídica (Peixoto et al., 2001; Khan et al., 2009), resultando em redução na fluidez das membranas e aumento na densidade de empacotamento dos lipídios (Chen et al., 1991). Desta maneira, a permeabilidade das membranas é alterada, tornando possível a passagem de não eletrólitos e de permeadores lipídicos (Zhao et al., 1987). Além disso, o Al pode inibir a H^+ -ATPase da membrana plasmática, impedindo a formação e manutenção do gradiente de H^+ (Ahn et al., 2001; Kochian et al., 2005). Por conseguinte, o Al interfere no transporte secundário de íons, alternando indiretamente a homeostase dos íons nas células da raiz (Kochian et al., 2005). O Al, também, inibe rápida e eficazmente o influxo de Ca^{2+} nas células (Rengel e Zhang, 2003), modulando a atividade de transportadores através de mudanças no potencial de membrana (Kochian et al., 2005). Além disso, o Al inibe a enzima fosfolipase C, interferindo na sinalização com cálcio (Jones; Kochian, 1995).

2.2. Mecanismos de tolerância ao alumínio em plantas

Nas últimas décadas, muitos estudos têm concentrado seus esforços na identificação e caracterização dos mecanismos de tolerância das plantas a níveis tóxicos de Al (Ma et al., 2001; Panda et al., 2009). A compreensão destes mecanismos é de fundamental importância para a seleção de plantas resistentes ao Al (Barceló e Poschenrieder, 2002). Há grande

variabilidade na tolerância ao Al entre espécies e mesmo entre cultivares de uma mesma espécie (Huang et al., 2009). Estas diferenças parecem ser resultado de duas estratégias de desintoxicação do Al utilizadas pelas plantas: tolerância interna e exclusão do Al do ápice radicular (Ma et al., 2001; Ryan et al., 2001; Kochian et al., 2005; Ma 2007; Panda et al., 2009; Ryan e Delhaize, 2010).

Na tolerância interna, a planta é capaz de crescer e desenvolver mesmo após a entrada de Al no simplasma das células. Em plantas que operam este mecanismo, o Al seria quelado no citosol por ácidos orgânicos, proteínas, ou outros ligantes orgânicos formando complexos não tóxicos e, em seguida, estes complexos seriam compartimentalizados no vacúolo. Deste modo, o Al modificaria pouco ou nada o metabolismo da planta (Kochian, 1995; Ma, 2000; Ryan e Delhaize, 2010). Este mecanismo de tolerância é encontrado principalmente em espécies endêmicas de regiões com solos ácidos, onde a capacidade de lidar com a toxicidade ao Al é pré-requisito para sua sobrevivência (Ryan e Delhaize, 2010). No entanto, são poucas as espécies que acumulam grandes concentrações de Al nos tecidos vegetais sem apresentar efeitos com sua toxicidade (Jansen et al., 2004). Alguns exemplos são *Hydrangea sp* (Ma et al., 1997a), *Fagopyrum esculentum* (Ma et al., 1997b), *Melostoma malabathricum* (Watanabe et al., 2005) e *Camellia sinensis* (Morita et al., 2008).

Nos mecanismos de exclusão, admite-se que as plantas seriam capazes de excluir o Al absorvido e/ou impedir que ele entre e se acumule no simplasma (Ryan e Delhaize, 2010). Dentre estes destacam-se: a secreção de substâncias como ácidos orgânicos e compostos fenólicos, capazes de formar complexos com Al no meio externo; a alcalinização da rizosfera; a redistribuição e/ou efluxo do alumínio (Ma, 2007).

O mecanismo para evitar a toxidez do Al mais aceita atualmente é a capacidade de sintetizar e exsudar para o meio nutritivo ácidos orgânicos, que complexariam com a forma monomérica e mais tóxica do Al, diminuindo assim sua fitotoxicidade (Ma et al., 2001; Kochian et al., 2004; Conyers et al., 2005; Ma, 2007). Algumas das principais razões apontadas por Kochian et al. (2005) para esta ampla aceitação são: a) existe forte correlação entre a tolerância ao Al e a exsudação de ácidos orgânicos em várias espécies; b) a adição de ácidos orgânicos (malato, citrato, oxalato e outros), ao meio nutritivo, reduz a toxidez do Al em espécies sensíveis; c) complexos de Al-ácidos orgânicos (di- e tricarbônicos) não são transportados através das membranas ou absorvidos pelas raízes; d) a exsudação de ácidos orgânicos, ativada pelo Al, ocorre no ápice radicular, local do efeito primário da toxidez de Al; e) em geral, a ativação deste mecanismo é especificamente desencadeada por Al³⁺

exógeno; f) o aumento na expressão de enzimas envolvidas com o metabolismo de ácidos orgânicos, como a sintase do citrato e a desidrogenase do malato, resultando em aumento na produção e exsudação de ácidos orgânicos pelas raízes; g) a existência na membrana plasmática de canais aniônicos, ativados por Al^{3+} , para facilitar o efluxo dos ácidos orgânicos.

Embora a produção e exsudação de ácidos orgânicos estejam presentes em diversas espécies, há diversidade quanto aos tipos e a intensidade de ácidos orgânicos exsudados e a localização espacial desta resposta nas raízes (Kochian et al., 2004). Os primeiros estudos reportaram a secreção de malato em raízes de trigo (*Triticum aestivum*) (Kitagawa et al., 1986) e citrato em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) (Miyasaka et al., 1991). Sabe-se que várias espécies exsudam: (a) o malato: *Arabidopsis thaliana* (Hoekenga et al., 2003) e *Triticum aestivum* (Ryan et al., 1995); (b) o citrato: *Glycine max* (Yang et al., 2000), *Nicotiana tabacum* (Delhaize et al., 2001) e *Sorghum bicolor* (Magalhães, 2002); (c) o oxalato: *Fagopyrum esculentum* (Ma et al., 1997b) e *Colocasia esculenta* L. (Mae Miyasaka; 1998); (d) o citrato e o malato: *Brassica napus* (Zheng et al., 1998a) e *Secale cereale* (Li et al., 2000); (e) o citrato e o oxalato: *Zea mays* (Kidd et al., 2001).

Na literatura são reconhecidos dois padrões de exsudação de ácidos orgânicos: o Padrão I e/ou o Padrão II (Ma et al., 2001). No Padrão I as plantas se caracterizam por apresentar resposta quase imediata de liberação de ácidos orgânicos pelas raízes quando são expostas ao Al. No Padrão II existe uma fase “lag” entre a exposição ao Al e a liberação dos ácidos orgânicos. Diferentes mecanismos parecem controlar o Padrão de secreção dos ácidos orgânicos (Ma, 2000). A secreção rápida observada nas plantas que apresentam o Padrão I parece envolver a ativação de proteínas pré-existentes (Delhaize e Ryan, 1995). Trigo, tabaco e cevada são exemplos de espécies que apresentam este Padrão de resposta I (Delhaize et al., 1993; Delhaize et al., 2001; Zhao et al., 2003). Nas plantas que apresentam o Padrão II, há indução da expressão gênica e, portanto, a exsudação do ácido orgânico é mais demorada (Ma, 2000; Ma et al., 2001), podendo variar de horas, como em *Cassia tora* L. (Ma et al., 1997c), até dias, conforme observado em *Sorghum bicolor* (Magalhães et al., 2007).

2.3. *Stylosanthes*

Stylosanthes constitui um grupo de plantas nativas com elevada tolerância ao Al, pois desenvolvem em solos de cerrado e savanas (Andrade et al., 2004). As tentativas de elucidar o mecanismo de tolerância destas plantas são relativamente poucas quando comparado com outras culturas. Estudos realizados por Mosquim et al. (1978) sobre a influência do Al sobre o

crescimento e o metabolismo de nitrogênio serviram de base para as pesquisas realizadas por Gonçalves (1983) que concluiu ser a absorção, a translocação e a assimilação de nitrato e de amônio parte importante do mecanismo de tolerância ao Al. Outras pesquisas, no entanto, realizadas com genótipos de *Stylosanthes* spp. mostraram que o genótipo mais eficiente na utilização de P, não apenas tinha maior tolerância ao Al, mas também maior atividade de fosfatase ácida e, portanto, capacidade superior de utilizar P-orgânico (Du et al., 2009), sugerindo um possível envolvimento do metabolismo de P na tolerância das plantas ao Al.

Mais recentemente, foi verificado que dois genótipos de *Stylosanthes*, semelhante ao que acontece em outras espécies, produzem e exsudavam ácido cítrico pelas raízes e isso foi considerado como importante componente no processo de tolerância ao Al (Li et al., 2009). Entretanto, neste estudo as concentrações de Al usadas não apresentam qualquer efeito do elemento nas espécies testadas no presente estudo, sugerindo maior tolerância das espécies nacionais. Neste sentido, são necessários maiores estudos nos mecanismos de tolerância ao alumínio.

3. MATERIAL E MÉTODOS

No experimento foram utilizadas duas espécies do gênero *Stylosanthes*, com tolerância diferencial ao alumínio, selecionadas dentre seis espécies fornecidas pela EMBRAPA Gado de Corte e EMBRAPA Cerrados.

3.1. Obtenção do material vegetal e cultivo das plantas

As sementes, selecionadas quanto ao tamanho e forma, foram escarificadas para quebra da dormência e esterilizadas com hipoclorito de sódio 2,5 % (v/v) por 1 minuto. As sementes foram colocadas para germinar em bandejas contendo substrato “Tropstrato HT”, com irrigação diária, em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, irradiância de $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura controlada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$).

Quinze dias após a semeadura, as plântulas foram transferidas para recipientes contendo 15 L de solução nutritiva de Clark (Clark, 1975), pH 4,5, com um quinto da força iônica, sob aeração contínua. A solução nutritiva foi trocada a cada dois dias, aumentando progressivamente sua força iônica, até atingir metade da força iônica total. O pH da solução nutritiva foi ajustado diariamente para 4,5 pela adição de HCl 1 M ou NaOH 1 M. As plântulas foram mantidas nestas condições por quinze dias.

Após este período, as plântulas foram colocadas *overnight* em solução contendo cloreto de cálcio (CaCl_2) 0,5 mM, pH 4,0 antes da execução do experimento.

3.2. Seleção da espécie mais sensível e mais tolerante de *Stylosanthes* ao alumínio

As espécies utilizadas foram: *Stylosanthes humilis*, *S. capitata* e *S. macrocephala*, *S. viscosa* (n°6), *S. scabra* cv. Seca e *S. guianensis* cv. Mineirão.

As plântulas das diferentes espécies foram obtidas conforme descrito no item 3.1., e transferidas para vasos de polietileno (quatro plântulas/vaso, com quatro repetições) com capacidade de 1,8 L, contendo cloreto de cálcio (CaCl_2) 0,5 mM e, então, aplicados os tratamentos na ausência de Al (controle) e na concentração de 200 μM , na forma de cloreto de Al (AlCl_3).

A seleção das espécies de *Stylosanthes* mais tolerante e mais sensível ao Al foi realizada com base nas respectivas porcentagens de inibição no alongamento radicular. Antes da

aplicação dos tratamentos foi determinado, em todas as plantas, o comprimento inicial da maior raiz (tempo zero). Após 24 horas de tratamento, as plântulas foram removidas, lavadas com água desmineralizada e foi avaliado o comprimento final da maior raiz.

3.3. Avaliação do efeito do alumínio sobre o alongamento radicular em *Stylosanthes*

As plântulas das duas espécies de *Stylosanthes* selecionadas no item 3.2 foram expostas às concentrações 0, 75, 150, 300, 600 e 900 μM de Al aplicado na forma de AlCl_3 , com três repetições. Foram utilizados vasos de polietileno com capacidade de 1,8 L, contendo seis plântulas cada.

Antes da aplicação dos tratamentos, foram determinados os comprimentos da maior raiz (comprimento inicial). Após 24 horas de tratamento, as plântulas foram removidas e lavadas em HCl 0,1 M e, posteriormente, lavadas em água corrente e desmineralizada e utilizadas para determinação dos teores de Al.

3.4. Determinação do teor de alumínio

O Al nas raízes e folhas foi extraído em HCl 2 M por 48 horas (Wang e Yang, 2005) e seu teor nos extratos foi determinado por espectrofotometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado - ICP-OES, no comprimento de onda 394,4 nm.

3.5. Avaliação do efeito do alumínio sobre o alongamento radicular em *Stylosanthes* em função do tempo de exposição a este metal

As plântulas das espécies cultivadas e selecionadas de acordo com os itens 3.1 e 3.2, respectivamente, foram transferidas para vasos de polietileno com capacidade de 1,8 L, em número de seis por vaso, com três repetições, e então expostas ao Al nas concentrações 0 e 200 μM aplicado na forma de AlCl_3 . Antes da aplicação dos tratamentos, foram determinados os comprimentos da maior raiz (comprimento inicial). Após 12, 24 e 48 horas de tratamento, foram analisados os comprimentos da maior raiz (comprimento final).

3.6. Determinação do efeito do alumínio sobre os teores de ácidos orgânicos na raiz e sobre a exsudação de ácidos orgânicos para a solução externa

Plântulas de duas espécies de *Stylosanthes*, obtidas conforme o item 3.1., foram transferidas em número de dez para recipientes de 300 mL (três repetições) contendo solução de CaCl₂, pH 4,0, e então submetidas aos tratamentos com Al (0 e 200 µM - concentração definida no item 3.3.), aplicado na forma de AlCl₃. No início (tempo zero) e após 1, 2, 4, 8, 16, 24 e 48 h as plantas foram removidas e lavadas sucessivamente em HCl 0,1 M, e em água corrente e desmineralizada. As raízes foram, então, tratadas com 30 mL de etanol 80 % (v/v) fervente e, em seguida, armazenadas em freezer à -20 °C, até o momento das análises químicas. As soluções de cultivo foram coletadas, o volume total de 300 mL, liofilizadas e solubilizadas em 3 mL de água destilada, e estocadas em freezer à -20 °C.

As amostras vegetais, após descongelamento e homogeneização no próprio solvente de armazenamento (etanol 80%), para a remoção de lipídios e pigmentos (Cambraia et al., 1983), foram liofilizados e solubilizados em 3 mL de etanol. Seguiu-se a cromatografia dos extratos vegetais e das soluções em coluna trocadora de cátions (Dowex AG50-WX8, 200-400 mesh, na forma H⁺) e, na sequência, em coluna trocadora de ânions (Dowex AG1-X8, 200-400 mesh, na forma de formato). Os ácidos orgânicos foram, então, eluídos “em massa” da última coluna 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, que foi utilizado como padrão interno. Após evaporação até *secura completa*, os ácidos orgânicos foram transformados em derivados trimetilsililados por reação com piridina e bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA), sendo o volume completado para 0,5 mL com diclorometano (Jham et al., 2002).

Os ácidos orgânicos foram determinados injetando-se um µL de amostra à um cromatógrafo a gás, Shimadzu (modelo GC2014, Tóquio, Japão), equipado com detector de ionização de chama. Na separação cromatográfica foi utilizada coluna capilar Rtx-1 (100 % dimetil polisiloxane) (Restek) DB1, 30 m x 0,25 mm. A temperatura inicial da coluna foi de 100 °C (durante 2 min), aumentando 10 °C/min até atingir a temperatura final de 250 °C. A temperatura do detector foi ajustada para 300°C, enquanto a pressão na coluna foi mantida em 100 kPa, para um fluxo na coluna (a 60°C) de 1,2 mL/min, velocidade linear de 31,2 cm/s, fluxo total de 10,2 mL/min e razão de “split” de 1:10. Nitrogênio ultra puro foi utilizado como gás de arraste.

As concentrações dos ácidos orgânicos nas amostras foram estimadas por comparação com padrões autênticos dos ácidos: oxálico, malônico, succínico, fumárico, málico, tartárico, trans-aconítico e cítrico.

3.7. Efeito de inibidores de canais de ânions e de síntese de proteínas sobre a exsudação de ácidos orgânicos induzida por alumínio

Após a seleção de plântulas das duas espécies de *Stylosanthes*: *S. capitata* e *S. guianensis*, definidas no item 2.2., foram transferidas 10 plântulas de cada espécie para recipientes contendo 300 mL de solução de CaCl₂ 0,5 mM, pH 4,0. Em seguida, foram aplicando os tratamentos com Al (0 e 200 µM - concentração definida no item 3.3), combinados com os inibidores de canais iônicos: ácido antraceno-9- carboxílico (A-9-C) 10 µM e niflumato 50 µM; inibidor de proteína: cicloheximida (CHM) 30 µM. Para esta análise foram utilizadas três repetições de cada tratamento.

Após 24 h de exposição aos tratamentos foram coletadas as soluções e determinados os teores de ácidos orgânicos por cromatografia gasosa, conforme descrito no item 3.5. As raízes foram removidas e utilizadas para determinação do teor de Al e quantificação de proteínas totais, analisadas pelo método de Lowry et al (1951).

3.8. Delineamento experimental e análise estatística

O experimento constituiu num esquema fatorial com delineamento em blocos casualizados. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott 5% de probabilidade. Os fatores quantitativos foram analisados por regressão. Com base no coeficiente de determinação, significância da regressão, testados pelo teste F e pela significância dos coeficientes da regressão, testados pelo teste “t”, foram escolhidos os modelos que melhor explicaram o comportamento das variáveis.

As análises estatísticas foram processadas utilizando-se o programa estatístico “SAEG”, da Fundação Arthur Bernardes, da Universidade Federal de Viçosa, versão 9.0.

4. RESULTADOS

4.1. Seleção de duas espécies de *Stylosanthes* discrepantes quanto à tolerância ao alumínio

Seis espécies pertencentes ao mesmo gênero apresentaram variações na porcentagem de inibição do alongamento radicular após exposição das plantas ao Al (Figura 1). A maior inibição foi observada na espécie *S. capitata* (79,8 %), seguida das espécies *S. humilis*, *S. scabra* e *S. macrocephala* as quais não diferiram entre si. *S. viscosa* apresentou porcentagem de inibição do alongamento radicular de 54,7 %, enquanto a *S. guianensis* apresentou a menor porcentagem de inibição (46,3 %).

Diante dos resultados foram classificadas três categorias em relação à tolerância ao Al: tolerante (*S. guianensis*); moderadamente tolerante (*S. humilis*, *S. scabra*, *S. macrocephala* e *S. viscosa*) e sensível (*S. capitata*). As espécies selecionadas como a mais sensível e a mais tolerante ao Al foram escolhidas para os demais experimentos.

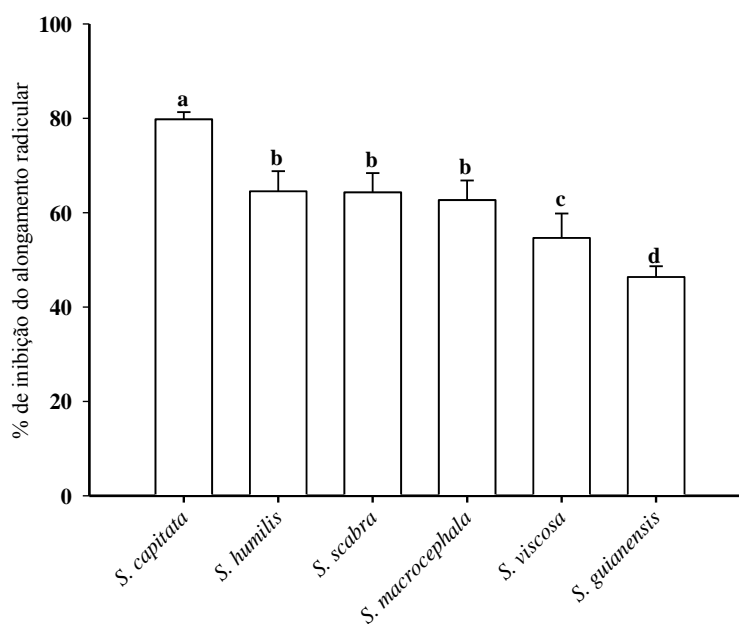


Figura 1 - Efeito do Al sobre a inibição do alongamento radicular em seis espécies de *Stylosanthes*, após 24 horas de tratamento com Al 200 µM.

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott à de 5 % de probabilidade.

4.2. Efeito de alumínio sobre o alongamento radicular de *Stylosanthes*

A inibição do alongamento radicular aumentou significativamente nas duas espécies com o incremento das concentrações de Al, após 24 horas de exposição a este metal (Figura 2). Para a faixa de concentração estudada, *S. guianensis* sempre se mostrou mais tolerante ao Al do que *S. capitata*. As diferenças de sensibilidade ao Al entre as espécies, com base na inibição do alongamento radicular, aumentaram com o incremento das doses de AlCl_3 , até a concentração de aproximadamente 700 μM .

Mesmo em baixas concentrações de AlCl_3 foi possível observar inibição do alongamento radicular e detectar diferenças significativas entre as duas espécies estudadas. Para a realização dos experimentos posteriores escolheu-se a concentração de 200 μM , suficientemente alta para uma boa discriminação entre as duas espécies e relativamente baixa para evitar altas inibições. Nessa concentração obteve-se 50 % de inibição do alongamento radicular da espécie considerada tolerante, *S. guianensis* (Figura 2).

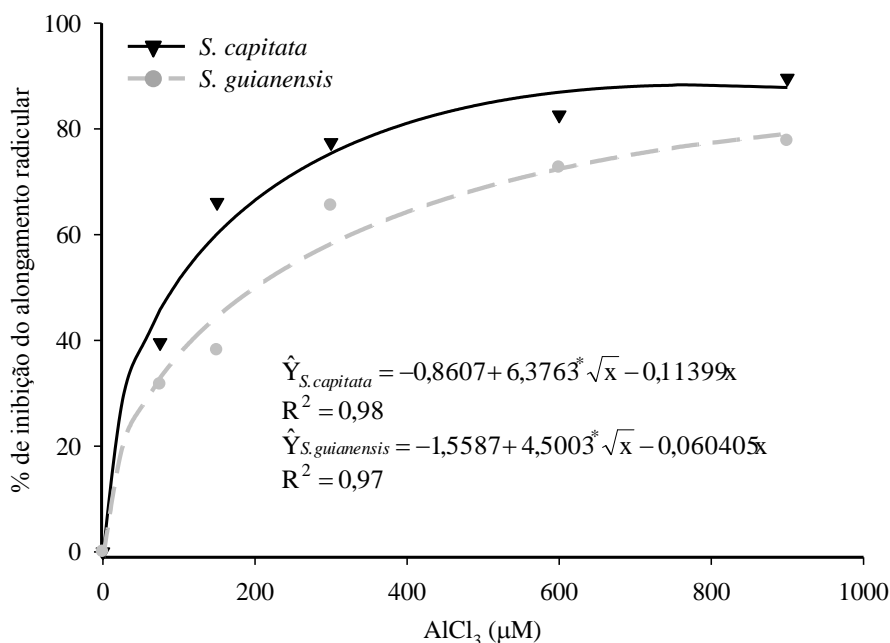


Figura 2 – Efeito de concentrações crescentes de Al sobre a inibição do alongamento radicular em duas espécies de *Stylosanthes*, após 24 horas de tratamento. *, significativo à 5 % de probabilidade pelo teste t.

Os teores de alumínio nas raízes das duas espécies aumentaram com os incrementos nas doses de AlCl_3 na solução de cultivo, após 24 horas de tratamento (Figura 3), sem que fosse

observada tendência de estabilização nesses valores. Na concentração de Al de 200 μM *S. capitata* apresentou teor de Al 25 % mais elevado do que em *S. guianensis*. A diferença entre as espécies aumentou continuamente com o incremento na concentração de Al na solução de cultivo e na maior concentração de AlCl_3 , *S. capitata* atingiu um teor de Al 32 % mais elevado do que em *S. guianensis*.

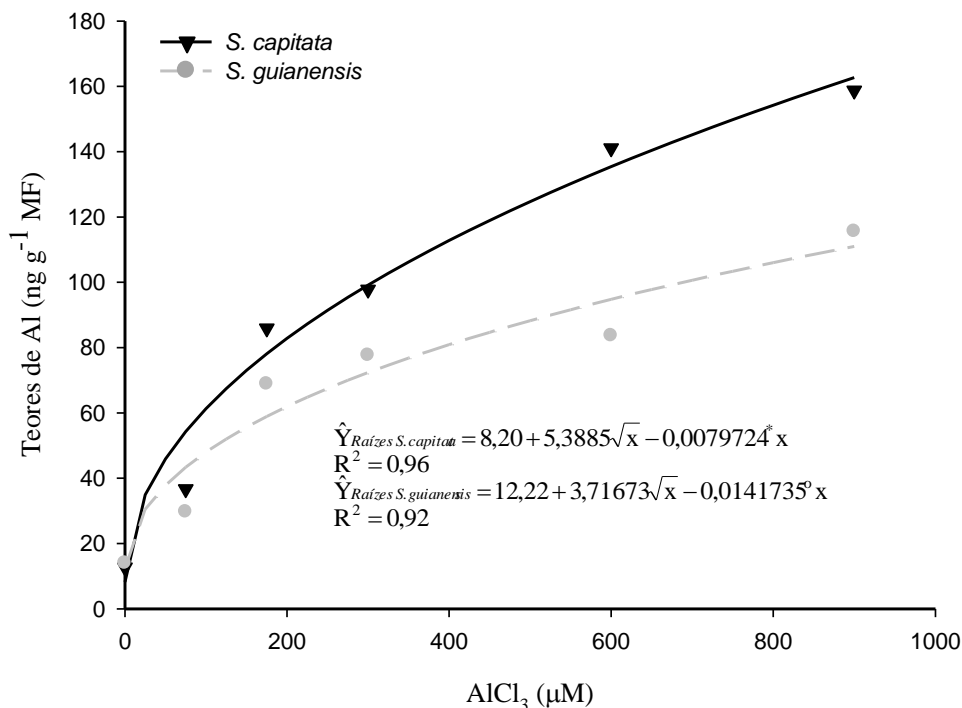


Figura 3 – Teores de Al nas raízes de duas espécies de *Stylosanthes*, submetidas a diferentes concentrações de AlCl_3 , após 24 horas de tratamento. *, ° significativo a 5 % e 10 %, respectivamente, de acordo com o teste t.

A inibição do alongamento radicular aumentou proporcionalmente com os teores de Al encontrado nas raízes das duas espécies de *Stylosanthes* (Figura 4), apresentando coeficiente de correlação igual a $r=0,93^{**}$ para ambas as espécies.

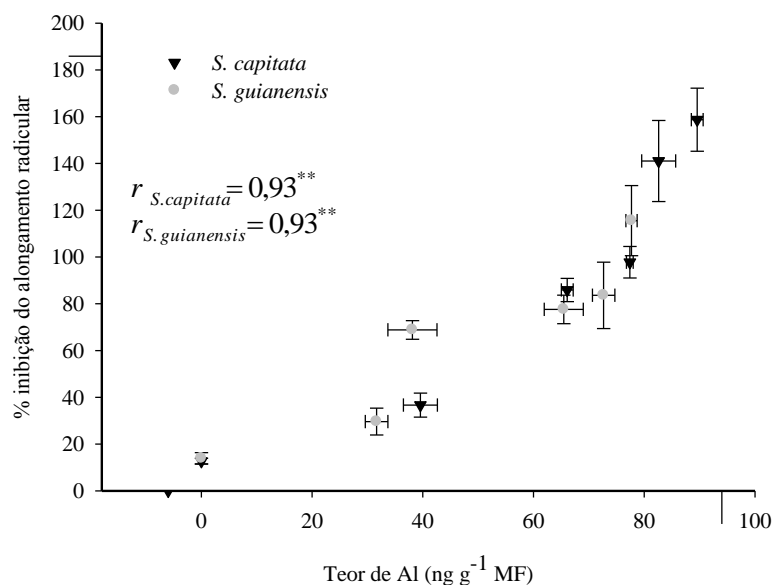


Figura 4 – Correlação entre inibição do alongamento radicular e teores de Al nas raízes de duas espécies de *Stylosanthes*, submetidas a diferentes concentrações de AlCl₃, após 24 horas de tratamento. ** significativo à 1 %, de acordo com o teste t.

4.3. Inibição do alongamento radicular de *Stylosanthes* em função do tempo de exposição ao alumínio

A inibição do alongamento radicular observada nas primeiras 12 horas de exposição ao Al não modificou significativamente com o prolongamento do tempo de exposição a AlCl₃ 200 µM, até 48 horas (Tabela 1). É interessante observar que a elevada porcentagem de inibição ocorrida no período inicial do tratamento demonstra a rapidez dos danos fitotóxicos causados pelo Al. *S. guianensis*, contudo, foi sempre mais tolerante que *S. capitata* em todos os tempos de exposição estudados.

Tabela 1 – Efeito do alumínio sobre o alongamento radicular em duas espécies de *Stylosanthes*, em função do tempo de exposição.

Espécie	% de inibição do alongamento radicular		
	12 h	24 h	48 h
<i>S. capitata</i>	71,9 Aa	73,4 Aa	76,2 Aa
<i>S. guianensis</i>	48,3 Ba	49,1 Ba	52,4 Ba

*Médias seguidas pelas mesmas letras, maiúsculas entre as espécies e minúsculas entre tratamentos com Al, não diferem estatisticamente, pelo teste de Scott-Knott à de 5 % de probabilidade.

Os teores de Al nas raízes e folhas das duas espécies aumentaram significativamente com o tempo de exposição ao tratamento com este metal (Figura 5). Os teores deste elemento nas raízes foram sempre maiores do que nas folhas, diferindo entre as duas espécies de *Stylosanthes*. Com 48 horas de exposição ao Al, os teores deste elemento nas raízes e folhas de *S. capitata* foram aproximadamente 32 e 17 % mais elevados em *S. guianensis*, respectivamente.

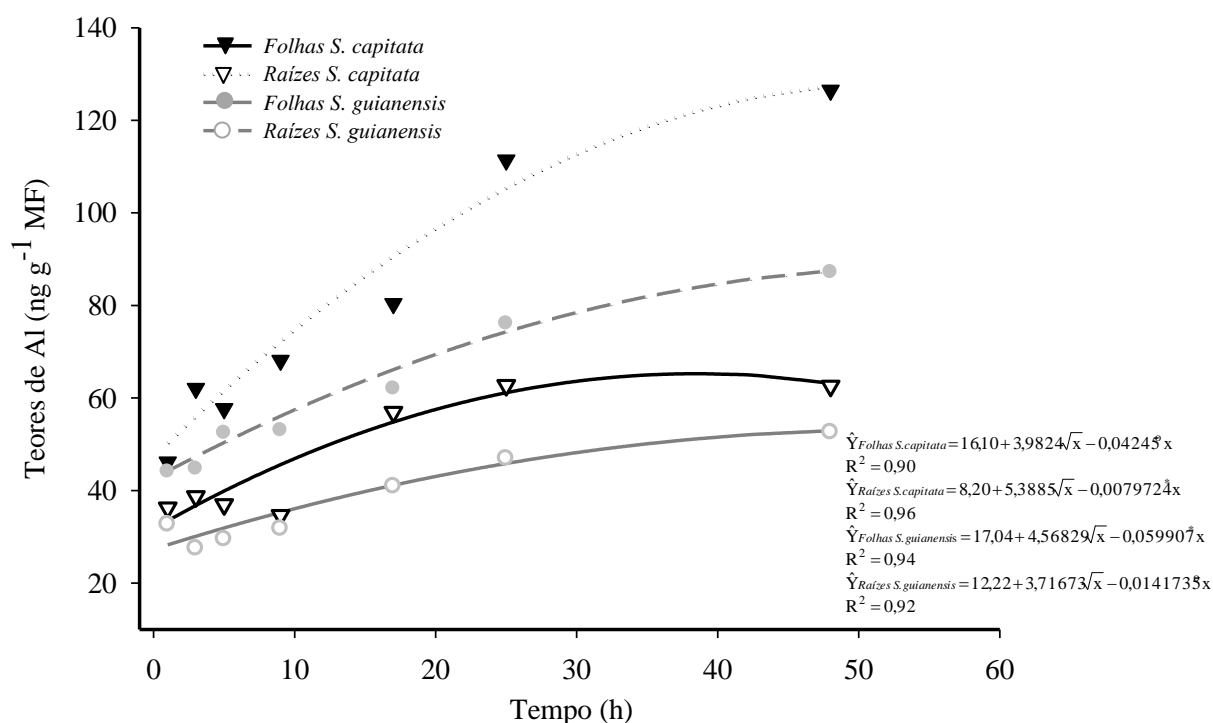


Figura 5 - Teores de alumínio em raízes e folhas de duas espécies de *Stylosanthes*, nos diferentes tempos de tratamento, com $AlCl_3$ 200 μM . *, ° significativo a 5 % e 10 %, respectivamente, de acordo com o teste t.

4.4. Efeito do alumínio sobre a produção e exsudação de ácidos orgânicos

Os teores de ácidos orgânicos nas raízes apresentaram modificações significativas nas duas espécies de *Stylosanthes*, após 48 h de exposição ao Al 200 μM (Tabela 2). Os dois ácidos orgânicos mais abundantes foram o ácido málico e o ácido cítrico, independente da espécie analisada ou do tratamento com Al.

A concentração do ácido oxálico não se modificou em *S. capitata*, mas aumentou cerca de 36 % em *S. guianensis* após exposição ao Al. Os teores de ácidos malônico e succínico decresceram com os tratamentos aplicados, mas não foram observadas diferenças entre as

espécies, exceto no tratamento sem adição de Al, para o ácido malônico. Não foram detectadas diferenças significativas para o ácido trans-aconítico.

Os teores de ácido málico decresceram 23 e 60 % em *S. capitata* e *S. guianensis*, respectivamente, após tratamento com Al por 48 horas. *S. capitata* apresentou sempre maiores teores deste ácido em relação a *S. guianensis*, independente do tratamento aplicado. Padrão semelhante foi observado para o ácido cítrico. Os teores de ácido cítrico apresentaram reduções de 45 % e 35 %, para *S. capitata* e *S. guianensis*, respectivamente, após tratamento com Al. Somente foram encontradas diferenças entre as duas espécies para o tratamento, sem Al.

Tabela 2- Teores de ácidos orgânicos em raízes de *Stylosanthes*, após 48 horas de exposição ao Al (200µM) nas espécies de *Stylosanthes*.

		Ácidos Orgânicos (nmol g ⁻¹ MF)					
		Oxálico	Malônico	Succínico	Málico	Trans- aconítico	Cítrico
<i>S. capitata</i>	-Al	14,37 Aa	39,86 Ba	50,11 Aa	727,99 Aa	2,49 Aa	272,79Aa
	+Al	14,18 Ba	27,42 Ab	34,27 Ab	564,17 Ab	3,20 Aa	152,03 Ab
<i>S. guianensis</i>	-Al	13,65 Ab	44,63 Aa	48,73 Aa	612,55 Ba	2,52 Aa	211,63 Ba
	+Al	22,09 Aa	26,24 Ab	37,08 Ab	250,02 Bb	4,55 Aa	138,92 Ab

*Médias seguidas pelas mesmas letras, maiúsculas entre as espécies e minúsculas entre tratamentos com Al, não diferem estatisticamente, pelo teste de Scott-Knott à de 5 % de probabilidade.

A exsudação de ácido cítrico pelas plantas em função do tempo é mostrada na Figura 6. Na ausência de Al, as raízes das duas espécies praticamente não exsudaram ácido cítrico para a solução de cultivo, mesmo após 48 horas de tratamento (Figura 7A e B). Após exposição ao Al, as plantas passaram a exsudar ácido cítrico (Figura 7C e D). Nas primeiras 4 horas a exsudação foi pequena, atingindo 22 e 38 nmol g⁻¹ MF de ácido cítrico em *S. capitata* e *S. guianensis*, respectivamente. A partir deste tempo, a exsudação de ácido cítrico para a solução aumentou rapidamente com o tempo de exposição ao Al nas duas espécies, sempre com maior intensidade em *S. guianensis*. Mesmo com 48 horas de tratamento não se observou tendência de estabilização na exsudação de ácido cítrico, especialmente em *S. guianensis*. Na ausência de Al não foram observadas diferenças entre as espécies, enquanto na presença do mesmo foi sempre maior em *S. guianensis*.

A taxa de exsudação de ácido cítrico para a solução de cultivo foi de aproximadamente $13 \text{ nmol g}^{-1} \text{ MF h}^{-1}$ na espécie tolerante, enquanto que na espécie sensível foi de aproximadamente $6 \text{ nmol g}^{-1} \text{ MF h}^{-1}$.

Nas primeiras horas de exposição ao Al foram verificadas diferenças significativas nas exsudações das espécies (Figura 6), Entre 1 e 8 horas observou-se aumento de aproximadamente 66 e 62 % nos teores de ácido cítrico em *S. capitata* e *S. guianensis*, respectivamente. A partir de 8 h de tratamento, observou-se forte incremento na exsudação de ácido cítrico, que se manteve intenso até o final do período de tratamento. *S. capitata* obteve aumento de aproximadamente 8,8 vezes, enquanto *S. guianensis* aumentou 10,6 vezes o conteúdo de ácido cítrico exsudado.

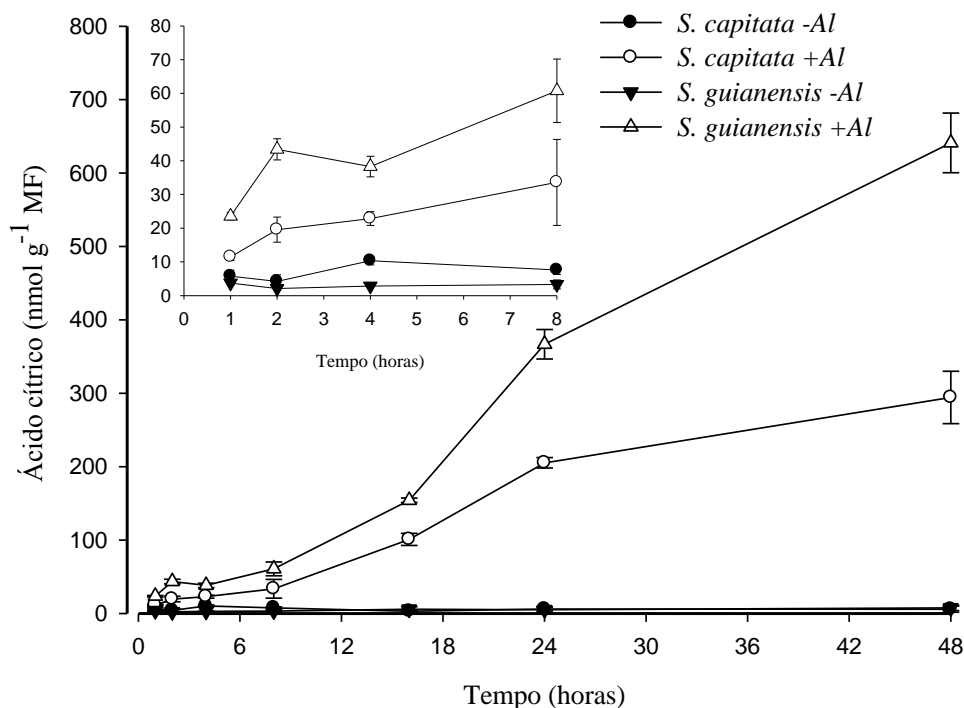


Figura 6 – Ácido cítrico exsudado para a solução de cultivo em função do tempo de exposição ao Al, com AlCl_3 $200 \mu\text{M}$, em duas espécies de *Stylosanthes*.

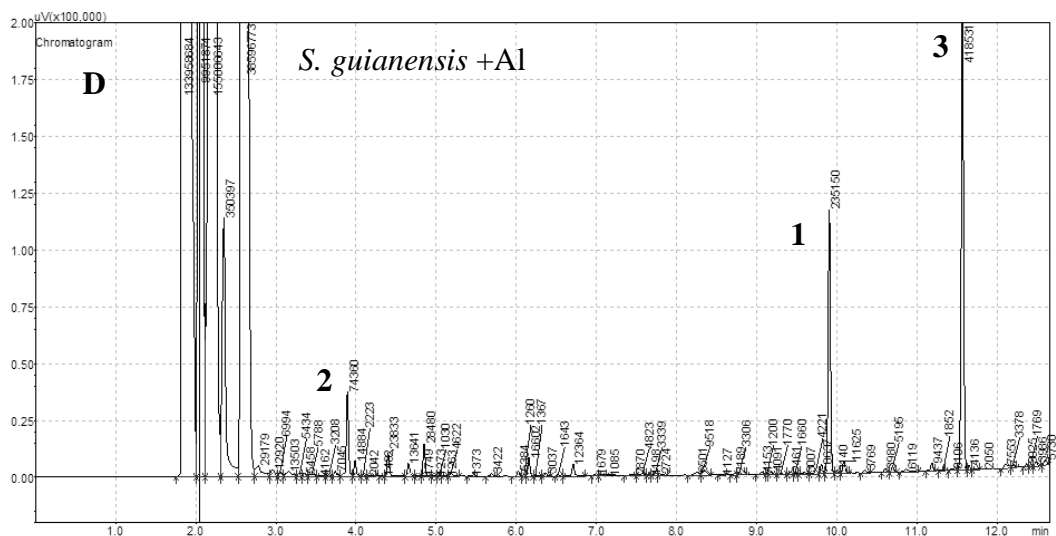


Figura 7 – Perfil cromatográfico da análise de ácidos orgânicos exsudados em raízes de *S. capitata* e *S. guianensis*, após 48 horas de tratamento, com AlCl_3 200 μM . Ácidos orgânicos encontrados: 1 – ácido tartárico (padrão interno); 2 – ácido oxálico; 3 – ácido cítrico.

4.5. Efeito de inibidores de canais de ânions e de síntese de proteínas sobre a exsudação de ácidos orgânicos induzida por alumínio

A exsudação de ácido cítrico para a solução foi reduzida pela exposição das plantas aos inibidores de canais de ânions (ácido niflúmico e ácido antraceno 9-carboxílico) e de síntese de proteína (cicloheximida) (Figura 8A). O inibidor de canais aniônicos, antraceno-9-carboxílico reduziu a exsudação de ácido cítrico induzida por Al, em 77 % e 81 % para as espécies *S. capitata* e *S. guianensis*, respectivamente. Os teores de Al nas raízes das plantas tratadas com esse inibidor por sua vez, aumentaram 42 % e 30 %, em *S. capitata* e *S. guianensis*, respectivamente (Figura 8B).

O tratamento das plantas com ácido niflúmico resultou em reduções nas exsudações de ácido cítrico de 69 % e 70 %, para *S. capitata* e *S. guianensis*, respectivamente. De modo semelhante os teores de Al nas raízes, também, com o tratamento com o ácido niflúmico aumentaram em 55 % e 42 % em *S. capitata* e *S. guianensis*, respectivamente.

O tratamento das plantas com o inibidor de síntese de proteínas, a cicloheximida resultou em redução de aproximadamente 93 % e 73 % na exsudação de ácido cítrico para o meio de cultivo, em *S. capitata* e *S. guianensis*. Os teores de alumínio no sistema radicular das plantas tratadas com este inibidor, à semelhança do que aconteceu com a aplicação dos

inibidores de canais iônicos, também aumentaram em relação ao tratamento somente com Al, de 26 % e 7 % em *S. capitata* e *S. guianensis*, respectivamente (Figura 8B).

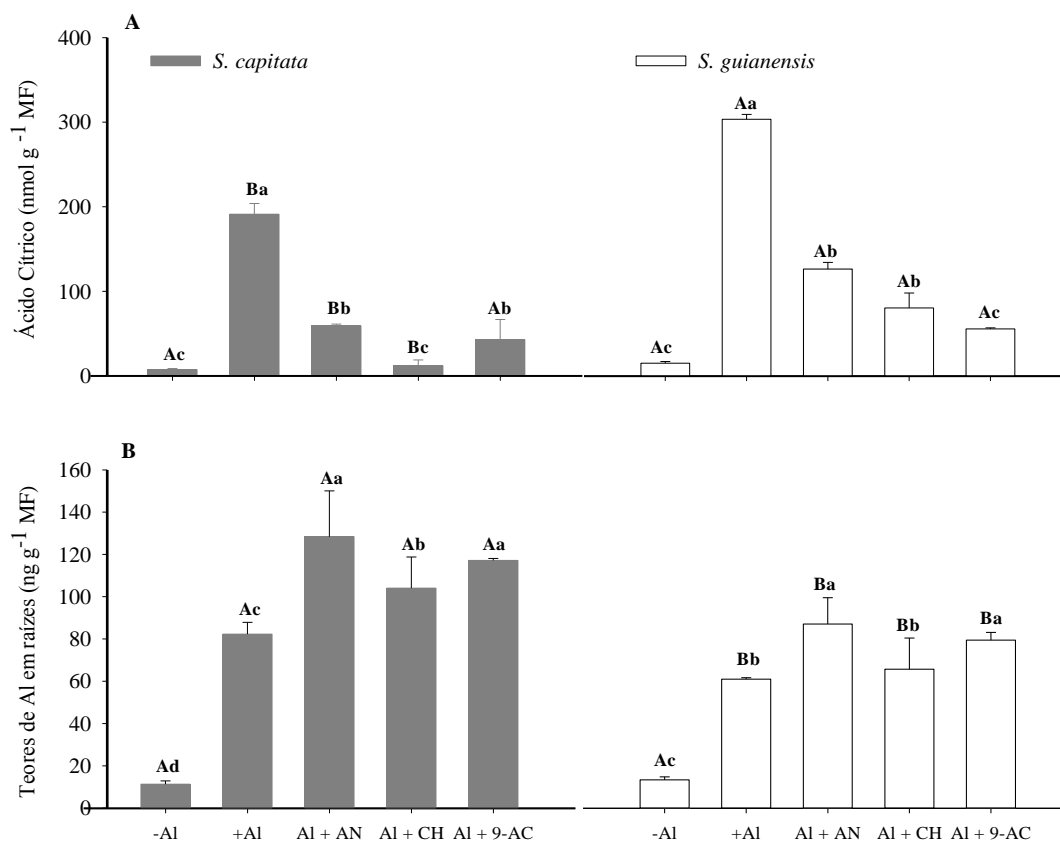


Figura 8 – Ácido cítrico exsudado para o meio de cultivo (A) e teores de Al nas raízes (B), com 24 horas de tratamento com AlCl₃ 0 μM (-Al), AlCl₃ 200 μM (+Al), AlCl₃ 200 μM e ácido niflúmico (AN) 50 μM (Al + AN), AlCl₃ 200 μM e cicloheximida (CHM) 30 μM (Al + CHM) ou AlCl₃ 200 μM e ácido antraceno 9-carboxílico (9-AC) 10 μM (Al + 9-AC). *Médias seguidas pelas mesmas letras, maiúsculas entre as espécies e minúsculas entre tratamentos com inibidores, não diferem estatisticamente, pelo teste de Scott-Knott à de 5 % de probabilidade

5. DISCUSSÃO

Espécies nativas e cultivadas exibem ampla variabilidade genética em resposta à toxidez ao Al e, portanto, diversidade em relação à capacidade de crescer e produzir em solos ácidos (López-Bucio et al., 2000; Ryan et al., 2009). A rápida inibição do crescimento radicular é um dos primeiros sintomas observados em resposta ao Al. Como se trata de resposta de fácil mensuração, torna-se um critério eficaz para a seleção de espécies/genótipos tolerantes a este elemento (Foy, 1988; Poschenrieder et al., 2008). No presente trabalho, as seis espécies expostas ao Al apresentaram variações nas inibições do alongamento radicular em apenas 24 horas de tratamento, indicando tolerância diferencial ao Al (Figura 1).

As diferenças observadas entre as seis espécies de *Stylosanthes* quanto à inibição do alongamento radicular foram semelhantes às obtidas por Du et al. (2009). Os autores avaliaram o crescimento radicular em três genótipos de duas espécies de *Stylosanthes*. Os genótipos “Fine-stem” e “Verano” (*S. capitata*) apresentaram as maiores taxas de inibição do alongamento radicular. Na dose de AlCl_3 100 μM , a inibição em “Fine-stem” atingiu 41 %, e para o genótipo “TPRC2001-1” (*S. guianensis*) foi de apenas 18 %. Estes resultados corroboram com os encontrados no presente trabalho, considerando a *S. capitata* a espécie mais sensível e *S. guianensis* a mais tolerante ao Al. No trabalho de Li et al. (2009), a *S. guianensis* genótipo R2 também foi escolhida como a espécie tolerante. Além disso, esses autores escolheram a espécie *S. Scabra* cv. Seca como a mais sensível ao AlCl_3 (50 μM), apresentando 71,2 % de inibição do alongamento radicular. Contudo, nos resultados observados no presente estudo, a *S. scabra* cv. Seca apresentou 64,3 % de inibição na concentração de AlCl_3 200 μM e, portanto, foi classificada como moderadamente tolerante.

A fitotoxicidade do Al é caracterizada por rápida inibição do alongamento radicular, mesmo em concentrações micromolares (Huang et al., 2011). Neste trabalho, observou-se que baixas concentrações e poucas horas de exposição ao Al foram suficientes para causar inibição do crescimento radicular (Figura 2 e Tabela 1). A partir da concentração de 75 μM foi observada resposta diferencial entre as duas espécies de *Stylosanthes*. No trabalho de Li et al. (2009), entretanto, concentrações mais baixas foram suficientes para obter diferenças significativas entre os genótipos de *Stylosanthes* estudados. Isso pode demonstrar maior tolerância das espécies encontradas em território brasileiro em relação às mesmas espécies asiáticas.

A rápida inibição do crescimento radicular induzida pelo Al sugere que o efeito inicial é provavelmente função da inibição do alongamento radicular, anterior a um efeito sobre a divisão celular (Ma, 2007). Embora os mecanismos exatos da toxicidade causada pelo Al não sejam totalmente compreendidos, parece que o Al interage com vários sítios de ligação das células das raízes (Ma, 2007; Poschenrieder et al., 2008), tais como grupamentos fosfato, sulfato e carboxílicos presentes na parede celular, na membrana plasmática e no simplasma (Kochian et al., 2004), resultando em danos funcionais e estruturais.

A correlação positiva entre porcentagem de inibição do alongamento radicular e os teores de Al em raízes de *Stylosanthes* (Figura 4) sugerem que a paralisação do crescimento radicular é resultante dos danos estruturais causados pela incorporação do elemento nas células das raízes. Os maiores teores de Al encontrados em *S. capitata* resultaram em maior porcentagem de inibição do crescimento radicular em relação *S. guianensis*. De forma semelhante, Piñeros et al. (2005) observou que seis genótipos de milho apresentaram correlação entre a resistência e concentração de Al nas raízes, destacando que as diferenças de tolerância ao Al entre os genótipos surgem a partir da capacidade de excluir ou de prevenir a absorção do Al nas raízes.

Embora os teores de Al nas raízes e folhas tenham aumentado com o tempo de exposição ao Al (Figura 5), praticamente não se verificou efeito deste elemento sobre a intensidade da inibição do alongamento após 12 horas de exposição. Aparentemente, após este tempo as plantas já tinham absorvido e, ou acumulado Al suficiente para o limiar de toxicidade deste elemento nestas plantas. De modo similar ao encontrado pela maioria dos trabalhos sobre toxidez de Al (Jansen et al., 2002; Ma, 2007), os maiores teores de Al foram encontrados nas raízes, mas as duas espécies apresentaram incrementos nos teores de Al nas folhas. *S. capitata* absorveu e translocou mais Al para a parte aérea do que *S. guianensis*.

Cabe ressaltar que a concentração de Al nas raízes e folhas é determinada por características do solo, mas também por características específicas das plantas e pelo seu estágio de desenvolvimento (Osaki et al., 2003; González-Santana et al., 2012). Shen e Ma (2001) investigaram a distribuição do Al em trigo mourisco e concluíram que, mesmo após a remoção do Al da solução de cultivo das plantas, ocorre transporte de Al das raízes para as folhas, porém há pouca redistribuição do Al acumulado das folhas velhas para as mais jovens. Vários autores salientaram que a distribuição do Al é controlada tanto pela transpiração, como pela idade das folhas (Shen e Ma, 2001; Shen et al., 2006; Zeng et al., 2011). Britez et al. (2002) sugeriram que o Al nas folhas seja compartimentalizado nos vacúolos das células

epidérmicas, que não participam diretamente da fotossíntese, e assim o Al não afetaria o processo fotossintético.

O mecanismo de tolerância ao Al, considerado mais importante e, também, mais documentado na literatura é baseado na exsudação de ácidos orgânicos pelas raízes (Ma, 2000; Ryan et al., 2001; Kochian et al., 2005; Matsumoto, 2011). Os ácidos orgânicos exsudados podem formar complexos estáveis com Al, evitando sua ligação com sítios negativos da parede celular e da membrana plasmática e, ou com metabólitos e, ou estruturas subcelulares importantes dentro do simplasma (Pellet et al., 1995; Ryan e Delhaize, 2010, Singh e Chauhan, 2011).

Alguns dos principais ácidos orgânicos exsudados para a solução externa são os ácidos málico e trans-aconítico, em sorgo (Gonçalves et al., 2005), ácidos málico e cítrico, em triticale (Ma et al., 2000) e arroz (Alves, 2005), ácido málico, em trigo (Delhaize et al., 1993) e ácido oxálico, em *Cassia tora* L. (Ma et al., 1997c) e taro (Ma et al., 1998). Em milho, três variedades estudadas por Kidd et al. (2001) exsudaram principalmente oxalato e, também, ácidos cítrico e aconítico. Por outro lado, Piñeros, et al. (2002) mostraram que o cultivar de milho Cateto-Colombia, tolerante ao Al, após cinco dias de exposição a 222 μM de Al, exsudava, principalmente, ácido cítrico. Jorge et al. (1997) detectaram, também em milho, a exsudação de ácido málico e cítrico em presença de Al no meio de cultivo.

No presente experimento, apenas dois ácidos orgânicos foram detectados no meio de cultivo: o ácido oxálico e o ácido cítrico. O padrão de exsudação do ácido oxálico foi errático, não apresentando qualquer tendência que pudesse ser correlacionada com o mecanismo de tolerância das plantas ao Al (resultados não apresentados). Apenas o ácido cítrico foi exsudado em quantidade e num padrão coerente com sua função na tolerância das plantas ao Al (Figura 6). A quantidade de citrato produzida até 4 h foi pequena sugerindo a não existência de canais aniônicos pré-existentes para transportá-lo para o meio externo conforme se espera do padrão I de exsudação. Após esta fase de latência iniciou-se rápida e intensa exsudação de ácido cítrico induzida pela exposição ao Al, característica do padrão II de exsudação (Ma, 2000). As duas espécies, embora em intensidades diferentes, apresentaram basicamente o mesmo padrão de exsudação. Os resultados se assemelham aos obtidos por Li et al, (2009), que trabalharam com genótipos de diferentes espécies de *Stylosanthes* e observaram a exsudação de ácido cítrico pelas raízes, aumentando em função das doses e do tempo de exposição ao Al. Os autores também classificaram a secreção de ácido cítrico como Padrão II. Estas características de exsudação de ácidos orgânicos, induzido pelo Al é similar a

outras espécies da família Fabaceae, como *Cassia tora* (Ma et al., 1997c), *Phaseolus vulgaris* (Shen et al., 2004), *Glycine max* (Yang et al., 2001) e *Vigna unguiculata* (Yu et al., 2012), com predominância de citrato exsudado.

O perfil de exsudação de citrato das duas espécies de *Stylosanthes* estudadas (Figura 6) reflete a tolerância diferencial ao Al manifestada pela inibição do alongamento radicular dessas espécies (Figura 1, Tabela 1). *S. guianensis* exsudou aproximadamente 2,2 vezes mais ácido cítrico e apresentou inibição do crescimento radicular 42 % menor do que *S. capitata*. Associado a esta resposta, *S. guianensis* apresentou menores teores de Al nas raízes no decorrer do tempo de exposição ao Al comparada a *S. capitata* (Figura 5). A exsudação de citrato preveniu a entrada de Al para as raízes, resultando em menores danos celulares e, portanto, permitindo o alongamento radicular, principalmente em *S. guianensis*. Cabe salientar que o citrato faz parte dos compostos existentes no metabolismo celular, e são de síntese econômica quando comparados aos metabólitos secundários, que também poderiam ser exsudados e complexar o Al (Ryan e Delhaize, 2010). Além disso, o ácido cítrico forma forte complexo com o Al, que é cerca de 700 vezes maior que a do complexo Al-malato. É, portanto, um dos ácidos orgânicos mais eficazes no processo de exclusão do Al na região próxima ao sistema radicular, como outros autores já sugeriram (Ownby e Popham, 1989; López-Bucio et al., 2000; Ryan e Delhaize, 2001).

A exsudação de ácidos orgânicos para o meio de cultivo estimulada por Al é catalisada por canais aniônicos (Hiradate et al., 2007). Canais que mediam a exsudação de ácido málico (Sasaki et al., 2004) e de ácido cítrico (Magalhães et al., 2007) já foram identificados em várias espécies (Zheng et al., 1998b; Li et al., 2000; Zhao et al., 2003; Dong et al., 2008; Ramírez-Benítez et al., 2008). A avaliação do envolvimento destes canais de ânions tem sido feita com a utilização de inibidores específicos desses canais ou de síntese de proteínas. A aplicação dos inibidores de canais de ânions: ácido niflúmico (AN) e ácido 9-antraceno carboxílico (9-AC) diminuiu as quantidades de ácido cítrico exsudado para a solução de cultivo nas duas espécies, especialmente em *S. capitata* (Figura 8A). Paralelamente, foram observados aumentos significativos dos teores de Al presentes nos tecidos radiculares nestes tratamentos. Assim, pode-se inferir que os canais de ânions estão envolvidos na secreção de citrato induzido por Al em *Stylosanthes*. A exsudação de citrato, também, foi significativamente afetada por cicloheximida (CHM), indicando ter havido síntese “*de novo*” das proteínas formadoras dos canais aniônicos. De modo semelhante ao detectado com os inibidores de canais, o efeito da CHM foi observado nas duas espécies, mas com maior

intensidade em *S. capitata*. Adicionalmente, o acúmulo de Al nas raízes aumentou nas duas espécies, indicando a essencialidade da síntese de proteínas formadoras de canais aniônicos no mecanismo de tolerância ao Al.

Resultados semelhantes foram observados em outros cultivares de *Stylosanthes* tratados com Al 30 μ M por 12 h (Li et al., 2009). Os autores observaram diminuições significativas na exsudação de citrato em *Stylosanthes* tratados com os inibidores de canais de ânions, 9-AC e fenilisotiocianato (PITC), e consequente aumento nos teores de Al presentes nos tecidos radiculares. A CHM também foi usada por estes autores e diminuindo severamente a exsudação de citrato, após 12 horas de exposição ao tratamento. Yu et al, (2012) analisaram o efeito dos inibidores CHM e 9-AC em *Vigna unguiculata*, verificando eliminação completa do efluxo de citrato e malato. Entretanto, o inibidor AN não alterou a exsudação dos dois ácidos.

A cicloheximida foi utilizada em *Cassia tora* na tentativa de verificar sua influência sobre a exsudação de ácido cítrico, que nessa espécie segue o padrão II de exsudação e em *Fagopyrum esculentume* em que a exsudação de ácido oxálico segue o padrão I (Yang et al., 2006). Esses autores observaram que a CHM inibiu a exsudação de ácido cítrico em *Cassia tora*, mas não alterou a exsudação de ácido oxálico em *F. esculentum*. O resultado foi interpretado como indicativo da ocorrência da síntese “*de novo*” de proteínas de canal de ácido cítrico em *Cassia tora*.

Além dos mecanismos de exsudação de ácidos orgânicos induzidos por Al, sugere-se a operação de alguns mecanismos alternativos para várias espécies e genótipos (Cabraia et al., 1983; Ma et al., 1997a; Gonçalves et al., 2005). Dentre esses, incluem-se mecanismos de desintoxicação interna, envolvendo a produção de ácidos orgânicos nos tecidos, seguido de complexação do Al e o transporte/armazenamento do complexo Al-ácido orgânico nos vacúolos (Kochian et al., 2004). Plantas que utilizam estes mecanismos, embora não possam impedir a entrada de Al em sua totalidade, produziram teores tissulares de ácidos orgânicos mais elevados capazes de reduzir a concentração de Al³⁺ livre no simplasma.

No presente trabalho, entretanto, observou-se redução nos teores de ácido málico e cítrico, dois dos mais importantes ácidos orgânicos envolvidos com a tolerância das plantas ao Al. Andrade et al (2011) relataram a mesma tendência de diminuição dos teores de ácido málico para cultivares de trigo. Estes autores interpretaram esta resposta como efeito do estresse causado pelo Al sobre a biossíntese dos ácidos orgânicos e não como uma resposta das plantas para tolerarem os efeitos tóxicos do Al. Os dados na literatura não são consistentes

com as concentrações de ácidos orgânicos encontradas nas raízes desse experimento. Gonçalves et al (2005) relatam que o tratamento com Al aumentou os teores de ácidos orgânicos nas raízes (principalmente ácido málico e trans-aconítico) de cultivares de sorgo tolerantes e sensíveis ao Al. Entretanto, Delhaize et al, (1993) observou que o conteúdo de ácido málico nos ápices radiculares de trigo não foram alterados com a exposição ao Al. Silva et al (2001) relataram aumento das concentrações de ácido málico, não somente nos ápices radiculares, mas em toda a raiz de variedade de soja expostas ao Al.

Alguns trabalhos mostram que pode ocorrer aumento na atividade de certas enzimas do ciclo de Krebs (Li et al., 2000; Yang et al., 2001) resultando em aumento da biossíntese desses ácidos orgânicos. Os resultados desse experimento são sugestivos de duas possibilidades: a) as plantas não apresentam, na presença de Al, capacidade de sintetizar ácidos orgânicos compatível com sua capacidade de exsudá-los para o meio externo; 2) as atividades das enzimas da biossíntese dos principais ácidos orgânicos envolvidos foram seriamente comprometidas na presença de Al. O esclarecimento destas dúvidas requer estudos posteriores principalmente de determinação das atividades das principais enzimas relacionadas com a biossíntese de ácidos orgânicos.

6. CONCLUSÕES

O gênero *Stylosanthes* apresenta ampla variabilidade quanto à tolerância ao Al. Dentre seis espécies analisadas *S. capitata* e *S. guianensis* foram selecionadas como mais sensível e mais tolerante ao Al, respectivamente. *S. guianensis* acumulou menores teores de Al e apresentou menores taxas de inibição do alongamento radicular em relação *S. capitata*. Os ácidos orgânicos encontrados em maiores concentrações nos tecidos radiculares foram o ácido cítrico e o málico, mas os teores desses ácidos diminuíram após exposição ao Al, nas duas espécies de *Stylosanthes*. O tratamento das plantas com Al resultou em aumento na exsudação de ácido cítrico para a solução de cultivo das duas espécies, com maior intensidade em *S. guianensis*. A utilização de inibidores de canais aniônicos e de síntese de proteínas mostrou que a tolerância ao Al encontrada em *S. guianensis*, comparativamente a *S. capitata*, pode estar associada à sua capacidade exsudar ácido cítrico para meio de cultivo.

7. REFERÊNCIAS

- 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.
- AKESON, M.A.; MUNNS, D.N.; BURAU, R.G. (1989). Adsorption of Al³⁺ to phosphatidylcholine vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta**, 986, 200-206.
- ALVES, R.M.M. **Produção, acúmulo e exsudação de ácidos Orgânicos em dois cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.), submetidos a níveis tóxicos de alumínio**. Viçosa: UFV, 2005. 77p.
- ANDRADE, L.R.M.; IKEDA, M.; AMARAL, L.I.V.; ISHIZUKA, J. (2011). Organic acid metabolism and root excretion of malate in wheat cultivars under aluminium stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, 49, 55-60.
- ANDRADE, R.P.; KARIA, C.T.; RAMOS, A.K.B. *Stylosanthes* as a forage legume at its centre of diversity. In: CHAKRABORTY, S. (Ed.). **High-yielding antracnose-resistant *Stylosanthes* for agricultural system**, Canberra: Aciar, 2004. p. 39-50.
- AYARZA, M.; VILELA, L.; ALVES, B.J.R.; OLIVEIRA, O.C.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. (1997). Introdução de *Stylosanthes guianensis* Cv. Mineirão em pastagem de *Brachiaria ruziziensis*: influência na produção animal e vegetal. **Boletim Técnico**, nº1, EMBRAPA Agrobiologia. 18p.
- BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. (2002). Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. **Environmental and Experimental Botany**, 48, 75-92.
- BARROS, A.M; FALEIRO, F.G.; KARIA, C.T.; SHIRATSUCHI, L.S.; ANDRADE, R.P.; LOPES, G.K.B. (2005). Variabilidade genética e ecológica de *Stylosanthes macrocephala* determinadas por RAPD e SIG. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 40, 899-909.
- BERTHON, G. (1996). Chemical speciation studies in relation to aluminium metabolism and toxicity. **Coordination Chemistry Reviews**, 149, 241-280.
- BRITEZ, R. M., WATANABE, T., JANSEN, S., REISSMANN, C. B., & OSAKI, M. (2002). The relationship between aluminium and silicon accumulation in leaves of *Fareamea marginata* (Rubiaceae). **New Phytologist**, 156, 437-444.

- 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.
- 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.
- chromosome 3R are linked to organic acid release in triticale. **Plant Physiology**, 122, 687-94.
- CLARK, R.B. (1975). Characterization of phosphatase of intact maize roots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 23, 458-460.
- CONYERS, M.; HELYAR, K.; MORONI, J.S. (2005). The carbon cost of protecting the root apex from soil acidity: a theoretical framework. **Plant and Soil**, 278, 195-204.
- DELHAIZE E.; HEBB, D.M.; RYAN, P.R. (2001). Expression of a *Pseudomonas aeruginosa* citrate synthase gene in tobacco is not associated with either enhanced citrate accumulation or efflux. **Plant Physiology**, 125, 2059-2067.
- DELHAIZE, E.; RYAN, P.R. (1995). Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiology**, 107, 315-321.
- DELHAIZE, E.; RYAN, P.R.; RANDALL, P.J. (1993). Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) (II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices). **Plant Physiology**, 103, 695-702.
- DONCHEVA, S.; AMENÓS, M.; POSCHENRIEDER, C.; BARCELÓ, J. (2005). Root cell patterning: a primary target for aluminium toxicity in maize. **Journal of Experimental Botany**, 56, 1213-20.
- DONG, X.Y.; SHEN, R.F.; CHEN, R.F.; ZHU, 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.
- DU, Y.M.; TIAN, J.; LIAO, H.; BAI, C.J.; YAN, X.L.; LIU, G.D. (2009). Aluminium tolerance and high phosphorus efficiency helps *Stylosanthes better* adapt to low-P acid soils. **Annals of Botany**, 103, 1239-1247.
- FOY, C.D. (1988). Plant adaptation to acid, aluminum-toxic soils. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, 19, 959-987.
- 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

- GONÇALVES, M.C. (1983). **Influência do Al, nitrato e amônio na absorção e na assimilação do nitrogênio, em *Stylosanthes guianensis* e *S. macrocephala***. Viçosa: UFV, 1983. 38p.
- GONZÁLEZ-SANTANA, I.H.; MÁRQUEZ-GUZMÁN, J.; CRAM-HEYDRICH, S.; CRUZ-ORTEGA, R. (2012). *Conostegia xalapensis* (Melastomataceae): an aluminum accumulator plant. **Physiologia Plantarum**, 144, 134-45
- GUO, J.H.; LIU, X.J.; ZHANG, Y.; SHEN, J.L.; HAN, W.X.; ZHANG, W.F.; CHRISTIE, P.; GOULDING, K.W.T.; VITOUSEK, P.M.; ZHANG, F.S. (2011). Significant acidification in major Chinese croplands. **Science**, 327, 1008-1010.
- HIRADATE, S.; MA, J.F.; MATSUMOTO, H. (2007). Strategies of plants to adapt to mineral stresses in problem soils. **Advances in Agronomy**. 96, 65-132.
- HOEKENGA, O.A.; VISION, T.J.; SHAFF, J.E.; MONFORTE, A.J.; LEE, G.P.; HOWELL, S.H.; KOCHIAN, L.V. (2003). Identification and characterization of aluminum tolerance loci in *Arabidopsis* (*Landsberg erecta* x *columbia*) by quantitative trait locus mapping. A physiologically simple but genetically complex trait. **Plant Physiology**, 132, 936-948.
- HUANG, C.-F.; YAMAJI, N.; CHEN, Z.; MA, J. F. (2011). A tonoplast-localized half-size ABC transporter is required for internal detoxification of Al in rice. **The Plant Journal**, 1-11.
- HUANG, C.F.; YAMAJI, N.; MITANI, N.; YANO, M.; NAGAMURA, Y.; MA, J.F. (2009). A bacterial-type ABC transporter is involved in aluminum tolerance in rice. **The Plant Cell**, 21, 655-667.
- JANSEN, S.; WATANABE, T.; CARIS, P.; GEUTEN, K.; LENS, F.; PYCK, N.; SMETS, E. (2004). The distribution and phylogeny of aluminium accumulating plants in the Ericales. **Plant Biology**, 6, 498-505.
- 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. **Phytochem Anal**, 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. Aluminum-induced organic acids exudation by roots of an aluminum-tolerance tropical maize. **Phytochemistry**, 48: 675-681, 1997.

- KHAN, M.S.H.; TAWARAYA, K.; SEKIMOTO, H.; KOYAMA, H.; KOBAYASHI, Y.; MURAYAMA, T.; CHUBA, T.; KAMBAYASHI, M.; SHIONO, Y.; UEMURA, M.; ISHIKAWA, S.; WAGATSUMA, T. (2009). 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.
- KIDD, P.S.; LLUGANY, 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.
- KISS, T.; ZATTA, P.; CORAIN, B. (1996). Interaction of aluminium (III) with phosphate-binding sites: biological aspects and implications. **Coordination Chemistry Reviews**, 149, 329-346.
- KITAGAWA, T.; MORISHITA, T.; TACHIBANA, Y.; NAMAI, H.; OHTA, Y. (1986). Differential aluminum resistance of wheat varieties and secretion of organic acids. **Japanese Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, 57, 352-358.
- KOCHIAN, L.V. (1995). Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular 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 Plant Biology**, 55, 459-493.
- KOCHIAN, L.V.; PIÑEROS, M.A.; HOEKENGA, O.A. (2005). The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. **Plant and Soil**, 274, 175-195.
- LAZOF, D.B.; GOLDSMITH, J.G.; RUFTY, T.W.; LINTON, R.W. (1996). The early entry of Al into cells of intact soybean roots (a comparison of three developmental root regions using secondary ion mass spectrometry imaging). **Plant Physiology**, 112, 1289-1300.
- LI, X.F.; MA, J.F.; MATSUMOTO, H. (2000). Pattern of aluminum-induced secretion of organic acids differs between rye and wheat. **Plant Physiology**, 123, 1537-44.
- LI, X.F.; ZUO, F.H.; LING, G.Z.; LI, Y.Y.; YU, Y.X.; YANG, P.Q.; TANG, X.L. (2009). Secretion of citrate from roots in response to aluminum and low phosphorus stresses in *Stylosanthes*. **Plant Soil**, 325, 219-229.

- LIU, G.D.; PHAIKAEW, C.; STUR, W.W. (1997). Status of *Stylosanthes* development in other countries. II. *Stylosanthes* development and utilization in China and south-east Asia. **Tropic Grasslands**, 31, 460-466.
- LOPES, A.S. (1984). **Solos sob "Cerrado": características, propriedades e manejo**. Piracicaba, Associação Brasileira para a Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 162p.
- LÓPEZ-BUCIO, J.; NIETO-JACOBO, M.F.; RAMÍREZ-RODRÍGUEZ, V.; HERRERA-ESTRELLA, L. (2000). Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. **Plant Science**, 160, 1-13.
- LOVATO, M.B.; MARTINS, P.S. (1997). Genetic variability in salt tolerance during germination of *Stylosanthes humilis* H.B.K. and association between salt tolerance and isozymes. **Brazilian Journal of Genetics**, 20, 435-441.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, 193, 265-275.
- MA, J.F. (2000). Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants. **Plant & Cell Physiology**, 41, 383-90.
- MA, J.F. (2007). Syndrome of aluminum toxicity and diversity of aluminum resistance in higher plants. **International Review of Cytology**, 264, 225-253.
- MA, J.F.; HIRADATE, S.; NOMOTO, K.; IWASHITA, T.; MATSUMOTO, H. (1997a). Internal detoxification mechanism of Al in hydrangea (identification of Al form in the leaves). **Plant Physiology**, 113, 1033-1039.
- MA, J.F.; RYAN, P.R.; DELHAIZE, E. (2001). Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. **Trends in Plant Science**, 6, 273-278.
- MA, J.F.; SHEN, R.; NAGAO, S.; TANIMOTO, E. (2004). Aluminum targets elongating cells by reducing cell wall extensibility in wheat roots. **Plant & Cell Physiology**, 45, 583-589.
- MA, J.F.; TAKETA, S.; YANG, Z.M. (2000). Aluminum tolerance genes on the short arm of
- MA, J.F.; ZHENG, S.J.; MATSUMOTO, H. (1997c). Specific secretion of citric acid induced by Al stress in *Cassia tora* L. **Plant Cell**, 38, 1019-1025.
- MA, J.F.; ZHENG, S.J.; MATSUMOTO, H.; HIRADATE, S. (1997b). Detoxifying aluminium with buckwheat. **Nature**, 390, 569-570.
- MA, J.F.; RYAN, P.R. (2010). Understanding how plants cope with acid soils. **Functional Plant Biology**, 37, 2008-2011.

- MA, Z.; MIYASAKA, S. (1998). Oxalate exudation by taro in response to Al. **Plant Physiology**, 118, 861-865.
- MAGALHÃES J. (2002). **Molecular genetic and physiological investigations of aluminum tolerance in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench)**. PhD thesis. Cornell Univ. pp. 192.
- MAGALHÃES, J.V.; LIU, J.; GUIMARÃES, C.T.; LANA, U.G.P.; ALVES, V.M.C.; WANG, Y.-H.; SCHAFFERT, R.E.; HOEKENGA, O.A.; PIÑEROS, M.A.; SHAFF, J.E.; KLEIN, P.E.; CARNEIRO, N.P.; COELHO, C.M.; TRICK, H.N.; KOCHIAN, L.V. (2007). A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. **Nature Genetics**, 39, 1156-1161.
- MATSUMOTO, H. (2005). Molecular aspect of al tolerance in crop plants: novel al-activated malate transporter gene in wheat roots. **Soil Science and Plant Nutrition**, 51, 613-615.
- MILLER, C.P.; RAINS, J.P.; SHAW, K.A.; MIDDLETON, C.H. (1997). Commercial development of *Stylosanthes* pastures in northern Australia. II. *Stylosanthes* in the northern Australian beef industry. **Tropic Grasslands**, 31, 509-514.
- MIYASAKA, S.C.; BUTA, J.G.; HOWELL, R.K.; FOY, C.D. (1991). Mechanism of aluminium tolerance in snap beans: root exudation of citric acid. **Plant Physiology**, 96, 737-743.
- MORITA, A.; YANAGISAWA, O.; TAKATSU, S.; MAEDA, S.; HIRADATE, S. (2008). Mechanism for the detoxification of aluminum in roots of tea plant (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze). **Phytochemistry**, 69, 147-153.
- MOSQUIM, P.R. (1978). **Influência do Al sobre o crescimento e o metabolismo em plantas de *Stylosanthes humilis* H. B. K.** Viçosa, MG: UFV. 29p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa.
- OSAKI, M.; YAMADA, S.; ISHIZAWA, T.; WATANABE, T.; SHINANO, T.; TUAH, S.J.; URAYAMA, M. (2003). Mineral characteristics of leaves of plants from different phylogeny grown in various soil types in the temperate region. **Plant Foods for Human Nutrition**, 58, 117-37.
- OWNBY, J.D.; POPHAM, H.R. (1989). Citrate reverses the inhibition of wheat root growth caused by aluminum. **Journal Plant Physiology**, 135, 588-591.
- PANDA, S.K.; BALUSKA, F.; MATSUMOTO, H. (2009). Aluminum stress signaling in plants. **Plant Signaling & Behavior**, 4, 592-597.
- 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.
- PELLET, D.M.; GRUNES, D.L.; KOCHIAN, L.V. (1995). Organic acid exudation as aluminium tolerance mechanisms in maize (*Z. mays* L.). **Planta**, 196, 788-795.
- PIÑEROS, M.A.; MAGALHAES, J.V.; ALVES, V.M.C.; KOCHIAN, L.V. (2002). The physiology and biophysics of an aluminum tolerance mechanism based on root citrate exudation in maize. **Plant Physiology**, 129, 1194-1206.
- PIÑEROS, M.A.; SHAFF, J.E.; MANSLANK, H.S.; ALVES, V.M.C.; KOCHIAN, L.V. (2005). Aluminum Resistance in Maize Cannot Be Solely Explained by Root Organic Acid Exudation. A comparative physiological study. **Plant Physiology**, 137, 231-241.
- POSCHENRIEDER, C.; GUNSE, B.; CORRALES, I.; BARCELÓ, J. (2008). A glance into aluminum toxicity and resistance in plants. **The Science of the Total Environment**, 400, 356-68.
- QUECINI, V.M.; OLIVEIRA, C.A.; ALVES, A.C.; VIEIRA, M.L.C. (2002). Factors influencing electroporation-mediated gene transfer to *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. Protoplasts. **Genetics and Molecular Biology**, 25, 73-80.
- RENGEL, Z.; ZHANG, W.-H. (2003). Role of dynamics of intracellular calcium in aluminium-toxicity syndrome. **New Phytologist**, 159, 295-314.
- 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.; DELHAIZE, E.; JONES, D. (2001). Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 52, 527-560.
- RYAN, P.R.; DELHAIZE, E.; RANDALL, P.J. (1995). Characterization of Al-stimulated efflux of malate from the apices of Al-tolerant wheat roots. **Planta**, 196, 103-110.
- RYAN, P.R.; RAMAN, H.; GUPTA, S.; HORST, W.J.; 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.
- 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**, 37, 645-653.
- SHEN, R.; MA, J.F. (2001). Distribution and mobility of aluminium in an Al-accumulating plant, *Fagopyrum esculentum* Moench. **Journal of Experimental Botany**, 52, 1683-1687.

- SHEN, R.F.; CHEN, R.F.; MA, J.F. (2006). Buckwheat accumulates aluminum in leaves but not in seeds. **Plant Soil**, 284, 265-271.
- SILVA, I.R.; SMYTH, T.J.; RAPER, C.D.; CARTER, T.E.; RUFTY, T.W. (2001). Differential aluminum tolerance in soybean: an evaluation of the role of organic acids, **Physiology Plantarum**, 112, 200-210.
- SINGH, D.; CHAUHAN, S. K. (2011). Organic acids of crop plants in aluminium detoxification. **Current Science**, 100, 1509-1515.
- SIVAGURU, M.; FUJIWARA, T.; ŠAMAJ, J.; BALUŠKA, F.; YANG, Z.; OSAWA, H.; MAEDA, T.; MORI, T.; VOLKAMANN, D.; MATSUMOTO, H. (2000). Aluminum-induced 1→3-β-d-glucan inhibits cell-to-cell trafficking of molecules through plasmodesmata. A new mechanism of aluminum toxicity in plants. **Plant Physiology**, 124, 991-1005.
- SIVAGURU, M.; HORST, W.J. (1998). The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize. **Plant Physiology**, 116, 155-163.
- STACE, H.M.; EDYE, L.A. (Ed.). **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. Sidney: Academic Press, 1984.
- TAYLOR, G.J.; McDONALD-STEPHENS, J.L.; HUNTER, D.B.; BERTSCH, P.M.; ELMORE, D.; RENGEL, Z.; REID, R.J. (2000). Direct measurement of aluminum uptake and distribution in single cells of *Chara corallina*. **Plant Physiology**, 123, 987-96.
- VITORELLO, V.A.; CAPALDI, F.R.; STEFANUTO, V.A. (2005). Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 17, 129-143.
- 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 Physiol**, 46, 1915-1923.
- WATANABE, T.; JANSEN, S.; OSAKI, M. (2005). The beneficial effect of aluminium and the role of citrate in Al accumulation in *Melastoma malabathricum*. **New Phytologist**, 165, 773-780.
- XUE, Y.J.; TAO, L.; YANG, Z.M. (2008). Aluminum-induced cell wall peroxidase activity and lignin synthesis are differentially regulated by jasmonate and nitric oxide. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56, 9676-9684.
- 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.; ZHENG, S.J.; HE, Y.F.; YOU, J. F.; ZHANG, L.; YU, X.H. (2006). Comparative studies on the effect of a protein-synthesis inhibitor on aluminium-induced secretion of organic acids from *Fagopyrum esculentum* Moench and *Cassia tora* L. roots. **Plant, Cell and Environment**, 29, 240-246.
- YANG, L.-T.; JIANG, H.-X.; TANG, N.; CHEN, L.-S. (2011). Mechanisms of aluminium-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, Z.M.; NIAN, H.; SIYAGURU, M.; TANAKAMARU, S.; MATSUMOTO, H. (2001). Characterization of aluminium-induced citrate secretion in aluminium-tolerant soybean (*Glycine max*) plants. **Physiologia Plantarum**, 113, 64-71.
- YANG, Z.M.; SIVAGURU, M.; HORST, W.J.; MATSUMOTO, H. (2000). Aluminium tolerance is achieved by exudation of citric acid from roots of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, 110, 72-77.
- YU, L.; YAN, J.; GUO, S.; ZHU, W. (2012). Aluminum-induced secretion of organic acid by cowpea (*Vigna unguiculata* L.) roots. **Scientia Horticulturae**, 135, 52-58.
- ZENG, Q.-L.; CHEN, R.-F.; ZHAO, X.-Q.; WANG, H.-Y.; SHEN, R.-F. (2011). Aluminium uptake and accumulation in the hyperaccumulator *Camellia oleifera* abel. **Pedosphere**, 21, 358-364.
- ZHAO, X.-J.; SUCOFF, E.; STADELMANN, E.J. (1987). Al^{3+} and Ca^{2+} alteration of membrane permeability of *Quercus rubra* root cortex cells. **Plant Physiology**, 83, 159-162.
- ZHAO, Z.; MA, J.F.; SATO, K.; TAKEDA, K. (2003). Differential Al resistance and citrate secretion in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Planta**, 217, 794-800.
- ZHENG, S.J.; MA, J.F.; MATSUMOTO, H. (1998a). Continuous secretion of organic acids is related to aluminum resistance during relatively long-term exposure to aluminum stress. **Physiologia Plantarum**, 103, 209-214.
- ZHENG, S.J.; MA, J.F.; MATSUMOTO, H. (1998b). High Aluminum Resistance in Buckwheat. I. Al-induced Specific Secretion of Oxalic Acid from Root Tips. **Plant Physiology**, 117, 745-751.

APÊNDICE

Quadro 1 - Análise de variância da % de inibição do alongamento radicular (IAR) nas espécies estudadas na concentração de 200 μM de AlCl_3

FV	GL	Quadrado Médio	
		% IAR	
Blocos	3	5,00*	
Tratamentos	(5)		
Espécies	5	501,44*	
Resíduo	15	16,30	
CV (%)		10,63	

*, significativo á 1 % de probabilidade de acordo com o teste F.

Quadro 2 - Análise de variância da % de inibição do alongamento radicular (IAR) e teores de alumínio em raízes (TAR) nas espécies estudadas e em função das doses de alumínio

FV	GL	Quadrado Médio	
		% IAR	TAR (ng g-1 MF)
Blocos	2	5	6,83
Tratamentos			
Espécies	1	1211,24	5154,81
Doses	5	5995,28	13150,45
Espécies x Doses	5	125,59	742,15
Resíduo	22	7,88	149,01
CV (%)		5,26	15,90

*,** significativo á 1 e 5 % de probabilidade de acordo com o teste F, respectivamente.

Quadro 3 - Análise de variância da % de inibição do alongamento radicular (IAR) nas espécies estudadas em função do tempo após aplicação de Al (200 μM de AlCl_3) na solução

FV	GL	Quadrado Médio	
		% IAR	
Blocos	3	27,51*	
Tratamentos	(5)		
Espécies	1	3431,63*	
Tempos	2	37,98*	
Espécies x Tempos	2	0,25*	
Resíduo	15	47,84	
CV (%)		11,17	

*, significativo á 1 % de probabilidade de acordo com o teste F.

Quadro 4 - Análise de variância da exsudação de ácidos orgânicos (EAO), teores de alumínio de folhas (TAF), teores de alumínio em raízes (TAR) nas espécies estudadas em função do tempo, após adição de Al na solução

FV	GL	Quadrado Médio		
		EAO (nmol g ⁻¹ MF)	TAF (ng g ⁻¹ MF)	TAR (ng g ⁻¹ MF)
Blocos	2	155,89**	12,81	59,44
Tratamentos				
Espécies	1	42208,45	551,42	1557,63
Doses	1	404463,20	12290,08	56232,46
Tempos	6	88746,26	322,34	1337,20
Espécie x Tempo	6	11904,86	92,47	160,33
Espécie x Doses	1	45623,68	417,63	2251,06
Tempo x Doses	6	87436,71	467,74	1842,34
Espécie x Tempo x Doses	6	11200,17	23,84	135,66
Resíduo	54	135,45	41,90	54,13
CV (%)		15,59	21,51	16,90

*,** significativo á 1 e 5 % de probabilidade de acordo com o teste F, respectivamente.

Quadro 5 - Análise de variância dos teores de ácido oxálico, malônico e succínico nas espécies estudadas, com 48 horas de aplicação dos tratamentos

FV	GL	Quadrado Médio		
		Oxálico	Malônico	Succínico
Bloco	2	11,0430	3,3866	52,3170
Al	1	51,0573	713,2968**	566,9172**
Espécie	1	38,8352	9,7023	1,5270
Al x Espécie	1	55,7529	26,6394	13,2387
Resíduo	6	15,8925	5,2691	18,4182
CV%		24,8	6,64	10,08

*, significativo á 1 % de probabilidade de acordo com o teste F.

Quadro 6 - Análise de variância dos teores de ácido málico, trans-aconítico e cítrico nas espécies estudadas, com 48 horas de aplicação dos tratamentos

FV	GL	Quadrado Médio		
		Málico	Trans-aconítico	Cítrico
Bloco	2	1098,852	3,6369	591,7118
Al	1	207783,5**	5,6839	28072,48**
Espécie	1	138411,7**	1,4257	4135,917**
Al x Espécie	1	29613,94**	1,3072	1731,559**
Resíduo	6	727,6409	2,0999	137,4965
CV%		5,00	45,42	6,05

*, significativo á 1 % de probabilidade de acordo com o teste F.

Quadro 7 - Análise de variância dos teores de alumínio em raízes (TAR) e exsudação de ácidos orgânicos (EAO), nas espécies estudadas após aplicação dos inibidores da síntese de proteínas e canais iônicos

FV	GL	Quadrado Médio	
		TAR (ng g ⁻¹ MF)	EAO (nmol g ⁻¹ MF)
Blocos	2	1,97*	470,95 ^{ns}
Tratamentos			
Espécies	1	3471,61*	10981,09*
Inibidores	7	10812,86*	40348,75*
Espécies x Inibidores	7	570,40*	2548,64*
Resíduo	30	79,71	322,69
CV (%)		17,08	32,04

*, significativo á 1 % de probabilidade de acordo com o teste F.