

JOÃO ANTONIO BATISTA DE SIQUEIRA

**EFEITOS DO ALUMÍNIO SOBRE O METABOLISMO FOLIAR E
MORFOLOGIA RADICULAR EM GENÓTIPOS DE MILHO
CONTRASTANTES PARA A TOLERÂNCIA À SECA**

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
2016

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S618e
2016

Siqueira, João Antonio Batista de, 1990-
Efeitos do alumínio sobre o metabolismo foliar e
morfologia radicular em genótipos de milho contrastantes para a
tolerância à seca [recurso eletrônico] / João Antonio Batista de
Siqueira. – Viçosa, MG, 2016.
vii, 38f.: il. (algumas color.).

Inclui anexos.

Orientador: Cleberson Ribeiro.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.31-35.

1. Milho - Fisiologia vegetal. 2. Análise foliar. 3. Milho -
Metabolismo. 4. Milho - Efeitos do Alumínio. 5. Milho -
Resistência a seca. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-graduação
em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22. ed. 633.15

JOÃO ANTONIO BATISTA DE SIQUEIRA

**EFEITOS DO ALUMÍNIO SOBRE O METABOLISMO FOLIAR E
MORFOLOGIA RADICULAR EM GENÓTIPOS DE MILHO
CONTRASTANTES PARA A TOLERÂNCIA À SECA**

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: 20 de Maio de 2016.

Wagner L. Araújo
(Coorientador)

Dimas Mendes Ribeiro

Luzimar Campos da Silva

Cleberson Ribeiro
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Viçosa, singularmente ao Departamento de Biologia Vegetal e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal pela oportunidade.

A Capes pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Professor Cleberson Ribeiro pela orientação e oportunidades científicas concedidas, assim como, a amizade construída ao longo dos dias de trabalho.

Aos Professores Fábio Murilo DaMatta e Wagner L. Araújo pelo suporte científico prestado para com a elaboração desta dissertação.

Aos Professores Adriano Nunes-Nesi e Dimas Ribeiro pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Pesquisador Paulo Cesar Magalhães da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas-MG, pela disponibilização das sementes.

Ao BIOAGRO pela disponibilização da estrutura e recursos que permitiram a realização dos experimentos.

Ao núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) pelo suporte prestado durante as análises morfológicas.

A todos os funcionários da Universidade Federal de Viçosa por propiciarem o funcionamento desta instituição.

A Jéssica Barros pelo afeto cotidiano e por todo suporte durante o período de pós-graduação.

Ao Gillian Nunes pela amizade e companheirismo durante a dura empreitada de realização das disciplinas e noites pré-prova.

Ao Dr. Samuel Martins pela atenção aos meus questionamentos e prontidão para auxiliarme nos desenhos experimentais.

Por fim, a todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho, minha imensa gratidão.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	4
3. RESULTADOS	9
4. DISCUSSÃO	27
5. BIBLIOGRAFIA	32
6. ANEXOS	37

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

- A = taxa de assimilação líquida de CO_2
- A/E = eficiência extrínseca do uso da água
- A/g_s = eficiência intrínseca do uso da água
- AC = alongamento caulinar relativo
- AF = alongamento foliar relativo
- Al = alumínio
- AlCl_3 = cloreto de alumínio
- ATP = trifosfato de adenosina
- AO = ácidos orgânicos
- AR = alongamento radicular relativo
- C_i = concentração intercelular do CO_2
- CAT = catalase
- CS = citrato sintase
- CTE = cadeia transportadora de elétrons
- E = taxa de transpiração
- EH = estresse hídrico
- ERO = espécies reativas de oxigênio
- F_0 = fluorescência inicial
- F_m = fluorescência máxima
- FSII = fotossistema
- F_v = fluorescência variável
- F_v/F_m = eficiência fotoquímica máxima do FSII
- F_v'/F_m' = eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos do FSII
- g_s = condutância estomática
- K = potássio
- L = litro
- MEV = microscopia eletrônica de varredura
- MEV-EDS = microscopia eletrônica de varredura acoplada a sonda de raio-X
- Min = minuto
- P = fósforo
- FEPC = fosfoenolpiruvato carboxilase
- q_L = coeficiente de extinção fotoquímico
- R_E = taxa de respiração no escuro

R_L = taxa de respiração na luz

S = enxofre

s = segundo

SOD = superóxido dismutase

TA = toxidez por alumínio

TCA = ciclo dos ácidos tricarboxílicos

TCR = taxa de crescimento relativo

TTE = taxa de transporte de elétrons

ZDT = zona distal de transição

Φ_{FSII} = rendimento quântico do transporte de elétrons

RESUMO

SIQUEIRA, João Antonio Batista. M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2016. **Efeitos do Alumínio Sobre o Metabolismo Foliar e Morfologia Radicular em Genótipos de Milho Contrastantes para a Tolerância à Seca.** Orientador: Cleberson Ribeiro. Coorientadores: Fábio Murilo Damatta, Wagner Luiz Araújo.

Plantas cultivadas frequentemente são acometidas pela toxidez desencadeada pelo alumínio (Al) no solo. Esse estudo foi conduzido de modo a examinar os efeitos do Al sobre a fisiologia de genótipos de milho com susceptibilidade (BRS1010) e tolerância (BRS1055) a seca, uma vez que as respostas a esses estresses são correlacionadas. Com esse intuito, plantas de milho (*Zea mays* L.) após 5 dias de germinação foram expostas a 0 ou 100 μM de Al por até 120 horas (h). O alongamento radicular (AR) foi reduzido em BRS1010 após 72 h de exposição ao Al, enquanto BRS1055 apresentou redução somente em 120 h de exposição ao Al. Inversamente, o alongamento caulinar (AC) e foliar (AF) foram incrementados em BRS1055 após 72 h da imposição ao estresse. Enquanto que em BRS1010 o AF se manteve constante, ocorrendo a redução no AC após 72 h de estresse por Al. Raízes de BRS1010 apresentaram danos morfológicos mais intensos que BRS1055, explicados pelos maiores níveis de Al na região da coifa e pelo maior engrossamento dos ápices radiculares. Folhas de BRS1010 exibiram acúmulo de glicose, sacarose, amido, aminoácidos e proteínas, indicando que o crescimento foi comprometido por limitações relacionadas a utilização desses metabólitos. A taxa de respiração no escuro (R_E) foi superior em folhas de BRS1055 em condições de estresse, assim, foram encontrados menores níveis de fumarato nesse genótipo. Enquanto, os níveis de malato foram superiores em folhas de BRS1010 diante da toxidez por Al. Dessa forma, o acúmulo de malato, possivelmente estaria condicionando BRS1010 a menores taxas de R_E em condições de estresse por Al. Parâmetros fisiológicos e de crescimento exibiram baixas correlações em BRS1055, enquanto em BRS1010 esses parâmetros foram altamente correlacionados. Os resultados sugerem que os mecanismos de tolerância a Al em BRS1055 estão relacionados a manutenção do crescimento por meio de ajustes metabólicos alternativos em folhas.

ABSTRACT

SIQUEIRA, João Antonio Batista. M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2016. **Effects of Aluminium About Leaf Metabolism and Root Morphology in Maize Genotypes Contrasting to Drought Tolerance.** Adviser: Cleberson Ribeiro. Co-Advisers: Fábio Murilo DaMatta, Wagner Luiz Araújo.

Crop plant frequently are subject to the toxicity triggered by aluminum (Al) in the soil. This study was lead so as to examine the Al effects on the physiology of maize genotypes with susceptibility (BRS1010) and tolerance (BRS1055) to drought, since responses to this stress are highly correlated. With this objective, maize plants (*Zea mays* L.), 5 days after the germination were exposed to 0 and 100 μM of Al during 120 hours (h). Root elongation (RE) was reduced in BRS1010 since 72 h stress, while the BRS1055 RE was reduced after 120 h of Al exposition. Inversely, stalk (SE) and leaf (LE) elongation were increase in BRS1055 after 72 h of Al stress. While that in BRS1010 the LE was constant and occurred the reduction on the SE with 72 h of Al stress. BRS1010 roots showed morphological damage more intense that BRS1055, what was correlate with higher Al levels on the root tips and larger coarsening of this region. BRS1010 leaves exhibited glucose, sucrose, starch, amino acids and protein accumulation, indicating that growth limitations triggered by Al reduced utilization of these metabolites. The rate of dark respiration (R_d) was greater in BRS1055 leaves during Al stress, so was find lower fumarate levels in these genotype. While the malate levels was higher in BRS1010 leaves in stress conditions. On this way, malate accumulation would possibly subjecting the lower rate R_d in stress conditions by Al. Physiological and growth parameters display minor correlations in BRS1055, while in BRS1010 these parameters was highly correlated. The results suggests that the tolerance mechanisms to Al in BRS1055 are related with growth maintenance by alternative metabolic adjustments in leaves.

1. INTRODUÇÃO

Solos pertencentes a zonas tropicais frequentemente acometem plantas a múltiplos estresses, entre esses destaca-se o fator acidez. A acidez do solo compromete 30% dos solos do mundo, sendo que 60% dos solos tropicais e subtropicais demonstram problemas ao cultivo de plantas relacionados a toxidez desencadeada pelo Al (Kochian et al., 2004; Zheng et al., 2010). Aproximadamente 25% da área mundial designada ao cultivo de milho (*Zea mays* L.) é afetada pelo déficit hídrico (DH) durante os estádios de crescimento (Bänziger e Araus, 2007). A toxidez pelo alumínio (TA) e o DH demonstram afetar diversos processos biológicos de forma análoga. Assim, o desenvolvimento de cultivares com tolerância a estes estresses contempla o entendimento das principais respostas fisiológicas de plantas a esses estresses.

Ápices radiculares são altamente sensíveis ao Al (Horst et al., 1992; Delhaize e Ryan, 1995), resultando na inibição do alongamento de raízes, analogamente ao DH (Sharp et al., 2004; Horst et al., 2010; Kopittke et al., 2015). Dessa forma, a manutenção do crescimento radicular frente a TA e ao DH é requerida para a captação de água e a consequente absorção de nutrientes (Serraj e Sinclair, 2002; Kochian et al., 2004; Trachsel et al. 2010), sendo pré-requisito para a obtenção de plantas tolerantes a esses estresses. O crescimento da parte aérea é reduzido durante DH em virtude da mobilização de recursos para a manutenção das taxas de crescimento da porção radicular (Yamaguchi e Sharp, 2010). Por outro lado, a TA moderada pode promover a redução do alongamento radicular e aumentar o crescimento da parte aérea (Yang et al., 2009). Ambos estresses culminam na redução do alongamento foliar (Yang et al., 2013). Dessa forma, mecanismos que regem a tolerância ao DH e a TA supostamente propiciam a manutenção das taxas de expansão foliar. Wang et al. (2015) demonstraram que a promoção do alongamento foliar pelo Al em *Z. mays* resultou no incremento da tolerância a esse elemento.

Na dependência do período de exposição ao Al, esse elemento pode ser responsável pelo aumento na rigidez da parede celular de células meristemáticas. Esse fenômeno resulta na ruptura da epiderme de células do córtex mais externo, o que inibe o alongamento dos ápices radiculares (Blamey et al., 2004; Jones et al., 2006; Kopittke et al., 2008). Rupturas nas células do sistema radicular ocorrem predominantemente a partir de 1-2 mm dos ápices radiculares, região conhecida como zona distal de transição (ZDT) (Sivaguru e Horst, 1998). O Al acumulado em raízes se liga a constituintes pécticos da parede celular (Yang et al., 2010; Yang et al., 2012), sendo assim, o conteúdo de pectina radicular pode modular a sensibilidade de *Z. mays* à TA (Schmohl e Hosrt, 2000). Desta forma, o Al além de se ligar a matriz péctica, é responsável por modificar propriedades da parede celular, como a porosidade e a extensibilidade (Jones et al., 2006; Yang et al., 2010; Kopittke et al., 2015). Souza et al., (2016) avaliando genótipos de milho com tolerância diferencial ao Al, observaram que a desorganização celular promovida pelo metal no genótipo sensível iniciou-se em regiões mais próximas ao ápice

radicular. Esses resultados demonstraram que a manutenção da integridade radicular na região próxima ao ápice aparentemente contribui para uma maior tolerância ao Al.

Respostas fisiológicas ativadas pela TA em folhas são pouco esclarecidas, têm sido demonstrado que a taxa de assimilação de CO₂ (*A*) pode ser inibida em função do teor de Al em contato com as raízes (Lidon et al., 1997; Peixoto et al., 2002; Yang et al., 2015). A TA pode resultar também na redução dos teores de clorofila propiciando a redução da eficiência fotossintética (Peixoto et al., 2002; Ali et al., 2015; Hasni et al., 2015). O Al pode causar danos ao fotossistema II (FSII) reduzindo assim a eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m) (Moustakas et al., 1996; Chen et al., 2005), alterando a taxa de transporte de elétrons (TTE) (Chen et al., 2005; Jiang et al., 2008). Silva et al., (2012) comparando as respostas ao Al em cevada (*Secale cereale*), demonstraram a redução no teor relativo de água (TRA) no genótipo sensível. Esses autores atribuíram a redução no TRA ao aumento da transpiração (*E*), em que a TA promoveu redução na biomassa foliar semelhantemente ao DH.

Produtos da fotossíntese são utilizados para a manutenção metabolismo celular e crescimento durante condições ótimas. Entretanto, condições subótimas fazem com que esses produtos sejam utilizados prioritariamente para a manutenção do metabolismo celular (Araújo et al., 2014). O aumento no teor de carboidratos em folhas pode ser um indicativo da tolerância ao Al (Giannakoula, et al., 2008; Giannakoula et al., 2010; Navascúes et al., 2012), uma vez que essas moléculas podem ser utilizadas na respiração para geração de produtos de defesa contra este metal. A respiração mitocondrial atua no suprimento de ATP pela fosforilação oxidativa em tecidos heterotróficos. Durante reações do ciclo dos ácidos tricarbóxicos (TCA) são formados 8 ácidos orgânicos (AO) (Nunes-Nesi et al., 2013), dentre esses, malato e citrato ocupam papel central nas respostas de plantas ao Al (Kochian et al., 2015). Esses produtos metabólicos atuam quelando o Al na rizosfera, impedindo a absorção ou neutralizando esse elemento em células radiculares (Sasaki et al., 2004, Liu et al., 2008; Sun et al., 2014; Kochian et al., 2015). O funcionamento do TCA pode ocorrer de forma não-cíclica propiciando o acúmulo específico de metabólitos em resposta a variações ambientais (Rocha et al., 2010; Sweetlove et al., 2010). A modulação do TCA diante da TA foi reportada para o favorecimento da sobrevivência de microrganismos (Singh et al., 2009; Lemire et al., 2010). Wang et al., (2012) demonstraram que a superexpressão da citrato sintase (CS) juntamente com a fosfoenolpiruvato carboxilase (FEPC) em folhas sob controle de um promotor induzido pela luz, promoveu o aumento da exsudação de citrato e a tolerância ao Al. A abordagem do uso de um promotor induzido pela luz determina o aumento na síntese de AO sem que haja o acúmulo de produtos da fotossíntese, o que garante a suficiência para biossíntese e exsudação, sem afetar os demais processos metabólicos (Wang et al., 2010). Para a manutenção da homeostase celular, cloroplastos e mitocôndrias apresentam intensa atividade metabólica durante a TA, o que torna essas organelas altamente susceptíveis a danos oxidativos.

A ocorrência de desbalanço *redox* frequentemente é relatada como um dos principais efeitos do Al sobre as plantas. A atividade fotossintética favorece a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO). Cloroplastos e peroxissomos são os principais sítios para a geração de ERO na presença de luz (Foyer e Noctor, 2003), diferentemente de condições de escuro em que mitocôndrias passam a ocupar esse papel (Møller, 2001; Foyer e Noctor, 2003). Fotossistemas são os constituintes cloroplastidiais mais propensos a geração de ERO, enquanto os complexos I e III, além da ubiquinona, ocupam esse posto em mitocôndrias (Tuteja et al., 2010). Adicionalmente, lipídios e proteínas podem ser peroxidados frente aos efeitos oxidativos acarretados pelo Al (Boscolo et al., 2003; Yin et al., 2010; Wang et al., 2011). Para a manutenção do equilíbrio *redox* celular, as enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e ascorbato peroxidase (APX) têm a atividade impulsionada na presença de Al. Essas são as principais enzimas envolvidas no controle dos níveis de ERO (Noctor e Foyer, 1998). A TA é amplamente documentada como responsável por aumentar a atividade de enzimas relacionadas a manutenção do estado *redox* celular (Navascués et al., 2012).

O ajustamento dos processos biológicos promove a tolerância ao Al em plantas, uma vez que, muitas estratégias são empregadas para minimização das perdas na performance biológica. O déficit hídrico e o Al no solo desencadeiam ajustes biológicos altamente correlacionados (Yang et al., 2012). Assim, o entendimento dos mecanismos de resposta a estes estresses propiciaria o embasamento para o desenvolvimento de plantas tolerantes a ambos estresses. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo identificar as principais diferenças entre as respostas ao Al em dois genótipos de milho, BRS1010 e BRS1055, que se demonstraram sensível e tolerante ao déficit hídrico, respectivamente (Lavinsky et al., 2015).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Genótipos de milho e condições de crescimento

Foram utilizados dois genótipos de milho, BRS1010 e BRS1055, com sensibilidade e tolerância a seca (Lavinsky et al., 2015). As sementes foram gentilmente cedidas pelo Dr. Paulo Cesar Magalhães da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. A esterilização destas foi realizada em H_2SO_4 (P.A) durante 1 min com posterior lavagem em água desionizada. Estas seguiram a germinação em papel germiteste em solução aerada contendo $100 \mu M$ $CaCl_2$, pH 4,0. Quatro plântulas por recipiente foram cultivadas em 2 L de solução nutritiva de Clark $\frac{1}{2}$ força e pH 4,0 (Clark, 1969) com aeração contínua. Após 5 dias de cultivo, a solução foi trocada para Clark acrescida de 0 (-Al) ou $100 (+Al) \mu M$ de $AlCl_3$ em pH 4 por até 120 horas. As condições de crescimento foram ajustadas para $25 \text{ }^\circ C \pm 2$ de temperatura, 16 h de luz com aproximadamente $200 \mu mol \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de irradiância.

Raízes em sua totalidade e a porção central de folhas foram coletadas para análises bioquímicas, sendo imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, e posteriormente mantidas a $-80^\circ C$. Para análises microscópicas, raízes foram coletadas e fixadas em glutaraldeído a 2,5%.

2.2 Taxas de crescimento de folhas, caules e raízes

O comprimento da raiz seminal demonstrou o alongamento radicular (AR), a distância entre o ápice e a base caulinar demonstram ao alongamento do caule (AC) e extensão da base do pecíolo ao ápice da terceira folha atestaram o alongamento foliar (AF). A taxa de alongamento relativo foi obtida a partir da fórmula, $A (\%) = (A_{Al} / A_C) * 100$, em que:

A_{Al} = alongamento de plantas expostas a $100 \mu M$ Al

A_C = alongamento de plantas controle.

Ganhos de biomassa de BRS1010 e BRS1055 foram obtidos pela taxa de crescimento relativo com base na massa seca, de acordo com a equação proposta por Hunt (1978): $TCR = (\ln_{MS1} - \ln_{MS0}) \times 1000 / (t_1 - t_0)$ em que:

TCR = taxa de crescimento relativo, em termos de massa seca (MS), no período experimental ($mg \text{ g}^{-1} \text{ MS dia}^{-1}$);

\ln_{MS1} e \ln_{MS0} = logaritmo neperiano da massa seca no final e no início do experimento, respectivamente;

$t_1 - t_0$ = duração do experimento (em dias).

2.3 Detecção do alumínio pela coloração com hematoxilina

Ápices radiculares de 0,5 cm foram obtidos a partir das raízes principais de BRS1010 e BRS1055 posteriormente ao tratamento com Al por 72, 96 e 120 h. Os ápices permaneceram imersos em hematoxilina fêrrica 0,2% e KIO₃ a 0,02%, durante 15 min (Polle et al., 1978). A posteriori, o excesso da solução foi eliminado por lavagem em água desionizada e as raízes foram analisadas através de estereomicroscópio (Zeiss Stemi, DV4).

2.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microanálise de raios-X (EDS)

Ápices radiculares como descrito acima, seguiram a fixação em glutaraldeído 2,5%. A desidratação dos ápices ocorreu em série etílica, seguida pela secagem com CO₂ em equipamento de ponto crítico (CPD 030, Baltec, Liechtenstein), sendo cobertos com ouro (MEV) em metalizador (Sputter Coater, Balzers, FDU 010, Liechtenstein) ou carbono (EDS) através do evaporador de carbono (Q150T, Quorum Technologies, Ashford, Kent, UK). As amostras foram analisadas via microscópio eletrônico de varredura (Leo 1430VP, Cambridge, Inglaterra). Posteriormente, foram realizadas análises por meio da sonda de raio-X acoplada (MEV-EDS), para avaliação da distribuição do Al ao longo dos ápices radiculares, assim como, a determinação do teor relativo de Al, P, S e K na região da coifa e na ZDT.

2.5 Avaliação nutricional e teor de Al nos tecidos radiculares

Os nutrientes foram determinados através de raízes secas, de acordo com a metodologia proposta por Tedesco et al. (1995), por digestão nitroperclórica 3:1 (usando-se ácido nítrico- HNO₃ 70% e posteriormente em ácido perclórico - HClO₄ 70%) a partir de 0,2 g de amostra. Os teores de Ca, K, Mg, P, e Al foram determinados por espectrofotometria de emissão atômica em forno de grafite (Varian Spectra AA, 220FS, acoplado com forno de grafite GTA 110).

2.6 Avaliação das trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*

As trocas gasosas foram determinadas na terceira folha emitida e simultaneamente às medições dos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* com auxílio de dois sistemas portáteis de fluxo aberto de gás (LI-6400XT, LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA) equipados com câmara de fluorescência integrada (LI-6400-40, LI-COR Inc.). A taxa de assimilação líquida de CO₂ (*A*), a condutância estomática ao vapor da água (*g_s*) foram determinadas com irradiância de e 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 400 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ de ar. As avaliações foram conduzidas com a temperatura do

bloco a 25 °C, déficit de pressão de vapor em $c.1,0$ kPa e 10% de luz azul. Em sequência, o estado estacionário do rendimento da fluorescência (F_s) foi determinado a partir do pulso de luz azul saturante de $8000 \mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 0,8s a fluorescência máxima foi obtida (F_m'). A luz actínica foi desligada e a vermelho distante ($2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) foi aplicada sobre as folhas para a medição da fluorescência inicial (F_o'). A partir desses parâmetros, o coeficiente de extinção fotoquímico (q_L) e a eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação aberto do fotossistema II (F_v'/F_m') foram estimados (Logan et al., 2007). A eficiência atual fotoquímica do FSII (Φ_{FSII}) foi obtida pela equação: $\Phi_{\text{FSII}} = (F_m'/F_s) / F_m'$ seguindo a premissa estabelecidas por Genty et al., (1989). A taxa de transporte de elétrons (TTE) aparente foi estimada como estabelecido por Maxwell e Johnson (2000), onde $\text{TTE} = \Phi_{\text{FSII}} \times \text{DFFF} \times f \times a$, em que DFFF refere-se a densidade de fluxo fotossintética de fótons, f ao fator de particionamento da energia entre o FSII e o FSI sendo referido como 0,5, indicando que a energia é distribuída igualmente entre os fotossistemas, a indica a absorvância de tecidos fotossintéticos e foi referida como 0,84.

Respiração mitocondrial no escuro (RE) foi mensurada através do sistema de trocas gasosas descrito anteriormente. A partir de 4 h após o início do período de ausência de luz, folhas adaptadas a essas condições foram avaliadas. A RE foi utilizada para a determinação da taxa de respiração na luz (R_L) de acordo com Lloyd et al., (1995) onde $R_L = [0,5 - 0,05 \cdot \ln(\text{DFFF})] \cdot R_E$.

2.7 Determinação do Conteúdo de Metabólitos

Aproximadamente 25 mg de amostras foliares foram obtidas através de porções intermediárias das 3ª e 4ª folhas após 8 h de iluminação. Essas foram imediatamente acondicionadas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C. A extração metabólica foi realizada a partir de tecidos pulverizados em nitrogênio líquido seguida pela imediata adição de álcool etílico (Gibon et al., 2004). O conteúdo de amido, sacarose, frutose e glicose nos tecidos foliares foram determinados exatamente como descrito por Fernie et al., 2001. A determinação dos níveis de malato e fumarato foi realizada de acordo com os preceitos estabelecidos por Nunes-Nesi et al., (2007), enquanto os teores das clorofilas a e b foram obtidos pelo método estabelecido por Sulpice et al., (2009). Proteínas e aminoácidos totais foram quantificados de acordo com Cross et al., (2006).

2.8 Atividade das Enzimas SOD, CAT e APX

As atividades das SOD, CAT e APX em folhas foram determinadas como descrito por Pinheiro et al., (2004). Para a determinação das atividades enzimáticas, 25 mg de tecidos foliares foram macerados em N₂ líquido, seguido da adição de 500 µL de meio de homogeneização constituído de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, EDTA 0,1 mM, PMSF 1 mM e PVPP 1% (p/v). Os homogeneizados foram filtrados e centrifugados a 12.000 xg por 15 min a 4°C e os sobrenadantes utilizados como extrato bruto de enzima.

A atividade da superóxido dismutase (SOD – EC 1.15.1.1) foi determinada pela adição de 20 µL de amostra a um meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, contendo metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 µM, EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 µM (Del Longo et al., 1993). A reação foi conduzida a 25°C numa câmara de reação sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W. Após 5 min de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul produzida pela fotorredução do NBT medida a 560 nm (Giannopolitis e Ries, 1977). Um meio de reação exatamente igual ao anterior, mas mantido no escuro, por igual tempo, foi utilizado como branco. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade da enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT.

A atividade da peroxidase do ascorbato (APX – EC 1.11.1.11) foi medida pela adição de 20 µL de amostra a 80 µL de um meio de reação consistindo de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, ácido ascórbico 0,8 mM e H₂O₂ 1 mM (Ribeiro et al., 2012).

A atividade da catalase (CAT – EC 1.11.1.6) foi mensurada pela adição de 20 µL de amostra a 80 µL de um meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H₂O₂ 12,5 mM (Ribeiro et al., 2012).

Para todas as enzimas, o meio de reação foi incubado a 30°C e as variações na absorvâncias foram determinadas no primeiro minuto de reação. As respectivas absorvâncias e coeficientes de extinção molar utilizados foram para APX: 290 nm e 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹ e para CAT: 240 nm e 36 M⁻¹ cm⁻¹.

2.9 Determinação da Peroxidação de Lipídios

A concentração de malonaldeído em folhas e raízes (MDA) foi estimada de modo a fornecer a intensidade de peroxidação lipídica, de acordo com Heath e Packer (1968). A concentração do complexo aldeído malônico-TBA foi computada utilizando se o coeficiente de absorvidade molar de 155mM⁻¹ cm⁻¹ (Hodges et al., 1999).

2.10 Análises Estatísticas

Os resultados foram obtidos através do desenho experimento baseado no delineamento inteiro ao acaso (DIC) em esquema fatorial $2 \times 2 \times 3$ ($2G \times 2[AI] \times 3T$), 2×2 ($2G \times 3T$) e 2×2 ($2G \times 2[AI]$) para parâmetros com variação ao longo do tempo e pontuais, respectivamente, onde, genótipos (G), dose de AI ([AI]) e tempos (T). Nesse caso, os dados foram submetidos à análise com duas (Two-Way ANOVA) ou três (Three-Way ANOVA) fontes de variação. Todas as análises foram conduzidas com intervalo de confiança de 95%. O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para a identificação das interações entre as variáveis. As análises foram realizadas por meio do Sigma Plot 11 (Systat Software Inc., USA), e são apresentadas em anexo as tabelas referentes às análises estatísticas.

3. RESULTADOS

A exposição ao Al afetou negativamente características fenotípicas de BRS1010, tais como, a distribuição de raízes secundárias, laterais e o desenvolvimento caulinar (Fig. 1).

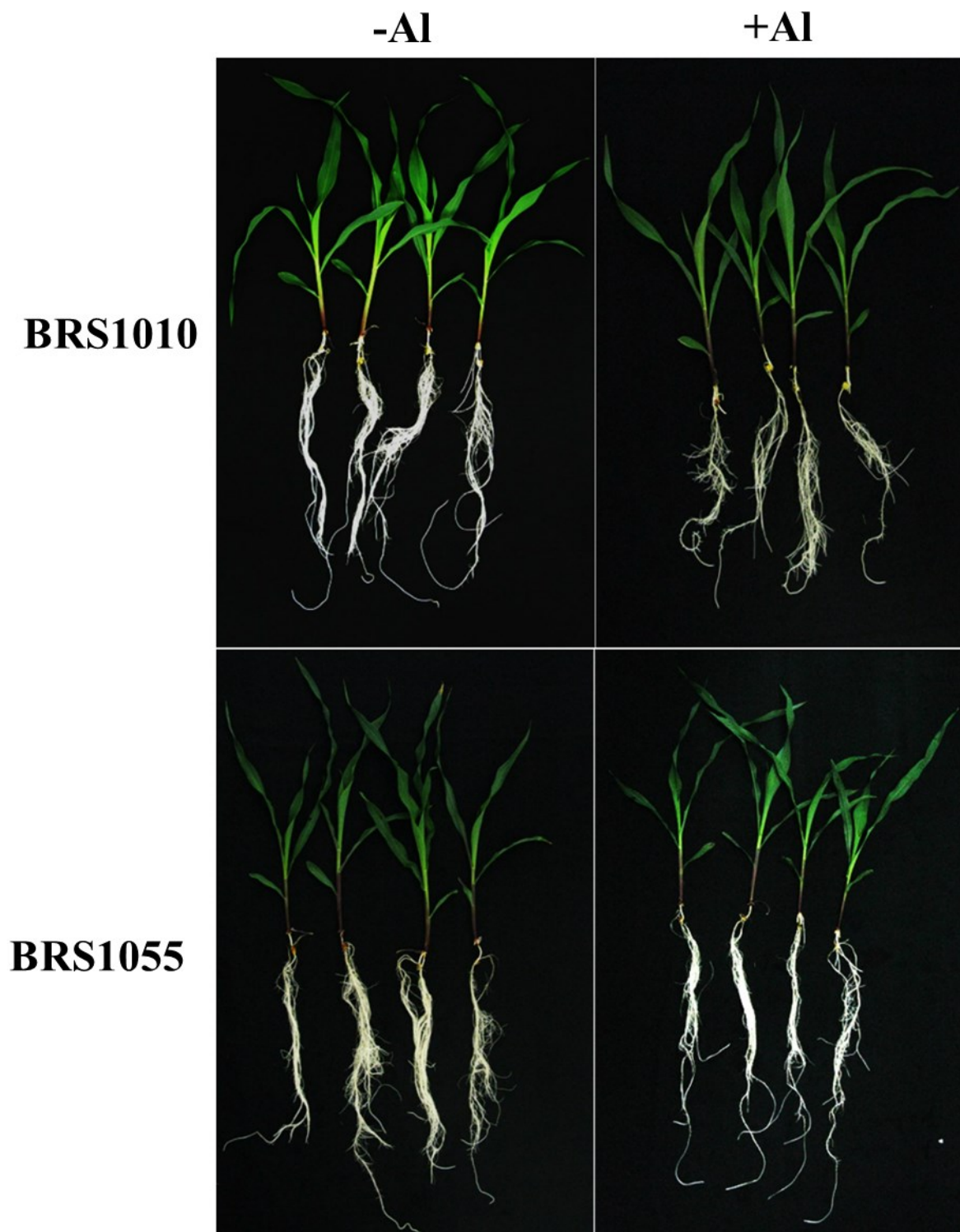


Figura 1. Alterações fenotípicas dos genótipos de milho BRS1010 e BRS1055 posteriormente a exposição a 0 (-Al) e 100 (+Al) μ M por 120 h.

BRS1055 apresentou AF 2,1 vezes maior que BRS1010 (Fig. 2a), indicando incremento durante as primeiras 72 h de estresse, o que demonstra o investimento inicial diferencial no desenvolvimento foliar. O desenvolvimento caulinar ao longo do período experimental foi 48% superior em BRS1055 em relação a BRS1010, contudo, com 120 h de exposição ao Al, o AC foi semelhante entre os genótipos (Fig. 2b). Diferentemente dos parâmetros relacionados à parte aérea, o AR tendeu a reduções durante todo o período experimental. Entretanto, BRS1055 apresentou superioridade de 27% no AR comparativamente à BRS1010 (Fig. 2c). O Al promoveu redução de 50% no ganho de biomassa radicular em BRS1010, enquanto BRS1055 manteve o acúmulo de biomassa radicular diante da exposição ao metal, sendo que esse último genótipo apresentou 2 vezes mais ganhos em biomassa pelas raízes que BRS1010 (Fig. 3).

O conteúdo e a concentração de Al, Ca, K, Mg e P indicaram as alterações nutricionais desencadeadas nos genótipos de milho (Fig. 4). O conteúdo de Al foi similar entre BRS1010 e BRS1055 quando esses foram submetidos a TA. Em decorrência da TA, BRS1010 teve o conteúdo de Mg reduzido cerca de 35%. Por outro lado, BRS1055 apresentou reduções de 18% e 72% nos teores de Ca e Mg, respectivamente. A concentração na raiz demonstra a representatividade do elemento sobre a massa total radicular. BRS1010 diante dos efeitos do Al, apresentou reduções 32% e 52% na concentração radicular de Ca e Mg, respectivamente. BRS1055 demonstrou redução de 60% na concentração de Mg nas raízes diante da TA. Comparando-se os genótipos quando expostos ao Al, a concentração deste elemento nas raízes de BRS1055 foi superior a BRS1010 em cerca de 28%. Além disso, BRS1055 apresentou superioridade sobre BRS1010 em 40% e 38% para as concentrações radiculares de Ca e K.

Características morfológicas de BRS1010 e BRS1055 foram afetadas diferencialmente durante o estresse por Al. A coloração do Al com hematoxilina em ápices radiculares demonstrou o acúmulo do metal em BRS1010 na região próxima ao ápice radicular logo nas primeiras 72 h quando da imposição a 100 μ M de Al, o que foi menos pronunciado para BRS1055. Nos períodos experimentais subsequentes foi notada a redução na intensidade de coloração por hematoxilina em BRS1010 exposta ao Al, fato que pode ser atribuído ao engrossamento das raízes. Assim o Al distribuiu-se através de uma superfície radicular superior ao início das avaliações (Fig. 5). A MEV demonstrou danos nos ápices radiculares associados aos efeitos do Al na região próxima da coifa de ambos genótipos, sendo estes mais evidentes para BRS 1010 (Fig. 6). Com 72 horas de exposição ao Al, danos na região acima da coifa foram evidenciados em BRS1010. Adicionalmente, observa-se pela figura 6 que a exposição ao Al resultou no engrossamento dos ápices radiculares em 72, 96 e 120 h, principalmente para o genótipo BRS1010. Através da MEV-EDS foi observada a intensa coloração vermelha para o genótipo BRS 1010 após exposição ao Al, fato que remete à uma distribuição mais homogênea e maior acúmulo desse metal na raiz desse genótipo (Fig. 7).

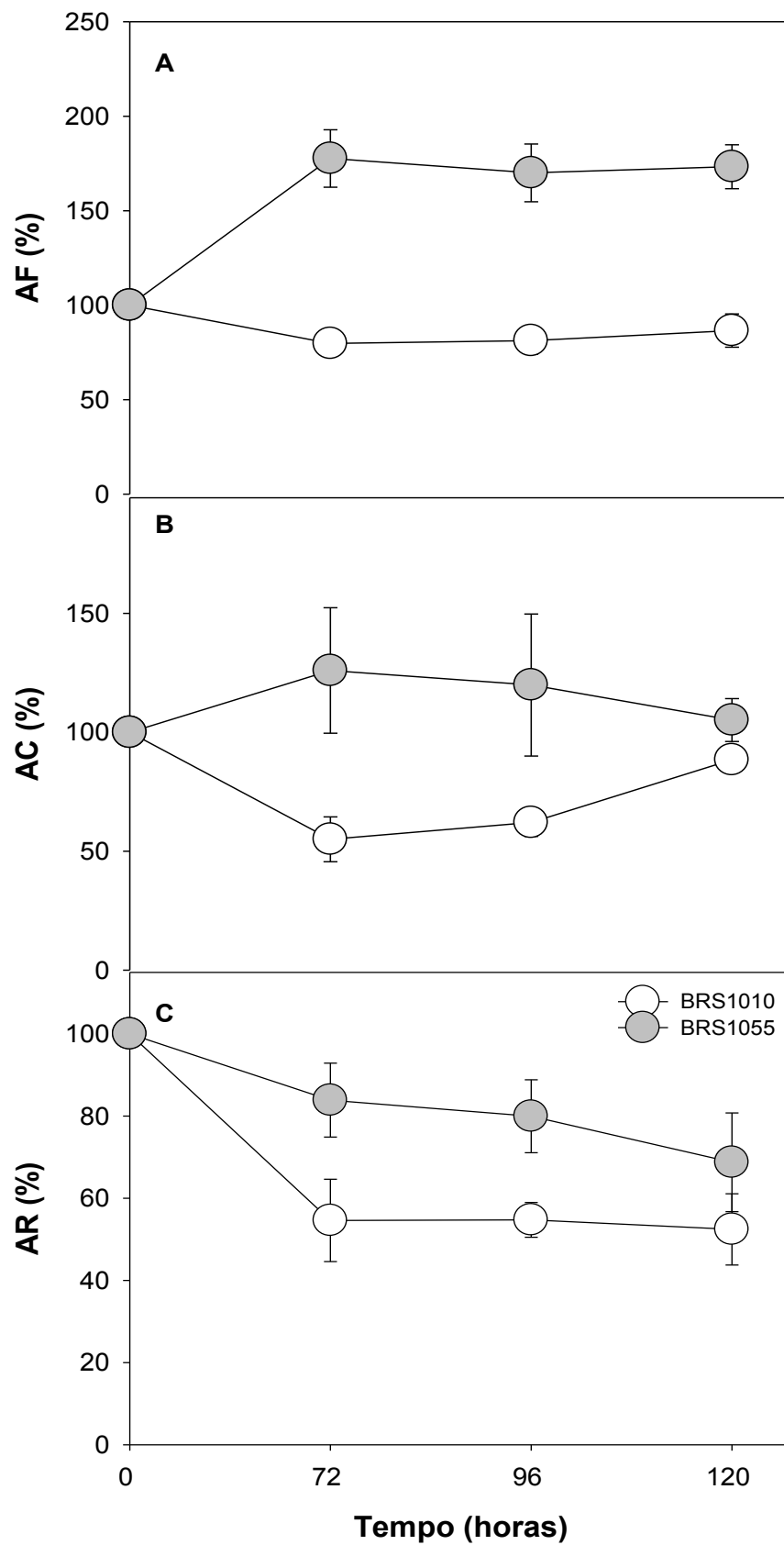


Figura 2. Alterações no crescimento dos genótipos de milho BRS1010 e BRS1055 durante condições de estresse por Al. Taxa de alongamento relativo (A) foliar (AF), (B) caulinar (AC) e (C) radicular (AR), $n = 4 \pm EP$.

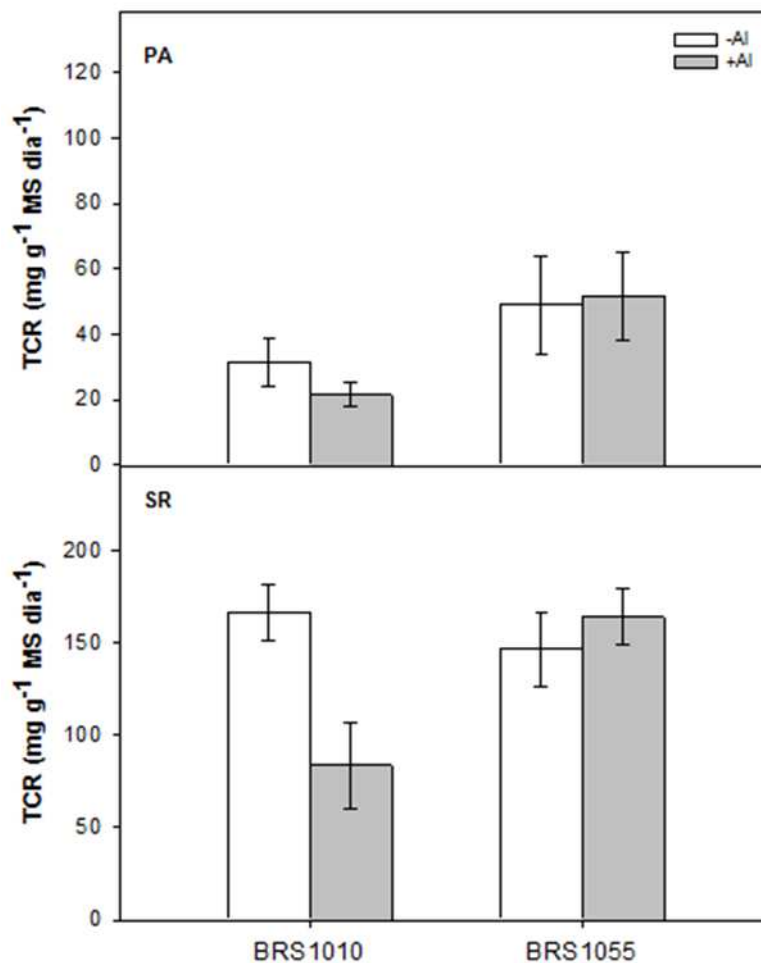


Figura 3. Acúmulo de biomassa pelos genótipos de milho BRS1010 e BRS1055 após 5 dias de exposição ao Al. Taxa de crescimento relativo (TCR) da parte aérea (PA) e de raiz (SR), $n = 4 \pm EP$.

Afim de obter informações acerca dos distúrbios nutricionais desencadeados pelo Al na região próxima a coifa e na ZDT, elementos com maiores teores relativos foram mensurados pela MEV-EDS (Fig. 8). Dessa forma, o teor relativo de Al na ZDT foi intensificado em ambos os genótipos durante a TA. Por outro lado, apenas BRS1010 demonstrou aumento desse elemento na região da coifa. Na ZDT o teor relativo de P foi superior em plantas expostas a TA que em plantas controle de ambos os genótipos. Houveram aumentos nos níveis de S na ZDT associados a exposição ao Al, sendo que, BRS1010 apresentou maior teor de S que BRS1055 na ZDT. Já na região próxima a coifa, ambos os genótipos apresentaram menores níveis deste elemento que seus respectivos controles. O K apresentou o maior teor relativo, apresentando cerca de 60% do total dos elementos avaliados. O teor de Al na coifa em BRS1010 apresentou correlação negativa com o AR ($R = -0,962$), enquanto para BRS1055 essa correlação foi oposta ($R = 0,859$) (Fig. 9), indicando que a proteção desta porção radicular contra os efeitos do Al é suspostamente acompanhada por estímulos que desencadeiam o incremento do AR em BRS1055.

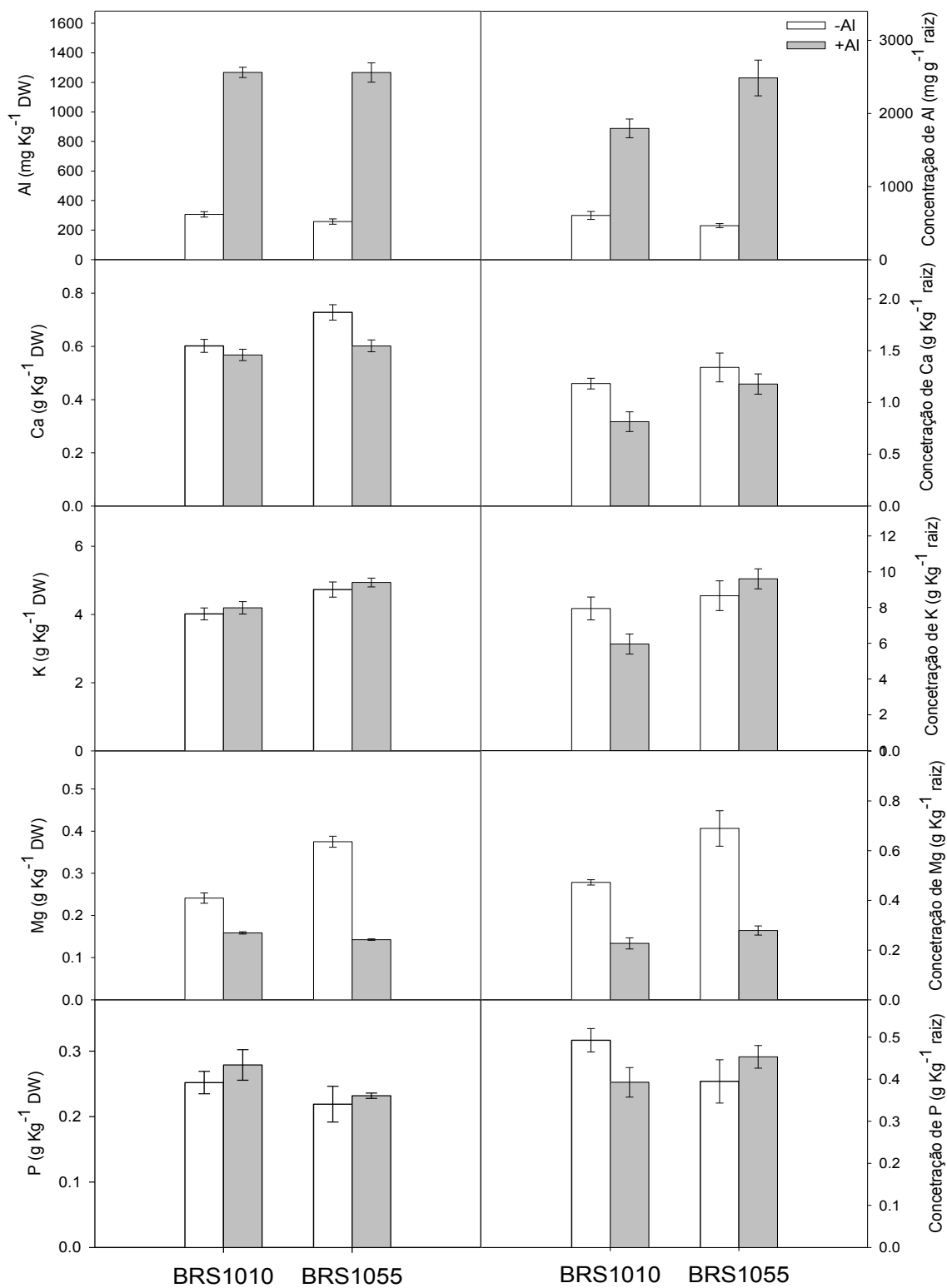


Figura 4. Distúrbios nutricionais desencadeados pelo tratamento com 0 (-Al) e 100 (+Al) μM de Al por 120 horas em raízes de BRS1010 e BRS1055. Teores e concentrações de alumínio (Al), cálcio (Ca), potássio (K), magnésio (Mg) e fósforo (P), $n = 4 \pm \text{EP}$.

As trocas gasosas sugeriram as diferentes estratégias de resposta dos genótipos diante dos efeitos do Al (Fig. 10). Para BRS1055, a TA promoveu incrementos de 10% na A (Fig. 10A), enquanto BRS1010 teve a g_s e o C_i ampliados em 12% e 11%, respectivamente (Fig. 10B e C). A taxa de E foi superior em ambos os genótipos diante da TA na comparação com plantas controle (Fig. 10D). A A/g_s foi aumentada em 8% em BRS1055 e reduzida em 10% em BRS1010 expostas ao estresse por Al. Comparando-se BRS1010 e BRS1055 acondicionadas à TA, o último genótipo apresentou superioridade de 12% na A/g_s (Fig. 10E), evidenciando que a superioridade na A/g_s influencia as respostas de tolerância ao Al, a exemplo do DH.

BRS1010 sob os efeitos do Al apresentou redução no q_L quando comparado ao seu respectivo controle, sendo que esse parâmetro também foi reduzido em relação a BRS1055 após exposição ao metal (Fig. 11B). Corroborando a influência da TA sobre o q_L de BRS1010, a F_v/F_m apresentou reduções, principalmente com 96 e 120 horas (Fig. 11D). Por apresentar reduções na eficiência máxima de captura de elétrons, BRS1010 também demonstrou aumento na F_v'/F_m' (Fig. 11C). A R_E de BRS1055 exposto a estresse por Al foi incrementada em 12% em relação ao controle, e 13% em comparação a BRS1010 sob o efeito deste elemento (Fig. 11E). BRS1055 sob a toxicidade do Al teve a R_L elevada em 17% em relação às plantas controle (Fig. 11F).

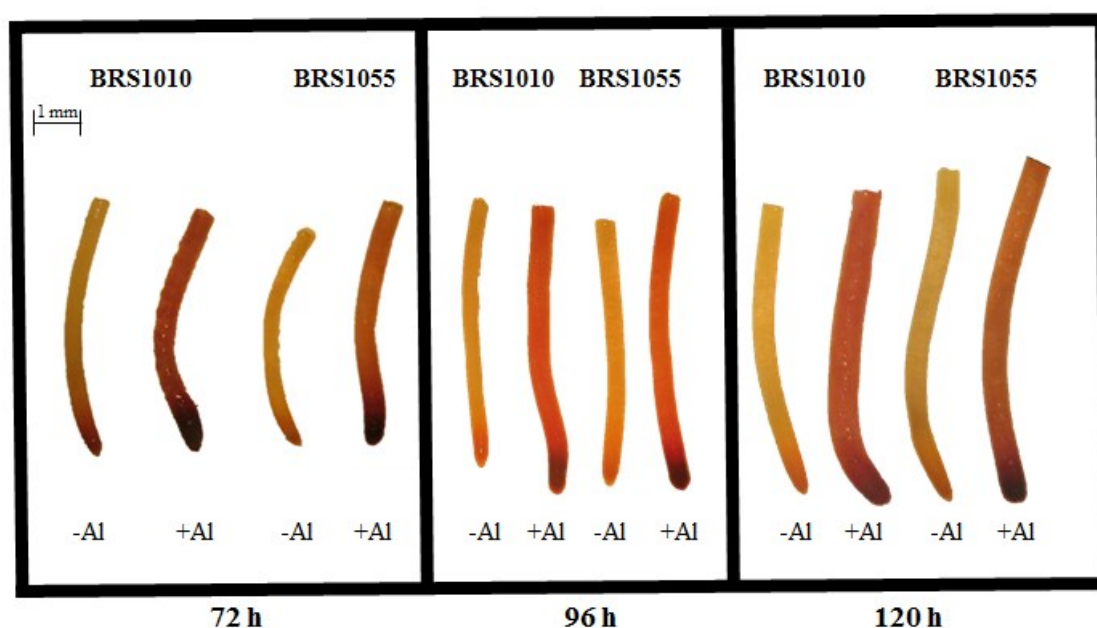


Figura 5. Detecção do Al pelo tratamento com hematoxilina. São demonstrados ápices radiculares de BRS1010 e BRS1055 submetidos a 0 (-Al) e 100 (+Al) μ M de Al por 72, 96 e 120 horas.

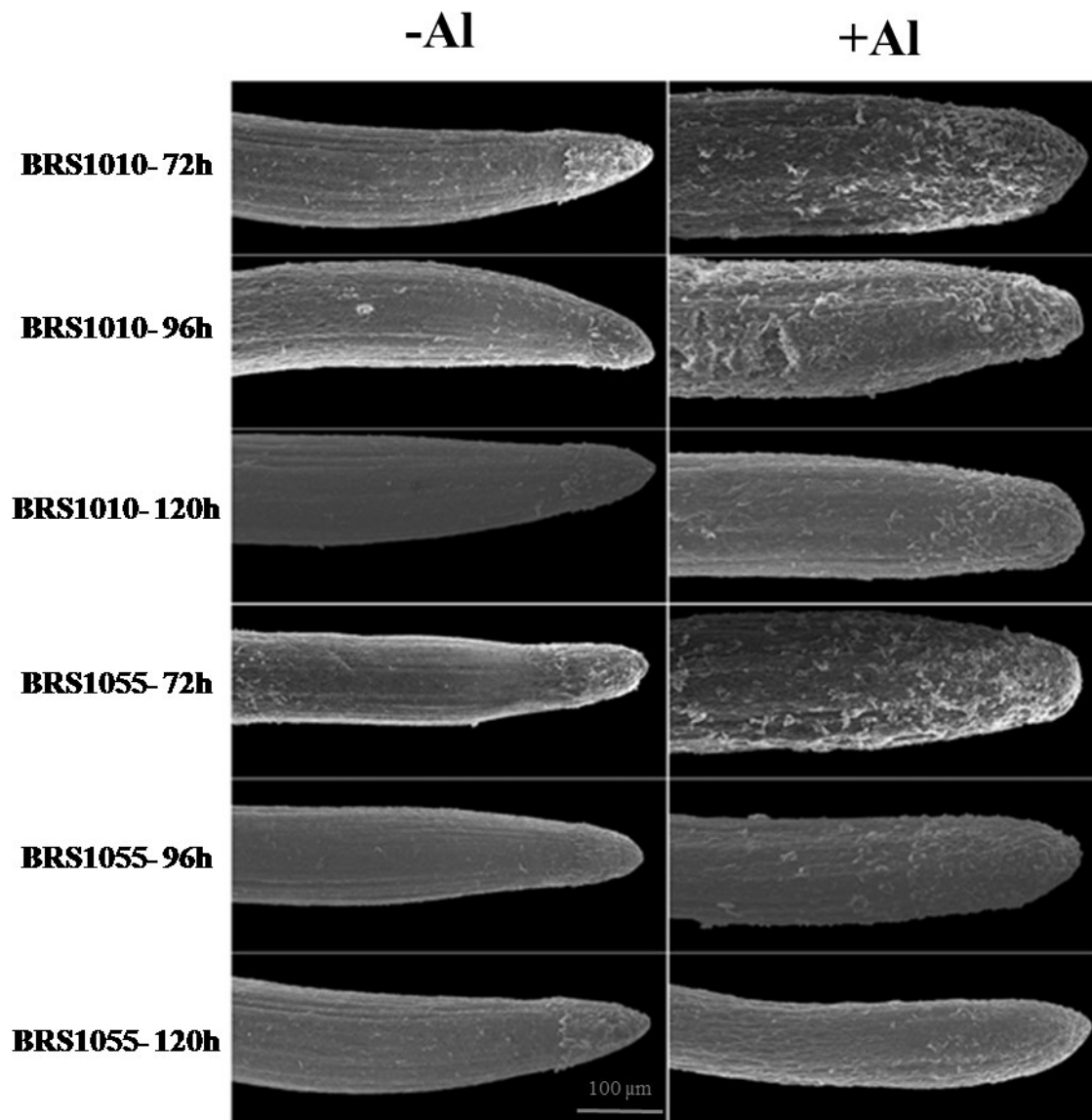


Figura 6. Modificações estruturais em ápices radiculares de BRS1010 e BRS1055 diante da exposição a 0 (-Al) e 100 (+Al) μM de Al por 72, 96 e 120 horas. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) demonstrando ápices radiculares com 0.5 cm e no caso de raízes +Al a região da coifa é focalizada.

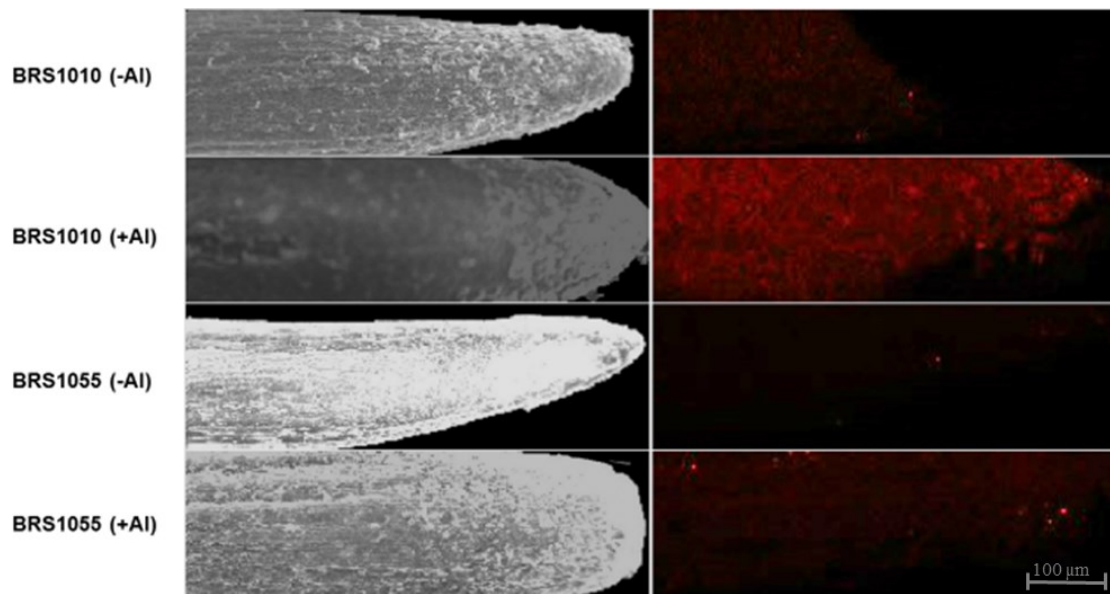


Figura 7. Distribuição do Al em ápices radiculares de BRS1010 e BRS1055 submetidos a 0 (-Al) e 100 (+Al) μ M de Al por 120 horas via microscopia eletrônica de varredura acoplada a sonda de raios-x (MEV-EDS).

O conteúdo total de clorofila em BRS1055 foi reduzido em 20% mediante a exposição ao Al (Fig. 12), enquanto a relação clorofila *a/b* permaneceu inalterada.

Danos oxidativos em folhas são recorrentes em condições de estresse por Al. Contudo, a peroxidação de lipídios em folhas não demonstrou ser afetada pela TA. Inversamente, em raízes BRS1010 demonstrou aumento de 1,5 vezes nos níveis de lipídios peroxidados (tabela 1). A atividade da enzima SOD foi elevada em 7,28% em folhas de BRS1010 como efeito da exposição Al (tabela 1). Entre as enzimas removedoras de H_2O_2 , a CAT apresentou atividade cerca de 300 vezes maior que a da APX. Na presença de Al, BRS1010 apresentou atividade da CAT 1,7 vezes maior que BRS1055. Entretanto, a atividade da APX em BRS1010 diante da TA foi reduzida 58% em relação ao controle (tabela 1).

Alterações no metabolismo central do carbono em folhas evidenciaram os principais impactos do Al sobre as plantas. Em geral, BRS1010 submetido à TA apresentou intenso acúmulo de metabólitos com 120 h de estresse, ocorrendo aumento em 2.5 vezes para glicose, 56% para sacarose e em 2.4 vezes para o conteúdo de amido (Fig. 13A, C e D). Na comparação com BRS1055 diante do efeito do Al, BRS1010 apresentou elevação de 2.3 para glicose, 43% para sacarose e de 1.8 vezes para o teor de amido foliar (Fig. 13A, C e D). O acúmulo metabólico em BRS1010 ocorreu também a nível de aminoácidos e proteínas. Aminoácidos e proteínas foram acumulados nesse genótipo em 1.6 e 1.72 vezes mais que em plantas controle, respectivamente (Fig. 13E e F). Na comparação entre os genótipos em condições de injúria pelo Al, BRS1010 teve 1.5 vezes mais aminoácidos que BRS1055, a mesma intensidade de aumento foi encontrada para proteínas (Fig. 13E e F).

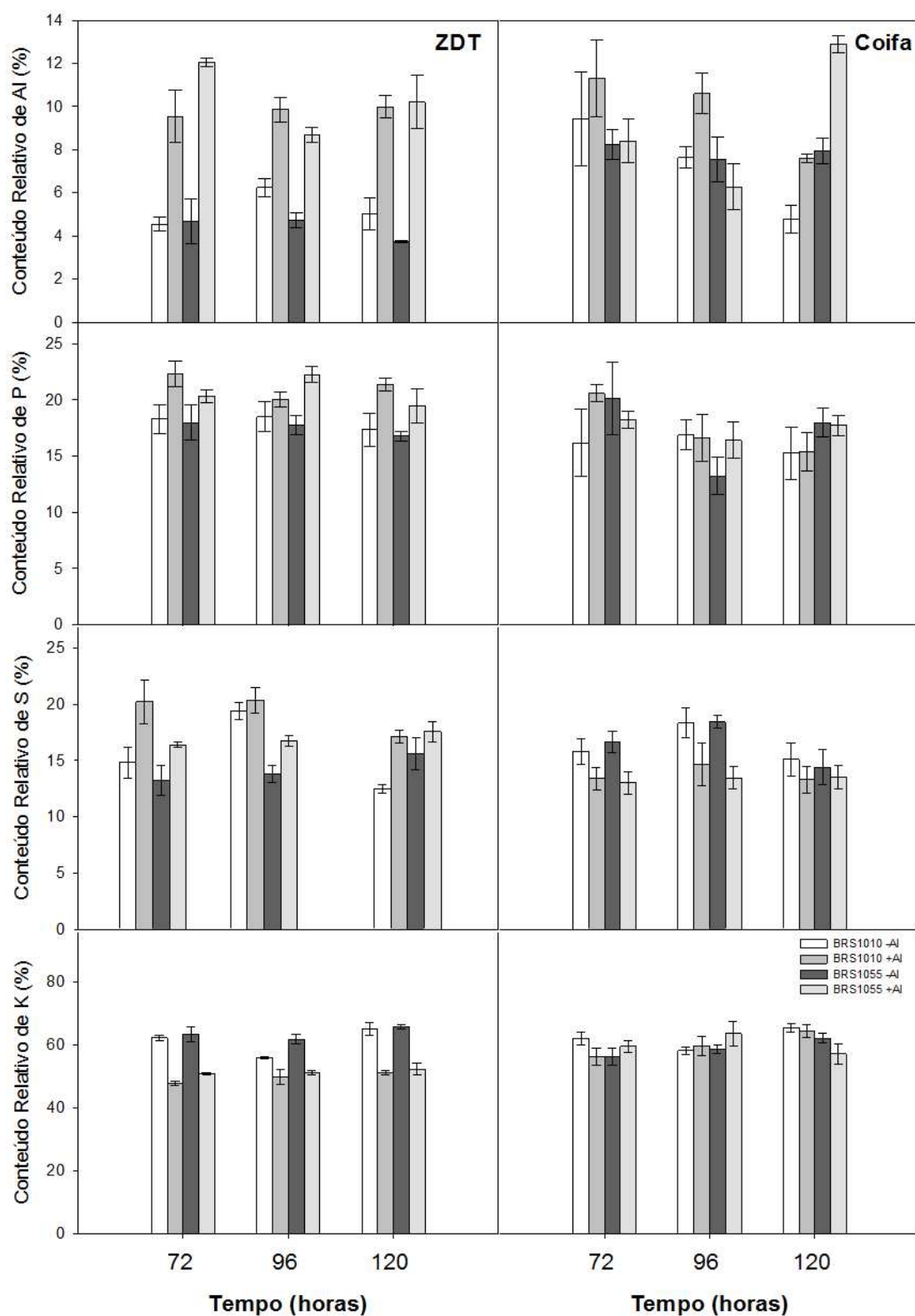


Figura 8. Alterações nutricionais em diferentes porções de ápices radiculares por MEV-EDS. Teores relativos (%) de alumínio (Al), fósforo (P), enxofre (S) e potássio (K) na zona distal de transição (ZDT) e na coifa de ápices radiculares dos genótipos de milho BRS1010 e BRS1055 após o tratamento com 0 (-Al) e 100 (+Al) μM de Al diante de diferentes períodos de tempo, $n = 3 \pm \text{EP}$.

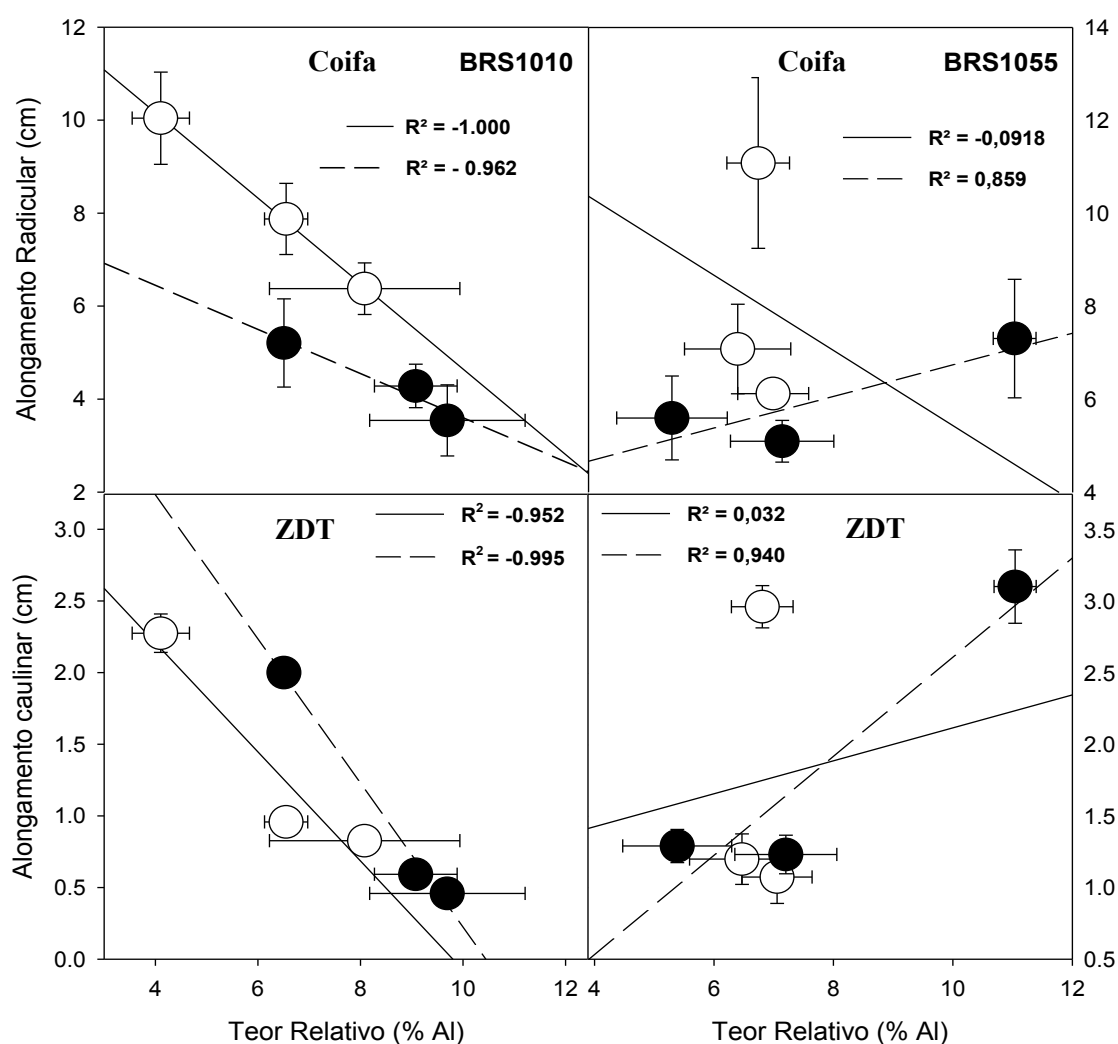


Figura 9. Correlação de Pearson entre os teores relativos de alumínio (Al) e o alongamento (radicular e caulinar). Os teores de Al foram mensurados na coifa e zona distal de transição (ZDT) em ápices radiculares de BRS1010 e BRS1055 após o tratamento com 0 (brancos) e 100 (pretos) μM de Al diante de diferentes períodos de tempo.

O conteúdo de malato nas folhas de BRS1010 foi aumentado em 1,4 vezes pela exposição ao Al (Fig. 14A). Na comparação dos níveis de fumarato entre genótipos submetidos à TA, ocorreu superioridade 2,1 vezes de BRS1010 sobre BRS1055 (Fig. 14B).

De maneira geral, BRS1010 demonstrou grande acoplamento entre os processos biológicos diante da exposição ao Al. O AF foi correlacionado positivamente com o AC ($R = 0,90$), o que demonstrou conexão entre o crescimento da parte aérea desse genótipo (Fig. 15). O alongamento da parte aérea de BRS1010 durante o estresse por Al foi influenciado principalmente pelo C_i , sendo correlacionado negativamente com o AF ($R = -0,96$) e AC ($R = -0,91$). Analogamente, C_i foi o principal parâmetro a se correlacionar de forma negativa as demais variáveis, destacando-se A ($R = -0,94$), A/g_s ($R = -0,99$) e R_E ($R = -0,83$) (Fig. 15).

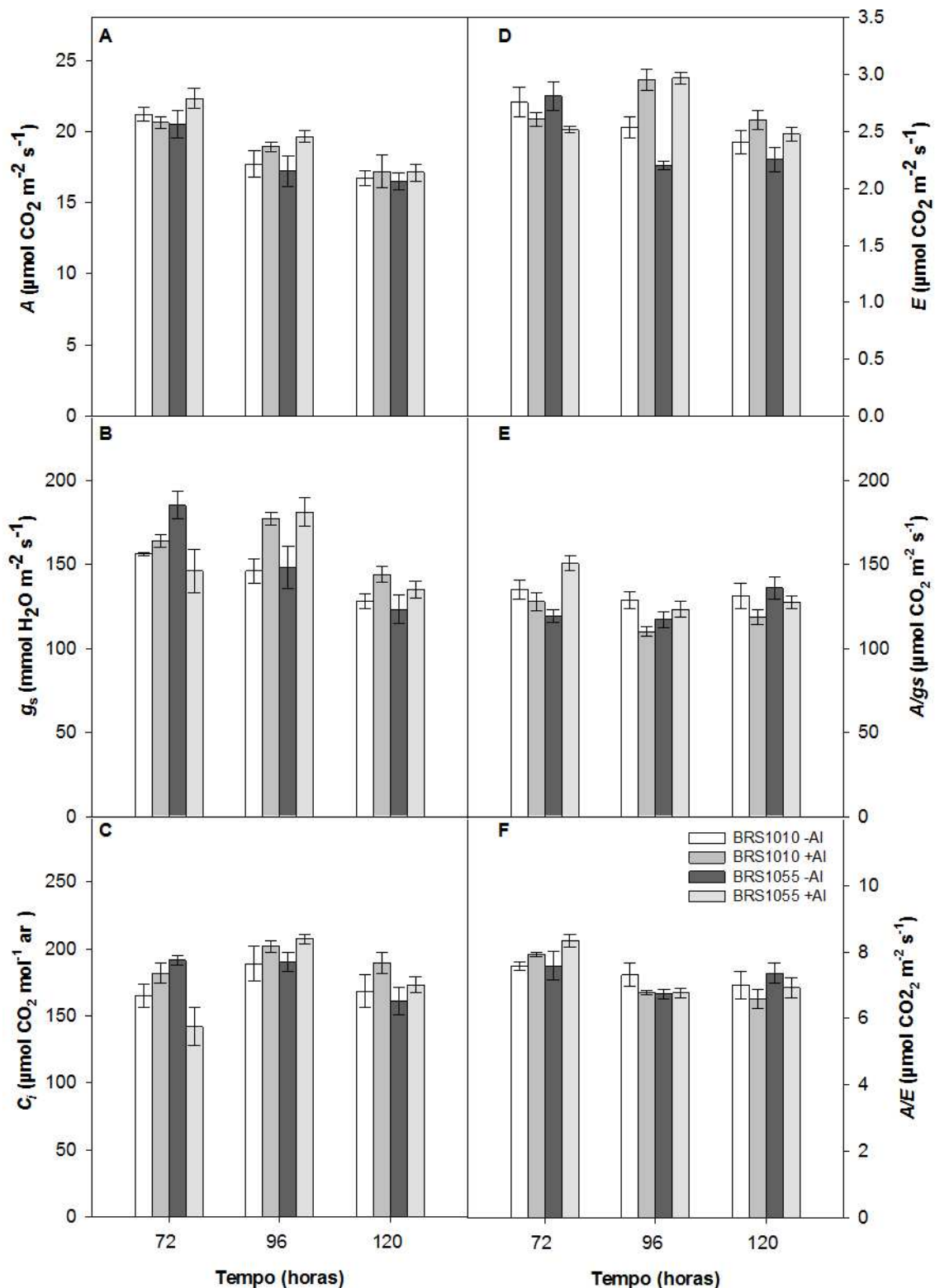


Figura 10. Trocas gasosas em folhas dos genótipos de milho BRS1010 e BRS1055 frente a exposição a 0 (-Al) e 100 (+Al) μM de Al por diferentes períodos de tempo. (A) Taxas de assimilação de CO_2 (A), (B) condutância estomática (g_s), (C) concentração intercelular de CO_2 (C_i), (D) transpiração (E), (E) eficiência intrínseca do uso da água e (F) eficiência extrínseca do uso da água, $n = 4 \pm \text{EP}$.

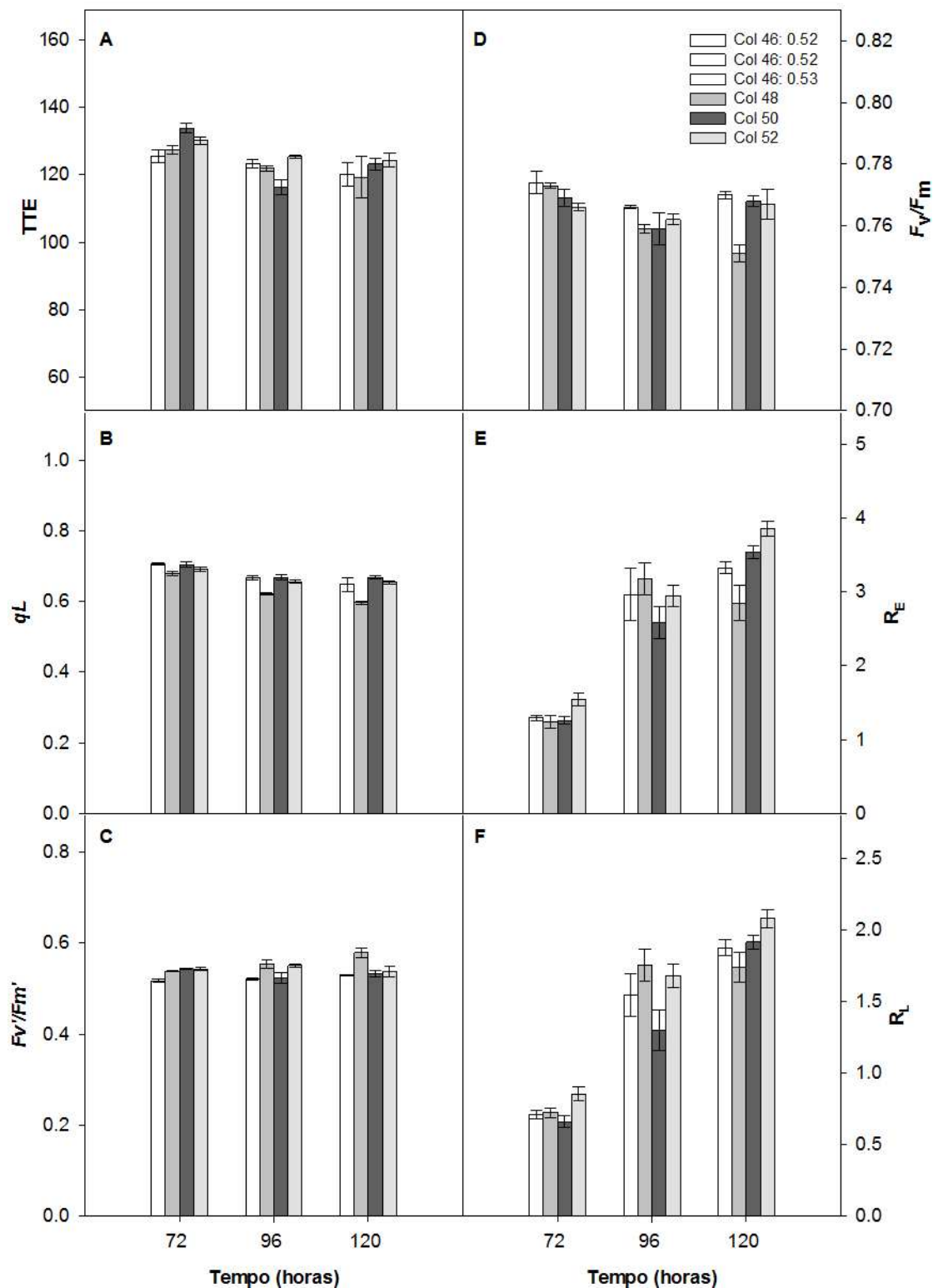


Figura 11. Efeito de 0 (-Al) e 100 (+Al) μM de Al sobre parâmetros fotoquímicos e respiratórios de BRS1010 e BRS1055. (A) taxa de transporte de elétrons (TTE), (B) coeficiente de extinção fotoquímico (qL), (C) eficiência na captura de energia pelo Fotossistema II (FSII) (F_v'/F_m'), (D) eficiência fotoquímica máxima do FSII, (E) taxa de respiração no escuro (R_E) e (F) taxa de respiração na luz (R_L), $n = 4 \pm \text{EP}$.

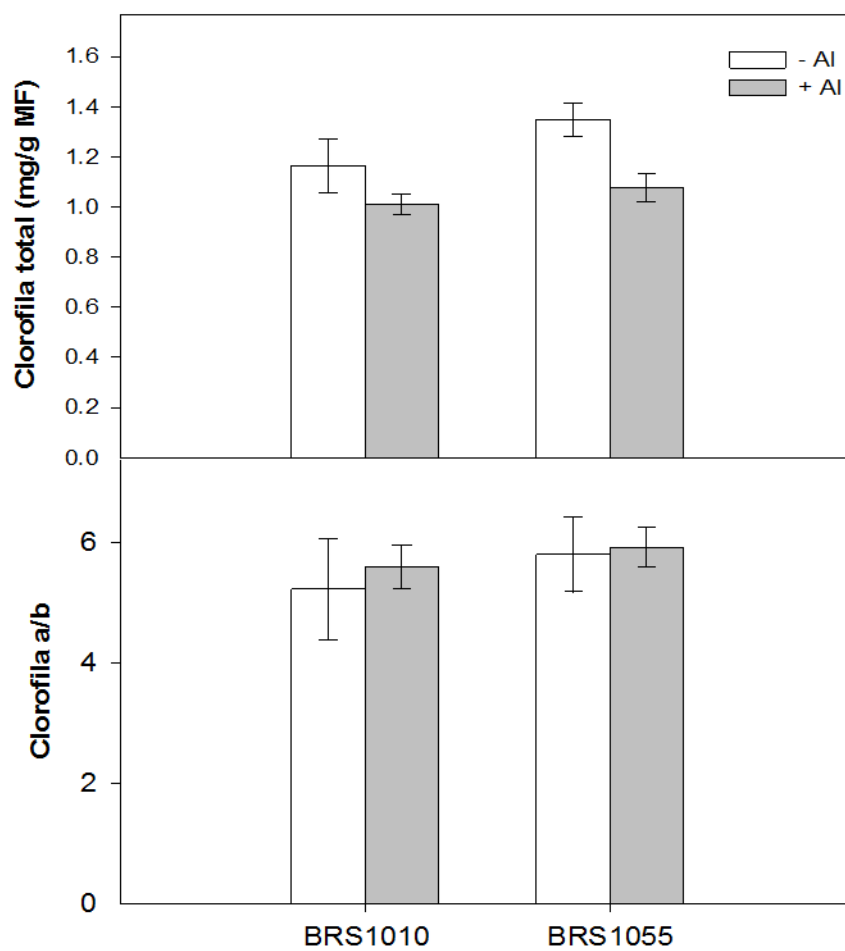


Figura 12. Variações no conteúdo das clorofilas. **(A)** Conteúdo total de clorofila e **(B)** Relação clorofila a/b em folhas dos genótipos de milho BRS1010 e BRS1055 posteriormente aos efeitos de 0 (-Al) e 100 (-Al) μM de Al durante 120 horas, $n = 4 \pm EP$.

Tabela 1. Tabela 1. Peroxidação de lipídios e atividades das enzimas antioxidativas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) em genótipos de milho BRS1010 e BRS1055 subsequentemente a exposição a 0 (-Al) e 100 (+Al) μM de Al por 120 horas, $n = 4 \pm \text{EP}$.

Componente	BRS1010		BRS1055	
	-Al	+Al	-Al	+Al
MDA _{raiz}	0.926 \pm 0.091	1.385 \pm 0.117	1.062 \pm 0.129	1.032 \pm 0.093
MDA _{folha}	9.747 \pm 1.421	12.444 \pm 2.522	8.138 \pm 0.556	9.685 \pm 1.143
SOD	45.31 \pm 0.725	48.87 \pm 0.548	47.13 \pm 0.408	48.72 \pm 0.729
CAT	13.85 \pm 1.527	19.11 \pm 3.244	11.70 \pm 2.275	11.25 \pm 0.583
APX	0.06 \pm 0,009.	0.025 \pm 0,004	0.037 \pm 0.005	0.039 \pm 0.006

Concentração de malonaldeído (MDA; nmol g^{-1} MF) em raízes e folhas. Atividade da SOD ($\text{U SOD min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ Proteína), CAT ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ Proteína) e da APX ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ Proteína) em folhas.

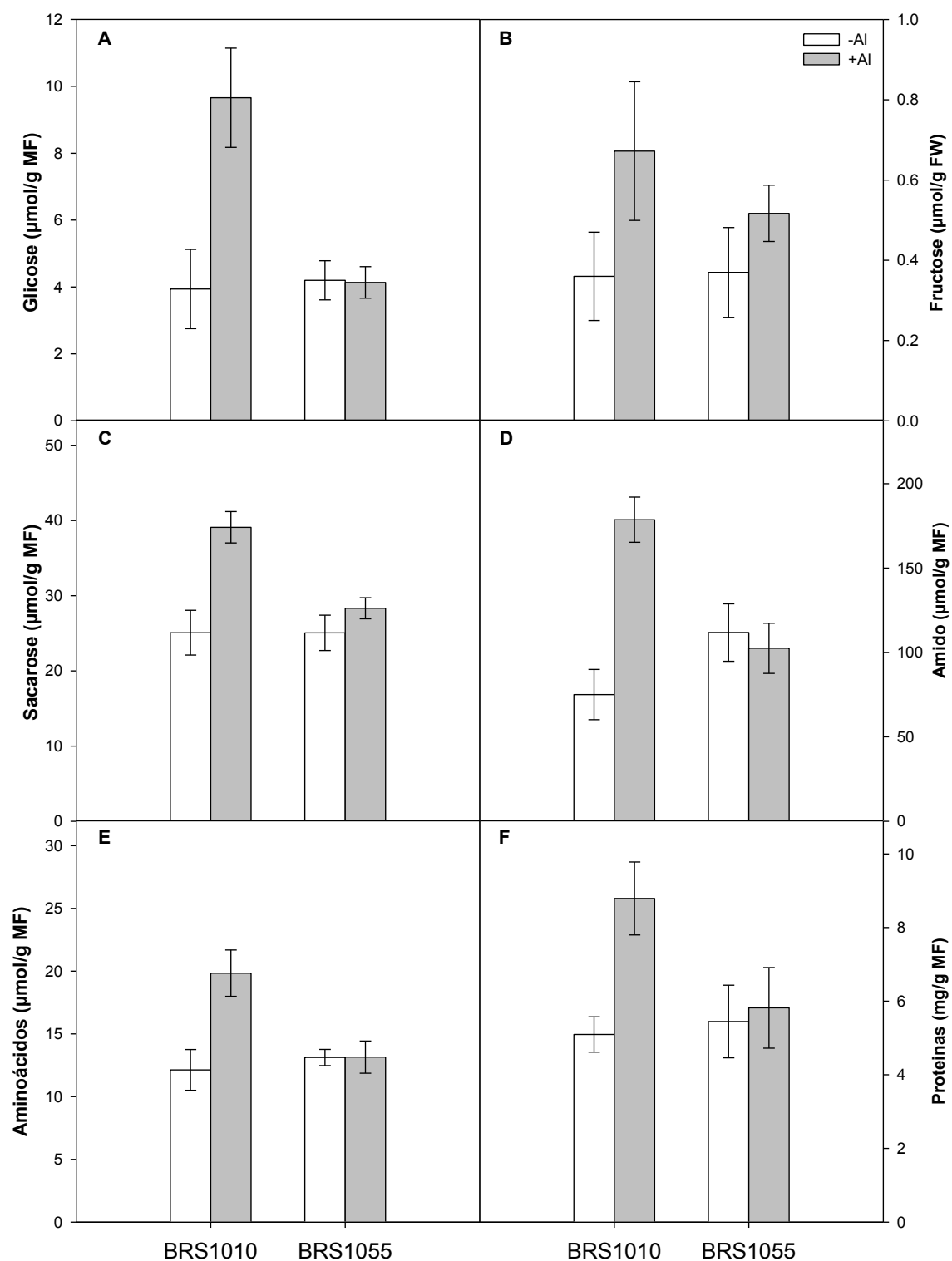


Figura 13. Níveis de metabólitos em folhas dos genótipos BRS1010 e BRS1055 expostos 0 (-Al) e 100 (+Al) µM de Al por 120 horas. (A) Glicose, (B) Frutose, (C) Sacarose, (D) Amido, (E) aminoácidos e (F) Proteínas totais, $n = 4 \pm EP$.

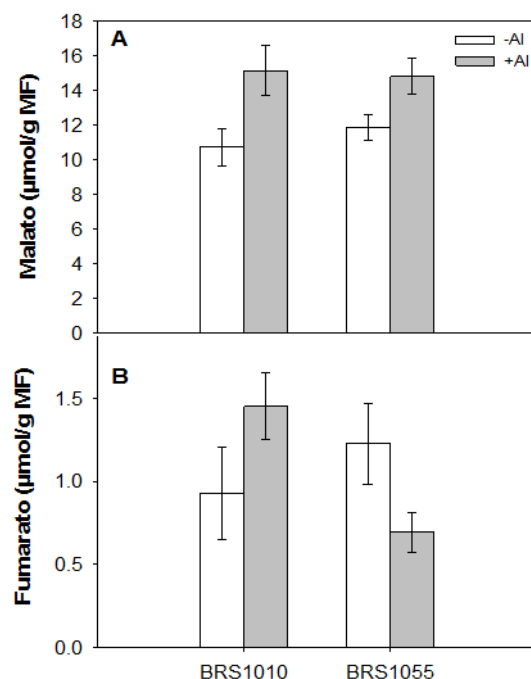


Figura 14. Teores dos ácidos orgânicos malato (A) e fumarato (B) em folhas dos genótipos de milho BRS1010 e BRS1055 subsequentemente a exposição a 0 (-Al) e 100 (+Al) μM de Al por 120 horas, $n = 4 \pm \text{EP}$.

Indicadores fisiológicos avaliados em BRS1055 durante a exposição a 100 μM de Al demonstram menos interações que BRS1010. Parâmetros relacionados ao alongamento foram pouco correlacionados a outros parâmetros (Fig. 16). As trocas gasosas em BRS1055 demonstraram independência entre os fatores, haja vista as baixas correlações entre os parâmetros. Deste modo, destacam-se as correlações entre $A \times R_E$ ($R = 0,96$) e do conteúdo de amido com A/g_s ($R = -0,99$) e a C_i ($R = 0,99$) (Fig. 16). Ao que tudo indica, o estresse por Al promoveu o ajustamento metabólico em BRS1055, de modo que as variações em seus metabólitos resultaram em interações que proveram o maior desempenho desse genótipo diante das injúrias associadas a TA. Interações positivas entre metabólitos e os demais parâmetros foram eminentes, pois os níveis dos metabólitos em folhas foram pouco alterados, aparentemente o ajustamento metabólico promoveu o aumento da performance de BRS1055 quando da exposição a TA.

4. DISCUSSÃO

O Al tem sido descrito como causador de perda na performance das espécies cultivadas por gerar seca e deficiência de minerais nessas plantas. Assim sendo, a tolerância ao Al refere-se à habilidade das plantas em manter o crescimento e a performance em solos com níveis tóxicos desse elemento (Kochian et al., 2015). Neste estudo, foi demonstrado que o aprimoramento das respostas ao estresse por Al que culminaram na tolerância em BRS1055 referem-se ao intenso crescimento das folhas e do caule, semelhantemente ao encontrado para as respostas a deficiência hídrica no solo (Lavinsky et al., 2015). Essas respostas resultaram na manutenção de altos índices de AR e manutenção do ganho de biomassa por raízes. Uma vez que, recentemente foi demonstrado o papel central das folhas nas respostas de *Z. mays* ao Al (Wang et al., 2015), BRS1055 demonstra empregar, principalmente as folhas para responder a TA.

Em plantas, o Mg é constituinte essencial da clorofila e juntamente com o Ca, esses atuam competindo com o Al por sítios de ligação na membrana celular (Grauer, 1993; Kinraide, 1998; Bose et al., 2011). A concentração de Ca e Mg foi reduzida em raízes de BRS1010 por intermédio da TA, enquanto apenas o Mg foi reduzido em BRS1055, sendo que este último apresentou maior concentração de Ca que BRS1010. Esses resultados indicam possíveis alterações na estrutura e função de membranas celulares que ocorrem principalmente em BRS1010, já que, os dois elementos demonstraram menores concentrações na massa total radicular. Maiores concentrações de Al em raízes podem indicar o investimento em mecanismos internos de desintoxicação (Sun et al., 2014), o que foi observado para o genótipo BRS1055. O Al foi demonstrado como responsável pela redução da absorção de K para equilibrar a carga criada pela exsudação de ácidos orgânicos (Ma et al., 2001, Matsumoto e Osawa, 2002). Assim, a redução da concentração desse elemento nas raízes de BRS1010 em comparação a BRS1055, indica o desbalanço de cargas, o que pode ter afetado a exsudação de AO.

A inibição do alongamento radicular pelo DH e TA ocorre principalmente pelos efeitos desses estresses sobre ápices radiculares (Sharp et al., 2004; Horst et al., 2010; Kopittke et al., 2015). No caso da TA, o Al acumula-se majoritariamente nos ápices radiculares (Delhaize e Horst, 1995; Yanamoto et al., 2001; Pereira et al., 2010). BRS1010 demonstrou baixa capacidade de proteção dessa porção radicular diante do estresse por Al, uma vez que a coloração por hematoxilina ocorreu principalmente na região próxima da coifa, logo nas primeiras 72 h de exposição ao metal, diferentemente de BRS1055. A rigidez das paredes celulares é aumentada em função da ligação do Al aos constituintes químicos dessa estrutura, o que gera redução do alongamento radicular (Blamey et al., 2004; Jones et al., 2006; Kopittke et al., 2008). Através do contato direto com o Al, células radiculares mais externas são alvos primários do efeito desse elemento (Delhaize e Horst, 1995; Ciamporova, 2002; Zheng e Yang.

2005). Por este fato, a região próxima da coifa de BRS1010 apresentou danos estruturais em camadas externas, assim como, maior engrossamento, como descrito por Souza et al., (2016). Enquanto BRS1055 permaneceu com as zonas mais próximas aos ápices radiculares praticamente intactas, sendo que, nessa região ocorrem células meristemáticas, relacionados ao crescimento.

A distribuição uniforme do Al ao longo dos ápices radiculares foi correlacionada ao engrossamento dessa região em BRS1010. A sensibilidade ao Al parece estar relacionada à proteção da coifa, pois esse elemento acumulou-se igualmente na ZDT dos genótipos, diferindo na coifa. Como a coifa recobre células meristemáticas que são associadas ao alongamento radicular, a proteção dessa zona contra os danos gerados pelo Al parece ser primordial a tolerância ao metal. Dessa forma, em BRS1055 o incremento do Al na região da coifa foi acompanhado por estímulos para o alongamento, ou seja, esse genótipo apresenta sinais proeminentes para a percepção do metal que resultam na indução do alongamento, o que não é demonstrado por BRS1010.

Genótipos de milho sensíveis ao Al frequentemente apresentam redução da assimilação de CO₂ quando este elemento está em contato com raízes (Lidon et al., 1997; Peixoto et al., 2002; Yang et al., 2015). Nesse sentido, BRS1055 apresentou incrementos nas taxas de A e A/g_s indicando não ocorrência de inibição da A frente à TA nesse genótipo. Como BRS1055 apresenta tolerância ao DH, a superioridade na A/g_s demonstra ser um diferencial fisiológico diante do estresse por Al. BRS1010 apresentou aumento na g_s e no C_i que são indícios da redução na A/g_s que foi corroborada nesse genótipo.

A exposição ao Al por 3 semanas promoveu a redução do TRA em genótipos de centeio sensíveis ao Al, mediante o aumento da E (Silva et al., 2012). Apesar da não detecção de diferenças no TRA (dados não mostrados), a E foi aumentada em ambos os genótipos. Pressupondo um maior período de exposição ao Al diante das condições experimentais desse estudo, aparentemente BRS1010 apresentaria reduções no TRA por sua baixa A/g_s . Não foram observadas diferenças para a A/E , apesar da redução desse parâmetro em ambos genótipos frente às 120 h de estresse. Subentende-se que o prolongamento da exposição ao Al resultaria na redução dessa variável. Desta forma, no presente estudo a A/g_s pode explicar de forma mais consistente a superioridade na eficiência fisiológica de BRS1055 que resultou em maior desempenho. Esse parâmetro reflete variações fisiológicas instantâneas, e o período de exposição ao Al deste estudo foi relativamente curto. A eficiência no uso da água foi aumentada em BRS1055 e diminuída em BRS1010 mediante a exposição ao Al, indicando tolerância e a sensibilidade frente à TA, como previamente demonstrado (Simon et al., 1994; Yang et al., 2015). A redução na A/g_s em BRS1010 pode ser associada ao aumento na g_s e no C_i , indicando a não ocorrência de limitações estomáticas, mas a redução da habilidade de assimilação do CO₂ (Lidon et al., 1997; Pereira et al., 2000).

BRS1010 submetida aos efeitos do Al demonstrou redução de seu potencial fotoquímico (q_L) diante da TA, por conseguinte da redução da F_v/F_m , como previamente demonstrado (Moustakas et al., 1996; Chen et al., 2005). Esses resultados sugerem a remoção de polipeptídios associados ao FSII (Hasni et al., 2015), já que, os teores de clorofilas desse genótipo não foram alterados. Todavia, esses fatores são explicados pelo aumento da F_m em decorrência da formação de centros de reação inativos no FSII (Jiang et al., 2008). Pela não alteração nos níveis lipídios peroxidados em folhas, infere-se que a integridade de membranas foi pouco afetada nesse órgão. Contudo, a maior atividade das enzimas SOD e CAT em folhas de BRS1010 quando exposto ao Al indicam danos oxidativos em outras moléculas, principalmente em cloroplastos, uma vez que esses são os principais sítios para a geração de ERO (Tuteja et al., 2010). Pyl et al., (2012) demonstraram que o aumento global nos níveis de proteínas resultou na melhoria da A , em condições de inibição desta. Assim, o maior conteúdo de proteínas diante dos efeitos do Al em BRS1010 pode ter sido responsável pelas baixas reduções em parâmetros fotossintéticos. Dessa forma, o acúmulo de aminoácidos e proteínas em BRS1010, pode ser relacionado ao “turnover” de proteínas que compõe o aparato fotossintético.

Com a desregulação da assimilação de CO_2 em BRS1010 sob efeitos do Al, metabólitos associados ao metabolismo central do carbono demonstraram intenso acúmulo. Assim, apesar do aumento nos níveis de carboidratos em folhas de BRS1010, esse genótipo demonstrou-se sensível ao Al, contrariando o que foi previamente reportado para *Z. mays* (Giannakoula, et al., 2008; Giannakoula et al., 2010). O acúmulo de glicose e sacarose em folhas, juntamente com o engrossamento dos ápices radiculares em BRS1010, sugere que esses açúcares seriam destinados a síntese de compostos de defesa contra o Al em raízes, pois esse mecanismo é comum em genótipos sensíveis ao Al (Bhuja et al., 2004; Tahara et al., 2005; Smith et al., 2011; Zhang et al., 2015). Diante dos danos oxidativos nas folhas, esses metabólitos supostamente não foram translocados para as raízes visando a manutenção do metabolismo celular foliar (Araújo et al., 2014), gerando estímulos negativos para a atividade da Rubisco, o que resultou no acúmulo de C_i (Silva et al., 2012).

A TA propiciou incrementos na R_E em BRS1055, enquanto os teores de fumarato foram reduzidos, a partir da atividade da fumarase ocorre a conversão desse a malato (Nunes-Nesi et al., 2013). A redução dos níveis de fumarato em BRS1055 sem acúmulo de malato sugerem o funcionamento alternativo do TCA (Rocha et al., 2010; Sweetlove et al., 2010) para o favorecimento da adaptação a TA, como previamente demonstrado para a bactéria *Pseudomonas fluorescens* (Singh et al., 2009; Lemire et al., 2010). Genes que codificam enzimas do TCA superexpressos sob controle de promotores induzidos pela luz não desencadearam impactos sobre a A por otimizarem o uso de esqueletos de carbono, promovendo o mais preciso direcionamento dos teores de glicose (Wang et al., 2010; Wang et al., 2012).

Essa abordagem supostamente pode incrementar a A e R_E , pois a exsudação de AO é aparentemente dependente das taxas de A (Yang et al. 2001). Analogamente, o controle dos níveis de metabólitos relacionados a fotossíntese e dos AO, pode ter promovido o ajustamento em BRS1055 que resultou na maior tolerância ao Al. Nunes-Nesi et al., (2007) verificaram que o baixo nível de transcritos da fumarase em linhagens de tomate (*Solanum lycopersicum*) (FLs) conduziu estas a menores taxas de A e R_E acompanhadas por maiores níveis de fumarato e malato em folhas. Esses autores reportaram reduções na massa seca de raízes e folhas de FLs, além disso, foi demonstrado o aumento do comprimento de células radiculares nessas linhagens (van der Merwe et al., 2009). Os maiores teores de malato e fumarato em folhas de BRS1010 aparentemente demonstram reduções na atividade da fumarase, somado a esse fato, o Al pode ter tornado esta enzima inefetiva (Lemire et al., 2010). Assim, reduções na performance de BRS1010 são em parte explicadas por possíveis reduções na atividade da fumarase, e o aumento no comprimento de células radiculares pode ter potencializado a ligação do Al em paredes celulares, o que gerou maiores danos às raízes desse genótipo.

O estresse por Al acomete múltiplos mecanismos fisiológicos em plantas desencadeando diversas interações entre as respostas a este elemento. Interações demonstraram que o AF é intimamente relacionado ao AC em BRS1010 ($R = 0,90$). Sendo assim, tem-se baixa performance da parte aérea nesse genótipo durante a exposição ao Al, já que o AF permaneceu estável nesse genótipo. Reduções no *fitness* da parte aérea aparentemente são a principais desvantagens de BRS1010 na comparação com BRS1055. BRS1010 apresenta menor taxa de carboxilação máxima pela Rubisco que BRS1055 (Lavinsky et al., 2015b). Assim, o C_i foi a principal variável correlacionada negativamente ao crescimento da parte aérea e a parâmetros fotossintéticos e respiratórios deste genótipo. Esses resultados aparentemente estão relacionados à limitada taxa de carboxilação da Rubisco em BRS1010, o que pode ter sido potencializada pelo acúmulo de metabólitos em suas folhas.

A coordenação entre produtos da fotossíntese e intermediários do TCA pode promover a otimização no uso de esqueletos de carbono (Wang et al., 2010). Dessa forma, BRS1055 diante da TA apresentou correlações positivas entre as taxas fotossintéticas e respiratórias, sugerindo que ambas possam ter atuado de forma coordenada para a otimização no uso dos esqueletos de carbono. Corroborando essa sugestão, o conteúdo de amido de BRS1055 foi intimamente associado a indicadores da disponibilidade de CO_2 (A/g_s e C_i) em folhas. Contrariamente a BRS1010, BRS1055 submetido a 100 μM de Al não demonstrou alterações de caráter quantitativo na comparação com plantas controle. Nesse sentido, o ajustamento metabólico juntamente com a coordenação entre fotossíntese e respiração podem ter atuado de modo a aumentar a performance de BRS1055 na presença de Al. No tocante ao ajustamento metabólico, semelhantemente ao que foi reportado previamente para adaptações ao ambiente (Rocha et al, 2010; Sweetlove et al., 2010) e a TA em *P. fluorescens* (Singh et al., 2009; Lemire

et al., 2010), os resultados obtidos sugerem que o funcionamento não-cíclico do TCA pode atuar em milho para o aprimoramento das respostas ao Al. Estudos futuros devem ser conduzidos para o entendimento de como o ajustamento metabólico em folhas durante o estresse por Al promove o aumento de performance em plantas.

5. BIBLIOGRAFIA

- Ali, B., Qian, P., Sun, R., Farooq, M.A., Gill, R.A., Wang, J., Azam, M., Zhou, W. Hydrogen sulfide alleviates the aluminum-induced changes in *Brassica napus* as revealed by physiochemical and ultrastructural study of plant. **Environmental Science and Pollution Research International**, 22:3068–81, 2015.
- Araújo, W.L., Nunes-Nesi, A., Fernie, A.R. On the role of plant mitochondrial metabolism and its impact on photosynthesis in both optimal and sub-optimal growth conditions. **Photosynthesis Research**, 119:141–156, 2014.
- Bänziger M, Araus J. Recent advances in breeding maize for drought and salinity stress tolerance. In MA. Jenks, PM. Hasegawa, SM Jain, eds, Adv. Mol. Breed. Towar. Drought Salt Toler. **Crop. Springer Netherlands**, Dordrecht, pp 587-601, 2007.
- Blamey, F.P.C., Nishizawa, N.K., Yoshimura, E. Timing, magnitude, and location of initial soluble aluminum injuries to mung bean roots. **Soil Science and Plant Nutrition**, 50:67-76, 2004.
- Boscolo, P.R.S., Menossi, M., Jorge, R.A. Aluminum-induced oxidative stress in maize. **Phytochemistry**, 62:181–189, 2003.
- Bose, J., Babourina, O., Rengel, Z. Role of magnesium in alleviation of aluminium toxicity in plants. **Journal of Experimental Botany**, 62:2251–2264, 2011.
- Chen, L-S., Qi, Y-P., Liu, X-H. Effects of Aluminum on Light Energy Utilization and Photoprotective Systems in Citrus Leaves. **Annals of Botany**, 96: 35–41, 2005.
- Cross, J.M., von Korff, M., Altmann, T., Bartzetko, L., Sulpice, R., Gibon, Y., Palacios, N., Stitt, M. Variation of Enzyme Activities and Metabolite Levels in 24 Arabidopsis Accessions Growing in Carbon-Limited Conditions. **Plant Physiology**, 142:1574–1588, 2006.
- Delhaize, E., Ryan, P.R. Aluminum Toxicity and Tolerance in Plants. **Plant Physiology**, 107:315–321, 1995.
- Eprintsev, A.T., Fedorin, D.N., Sazonova, O.V. Phytochrome Dependent Regulation of Fumarate Hydratase Activity in Maize Green Leaves. **Russian Journal of Plant Physiology**, 62:474–480, 2015.
- Hasni, I., Yaakoubi, H., Hamdani, S., Tajmir-Riahi, H-A., Carpentier, R. Mechanism of Interaction of Al³⁺ with the Proteins Composition of Photosystem II. **Plos One**, 10:1-23, 2015.
- Hildebrandt, T.M., Nunes-Nesi, A., Araújo, W. L., Braun, H. Amino Acid Catabolism in Plants. **Molecular Plant**, 8:1563–1579, 2015.
- Horst, W.J., Asher, C.J., Cakmak, I., Szulkiewicz, P., Wissemeier, A.H. Short-term responses of soybean roots to aluminium. **Journal of Plant Physiology**, 140:174–178, 1992.

- Horst, W.J., Wang, Y., Eticha, D. 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, 2010.
- Jiang, H-X., Chen, L-S., Zheng, J-G., Han, S., Tang, N., Smith, B.R. Aluminum-induced effects on Photosystem II photochemistry in *Citrus* leaves assessed by the chlorophyll a fluorescence transient. **Tree Physiology**, 28:1863–1871, 2008.
- Jones, D.L., Blancaflor, E.B., Kochian, L.V., Gilroy, S. Spatial coordination of aluminium uptake; production of reactive oxygen species; callose production and wall rigidification in maize roots. **Plant and Cell Environment**, 29:1309-1318, 2006.
- Kinraide, T. B. Three Mechanisms for the Calcium Alleviation of Mineral Toxicities. **Plant Physiology**, 118:513–520, 1998.
- Kochian, L.V., Hoekenga, O.A., Piñeros, M.A. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, 55:459-493, 2004.
- Kochian, L.V., Piñeros, M.A., Liu, J., Magalhaes, J.V. Plant Adaptation to Acid Soils: The Molecular Basis for Crop Aluminum Resistance. **Annual Review of Plant Biology**, 11:1–28, 2015.
- Kopittke, P.M., Blamey, F.P.C., Menzies, N.W. Toxicities of soluble Al, Cu, and La include ruptures to rhizodermal and root cortical cells of cowpea. **Plant and Soil**, 303:217-227, 2008.
- Kopittke, P.M., Moore, K.L., Lombi, E., Gianoncelli, A., Ferguson, B.J., Blamey, F.P. C., Menzies, N.W., Nicholson, T.M., McKenna, B.A., Wang, P., Gresshoff, P.M., Kourousias, G., Webb, R.L., Green, K., Tollenaere, A. Identification of the Primary Lesion of Toxic Aluminum in Plant Roots. **Plant Physiology**, 167:1402–1411, 2015.
- Lavinsky, A.O., Magalhães, P.C., Ávila, R., Gomes-Jr, C.C., Carneiro, N.P. Advances in Crop Science and Technology Analysis of Maize Photosynthesis Parameters and Whole Plant Oxidative Damage Under Long-term Drought. **Advances in Crop Science and Technology**, 1–6, 2015.
- Lavinsky, A.O., César, P., Geraldo, R., Melo, M., Corrêa, T., Souza, D. Partitioning between primary and secondary metabolism of carbon allocated to roots in four maize genotypes under water deficit and its effects on productivity. **The Crop Journal**, 3:379-386, 2015b.
- Lemire, J., Mailloux, R., Auger, C., Whalen, D., Appanna, V.D. *Pseudomonas fluorescens* orchestrates a fine metabolic-balancing act to counter aluminium toxicity. **Environmental Microbiology**, 12:1384–1390, 2010.
- Lidon, F.C., Ramalho, J.C., Barreiro, M.G. Aluminium modulation of the photosynthetic carbon reduction cycle in *Zea mays*. **Photosynthetica**, 34:393-400, 1997.
- Liu, Q., Yang, J.L., He, L. S., Li, Y.Y., & Zheng, S.J. Effect of aluminum on cell wall, plasma membrane, antioxidants and root elongation in triticale. **Biologia Plantarum**, 52:87–92, 2008.

- Ma, J.F., Ryan, P.R., Delhaize, E., Delhaize, E. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. **Trends in Plant Science**, 6:273–278, 2001.
- Ma, J.F., Shen, R., Nagao, S., Tanimoto, E. Aluminum targets elongating cells by reducing cell wall extensibility in wheat roots. **Plant and Cell Physiology**, 35:583-589, 2004.
- Moustakas, M., Ouzounidou, G., Eleftheriou, E.P., Lannoye, R. Indirect effects of aluminum stress on the function of the photosynthetic apparatus. **Plant Physiology Biochemistry**, 34:533–560, 1996.
- Navascués, J., Pérez-Rontomé, C., Sánchez, D.H., Staudinger, C., Wienkoop, S., Rellán-Álvarez, R., Becana, M. Oxidative stress is a consequence, not a cause, of aluminum toxicity in the forage legume *Lotus corniculatus*. **New Phytologist**, 193:625–636, 2012.
- Nunes-Nesi, A., Araújo, W.L., Obata, T., Fernie, A.R. Regulation of the mitochondrial tricarboxylic acid cycle. **Current Opinion in Plant Biology**, 16:335–343, 2013.
- Nunes-Nesi, A., Brito, D.S., Inostroza-Blancheteau, C., Fernie, A.R., Araújo, W.L. The complex role of mitochondrial metabolism in plant aluminum resistance. **Trends in Plant Science**, 19:399–407, 2014.
- Nunes-Nesi, A., Carrari, F., Gibon, Y., Sulpice, R., Lytovchenko, A., Fisahn, J., Graham, J., Ratcliffe, G., Sweetlove, L.J., Fernie, A. R. Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. **The Plant Journal**, 50:1093–1106, 2007.
- Osawa, H., Matsumoto, H. Aluminium triggers malate-independent potassium release via ion channels from the root apex in wheat. **Planta**, 215:405–412, 2002.
- Pereira, W.E., Siqueira, D.L. De, Martinez, C.A., Puiatti, M. Gas exchange and chlorophyll fluorescence in four citrus rootstocks under aluminium stress. **Journal of Plant Physiology**, 157:513-520, 2000.
- Peixoto, P.H.P., DaMatta, F.M., Cambraia, J. Responses of the photosynthetic apparatus to aluminum stress in two sorghum cultivars. **Journal of Plant Nutrition**, 25:821–832, 2002.
- Pyl, M. P., Piques, M., Ivakov, A., Schulze, W., Ishihara, H., Stitt, M., Sulpice, R. Metabolism and Growth in Arabidopsis Depend on the Daytime Temperature but Are Temperature-Compensated against Cool Nights Metabolism and Growth in Arabidopsis Depend on the Daytime Temperature but Are Temperature-Compensated against Cool Nights. **The Plant Cell**, 24:2443–2469, 2012.
- Ribeiro, C., Cambraia, J., Peixoto, P.H.P., Junior, E.M.F. Antioxidant System Response Induced by Aluminum in Two Rice Cultivars. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 24:107-116, 2012.
- Rocha, M., Licausi, F., Araújo, W.L., Nunes-Nesi, A., Sodek, L., Fernie, A.R., van Dongen, J.T. Glycolysis and the TCA-cycle are linked by Alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of *Lotus japonicus*. **Plant Physiology**, 152:1501–1513, 2010.
- Schmohl, N., Horst, W.J. Cell wall pectin content modulates aluminium sensitivity of *Zea mays* (L.) cells grown in suspension culture. **Plant, Cell and Environment**, 23:735–742, 2000.

- Serraj, R., Sinclair, T.R. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? **Plant, Cell and Environment**, 25:333–341, 2002.
- Sharp, R.E., Poroyko, V., Hejlek, L.G., Spollen, W.G., Springer, G.K., Bohnert, H.J., Nguyen, H.T. Root growth maintenance during water deficits : physiology to functional genomics. **Journal of Experimental Botany**, 55:2343–2351, 2004.
- Silva, S., Pinto, G., Dias, M.C., Correia, C.M., Moutinho-Pereira, J., Pinto-Carnide, O., Santos, C. Aluminium long-term stress differently affects photosynthesis in rye genotypes. **Plant Physiology and Biochemistry**, 54:105–112, 2012.
- Sivaguru, M., Horst, W.J. The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize. **Plant Physiology**, 116:155-163, 1998.
- Smith, E., Naik, D., Cumming, J. R. Genotypic variation in aluminum resistance , cellular aluminum fractions , callose and pectin formation and organic acid accumulation in roots of *Populus* hybrids. **Environmental and Experimental Botany**, 72:182–193, 2011.
- Sun, L., Liang, C., Chen, Z., Liu, P., Tian, J., Liu, G., Liao, H. Superior aluminium (Al) tolerance of *Stylosanthes* is achieved mainly by malate synthesis through an Al-enhanced malic enzyme , SgME1. **New Phytologist**, 202:209–219, 2014.
- Souza, L. T. De, Cambraia, J., Ribeiro, C. Effects of aluminum on the elongation and external morphology of root tips in two maize genotypes. **Bragantia**, 75:19–25, 2016.
- Sweetlove, L.J., Beard, K.F.M., Nunes-Nesi, A., Fernie, A.R., Ratcliffe, R.G. Not just a circle : flux modes in the plant TCA cycle. **Trends in Plant Science**, 15:462–470, 2010.
- Tahara, K., Norisada, M., Hogetsu, T., Kojima, K. Aluminum tolerance and aluminum-induced deposition of callose and lignin in the root tips of *Melaleuca* and *Eucalyptus* species. **Journal of Forest Research**, 10:325–333, 2005.
- Trachsel, S., Stamp, P., Hund, A. Effect of high temperatures, drought and aluminium toxicity on root growth of tropical maize (*Zea mays* L.) seedlings. **Maydica**, 55:249–260, 2010.
- Van der Merwe, M.J., Osorio, S., Moritz, T., Nunes-Nesi, A., Fernie, A.R. Decreased Mitochondrial Activities of Malate Dehydrogenase and Fumarase in Tomato Lead to Altered Root Growth and Architecture via Diverse Mechanisms. **Plant Physiology**, 149: 653–669, 2009.
- Wang, L., Fan, X-W, Pan, J-L., Huang, Z-B., Li, Y-Z. Physiological characterization of maize tolerance to low dose of aluminum, highlighted by promoted leaf growth, highlighted by promoted leaf growth. **Planta**, 242:1391-1403, 2015.
- Wang, Q., Yi, Q., Hu, Q., Zhao, Y., Nian, H., Li, K., Yu, Y., Izui, K., Chen, L. Simultaneous Overexpression of Citrate Synthase and Phosphoenolpyruvate Carboxylase in Leaves Augments Citrate Exclusion and Al Resistance in Transgenic Tobacco. **Plant Molecular Biology Reporter**, 30:992–1005, 2012.
- Wang, Q-F., Zhao, Y., Yi, Q., Li, K-Z., Yu, Y-X., Chen, L-M. Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic tobacco leaves : enhanced malate synthesis and augmented Al-resistance. **Acta Physiologiae Plantarum**, 32:1209–1220, 2010.

- Yamaguchi M., Sharp R.E. Complexity and coordination of root growth at low water potentials: recent advances from transcriptomic and proteomic analyses. **Plant Cell Environment**, 33:590–603, 2010.
- Yang, M., Tan, L., Xu, Y., Zhao, Y., Cheng, F., Ye, S. Effect of Low pH and Aluminum Toxicity on the Photosynthetic Characteristics of Different Fast-Growing *Eucalyptus* Vegetatively Propagated Clones. **PLoS ONE**, 10:1–15, 2015.
- Yang, Z.-B., Eticha, D., Rao, I.M., Horst, W.J. Alteration of cell-wall porosity is involved in osmotic stress-induced enhancement of aluminium resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Experimental Botany**, 61:3245–3258, 2010.
- Yang, Z.-B., Eticha, D., Albacete, A., Rao, I.M., Roitsch, T., Horst, W.J. Physiological and molecular analysis of the interaction between aluminium toxicity and drought stress in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Experimental Botany**, 63:3109–3125, 2012.
- Yang, Z.-B., Rao, I. M., Horst, W.J. Interaction of aluminium and drought stress on root growth and crop yield on acid soils. **Plant and Soil**, 372: 3–25, 2013.
- Yang, Z.B., You, J.F., Xu, M.Y., Yang, Z.M. Interaction between aluminum toxicity and manganese toxicity in soybean (*Glycine max*). **Plant and Soil**, 319:277–289, 2009.
- Yin, L., Mano, J., Wang, S., Tsuji, W., Tanaka, K. The Involvement of Lipid Peroxide-Derived Aldehydes in Aluminum Toxicity of Tobacco Roots. **Plant Physiology**, 152:1406–1417, 2010.
- Zhang, H., Shi, W.L., You, J.F., Bian, M.D., Qin, X.M., Yu, H., Liu, Q., Ryan, P.R., Yang, Z.M. Transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing a β -1, 3-glucanase from sweet sorghum (*Sorghum bicolor* L.) show reduced callose deposition and increased tolerance to aluminium toxicity. **Plant, Cell and Environment**, 38:1178–1188, 2015.
- Zheng, S.J. Crop production on acidic soils: overcoming aluminium toxicity and phosphorus deficiency. **Annals of Botany**, 106:183–184, 2010.

6. ANEXOS

Tabela 1. Resultados (*P* value) da ANOVA para efeitos do genótipo (Gt), alumínio (Al) e interações entre esses parâmetros. São demonstrados o alongamento foliar (AF), alongamento caulinar (AC), alongamento radicular (AR).

Parâmetros	Gt	T	Gt x T
AF	<0,001	0,928	0,872
AC	0,003	0,922	0,289
AR	0,005	0,616	0,771

Em negrito são apresentados valores de $P < 0.05$.

Tabela 2. Resultados (*P* value) da ANOVA para efeitos do genótipo (Gt), alumínio (Al) e interação entre esses parâmetros. São demonstrados a taxa de crescimento relativo baseado na massa da parte aérea (TCR_{parte aérea}) e de raízes (TCR_{raízes}), o teor e a concentração ([]) dos elementos em raízes, teor total de clorofila, relação clorofila a/b, concentração de malonaldeído em raízes (MDA_{raiz}) e folhas (MDA_{folha}), Atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e da ascorbato peroxidase (APX) em folhas.

Parâmetros	Gt	Al	Gt x Al
TCR _{parte aérea}	0,062	0,683	0,906
TCR _{raízes}	0,135	0,104	0,020
Al _{raiz}	0,546	<0,001	0,550
[Al]	0,075	<0,001	0,012
Ca _{raiz}	0,007	0,007	0,084
[Ca]	0,024	0,022	0,326
K _{raiz}	0,002	0,306	0,937
[K]	0,006	0,450	0,045
Mg _{raiz}	<0,001	<0,001	<0,001
[Mg]	0,005	<0,001	0,055
P _{raiz}	0,071	0,325	0,741
[P]	0,620	0,579	0,051
Clorofila total	0,106	0,011	0,430
Clorofila a/b	0,455	0,678	0,831
MDA _{raiz}	0,344	0,076	0,048
MDA _{folha}	0,204	0,216	0,725
SOD _{folha}	0,205	0,001	0,136
CAT _{folha}	0,038	0,284	0,207
APX _{folha}	0,564	0,029	0,017
Glicose _{folha}	0,024	0,017	0,015
Frutose _{folha}	0,688	0,828	0,338
Sacarose _{folha}	0,035	0,003	0,036
Amido _{folha}	0,588	0,102	0,019
Aminoácidos _{folha}	0,069	0,019	0,020
Proteínas _{folha}	0,180	0,047	0,096
Malato _{folha}	0,725	0,006	0,508
Fumarato _{folha}	0,314	0,982	0,032

Cálcio (Ca), potássio (K), magnésio (Mg) e fósforo (P). Os valores de P representam plantas com 120 horas de exposição ao Al. Em negrito são apresentados valores de $P < 0.05$.

Tabela 3. Resultados (*P* value) da ANOVA para efeitos do genótipo (Gt), alumínio (Al), tempo (T) e interações entre esses parâmetros. São demonstrados o teor relativo dos elementos na zona distal de transição (ZDT) e na zona da coifa (MEV-EDS), taxa de assimilação do CO₂ (*A*), condutância estomática (*g_s*), concentração intercelular de CO₂ (*C_i*), taxa de transpiração (*E*), eficiência intrínseca no uso da água (*A/g_s*), eficiência extrínseca no uso da água (*A/E*), taxa de transporte de elétrons (TTE), coeficiente de extinção fotoquímico (*q_L*), rendimento quântico do transporte de elétrons (Φ_{FSII}), eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos do FSII (F_v'/F_m'), eficiência fotoquímica máxima do FSII (F_v/F_m), taxa de respiração no escuro (*R_E*) e na luz (*R_L*).

Parâmetros	Gt	Al	Gt x Al	t	Gt x t	Al x t	Gt x Al x t
%Al _{ZDT}	0,640	<0,001	0,094	0,634	0,036	0,054	0,588
%Al _{Coifa}	0,985	0,005	0,315	0,199	<0,001	0,099	0,126
%P _{ZDT}	0,393	<0,001	0,993	0,372	0,355	0,976	0,270
%P _{Coifa}	0,661	0,423	0,633	0,086	0,260	0,821	0,205
%S _{ZDT}	0,007	<0,001	0,420	0,053	<0,001	0,315	0,256
%S _{Coifa}	0,796	<0,001	0,718	0,065	0,899	0,260	0,775
%K _{ZDT}	0,013	<0,001	0,682	0,002	0,387	0,021	0,289
%K _{Coifa}	0,299	0,803	0,303	0,098	0,102	0,188	0,172
<i>A</i>	0,703	0,021	0,140	<0,001	0,828	0,376	0,547
<i>g_s</i>	0,928	0,028	0,073	<0,001	0,436	<0,001	0,052
<i>C_i</i>	0,854	0,158	0,007	0,002	0,055	0,006	0,026
<i>E</i>	0,043	<0,001	0,447	<0,001	0,471	<0,001	0,141
<i>A/g_s</i>	0,214	0,584	<0,001	0,002	0,730	0,008	0,068
<i>A/E</i>							
TTE	0,072	0,475	0,450	<0,001	0,103	0,381	0,082
<i>q_L</i>	0,002	<0,001	0,035	<0,001	0,172	0,811	0,802
Φ_{FSII}	0,043	0,353	0,308	<0,001	0,063	0,518	0,164
F_v'/F_m'	0,674	<0,001	0,207	0,076	0,156	0,287	0,816
F_v/F_m	0,789	0,006	0,011	<0,001	0,008	0,091	0,034
<i>R_E</i>	0,141	0,270	0,034	<0,001	0,002	0,320	0,391
<i>R_L</i>	0,632	0,009	0,034	<0,001	0,024	0,077	0,834

Fósforo (P), enxofre (S) e potássio (K). Em negrito são apresentados valores de $P < 0.05$.