

**OTAVIA FARIA DOS ANJOS**

**EXSUDAÇÃO DE ÁCIDO MÁLICO E ALONGAMENTO RADICULAR EM  
GENÓTIPOS DE MILHO TRATADOS COM NÍVEIS TÓXICOS 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  
2007**

**OTAVIA FARIA DOS ANJOS**

**EXSUDAÇÃO DE ÁCIDO MÁLICO E ALONGAMENTO RADICULAR DE  
GENÓTIPOS DE MILHO TRATADOS COM NÍVEIS TÓXICOS 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: 31 de outubro de 2007.**

---

**Prof. Juraci Alves de Oliveira  
(Co-Orientador)**

---

**Prof. Marco A. Oliva Cano  
(Co-Orientador)**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Hermínia Emília P. Martinez**

---

**Prof. Paulo Cezar Rezende Fontes**

---

**Prof. José Cambraia  
(Orientador)**

“A você, que estive ao meu lado  
nas horas que chorei e nas horas  
que sorri, nas horas que me lamentei  
e nas horas em que de uma forma ou  
de outra demonstrei total alegria...  
Agradecer pelo sorriso diário,  
sem mágoas nem rancores,  
agradecer de peito aberto,  
de alma explosiva...  
Hoje quero parar e agradecer,  
porque você fez, faz e fará sempre parte  
de minha história!”

(Edla Maria Silveira)

À minha Mãe

Aos meus familiares

Ao meu namorado

Aos meus amigos

À DEUS

**OFEREÇO E DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, pela minha existência e por ter colocado esta oportunidade em minha vida, além de me dar força todos os dias para que eu acordasse em paz e com saúde para continuar minha caminhada diária;

À Universidade Federal de Viçosa, pelo seu tradicionalismo e excelência em ensino;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela oportunidade e pelo apoio financeiro;

Ao Departamento de Biologia Vegetal (Programa de Fisiologia Vegetal), pela competência de seus docentes;

Ao Departamento de Fitotecnia (Programa Milho), pelo fornecimento das sementes de milho utilizadas na realização dos trabalhos. Em especial ao professor Glauco Vieira Miranda pela cordialidade;

Ao professor José Cambraia, pela orientação, pelos conhecimentos transmitidos, compreensão nos momentos mais difíceis e, principalmente, pela persistência;

À minha doce e amável MÃE, pelo amor, dedicação, amizade, compreensão e confiança em mim, em todos os momentos. Sem você este sonho não seria realizado!

Ao meu namorado Marcelo, que mesmo à distância sempre me apoiou e me deu forças para conquistar este objetivo;

Aos meus familiares e amigos distantes, pelo apoio moral;

Aos novos amigos que fiz em Viçosa, em especial a Ângela, Daniela, Maristela, Rafaela, Gabriela, Kelly, Élcio, Cléber, Clarice, Cris, Rony, Héber, Ana, Cláudio, Eduardo, Valdir, Karine, Elaine, Michele e tantos outros que foram companheiros nos momentos felizes e nas dificuldades;

Às minhas companheiras de república Roseli, Fernanda, Giselle e Yhasmin, que sempre me deram força nos momentos mais difíceis. Adoro vocês!

Aos Professores Marco Antônio Oliva e Juraci Alves de Oliveira, pela orientação;

Ao técnico José Antônio Bhering, pela colaboração indispensável;

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

Otavia Faria dos Anjos, filha de Luzineth Faria Alves e Otávio dos Anjos, nasceu na cidade de Ipatinga, MG, no dia 06 de janeiro de 1982.

Em janeiro de 2005, graduou-se como Engenheiro Agrônomo na Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG.

Em agosto do mesmo ano, iniciou o curso de Mestrado em Fisiologia Vegetal, na Universidade Federal de Viçosa - UFV.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viiix
<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	viiiix
<b>RESUMO</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	xi
<b>1 - INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 - MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>6</b>
2.1 - Obtenção das plantas e aplicação dos tratamentos com alumínio.....	<b>6</b>
2.2 - Seleção dos genótipos de milho quanto a tolerância ao alumínio e avaliação dos sintomas de toxidez .....	<b>6</b>
2.3 - Efeito do alumínio no alongamento radicular de genótipos de milho.....	<b>7</b>
2.3.1 - Determinação do efeito da concentração de alumínio sobre o alongamento radicular das plantas.....	<b>7</b>
2.3.2 - Determinação do efeito do tempo de exposição ao alumínio sobre o alongamento radicular das plantas.....	<b>7</b>
2.4 - Determinação dos teores de alumínio.....	<b>8</b>
2.5 - Determinação do efeito do alumínio sobre a atividade da enzima desidrogenase do malato. ....	<b>8</b>
2.6 - Determinação da exsudação de ácido málico em função da concentração de alumínio.....	<b>9</b>
2.7 - Delineamento do experimento e análise estatística .....	<b>10</b>
<b>3- RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>11</b>
3.1 - Sintomas de toxicidade do alumínio nos genótipos de milho .....	<b>11</b>
3.2 - Seleção de genótipos de milho quanto à tolerância ao alumínio.....	<b>11</b>
3.3 - Efeito de diferentes concentrações de alumínio sobre o comprimento da raiz principal, em dois genótipos de milho.....	<b>13</b>
3.4 - Efeito do tempo de exposição ao alumínio sobre o alongamento radicular radicular de genótipos de milho.....	<b>16</b>
3.5 - Teores de alumínio em folhas e raízes de plantas tratadas com este cátion ....	<b>18</b>
3.6 - Efeito do alumínio sobre a atividade da desidrogenase do malato.....	<b>20</b>
3.7 - Efeito do alumínio sobre a exsudação de ácido málico .....	<b>21</b>
<b>4 – RESUMOS E CONCLUSÕES</b> .....	<b>23</b>
<b>5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>24</b>
<b>6 - APÊNDICE</b> .....	<b>35</b>

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Efeito de concentrações crescentes de Al sobre o comprimento da raiz principal, em dois genótipos de milho, após tratamento por 24 horas.....	<b>15</b>
<b>Figura 2.</b> Efeito de concentrações de Al sobre a percentagem de inibição da maior raiz de dois genótipos de milho após tratamento por 24 horas .....	<b>16</b>
<b>Figura 3.</b> Efeito do tempo de tratamento, com diferentes concentrações de alumínio, sobre o comprimento da raiz principal dos genótipos de milho. ....	<b>18</b>
<b>Figura 4.</b> Teores de Al em folhas e raízes de dois genótipos milho submetidos a diferentes concentrações de Al, após tratamento por 24 horas.....	<b>19</b>
<b>Figura 5.</b> Efeito de concentrações de alumínio sobre a exsudação de ácido málico, em dois genótipos de milho, após 24 horas de tratamento .....	<b>22</b>



## LISTA DE QUADROS

	<b>Página</b>
<b>Quadro 1.</b> Efeito do alumínio sobre o alongamento radicular da raiz principal, em seis genótipos de milho. ....	<b>12</b>
<b>Quadro 2.</b> Atividade da desidrogenase do malato, em dois genótipos de milho, após 24 horas de tratamento .....	<b>20</b>

## RESUMO

ANJOS, Otavia Faria dos, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2007.

**Exsudação de ácido málico e alongamento radicular de genótipos de milho tratados com níveis tóxicos de alumínio.** Orientador: José Cambraia. Co-Orientadores: Juraci Alves de Oliveira e Marco Antônio Oliva Cano.

Os efeitos do alumínio sobre o alongamento radicular e a exsudação de ácido málico foram avaliados em dois genótipos de milho: UFVM 100 e UFVM 200, selecionados de um grupo de seis genótipos desenvolvidos pelo Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil. Plântulas, com cinco dias de idade, dos seis genótipos foram expostas a Al 50  $\mu$ M em solução de CaCl<sub>2</sub> 0,4 mM, por 24 horas e, baseado na inibição do alongamento radicular, foram classificados em duas categorias: a) sensíveis ao Al ( $\geq$  68% de inibição): UFVM 8 e UFVM 100; e b) tolerantes ao Al ( $\leq$  64% de inibição): UFVM 6, UFVM 7, UFVM 9 e UFVM 200. Os genótipos UFVM 100 e UFVM 200 foram selecionados para os demais experimentos. Plântulas dos dois genótipos foram expostas a diferentes concentrações de Al e diferentes tempos de exposição e, então, o efeito do Al sobre o alongamento da raiz principal foi avaliado. O alongamento da raiz principal decresceu com o incremento na concentração de Al nos dois genótipos, especialmente no genótipo UFVM 100. Diferenças entre os genótipos foram maiores em baixas concentrações de Al e decresceram à medida que a concentração de alumínio foi aumentando no meio de cultivo. Inibições no crescimento da raiz principal foram evidentes desde o início da aplicação do tratamento e aumentaram linearmente com o tempo de exposição ao Al. O genótipo UFVM 200 mostrou sempre maior tolerância ao Al que o genótipo UFVM 100, tendo as maiores diferenças entre eles ocorrido entre 25 e 50  $\mu$ M de Al. Os teores de Al nas folhas foram sempre baixas em comparação aos teores nas raízes, mas o genótipo UFVM 200 apresentou teores mais elevados que o genótipo UFVM 100. Nas raízes, os teores de Al aumentaram com a elevação na concentração de Al na solução de cultivo e foram sempre mais elevados no genótipo UFVM 100. A atividade da enzima desidrogenase malato (MDH) foi maior nas raízes, mas só foi modificada pelo tratamento com Al nas folhas do genótipo tolerante. Exsudação de ácido málico para o meio de cultivo ocorreu nas plantas controle dos dois genótipos. A exposição das plantas ao Al resultou em aumento na exsudação de ácido málico para o meio de cultivo, tendo o genótipo UFVM 200 apresentado maior exsudação deste ácido em

todas as concentrações de Al. A exsudação máxima de ácido málico ocorreu nas concentrações estimadas de Al de 133 e 197  $\mu\text{M}$  para os genótipos UFVM 200 e UFVM 100, respectivamente. Embora, os dois genótipos tenham exsudado ácido málico para o meio de cultivo, em nenhum deles a quantidade de ácido málico foi suficiente para eliminar a toxidez do Al na solução nutritiva.

## ABSTRACT

ANJOS, Otavia Faria dos, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, October 2007.

**Malic exudation and root elongation in maize genotypes treated with toxic levels of aluminum.** Adviser: José Cambraia. Co-Advisers: Juraci Alves de Oliveira and Marco Antônio Oliva Cano.

Aluminum effects on malic acid exudation and root elongation were evaluated in two maize genotypes: UFVM 100 e UFVM 200, selected from a group of six genotypes developed by the Agronomy Department of the Federal University of Viçosa, Viçosa, MG, Brazil. Five days-old seedlings of the six genotypes were exposed to Al 50  $\mu$ M in 0.4 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 4.0, for 24 h and, based on growth inhibition of the main root, they were classified into two categories: a) Al sensitive ( $\geq$  68% inhibition): UFVM 8 and UFVM 100; and b) Al tolerant ( $\leq$  64% inhibition): UFVM 6, UFVM 7, UFVM 9 and UFVM 200. The genotypes: UFVM 100 and UFVM 200 were selected for the following experiments. Seedlings of both genotypes were treated with different Al concentrations and different time of exposition to the metal and then the Al effect on root elongation was evaluated. The elongation of the main root decreased with increasing Al concentration in both genotypes, especially in the UFVM 100 genotype. Differences between cultivar were higher at lower concentration but decreased as Al concentration was increased in the growth medium. Inhibition in the elongation of the main root was evident from the beginning of Al treatment and increased linearly with the time of exposition to Al. The UFVM 200 genotype always showed higher Al tolerance than the UFVM 100 genotype and the differences between them were bigger at Al concentration between 25 and 50  $\mu$ M. Aluminum contents in leaves were always low in comparison with the roots, but the UFVM 200 genotype showed higher Al contents than the UFVM 100 genotype. In the roots Al contents increased with increasing Al concentration in the growth medium and they were always higher in the UFVM 100 genotype. The activity of the malate dehydrogenase (MDH) was higher in roots, but it increased with Al treatment only in leaves of the tolerant genotype. Malic acid exudation to the growth medium was observed in control plants of both genotypes. In Al-treated plants of both genotypes malic acid exudation increased with increasing Al concentration in the growth medium but UFVM 200 genotype always showed higher exudation at all Al concentrations. Maximum malic exudation occurred at estimated Al concentration of 133 and 197  $\mu$ M for the genotypes UFVM 200 e UFVM 100,

respectively. Although, both genotypes have exudated malic acid to the growth medium, in none of them the amount of malic acid was enough to detoxify the Al in the nutrient solution.

## 1. INTRODUÇÃO

O constante aumento na demanda por cereais e outros grãos e a escassez crescente de solos de boa qualidade para seu cultivo, estão direcionando o cultivo à inevitável utilização de solos com características adversas, como por exemplo, terras ácidas altamente esgotadas em sais minerais. No Brasil, o plantio de culturas importantes, como a do milho, ocorre em grande parte dos solos sob cerrado, que ocupam quase um quarto do território nacional, concentrando-se nos Estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Tocantins e Piauí (FERREIRA et al, 2006).

Nestes Estados, predominam os Latossolos, caracteristicamente ácidos, com baixa capacidade de troca catiônica (CTC), elevada acidez, deficiência extrema de P, Ca, Mg e níveis elevados de Al e Mn (FERREIRA et al., 2006; LOPES, 1984). A toxidez por Al tem sido reconhecida como um dos principais fatores que limitam o alongamento radicular e a produtividade da cultura do milho nas regiões de solos de cerrados do Brasil Central (MACHADO & PEREIRA, 1990).

Na maioria das vezes, o problema da acidez é corrigido, pelo menos parcialmente, com a aplicação de calcário aos solos. No entanto, a correção da toxidez de Al nos horizontes inferiores desses solos, mediante métodos conhecidos e tradicionais, é muito difícil ou agrônômica e economicamente inexecutável. A alternativa que oferece maiores possibilidades de sucesso na utilização agrícola destes solos é a sua correção superficial, conjugada com a utilização de espécies e, ou variedades mais tolerantes à toxidez de Al (CAMBRAIA et al., 1991).

O Al é um dos metais mais abundante na crosta terrestre, constituindo aproximadamente 7% da massa total do planeta (DELHAIZE & RYAN, 1995; KOCHIAN, 1995). Apresenta-se, quase sempre, na forma de complexos estáveis de alumino-silicatos. Esse, aos poucos, dependendo de vários fatores do meio, liberam o Al para a solução do solo, disponibilizando-o em concentrações elevadas para as raízes e, conseqüentemente, resultando em vários tipos de injúrias nas plantas (KOCHIAN et al., 2004).

Na solução do solo, o Al pode se apresentar sob diferentes formas, dependendo do pH e de outros fatores do solo. Em valores de pH abaixo de 5,0, a forma predominante e, aparentemente mais tóxica, é o íon trivalente positivo ( $Al^{3+}$ ) (ECHART & MOLINA, 2001), mas à medida que o pH vai aumentando, formam-se as espécies

$\text{Al}(\text{OH})^{2+}$  e  $\text{Al}(\text{OH})^+$ . Em pH próximo da neutralidade, o Al assume a forma pouco solúvel de  $\text{Al}(\text{OH})_3$  e, em condições alcalinas, predomina a forma  $\text{Al}(\text{OH})_4^-$  (DELHAIZE & RYAN, 1995).

Quando em níveis tóxicos no solo, o Al desencadeia uma série de efeitos prejudiciais ao alongamento radicular e à produtividade das plantas. Um dos primeiros e principais efeitos do Al é sobre o alongamento radicular, na zona de transição do ápice radicular (SIVAGURU & HORST, 1998), que pode ser detectado em poucos minutos após a indução do estresse (BARCELÓ & POSCHENRIEDER, 2002; KOCHIAN et al., 2004). O Al, inicialmente, inibe o alongamento e a expansão celular e, posteriormente, a divisão celular (KOCHIAN et al., 2004).

Após exposições mais prolongadas do sistema radicular ao Al, a toxicidade desse íon se manifesta por meio de um conjunto de sintomas que expressam seu efeito contínuo e crescente sobre a morfologia e fisiologia das raízes. Tais sintomas incluem reduções no peso de matéria seca, no número e no comprimento das raízes, freqüentemente associados ao aumento no raio médio e no volume radicular (SIVAGURU & PALIWAL, 1993), redução na absorção de água e de nutrientes minerais (CALBO & CAMBRAIA, 1980; MENDONÇA et al., 2003), e de respiração celular, resultando em severas perdas em alongamento radicular e produtividade.

Devido à intensidade de sua carga elétrica positiva, o Al reage com inúmeros sítios nas células, como a parede celular, o citoesqueleto, o núcleo e, principalmente, a membrana plasmática (KOCHIAN et al., 2004). Na membrana plasmática, o Al se liga aos grupos fosfóricos e carboxílicos dos componentes moleculares, promovendo alterações na fluidez e na densidade de empacotamento dos fosfolipídios (SILVA et al., 2002). Além disso, o Al modifica a dinâmica de efluxo e influxo de  $\text{H}^+$  através da membrana plasmática de raízes, conforme sugere AHN et al. (2002), reduzindo a atividade da  $\text{H}^+$ -ATPase, despolarizando a membrana (AHN et al., 2004).

O Al penetra rapidamente no citossol, ligando-se a importantes moléculas e, ou estruturas intracelulares (KOCHIAN et al., 2004). Alguns alvos preferenciais do Al parecem ser o DNA, com o qual reage aumentando a estabilidade da dupla hélice e inibindo sua replicação (ROUT et al., 2001), os microtúbulos e filamentos de actina, que se reorganizam ao acaso, principalmente nas células corticais internas (BLANCAFLOR et al., 1998; KOCHIAN et al., 2004) e as mitocôndrias, diminuindo sua capacidade de produzir ATP e aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio, possivelmente  $\text{O}_2^-$ .

Somente sob estresse prolongado ao Al são observados efeitos sobre o alongamento radicular da parte aérea, que se deve, principalmente, a limitações na absorção de nutrientes e água acompanhados do aparecimento de clorose (CHANG et al., 1998) e necrose foliar (NGUYEN et al., 2003). Também podem ser observados sintomas que se assemelham aos de deficiência de fósforo, como a redução no alongamento radicular das folhas, arroxamento de caule, folhas e nervuras e amarelecimento e morte do ápice foliar. Outras espécies podem apresentar sintomas similares aos da deficiência de cálcio ou problemas na sua translocação, caracterizado pelo enrolamento ou o encurvamento de folhas novas e colapso dos pontos de alongamento radicular ou pecíolos (FOY, 1976). Algumas destas deficiências, aparentemente, ocorrem porque o Al induz a deposição de calose nos canais plasmodesmáticos, inibindo fisicamente o transporte simplástico entre células (SIVAGURU et al., 2000; ECHART & MOLINA, 2001; MAZZOCATO et al., 2002).

Duas categorias de mecanismos de tolerância ao Al têm sido propostas: mecanismos de exclusão e mecanismos de tolerância interna. As plantas que utilizam mecanismos de exclusão do Al são capazes de evitar a entrada desse íon no simplasma, enquanto aquelas que possuem mecanismos de tolerância interna são capazes de manter seus processos metabólicos próximo da normalidade, mesmo na presença de concentrações relativamente elevadas de Al no simplasma (GONÇALVES et al., 2000).

As plantas que utilizam o mecanismo de exclusão podem evitar que o Al chegue ao simplasma immobilizando-o nas cargas negativas de ácidos carboxílicos constituintes da parede celular, modificando a permeabilidade seletiva na membrana plasmática, induzindo a elevação do pH na rizosfera para promover a precipitação do Al e, ou exsudando substâncias capazes de complexar o Al (SILVA et al., 2002; MARIANO et al., 2003; KOCHIAN et al., 2004; VITORELLO et al., 2005). Dentre essas hipóteses a que envolve a síntese e a exsudação de ácidos orgânicos é a que tem recebido mais aceitação por parte dos pesquisadores. Algumas das principais razões apontadas por KOCHIAN et al. (2004) 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 e outros), no meio nutritivo, reduz a toxidez do Al; c) Complexos de Al-ácidos orgânicos (di- e tri-carboxílicos) não atravessam significativamente as membranas e não são 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 do mecanismo de exsudação é desencadeada



especificamente por  $Al^{3+}$  e f) Existem na membrana plasmática canais aniônicos, ativados por  $Al^{3+}$ , para facilitar o efluxo dos ácidos orgânicos.

Nas diversas espécies estudadas foram identificados dois padrões de exsudação de ácidos orgânicos. No padrão I, a exsudação de ácido orgânico começa a ocorrer tão logo a planta seja exposta a níveis tóxicos de Al, enquanto, no padrão II, a exsudação ocorre várias horas após a exposição ao Al (MA et al., 2001). A rapidez de reação característica do padrão I é indicativa de que o Al ativa mecanismos preexistentes, como por exemplo, a abertura de canais de efluxo de ácidos orgânicos. Espécies como trigo (DELHAIZE & RYAN, 1995) e tabaco (DELHAIZE et al., 2001) apresentam padrão do tipo I na exsudação de ácidos orgânicos. Quando a exsudação do ácido orgânico ocorre algum tempo depois da exposição ao Al, parece haver a necessidade de biossíntese de proteínas ligadas ao metabolismo e, ou ao transporte dos ácidos orgânicos para o meio externo. Têm-se como exemplo, o centeio (LI et al., 2000) e o milho (PELLET et al., 1995), que utilizam o mecanismo tipo II.

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 tritcale (MA et al., 2000) e arroz (ALVES, 2005), ácido málico, em trigo (DELHAIZE et al., 1993) e ácido oxálico, em *Cássia tora* L. (MA et al., 1997) 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  $\mu M$  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.

Além destes mecanismos de exsudação de ácidos orgânicos induzidos por Al, sugere-se a operação de alguns mecanismos alternativos para sorgo (CAMBRAIA et al., 1983; GONÇALVES et al., 2005) e em hortências (*Hidrangea macrophylla*) (MA et al., 1997). Dentre esses, incluem-se mecanismos de desintoxicação interna, envolvendo a produção de ácidos orgânicos, 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, seriam capazes de reduzir a concentração de  $Al^{3+}$  livre, mantendo teores elevados de ácidos orgânicos ou outras moléculas em seus tecidos. Corroborando esta idéia, trabalho recente de PIÑEROS et al. (2005), com seis genótipos de milho, sugerem

que o mecanismo de exsudação de ácidos orgânicos é importante na resistência das plantas ao Al, mas não é o único.

Mudanças no metabolismo de ácidos orgânicos parecem ser necessárias para manter adequados os níveis de ácidos orgânicos, não apenas para a complexação interna, mas também para sua exsudação para o meio extracelular (Li et al., 2000). Não há, porém, consenso quanto a isto. Ryan et al. (2001) mostraram que a exsudação de malato em trigo continuou por algumas horas sem mudanças significativas na atividade carboxilativa da fosfoenol piruvato (PEPC) ou da malato desidrogenase (MDH). Em centeio, igualmente, ocorreu efluxo de malato e citrato sem qualquer mudança na atividade da PEPC, MDH e isocitrato desidrogenase, e apenas incremento de 25% na atividade da citrato sintase (LI et al., 2000). Por outro lado, foram observados incrementos na atividade da citrato sintase em arroz (ALVES, 2005), em espécies leguminosas tropicais arbóreas (RYAN et al., 2001) e em sorgo submetidas a níveis elevados de Al (GONÇALVES et al., 2005).

A tolerância ao Al, portanto, varia de espécie para espécie e os mecanismos de tolerância a este íon são variáveis e não são perfeitamente conhecidos. No caso do milho, a situação não é diferente e muitos mecanismos de tolerância têm sido sugeridos, mas para essa espécie nenhum mecanismo específico foi comprovado.

Recentemente, o Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa desenvolveu diversos genótipos de milho de elevada produção. Apesar de serem considerados de elevada produtividade, pouco ou nada se sabe sobre as respostas destes cultivares frente a níveis elevados de Al.

O objetivo deste trabalho foi selecionar dentre alguns dos mais promissores destes genótipos desenvolvidos na UFV dois que apresentassem resposta diferencial ao Al e estudar suas respostas quanto a alongamento radicular e produção de ácido málico em plantas submetidas a níveis elevados de Al.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção das plantas e aplicação dos tratamentos com alumínio

Os genótipos utilizados nos experimentos foram obtidos a partir de uma seleção dentre seis genótipos de milho (UFVM100, UFVM 200, UFVM 6, UFVM 7, UFVM 8 e UFVM 9) desenvolvidos pelo Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

As sementes foram selecionadas quanto ao tamanho e forma, tratadas com ácido sulfúrico concentrado, para facilitar a embebição, por 1 min, seguindo-se lavagem em água corrente e desmineralizada. A germinação foi feita em cartuchos de papel “germiteste”, pH neutro, mergulhados em solução de  $\text{CaCl}_2$  0,4 mM, pH 4,0, em câmara úmida a 30°C. Cinco dias após a semeadura, as plântulas foram selecionadas, quanto à uniformidade de tamanho e forma, e transplantadas para vasos de polietileno contendo 1,0 L de  $\text{CaCl}_2$  0,4 mM, pH 4,0 e submetidas aos tratamentos com Al nas concentrações de 0 e 50  $\mu\text{M}$ , aplicado na forma de  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . O cultivo das plantas foi realizado em sala de crescimento, com temperatura controlada para  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , sob irradiância de  $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 h.

### 2.2 Seleção dos genótipos de milho quanto à tolerância ao alumínio e avaliação dos sintomas de toxidez

Plântulas dos seis genótipos de milho: UFVM 100, UFVM 200, UFVM 6, UFVM 7, UFVM 8 e UFVM 9, obtidas conforme descrito no item 2.1, foram transplantadas para vasos plásticos, com capacidade de 1,0 L, contendo  $\text{CaCl}_2$  0,4 mM, pH 4,0 e submetidas ao Al nas concentrações de 0 e 50  $\mu\text{M}$ , na forma de  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Antes das plântulas serem submetidas ao tratamento, foi determinado o comprimento inicial da maior raiz. Após 24 horas de tratamento, o experimento foi encerrado e as plantas removidas, lavadas, medidos os comprimentos da raiz principal e determinados os pesos de matéria fresca e seca, do sistema radicular e da parte aérea.

Com base na percentagem de inibição do crescimento radicular e da parte aérea e, na produção de matéria fresca e seca, foi determinado o genótipo mais tolerante e o mais sensível, que foram utilizados nos demais experimentos.

$$\% \text{ inibição} = \frac{\text{Alongamento } Al_0 - \text{Alongamento } Al_T}{\text{Alongamento } Al_0} \times 100$$

em que

$Al_0$  = Alongamento da raiz principal de plântulas controle (sem tratamento com Al)

$Al_T$  = Alongamento da raiz principal de plântulas submetidas ao tratamento com Al

Em experimento paralelo as plantas dos genótipos UFVM 100 e UFVM 200 foram mantidas nos tratamentos com Al durante 7 dias para a verificação da sintomatologia de toxidez de alumínio. O aparecimento dos sintomas de toxidez de alumínio foi observado visualmente, todos os dias, tanto na parte aérea quanto no sistema radicular.

## **2.3 Efeito do alumínio no alongamento radicular de dois genótipos de milho**

### 2.3.1 Determinação do efeito da concentração de alumínio sobre o alongamento radicular das plantas

Plântulas de dois genótipos de milho UFVM 100 e UFVM 200, considerados o mais sensível e o mais tolerante ao Al, obtidos conforme descrito no item 2.1, foram transplantadas para vasos plásticos, com capacidade de 1,0 L, contendo  $CaCl_2$  0,4 mM, pH 4,0 e submetidas ao tratamento com Al, nas concentrações de 0, 25, 50 e 100  $\mu$ M, por 24 horas.

Ao final do experimento, as plantas foram removidas, lavadas, medidos o alongamento da raiz principal e determinados os pesos de matéria fresca e seca do sistema radicular e da parte aérea.

### 2.3.2 Determinação do efeito do tempo de exposição ao alumínio sobre o alongamento radicular das plantas

Seguindo-se procedimento descrito em 2.3.1, plântulas de dois genótipos de milho UFVM 100 e UFVM 200 foram submetidas ao tratamento com Al, nas concentrações de 0, 25, 50 e 100  $\mu$ M, por 24 horas. A cada seis horas avaliou-se o alongamento da raiz principal.

Após 24 horas de tratamento as plantas foram removidas da solução de cultivo, lavadas e medido o alongamento da raiz principal. Foi determinado o peso de matéria fresca e seca do sistema radicular e da parte aérea.

## **2.4 Determinação dos teores de alumínio**

Plântulas dos dois genótipos de milho UFVM 100 e UFVM 200, o mais sensível e o mais tolerante ao Al, obtidos conforme descrito em 2.1, após exposição aos tratamentos com Al, nas concentrações de 0, 25, 50, 100 e 200  $\mu\text{M}$ , aplicados na forma de  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , durante um período de 24 horas, foram removidas de vasos plásticos, lavadas em HCl 0,1 N por cinco minutos e posteriormente lavadas em água corrente e desmineralizada, secas em papel-toalha e divididas em parte aérea e sistema radicular. A matéria seca da parte aérea e do sistema radicular foi obtida após a secagem do material vegetal em estufa convencional, a  $70^\circ\text{C}$ , até peso constante.

Amostras de aproximadamente 100 mg da parte aérea e do sistema radicular após secagem foram finamente moídas em almofariz elétrico (compartimento de moagem em aço inox) e digeridas em 1,5 mL de uma mistura nítrico-perclórica (2:1; v/v). Os teores de Al foram determinados no extrato mineral pelo método da aluminona (WANG & WOOD, 1973).

## **2.5 Determinação do efeito do alumínio sobre a atividade da enzima desidrogenase do malato**

Plântulas dos dois genótipos de milho, obtidas conforme descrito no item 2.1, foram transplantadas (vinte plantas/vaso) para vasos plásticos, com contendo 1,0 L  $\text{CaCl}_2$  0,4 mM, pH 4,0 e submetidas aos tratamentos com Al, 0 e 25  $\mu\text{M}$ , aplicado na forma de  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Decorridos 24 horas de exposição ao Al, o experimento foi encerrado, as plantas removidas da solução de cultivo e, em seguida, lavadas em água corrente e água desmineralizada.

Os extratos enzimáticos para determinação da atividade da enzima desidrogenase do malato foram obtidos pela maceração de 0,4 g de material vegetal fresco, raiz ou folhas, em almofariz de porcelana, após adição de nitrogênio líquido. Em seguida, foram adicionados 2,0 mL do meio de homogeneização, constituído de tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  5,0 mM,  $\text{MgCl}_2$ , 5,0 mM, glicerol 10% (v/v), Triton 0,1% (v/v), fluoreto de fenilmetilsulfonil 0,5 mM e DTT 1mM (HAYES e MA, 2003). Os homogeneizados foram filtrados através de quatro camadas de gaze e centrifugados a 15.000 xg por 15 min, em centrífuga refrigerada, a  $4^\circ\text{C}$ . Os sobrenadantes, diluídos convenientemente, foram utilizados como fonte das enzimas.

A atividade da desidrogenase do malato (EC 1.1.1.37) foi determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto a 0,7 mL de um meio de reação constituído de tampão Tris-HCl, 50 mM, pH 8,0, EDTA 0,5 mM e NADH 0,2 mM. Após incubação da amostra em banho-maria a 25°C, por 30 min, a reação foi iniciada pela adição de 0,2 mL de ácido oxaloacético 5 mM (HAYES e MA, 2003), acompanhando-se o decréscimo na absorvância a 340 nm, a 25°C, durante 1 min. A atividade da enzima foi calculada utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar do NADH, a 340 nm ( $6.200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) e expressa em  $\mu\text{mol h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína.

Os teores de proteínas dos extratos enzimáticos foram determinados pelo método de LOWRY et al. (1951), utilizando BSA como padrão.

## **2.6 Determinação da exsudação de ácido málico em função concentração de alumínio**

Treze plântulas dos dois genótipos de milho UFVM 100 e UFVM 200, o mais sensível e o mais tolerante ao Al, obtidos conforme descrito em 2.1, foram transferidas para recipientes de 45 mL, contendo  $\text{CaCl}_2$  0,4 mM, pH 4,0 e submetidas aos tratamentos com Al, nas concentrações de 0, 25, 50, 100 e 200  $\mu\text{M}$ , aplicados na forma de  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , durante um período de 24 horas, sob agitação constante. Após este período, as plântulas foram removidas e a solução de cultivo foi liofilizada e resuspendida em 5 mL de água desmineralizada.

A concentração de ácido málico foi determinada pela adição de alíquotas de 600  $\mu\text{L}$  da solução anterior a 225  $\mu\text{L}$  de tampão (glicina 1,0 M + hidrazina 0,8 M), pH 9,0 e 175  $\mu\text{L}$  de NAD 50 mM. Após incubação em banho-maria, a 25°C por 30 min, foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  da enzima desidrogenase do malato (2500 U/mg de proteína) e o aumento na absorvância, a 340 nm, foi medido em cubetas de quartzo, termostatizadas a 25°C, durante 1 min. O teor de ácido málico foi calculado por meio de curva padrão, utilizando padrões de ácido málico entre 0 e 9 nmol / mL (DELHAIZE et al., 1993).

## **2.7 Delineamento do experimento e análise estatística**

O experimento de seleção dos genótipos (6 x 2), do efeito de concentração e do tempo de exposição ao Al (5 x 2) e a atividade enzimática (2 x 2), seguiram esquemas fatoriais no delineamento de blocos casualizados, com três repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade e os fatores quantitativos foram analisados por regressão. As análises foram efetuadas utilizando o programa estatístico “SAEG”, da Fundação Arthur Bernardes, da Universidade Federal de Viçosa, versão 9.0.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Sintomas de toxicidade do alumínio nos genótipos de milho

Os sintomas de toxicidade de alumínio foram observados, principalmente, nas raízes dos dois genótipos estudados, sendo nelas o local de maior acúmulo deste metal. A exposição das plantas ao Al resultou no desenvolvimento de raízes mais curtas, mais grossas, com aspecto quebradiço e com coloração amarronzada, principalmente no ápice radicular. O Al induziu, também, alterações na morfologia externa do sistema radicular, com inibição do desenvolvimento de pêlos radiculares, reprimindo o crescimento de ramificações laterais, levando a uma redução do volume do sistema radicular. A maioria destes sintomas visuais só foram observados em experimentos realizados com a aplicação de Al 200  $\mu\text{M}$ , após 7 dias de tratamento, nos genótipos UFVM 100 e UFVM 200.

Os sintomas da toxicidade na parte aérea assemelham-se aos da deficiência de fósforo, como a redução no crescimento das folhas, arroxamento de caule, folhas e nervuras e amarelecimento e morte do ápice foliar, também como os similares aos da deficiência de cálcio caracterizado pelo enrolamento ou o encurvamento de folhas novas e colapso dos pontos de crescimento ou pecíolos (FOY, 1976), porém, neste experimento, na parte aérea, nenhum sintoma de toxidez foi observado, mesmo após 7 dias de tratamento com Al na concentração de 200  $\mu\text{M}$ .

Todos os sintomas observados nos dois genótipos de milho utilizados também foram observados em outras espécies vegetais, como o trevo branco (*Trifolium repens* L.) (CARE, 1995) e a soja (MASCARENHAS et al., 1984) indicando ser sintomatologia típica de toxidez de Al. Em milho, RHUE & GROGAN (1976) observaram que as raízes das linhagens NY511 (sensível) e R158 (tolerante), após 12 dias de exposição a 125  $\mu\text{M}$  de Al, estavam severamente atrofiadas, com engrossamento e descoloração nas linhagens mais sensíveis e compridas, bem desenvolvidas e fibrosas, nas linhagens mais tolerantes.

#### 3.2 Seleção de genótipos de milho quanto à tolerância ao alumínio

Na ausência de Al, os genótipos UFVM 8 e UFVM 6 foram os que apresentaram o maior e o menor alongamento da raiz principal, respectivamente (Quadro 1). Na



presença de Al o alongamento radicular foi drasticamente inibido em todos os genótipos, passando a ter alongamento radicular médio de 0,8 cm/dia, não existindo diferença estatisticamente significativa entre os genótipos ao se analisar o parâmetro de alongamento da raiz principal.

Porém, as diferenças entre os genótipos tornaram-se mais evidentes com a expressão dos resultados em termos da percentagem de inibição do alongamento radicular (Quadro 1). Quanto à percentagem de inibição, os genótipos de milho estudados se enquadraram em duas categorias: a) sensíveis ao Al ( $\geq 68\%$  de inibição): UFVM 8 e UFVM 100; e b) mais tolerantes ao Al ( $\leq 64\%$  de inibição): UFVM 6, UFVM 7, UFVM 9 e UFVM 200.

**Quadro 1.** Efeito do alumínio sobre o alongamento da raiz principal em seis genótipos de milho.

Genótipos	Alongamento radicular <sup>1</sup>		Inibição do Alongamento radicular
	- Al	+ Al	
	<i>mm</i>		<i>%</i>
UFVM 6	16,5 Ca <sup>2</sup>	6,8 Ab	58,8 B
UFVM 7	22,2 Ba	8,7 Ab	60,8 B
UFVM 8	28,5 Aa	8,3 Ab	70,9 A
UFVM 9	22,9 Ba	8,3 Ab	64,0 B
UFVM 100	22,8 Ba	7,3 Ab	68,0 A
UFVM 200	23,4 Ba	8,8 Ab	62,4 B

<sup>1</sup>Alongamento da raiz principal, após 24 horas de tratamento com Al 0  $\mu\text{M}$  (-Al) e 50  $\mu\text{M}$  (+Al).

<sup>2</sup>Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, entre cultivares, e pela mesma letra minúscula, entre tratamentos, para cada cultivar, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Diversos autores têm investigado os efeitos tóxicos de Al em diferentes genótipos de milho e, os resultados obtidos, indicam respostas semelhantes às observadas no presente trabalho. Trabalho realizado com duas linhagens de milho (*Zea mays* L.), com tolerância diferencial ao Al, mostrou maior redução no alongamento radicular na linhagem considerada mais sensível (GIANNAKOULA et al, 2007).

Avaliando a tolerância de onze híbridos comerciais de milho CAMBRAIA e CAMBRAIA (1995), observaram forte redução no comprimento da raiz principal de

plantas expostas ao Al e concluíram que essa medição foi o critério de avaliação mais simples, fácil e confiável para a avaliação da tolerância ao Al em milho. Em trigo (KIKUI et al, 2007), arroz (ALVES, 2005; RIBEIRO, 2007) e sorgo (CAMBRAIA et al, 1991), também, foram observadas reduções no alongamento radicular quando as plantas foram expostas ao alumínio.

Todos os genótipos estudados apresentaram percentagem de inibição do alongamento da raiz principal superior a 59%, após 24 horas de tratamento com Al 50  $\mu$ M. Esta sensibilidade ao Al foi muito mais elevada que a apresentada por híbridos de milho testados por CAMBRAIA e CAMBRAIA (1995), expostos ao Al durante 7 dias, com inibições no alongamento radicular que variaram de 6,9 a 33,3%. Os dois experimentos diferiram não apenas no tempo de exposição ao Al, mas também quanto ao meio nutritivo. Enquanto neste experimento o tratamento com Al foi aplicado em solução contendo exclusivamente  $\text{CaCl}_2$ , naquele usou-se solução nutritiva completa. A solução nutritiva contém alguns íons, como por exemplo, o Mg, reconhecidos como amenizadores dos efeitos do Al (SILVA et al, 2001 ) e, também, o ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) utilizado no fornecimento do elemento ferro, que em excesso e dependendo da afinidade relativa por Fe e Al, poderia complexar parte do Al reduzindo seus efeitos tóxicos. Em ensaios preliminares, sob as mesmas condições do experimento de CAMBRAIA e CAMBRAIA (1995), os genótipos estudados nesta pesquisa não apresentaram sensibilidade similar à dos híbridos BR106, considerado sensível ao Al, e BR201, considerado tolerante ao Al, utilizados por CAMBRAIA e CAMBRAIA (1995) (Dados não publicados).

Devido os genótipos UFVM 100 e UFVM 200 estarem disponíveis no mercado, estes foram escolhidos para os demais trabalhos, sendo considerado UFVM 100 mais sensível e o UFVM 200, um pouco mais tolerante ao Al.

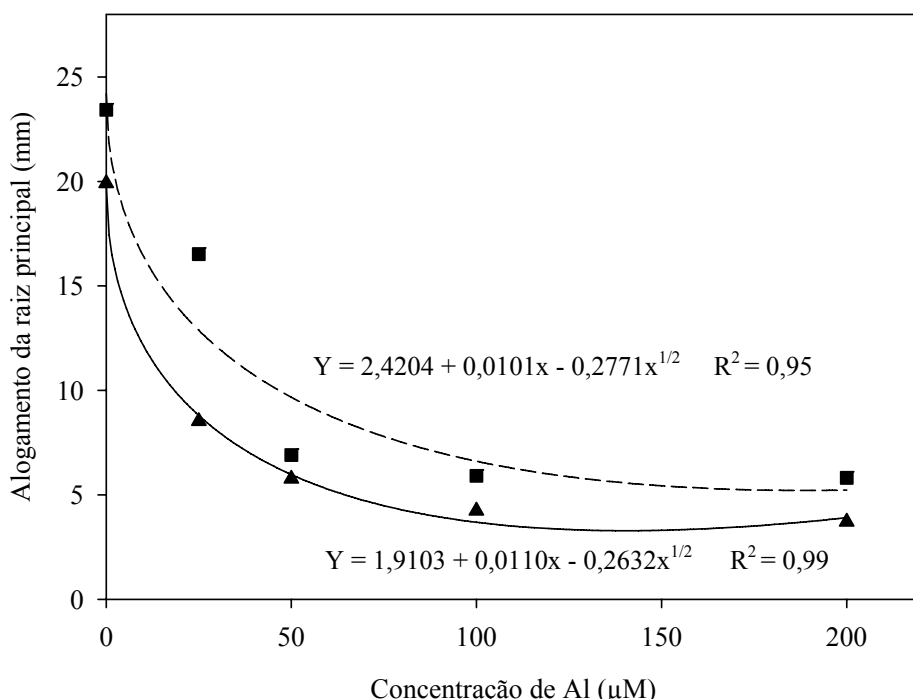
### **3.3 Efeito de diferentes concentrações de alumínio sobre o alongamento da raiz principal em dois genótipos de milho**

O alongamento da raiz principal decresceu com o incremento na concentração de Al nos dois genótipos (Figura 1). O decréscimo foi maior nas concentrações de Al mais baixas e, à medida que a concentração deste elemento foi se elevando, ele se tornou

cada vez menor até se tornar insignificante entre 100 e 200  $\mu\text{M}$ . Os resultados indicam que concentrações de Al acima de 100  $\mu\text{M}$  não resultam em incremento na redução do alongamento da raiz principal, pelo menos no período de apenas 24 horas. As curvas mostram, também, que à medida que se eleva a concentração de Al na solução de cultivo as diferenças entre os dois genótipos desaparecem.

Diferenças entre cultivares, em termos de comprimento da raiz, foram verificadas por CAMARGO e FELÍCIO (1984) avaliando as respostas de três cultivares de trigo e dois de triticales a concentrações crescentes de Al. Estes autores observaram que as diferenças quanto ao comprimento da raiz existentes em baixas concentrações (5 mg/L) desapareceram em concentrações mais elevadas de Al (10 mg/L), após 72 horas de tratamento.

As maiores diferenças entre os dois genótipos quanto à sensibilidade ao Al ocorreu na concentração de 25  $\mu\text{M}$  de Al. O genótipo UFVM 100 nesta concentração de Al apresentou redução no alongamento da raiz principal de 66 % e o genótipo UFVM 200 de 46,6 % (Figura 1). O Al, em concentrações mais elevadas, causa severos danos à estrutura e à função da membrana plasmática e de outras membranas celulares, com perda da compartimentalização celular, fazendo com que as diferenças genótípicas desapareçam como aconteceu com os dois genótipos estudados (BARCELÓ et al., 2002). Estes são eventos considerados tardios na indução de síndrome radicular de toxidez induzida por Al e podem não ser responsáveis pela rápida inibição do alongamento radicular verificada neste experimento. Investigações dos efeitos do Al no alongamento radicular inicial de raízes são sugestivas de que o ápice radicular é o sítio primário de toxicidade e da inibição do alongamento radicular, (BENNET e BREEN, 1991; RYAN et al., 1993; KOCHIAN, 1995; DELHAIZE e RYAN, 1995; CRAWFORD e WILKENS, 1997) havendo, provavelmente, paralisação da atividade mitótica (CLARKSON, 1969) e da divisão celular (MINOCHA et al., 1992).



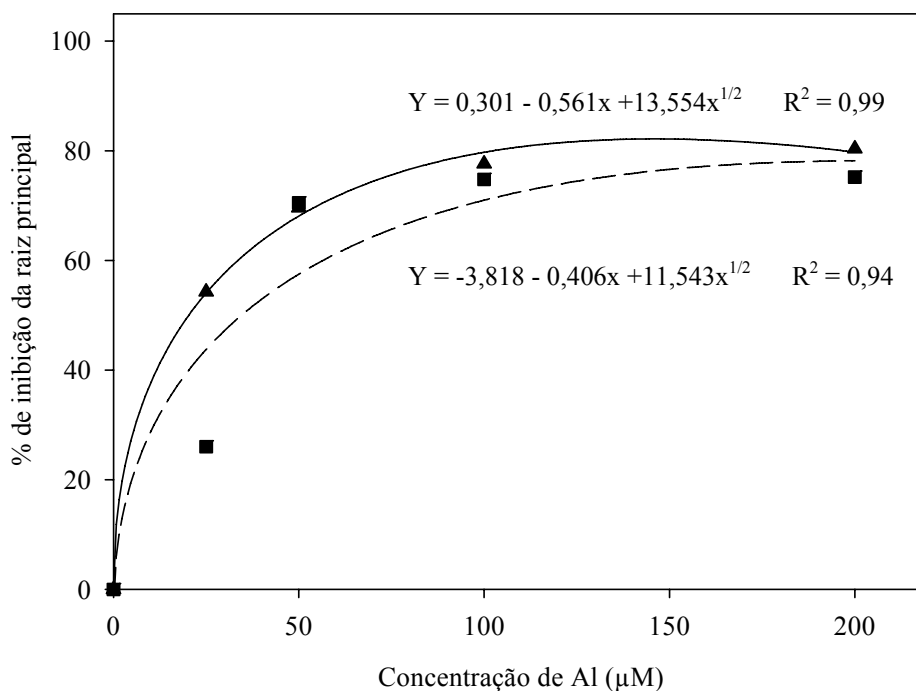
**Figura 1.** Efeito de concentrações de Al sobre o alongamento da raiz principal de dois genótipos de milho: UFVM 100 (-▲-) e UFVM 200 (--■--), após 24 horas de tratamento.

Nos dois genótipos, o alumínio reduziu progressivamente o alongamento da raiz principal, sendo que nas maiores concentrações utilizadas de Al estas reduções foram mais elevadas, porém seguindo a mesma tendência para os dois genótipos. Outros estudos mostram, ainda, que altas concentrações de Al provocavam morte das células meristemáticas nas raízes, resultando em redução do seu tamanho (SAPRA et al, 1982).

Avaliando a resposta de quatro cultivares de soja, a concentrações crescente de Al, MASCARENHAS et al. (1984) verificaram que, em concentrações mais baixas e utilizando concentrações de alumínio de 0, 1, 2 e 4 mg/L, durante sete dias, ocorreram restrições no alongamento radicular das raízes primárias das plântulas de soja, e que nas doses mais elevadas houve redução acentuada no desenvolvimento radicular em todos os cultivares, de magnitude tal que, nestas concentrações de alumínio não foi possível a separação de cultivares tolerantes e susceptíveis.

Após 24 h de tratamento a percentagem de inibição no alongamento da raiz principal aumentou com o incremento na concentração de Al (Figura 2). Observa-se que nas concentrações mais baixas a percentagem de inibição aumenta muito com

pequenos incrementos na concentração de Al e, à medida que a concentração deste elemento na solução de cultivo vai aumentando, os incrementos na percentagem de inibição decrescem. Novamente, as diferenças entre genótipos tendem a desaparecer em concentrações mais elevadas.



**Figura 2.** Efeito de concentrações de Al sobre a percentagem de inibição do alongamento da raiz de dois genótipos de milho: UFVM 100 (-▲-) e UFVM 200 (--■--), após tratamento por 24 horas.

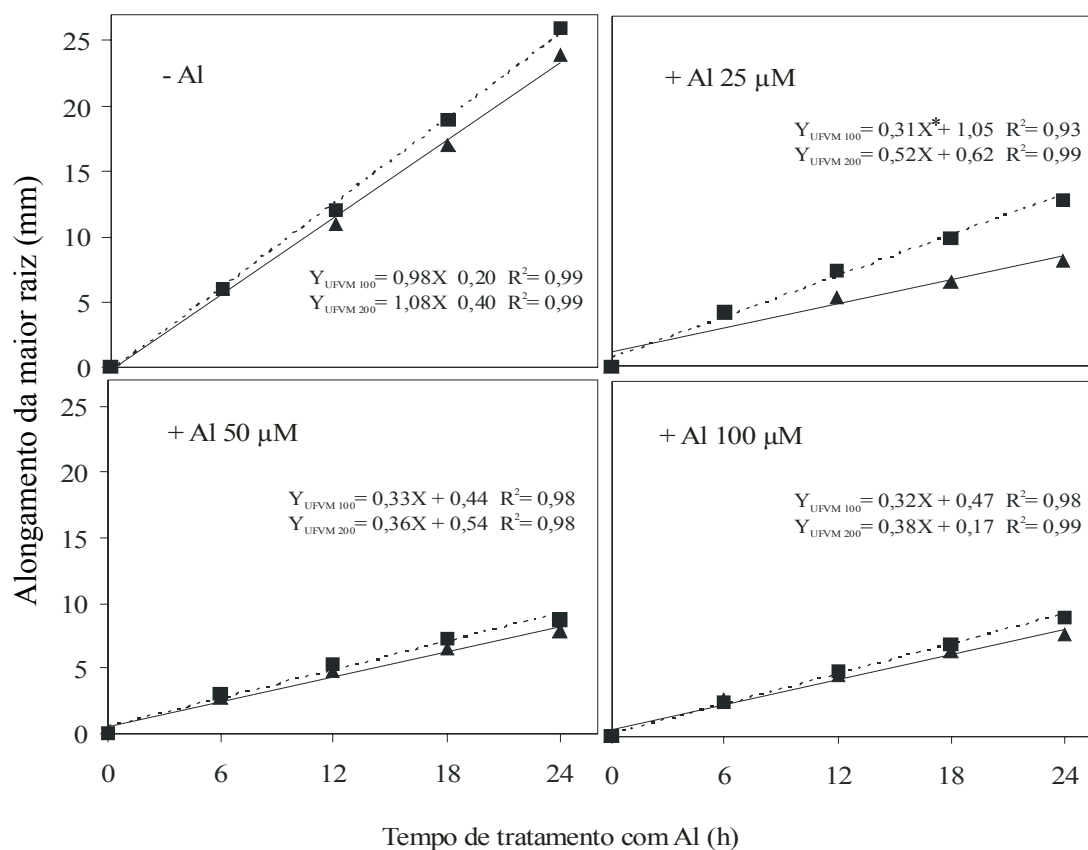
### 3.4 Efeito do tempo de exposição ao alumínio sobre o alongamento radicular de genótipos de milho

O alongamento da raiz principal nos dois genótipos, UFVM 100 e UFVM 200 aumentou, linearmente, em função do tempo de exposição, independente do tratamento com Al (Figura 3). Inibições no alongamento da raiz principal foram evidentes desde o início da aplicação do tratamento e aumentaram, linearmente, em função do tempo de exposição ao Al, em todas as concentrações testadas, nos dois genótipos.

Na ausência de Al na solução de cultivo não foram observadas diferenças entre os genótipos de milho, tendo o alongamento da raiz principal atingido valor médio de 25,8 mm, após 24 h de tratamento.

Os efeitos inibitórios do Al, nas concentrações mais elevadas de 50 e 100  $\mu\text{M}$ , foram mais intensos do que na concentração de 25  $\mu\text{M}$ , mas nestas concentrações os genótipos não diferiram entre si, como pode ser visto pelos valores dos coeficientes angulares.

Quando se compara o efeito do Al entre os genótipos, observa-se que ambos, independentemente do tempo de exposição ao Al, apresentaram redução no alongamento radicular, embora em proporções diferenciadas. Um fato a ser considerado neste experimento foi a detecção do efeito fitotóxico do Al desde o início da exposição das plântulas a este elemento, o que demonstra a precocidade dos efeitos fitotóxicos do Al sobre as etapas metabólicas que controlam o alongamento radicular. Conforme demonstrado por vários autores (WALLACE et al., 1982; BENNET e BREEN, 1991;



**Figura 3.** Efeito do tempo de tratamento com diferentes concentrações de alumínio sobre o alongamento da raiz dos genótipos de milho: UFVM 100 (-▲-) e UFVM 200 (--■--). \* coeficiente angular de x significativo pelo teste t a 5%.

RYAN et al., 1992 e RYAN), o alongamento radicular é afetado rapidamente após exposição ao Al, ocorrendo, inclusive, na mesma hora de exposição a este elemento (JONES e KOCHIAN, 1995; SIVAGURU et al., 1999; SILVA et al., 2000).

Como demonstrou DONCHEVA et al. (2005) em variedades de milho sensível (HS 16x36) e tolerante (Cateto) ao Al, quando elas foram tratadas com Al 50 $\mu$ M a variedade HS 16x36 teve seu alongamento radicular afetado em apenas 45 min de tratamento, enquanto nenhum efeito foi observado na variedade Cateto antes de 4 horas de exposição ao Al. Fica evidente, portanto, a existência de fortes diferenças entre espécies e, até mesmo entre genótipos, quando se varia não apenas a concentração de Al mas também o tempo de tratamento.

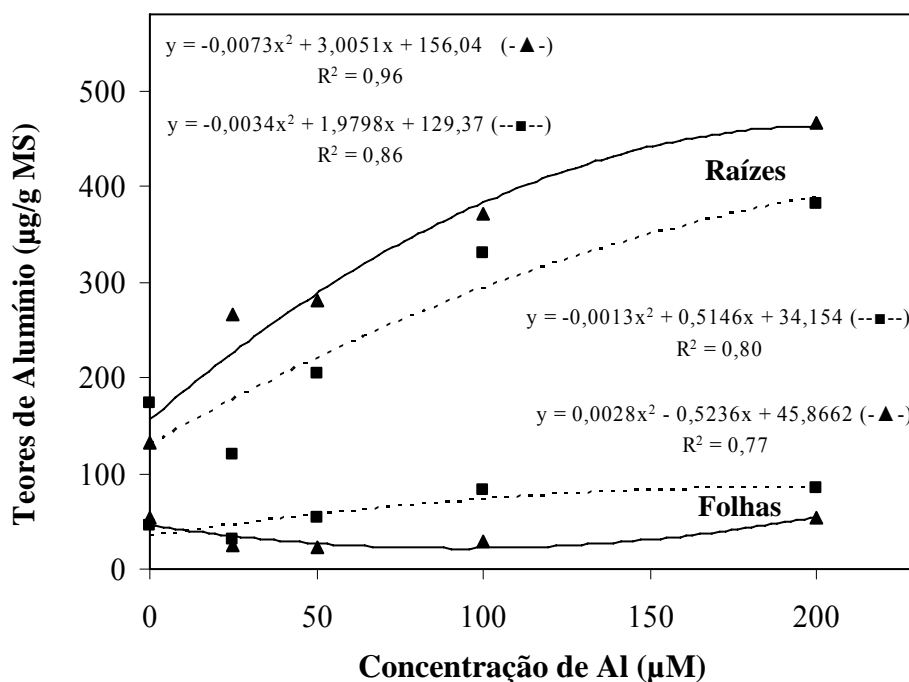
### **3.5 Teores de alumínio em folhas e raízes de plantas tratadas com este cátion**

Os teores de Al nas folhas do genótipo UFVM 100 decresceram ligeiramente com o incremento na concentração de Al na solução nutritiva até aproximadamente 100  $\mu$ M; e, então, voltaram a crescer atingindo na concentração mais elevada de Al valor aproximadamente igual ao das plantas controle (Figura 4). No genótipo UFVM 200 observou-se contínuo incremento nos teores de Al com o aumento na concentração deste elemento na solução nutritiva. Os teores de Al nas folhas do genótipo UFVM 200 foram sempre mais elevados do que no genótipo UFVM 100.

Os teores de Al nas raízes dos dois genótipos aumentaram com a elevação da concentração de Al na solução nutritiva (Figura 4). Ao contrário do observado nas folhas, os teores de Al nas raízes do genótipo UFVM 100 foram sempre mais elevados que o genótipo UFVM 200. Os teores de Al nas raízes foram em média 5,7 vezes mais elevados que nas folhas.

Trabalhando com duas linhagens de milho (*Zea mays* L.), com tolerância diferencial ao Al, GIANNAKOULA et al. (2007), constataram também aumento nos teores de Al em folhas e raízes com a exposição das plantas a concentrações de Al no meio de cultivo. Após sete dias de exposição ao Al na concentração de 480  $\mu$ M, encontraram teores de Al nas raízes cerca de 45 vezes maior na linhagem tolerante e de 65 vezes maior na sensível, em relação ao controle. O acúmulo de Al nas raízes dessas linhagens foi muito mais elevado que o observado neste experimento, demonstrando que o acúmulo de Al nas plantas, especialmente nas raízes, depende não apenas da

concentração do Al na solução de cultivo, mas também do tempo de exposição a este elemento.



**Figura 4.** Teores de Al em raízes e folhas de dois genótipos milho: UFVM 100 (-▲-) e UFVM 200 (--■--), submetidos a diferentes concentrações de Al, após tratamento por 24 horas.

A maior capacidade das raízes acumularem Al deve-se, provavelmente, à forte interação deste cátion trivalente com várias estruturas no sistema radicular (CLARK, 1977; FOY et al., 1978; ROY, 1988; TAYLOR, 1991), principalmente no apoplasto (LEMOS FILHO et al., 1983; KOCHIAN, 1995), rico em cargas negativas. Em muitos casos, a imobilização do Al na planta tem sido relacionada à sua precipitação na forma de compostos insolúveis, como por exemplo, na forma de fosfato (KOCHIAN, 1995). Este não foi o caso do presente experimento em que o tratamento com o Al foi feito numa solução contendo exclusivamente  $\text{CaCl}_2$ . Este fato, entretanto, pode ser parte da explicação também do porque as linhagens de milho utilizadas por GIANNAKOULA et al. (2007) acumularam mais Al.



### 3.6 Efeito do alumínio sobre a atividade da desidrogenase do malato

No genótipo UFVM 200, o tratamento com Al 25  $\mu\text{M}$  resultou em aumento de 42% na atividade da MDH nas folhas, enquanto nas raízes a atividade da enzima não se modificou com o tratamento. A atividade da MDH nas raízes deste genótipo foi cerca de 3,4 vezes maior do que nas folhas. Já o genótipo UFVM 100 não apresentou diferenças na atividade da MDH em ambas as partes analisadas (Quadro 2).

**Quadro 2.** Atividade da desidrogenase do malato em dois genótipos de milho, após 24 horas de tratamento com Al.

Cultivares	Al	Atividade da desidrogenase do malato	
		Folhas	Raízes
	$\mu\text{M}$	$(\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{proteína})$	
UFVM 100	0	56,4 Aa	192,9 Aa <sup>1</sup>
	25	55,8 Aa	193,8 Aa
UFVM 200	0	46,6 Ba	202,1 Aa
	25	66,5 Aa	190,3 Aa

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre tratamentos para cada cultivar e pela mesma letra minúscula entre cultivares, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Em cultivares de sorgo com tolerância diferencial ao Al, a atividade da MDH sofreu redução nas folhas, enquanto nas raízes aumentou no cultivar sensível e diminuiu no cultivar tolerante (GONÇALVES et al, 2005). Em arroz, por outro lado, a presença do Al no meio de cultivo não modificou a atividade da MDH em nenhuma das partes dos dois genótipos analisados. Contudo, o cultivar tolerante teve maior atividade de MDH que o cultivar sensível, com os maiores valores observados nas raízes (ALVES, 2005).

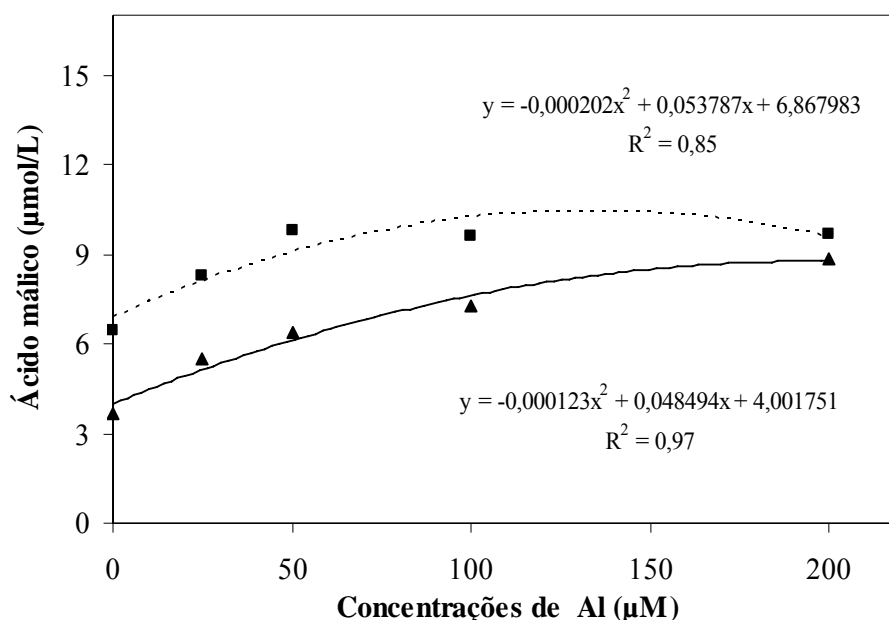
LI et al. (2000) realizando trabalhos com arroz e trigo obtiveram resultados semelhantes a ALVES (2005), não tendo encontrado nas espécies estudadas efeito significativo do Al na atividade da MDH entre o cultivar sensível e o tolerante, e entre plantas tratadas ou não com 50  $\mu\text{M}$  de Al por um período de 12h.

Os efeitos do Al sobre a atividade desta e de outras enzimas relacionadas ao metabolismo de ácidos orgânicos são variáveis com a espécie estudada e, talvez, outros fatores como, por exemplo, a concentração e o tempo de duração do tratamento com Al. Contudo, conforme se obteve aqui, um incremento na atividade desta enzima é esperado no genótipo tolerante, conferindo, produção de malato, que por meio de translocação pelo floema pode atingir as raízes e aumentar a exsudação para a solução de cultivo, se é que ele utiliza o mecanismo de exsudação de ácido málico para esta solução.

### 3.7 Efeito do alumínio sobre a exsudação de ácido málico

A concentração de ácido málico exsudado para a solução de cultivo aumentou, tanto para o genótipo sensível quanto para o tolerante, em resposta a exposição das plântulas a doses crescentes de Al, por 24 h (Figura 5).

Na ausência de Al, o genótipo tolerante (UFVM 200) apresentou maior exsudação de ácido málico do que o genótipo sensível (UFVM 100). O tratamento com Al aumentou a exsudação nos dois genótipos. Nas concentrações de Al de até 50  $\mu\text{M}$ , os incrementos na exsudação tiveram, praticamente, a mesma magnitude nos dois genótipos. A partir de 50  $\mu\text{M}$ , as taxas de incremento na exsudação decresceram nos dois genótipos, mas com maior magnitude no genótipo UFVM 200. A exsudação de



**Figura 5.** Efeito de concentrações de alumínio sobre a exsudação de ácido málico em dois genótipos de milho: UFVM 100 (-▲-) e UFVM 200 (--■--) após 24 h de tratamento.

ácido málico pelo genótipo UFVM 200, contudo, foi sempre maior do que no genótipo UFVM 100. A exsudação máxima de ácido málico ocorreu nas concentrações de 133 e 197  $\mu\text{M}$  de Al, para os genótipos UFVM 200 e UFVM 100, respectivamente.

Alguns trabalhos realizados com milho e outros cereais relatam respostas diferentes das obtidas no presente trabalho. PELLET et al (1996), trabalhando com dois cultivares (Atlas 66 resistente ao Al e Scout 66 sensível) e duas linhagens (ET3 resistente ao Al e ES3 sensível) de trigo, observaram que os genótipos resistentes apresentaram incremento na exsudação de ácido málico proporcional às concentrações de Al, de 5 e 20  $\mu\text{M}$ , após 7 dias de tratamento, e até 11 vezes maior do que a dos genótipos sensíveis ao Al. ALVES (2005) trabalhando com dois cultivares de arroz (Fernandes - tolerante e Maravilha – sensível ao Al), tratados com Al 1 mM, por período de sete dias, também observou incremento na exsudação de ácido málico de 2 a 3 vezes maior no cultivar tolerante.

Diversos trabalhos relatam que o Al induz a exsudação de ácido málico, mas que nem sempre este é um parâmetro para diferenciação de cultivares quanto a tolerância ao Al. Isto foi observado por PELLET et al. (1995) em cultivares de milho, SA 3 e Tuxpeño, tolerante e sensível ao Al, respectivamente, expostos a 10 e 20  $\mu\text{M}$  de Al ativo por 20 horas, em que não houve diferença entre os cultivares quanto à exsudação de ácido málico.

Apesar do genótipo UFVM 200, considerado mais tolerante ao Al, ter sempre exsudado mais ácido málico do que o genótipo UFVM 100 a concentração deste ácido na solução nutritiva foi cerca de 19 vezes menor do que em trigo (DELHAIZE et al., 1993) e, portanto, é pouco provável que constitua o mecanismo básico de tolerância ao Al destes genótipos de milho. Por outro lado, o aumento na atividade da enzima desidrogenase do malato, constatado apenas nas folhas do genótipo tolerante (Quadro 2), é sugestivo de estar ocorrendo maior produção e acúmulo de ácido málico nas folhas deste genótipo, conferindo-lhe maior tolerância interna, conforme sugerido por GONÇALVES et al. (2005) para cultivares de sorgo. Esta hipótese, contudo, precisa ser confirmada determinando se ocorre o acúmulo de ácido málico nos tecidos foliares do genótipo UFVM 200.

#### 4. RESUMOS E CONCLUSÕES

Neste trabalho foram avaliados os efeitos do Al sobre o alongamento radicular, a concentração de Al nos tecidos e a exsudação de ácido málico, em genótipos de milho desenvolvidos pelo Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. Os genótipos de milho com base na % de inibição do alongamento radicular da raiz principal foram classificados em duas categorias: a) mais sensíveis ao Al ( $\geq 68\%$  de inibição): UFVM 8 e UFVM 100; e b) mais tolerantes ao Al ( $\leq 64\%$ ): UFVM 6, UFVM 7, UFVM 9 e UFVM 200. Os genótipos UFVM 100 e UFVM 200 foram selecionados como representantes dos genótipos mais sensíveis e tolerantes, respectivamente, para os demais experimentos.

A redução no alongamento da raiz principal aumentou com a elevação da concentração de Al na solução nutritiva. O genótipo UFVM 200 mostrou-se mais tolerante que o genótipo UFVM 100 em todas as concentrações de Al, tendo as maiores diferenças entre os dois genótipos sido observadas entre 25 e 50  $\mu\text{M}$ . O alongamento da raiz principal aumentou linearmente com o tempo de exposição ao Al nos dois genótipos. Na concentração de 25  $\mu\text{M}$  o genótipo UFVM 200 foi mais tolerante ao Al ao longo de todo o período experimental estudado.

Os teores de Al nas folhas foram sempre baixas em comparação aos teores nas raízes, mas o genótipo UFVM 200 apresentou teores mais elevados que o genótipo UFVM 100. Nas raízes, os teores de Al aumentaram com a elevação na concentração de Al na solução de cultivo e foram sempre mais elevados no genótipo UFVM 100.

A atividade da enzima desidrogenase malato (MDH) só foi modificada pelo tratamento com Al nas folhas do genótipo tolerante.

A concentração de ácido málico exsudado para a solução de cultivo aumentou com a elevação da concentração de Al na solução nutritiva nos dois genótipos e foi sempre mais elevada no genótipo UFVM 200. As diferenças de exsudação entre os genótipos, entretanto, tenderam a desaparecer com a elevação da concentração de Al na solução nutritiva.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, R.M. Produção, acúmulo e exsudação de ácidos orgânicos em dois genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.), submetidos a níveis tóxicos de alumínio. Viçosa, MG: UFV. 2005. 77 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, 2005.
- AHN, S.J.; SIVAGURU, M.; CHUNG, G.C.; RENGEL, Z.; MATSUMOTO, H. Aluminum-induced growth inhibition is associated with impaired efflux and influx of H<sup>+</sup> across the plasma membrane in root apices of squash (*Cucurbita pepo*). **J. Exp. Bot.**, 53:1959-1966, 2002.
- AHN, S.J.; RENGEL, Z.; MATSUMOTO, H. Aluminum-induced plasma membrane surface potential and H<sup>+</sup>-ATPase activity in near-isogenic wheat lines differing in tolerance to aluminum. **New Phytol.**, 162:71-79, 2004.
- BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminum toxicity and resistance: a review. **Environ. Exp. Bot.**, 48:75-92, 2002.
- BENNET, R.J.; BREEN, C.M. The recovery of the roots of *Zea mays* L. from various aluminum treatments: towards elucidating the regulatory processes that underlies root growth control. **Environ. Exp. Bot.**, 31:153-163, 1991.
- BLANCAFLOR, E.B., JONES, D.L.; GILROY, S. Alterations in the cytoskeleton accompany aluminum-induced growth inhibition and morphological changes in primary roots of maize. **Plant Physiol.**, 118:159-172, 1998.

- CALBO, A.G.; CAMBRAIA, J. Efeito do alumínio sobre a composição mineral de dois cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench). **Rev. Ceres**, 27:369-378, 1980.
- CAMARGO, C.E.O.; FELÍCIO, J.C. Tolerância de cultivares de trigo, triticale e centeio em diferentes níveis de alumínio em solução nutritiva. **Bragantia**, 43:9-16, 1984.
- CAMBRAIA, J.; CAMBRAIA, M.C. Avaliação de híbridos de milho quanto à tolerância ao alumínio, em solução nutritiva. **Rev. Ceres**, 42:297-307, 1995.
- CAMBRAIA, J.; GALVANI, F.R.; ESTEVÃO, M.M.; SANT'ANNA, R. Effects of aluminum on organic acid, sugar and amino acid composition of the root system of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). **J. Plant Nutr.**, 6:313-322, 1983.
- CAMBRAIA, J.; SILVA, M.A.; OLIVA, M.A.; SANT'ANNA, R. Método simples para a avaliação de cultivares de sorgo quanto à tolerância ao alumínio. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, 3:87-95, 1991.
- CARE, D.A. The effect of aluminum concentration on root hairs in white clover (*Trifolium repens* L.). **Plant Soil**, 171:159-162, 1995.
- CHANG, Y.C.; MA, J.F.; MATSUMOTO, H. Mechanisms of Al-induced iron chlorosis in wheat (*Triticum aestivum*): Al-inhibited biosynthesis and secretion of phytosiderophore. **Physiol. Plant.**, 102:9-15, 1998.
- CLARK, R.B. Effect of aluminium on growth and mineral elements of Al tolerance and Al-intolerant corn. **Plant Soil**, 47:653-662, 1977.

- CLARKSON, D.T. Metabolic aspects of aluminum toxicity and some possible mechanisms for resistance. In: RORISON, I. H. (Ed.). **Ecological aspects of mineral nutrition of plants**. Oxford: Blackwell Scientific, p. 381-394, 1969.
- CRAWFORD, S.A.; WILKENS, S. Ultrastructural changes in root cap cells of two australian native grass species following exposure to aluminum. **Aust. J. Plant Physiol.**, 24:165-174, 1997.
- DELHAIZE E.; HEBB, D.M.; RYAN, P.R. Expression of a *Pseudomonas aeruginosa* citrate synthase gene in tobacco is not associated with either enhanced citrate accumulation or efflux. **Plant Physiol.**, 125:2059-2067, 2001.
- DELHAIZE, E.; RYAN P.R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiol.**, 107:315-321, 1995.
- DELHAIZE, E.; CRAIG, S.; BEATON, C.D.; BENNET, R.J.; JAGADISH, V.C.; RANDALL, P.J. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. **Plant Physiol.**, 103:695-702, 1993.
- DONCHEVA, S.; AMENÓS, M.; POSCHENRIEDER, C.; BARCELÓ, J. Root cell patterning: a primary target for aluminum toxicity in maize. **J. Exp. Bot.**, 56:1213-1220, 2005.
- ECHARTE, C.L.; MOLINA, S.C. Fitotoxicidade do alumínio: efeitos, mecanismos de tolerância e seu controle genético. **Ciência Rural**, 31:531-541, 2001.

FERREIRA, R.P.; MOREIRA, A.; RASSINI, J.B. Toxidez de alumínio em culturas anuais. **Embrapa Pecuária Sudeste**. Documentos, 63, 35p., 2006.

FOY, C.D. Differential aluminum and manganese tolerances of plant species and varieties in acid soils. **Ciência e Cultura**, 28:150-155, 1976.

FOY, C.D.; CHANEY, R.L.; WHITE, M.C. The physiology of metal toxicity in plants. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, 29:511-516, 1978.

GIANNAKOULA, A.; MOUSTAKAS, M.; MYLONA, P.; PAPADAKIS, L.; YUPSANIS, T. Aluminum tolerance in maize is correlated with increased levels of mineral nutrients, carbohydrates and proline, and decreased levels of lipid peroxidation and accumulation. **J. Plant Physiol.** Article in press, 2007.

GONÇALVES, J.F.C.; CAMBRAIA, J.; MOSQUIM, P.R.; ARAÚJO, E.F. Aluminum effect on the organic acid production and accumulation in sorghum. **J. Plant Nutr.**, 28:507-520, 2005.

GONÇALVES, J.F.C.; PEIXOTO, P.H.P.; CAMBRAIA, J. Toxicidade do alumínio em plantas. **Universa**, 18:243-258, 2000.

HAYES, J.E.; MA, J.F. Al-induced efflux of organic acid anions is poorly associated with internal organic acid metabolism in triticale roots. **J. Exp. Bot.**, 54:1753-1759, 2003.



- JONES, D.L.; KOCHIAN, L.V. Aluminum inhibition of the inositol 1,4,5-triphosphate signal transduction pathway in wheat roots: role in aluminum toxicity? **Plant Cell**, 7:1913-1922, 1995.
- JORGE, R.A.; ARRUDA, P. Aluminum-induced organic acids exudation by roots of an aluminum-tolerance tropical maize. **Phytochemistry**, 48:675-681, 1997.
- KIDD, P.S.; LLUGANY, M.; POSCHENRIEDER, C.; GUNSE, B.; BARCELÓ, J. The role of root exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminum toxicity in three varieties of *Zea mays* L. **J. Exp. Bot.**, 52:1339-1352, 2001.
- KIKUI, S.; SASAKI, T.; OSAWA, H.; MATSUMOTO, H.; YAMAMOTO, Y. Malate enhances recovery from aluminum-caused inhibition of root elongation in wheat. **Plant Soil**, 290:1-15, 2007.
- KOCHIAN, L.V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, 46:237-260, 1995.
- KOCHIAN, L.V.; HOEKENGA, O.A.; PIÑEROS, M.A. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annu. Rev. Plant Biol.**, 55:459-493, 2004.
- LEMOS FILHO, J.P.; CAMBRAIA, J.; OLIVA, M.A. Efeito do Al sobre a fotossíntese em dois cultivares de sorgo. **Rev. Ceres**, 30:55-62, 1983.

- LI, X.F.; MA, J.F.; MATSUMOTO, H. Pattern of aluminum-induced secretion of organic acids differs between rye and wheat. **Plant Physiol.**, 123:1537-1544, 2000.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, 193:265-275, 1951.
- MA, J.F.; HIRATE, S.S.; NOMOTO, K; IWASHITA, T; MATSOMOTO, H. Internal detoxification mechanism of Al in hydrangea. **Plant Physiol.**, 113:1033-1039, 1997.
- MA, Z.; MIYASAKA, S.C. Oxalate exudation by taro in response to Al. **Plant Physiol.**, 118:861-865, 1998.
- MA, J.F.; RYAN, P.R.; DELHAIZE, E. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. **Trends Plant Sci.**, 6:273-78, 2001.
- MA, J.F.; TAKETA, S.; YANG, Z.M. Aluminum tolerance genes on the short arm of chromosome 3R are linked to organic acid release in triticale. **Plant Physiol.**, 122:687-94, 2000.
- MA, J.F.; ZHENG, S.J.; MATSUMOTO, H. Specific secretion of citric acid induced by Al stress in *Cassia tora* L. **Plant Cell Physiol.**, 38:1019-1025, 1997.
- MACHADO, E.C.; PEREIRA, A.R. Eficiência de conversão e coeficiente de manutenção da planta inteira, das raízes e da parte aérea em milho e arroz submetidos ao estresse de alumínio. **Pesq. Agrop. Bras.**, 25:845-855, 1990.

- MARIANO, E.D.; KELLTJENS, W.G. Evaluating the role of root citrate exudation as a mechanism of aluminium resistance in maize genotypes. **Plant Soil**, 256:469-479, 2003.
- MASCARENHAS, H.A.A.; CAMARGO, E.O.; FALIVENE, S.M.P. Efeito do alumínio sobre o alongamento radicular de raízes, peso seco da parte aérea e raízes de diferentes cultivares de soja. **Bragantia**, 43:191-200, 1984.
- MAZZOCATO, A.C.; ROCHA, P.S.G.; SERENO, M.J.C.M.; BOHNEN, H.; GRONGO, V.; NETO, J.F.B. Tolerância ao alumínio em plântulas de milho. **Ciência Rural**, 32:19-24, 2002.
- MENDONÇA, R.J.; CAMBRAIA, J.; OLIVEIRA, J.A.; OLIVA, M.A. Efeito do alumínio na absorção e na utilização de macronutrientes em duas cultivares de arroz. **Pesq. Agropec. Bras.**, 38:843-848, 2003.
- MINOCHA, R.; MINOCHA, S.C.; STEPHANIE, L.L. Effects of aluminum on DNA synthesis, cellular polyamines, polyamine biosynthetic enzymes and inorganic ions in cell suspension cultures of a woody plant *Catharauthus roseus*. **Physiol. Plant.**, 85:417-424, 1992.
- NGUYEN, V.T.; BUROW, M.D.; NGUYEN, H.T.; LE, B.T.; LE, T.D.; PATERSON, A.H. Molecular mapping of genes conferring aluminum tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, 102:1002-1010, 2001.

- PELLET, D.M.; GRUNES, D.L.; KOCHIAN, L.V. Organic acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). **Planta**, 196:788-795, 1995.
- PELLET, D.M.; PAPERNIK, L.A.; KOCHIAN, L.V. Multiple aluminum resistance mechanisms in wheat: Roles of root apical phosphate and malate exudation. **Plant Physiol.**, 112:591-597, 1996.
- PIÑEROS, M.A. The physiology and biophysics of an aluminum tolerance mechanism based on root citrate exudation in maize. **Plant Physiol.**, 129:1194-1206, 2002.
- PIÑEROS, M.A.; SHAFF, J.E.; MANSLANK, H.S.; ALVES, V.M.C.; KOCHIAN, L.V. Aluminum resistance in maize cannot be solely explained by root organic acid exudation. A comparative physiological study. **Plant Physiol.**, 137:231-234, 2005.
- RIBEIRO, C. Sistemas de defesa contra estresses oxidativos em dois cultivares de arroz (*Oryza Sativa* L.) com tolerância diferencial ao alumínio. Viçosa, MG: UFV. 2007. 60 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, 2007.
- ROUT, G.R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. Aluminum toxicity in plants: a review. **Agronomie**, 21:3-21, 2001.
- RYAN, P.R.; DELHAIZE, E.; JONES, D.L. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, 52:527-560, 2001.

- ROY, K.A.; SHARMA, A.; TALUKTER, G. Some aspects of aluminum toxicity in plants. **Bot. Rev.**, 54:145-78, 1988.
- RHUE, R.D.; GROGAN, C.O. Screening corn for aluminum tolerance. In: **Proceedings of workshop on 'Plant Adaptation to Mineral Stress in Problem Soils'**. Beltsville, Maryland Nov. 22–23, 1976. Cornell University, Ithaca, 1976. 420p.
- RYAN, P.R.; KOCHIAN, L.V. Interaction between aluminum toxicity and calcium uptake at the root apex in near-isogenic lines of wheat (*Triticum aestivum* L.) differing in aluminum tolerance. **Plant Physiol.**, 102:975-982, 1993.
- RYAN, P.R.; SHAFF, J.E.; KOCHIAN, L.V. Aluminum toxicity in roots. **Plant Physiol.**, 99:193-1200, 1992.
- SAPRA, V.T.; MEBRAHTO, T; MUGWIRA, L.M. Soybean germplasm and cultivar aluminum tolerance in nutrient solution and Bladen Clay Loam Soil. **Agron. J.**, 74:687-690, 1982.
- SILVA, I.R.; SMYTH, T.J.; BARROS, N.F.; NOVAIS, R.F. Physiological aspects of aluminum toxicity and tolerance in plants. **Tópicos em Ciência Solo**, 2:277-355, 2002.
- SILVA, I.R.; SMYTH, T.J.; CARTER, T.E.; ALLEN, N.S.; RUFTY, T.W. Aluminum accumulation at nuclei of cells in the root tip. Fluorescence detection using lumogallion and confocal laser scanning microscopy. **Plant Physiol.**, 123:543-552, 2000.

- SILVA, I.R.; SMYTH, T.J.; ISRAEL, D.W.; RUFTY, T.W. Altered aluminum inhibition of soybean root elongation in the presence of magnesium. **Plant and Soil**, 230:223-230, 2001.
- SIVAGURU, M.; BALUSKA, F.; VOLKMANN, D.; FELLE, H.H.; HORST, W.J. Impacts of aluminum on the cytoskeleton of the maize root apex: short-term effects on the distal part of the transition zone. **Plant Physiol.**, 119:1073-1082, 1999.
- SIVAGURU, M.; FUJIWARA, T.; SAMAJ, J.; BALUSKA, F.; YANG, Z.; OSAWA, H.; MAEDA, T.; MORI, T.; VOLKMANN, D.; MATSUMOTO, H. 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 Physiol.**, 124:991-1005, 2000.
- SIVAGURU, M.; HORST, W. The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize. **Plant Physiol.**, 116:155-63, 1998.
- SIVAGURU, M.; PALIWAL, K. Differential aluminum tolerance in some tropical rice cultivars: II. Mechanism of aluminum tolerance. **J. Plant Nutr.**, 16:1717-1732, 1993.
- TAYLOR, G.J. Current views of the aluminum stress response: the physiological basis of tolerance. **Curr Top. Plant Biochem. Physiol.**, 10:57-93, 1991.

VITORELLO, V.A.; CAPALDI, F.R.; STEFANUTO, V.A. Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. **Braz. J. Plant Physiol.**, 17:129-143, 2005.

WALLACE, S.; HENNING, S.; ANDERSON, I.C. Elongation, Al concentration, and hemotoxilin staining of aluminum-treated wheat roots. **Iowa State J. Res.**, 57:97-106, 1982.

WANG, C.; WOOD, F.A. A modified aluminon reagent for the determination of aluminum after HNO<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> digestion. **Can. J. Soil Sci.**, 53:237-239, 1973.

## **6. APÊNDICE**



**Quadro 1** – Análise de variância sumarizada do efeito do alumínio sobre o comprimento da raiz principal, em seis genótipos de milho.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio	F
		Raízes	Raízes
Níveis de Al	1	19,59667	816,74*
Genótipos	5	0,2867953	11,95*
Al*Genótipos	5	0,1723657	7,18*
Resíduo	22	0,02399391	
CV (%)		10,068	

\*Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade

**Quadro 2** – Análise de variância sumarizada do efeito do alumínio sobre percentagem de inibição do alongamento radicular em seis genótipos de milho.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio	F
		Raízes	Raízes
Genótipos	5	60,78347	4,51*
Resíduo	10	22,43416	1,67*
CV (%)		5,7066	

\*Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade

**Quadro 3** – Análise de variância sumarizada do efeito de concentrações crescentes de Al sobre o comprimento da raiz principal de dois genótipos de milho submetidos ao tratamento por 24 horas.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio	F
		Raízes	Raízes
Níveis de Al	4	2,991718	177,96*
Genótipos	1	0,8816327	52,44*
Al*Genótipos	4	0,1187245	7,06*
Resíduo	18	0,01681104	
CV (%)		12,966	

\*Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade

**Quadro 4** – Análise de variância sumarizada do efeito de concentrações crescentes de Al sobre a percentagem de inibição da maior raiz de dois genótipos de milho submetidos ao tratamento por 24 horas.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio	F
		Raízes	Raízes
Níveis de Al	4	6628,996	1501,51*
Genótipos	1	375,5463	85,06*
Al*Genótipos	1	219,3268	49,68*
Resíduo	18	4,414872	
CV (%)		3,9759	

\*Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade

**Quadro 5** – Análise de variância sumarizada do efeito do alumínio sobre o comprimento da raiz principal do genótipo de milho UFVM 100 e UFVM 200 submetido ao tratamento com 0  $\mu\text{M}$  de Al por 24 horas.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio		F	
		UFVM 100 0 $\mu\text{M}$ Al	UFVM 200 0 $\mu\text{M}$ Al	UFVM 100 0 $\mu\text{M}$ Al	UFVM 200 0 $\mu\text{M}$ Al
Tempo	4	3,049047	2,590432	156,864*	244,464*
Resíduo	8	0,01943750	0,01059635		
CV (%)		11,161	8,836		

\*Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade

**Quadro 6** – Análise de variância sumarizada do efeito do alumínio sobre o comprimento da raiz principal do genótipo de milho UFVM 100 e UFVM 200 submetido ao tratamento com 25 $\mu\text{M}$  de Al por 24 horas.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio		F	
		UFVM 100 25 $\mu\text{M}$ Al	UFVM 200 25 $\mu\text{M}$ Al	UFVM 100 25 $\mu\text{M}$ Al	UFVM 200 25 $\mu\text{M}$ Al
Tempo	4	0,2856927	0,7421354	483,286*	571,102*
Resíduo	8	0,0005911458	0,001299479		
CV (%)		5,057	5,243		

\*Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade

**Quadro 7** – Análise de variância sumarizada do efeito do alumínio sobre o comprimento da raiz principal do genótipo de milho UFVM 100 e UFVM 200 submetido ao tratamento com 50 $\mu\text{M}$  de Al por 24 horas.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio		F	
		UFVM 100 50 $\mu\text{M}$ Al	UFVM 200 50 $\mu\text{M}$ Al	UFVM 100 50 $\mu\text{M}$ Al	UFVM 200 50 $\mu\text{M}$ Al
Tempo	4	0,3570677	0,2909010	573,699*	371,116*
Resíduo	8	0,0006223958	0,0007838542		
CV (%)		5,126	6,436		

\*Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade

**Quadro 8** – Análise de variância sumarizada do efeito do alumínio sobre o comprimento da raiz principal do genótipo de milho UFVM 100 e UFVM 200 submetido ao tratamento com 100 $\mu\text{M}$  de Al por 24 horas.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio		F	
		UFVM 100 100 $\mu\text{M}$ Al	UFVM 200 100 $\mu\text{M}$ Al	UFVM 100 100 $\mu\text{M}$ Al	UFVM 200 100 $\mu\text{M}$ Al
Tempo		0,3862500	0,2764427	2247,273*	933,416*
Resíduo		0,0001718750	0,0002942708		
CV (%)		2,784	4,005		

\*Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade

**Quadro 9** – Análise de variância sumarizada do efeito do alumínio sobre teores deste cátion em folhas e raízes de dois genótipos de milho após vinte e quatro horas de tratamento em doses crescentes de Al.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio		F	
		Folhas	Raízes	Folhas	Raízes
Níveis de Al	4	1423,082	75918,78	21,29*	25,45*
Genótipos	1	3759,070	28675,21	56,23*	9,61*
Al*Genótipos	4	847,5740	6928,405	12,68*	2,32 <sup>NS</sup>
Resíduo	18	66,85101	2982,638		
CV (%)		17,094	20,040		

\*Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade

<sup>NS</sup>Não –Significativo

**Quadro 10** – Análise de variância sumarizada do efeito do Al sobre a atividade da desidrogenase do malato em dois genótipos de milho após 24 horas de cultivo.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio		F	
		Folhas	Raízes	Folhas	Raízes
Níveis de Al	1	89.03273	279.3259	0.11*	3.60 <sup>NS</sup>
Genótipos	1	24.44062	0.6188354	0.03*	0.01*
Al*Genótipos	1	122.3141	317.8397	0.15*	4.10 <sup>NS</sup>
Resíduo	6	820.0373	77.60137		
CV (%)		14,704	15,638		

\*Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade

<sup>NS</sup>Não –Significativo

**Quadro 11** – Análise de variância sumarizada do efeito do Al sobre o teor de ácido málico em dois genótipos de milho após 24 horas de cultivo.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio		F	
		Folhas	Raízes	Folhas	Raízes
Níveis de Al	4	15,99268		21,01*	
Genótipos	1	43,43525		57,06*	
Al*Genótipos	4	1,389892		1,83 <sup>NS</sup>	
Resíduo	18	0,7612698			
CV (%)		11,584			

\*Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade

<sup>NS</sup>Não –Significativo