

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**

FELIPE FURLAN

Tolerância diferencial ao alumínio em plantas do gênero *Brachiaria*: morfologia de raízes, sistema antioxidativo e alumínio trocável no apoplasto radicular

**Piracicaba
2014**

Felipe Furlan
Engenheiro Agrônomo

Tolerância diferencial ao alumínio em plantas do gênero *Brachiaria*: morfologia de raízes, sistema antioxidativo e alumínio trocável no apoplasto radicular

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. José Lavres Junior

Piracicaba
2014

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Furlan, Felipe

Tolerância diferencial ao alumínio em plantas do gênero *Brachiaria*: morfologia de raízes, sistema antioxidativo e alumínio trocável no apoplasto radicular / Felipe Furlan; orientador José Lavres Junior. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2014.

107 f.: fig.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Estresse oxidativo 2. Enzimas 3. Gramíneas forrageiras 4. Nutrição Vegetal 5. Sistema radicular 6. Toxicidade por alumínio I. Título

CDU 631.811:631.453

Aos meus pais, Antônio Aparecido Furlan e Olga Maria Fabrício Furlan, aos familiares e aos amigos, pelo apoio, oportunidade de estudo, dedicação e incentivo.

OFEREÇO E DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conceder o dom da vida e iluminar todos os caminhos por onde passei.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA/USP, por me acolher e fornecer a infraestrutura necessária para a realização da respectiva pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Ref. Proc. 2013/02986-0), pela concessão da bolsa de mestrado e acreditar em meu trabalho.

Ao Prof. Dr. José Lavres Junior, pelo exemplo de pessoa, amizade, orientação, dedicação e confiança no meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo, por oferecer a infraestrutura do Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas da ESALQ/USP.

À Prof. Dr^a. Adriana Pinheiro Martinelli, pela colaboração e conselhos nas análises de microscopia.

À Bióloga Cleusa Pereira Cabral, pela amizade, conselhos e ajuda nas análises laboratoriais.

À Mônica Lanzoni Rossi, do Laboratório de Histopatologia Vegetal, pela amizade, imensa ajuda e dedicação nas análises de microscopia.

À Dr^a. Salete Aparecida Gaziola, do Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas, pela ajuda, conselhos, auxílio e paciência nas análises bioquímicas.

À Aparecida de Fátima Patreze, do Laboratório de Química Analítica, pela paciência e auxílio nas análises químicas.

Em especial, a Dr^a. Lucélia Borgo, pela imensa ajuda, conselhos, paciência e ensinamentos.

Aos amigos do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas do CENA: Aline Grella de Campos, Bruno José Zanchim, Dr^a. Cristiane Prezotto Silveira, Elcio Ferreira dos Santos, Fernando Giovannetti de Macedo, Flávio Henrique Silveira Rabêlo, Joaquim José Frazão, Raphael Florencio Garrone, Riviane Maria de Albuquerque Donha, pelo companheirismo e ajuda durante todo o período da pós-graduação.

À Biblioteca do CENA e a Adriana Bueno Moretti pela ajuda e revisão das normas técnicas.

Aos funcionários do CENA, pela pronta colaboração.

Às empresas JC Maschietto e Agrosalles, pelo fornecimento das sementes dos genótipos de *Brachiaria*.

“Se você quer ser bem sucedido, precisa ter dedicação total, buscar seu último limite e dar o melhor de si.”

Airton Senna da Silva

RESUMO

FURLAN, F. **Tolerância diferencial ao alumínio em plantas do gênero *Brachiaria*: morfologia de raízes, sistema antioxidativo e alumínio trocável no apoplasto radicular.** 2014. 107 f. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

Os vegetais apresentam variados mecanismos de defesa, os quais conferem tolerância a elementos considerados tóxicos, como o alumínio (Al). Em primeiro experimento, objetivou-se avaliar a tolerância diferencial ao Al em quatro plantas forrageiras do gênero *Brachiaria* (*B. decumbens* cv. Basilisk, *B. brizantha* cv. Marandu, *B. brizantha* cv. Piatã e *B. brizantha* cv. Xaraés), por meio da quantificação da área foliar; aspectos morfológicos do sistema radicular (comprimento total e superfície total de raízes); produção de biomassa de raízes e parte aérea; concentração, acúmulo e transporte de Al à longa distância; peroxidação lipídica em tecidos de folhas e raízes e concentração de H_2O_2 nas folhas. As concentrações de Al empregadas na solução nutritiva foram de 0; 0,44; 0,89 e $1,33\text{ mmol L}^{-1}$, as quais foram distribuídas conforme delineamento experimental de blocos completos ao acaso, utilizando-se esquema fatorial 4×4 (quatro doses de Al x quatro genótipos de *Brachiaria*), com quatro repetições. A atividade do Al^{3+} livre na solução nutritiva foi estimada utilizando o *software GeoChem-EZ*[®], o qual evidenciou que cerca de 81% do Al estava disponível, considerando a variação nos valores de pH de 3,0 a 4,0. A adição de Al na solução nutritiva resultou na redução de parâmetros produtivos da parte aérea e do sistema radicular, além de aumentar a concentração e o acúmulo do metal nas raízes. Por intermédio de tais parâmetros, permitiu-se a seguinte classificação, quanto à tolerância diferencial ao Al: *B. brizantha* cv. Xaraés > *B. decumbens* cv. Basilisk $\geq$ *B. brizantha* cv. Piatã > *B. brizantha* cv. Marandu. No segundo experimento a *B. brizantha* cv. Marandu (menor tolerância) e a *B. brizantha* cv. Xaraés (maior tolerância) foram cultivadas em solução nutritiva e, em seguida, foram efetuadas avaliações referentes à morfologia e anatomia do sistema radicular (pêlos radiculares), por meio de microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura, determinação do Al no apoplasto e simplasto das raízes, bem como a quantificação da atividade de enzimas antioxidantes catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GPOX) e glutathione redutase (GR), em folhas e raízes. Utilizaram-se as concentrações de Al na solução de 0 e $1,33\text{ mmol L}^{-1}$, as quais foram distribuídas conforme delineamento experimental de blocos completos ao acaso, utilizando-se esquema fatorial 2×2 (duas concentrações de Al x dois genótipos de *Brachiaria*), com oito repetições. As atividades das enzimas CAT,

APX, GPOX e GR foram mais expressas em tecidos radiculares. O excesso de Al reduziu a atividade da CAT e da GPOX nas raízes de *B. brizantha* cv. Xaraés e da APX e GR nas raízes de *B. brizantha* cv. Marandu. Quanto à compartimentação do Al no sistema radicular, constatou-se que a maior parte do metal concentrou-se no simplasto radicular, para ambos os genótipos. Por sua vez, na condição de excesso do metal, a maior concentração de Al trocável no apoplasto radicular foi verificada no cultivar Xaraés, sendo 49% superior ao cultivar Marandu. Foram verificadas maiores injúrias na epiderme radicular, como microfissuras e descamação, no cultivar Marandu. Os resultados fornecem evidências de que os genótipos de *Brachiaria* apresentam distintas respostas ao excesso de Al, com maior ou menor eficiência, caracterizando a tolerância diferencial.

Palavras-chave: compartimentação, comprimento radicular, eletromicrografias.

ABSTRACT

FURLAN, F. **Differential aluminum tolerance in plants of *Brachiaria* genus: root system morphology, antioxidant system and exchangeable aluminum in root apoplast.** 2014. 107 f. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

A variety of plant defense mechanisms have been shown, which confer tolerance to elements considered toxics, such as aluminum (Al). The aim of the first experiment was to evaluate the differential aluminum tolerance in four forage plants of *Brachiaria* genus (*B. decumbens* cv. Basilisk, *B. brizantha* cv. Marandu, *B. brizantha* cv. Piatã and *B. brizantha* cv. Xaraés), by measuring leaf area; root system morphology (total root length and total root surface); quantifying roots and plant top biomass yield; the Al-concentration, uptake and Al-long distance transport; evaluating lipid peroxidation in roots and leaves tissues, as well as the H₂O₂ content in leaves. Aluminum rates used were 0; 0.44; 0.89 and 1.33 mmol L⁻¹, which were distributed as randomized block design, using a factorial 4 x 4 (four Al rates x four *Brachiaria* genotypes), with four replications. The free Al³⁺ activity in the nutrient solution was estimated using the software *GeoChem-EZ*[®], revealing that around 81% of Al was available, considering the pH range between 3.0 and 4.0. Al addition in the nutrient solution decreased the plant top and root dry matter yield, increased Al-concentration and uptake in the roots. Though all these parameters, this following rank - as related to differential Al tolerance - was done: *B. brizantha* cv. Xaraés > *B. decumbens* cv. Basilisk ≥ *B. brizantha* cv. Piatã > *B. brizantha* cv. Marandu. In the second experiment, *B. brizantha* cv. Marandu (lower Al tolerance) and *B. brizantha* cv. Xaraés (higher Al tolerance) were grown in nutrient solution, with 0 and 1.33 mmol L⁻¹ Al-concentrations, which were distributed as randomized block design, using a factorial 2 x 2 (two Al rates x two *Brachiaria* genotypes), with eight replications. Root system morphology and anatomy (root hairs) evaluations by using light and scanning electron microscopy, the Al concentration in the apoplast and symplast of roots, as well as the antioxidant enzymes activities such as catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GPOX) and glutathione reductase (GR) were taken in the leaves and roots tissues. The CAT, APX, GPOX and GR activities were more expressed in root tissues than leaves tissues. Al toxicity decreased CAT and GPOX activities in roots of *B. brizantha* cv. Xaraés on the one hand; and the other the APX and GR activity in *B. brizantha* cv. Marandu roots. As regards to Al partition in root system compartments, it was found that most of metal was accumulated in symplast, to both genotypes. On the other hand, in metal

excess condition, the highest Al concentration on the root apoplast was verified to Xaraés cultivar, being 49% higher than those quantified on the Marandu cultivar. Major injuries were found in the root epidermis, as ruptures and small clefts, which in turn have induced significant structural changes on the root surface of Marandu genotype. Taken together, the results provide evidences that *Brachiaria* genotypes have distinct responses to Al excess, with greater or lesser efficiency mechanism, featuring differential Al-tolerance.

Keywords: epidermal cell patterning, scanning electron microscopy, total root length.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Importância das pastagens	17
2.2 Características dos genótipos de <i>Brachiaria</i>	17
2.2.1 <i>Brachiaria decumbens</i> cultivar Basilisk.....	17
2.2.2 <i>Brachiaria brizantha</i> cultivar Marandu.....	18
2.2.3 <i>Brachiaria brizantha</i> cultivar Piatã	18
2.2.4 <i>Brachiaria brizantha</i> cultivar Xaraés	18
2.3 Alumínio no solo	19
2.4 Alumínio na planta	20
2.5 Mecanismos de tolerância ao alumínio	22
2.6 O alumínio e a resposta do sistema antioxidante das plantas	24
Referências	28
3 TOLERÂNCIA DIFERENCIAL AO ALUMÍNIO EM QUATRO GRAMÍNEAS FORRAGEIRAS: PARÂMETROS DE CRESCIMENTO, ABSORÇÃO, TRANSPORTE DE Al À LONGA DISTÂNCIA E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.	35
Resumo	35
Abstract.....	37
3.1 Introdução.....	39
3.2 Material e Métodos	40
3.2.1 Condições de crescimento e delineamento experimental	40
3.2.2 Estimativa das espécies de alumínio na solução nutritiva.....	41
3.2.3 Coleta do material vegetal e avaliações de parâmetros produtivos da parte aérea.....	41
3.2.4 Avaliações de parâmetros produtivos e morfológicos do sistema radicular	42
3.2.5 Concentração, acúmulo e transporte à longa distância de alumínio.....	42
3.2.6 Determinação do peróxido de hidrogênio e da peroxidação de lipídeos.....	43
3.2.7 Análise estatística	44
3.3 Resultados.....	44
3.3.1 Variação dos valores de pH no período experimental	44
3.3.2 Especificação química da solução nutritiva.....	46
3.3.3 Parâmetros produtivos da parte aérea	48
3.3.4 Massa seca de raízes, comprimento e superfície radicular	51
3.3.5 Concentração, acúmulo de alumínio nas folhas e raízes e transporte à longa distância..	53
3.3.6 Peroxidação lipídica e peróxido de hidrogênio	56
3.4 Discussão	57
3.5 Conclusões.....	61
Referências	62
4 RESPOSTA DO SISTEMA ANTIOXIDANTE, COMPARTIMENTAÇÃO DO ALUMÍNIO NO APOPLASTO E SIMPLASTO E MODIFICAÇÕES NA ANATOMIA RADICULAR.....	65
Resumo	65

Abstract	67
4.1 Introdução	69
4.2 Material e Métodos	70
4.2.1 Material vegetal, condições de crescimento e delineamento experimental	70
4.2.2 Coleta do material vegetal.....	71
4.2.3 Avaliações	72
4.2.3.1 Concentração, acúmulo e transporte à longa distância de alumínio	72
4.2.3.2 Determinação do peróxido de hidrogênio e da peroxidação de lipídeos	72
4.2.3.3 Extração de proteínas	73
4.2.3.4 Catalase (CAT)	74
4.2.3.5 Ascorbato peroxidase (APX)	74
4.2.3.6 Guaiacol peroxidase (GPOX)	74
4.2.3.7 Glutathione redutase (GR)	75
4.2.4 Compartimentação do alumínio nas raízes: absorção simplástica e Al trocável no apoplasto	75
4.2.5 Análises anatômicas e ultraestruturais das raízes	76
4.2.5.1 Preparo do material radicular para microscopia de luz	76
4.2.5.2 Preparo do material radicular para microscopia eletrônica de varredura.....	77
4.2.6 Análise estatística.....	77
4.3 Resultados	78
4.3.1 Variação dos valores de pH no período experimental	78
4.3.2 Massa seca da parte aérea e de raízes	78
4.3.3 Concentração, acúmulo de alumínio nas folhas e nas raízes e transporte à longa distância	79
4.3.4 Peroxidação lipídica e peróxido de hidrogênio.....	81
4.3.5 Catalase (CAT)	83
4.3.6 Ascorbato peroxidase (APX)	84
4.3.7 Guaiacol peroxidase (GPOX)	85
4.3.8 Glutathione redutase (GR)	85
4.3.9 Compartimentação do alumínio nas raízes: absorção simplástica e Al trocável no apoplasto	86
4.3.10 Modificações anatômicas e ultraestruturais nas raízes	88
4.4 Discussão	91
4.5 Conclusões	96
Referências.....	97
APÊNDICES.....	102

1 INTRODUÇÃO

As pastagens possuem relevante importância para a pecuária brasileira, por consistirem a base da alimentação de rebanhos bovinos, ovinos e caprinos. A área agricultável do país ocupada por pastagens abrange aproximadamente 22% do território nacional. Dentre as gramíneas forrageiras utilizadas, o gênero *Brachiaria* destaca-se pelo alto rendimento de biomassa, produção de sementes e pela qualidade nutricional. Contudo, o potencial produtivo de determinados genótipos de *Brachiaria* tendem a declinar, em virtude do manejo inadequado do sistema solo-planta.

Em regiões tropicais, extensas áreas são ocupadas por solos ácidos e com alta saturação por alumínio (Al) no complexo de troca, contexto pelo qual, muitas vezes, se insere a produção de gramíneas forrageiras. Nesse sentido, em solos ácidos há o aumento na disponibilidade do Al fitotóxico na solução do solo. O principal sintoma resultante da toxidez causada pelo metal é a redução no crescimento do sistema radicular, e por consequência a redução na absorção de água e nutrientes pelas plantas. Por esse motivo, o Al é considerado um dos principais fatores abióticos que limitam a produtividade agrícola em tais regiões.

O gênero *Brachiaria* abrange gramíneas forrageiras consideradas tolerantes ao Al. À característica de determinadas plantas em tolerar a presença de Al é resultante de mecanismos adaptativos de cada genótipo. Tais mecanismos podem evitar a entrada do metal nas raízes (exclusão) e/ou complexar o elemento no meio celular (detoxificação). Em conjunto, a participação do sistema antioxidativo das plantas, também exerce papel importante para reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO'S) e os danos nas células vegetais. Contudo, no mesmo gênero é possível observar respostas fisiológicas e bioquímicas distintas mediante a adição de Al no meio de cultivo. Portanto, a eficiência na restrição à entrada e/ou a complexação do Al, por meio de diversas reações bioquímicas são ferramentas efetivas para caracterizar a tolerância diferencial ao metal.

As hipóteses formuladas no presente trabalho é que a adição de Al: i) limita o crescimento de parâmetros produtivos da parte aérea e do sistema radicular, ocasiona maior concentração e acúmulo de Al nas partes vegetais de genótipos com menor tolerância ao metal; ii) a compartimentação do Al no apoplasto radicular no genótipo tolerante está correlacionado a maior eficiência do sistema antioxidativo e a preservação das ultraestruturas celulares, resultando em menor transporte à longa distância e, por sua vez, reduzindo o acúmulo na parte aérea.

Com o objetivo geral de avaliar a tolerância diferencial ao Al para os genótipos de *Brachiaria*, estudaram-se os seguintes objetivos específicos: i) quantificar a área foliar e a produção de biomassa da parte aérea e do sistema radicular; ii) avaliar a morfologia das raízes; iii) determinar as concentrações e os acúmulos na parte aérea e nas raízes, bem como o transporte à longa distância de Al; vi) avaliação da atividade das enzimas do sistema antioxidante, catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GPOX) e glutathione redutase (GR), para os genótipos de *Brachiaria* com menor e maior tolerância ao metal (2º experimento); vii) quantificação do Al no apoplasto e simplasto das células radiculares (2º experimento); viii) determinação das concentrações, acúmulos na parte aérea e nas raízes e o transporte à longa distância de Al (2º experimento).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância das pastagens

As áreas de pastagens no Brasil destacam-se por ocuparem 190 milhões de hectares, representando aproximadamente 22% do território nacional (AGUIAR, 2013). Do total de áreas com pastagens, cerca de 52% são pastagens cultivadas, predominando gramíneas do gênero *Brachiaria* (FERRAZ, 2008). Dentre as espécies economicamente importantes destacam-se a *Brachiaria brizantha*, a *Brachiaria decumbens* e a *Brachiaria humidicola* (FERRAZ, 2003). Neste contexto, as gramíneas forrageiras possuem grande importância na pecuária e economia brasileira, pois se constituem a base da alimentação de rebanhos bovinos.

O gênero *Brachiaria*, original do continente Africano, pertence à família *Poaceae* e reúne cerca de 100 espécies (ARROYAVE et al., 2013). Dentre as quais algumas gramíneas forrageiras possuem relevante importância para regiões tropicais. As razões para a expansão da utilização dessas gramíneas estão relacionadas com a qualidade nutricional combinada com a resistência à alta pressão de pastejo, tolerância a estresses e adaptação às variadas condições de clima e solo (KELLER-GREIN; MAASS; HANSON, 1996; ARROYAVE et al., 2011).

Os rebanhos bovinos, muitas vezes estão localizados em áreas com solos de baixa fertilidade, ácidos e com altos teores de alumínio trocável (Al^{3+}), limitando o potencial produtivo das plantas e, conseqüentemente, comprometendo os índices zootécnicos. Na região de Cerrado, principalmente, atribui-se a redução do crescimento das plantas à acidez do solo, ao excesso de Al e baixos teores de fósforo (RAMOS et al., 2012).

2.2 Características dos genótipos de *Brachiaria*

2.2.1 *Brachiaria decumbens* cultivar Basilisk

O genótipo *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk foi introduzido no Brasil, no início da década de 1960 pelo *International Research Institute* (IRI). O cultivar tem origem na Austrália e demonstrou excelente adaptação às condições edafoclimáticas brasileiras (EMBRAPA, 2006). Considerada espécie perene, os rizomas apresentam-se em forma de nódulos pequenos. As folhas são linear-lanceoladas rígidas e esparsamente pilosas. A inflorescência é composta por um a cinco ráculos, com espiguetas ligeiramente pilosas no

ápice. O genótipo é tolerante a solos com baixa fertilidade e pouco sensível a variação de umidade do solo (EMBRAPA, 2010).

2.2.2 *Brachiaria brizantha* cultivar Marandu

A gramínea forrageira *Brachiaria brizantha* cv. Marandu foi introduzida no Brasil em 1967 (EMBRAPA, 1984) e o genótipo lançado em 1984 pela EMBRAPA – CNPGC. As lâminas foliares são linear-lanceoladas, esparsamente pilosas na face ventral. Inflorescência geralmente com quatro a seis ráceros, e espiguetas esparsamente pilosas no ápice (VALLS; SENDULSKY, 1984). Esse genótipo necessita de moderada fertilidade do solo para o crescimento e desenvolvimento das plantas (BOGDAN, 1977; SKERMAN; RIVEROS, 1990).

2.2.3 *Brachiaria brizantha* cultivar Piatã

A *Brachiaria brizantha* cv. Piatã foi lançada pela Embrapa em 2007, sendo alternativa para a diversificação de pastagens no Brasil. A forrageira é resultado de 16 anos de avaliações conduzidas pela Embrapa e colaboradores, em estudos dirigidos em várias regiões do país (VALLE et al., 2007). As folhas mostram-se ásperas na face superior, com bordas serrilhadas e cortantes. A inflorescência pode conter até 12 ráceros, superiores a outros genótipos de *Brachiaria brizantha*. O genótipo é indicado para solos de média fertilidade (VALLE et al., 2007; EMBRAPA, 2010).

2.2.4 *Brachiaria brizantha* cultivar Xaraés

O genótipo *Brachiaria brizantha* cv. Xaraés foi lançado pela Embrapa em 2002, decorrente de 15 anos de avaliações e surgiu como alternativa para a produção de pastagens no Brasil (VALLE et al., 2003). As folhas são lanceoladas, de coloração verde-escura, com pilosidade curta na face superior e bordos ásperos. As inflorescências são grandes podendo conter sete ráceros com espiguetas compondo somente uma fileira. É indicado para solos de média fertilidade (EMBRAPA, 2004).

2.3 Alumínio no solo

Os solos ácidos estão presentes em dois terços do território nacional e em 40% da área agricultável do mundo, o que torna o Al o principal fator limitante para a produção de alimentos e biomassa (VITORELLO; CAPALDI; STEFANUTO, 2005). Em regiões de clima tropical e subtropical, locais com elevadas precipitações pluviais, nutrientes como o cálcio (Ca), magnésio (Mg) e o potássio (K) podem ser lixiviados. Nesse sentido a remoção de cátions básicos pode ser maior que a taxa de entrada, resultando na redução do pH do solo. O processo de acidificação do solo, muitas vezes é intensificado por práticas agrícolas, pela mineração e por práticas de descarte de resíduos (FOY; FLEMING; SCHWARTZ, 1978; RAO; ZEIGLER; VERA, 1993). Com a acidificação do solo ocorre a redução da estabilidade química dos compostos de Al, ocasionando a solubilização de espécies fitotóxicas e consequentemente prejudicando o desenvolvimento das plantas (GUO et al., 2004; KOCHIAN, 1995) – A acidez do solo é, portanto, um resultado de hidrólise de compostos de Al.

Em solos com valores de $\text{pH} > 5,5$ (em H_2O) o Al é encontrado na forma de óxidos e aluminossilicatos insolúveis. Em condições ácidas $\text{pH} < 5,5$ (em H_2O) é encontrado na forma de $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$, o qual por convenção é denominado Al^{3+} . Com a elevação do pH a forma $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$, é submetida a sucessivas desprotonações formando $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$ e $\text{Al}(\text{OH})_2^+$. Em pH neutro encontra-se na forma de $\text{Al}(\text{OH})_3$, relativamente insolúvel e o $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ predomina em condições alcalinas (KOCHIAN, 1995). Os cátions monoméricos de Al podem formar complexos com ligantes orgânicos e inorgânicos como PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , F^- , ácidos orgânicos, proteínas e lipídeos (DELHAIZE; RYAN, 1995). Adicionalmente, a espécie polinuclear Al_{13} ($\text{AlO}_4\text{Al}_{12}(\text{OH})_{24}(\text{H}_2\text{O})_{12}^{7+}$), denominado *triskaidekaaluminium*, pode ocorrer pela neutralização parcial de soluções com Al, por base forte (PARKER; BERTSCH, 1992), contudo o processo natural de formação é desconhecido (DELHAIZE; RYAN, 1995).

A atividade do Al e suas respectivas espécies químicas depende basicamente do tipo de mineral da fase sólida e do pH do solo. Portanto, em solos ácidos, com predomínio de argilas 1:1 (caulinita) e oxihidróxidos (gibbsita) na fração argila, tem-se elevada atividade do Al na solução do solo (SOUSA; MIRANDA; OLIVEIRA, 2007). O comportamento químico do metal pode variar dependendo do tipo de solo. O conjunto da complexidade de reações que ocorrem na solução do solo, além do fato de que espécies vegetais apresentarem respostas distintas à presença de Al torna-se difícil o desenvolvimento de métodos de análises, os quais

avaliam o Al que efetivamente limita o crescimento e desenvolvimento das plantas (RITCHIE, 1989).

Além da acidificação do solo, outros fatores como os minerais predominantes no solo, os teores de matéria orgânica e as concentrações de cátions e ânions interferem na concentração de Al potencialmente tóxico (KAMPRATH; FOY, 1985). Ademais, a acidez em solos tropicais favorece o incremento da atividade do metal na solução do solo, também proporciona a deficiência de Ca, Mg e fósforo (P) e a toxidez por manganês (Mn). (SOUSA; MIRANDA; OLIVEIRA, 2007).

Para a redução da acidez e consequentemente a presença de Al na solução do solo, utiliza-se o calcário para a correção da camada superficial do solo (SOUSA; LOBATO, 2004). Com a calagem o Al é precipitado na forma de oxidróxidos (RAIJ, 1991). Contudo, a aplicação de calcário não soluciona os problemas relacionados à acidez em camadas inferiores, devido à apresentar problemas técnicos e econômicos. Outra forma de redução da espécie fitotóxica de Al é a aplicação do gesso agrícola ao qual proporciona a formação do composto químico $AlSO_4^+$, altamente móvel no perfil do solo, possibilitando maior desenvolvimento do sistema radicular.

Em alternativa ao uso de recursos não renováveis, tem-se a estratégia de utilização de genótipos considerados tolerantes à presença do metal tóxico. Desse modo, pesquisas relacionadas ao estudo da tolerância diferencial intra e interespecífica tornam-se fundamentais ao manejo varietal. Dessa forma o emprego de genótipos tolerantes é considerada a estratégia mais efetiva para exploração de culturas economicamente importantes, notadamente em regiões com pH ácido e elevada disponibilidade de Al no complexo de troca de minerais.

2.4 Alumínio na planta

A compreensão das respostas fisiológicas e bioquímicas, bem como os mecanismos relacionados à defesa das plantas, é fundamental para a distinção e caracterização de espécies consideradas tolerantes ao excesso de elementos tóxicos e metais pesados. O Al em concentrações tóxicas pode resultar para os vegetais, no aumento da rigidez da parede celular derivada de ligações com pectinas, redução na replicação do DNA, interferir na mitose, diminuir a respiração das raízes, causar o rompimento na estrutura e na função de membranas celulares e prejudicar a absorção e transporte de nutrientes como o Ca, Mg, P, K e ferro (Fe) (FOY, 1992).

Na parede celular, o Al por ser ligante metálico, pode ligar-se a grupos carboxílicos e fosfatos, devido à alta afinidade por doadores de elétrons (DALE; SUTCLIFFE, 1986), resultando em mudanças estruturais e comprometendo a expansão da parede celular (MA et al., 2004). Nesse sentido a absorção e o acúmulo de Al no tecido vegetal podem afetar células e organelas em nível morfológico, citogenético e fisiológico, prejudicando substancialmente o desenvolvimento dos genótipos considerados sensíveis (KUMAR; DUSHENKOV; MOTTO, 1995).

O ápice radicular, e particularmente a parte distal da zona de transição, é a região mais sensível ao estresse induzido pelo Al (SIVAGURU; HORST, 1998; KOLLMEIER; FELLE; HORST, 2000; HUANG et al., 2009). O sintoma de toxidez causado por Al é facilmente observado pela inibição do crescimento radicular, encurtamento e o espessamento das pontas radiculares, prejudicando a formação de raízes finas, o que consequentemente reduz a absorção de água e nutrientes pelas plantas (KERRIDGE; DAWSON; MOORE, 1971; FOY, 1976; KOCHIAN, 1995). Portanto estudos relacionados à morfologia, fisiologia e a bioquímica do ápice radicular são consideradas variáveis importantes em estudos de toxidez por Al (VASCONCELOS; JOCOB-NETO; ROSSILO, 2002).

Atualmente no Brasil as pesquisas relacionadas às gramíneas forrageiras tropicais têm abordado, de modo geral, atributos morfológicos do sistema radicular e da parte aérea, aspectos produtivos e nutricionais. A determinação do efeito do elemento tóxico na inibição do alongamento radicular e no índice de tolerância ao Al permitiu classificar 30 genótipos de *Panicum maximum* em tolerantes, intermediários e sensíveis (ALMEIDA; MONTEIRO; JANK, 2000). Por sua vez, Miguel et al. (2011), avaliando dez genótipos de *Brachiaria ruzizienses*, por meio da avaliação da produção da massa verde da parte aérea e radicular, massa seca da parte aérea e da raiz, o desenvolvimento da parte aérea e das raízes e o número de perfilhos, constataram a existência de variabilidade genética, sendo possível identificar materiais potencialmente mais produtivos (rendimento de biomassa) na presença de Al tóxico.

Estudos acerca da tolerância diferencial ao Al entre genótipos considerados altamente tolerantes, como a *Brachiaria decumbens* e genótipos tolerantes como a *Brachiaria brizantha*, têm sido associados a mudanças provocadas pelo metal nas células epidérmicas radiculares, responsáveis pela formação de pêlos absorventes e que aparentemente acumulam o Al (ARROYAVE et al., 2011). Nesse contexto, Arroyave et al. (2013) estudaram os efeitos do Al na superfície radicular de *Brachiaria decumbens*, *Brachiaria brizantha* e *Brachiaria ruzizienses* por meio de eletromicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura. Foram verificadas injúrias na epiderme da raiz de *Brachiaria ruzizienses* após 24 horas de

exposição ao Al, não sendo constatados danos e rugosidades na superfície radicular das outras espécies de *Brachiaria*.

Outros estudos têm destacado a importância da avaliação de atributos radiculares em gramíneas forrageiras, como o comprimento e o diâmetro radicular, para a seleção de materiais tolerantes ao Al. Nesses trabalhos, foi verificado que a *Brachiaria decumbens* apresentou maior comprimento e área superficial de raízes, em relação à *Brachiaria brizantha* e *Brachiaria ruzizienses* em condições de excesso de Al no substrato (BITENCOURT et al., 2011; RAMOS et al., 2012).

Contudo, considerando a parte aérea das plantas, existe a assertiva de que a toxidez provocada pela presença de Al não é facilmente detectável, pois as manifestações sintomatológicas assemelham-se às de P e em alguns casos com deficiência induzida de Ca (ROUT; SAMANTARAY; DAS, 2001). Devido ao transporte de Ca ser energeticamente passivo e mediado por canais de membrana, cátions polivalentes (e.g., Al^{3+}) podem inibir o transporte de Ca. Portanto o Al pode reduzir a absorção e o transporte de Ca para as partes vegetais (HUANG et al., 1992; RENGEL, 1992) e consequentemente alterar os níveis citosólicos desse elemento, resultando na alteração da atividade de enzimas como a fosfolipase-C (KOCHIAN; HOEKENGA; PIÑEROS, 2004). O excesso de Al no substrato pode também induzir os sintomas de deficiência de Fe em plantas de arroz, sorgo e trigo (CLARK et al., 1981; FURLANI; CLARK, 1981; FOY; FLEMING, 1982).

Os estudos referentes ao comportamento de plantas expostas ao Al podem ser avaliados e mensurados por meio de avaliações em campo, casa de vegetação ou em laboratório (SILVA et al., 2007). Assim, aferições da massa seca da parte aérea e das raízes, transporte e/ou redistribuição de nutrientes do sistema radicular para a parte aérea, principalmente o P, avaliações de comprimento radicular total e relativo, bem como a retomada de crescimento de raízes, estabelecem diferenças entre genótipos sensíveis e tolerantes (SANCHÉZ-CHÁCON et al., 2000), e que são características buscadas nos programas de melhoramento genético e seleção massal.

2.5 Mecanismos de tolerância ao alumínio

Devido ao fato da toxicidade causada pelo Al ser considerado fator de restrição à produtividade das culturas, inúmeras pesquisas foram conduzidas, procurando estabelecer relações entre os mecanismos de tolerância e a toxidez ocasionada pelo metal (MATSUMOTO, 2000; BARCELÓ; POSCHENRIEDER, 2002; KOCHIAN; HOEKENGA;

PIÑEROS, 2004; RANGEL; RAO; HORST, 2009; MA, 2007; POSCHENRIEDER et al., 2008).

Os mecanismos de tolerância ao Al envolvem duas estratégias. A primeira é baseada na exclusão apoplástica do Al tóxico pelo ápice radicular por meio da liberação de ligantes/quelantes como ácidos orgânicos - citrato, malato e oxalato - (DELHAIZE; RYAN, 1995; MA; RYAN; DELHAIZE, 2001), compostos fenólicos e pela alcalinização da rizosfera (MA, 2007), os quais reduzem a concentração de formas tóxicas de Al e dificulta a entrada do metal nas células radiculares. A segunda estratégia é a detoxificação interna/simplástica por ligantes/quelantes como os ácidos orgânicos (citrato, malato e oxalato), fitoquelatinas e a compartimentalização do complexo-Al em vacúolos (DELHAIZE; RYAN, 1995; KOCHIAN, 1995; MA; RYAN; DELHAIZE, 2001; MATSUMOTO, 2000; MA, 2007).

Wenzl et al. (2002) avaliaram a detoxificação interna nas gramíneas forrageiras *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria ruzizienses*, constatando a presença de ácidos orgânicos nos tecidos apicais de raízes, sendo a quantidade excretada de tais compostos em pequena proporção. Portanto, considerou-se que os ácidos orgânicos contribuíram para a tolerância ao metal em ambas as espécies, porém não sendo o principal mecanismo responsável pela maior tolerância ao Al em *Brachiaria decumbens*.

Alguns estudos conduzidos com plantas dicotiledôneas têm destacado que a exudação de ácidos orgânicos - como o ácido cítrico - na rizosfera contribui para redução da absorção apoplástica do Al, evitando-se o transporte à longa distância e, por fim, a toxidez na parte aérea (KOCHIAN; HOEKENGA; PIÑEROS, 2004). Assim há necessidade do melhor entendimento da cinética de acúmulo de Al nos ápices radiculares (região meristemática) e sua distribuição em nível celular e tecidual em relação às diferenças genótípicas quanto à tolerância diferencial ao Al (RANGEL; RAO; HORST, 2009). Ademais, é conhecido que o Al acumula-se inicialmente nas raízes de modo rápido (absorção rápida do Al trocável no apoplasto), seguido por baixa taxa linear de acúmulo, caracterizada pela absorção simplástica (ZHANG; TAYLOR, 1989). A compartimentação do Al no simplasto, principalmente pela deposição no vacúolo, parece ser um dos principais mecanismos de tolerância ao excesso de Al, bem como pela maior distribuição (homogeneidade) do Al no tecido vegetal - notadamente no sistema radicular - e maior eficiência do sistema antioxidativo, enzimático ou não enzimático (RANGEL; RAO; HORST, 2009; SIMÕES et al., 2012).

Os mecanismos de exclusão e detoxificação interna são ferramentas efetivas para a distinção entre genótipos tolerantes e sensíveis. Em trigo foi constatado que genótipos

considerados tolerantes acumulam de três a oito vezes menos Al no ápice radicular, quando comparados aos genótipos sensíveis (KOCHIAN; HOEKENGA; PIÑEROS, 2004).

Estudos atuais contemplando abordagens genéticas e moleculares têm contribuído para o entendimento da funcionalidade de proteínas facilitadoras do transporte de citrato, malato, oxalato e succinato, bem como dos genes que codificam a síntese proteica (transdução), como o gene *ALMT* (*Aluminum-Activated Malate Transporter*) e *MATE* (*Multidrug and Toxic Compound Extrusion*) (SIMÕES et al., 2012). Todavia, não há evidências claras e conclusivas dos eventos bioquímicos que estão atuando, em nível celular e ultraestrutural, para a maior adaptação ao estresse abiótico provocado pelas concentrações tóxicas de Al. Recentes estudos têm pesquisado a toxidez ao Al em plantas em bases genéticas, fisiológicas, bioquímicas e proteômicas, no entanto o mecanismo molecular de inibição do crescimento do sistema radicular não está totalmente elucidado (KOCHIAN, 1995; KOCHIAN; HOEKENGA; PIÑEROS, 2004).

Nesse contexto, o entendimento das desordens fisiológicas causadas pela toxicidade do Al se faz necessário para a obtenção de informações acerca dos mecanismos fisiológicos e bioquímicos referentes à tolerância diferencial entre plantas cultivadas.

2.6 O alumínio e a resposta do sistema antioxidante das plantas

Em condições normais para o crescimento das plantas, mecanismos do sistema antioxidante promovem o adequado equilíbrio e proteção contra as espécies reativas de oxigênio (ERO's em inglês *Reactive Oxygen Species-ROS*), as quais são subprodutos de reações de oxidação-redução derivadas do processo de fotossíntese. As organelas, mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos são os principais locais de produção de ERO'S em organismos fotossintetizantes. Fatores abióticos e bióticos como temperatura, deficiência/excesso de água, salinidade, incidência luminosa, seca, deficiência de nutrientes, herbicidas, ataques de patógenos e metais pesados podem aumentar a produção de tais compostos oxidantes, dentre os quais, o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), oxigênio *singlet* (1O_2), radical hidróxido ($\cdot OH$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Compostos como $O_2^{\cdot-}$ e o H_2O_2 apresentam baixa reatividade quando comparados às demais ERO's (GRATÃO et al., 2005; GILL; TUTEJA, 2010). O acúmulo de ERO's devido a estresses ambientais é considerado o principal fator de perdas para a produtividade agrícola mundial (GILL; TUTEJA, 2010).

Dentre o estresse ambiental causado pela presença de metais em solos ácidos, a toxidez causada pelo Al pode provocar danos em biomoléculas como lipídeos, proteínas

(oxidação de proteínas), carboidratos e ácidos nucleicos, prejudicando o metabolismo celular podendo até causar a morte de células (BUCKNER; JOHAL; JANICK-BUCKNER, 2000; JONES, 2000). Por esse fato a desestruturação da membrana plasmática é utilizada como parâmetro para a determinação do processo de peroxidação de lipídeos em organismos sob condições de estresse.

A peroxidação de lipídeos é a primeira injúria na estrutura da membrana causada pela presença de Al (CAKMAK; HORST, 1991), a qual pode ser quantificada devido à formação de compostos como álcoois, alcanos e principalmente aldeídos [*e.g.*, malondialdeído (MDA)]. Os resultados são a redução da fluidez de membrana e danos secundários em proteínas, o que consequentemente promove a inativação de receptores, enzimas e canais iônicos (GILL; TUTEJA, 2010).

Para proteger e minimizar os danos celulares, as células e organelas (cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos) compõem o sistema de defesa antioxidante. As plantas possuem mecanismos de remoção das ERO's via sistema não enzimático - como, por exemplo, ácido ascórbico (vitamina C), glutathione (GSH), prolina (Pro), α -tocofenóis (vitamina E), compostos fenólicos, alcalóides, carotenóides (Car) e flavonóides - e enzimático (GRATÃO et al., 2005). Porém, as falhas nesses sistemas podem ocasionar sérios prejuízos ao metabolismo celular (MA et al., 2012).

O mecanismo de remoção de ERO's via sistema enzimático envolve a ação de enzimas como a superóxido dismutase (SOD), glutathione redutase (GR), monodehidroascorbato redutase (MDHAR), dehidroascorbato redutase (DHAR), glutathione-S-transferase (GST) e as peroxidases, catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX) e ascorbato peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GOPX).

A atividade de enzimas antioxidantes facilita a remoção das ERO's e reduzem a peroxidação de lipídeos, sendo a ação enzimática considerada benéfica para o desenvolvimento de plantas na presença de Al. A SOD constituiu-se na primeira linha de defesa para reduzir os danos causados por ERO'S, catalisando a dismutação de $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 e consequentemente influenciando na reação de Haber-Weiss. As peroxidases CAT, GPX e APX são responsáveis pela detoxificação do H_2O_2 (GRATÃO et al., 2005).

A CAT na célula vegetal é responsável por metabolizar o H_2O_2 , o qual é gerado em peroxissomos por processos envolvendo eventos de β -oxidação de ácidos graxos e fotorrespiração, convertendo assim o H_2O_2 em H_2O e O_2 . No entanto a resposta da atividade da CAT na presença de Al tem-se mostrado dependente da espécie e dos órgãos vegetais analisados (GRATÃO et al., 2005). Estudos sobre ERO'S e a peroxidação de lipídeos com

relação à presença do metal tóxico são de fundamental importância para o entendimento dos mecanismos de tolerância. Achary et al. (2008) verificaram que o Al inibiu a atividade da CAT em *Allium cepa* (L.), no entanto constatou-se o aumento na atividade da GPX e APX.

A APX é a peroxidase do sistema antioxidante, cuja função é catalisar a conversão do H_2O_2 em H_2O pela oxidação do ascorbato, resultando na produção de MDHA (monodehidroascorbato). O MDHA pode ser espontaneamente dismutado a deidroascorbato (DHA) ou reduzido diretamente a ascorbato pela ação da MDHAR, enzima a qual é dependente de NAD(P)H. O DHA é reduzido a ascorbato por meio da oxidação da GSH a GSSG (glutathiona oxidada), revelando a dependência de rotas metabólicas que compõem o ciclo ascorbato-glutathiona (GRATÃO et al., 2005). A APX possui alta afinidade por H_2O_2 (μM) quando comparada a CAT (mM) sendo, portanto essencial na proteção de células contra ERO'S em plantas submetidas a estresses (GILL; TUTEJA, 2010).

A GPOX é distinta da APX na sequência de aminoácidos e nas funções fisiológicas. GPOX tem a função de decompor ácido indolacético (AIA) e na defesa contra patógenos por consumir H_2O_2 . A enzima antioxidante GR é a flavoproteína, que catalisa a reação de redução de NAD(P)H para NAD(P), e de GSSG para a forma de GSH. A GR está associada à proteção contra o estresse oxidativo, enquanto que a GSH desempenha papel importante na participação no ciclo ascorbato-glutathiona (GRATÃO et al., 2005; GILL; TUTEJA, 2010).

Ma et al. (2012) estudaram o efeito do Al nas raízes de dois genótipos de arroz considerados tolerante (azucena) e sensível (IR64), sendo constatado aumento na peroxidação de lipídeos para o genótipo IR64 em relação ao azucena. Também foi verificado que o genótipo azucena aumentou a atividade da APX, GR e da GPX quando comparado ao IR64. Por sua vez, Xu et al. (2012) analisaram o efeito da presença do Al no sistema radicular de dois genótipos de trigo contrastantes, o tolerante (Jian-864) e o sensível (Yangmai-5), com relação à peroxidação de lipídeos e atividade de enzimas antioxidantes. Foi constatada maior atividade da CAT, APX, GR e da GPX para o genótipo Jian-864 comparado ao genótipo Yangmai-5.

Giannakoula et al. (2010) constataram aumento na peroxidação lipídica em genótipo de milho sensível (A4/67) em relação ao genótipo tolerante (VA-22). Em resposta a atividade enzimática da SOD e de peroxidases (POD) foi maior para o genótipo tolerante quando comparado ao sensível. Esses resultados sugerem que a atividade do sistema antioxidativo do genótipo tolerante por ser mais eficiente, praticamente não promoveu alteração e injúria na membrana lipídica.

Guo et al. (2004) avaliaram a resposta do sistema antioxidante para dois genótipos de cevada, Gebeina (tolerante) e Shang 70-119 (sensível), na presença de Al e Cádmio (Cd). O genótipo sensível revelou maior peroxidação de lipídeos e redução na atividade da SOD, com relação ao genótipo tolerante. Contudo as atividades de enzimas do sistema antioxidante podem ser alteradas, devido à dependência de fatores como: a adição do elemento tóxico, a dose proporcionada, o material vegetal utilizado no estudo e o tempo de exposição.

Referências

- ACHARY, V.M.M.; JENA, S.; PANDA, K.K.; PANDA, B.B. Aluminium induced oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 70, p. 300-310, 2008.
- AGUIAR, A.P.A. O pasto do vizinho está se degradando. In: FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Anualpec 2013**: anuário da pecuária brasileira. São Paulo: FNP, 2013. p. 35-39.
- ALMEIDA, A.A.S.; MONTEIRO, F.A.; JANK, L. Avaliação de *Panicum maximum* Jack. para tolerância ao alumínio em solução nutritiva. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 24, p. 339-344, 2000.
- ARROYAVE, C.; BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C.; TOLRÀ, R. Aluminium-induced changes in root epidermal cell patterning, a distinctive feature of hyperresistance to Al in *Brachiaria decumbens*. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 105, p. 1477-1483, 2011.
- ARROYAVE, C.; TOLRÀ, R.; THUY, T.; BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Differential aluminum resistance in *Brachiaria* species. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 89, p. 11-18, 2013.
- 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. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 48, p. 75-92, 2002.
- BITENCOURT, G.A.; CHIARI, L.; LAURA, V.A.; VALLE, C.B.; JANK, L.; MORO, J.R. Aluminum tolerance on genotypes of signal grass. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, p. 245-250, 2011.
- BOGDAN, A.V. **Tropical pasture and fodder plants**. New York: Longman, 1977. 475 p.
- BUCKNER, B.; JOHAL, G.S.; JANICK-BUCKNER, D. Cell death in maize. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 108, p. 231-239, 2000.
- CAKMAK, I.; HORST, W.J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 83, p. 463-468, 1991.
- CLARK, R.B.; PIER, H.A.; KNUDSEN, D.; MARANVILLE, J.W. Effect of trace element deficiencies and excesses on mineral nutrients in sorghum. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 3, p. 357-374, 1981.
- DALE, J.E.; SUTCLIFFE, J.F. Water relations of plant cells. In: STEWARD, F.C.; SUTCLIFFE, J.F.; DALE, J.E. (Eds.). **Plant physiology**: a treatise. Orlando: Academic Press, 1986. p. 1-48.
- DELHAIZE, E.; RYAN P.R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 107, p. 315-321, 1995.

EMBRAPA. *Brachiaria brizantha* cv. **Marandu**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 1984. 31 p. (Documentos, 21).

EMBRAPA. **O capim-xaraés (*Brachiaria brizantha* cv. Xaraés) na diversificação das pastagens de braquiária**. Campo Grande, Embrapa Gado de Corte, 2004. 36 p. (Documentos, 149).

EMBRAPA. **Desenvolvimento de cultivares do gênero *Brachiaria* (trin.) Griseb. no Brasil**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2006. 58 p. (Documentos, 163).

EMBRAPA – Centro Agroflorestral de Rondônia. [2010]. In: Embrapa, Brasil: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2010. Disponível em: <http://www.cpafrro.embrapa.br/embrapa/bases/index.htm>. Acesso em: 21 de maio de 2014.

FERRAZ, F.M. Pastagens garantem o futuro da pecuária brasileira. In: FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Anualpec 2003**: anuário da pecuária Brasileira. São Paulo: FNP, 2003. p. 55-56.

FERRAZ, J.V. Uma visão do futuro: a pecuária brasileira daqui a 10 anos. In: FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Anualpec 2008**: anuário da pecuária brasileira. São Paulo: FNP, 2008. p. 22-32.

FOY, C.D. Differential aluminum and manganese tolerance of plant species and varieties in soils. **Ciência e Cultura**, Campinas, v. 28, p. 150-155, 1976.

FOY, C.D.; FLEMING, A.L.; SCHWARTZ, J.W. The physiology of plant tolerance to excess available aluminum and manganese in acid soils. In: JUNG, G.A. (Ed.). **Crop tolerance to sub optimal land condition**. Madison: Soil Science Society of America, 1978. p. 301-338.

FOY, C.D.; FLEMING, A.L. Aluminium tolerance of two wheat cultivars related to nitrate reductase activities. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 5, p. 1313-1333, 1982.

FOY, C.D. Soil chemical factors limiting plant root growth. In: HATFIELD, J.L.; STEWART, B.A. (Ed.). **Advances in soil sciences**: limitations to plant root growth. New York: Springer, 1992. p. 97-149.

FURLANI, R.R., CLARK R.B. Screening Sorghum for aluminium tolerance in nutrient solution. **Agronomy Journal**, Madison, v. 73, p. 587-594, 1981.

GIANNAKOULA, A.; MOUSTAKAS, M.; SYROS, T.; YUPSANIS, T. Aluminum stress induces up-regulation of an efficient antioxidant system in the Al-tolerant maize line but not in the Al-sensitive line. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 67, p. 487-494, 2010.

GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 48, p. 909-930, 2010.

GRATÃO, P.L.; POLLE, A.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 32, p. 481-494, 2005.

GUO, T.; ZHANG, G.; ZHOU, M.; WU, F.; CHEN, J. Effects of aluminum and cadmium toxicity on growth and antioxidant enzyme activities of two barley genotypes with different Al resistance. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 58, p. 241-248, 2004.

HUANG, J.W.; GRUNES, D.L.; KOCHIAN, L.V. Aluminum effects on the kinetics of calcium uptake into cells of the wheat root apex. **Planta**, New York, v. 188, p. 414-421, 1992.

HUANG, C.F.; YAMAJI, N.; NISHIMURA, M.; TAJIMA, S.; MA, J.F. A rice mutant sensitive to Al toxicity is defective in the specification of root outer cell layers. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 50, p. 976-985, 2009.

JONES, A. Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death? **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 5, p. 273-278, 2000.

KAMPRATH, E.J.; FOY, C.D. Lime-fertilizer-plant interactions in soils. In: ENGELSTAD, O.P. (Ed.). **Fertilizer technology and use**. Madison: Soil Science Society of America, 1985. p. 91-151.

KELLER-GREIN, G.; MAAS, B.L.; HANSON, J. Natural variation in *Brachiaria* and existing germoplasm collections. In: MILES, V. (Ed). **Brachiaria: biology, agronomy, and improvement**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 1996. p. 16-42.

KERRIDGE, P.C.; DAWSON, M.D.; MOORE, D.P. Separation of degrees of aluminum tolerance in wheat. **Agronomy Journal**, Madison, v. 63, p. 586-590, 1971.

KOCHIAN, L.V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 46, p. 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. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 459-493, 2004.

KOLLMEIER, M.; FELLE, H.H.; HORST, W.J. Genotypical differences in aluminum resistance of maize are expressed in the distal part of the transition zone. Is reduced basipetal auxin flow involved in inhibition of root elongation by aluminum? **Plant Physiology**, Rockville, v. 122, p. 945-956, 2000.

KUMAR, P.B.A.N.; DUSHENKOV, V.; MOTTO, H. Phytoextraction: The use of plants to remove heavy metals from soils. **Environmental Science Technology**, Washington, v. 29, p. 1232-1238, 1995.

MA, J.F.; RYAN, P.R.; DELHAIZE, A. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 6, p. 273-278, 2001.

MA, J.F.; SHEN, R.; NAGAO, S.; TANIMOTO, E. Aluminum targets elongating cells by reducing cell wall extensibility in wheat root. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 45, p. 583-589, 2004.

MA, J.F. Syndrome of aluminum toxicity and diversity of aluminum resistance in higher plants. **International Review of Cytology**, San Diego, v. 264, p. 225-253, 2007.

MA, B.; GAO, L.; ZHANG, H.; CUI, J.; SHEN, Z. Aluminum-induced oxidative stress and changes in antioxidant defenses in the roots of rice varieties differing in Al tolerance. **Plant Cell Reports**, New York, v. 31, p. 687-696, 2012.

MATSUMOTO, H. Cell biology of aluminum tolerance and toxicity in higher plants. **International Review of Cytology**, San Diego, v. 200, p. 1-46, 2000.

MIGUEL, P.S.B.; ROCHA, W.S.D.; SOUZA SOBRINHO, F.; MARTINS, C.M.; GOMES, F.T.; OLIVEIRA, A.V.; CARVALHO, C.A. Seleção de genótipos de *Brachiaria ruzizienses* quanto ao alumínio em solução nutritiva. II. Avaliação da tolerância ao alumínio. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 34, p. 163-164, 2011.

PARKER, D.R.; BERTSCH, P.M. Formation of the “Al₁₃” tridecameric polycation under diverse synthesis conditions. **Environmental Science Technology**, Easton, v. 26, p. 914-921, 1992.

POSCHENRIEDER, C.; GUNSE, B.; CORRALES, I.; BARCELÓ, J. A glance into aluminum toxicity and tolerance. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 400, p. 356-368, 2008.

RAIJ, B. van. **Fertilidade do solo e adubação**. São Paulo: Ceres, 1991. p. 343.

RAMOS, F.T.; FRANÇA, M.G.C.; ALVIM, M.N.; ROSSIELLO, R.O.P.; ZONTA, E. Aluminum tolerance measured by root growth and mucilage protection in *Urochloa brizantha* and *Urochloa decumbens*. **Journal of Plant Interactions**, Oxon, v. 7, p. 225-229, 2012.

RANGEL, A.F.; RAO, I.M.; HORST, W.J. Intracellular distribution and binding state of aluminum in root apices of two common bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes in relation to Al toxicity. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 135, p. 162-173, 2009.

RAO, I.M.; ZEIGLER, R.S.; VERA, R. Selection and breeding for acid-soil tolerance in crop. **BioScience**, Washington, v. 43, p. 454-465, 1993.

RENGEL, Z. Role of calcium in aluminium toxicity. **New Phytologist**, New York, v. 21, p. 499-513, 1992.

RITCHIE, G.S.P. The chemical behaviour of aluminium, hydrogen and manganese in acid soils. In: ROBSON, A.D. (Ed.). **Soil acidity and plant growth**. New York: Academic Press, 1989. p. 1-60.

ROUT, G.R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. Aluminium toxicity in plants: a review. **Agronomie**, Les Ulis Cedexa, v. 21, p. 3-21, 2001.

SÁNCHEZ-CHACÓN, C.D.; FEDERIZZI, L.C.; MILACH, S.C.K.; PACHECO, M.T. Variabilidade genética e herança da tolerância à toxicidade do alumínio em aveia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, p. 1798-1808, 2000.

SILVA, J.A.G.; CARVALHO, F.I.F.; COIMBRA, J.L.M.; VIEIRA, E.A.; BENIN, G.; OLIVEIRA, A.C.; FINATTO, T.; BERTAN, I.; SILVA, G.O.; CORREA, M. R. Tolerância ao alumínio em cultivares de aveia branca sob cultivo hidropônico. **Bragantia**, Campinas, v. 66, p. 587-593, 2007.

SIMÕES, C.C.; MELO, J.O.; MAGALHAES, J.V.; GUIMARÃES, C.T. Genetic and molecular mechanisms of aluminum tolerance in plants. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 11, p. 1949-1957, 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**, Rockville, v. 116, p. 155-163, 1998.

SKERMAN, P.J.; RIVEROS, F. **Tropical grasses**. Rome: FAO, 1990. 832 p. (FAO Plant Production and Protection Series, 23).

SOUSA, D.M.G.; LOBATO, E. Correção da acidez do solo. In: SOUSA, D.M.G.; LOBATO, E. (Ed.). **Cerrado: correção do solo e adubação**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2004. p. 81-96.

SOUSA, D.M.G.; MIRANDA, L.N.; OLIVEIRA, S.A. Acidez do solo e sua correção. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ, V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J.C.L. (Ed.). **Fertilidade do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p. 205-274.

VALLE, C.B.; JANK, L.; RESENDE, R.M.S.; BONATO, A.L.V. Lançamento de cultivares forrageiras: o processo e seus resultados – cvs. Massai, Pojuca, Campo Grande e Xaraés. In: NÚCLEO DE ESTUDOS EM FORRAGICULTURA, 4., 2003, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2003. p. 179-225.

VALLE, C.B.; EUCLIDES, V.P.B.; VALÉRIO, J.R.; MACEDO, M.C.M.; FERNANDES, C.D.; DIAS-FILHO, M.B. *Brachiaria brizantha* cv. Piatã: uma forrageira para diversificação de pastagens tropicais. **Seed News**, Pelotas, v. 11, p. 28-30, 2007.

VALLS, J.F.M.; SENDULSKY, T. **Descrição botânica**. Campo Grande, p. 4-6, 1984.

VASCONCELOS, S.S.; JACOB-NETO, J.; ROSSIELO, R.O.P. Differential root responses to aluminum stress among Brazilian rice genotypes. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 25, p. 655-669, 2002.

VITORELLO, V.A.; CAPALDI, F.R.; STEFANUTO, V.A. Recent advances in aluminum toxicity and tolerance in higher plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campos dos Goytacazes, v. 17, p. 129-143, 2005.

XU, F.J.; LI, G.; JIN, C.W.; LIU, W.J.; ZHANG, S.S.; ZHANG, Y.S.; LIN, X.Y. Aluminum-induced changes in reactive oxygen species accumulation, lipid peroxidation and antioxidant capacity in wheat root tips. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 56, p. 89-96, 2012.

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

WENZL, P.; CHAVES, A.L.; PATIÑO, G.M.; MAYER, J.E.; RAO, I.M. Aluminum stress stimulates the accumulation of organic in root apices of *Brachiaria* species. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v. 165, p. 582-588, 2002.

3 TOLERÂNCIA DIFERENCIAL AO ALUMÍNIO EM QUATRO GRAMÍNEAS FORRAGEIRAS: PARÂMETROS DE CRESCIMENTO, ABSORÇÃO, TRANSPORTE DE Al À LONGA DISTÂNCIA E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.

Resumo

O gênero *Brachiaria* destaca-se entre as forrageiras cultivadas em regiões tropicais devido ao rendimento de biomassa e à tolerância aos estresses abióticos, dentre os quais se destaca o alumínio trocável (Al^{3+}) dos solos ácidos. Os vegetais apresentam distintos mecanismos de tolerância ao excesso de Al, os quais podem ser mais bem caracterizados, fornecendo subsídio aos programas de melhoramento genético. Portanto, objetivou-se com esse estudo avaliar os efeitos das concentrações de Al no crescimento de quatro genótipos de *Brachiaria* (*Brachiaria decumbens* cv. Basilisk, *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, *Brachiaria brizantha* cv. Piatã e *Brachiaria brizantha* cv. Xaraés). A tolerância diferencial foi estudada por meio das avaliações de redução relativa do crescimento da parte aérea e das raízes (comprimento e superfície total), da absorção, acúmulo e do transporte de Al à longa distância, do dano na membrana plasmática em folhas e raízes, bem como da concentração de H_2O_2 , nas folhas. As plantas foram cultivadas em solução nutritiva ($\text{pH}=4,0\pm0,1$) com quatro doses de Al: 0; 0,44; 0,89 e 1,33 mmol L^{-1} . A estimativa da atividade do Al^{3+} livre na solução, por meio do software *GeoChem-EZ*[®], revelou que cerca de 81% do metal estava disponível, considerando valores de pH entre 3,0 e 4,0. A concentração de Al em todos os genótipos aumentou com o incremento do Al^{3+} livre na solução, sendo que a maior e menor concentração do elemento nas lâminas foliares e nas raízes foi verificada para os cultivares Marandu e Xaraés, respectivamente. Cerca de 9% do Al absorvido foi transportado à longa distância, em todos os genótipos. O cultivar Xaraés apresentou menor redução relativa da área foliar e massa seca da parte aérea no primeiro período de crescimento, entretanto no segundo crescimento, o cultivar Marandu exibiu a maior redução relativa para tais parâmetros. A menor redução relativa do comprimento e superfície total de raízes foi observada para o cv. Xaraés, com o aumento da concentração de Al na solução. O aumento da peroxidação lipídica foi verificado nas folhas do cv. Marandu e reduziu para o cv. Basilisk; permaneceu constante nas raízes do cv. Xaraés e reduziu nas raízes do cv. Piatã. Os comportamentos das espécies de *Brachiaria* permitiram classificar a *B. brizantha* cv. Xaraés e a *B. brizantha* cv. Marandu como os genótipos com maior e menor tolerância ao Al.

Palavras-chave: elemento tóxico, malondialdeído, sistema radicular.

DIFFERENTIAL ALUMINUM TOLERANCE IN FOUR FORAGES GRASSES: GROWTH PARAMETERS, Al UPTAKE, Al-LONG DISTANCE TRANSPORT AND LIPID PEROXIDATION

Abstract

Brachiaria genus stand out among the forage grasses at tropical regions due to biomass yield and tolerance to abiotic stresses, mainly to exchangeable aluminum (Al^{3+}) of acid soils. Plants have different mechanisms to tolerate Al excess, which can be characterized, providing subsidy to plant breeding programs. Therefore, the study aim was to evaluate the effects of Al concentration on growth of four *Brachiaria* genotypes (*B. decumbens* cv. Basilisk, *B. brizantha* cv. Marandu, *B. brizantha* cv. Piatã and *B. brizantha* cv. Xaraés). Differential tolerance was studied by means of assessments such as relative growth reduction for shoots (plant tops) and roots (total root length and total root surface, as well), Al uptake, content and Al-long distance transport, and considering the damage to the plasma membrane on the leaves and roots tissues as well as the H_2O_2 concentration on leaves tissues. *Brachiaria* genotypes were grown in nutrient solution ($\text{pH}=4.0\pm0.1$) with four Al rates: 0; 0.44; 0.89 and 1.33 mmol L^{-1} . The free Al^{3+} activity in the nutritive solution was estimated using the software *GeoChem-EZ*[®], which in turn shown that around 81% of Al was available to plant uptake, considering the pH range between 3.0 and 4.0. Despite of Al uptake to all genotypes increase with free Al^{3+} in solution, being observed the higher and lower Al-content on the leaves and roots tissues of Marandu and Xaraés cultivars, respectively, about 9% of Al taken up was transported from roots to shoot. The Xaraés cultivar showed the lowest relative leaf area and dry matter reduction for the first growth. For the second plant growth period, Marandu cultivar showed the highest relative reduction for these parameters. The lowest relative root growth (root length and root surface decrease) was observed for cv. Xaraés, with increasing Al concentration in the solution. The lipid peroxidation increased on the leaves of Marandu and decreased to cv. Basilisk; remained constant on the roots tissues of Xaraés and decreased on the roots tissues of Piatã cultivar. *Brachiaria* species behaviors allowed classifying *B. brizantha* cv. Xaraés and *B. brizantha* cv. Marandu as genotypes with high and low tolerance to Al, respectively.

Keywords: malondialdehyde, root system, toxic element.

3.1 Introdução

A acidez do solo é fator limitante à produção vegetal em regiões de clima tropical. A ocupação de solos ácidos consiste em 30-40% das terras aráveis no mundo (UEXKÜLL; MUTERT, 1995). A solubilização de espécies fitotóxicas de Al na solução do solo ocorre em valores de $\text{pH} < 5,0$, as quais reduzem consideravelmente o desenvolvimento das plantas (TAMÁS; HUTTOVÁ; MISTRÍK, 2003). Nesse sentido o Al torna-se o principal fator limitante ao crescimento vegetal em solos ácidos (GUO et al., 2004). No entanto, poucos estudos têm por objetivo avaliar o estresse causado pelo metal em gramíneas forrageiras (RAMOS et al., 2012). Esse fato estimula a busca por genótipos, que apresentem maior eficiência produtiva, quando cultivados na presença de Al tóxico.

As espécies de *Brachiaria* (e.g., *Brachiaria decumbens*) são adaptadas às condições de solos ácidos e com baixa fertilidade (MILES et al., 1996). Dentro do mesmo gênero, as espécies de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu e *Brachiaria decumbens* apresentam tolerância diferencial à toxidez causada pelo Al (ARROYAVE et al., 2011, 2013), indicando haver perspectivas para estudos no gênero *Brachiaria*.

A seleção de genótipos para tolerância ao Al é considerada a melhor alternativa. Todavia, é necessária a compreensão dos mecanismos de tolerância, os quais conferem a distinção entre genótipos. Dentre os mecanismos já elucidados têm-se o baseado na exclusão do elemento por via apoplástica, notadamente na região do ápice radicular, por meio da liberação de ácidos orgânicos aniônicos (e.g., citrato, malato e oxalato) (MA; RYAN; DELHAIZE, 2001), os quais complexam o Al, evitando a entrada nas células radiculares, e por sua vez, reduzindo a ligação do metal aos grupos carboxílicos pécticos de apoplasto (HORST; WANG; ETICHA, 2010). Outra estratégia é a detoxificação interna ou simplástica, que inclui a complexação do Al por ácidos orgânicos (e.g., citrato, malato e oxalato) ou pela compartimentação do complexo metal-ácido orgânico aniônico em vacúolos (KOCHIAN, 1995; MA; RYAN; DELHAIZE, 2001; MATSUMOTO, 2000). No entanto, esses mecanismos de tolerância ao Al não estão totalmente elucidados para gramíneas forrageiras tropicais, do gênero *Brachiaria*.

Nesse contexto, a eficiência do sistema antioxidante das plantas também é fator decisivo, por permitir maior capacidade de tolerância ao estresse nutricional. A compreensão de informações referentes a alterações de parâmetros produtivos e morfológicos, quanto bioquímicos, por meio da avaliação da peroxidação lipídica e do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) formado, além de informações sobre o acúmulo de Al nos tecidos vegetais são

importantes para a caracterização de espécies com maior e menor tolerância. Portanto, pesquisas relacionadas à tolerância diferencial são consideradas fundamentais (TAMÁS; HUTTOVÁ; MISTRÍK, 2003), principalmente no que se refere ao comportamento ainda desconhecido de genótipos recém-lançados de espécies de gramíneas forrageiras como a *B. brizantha* (cultivares Piatã e Xaraés). De forma conjunta, é necessário o entendimento referente à distribuição do Al entre os tecidos vegetais, para a distinção de genótipos tolerantes ao metal (JONES et al., 2006).

Objetivou-se avaliar a tolerância diferencial ao Al entre genótipos de *B. brizantha* (cultivares Marandu, Piatã e Xaraés) e de *B. decumbens* (cultivar Basilisk) por meio de quantificação da área foliar, do crescimento radicular (comprimento e superfície total) e crescimento radicular relativo, da produção de biomassa das plantas, da concentração, acúmulo e do transporte de Al à longa distância, além de avaliar a peroxidação lipídica e o conteúdo de H_2O_2 , como resultado direto da toxidez de Al.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Condições de crescimento e delineamento experimental

O experimento foi desenvolvido em casa de vegetação localizada no Centro de Energia Nuclear na Agricultura, da Universidade de São Paulo, em Piracicaba-SP, no período de sete de março a três de junho de 2013. No experimento foram avaliados quatro genótipos do gênero *Brachiaria*: *Brachiaria decumbens* cultivar Basilisk, *Brachiaria brizantha* cultivares Marandu, Piatã e Xaraés.

Sementes dos quatro genótipos de *Brachiaria* foram germinadas em bandejas contendo vermiculita como substrato. Após 12 dias da semeadura, cinco plântulas de cada genótipo foram transferidas para vasos com capacidade de 2,2 L, contendo 2 L de solução nutritiva Furlani e Furlani (1988), com a seguinte composição: 3,54 mmol L⁻¹ de Ca; 1,88 mmol L⁻¹ de N-NO₃⁻; 0,57 mmol L⁻¹ de N-NH₄⁺; 2,17 mmol L⁻¹ de K; 0,032 mmol L⁻¹ de P; 0,89 mmol L⁻¹ de Mg; 50,00 µmol L⁻¹ de Fe; 54,00 µmol L⁻¹ de S; 20,00 µmol L⁻¹ de B; 7,09 µmol L⁻¹ de Mn; 1,83 µmol L⁻¹ de Zn; 0,47 µmol L⁻¹ de Cu; 0,62 µmol L⁻¹ de Mo (reagentes P.A.). Inicialmente a solução nutritiva foi diluída em 20% da concentração final. Sete dias após o transplante, substituiu-se a solução por outra com 100% da força iônica, ocasião em que foram adicionadas as doses de Al de 0; 0,44; 0,89; 1,33 mmol L⁻¹, na forma de AlCl₃.6H₂O. O pH da solução nutritiva foi inicialmente ajustado para 4,0±0,1 e monitorado

a cada dois dias até o final do experimento (Figura 1). A solução nutritiva foi renovada a cada sete dias para manutenção das concentrações do metal e dos nutrientes. Em todo o período experimental manteve-se aeração constante das soluções nutritivas e o volume dos vasos foi completado com água desionizada para repor a perda por evapotranspiração.

O delineamento experimental utilizado foi de blocos completos ao acaso, em esquema fatorial 4 x 4 (quatro doses de Al x quatro genótipos de *Brachiaria*), com quatro repetições.



Figura 1. Verificação dos valores de pH das soluções nutritivas de cada unidade experimental, no primeiro e segundo período de crescimento.

3.2.2 Estimativa das espécies de alumínio na solução nutritiva

As estimativas das espécies de Al foram obtidas utilizando o *software GeoChem-EZ[®]*, de acordo com a variação do pH da solução.

3.2.3 Coleta do material vegetal e avaliações de parâmetros produtivos da parte aérea

O experimento foi avaliado em dois períodos de crescimento. A parte aérea dos quatro genótipos foi colhida aos 35 dias (posteriormente ao emprego da solução 100% acrescida de Al) e aos 36 após a primeira colheita. Nas ocasiões dos cortes das plantas, os tecidos vegetais foram separados em lâminas foliares e colmos + bainhas, sendo a área das lâminas foliares determinada com o auxílio do integrador de área foliar LICOR[®], modelo LI 3100. As plantas foram cortadas cerca de quatro centímetros da base do perfilho (colo das plantas). As colheitas foram determinadas em função do início de senescência das folhas maduras. Posteriormente, todo o material vegetal foi colocado em sacos de papel previamente identificados e secados por 72 horas em estufa com circulação forçada de ar, a 65°C.

3.2.4 Avaliações de parâmetros produtivos e morfológicos do sistema radicular

Ao final do segundo período de crescimento as raízes foram coletadas e lavadas com água desionizada. Para a avaliação do comprimento e superfície radiculares, foi retirada uma subamostra com aproximadamente 20% de massa fresca total para cada unidade experimental (LAVRES JUNIOR; MONTEIRO, 2003). Em seguida, as subamostras foram coradas com solução de violeta genciana (50 mg L^{-1}) e armazenadas em geladeira $\pm 10^\circ\text{C}$ (NOORDWIJK; FLORIS, 1979). Posteriormente as raízes foram colocadas em lâminas transparentes ($3\text{M}^{\text{®}}$, $210 \times 297 \text{ mm}$) evitando-se sobreposição e digitalizadas. As imagens das raízes foram obtidas com o auxílio de *scanner* HP[®] Scanjet 2400. O comprimento e a superfície radiculares foram determinados por meio do aplicativo SIARCS (Sistema Integrado para Análise de Raízes e Cobertura do Solo) versão 3.0. Após a determinação do comprimento e superfície radiculares, as subamostras foram colocadas em estufa de circulação forçada de ar, a 65°C por 72 horas e os valores de produção de massa seca foram somados ao material radicular pesado anteriormente. Os valores totais de comprimento e superfície radiculares foram expressos por meio de regra de três direta entre os valores da massa seca da subamostra com a massa seca total de raízes. A redução relativa do crescimento radicular foi calculada como: $Y = 100 - [(\text{comprimento ou superfície} + \text{Al}) / (\text{comprimento ou superfície} - \text{Al})]$ (RYAN et al., 2011).

3.2.5 Concentração, acúmulo e transporte à longa distância de alumínio

A determinação da concentração de Al nos tecidos vegetais (lâminas foliares, colmos + bainhas e raízes) foi realizada utilizando-se 0,25 g de material vegetal seco e moído por meio da digestão nitro-perclórica ($\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$, 83%:17%, 5:1 v/v) (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997). A leitura do extrato foi realizada por meio de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES).

O acúmulo de Al no tecido vegetal foi obtido pelo produto da concentração de Al e a produção de massa seca, sendo:

$$Ac_{\text{tecido (mg)}} = [(\text{concentração de Al (mg kg}^{-1}\text{)}) \times \text{massa seca (g)}].$$

O transporte à longa distância de Al (T_{ld}) do Al foi determinado em função do acúmulo nas folhas, no colmo + bainha e nas raízes, por meio da fórmula:

$$Tld = [Ac_{\text{folhas}} / (Ac_{\text{folhas}} + Ac_{\text{(colmos + bainhas)}} + Ac_{\text{raízes}})] \times 100.$$

Em que: $Ac_{\text{folhas (mg)}}$ = acúmulo de Al nas folhas no primeiro e segundo período de crescimento; $Ac_{\text{colmos + bainhas (mg)}}$ = acúmulo de Al no colmos + bainhas no primeiro e segundo período de crescimento; $Ac_{\text{raízes (mg)}}$ = acúmulo de Al nas raízes.

3.2.6 Determinação do peróxido de hidrogênio e da peroxidação de lipídeos

Após 30 dias do início dos tratamentos (adição de Al na solução nutritiva), uma planta de cada vaso foi coletada e, em seguida, preservada em nitrogênio líquido e armazenada em freezer -80°C . A concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Alexieva et al. (2001). As amostras de folhas e raízes foram maceradas com solução de 2,4,6-tricloroanisol (TCA) 0,1% na proporção de 0,2 g / 2 mL para folhas e 0,4 g / 2 mL para raízes, com 20% de polivinilpirrolidona (PVPP) (m:v). Após completa homogeneização, as amostras foram transferidas para tubos e centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos, à 4°C . Foram retirados 200 μL do sobrenadante aos quais foram adicionados 200 μL de tampão fosfato de potássio 100 mmol L^{-1} (pH 7,5) e 800 μL de solução 1 mol L^{-1} de iodeto de potássio (KI). Os tubos foram colocados em gelo e permaneceram no escuro durante 1 hora. Após esse período, as amostras permaneceram no escuro por 20 minutos, porém em temperatura ambiente para a estabilização da reação, e em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro *Perkin Elmer*[®] - *Lambda 40* a 390 nm. A quantidade de H_2O_2 foi expressa em nmol/g de tecido fresco.

Para a análise da concentração de malondialdeído (MDA) foi utilizado o método descrito por Heath e Packer (1968), com as seguintes adaptações. Amostras de lâminas foliares e raízes foram maceradas em solução de TCA 0,1% na proporção de 0,2 g / 2 mL para folhas e 0,4 g / 2 mL para raízes, com 20% de PVPP (m:v). Após completa homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos, à 4°C . Foi retirado 0,25 mL do sobrenadante e transferido para outro tubo contendo 1,0 mL de solução TCA 20% e ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) 0,5%. A mistura foi incubada a 95°C por 30 minutos, e em seguida resfriada em gelo por 10 minutos. As amostras foram novamente centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos, e posteriormente realizou-se a leitura em espectrofotômetro *Perkin Elmer*[®] - *Lambda 40* a 535 e 600 nm. A quantidade de MDA foi expressa em nmol/g de tecido fresco.

3.2.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com auxílio do *software Statistical Analysis System* (SAS, 2000). Foi efetuada a análise de variância para verificar a interação entre as doses de Al e os genótipos de *Brachiaria* para as variáveis respostas. De acordo com o nível de significância no teste F ($p < 0,05$), procedeu-se o estudo de regressão de primeiro e de segundo grau. Foi realizado o teste de Tukey ($p < 0,05$) para a comparação de médias entre os genótipos, dentro de cada dose de Al.

3.3 Resultados

3.3.1 Variação dos valores de pH no período experimental

No primeiro período de crescimento, os valores de pH da solução nutritiva variaram na faixa de 3,0 a 4,5 aproximadamente (Figura 2). No segundo período de crescimento, após o corte das plantas, ocorreu a elevação do pH da solução nutritiva na dose de 0 mmol L⁻¹ de Al no período de 30 de abril e quatro de maio, para todos os genótipos de *Brachiaria*. No entanto a partir do dia quatro de maio (cinco dias após a primeira coleta) houve a redução do pH na ausência de Al na solução nutritiva. Para as soluções nutritivas com doses de 0,44; 0,89 e 1,33 mmol L⁻¹ de Al a faixa de variação de pH foi de 3,0 a 4,5 (Figura 3).

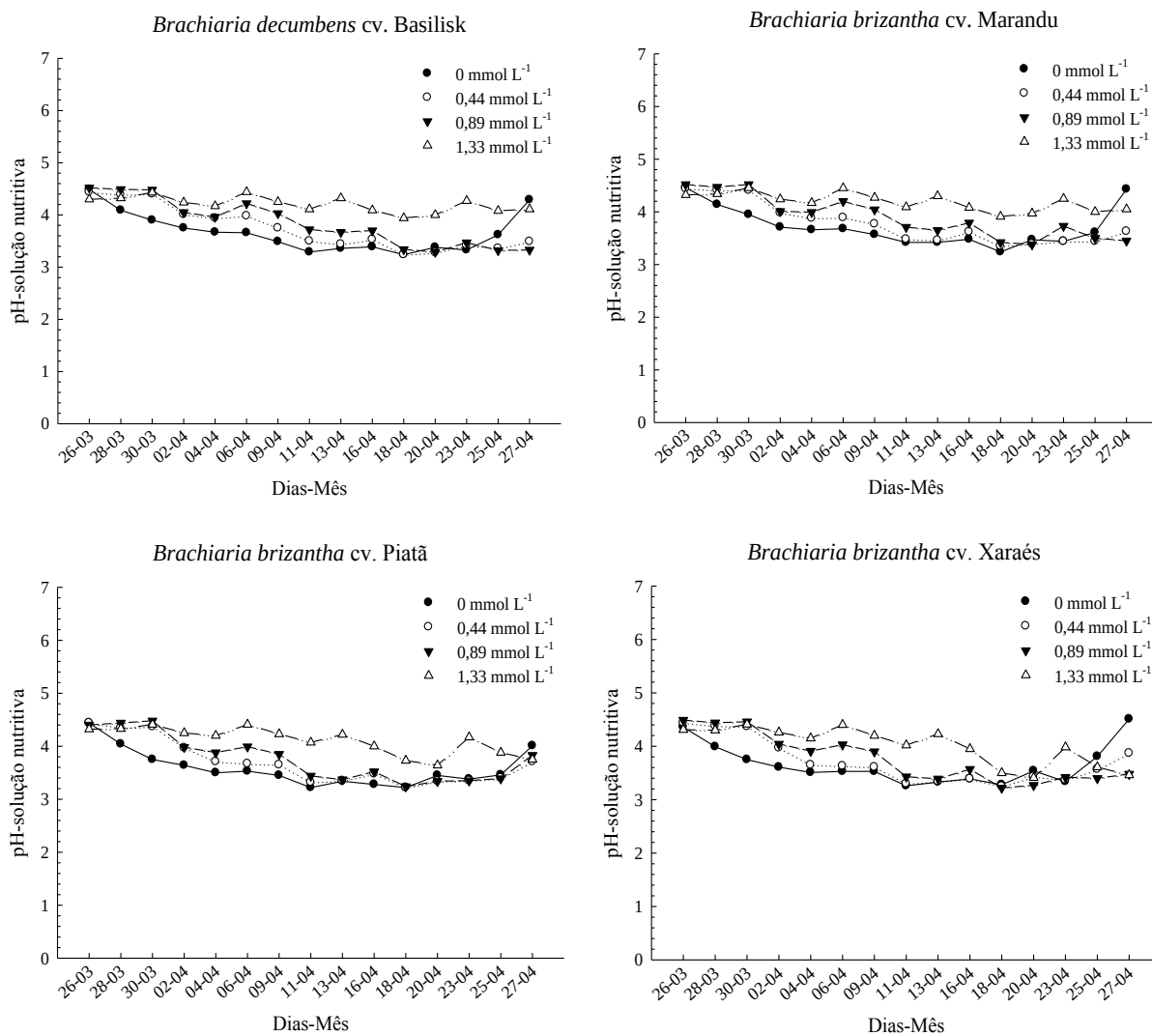


Figura 2. Variação dos valores de pH das soluções nutritivas, em função das doses de Al para os genótipos de *Brachiaria*, no primeiro período de crescimento.

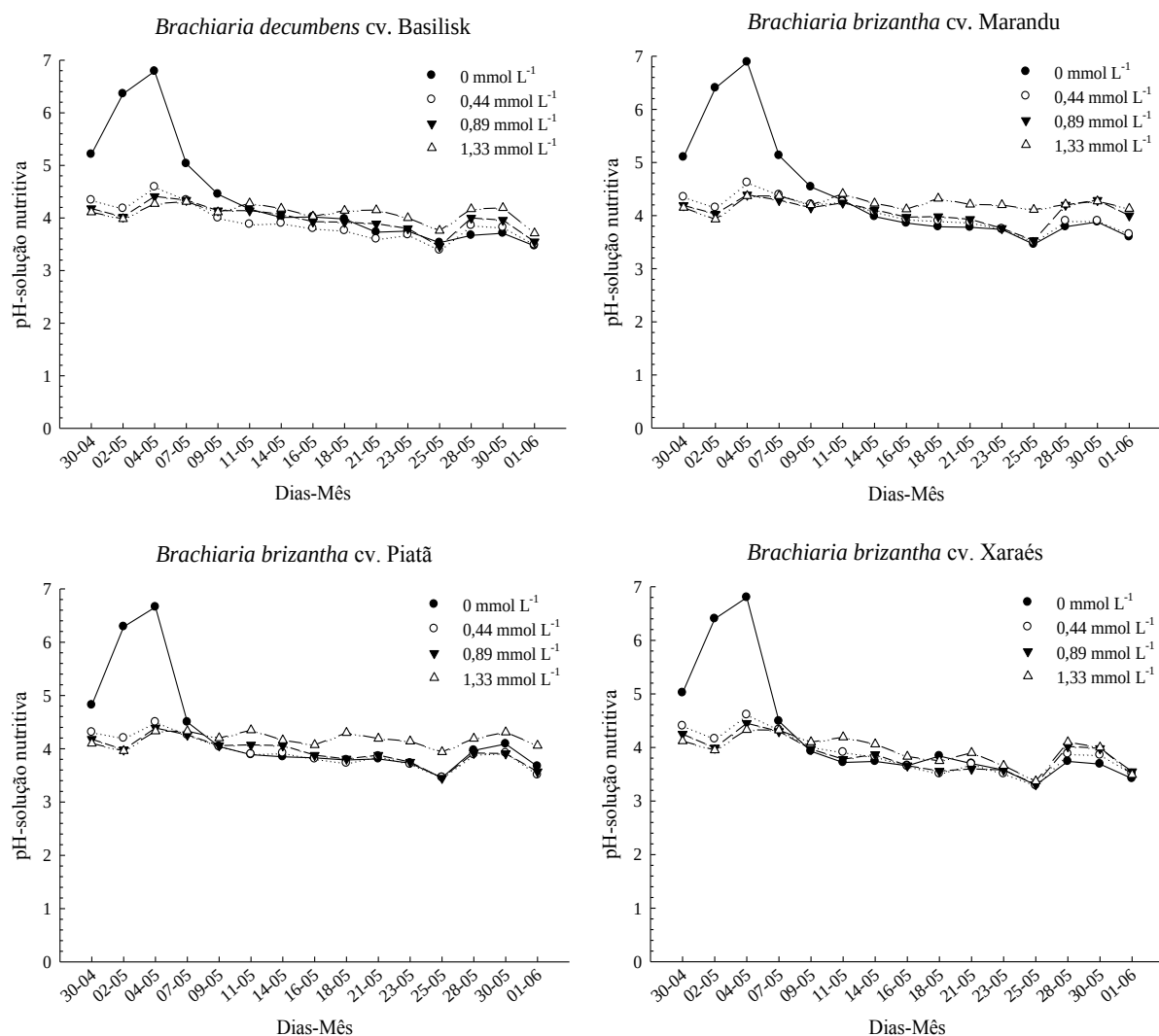


Figura 3. Variação dos valores de pH das soluções nutritivas, em função das doses de Al para os genótipos de *Brachiaria*, no segundo período de crescimento.

3.3.2 Especificação química da solução nutritiva

Por meio do software *GeoChem-EZ*[®], foi possível verificar que a mudança nos valores de pH da solução nutritiva interferiu diretamente na disponibilidade do Al, devido a possível complexação do metal com os ligantes: PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , $\text{B}(\text{OH})_4^-$ e OH^- (Tabela 1). Por essa razão, com o aumento do pH, a disponibilidade de Al livre (Al^{3+}), foi reduzida para as plantas, devido a formação de complexos insolúveis - indisponíveis para a absorção das raízes. Todavia, vale ressaltar que esses resultados são considerados apenas estimativas, pois a interação entre o Al e as raízes dos genótipos de *Brachiaria* envolve também a capacidade de restrição a entrada do metal nas raízes (mecanismo de tolerância).

Tabela 1 - Especificação do $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ das soluções nutritivas pelo *software GeoChem-EZ*[®], em função dos valores de pH e das doses de Al.

	Doses de Al (mmol L ⁻¹)		
pH = 3,0	0,44	0,89	1,33
Al livre (Al ³⁺)	80,73%	83,72%	85,81%
Complexado com PO ₄ ³⁻	1,85%	1,46%	1,21%
Complexado com SO ₄ ²⁻	17,00%	14,39%	12,55%
Complexado com B(OH) ₄ ⁻	0,02%	0,02%	0,02%
Complexado com OH ⁻	0,41%	0,41%	0,41%
pH = 4,0			
Al livre (Al ³⁺)	74,42%	78,57%	81,14%
Complexado com PO ₄ ³⁻	4,66%	2,83%	2,04%
Complexado com SO ₄ ²⁻	16,81%	14,39%	12,62%
Complexado com B(OH) ₄ ⁻	0,18%	0,18%	0,17%
Complexado com OH ⁻	3,93%	4,03%	4,04%
pH = 5,0			
Al livre (Al ³⁺)	45,80%	49,00%	50,49%
Complexado com PO ₄ ³⁻	6,67%	3,46%	2,35%
Complexado com SO ₄ ²⁻	10,94%	10,07%	9,24%
Complexado com B(OH) ₄ ⁻	0,93%	0,78%	0,67%
Complexado com OH ⁻	35,66%	36,70%	37,25%
pH = 6,0			
Al livre (Al ³⁺)	2,07%	2,16%	2,23%
Complexado com PO ₄ ³⁻	5,85%	3,23%	2,25%
Complexado com SO ₄ ²⁻	0,56%	0,56%	0,57%
Complexado com B(OH) ₄ ⁻	0,50%	0,46%	0,41%
Complexado com OH ⁻	91,02%	93,59%	94,54%
pH = 7,0			
Complexado com PO ₄ ³⁻	0,08%	0,07%	0,07%
Complexado com OH ⁻	99,92%	99,92%	99,92%

3.3.3 Parâmetros produtivos da parte aérea

A área foliar e a produção de massa seca da parte aérea dos genótipos de *Brachiaria*, em ambos os períodos de crescimento, foram reduzidas pela presença de Al na solução nutritiva.

A interação genótipos x doses de Al foi significativa para o desenvolvimento da área foliar, no primeiro e segundo período de crescimento. Para o primeiro crescimento os resultados ajustaram-se ao modelo quadrático, sendo observado que o ponto de máxima área foliar foi obtido com a ausência de Al na solução nutritiva (Figura 4A). Para o mesmo período foi observado que a *B. brizantha* cv. Xaraés apresentou menor redução relativa da área foliar (54%) com fornecimento de Al de 1,33 mmol L⁻¹, quando comparado a *B. decumbens* cv. Basilisk, *B. brizantha* cv. Marandu e *B. brizantha* cv. Piatã, os quais apresentaram valores de 77%, 76% e 67% (Figura 4B).

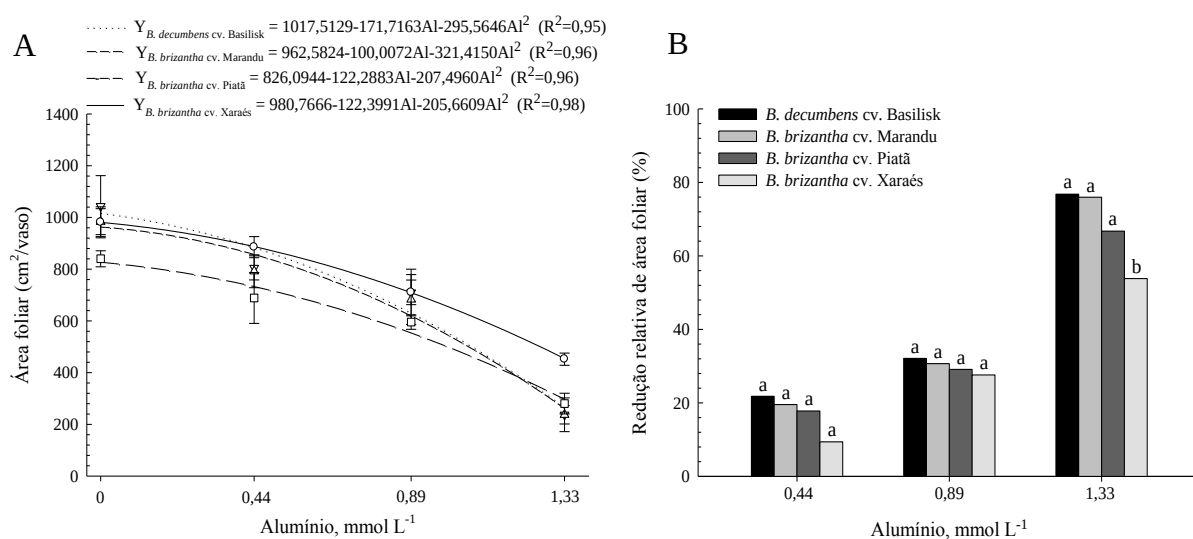


Figura 4. Área foliar total (A) e redução relativa de área foliar total (B), no primeiro período de crescimento dos quatro genótipos de *Brachiaria*, em resposta à adição de alumínio na solução nutritiva.

A área foliar das gramíneas *B. decumbens* cv. Basilisk, *B. brizantha* cv. Piatã e *B. brizantha* cv. Xaraés apresentaram redução linear no segundo período de crescimento, enquanto que para a *B. brizantha* cv. Marandu o ajuste foi ao modelo quadrático de regressão, constatando-se a maior área foliar para a dose de Al de aproximadamente 0,32 mmol L⁻¹ (Figura 5A). No segundo período de crescimento, o fornecimento da maior dose de Al promoveu maior redução relativa da área foliar da *B. brizantha* cv. Marandu (77%), verificando-se menor tolerância ao Al em relação aos outros genótipos, que revelaram valores

de 34%, 48% e 21%, respectivamente para *B. decumbens* cv. Basilisk, *B. brizantha* cv. Piatã e *B. brizantha* cv. Xaraés (Figura 5B).

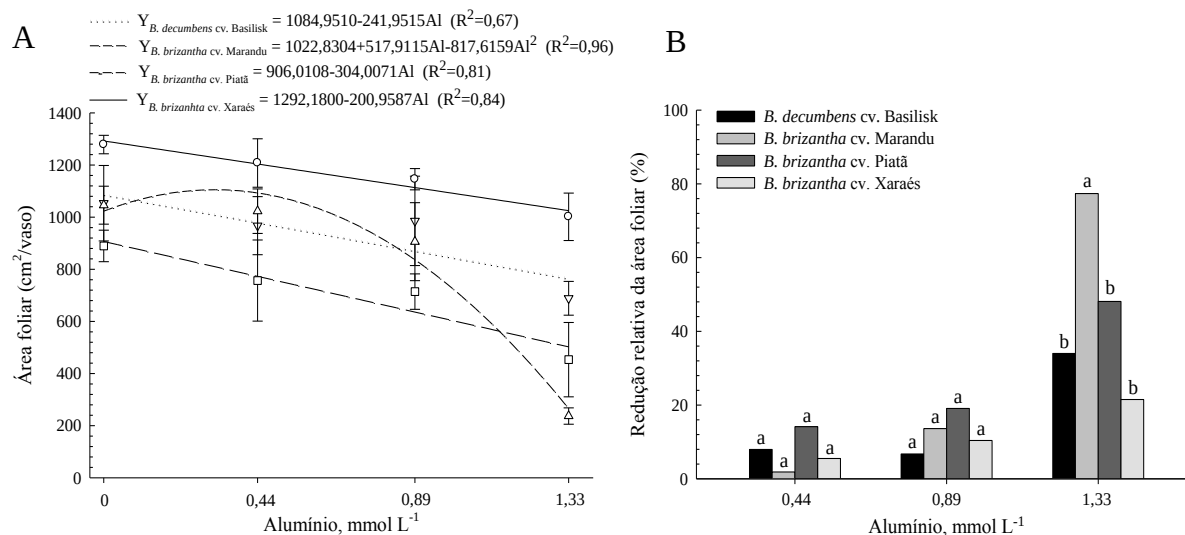


Figura 5. Área foliar total (A) e redução relativa de área foliar total (B), no segundo período de crescimento dos quatro genótipos de *Brachiaria*, em resposta à adição de alumínio na solução nutritiva.

Para o primeiro período de crescimento, constatou-se interação genótipos x doses de Al para a produção de massa seca da parte aérea. As produções de biomassa da parte aérea das gramíneas *B. decumbens* cv. Basilisk e *B. brizantha* cv. Piatã decresceram linearmente, enquanto que para o cv. Marandu e cv. Xaraés o ajuste foi ao modelo quadrático de regressão, com o aumento da concentração de Al na solução nutritiva (Figura 6A). A menor redução relativa de biomassa da parte aérea foi observada para a *B. brizantha* cv. Xaraés (correspondendo a 63%), enquanto que para os genótipos Basilisk, Marandu e Piatã, estas reduções foram, respectivamente, de 87%, 81% e 75%, para a maior concentração de Al na solução (Figura 6B).

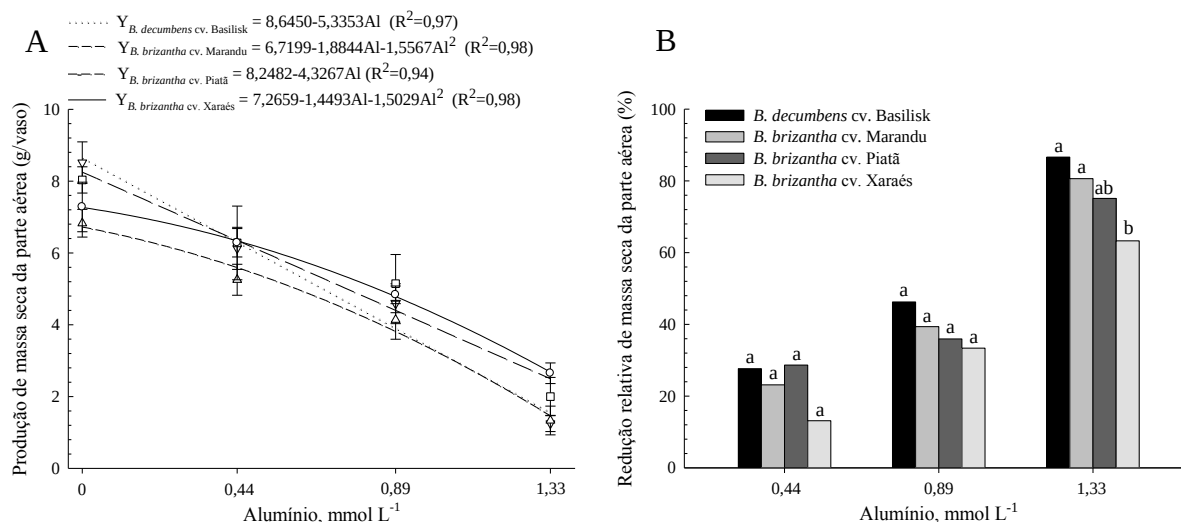


Figura 6. Produção de massa seca da parte aérea (A) e redução relativa de massa seca da parte aérea (B), no primeiro período de crescimento dos quatro genótipos de *Brachiaria*, em resposta à adição de alumínio na solução nutritiva.

No segundo período de crescimento verificou-se significância apenas para as doses de Al e genótipos isoladamente (Figura 7A), sendo que a máxima produção de massa seca da parte aérea poderia ser obtida mesmo com a concentração de 0,17 mmol L⁻¹ de Al na solução. Para o segundo período de crescimento, foi constatada maior redução relativa da massa seca da parte aérea com a adição do Al na solução para o genótipo Marandu (77%), ao passo que para os genótipos Basilisk e Piatã os valores foram de 47%, para ambos, e de 29% para o cultivar Xaraés (Figura 7B).

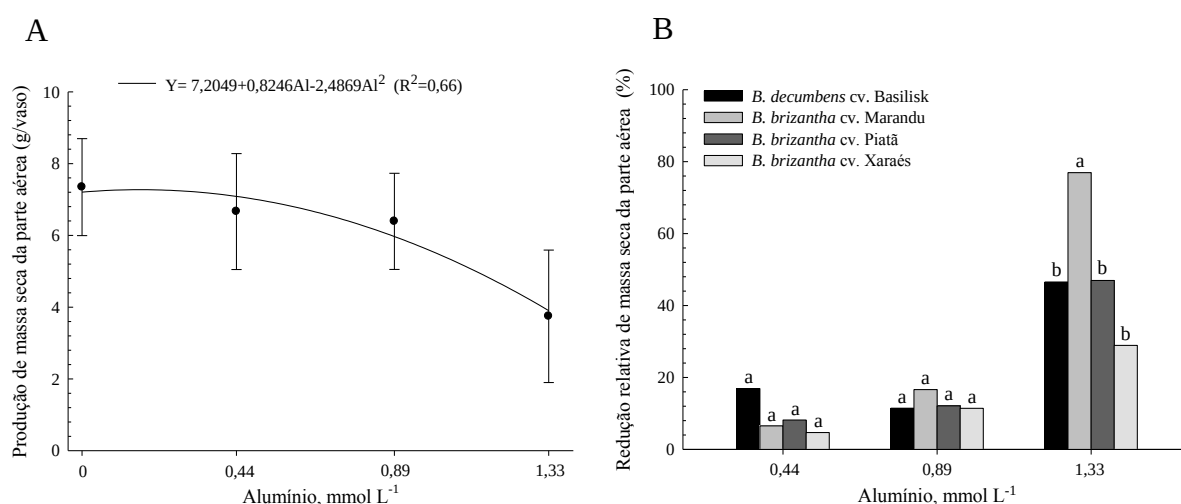


Figura 7. Produção de massa seca da parte aérea (A) e redução relativa de massa seca da parte aérea (B), no segundo período de crescimento dos quatro genótipos de *Brachiaria*, em resposta à adição de alumínio na solução nutritiva.

Os maiores índices de redução relativa observados para área foliar e massa seca da parte aérea no primeiro período de crescimento, em relação ao segundo, podem ser devido ao gasto energético destinado ao estabelecimento e ao crescimento do sistema radicular das plantas, necessários para garantir a absorção de água e nutrientes, bem como pelo menor aparato estrutural e bioquímico formado, que poderiam conferir maior tolerância ao excesso do metal.

3.3.4 Massa seca de raízes, comprimento e superfície radicular

Para as avaliações de parâmetros do sistema radicular, produção de massa seca de raízes, comprimento e superfície radicular total, não se constatou significância entre a interação doses de Al e genótipos, sendo apenas observados efeitos isolados para as doses de Al e genótipos. Os resultados de produção de massa seca de raízes e superfície radicular total ajustaram-se ao modelo de segundo grau, sendo possível constatar que os pontos de máximo para cada atributo, poderiam ser obtidos mesmo com as concentrações de Al na solução de 0,09 e 0,16 mmol L⁻¹ (Figuras 8A e 8E). Todavia, o comprimento radicular total decresceu linearmente com o aumento das concentrações de Al (Figura 8C).

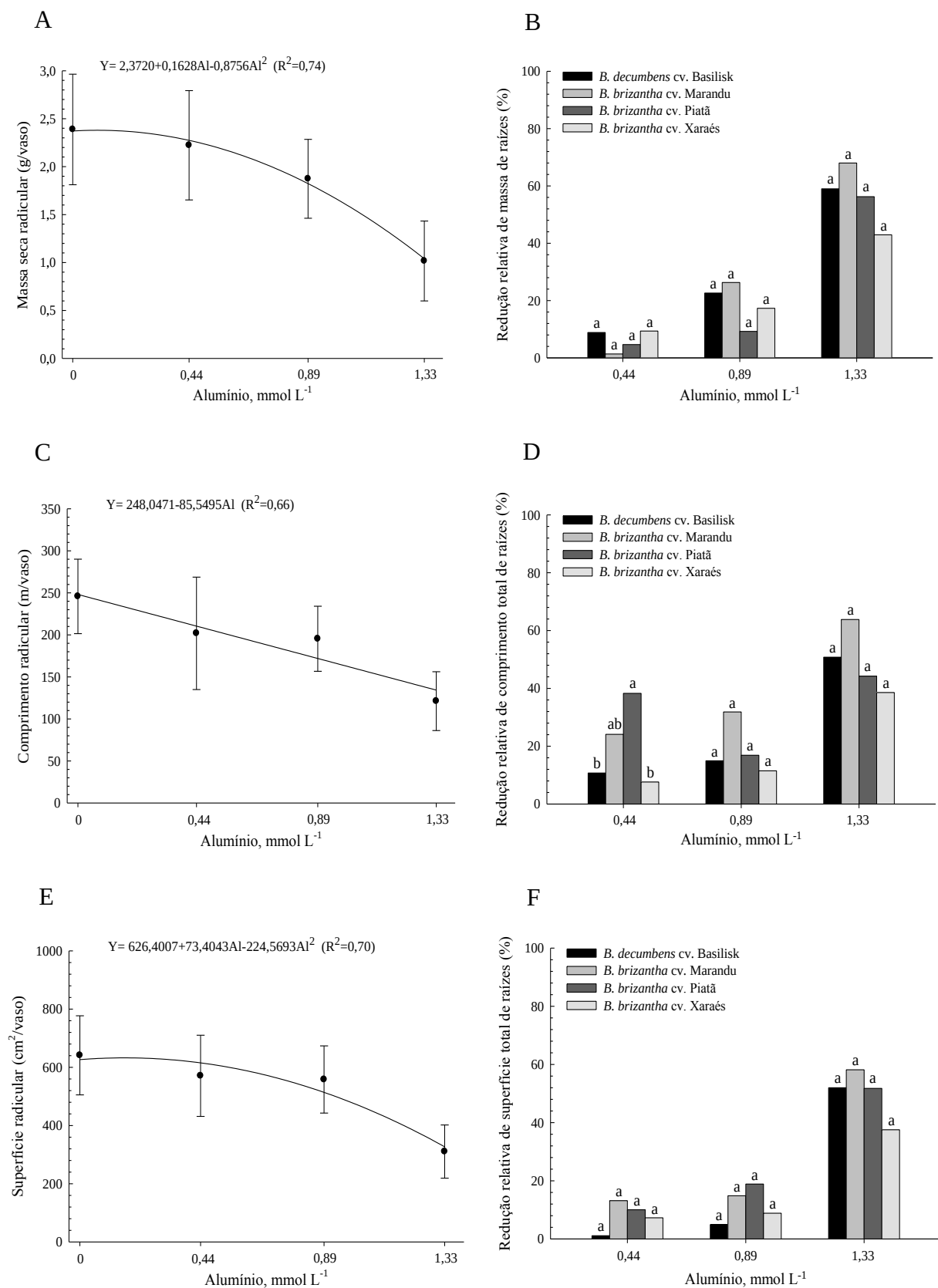


Figura 8. Produção de massa seca (A), comprimento (C) e superfície total de raízes (E) e reduções relativas de massa seca (B), de comprimento (D) e de superfície total de raízes (F) dos quatro genótipos de *Brachiaria*, em resposta à adição de alumínio na solução nutritiva.

Não foram constatadas diferenças entre os genótipos de *Brachiaria* para a redução relativa de massa seca de raízes, e para a redução relativa do crescimento radicular (comprimento e superfície) nas maiores doses de Al (Figuras 8B, 8D e 8F). Desse modo essas variáveis não demonstraram distinção de tolerância entre os genótipos de *Brachiaria* em condições de toxidez por Al. Contudo, foi verificado decréscimo progressivo para os atributos radiculares com o incremento da concentração de Al na solução nutritiva, o que resultou em alterações na morfologia do sistema radicular e consequentemente redução no volume total de raízes, sendo essa redução do volume de raízes, considerada dentre os principais sintomas de toxidez de Al em plantas. Apesar de não haver diferenças entre os genótipos de *Brachiaria* para esses atributos, vale ressaltar que apenas a *B. brizantha* cv. Xaraés obteve redução relativa menor que 50% para os parâmetros radiculares analisados, quando na presença da dose de Al de 1,33 mmol L⁻¹.

3.3.5 Concentração, acúmulo de alumínio nas folhas e raízes e transporte à longa distância

O incremento das doses de Al na solução nutritiva resultou em aumento significativo da concentração de Al nas lâminas foliares no primeiro e segundo período de crescimento. Observou-se no primeiro período de crescimento das plantas que, com o aumento do fornecimento de Al na solução, da menor (0 mmol L⁻¹) para a maior dose (1,33 mmol L⁻¹), ocorreu incremento na concentração do elemento nas folhas dos genótipos Basilisk, Marandu, Piatã e Xaraés, respectivamente de 438%, 967%, 947% e 277%. Para o segundo período de crescimento, estes incrementos corresponderam a 426%, 1.310%, 827% e 495%, respectivamente (Figuras 9A e 10A). A concentração de Al nos tecidos foliares da *B. brizantha* cv. Marandu aumentou do primeiro para o segundo período de crescimento, em aproximadamente 35% com fornecimento da maior dose de Al.

Para as doses de Al de 0,44 e 0,89 mmol L⁻¹, no primeiro período de crescimento, a *B. brizantha* cv. Marandu apresentou maior acúmulo de Al, correspondendo a 60% e 59% com relação a *B. decumbens* cv. Basilisk e de 44% e 47% para a *B. brizantha* cv. Piatã (Figura 9B).

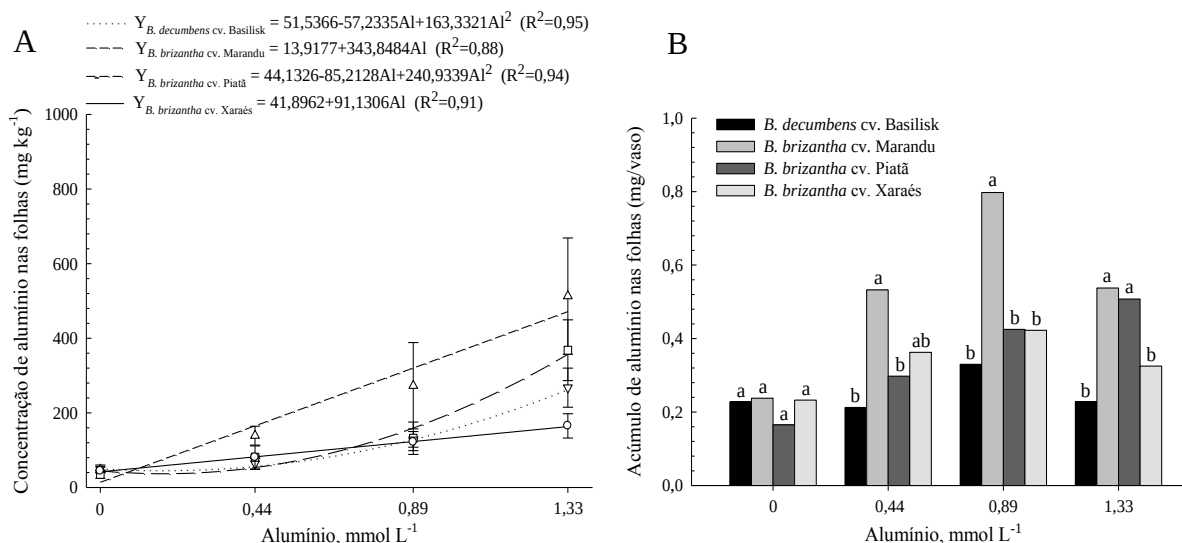


Figura 9. Concentração (A) e acúmulo (B) de Al nas folhas dos quatro genótipos de *Brachiaria*, no primeiro período de crescimento, em resposta à adição de alumínio na solução nutritiva.

A *B. brizantha* cv. Marandu acumulou no segundo período de crescimento para as doses de Al de 0,44 e 0,89 mmol L⁻¹, cerca de 58% e 75% mais Al em relação a *B. decumbens* cv. Basilisk e cerca de 51% e 55% mais Al que a *B. brizantha* cv. Xaraés. Contudo, ressalta-se que na dose de Al de 1,33 mmol L⁻¹ o acúmulo do metal nas folhas da *B. brizantha* cv. Xaraés foi maior em relação aos cultivares Basilisk e Piatã no segundo período de crescimento. Esse fato é justificado pela maior produção de massa seca da parte aérea do genótipo no período de crescimento em questão (Figura 10B).

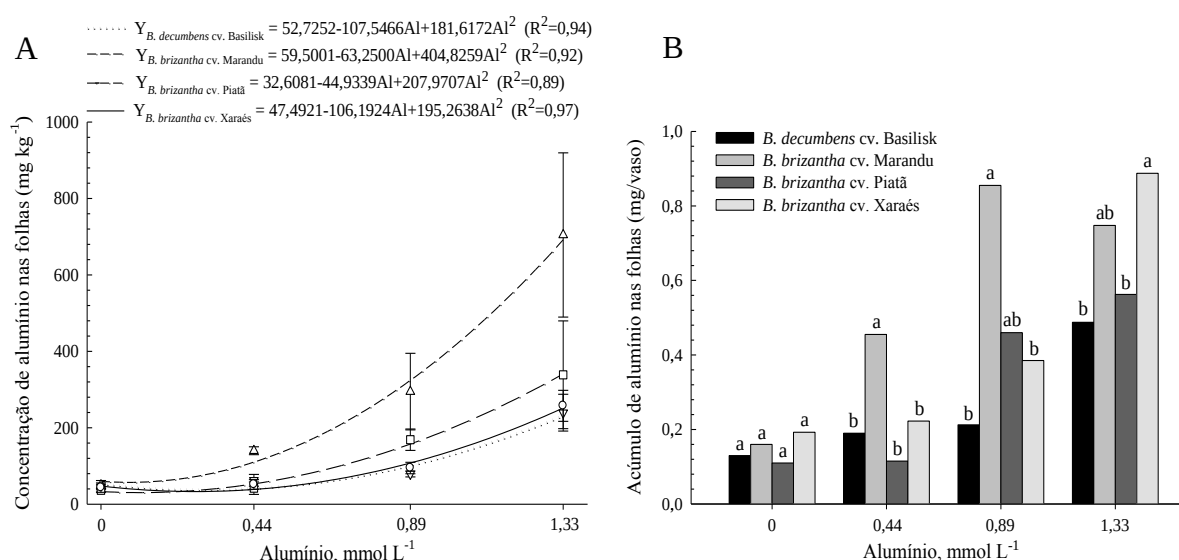


Figura 10. Concentração (A) e acúmulo (B) de Al nas folhas dos quatro genótipos de *Brachiaria*, no segundo período de crescimento, em resposta à adição de alumínio na solução nutritiva.

O aumento na disponibilidade de Al na solução nutritiva interferiu significativamente na concentração de Al nas raízes. Os valores da concentração do metal no sistema radicular aumentaram linearmente para a *B. decumbens* cv. Basilisk, *B. brizantha* cv. Piatã e *B. brizantha* cv. Xaraés, enquanto que para a *B. brizantha* cv. Marandu, o modelo de ajuste foi o quadrático. Verificou-se que a adição de Al na solução nutritiva, da menor para a maior dose, resultou em aumento na concentração do metal de 1.412%, 3.358%, 1.144% e 695% para *B. decumbens* cv. Basilisk, *B. brizantha* cv. Marandu, *B. brizantha* cv. Piatã e *B. brizantha* cv. Xaraés (Figura 11A).

As maiores concentrações de Al foram observadas nas raízes das plantas. Em média, estes valores foram 17 vezes superiores àqueles determinados nas folhas, em ambos os períodos de crescimento, quando adicionado $1,33 \text{ mmol L}^{-1}$ de Al. O maior acúmulo de Al no sistema radicular foi verificado para a *B. brizantha* cv. Marandu, na dose de Al de $1,33 \text{ mmol L}^{-1}$, sendo superior em 46% quando comparado a *B. brizantha* cv. Piatã (Figura 11B).

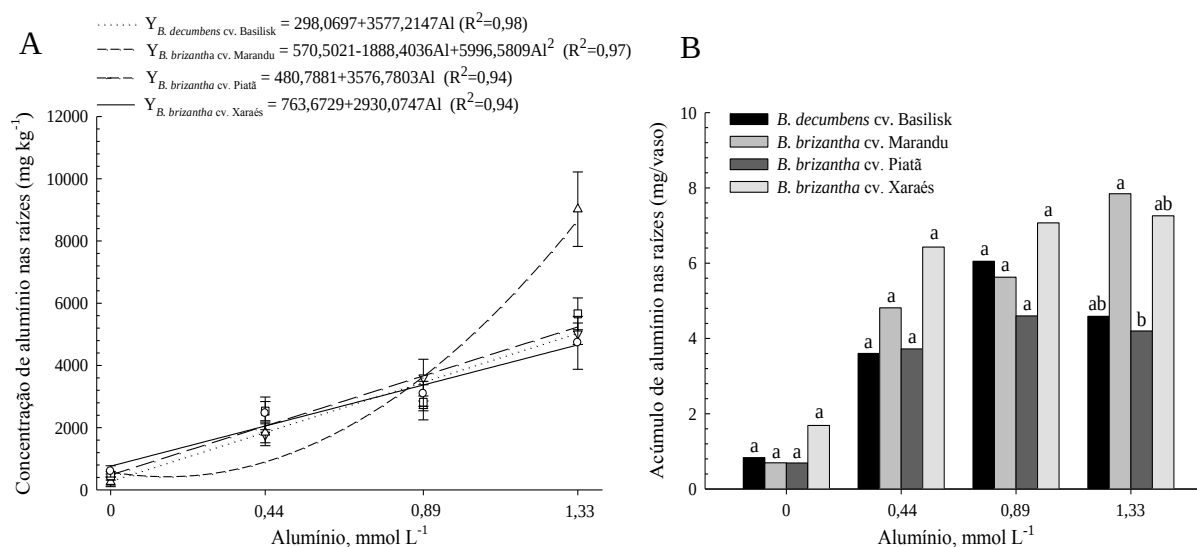


Figura 11. Concentração (A) e acúmulo (B) de Al nas raízes dos quatro genótipos de *Brachiaria*, em resposta à adição de alumínio na solução nutritiva.

Avaliando-se o acúmulo de Al nas folhas, com relação ao total de Al acumulado nas partes vegetais, é possível constatar que o transporte à longa distância do elemento foi cerca de 9% para os genótipos, na presença de Al na solução nutritiva. Esse fato indica que a retenção do elemento nas raízes, no “compartimento apoplástico” e “simplástico”, é efetivo para reduzir o descarregamento de Al no xilema, evidenciando a segunda estratégia de tolerância ao excesso do metal nesses genótipos de *Brachiaria* (Figura 12).

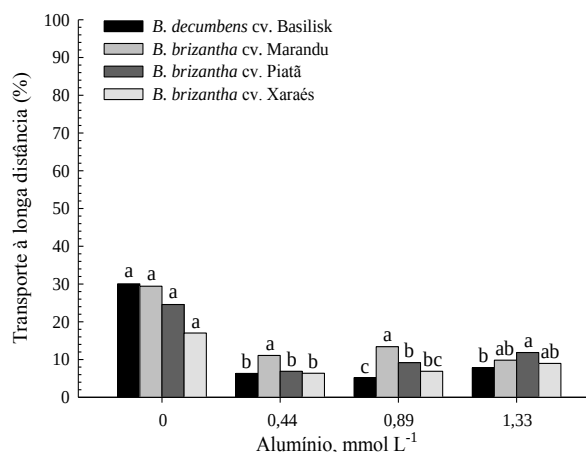


Figura 12. Transporte à longa distância de Al, nos quatro genótipos de *Brachiaria*, em resposta à adição de alumínio na solução nutritiva.

3.3.6 Peroxidação lipídica e peróxido de hidrogênio

A concentração de malondialdeído (MDA) nas folhas da *B. brizantha* cv. Piatã e *B. brizantha* cv. Xaraés foram de aproximadamente 24% superiores àquelas observadas para a *B. decumbens* cv. Basilisk na maior dose de Al (Figura 13A). Para as raízes da *B. decumbens* cv. Basilisk constatou-se que a adição de 0,89 mmol L⁻¹ de Al resultou numa concentração de MDA superior em relação aos genótipos de *B. brizantha*. Contudo na maior dose de Al, verificou-se que a concentração de MDA na *B. brizantha* cv. Piatã aumentou em 29% e 36% quando comparada aos genótipos Marandu e Xaraés.

Não foi constatada diferença na concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) entre os genótipos na dose de Al de 1,33 mmol L⁻¹. No entanto, com o fornecimento de 0,89 mmol L⁻¹ de Al, a *B. brizantha* cv. Piatã apresentou aumento de 36% e 50% na concentração de H₂O₂ com relação aos genótipos de *B. decumbens* cv. Basilisk e *B. brizantha* cv. Xaraés. As raízes não exibiram quantidades de H₂O₂ suficientes para a detecção analítica, mesmo com a utilização de 0,4 g de material vegetal (valor este, superior a 100% daquele comumente usado em análises de rotina).

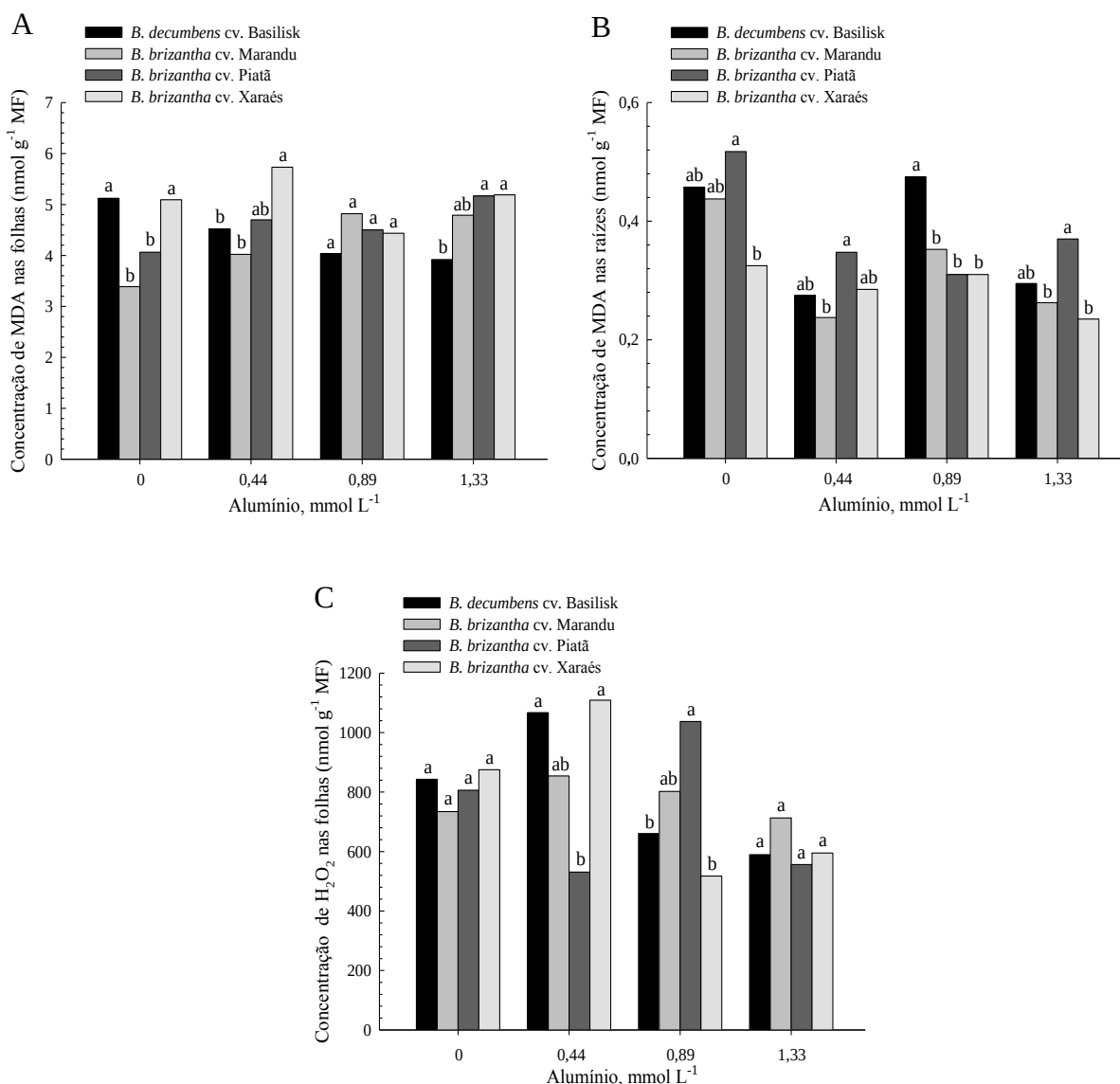


Figura 13. Concentração de malondialdeído (MDA) e de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) nas folhas (A e C) e de MDA nas raízes (B) dos quatro genótipos de *Brachiaria*, em resposta à adição de alumínio na solução nutritiva.

3.4 Discussão

Os parâmetros produtivos, morfológicos e bioquímicos indicam existir tolerância diferencial ao Al entre os genótipos de *Brachiaria*. Esse fato permitiu a seguinte indicação de genótipos com maior e menor tolerância ao excesso do metal na solução: *B. brizantha* cv. Xaraés > *B. decumbens* cv. Basilisk ≥ *B. brizantha* cv. Piatã > *B. brizantha* cv. Marandu.

A *B. brizantha* cv. Xaraés apresentou a menor redução relativa em termos percentuais para os parâmetros produtivos da parte aérea e morfológicos do sistema radicular, além de exibir as menores concentrações de Al nas folhas, no primeiro período de crescimento, e no

sistema radicular, sendo características indicativas de tolerância nesse genótipo. Em contraste a *B. brizantha* cv. Marandu apresentou os maiores índices percentuais de redução relativa para os atributos produtivos e morfológicos, além das maiores concentrações do metal nos tecidos vegetais. Diversos estudos têm demonstrado que as gramíneas forrageiras *B. decumbens* cv. Basilisk e *B. brizantha* cv. Marandu são genótipos considerados tolerantes ao Al (ARROYAVE et al., 2011; RAMOS et al., 2012; ARROYAVE et al., 2013). Contudo vale ressaltar, que no presente estudo a *B. brizantha* cv. Xaraés apresentou maior tolerância ao excesso de Al, quando comparado aos genótipos Basilisk e Marandu.

Apesar dos danos causados pelo Al não serem totalmente conhecidos principalmente na parte aérea, e especificamente nas folhas (sintomatologia), são notórias as injúrias e as modificações ocorridas no sistema radicular ocasionadas pela toxidez do metal. A baixa produção de matéria seca da parte aérea e a redução da área foliar estão diretamente relacionadas com os danos causados pelo Al nas raízes, os quais limitam a absorção de água e nutrientes (*e.g.*, Ca, Mg e P), prejudicando o crescimento vegetal. Batista et al. (2013) constataram redução significativa da matéria seca da parte aérea e das raízes em milho com o aumento da concentração de Al na solução nutritiva.

Ao se considerar a tolerância diferencial ao Al em gramíneas forrageiras, pesquisas têm abordado principalmente a avaliação de atributos radiculares para distinção entre genótipos tolerantes e sensíveis (ALMEIDA; MONTEIRO; JANK, 2000; ARROYAVE et al., 2011; BITENCOURT et al., 2011; RAMOS et al., 2012), uma vez que o efeito inibitório do crescimento das raízes pode ocorrer em curto espaço de tempo após a exposição ao Al (BARCELÓ; POSCHENRIEDER, 2002). Portanto para a expressão e distinção de genótipos potencialmente tolerantes é necessária a exposição das raízes por maior tempo de avaliação, devido à rápida inibição ocasionada pelo metal e o tempo necessário para a recuperação do crescimento e alongação das raízes (ARROYAVE, et al., 2011).

O fornecimento de Al inibe a expansão e alongamento celular e posteriormente à divisão celular, afetando diretamente o meristema radicular (KOCHIAN, 1995; MATSUMOTO, 2000). Por esse motivo a inibição do crescimento radicular é relacionada como o principal efeito tóxico ocasionado pelo Al. Dessa maneira, o sistema radicular funciona como barreira física e bioquímica para evitar a entrada do metal na planta (HORST; WANG; ETICHA, 2010). Os índices de tolerância ao Al, baseados nos parâmetros massa seca de raízes, comprimento e superfície radicular, não demonstraram diferenças entre os genótipos de *Brachiaria*. No entanto é relevante destacar que apenas a *B. brizantha* cv. Xaraés

obteve valores de redução relativa dos parâmetros de crescimento radicular menores que 50%, fato, pelo qual esse genótipo pode ser correlacionado como tolerante.

A relação entre os parâmetros de crescimentos com as distintas concentrações e acúmulos de Al na parte aérea e no sistema radicular, indica haver diferenças entre os genótipos de *Brachiaria* com relação aos mecanismos de absorção apoplástica e simplástica. A análise quantitativa de Al nas raízes revelou que a *B. brizantha* cv. Marandu obteve as maiores concentrações permitindo, portanto, a maior entrada do metal nas células radiculares e consequentemente maior concentração e acúmulo de Al em todo tecido vegetal. Wenzel et al. (2002) avaliaram os genótipos *B. decumbens* e *B. ruzizienses* e constataram concentrações superiores de Al no sistema radicular com relação as lâminas foliares, sendo que a *Brachiaria ruzizienses* foi considerada sensível por apresentar maior concentração de Al em ambas as partes vegetais. Portanto, a maior concentração e acúmulo do elemento em tecidos vegetais, em genótipos com menor tolerância ao metal, podem ser justificados pela menor eficiência dos mecanismos de exclusão (primeira estratégia de tolerância) e de detoxificação interna (segunda estratégia).

As raízes dos genótipos apresentaram concentrações e acúmulos de Al superiores aos valores verificados nas lâminas foliares, o que reflete a compartimentação nas raízes e ligação do metal, principalmente, no apoplasto radicular, como também verificado por Wang, Stass e Horst (2004) e por Rangel, Rao e Horst (2009). Assim o mecanismo de absorção e compartimentação no espaço livre aparente (apoplasto) de células radiculares são reconhecidos como pré-requisito para a tolerância ao Al (HORST; WANG; ETICHA, 2010). No entanto, os mecanismos intrínsecos que evitam a ligação do Al em apoplasto são desconhecidos.

Os mecanismos de tolerância ao excesso do Al, por meio da absorção apoplástica e simplástica (notadamente no vacúolo) são determinantes para evitar que o Al alcance o xilema e seja transportado para a parte aérea. Portanto a variação do acúmulo do metal entre a parte aérea e o sistema radicular é dependente das características de restrição à entrada e complexação do Al de cada genótipo de *Brachiaria*. Nesse sentido o transporte à longa distância de Al revelou que menos de 10% do elemento absorvido pelo sistema radicular é transportado para as lâminas foliares (Figura 12). Esse fato demonstra que a transferência do metal para as folhas pode ser considerado baixo em genótipos de gramíneas forrageiras (WEBB, 1953).

A concentração de malondialdeído (MDA), subproduto do processo de peroxidação lipídica, aumentou nos genótipos de *B. brizantha* cv. Marandu e *B. brizantha* cv. Piatã,

enquanto que para a *B. decumbens* cv. Basilisk esses valores reduziram com aumento de Al na solução nutritiva (Figura 13A). Para a *B. brizantha* cv. Xaraés os valores de MDA apresentaram variações, aumentando na dose de Al de 0,44 mmol L⁻¹ e reduzindo para as maiores concentrações de Al na solução. Guo et al. (2004) constataram aumento na concentração de MDA nas folhas dos genótipos de cevada Gebeina (tolerante) e Shang 70-119 (sensível), com relação ao fornecimento de Al e Cd separadamente e em conjunto, verificando quantidade superior de MDA no genótipo sensível. Assim, o contraste da peroxidação lipídica entre os genótipos reafirma que determinadas espécies como a *B. decumbens* cv. Basilisk e *B. brizantha* cv. Xaraés possuem capacidade mais eficiente de amenizar os danos na estrutura da membrana celular causados pela exposição ao Al tóxico.

Para o sistema radicular, as concentrações de MDA foram inferiores aos encontrados nas folhas. A redução na peroxidação lipídica nas raízes quando na presença de Al evidencia a capacidade das plantas de *Brachiaria* modularem seus mecanismos de tolerância, reduzindo os danos na membrana celular (Figura 13B).

A redução da concentração de H₂O₂ nas folhas dos genótipos, em função do incremento da concentração de Al na solução, indica que provavelmente o sistema antioxidativo dos genótipos de *Brachiaria* desempenha importante função para diminuir a quantidade de espécies reativas de oxigênio, que causam a disfunção no metabolismo celular (Figura 13C).

Os resultados analisados proporcionam a base para o entendimento acerca da tolerância diferencial entre os genótipos de *Brachiaria* estudados. Todavia é necessária a obtenção de mais informações relacionadas à bioquímica (atividades de enzimas do sistema antioxidativo), bem como das modificações ultraestruturais nas células radiculares e da capacidade de acumular o Al no apoplasto e no simplasto de células radiculares. Esse conhecimento permitirá agregar mais informações bioquímicas e fisiológicas determinantes para o entendimento da tolerância diferencial ao Al, por espécies forrageiras do gênero *Brachiaria*.

3.5 Conclusões

1. A *B. brizantha* cv. Marandu é menos tolerante ao excesso de Al em relação à *B. brizantha* cv. Xaraés. Avaliações exclusivas de produção de massa seca, de comprimento e superfície total de raízes não são efetivas para caracterizar os genótipos de *Brachiaria*, quanto à tolerância ao excesso de Al.

2. A menor redução relativa no crescimento de raízes pelo excesso de Al é observada no genótipo mais tolerante (Xaraés).

3. A maior concentração de Al nas folhas e nas raízes é verificada para a *B. brizantha* cv. Marandu, revelando menor eficiência nos mecanismos de detoxificação interna, mesmo sendo idêntico o transporte à longa distância de Al em todos os genótipos.

Referências

- ALEXIEVA, V.; SERGIEV, I.; MAPELLI, S.; KARANOV, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant Cell and Environment**, Oxon, v. 24, p. 1337–1344, 2001.
- ALMEIDA, A.A.S.; MONTEIRO, F.A.; JANK, L. Avaliação de *Panicum maximum* Jack. para tolerância ao alumínio em solução nutritiva. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 24, p. 339-344, 2000.
- ARROYAVE, C.; BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C.; TOLRÀ, R. Aluminium-induced changes in root epidermal cell patterning, a distinctive feature of hyperresistance to Al in *Brachiaria decumbens*. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 105, p. 1477-1483, 2011.
- ARROYAVE, C.; TOLRÀ, R.; THUY, T.; BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Differential aluminum resistance in *Brachiaria* species. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 89, p.11-18, 2013.
- 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. **Environmental and Experiment Botany**, Oxford, v. 48, p. 75-92, 2002.
- BATISTA, M.F.; MOSCHETA, I.S.; BONATO, C.M.; BATISTA, M.A.; ALMEIDA, O.J.G.; INOUE, T.T. Aluminum in corn plants: influence on growth and morpho-anatomy of root and leaf. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 37, p. 177-187, 2013.
- BITENCOURT, G.A; CHIARI, L.; LAURA, V.A.; VALLE, C.B.; JANK, L.; MORO, J.R. Aluminum tolerance on genotypes of signal grass. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, p. 245-250, 2011.
- FURLANI, A. M. C.; FURLANI, P. R. **Composição e pH de soluções nutritivas para estudos fisiológicos e seleção de plantas em condições nutricionais adversas**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1988. 34 p. (Boletim Técnico, 121).
- GUO, T.; ZHANG, G.; ZHOU, M.; WU, F.; CHEN, J. Effects of aluminum and cadmium toxicity on growth and antioxidant enzyme activities of two barley genotypes with different Al resistance. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 58, p. 241-248, 2004.
- HEATH, R.L., PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, San Diego, v. 125, p. 189-198, 1968.
- HORST, W.J.; WANG, Y.; ETICHA, D. The role of the root apoplast in aluminium-induced inhibition of root elongation and in aluminum resistance of plants: a review. **Annals of Botany**, Oxford, v. 106, p. 185-197, 2010.
- JONES, D.L; BLANCAFLOR, E.B; KOCHIAN, L.V; GILROY, S. Spatial coordination of aluminum uptake, production of reactive oxygen species, callosa production and wall

rigidification in maize roots. **Plant, Cell and Environment**, Malden, v. 29, p. 1309–1318, 2006.

KOCHIAN, L.V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 46, p. 237-260, 1995.

LAVRES JUNIOR, J.; MONTEIRO, F.A. Perfilhamento, área foliar e sistema radicular do capim-Mombaça submetido a combinações de doses de nitrogênio e potássio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, p. 1068-1075, 2003.

MA, J.F.; RYAN, P.R.; DELHAIZE, E. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 6, p. 273- 278, 2001.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319 p.

MATSUMOTO, H. Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. **International Review of Cytology**, San Diego, v. 200, p. 1-46, 2000.

MILES, J.W.; MAASS, B.L.; VALLE, C.B.; KUMBLE, V. **Brachiaria: biology, agronomy, and improvement**. Cali: International Center for Tropical Agriculture, 1996. 288 p. (Documentos, 259).

NOORDWIJK, M.V.; FLORIS, J. Loss of dry weight during washing and storage of root samples. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 53, p. 239-243, 1979.

RAMOS, F.T.; FRANÇA, M.G.C.; ALVIM, M.N.; ROSSIELLO, R.O.P.; ZONTA, E. Aluminum tolerance measured by root growth and mucilage protection in *Urochloa brizantha* and *Urochloa decumbens*. **Journal of Plant Interactions**, Oxon, v. 7, p. 225-229, 2012.

RANGEL, A.F.; RAO, I.M.; HORST, W.J. Intracellular distribution and binding state of aluminum in root apices of two common bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes in relation to Al toxicity. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 135, p. 162-173, 2009.

RYAN, P.R.; TYERMAN, S.D.; SASAKI, T.; FURUICHI, T.; YAMAMOTO, Y.; ZHANG, W.H.; DELHAIZE, E. The identification of aluminium-resistance genes provides opportunities for enhancing crop production on acid soils. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, p. 9-20, 2011.

SAS Institute. **SAS/STAT: user's guide**, version 8.0. Cary: SAS Institute, 2000.

TAMÁS, L.; HUTTOVÁ, J.; MISTRÍK, I. Inhibition of Al-induced root elongation and enhancement of Al-induced peroxidase activity in Al-sensitive and Al-resistant barley cultivars are positively correlated. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 250, p. 193-200, 2003.

UEXKÜLL, H.R. VON; MUTERT, E. Global extent, development and economic impact of acid soils. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 171, p. 1-15, 1995.

WANG, Y.; STASS, A.; HORST, W.J. Apoplastic binding of aluminum is involved in silicon-induced amelioration of aluminum toxicity in maize. **Plant Physiology**, Rockville, v. 136, p. 3762-3770, 2004.

WEBB, L.J. Aluminum accumulation in the Australian-New Guinea flora. **Australian Journal of Botany**, Collingwood, v. 2, p. 176-196, 1953.

WENZL, P.; CHAVES, A.L.; PATIÑO, G.M.; MAYER, J.E.; RAO, I.M. Aluminum stress stimulates the accumulation of organic acids in root apices of *Brachiaria* species. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v. 165, p. 582-588, 2002.

4 RESPOSTA DO SISTEMA ANTIOXIDANTE, COMPARTIMENTAÇÃO DO ALUMÍNIO NO APOPLASTO E SIMPLASTO E MODIFICAÇÕES NA ANATOMIA RADICULAR

Resumo

O alumínio (Al) é considerado o principal fator abiótico limitante a produção agrícola mundial. Espécies de *Brachiaria brizantha* são consideradas tolerantes ao Al, entretanto na mesma espécie é possível encontrar diferenças na atividade de enzimas do sistema antioxidante e no acúmulo do metal nas partes vegetais. Objetivou-se avaliar a concentração, o acúmulo e o transporte à longa distância de Al, a peroxidação de lipídeos, a concentração de H_2O_2 , a atividade de enzimas do sistema antioxidante catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GPOX) e glutathione redutase (GR), a compartimentação do Al (apoplasto e simplasto), bem com a anatomia e morfologia radicular para a *Brachiaria brizantha* cv. Marandu e *Brachiaria brizantha* cv. Xaraés. Os genótipos de *Brachiaria* foram cultivados em solução nutritiva ($pH=4,0\pm0,1$) com duas concentrações de Al: 0 e $1,33\text{ mmol L}^{-1}$. O Al absorvido acumulou-se predominantemente nas raízes de ambos os genótipos, todavia, constatou-se redução significativa no desenvolvimento da parte aérea do cultivar Marandu. A adição de Al resultou no aumento da peroxidação de lipídeos nas raízes do cultivar Xaraés e aumento na concentração de H_2O_2 nas raízes do cultivar Marandu. A atividade das enzimas antioxidantes foi superior nas raízes em relação à atividade enzimática constatada nas lâminas foliares. A atividade da CAT e da GPOX reduziu nas raízes do genótipo Xaraés com o incremento do Al na solução, enquanto que as atividades da APX e GR decresceram nas raízes do genótipo Marandu. Quanto à compartimentação do Al, foi verificado que 73% (*B. brizantha* cv. Marandu) e 61% (*B. brizantha* cv. Xaraés) do metal concentraram-se no simplasto radicular. Para o apoplasto radicular, foi observado que o cultivar Xaraés concentrou cerca de 49% a mais de Al em relação ao cultivar Marandu. Por meio de eletromicrografias, constatou-se na epiderme radicular, microfissuras e descamação, redução no número de pêlos absorventes, a desorganização do sistema vascular e o colapso da região cortical para ambos os genótipos. Para o genótipo Marandu os danos observados na epiderme radicular foram maiores, em relação ao genótipo Xaraés. Os resultados evidenciam que na mesma espécie de gramínea forrageira há respostas e mecanismos distintos quanto à presença do excesso de Al, as quais poderão fornecer informações referentes ao comportamento fisiológico de plantas forrageiras.

Palavras-chave: atividade enzimática, pêlos radiculares, peroxidases.

ANTIOXIDANT SYSTEM RESPONSE TO Al TOXICITY, Al PARTITION IN APOPLAST AND SYMPLAST AND CHANGES IN THE ROOT ANATOMY

Abstract

Aluminum (Al) is considered the most important abiotic factor limiting to agricultural production worldwide. *Brachiaria brizantha* species are considered tolerant to Al, though for the same species is possible find differences for enzymes activities that compose the antioxidant system and metal accumulation in plant parts. The aim of the present study was evaluate the Al concentration, Al uptake and Al-long distance transport, lipid peroxidation, H₂O₂ concentration, the antioxidant enzymes activities such as catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GPOX) and glutathione reductase (GR), Al partition (apoplast and symplast), as well as to evaluate root anatomy and morphology of *Brachiaria brizantha* cv. Marandu and *Brachiaria brizantha* cv. Xaraés. *Brachiaria* genotypes were grown in nutrient solution (pH=4.0±0.1) with two Al rates: 0 and 1.33 mmol L⁻¹. Al uptake was accumulated predominantly on the roots of *Brachiaria* genotypes, however; it was observed significant decrease on the shoot development of Marandu grass. Al addition increased lipid peroxidation on the roots of Xaraés cultivar and H₂O₂ concentration on the roots of Marandu cultivar. Antioxidant enzymes activities were higher in roots than those assayed on the leaves. CAT and GPOX activities decreased in Xaraés genotype with Al increasing in the solution, whereas the APX and GR activities decreased on the roots of Marandu grass. By Al partition, it was found that 73% (*B. brizantha* cv. Marandu) and 61% (*B. brizantha* cv. Xaraés) of metal was located in the root symplast. Root apoplast of Xaraés genotype accumulated 49% more Al as compared to Marandu grass. The root surfaces were damaged, with ruptures in the epidermis, and reduced numbers of root hairs in both *Brachiaria* genotypes, treated with Al, compared to the controls. A great disorganization of the vascular system as well as the rupture in the epidermal cells and the collapse of cortical region were observed in roots exposed to Al. Even though in Marandu palisade grass was observed more significant structural changes in epidermal surface with Al treatment. Taken together, results promote the evidence that in the same forage grasses species there different answers and distinct mechanisms, for Al presence, what provide information regarding the physiological behavior of forage plants.

Keywords: electron micrographs, enzyme activity, peroxidases.

4.1 Introdução

O alumínio (Al) é o metal em maior abundância e o terceiro elemento com maior presença na crosta terrestre, atrás apenas do oxigênio e do silício (MA; RYAN; DELHAIZE, 2001; KOCHIAN, 1995). Em condições ácidas $\text{pH} < 5,5$ (em H_2O) é encontrado na forma de $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$, o qual por convenção é denominado Al^{3+} . Visto que aproximadamente 40% das áreas agricultáveis no mundo são compostas por solos ácidos (SUMNER; NOBLE, 2003), a forma fitotóxica de Al está dentre os maiores fatores abióticos, que limitam a produção agrícola mundial (KOCHIAN, 1995).

O ápice radicular, e particularmente a parte distal da zona de transição, é a região mais sensível ao estresse induzido pelo Al (SIVAGURU; HORST, 1998; KOLLMEIER; FELLE; HORST, 2000; HUANG et al., 2009), o que resulta na inibição da elongação e da divisão de células radiculares. A obtenção de informações relativas às mudanças na morfologia e na anatomia do ápice radicular é importante para a caracterização de espécies ou cultivares com maior ou menor tolerância ao Al (ARROYAVE et al., 2011, 2013; MATSUMOTO; MOTODA, 2012).

O Al associado às células parece estar localizado principalmente em apoplasto (parede celular ou na superfície da membrana plasmática). Nesse sentido os efeitos tóxicos são principalmente resultados da associação externa de Al com as células radiculares (YAMAMOTO et al., 2003) e que resultam na desestruturação de pêlos absorventes e radicelas. Contudo a possível entrada de Al no citoplasma celular pode também ser responsável pelos sintomas de toxidez. Como consequência da entrada do elemento via apoplástica ou via simplástica, podem ocorrer injúrias nas biomoléculas que compõem a parede celular, membrana plasmática, citoplasma, citoesqueleto e o núcleo celular.

A resposta devido à modificação do metabolismo da planta é a mudança do estado redox de homeostases celulares, podendo desencadear a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO'S), o que resulta no estresse oxidativo (FOYER; NOCTOR, 2003; GIANNAKOULA et al., 2010). Nesse contexto, a eficiência do sistema antioxidante torna-se fator essencial para a tolerância das plantas ao estresse causado pelo metal.

Os compostos oxidantes podem ser representados pelo radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), oxigênio *singlet* ($^1\text{O}_2$), radical hidróxido ($^{\bullet}\text{OH}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), os quais são produzidos nos cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomos e no apoplasto celular (GRATÃO et al., 2005; EDREVA, 2005; GILL; TUTEJA, 2010). Estudos relacionados à toxidez por Al têm mostrado que na presença do Al há aumento na produção de ERO's e na

peroxidação de lipídeos (CAKMAK; HORST, 1991; YAMAMOTO et al., 2001; DIPIERRO et al., 2005; HOSSAIN et al., 2005; JONES et al., 2006; SHARMA; DUBEY, 2007), particularmente em genótipos considerados sensíveis (DARKÓ et al., 2004; TABALDI et al., 2009).

Para a proteção e redução dos danos em células e organelas, as plantas dispõem de mecanismos de defesa e estratégias bioquímicas para reduzir os danos causados pelas ERO'S (MITTLER et al., 2004; FOYER; NOCTOR, 2005). A defesa bioquímica é representada pelo sistema de defesa antioxidante, composto por mecanismos enzimáticos e não enzimáticos. O mecanismo de remoção de ERO's via sistema enzimático envolve a ação de enzimas como a superóxido dismutase (SOD), glutathione redutase (GR), monodehidroascorbato (MDHAR), dehidroascorbato (DHAR), glutathione-S-transferase (GST) e as peroxidases, catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), ascorbato peroxidase (APX) e guaiacol peroxidase (GOPX) (GRATÃO et al., 2005; GILL; TUTEJA, 2010). No entanto é possível que ocorram falhas no sistema de defesa antioxidante promovendo sérios prejuízos ao metabolismo celular.

Dessa forma, informações referentes às respostas bioquímicas, fisiológicas e a mudança da morfologia e anatomia radicular de genótipos de *Brachiaria*, são importantes para o conhecimento sobre os mecanismos que conferem a tolerância ao Al, principalmente para o genótipo de *Brachiaria brizantha* cv. Xaraés, o qual fora caracterizado no estudo anterior (Experimento I) como o genótipo mais tolerante. Por esse motivo objetivou-se avaliar, enzimas do sistema de defesa antioxidante (CAT, APX, GPOX e a GR), a compartimentação do Al nas raízes (Al no apoplasto e simplasto), bem como a morfologia e a anatomia de raízes dos genótipos de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu e *Brachiaria brizantha* cv. Xaraés, contrastantes quanto à tolerância ao excesso de Al.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Material vegetal, condições de crescimento e delineamento experimental

Os parâmetros produtivos, morfológicos e bioquímicos analisados, referentes ao primeiro experimento, permitiram a seleção de dois cultivares contrastantes quanto à tolerância diferencial ao Al. Como resultado, os genótipos de *Brachiaria brizantha* cv. Xaraés e a *Brachiaria brizantha* cv. Marandu foram classificados com maior e menor tolerância ao Al, respectivamente.

O experimento foi desenvolvido em condições de casa de vegetação, localizada no Centro de Energia Nuclear na Agricultura, da Universidade de São Paulo, em Piracicaba-SP, no período de janeiro a março de 2014. As sementes dos dois genótipos foram germinadas em bandejas contendo vermiculita como substrato e com fornecimento diário de água desionizada. Após nove dias da semeadura, cinco plântulas de cada genótipo foram transferidas para vasos com capacidade de 2,2 L (utilizaram-se 2 L), contendo solução nutritiva Furlani e Furlani (1988) na composição: 3,54 mmol L⁻¹ de Ca; 1,88 mmol L⁻¹ de N-NO₃⁻; 0,57 mmol L⁻¹ de N-NH₄⁺; 2,17 mmol L⁻¹ de K; 0,032 mmol L⁻¹ de P; 0,89 mmol L⁻¹ de Mg; 50,00 µmol L⁻¹ de Fe; 54,00 µmol L⁻¹ de S; 20,00 µmol L⁻¹ de B; 7,09 µmol L⁻¹ de Mn; 1,83 µmol L⁻¹ de Zn; 0,47 µmol L⁻¹ de Cu; 0,62 µmol L⁻¹ de Mo. Inicialmente a solução nutritiva foi diluída em 20% da concentração final. Sete dias após o transplante, as plântulas foram submetidas à solução nutritiva com 100% da força iônica, acrescida de 0 e 1,33 mmol L⁻¹ de Al, na forma de AlCl₃.6H₂O. O pH no preparo da solução nutritiva foi ajustado em 4,0±0,1 e monitorado a cada dois dias até o final do experimento. A solução nutritiva foi renovada a cada sete dias para manutenção da concentração do metal e dos nutrientes. Em todo o período experimental manteve-se aeração das soluções nutritivas.

O delineamento experimental utilizado foi de blocos completos ao acaso, em esquema fatorial 2 x 2 (duas doses de Al x dois genótipos de *Brachiaria*), com oito repetições. Das oito repetições (blocos), quatro blocos foram utilizados para a avaliação da atividade de enzimas do sistema antioxidante e quatro blocos destinados as avaliações da compartimentação do Al nas raízes e análises de microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura em pêlos radiculares, visto que foram análises destrutivas, efetuadas em períodos distintos.

4.2.2 Coleta do material vegetal

A coleta das plantas foi dividida em duas etapas. Aos 20 dias, após o emprego da solução nutritiva com 100% da força iônica acrescida de Al, procedeu-se a coleta de pequena porção de raízes secundárias (pêlos radiculares) dos genótipos Marandu e Xaraés para as respectivas análises de microscopia de luz e de microscopia eletrônica de varredura, tomando-se o cuidado para não danificar as demais raízes remanescentes, utilizadas no estudo da compartimentação do Al. Aos 23 dias após o emprego da solução nutritiva com 100% da força iônica, as plantas dos outros quatro blocos remanescentes foram coletadas para avaliação da atividade de enzimas do sistema antioxidante. Na ocasião da coleta do material, a parte aérea (folhas) foi separada das raízes, as quais foram previamente lavadas com água

desionizada, para a retirada do Al superficial. Em seguida o material foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado em *freezer* -80°C.

Para a determinação do Al trocável no apoplasto (e Al no simplasto) radicular, a coleta de todo o material vegetal foi realizada aos 28 dias posteriormente ao emprego da solução nutritiva com 100% da força iônica, acrescida de Al.

4.2.3 Avaliações

4.2.3.1 Concentração, acúmulo e transporte à longa distância de alumínio

A determinação da concentração de Al nos tecidos vegetais (lâminas foliares, colmos + bainhas e raízes) foi realizada utilizando-se 0,25 g de material vegetal seco e moído por meio da digestão nitro-perclórica (HNO₃:HClO₄, 83%:17%, 5:1 v/v) (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997). A leitura do extrato foi realizada por meio de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES).

O acúmulo de Al no tecido vegetal foi obtido pelo produto da concentração de Al e da produção de massa seca, sendo:

$$Ac_{\text{tecido (mg)}} = [(concentração \text{ de Al (mg kg}^{-1})] \times \text{massa seca (g)}.$$

O transporte à longa distância de Al (T_{ld}) foi determinado em função do acúmulo nas folhas, no colmo + bainha e nas raízes, por meio da fórmula:

$$Tld = [Ac_{\text{folhas}} / (Ac_{\text{folhas}} + Ac_{\text{(colmos + bainhas)}} + Ac_{\text{raízes}})] \times 100.$$

Em que: Ac_{folhas} (mg) = acúmulo de Al nas folhas; $Ac_{\text{colmos + bainhas}}$ (mg) = acúmulo de Al no colmos + bainhas; $Ac_{\text{raízes}}$ (mg) = acúmulo de Al nas raízes.

4.2.3.2 Determinação do peróxido de hidrogênio e da peroxidação de lipídeos

A concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi determinada de acordo com metodologia descrita por Alexieva et al. (2001). As amostras de folhas e raízes foram maceradas com solução de 2,4,6-tricloroanisol (TCA) a 0,1% na proporção de 0,2 g / 2 mL para folhas e para raízes, com 20% de polivinilpirrolidona (PVPP) (m:v). Após completa homogeneização, as amostras foram transferidas para tubos e centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos, à 4°C. Foram retirados 200 µL do sobrenadante, aos quais foram adicionados 200 µL de tampão fosfato de potássio 100 mmol L⁻¹ (pH 7,5) e 800 µL de solução 1 mol L⁻¹ de iodeto de potássio (KI). Os tubos foram colocados em gelo e permaneceram no escuro

durante 1 hora. Após esse período, as amostras permaneceram no escuro por 20 minutos, porém em temperatura ambiente para a estabilização da reação, e em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro *Perkin Elmer*[®] - *Lambda 40* a 390 nm. A quantidade de H₂O₂ foi expressa em nmol/g de tecido fresco.

Para a análise da concentração de malondialdeído (MDA) foi utilizado o método descrito por Heath e Packer (1968), com as seguintes adaptações. Amostras de lâminas foliares e raízes foram maceradas em solução de TCA 0,1% na proporção de 0,2 g / 2 mL para folhas e para raízes, com 20% de PVPP (m:v). Após completa homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos, à 4°C. Foi retirado 0,25 mL do sobrenadante e transferido para outro tubo contendo 1,0 mL de solução TCA 20% e ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) 0,5%. A mistura foi incubada a 95°C por 30 minutos, e em seguida resfriada em gelo por 10 minutos. As amostras foram novamente centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos, e posteriormente realizou-se a leitura em espectrofotômetro *Perkin Elmer*[®] - *Lambda 40* a 535 e 600 nm. A quantidade de MDA foi expressa em nmol/g de tecido fresco.

4.2.3.3 Extração de proteínas

O material vegetal (folhas e raízes) foi macerado em almofariz, contendo nitrogênio líquido e armazenado em *freezer* -80°C. Os extratos protéicos foram obtidos a partir de 1,5 gramas de material vegetal fresco, juntamente com adição de PVPP correspondente a 20% (m:v). Procedeu-se a extração protéica, utilizando-se solução tampão fosfato de potássio a 100 mmol L⁻¹ (pH 7,5), EDTA (ácido etileno diamino tetracético) a 1 mmol L⁻¹ e DDT (ditiotreitól) a 1 mmol L⁻¹. Os extratos homogeneizados foram centrifugados a 10.000 rpm por 30 minutos, à 4°C. O sobrenadante foi armazenado em *eppendorfs*, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em *freezer* -80°C.

A concentração de proteína solúvel foi determinada pelo método de Bradford (1976) utilizando-se o BSA (*bovine serum albumin*) como padrão. Alíquotas de 20 µL, quantificadas em triplicatas foram misturadas em 1 mL de reagente de *Bradford*. A leitura foi realizada em espectrofotômetro *Perkin Elmer*[®] - *Lambda 40* a 595 nm. Os resultados foram expressos em mg proteína/mL.

4.2.3.4 Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada de acordo com o método descrito por Kraus, McKersie e Fletcher (1995), adaptado por Azevedo et al. (1998). O ensaio enzimático foi realizado a 25°C e o meio de reação continha 1 mL de solução tampão fosfato de potássio a 100 mmol L⁻¹ (pH 7,5) e H₂O₂ a 30 mmol L⁻¹. A reação foi iniciada pela adição de 25 µL de extrato vegetal e a atividade enzimática foi determinada pelo monitoramento da degradação do H₂O₂. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 240 nm durante 1 minuto. Os resultados foram expressos em µmol/min/mg proteína.

4.2.3.5 Ascorbato peroxidase (APX)

A atividade da APX foi realizada utilizando o método descrito por Nakano e Asada (1981). O ensaio enzimático foi realizado a 30°C, em meio de reação contendo 950 µL de solução composta de tampão fosfato de potássio a 80 mmol L⁻¹ (pH 7,0), ascorbato a 5 mmol L⁻¹, EDTA a 1 mmol L⁻¹ e H₂O₂ a 1 mmol L⁻¹. A reação foi iniciada pela adição de 50 µL de extrato vegetal e a atividade enzimática foi determinada em virtude da oxidação do ascorbato pelo H₂O₂. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 290 nm por 1 minuto. Os resultados foram expressos em µmol/min/mg proteína.

4.2.3.6 Guaiacol peroxidase (GPOX)

A atividade da GPOX foi realizada utilizando o método descrito por Matsuno e Uritani (1972). O ensaio enzimático foi realizado em cubetas, em meio de reação, que continham 797,5 µL de tampão fosfato-citrato (fosfato dissódicodibásico a 0,2 mol L⁻¹ e ácido cítrico a 0,1 mol L⁻¹) (pH 5,0), 2,5 µL de extrato vegetal e 50 µL de guaiacol (0,5%), nas quais procedeu-se a agitação em *vortex*. Posteriormente adicionaram-se 50 µL de H₂O₂ (3%), agitando-se mais uma vez em *vortex* e, logo após, colocou-se o conjunto de cubetas em banho-maria a 30°C, por 15 minutos. Em seguida, as cubetas foram colocadas em gelo e adicionaram-se 50 µL de metabissulfito de sódio (2%) e agitou-se em *vortex* novamente. Após 10 minutos a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 450 nm durante 1 minuto. Os resultados foram expressos em µmol/min/mg proteína.

4.2.3.7 Glutathiona redutase (GR)

A atividade da GR foi determinada de acordo com o método descrito por Smith, Vierheller e Thorne (1988), adaptado por Azevedo et al. (1998). O ensaio enzimático foi realizado a 30°C, por meio de reação que continha 1 mL de tampão fosfato de potássio a 100 mmol L⁻¹ (pH 7,5), 500 µL de solução de 5,5' dithio-bis-[ácido 2-nitrobenzóico] (DTNB) a 3 mmol L⁻¹, 100 µL de solução nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) a 2 mmol L⁻¹ e 100 µL de solução glutathiona oxidada (GSSG) a 20 mmol L⁻¹. A reação foi iniciada com a adição de 50 µL de extrato vegetal e a atividade enzimática foi determinada pela oxidação do NADPH. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 412 nm durante 1 minuto. Os resultados foram expressos em µmol/min/mg proteína.

4.2.4 Compartimentação do alumínio nas raízes: absorção simplástica e Al trocável no apoplasto

Para o estudo da compartimentação do Al nas raízes, quatro plantas foram removidas da solução nutritiva e separadas em parte aérea e raízes, conforme descrito no item 4.2.2. Em seguida, a parte aérea das plantas foi colocada em sacos de papel previamente identificados e secados por 72 horas em estufa com circulação forçada de ar, a 65°C. Para a determinação do Al no apoplasto e simplasto, utilizou-se a metodologia descrita por Lavres Junior et al. (2008) e por Mori et al. (2009), com modificações. Para tanto, o sistema radicular das plantas foi previamente lavado com água desionizada e em seguida, as raízes de duas plantas foram colocadas em recipiente contendo 150 mL de solução de “dessorção” (CuCl₂ a 2,0 mmol L⁻¹, CaCl₂ a 0,5 mmol L⁻¹ e HCl a 100 mmol L⁻¹) e conservando-se em geladeira (± 5°C), por cerca de 30 minutos. Após o processo de dessorção, as raízes foram lavadas em água desionizada (Figura 1). Utilizou-se o CaCl₂ (0,5 mmol L⁻¹) para manter a integridade da parede celular durante o processo de dessorção do Al, e o CuCl₂ (2,0 mmol L⁻¹) pelo fato do cobre (Cu) se ligar fortemente à parede celular, liberando o Al ligado aos sítios de troca do apoplasto radicular.

As raízes de quatro plantas (dois sistemas radiculares não imersos e dois sistemas radiculares imersos em solução de dessorção) foram colocadas em sacos de papel previamente identificados e secados por 72 horas em estufa com circulação forçada de ar, a 65°C. Foi efetuada a determinação das concentrações de Al nas raízes conforme metodologia proposta

por Malavolta, Vitti e Oliveira (1997). A leitura do extrato foi realizada por meio de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES).

O total de Al absorvido foi determinado nas raízes que não foram colocadas na solução de dessorção. Por sua vez, a absorção “simplástica” de Al foi atribuída à determinação do Al remanescente nas raízes imersas na solução de dessorção. Portanto, o Al total acumulado nas raízes refere-se ao Al absorvido via simplasto e apoplasto, sendo a diferença entre o total de Al absorvido e Al absorvido no simplasto, representada pela fração do Al trocável, retido no apoplasto.

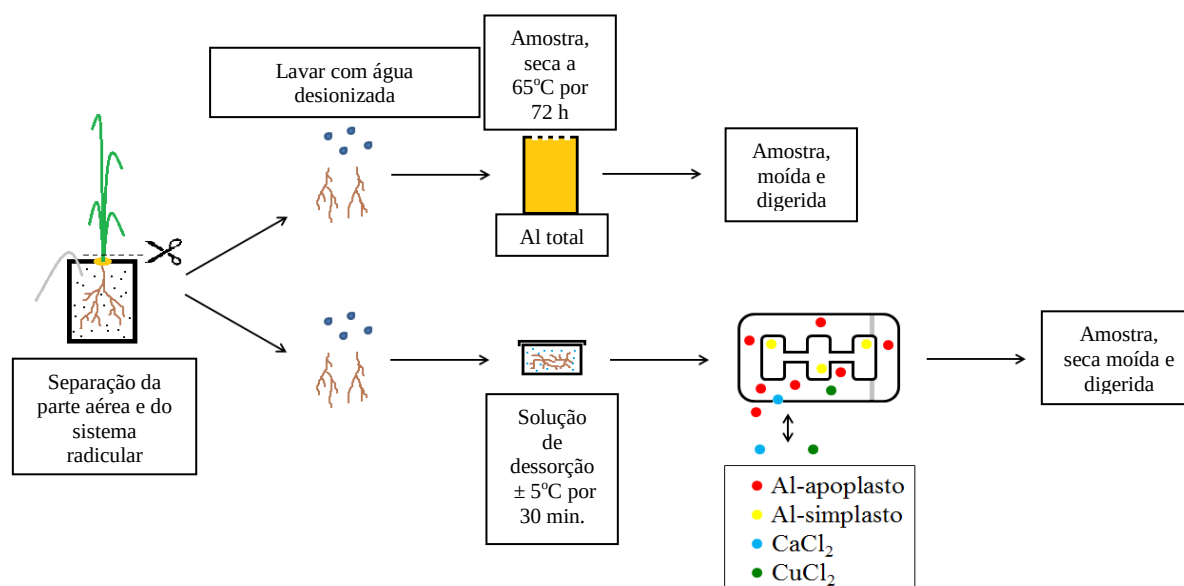


Figura 1. Representação esquemática da compartimentação do Al no apoplasto (Al trocável) e simplasto, adaptado de Lavres Junior et al. (2008); Mori et al. (2009).

4.2.5 Análises anatômicas e ultraestruturais das raízes

4.2.5.1 Preparo do material radicular para microscopia de luz

A coleta das raízes foi determinada em função do início das manifestações visuais de toxidez nas raízes e na parte aérea (redução no crescimento, alteração morfológica e senescência) dos genótipos de *Brachiaria* em função dos tratamentos (0 e 1,33 mmol L⁻¹ de Al). Na ocasião, a extremidade das raízes secundárias, acerca de 5 mm da coifa, foram coletadas e posteriormente fixadas em solução de Karnovsky (1965) com as seguintes modificações: glutaraldeído a 2%, paraformaldeído a 2% e cloreto de cálcio a 5 mmol L⁻¹ em tampão cacodilato de sódio a 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,2), por 48 horas. Posteriormente, as raízes

foram lavadas em tampão cacodilato de sódio a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pós fixadas por 1 hora com tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Após rápidas lavagens em solução salina 0,9%, foram coradas “em bloco” com acetato de uranila (2,5% em água), *overnight*. A desidratação foi realizada em séries crescentes de acetona em água (25, 50 e 75%). A infiltração das amostras foi procedida lentamente em resina Spurr (1969) e acetona nas seguintes proporções: (1:3) por 4 horas; (1:1) por 4 horas; (2:1) *overnight* e resina pura por 8 horas.

Os cortes semifinos (200 nm) foram alocados sobre lâminas de vidro, corados em solução composta por azul de toluidina a 2,0% e solução de bórax a 1% durante 5 minutos, e em seguida lavados em água destilada. As lâminas foram montadas utilizando resina *Entelan*[®] e as imagens obtidas em microscópio de Luz *Leica*[®] (*LMD 7000*).

4.2.5.2 Preparo do material radicular para microscopia eletrônica de varredura

As extremidades das raízes secundárias foram fixadas em solução de Karnovsky (1965) adaptada, por 48 horas. Posteriormente, as raízes foram lavadas três vezes por 10 minutos, em tampão cacodilato de sódio a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A desidratação foi feita em séries crescentes de etanol em água nas concentrações de 35%; 50%; 60%; 70%; 80% e 90%, apenas uma vez de 15 minutos; e 100% três vezes de 20 minutos. Em seguida, as amostras foram secas no aparelho de ponto crítico (*Leica*[®] *EM CPD 300*), montadas em “stubs” e metalizadas com ouro durante 260 segundos no aparelho evaporador (*MED 010 Balzers*). As imagens foram obtidas em microscópio eletrônico *Zeiss*[®] *LEO 435 VP* (*Cambridge, UK*) a 20 kV.

4.2.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com auxílio do *software Statistical Analysis System* (SAS, 2000). Procedeu-se o teste de “t” ($p < 0,05$) para a comparação de médias entre os genótipos dentro de cada dose de Al e para a comparação de médias de cada genótipo entre as doses de Al.

4.3 Resultados

4.3.1 Variação dos valores de pH no período experimental

Os valores de pH da solução nutritiva variaram na faixa de 3,0 a 4,0, respectivamente, devido a presença de Al. Na ausência de Al na solução nutritiva, ocorreu incremento nos valores de pH das soluções nutritivas, apenas ao final do período experimental (Figura 2).

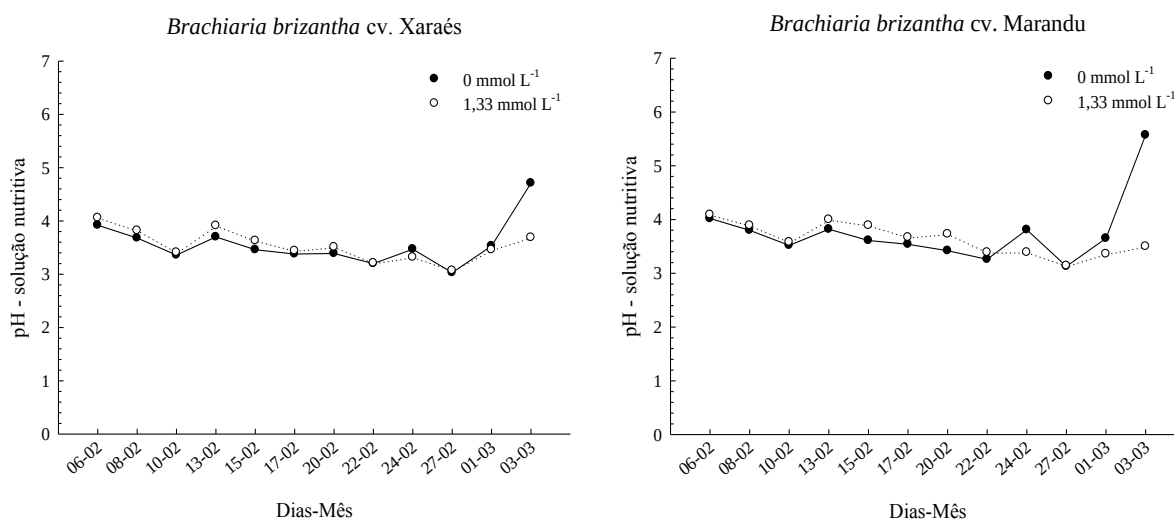


Figura 2. Variação dos valores de pH das soluções nutritivas, em função das doses de Al para os genótipos de *Brachiaria*.

4.3.2 Massa seca da parte aérea e de raízes

A produção de massa seca da parte aérea da *B. brizantha* cv. Marandu foi reduzida em aproximadamente 18% quando na presença de Al, em comparação às plantas do tratamento controle (Figura 3A). A biomassa da parte aérea do cultivar Xaraés foi superior em 18% ao cultivar Marandu, na dose de Al de 1,33 mmol L⁻¹ (Figura 3A). Quanto à produção de massa seca de raízes dos genótipos de *Brachiaria* não foi constatada diferença entre os genótipos, apesar da presença de Al na solução nutritiva (Figura 3B).

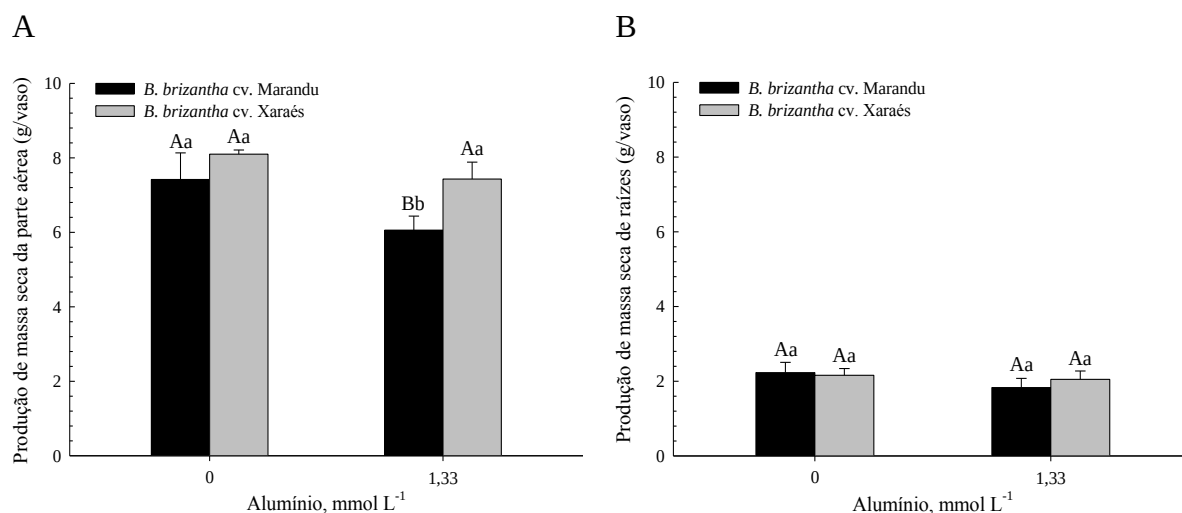


Figura 3. Produção de massa seca da parte aérea (A) e de raízes (B) dos genótipos de *Brachiaria*, em resposta à adição de alumínio na solução nutritiva.⁽¹⁾

⁽¹⁾Médias seguidas por letras distintas, maiúscula entre as doses e minúscula entre os genótipos, diferem entre si pelo teste t a 5% de probabilidade.

4.3.3 Concentração, acúmulo de alumínio nas folhas e nas raízes e transporte à longa distância

A concentração e o acúmulo de Al nas folhas, bem como nas raízes, aumentou com a adição de Al na solução nutritiva. Os genótipos de *B. brizantha* cv. Xaraés e de *B. brizantha* cv. Marandu exibiram aumento na concentração de Al de 589% e de 1.365% nas lâminas foliares com fornecimento do metal, quando comparado às plantas do tratamento controle. Na dose de Al de 1,33 mmol L⁻¹ a concentração de Al nas folhas da *B. brizantha* cv. Marandu foi superior a *B. brizantha* cv. Xaraés em aproximadamente 69% (Figura 4A).

O acúmulo de Al nas folhas aumentou em 540% e 1.185% para os genótipos Xaraés e Marandu, respectivamente, devido à adição de Al na solução nutritiva. Para a dose de Al de 1,33 mmol L⁻¹, o acúmulo de Al nas folhas do cultivar Marandu foi 62% superior, em relação àquele observado para o cultivar Xaraés (Figura 4B).

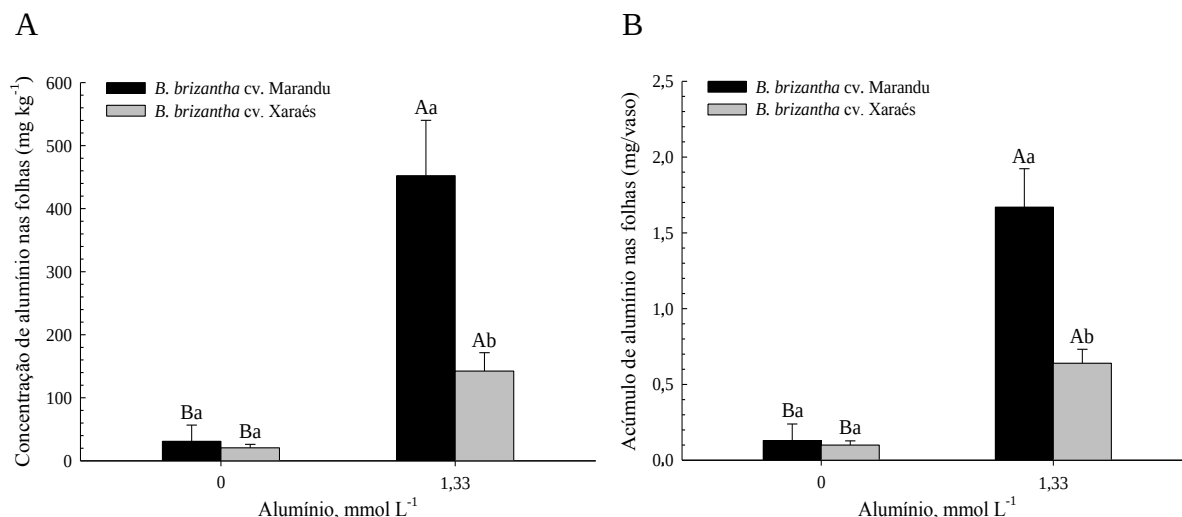


Figura 4. Concentração (A) e acúmulo (B) de alumínio nas folhas dos genótipos de *Brachiaria*, em resposta à adição de alumínio na solução nutritiva.⁽¹⁾

⁽¹⁾Médias seguidas por letras distintas, maiúscula entre as doses e minúscula entre os genótipos, diferem entre si pelo teste t a 5% de probabilidade.

As raízes de *B. brizantha* cv. Xaraés e a *B. brizantha* cv. Marandu apresentaram aumento na concentração de Al de 4.674% e de 3.157%, devido à adição de Al na solução nutritiva (Figura 5A). Por sua vez, o aumento na quantidade absorvida de Al nas raízes, com o fornecimento de Al na solução, foi de 4.720% e 2.653%, respectivamente, para os genótipos Xaraés e Marandu (Figura 5B). Em média, os valores obtidos para a concentração de Al no sistema radicular foram superiores em 7,8 vezes, quando comparados aos valores médios determinados nas folhas dos genótipos, quando o Al foi adicionado na solução nutritiva.

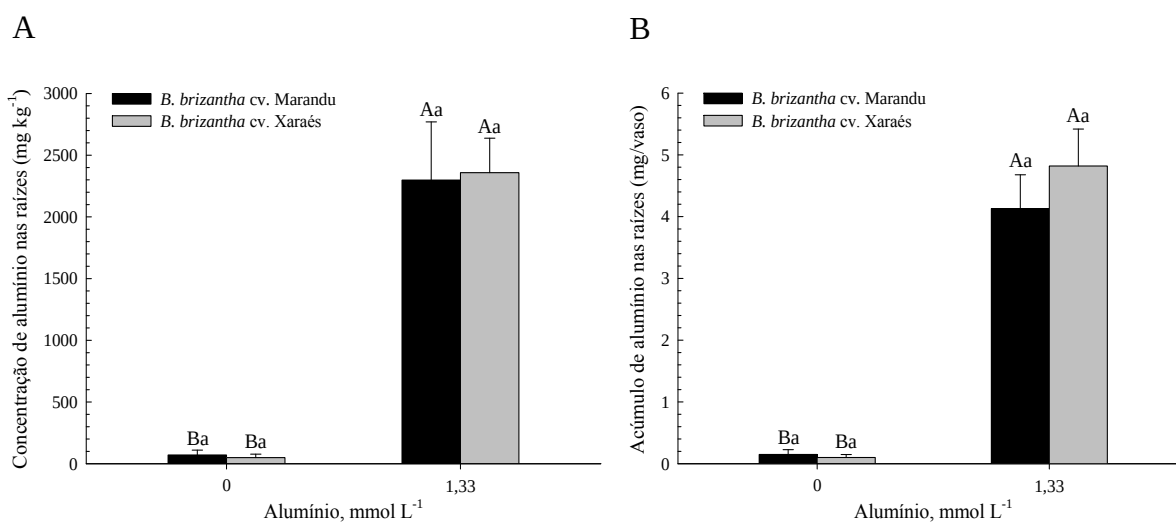


Figura 5. Concentração (A) e acúmulo (B) de alumínio nas raízes dos genótipos de *Brachiaria*, em resposta à adição de alumínio na solução nutritiva.⁽¹⁾

⁽¹⁾Médias seguidas por letras distintas, maiúscula entre as doses e minúscula entre os genótipos, diferem entre si pelo teste t a 5% de probabilidade.

O acúmulo de Al nas folhas, com relação ao acúmulo total na planta, permitiu constatar que na ausência de Al, o transporte à longa distância foi superior aos valores encontrados mediante a adição do metal na solução nutritiva. Contudo esse fato pode ser explicado pela maior produção de biomassa da parte aérea dos genótipos de *Brachiaria* no tratamento controle, levando-se em consideração que este atributo é um valor relativo. Para a dose de Al de 1,33 mmol L⁻¹, verificou-se que o transporte de Al à longa distância no cultivar Marandu foi aproximadamente 46% superior àquele observado no cultivar Xaraés (Figura 6).

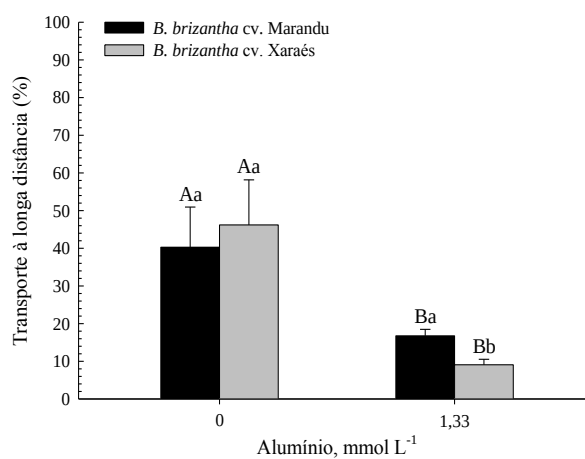


Figura 6. Transporte de Al à longa distância nos genótipos de *Brachiaria*, em resposta à adição de alumínio na solução nutritiva.

4.3.4 Peroxidação lipídica e peróxido de hidrogênio

Para a concentração de malondialdeído (MDA) nas folhas, não houve diferença entre os tratamentos e entre os genótipos de *Brachiaria*. Contudo vale ressaltar que, a concentração de MDA nas folhas do cultivar Xaraés se manteve praticamente a mesma na ausência e na presença de Al, ao passo que para o cultivar Marandu esse valor foi levemente incrementado com a adição de Al na solução nutritiva (Figura 7A). Para as raízes, constatou-se que na ausência de Al na solução nutritiva, a concentração de MDA na *B. brizantha* cv. Marandu foi 40% superior com relação a *B. brizantha* cv. Xaraés. Por sua vez, constatou-se nas raízes de *B. brizantha* cv. Xaraés aumento de 37% na concentração de MDA devido à adição de Al na solução nutritiva, enquanto que para a *B. brizantha* cv. Marandu os valores foram praticamente os mesmos na ausência e na presença de Al na solução nutritiva (Figura 7B).

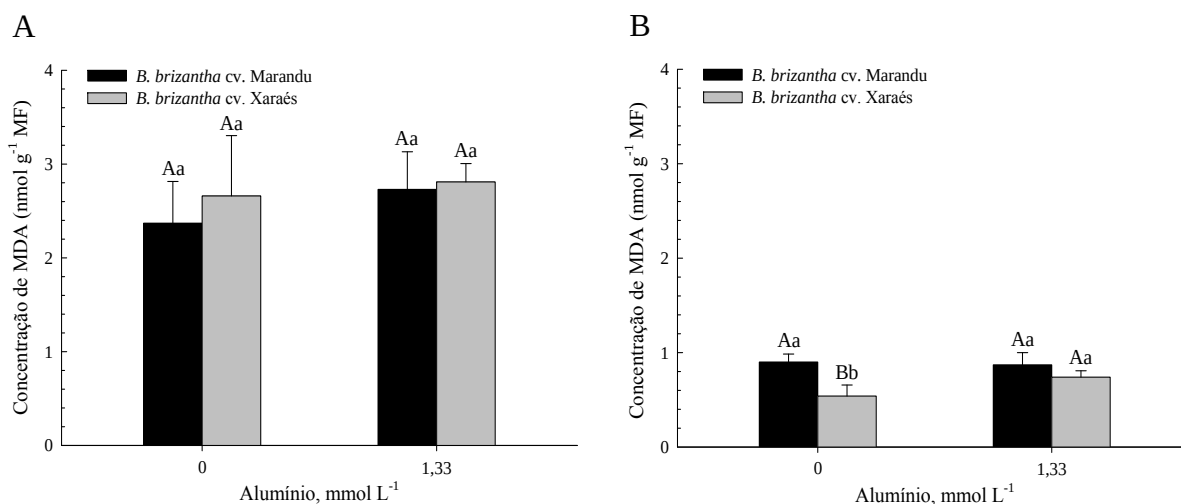


Figura 7. Concentração de malondialdeído (MDA) nas folhas (A) e nas raízes (B) dos genótipos de *Brachiaria*, em resposta à adição de alumínio na solução nutritiva.⁽¹⁾

⁽¹⁾Médias seguidas por letras distintas, maiúscula entre as doses e minúscula entre os genótipos, diferem entre si pelo teste t a 5% de probabilidade.

A concentração de H₂O₂ nas folhas de *B. brizantha* cv. Xaraés foi aproximadamente 23% maior em relação a *B. brizantha* cv. Marandu, na presença de 1,33 mmol L⁻¹ de Al (Figura 8A). Por sua vez para as raízes, a adição de Al na solução nutritiva proporcionou aumento de 110% na concentração de H₂O₂ para a *B. brizantha* cv. Marandu, ao passo que para a *B. brizantha* cv. Xaraés esse aumento foi de 62% (Figura 8B). Vale destacar que apesar do Al prejudicar principalmente a divisão e alongação de células do sistema radicular, as concentrações de MDA e de H₂O₂ nas folhas revelaram valores superiores às concentrações encontradas nas raízes.

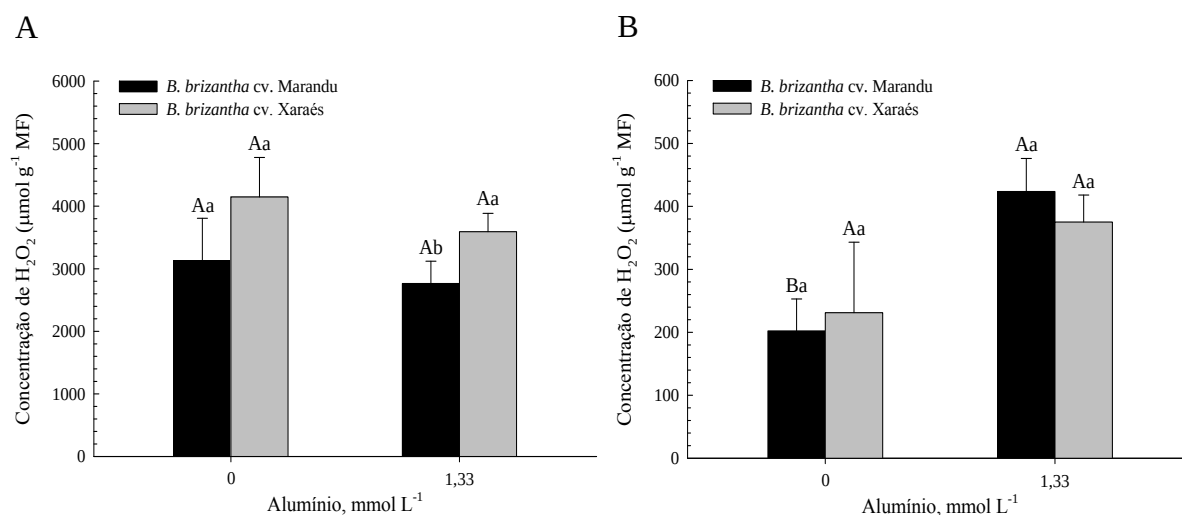


Figura 8. Concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas folhas (A) e nas raízes (B) dos genótipos de *Brachiaria*, em resposta à adição de alumínio na solução nutritiva.⁽¹⁾

⁽¹⁾Médias seguidas por letras distintas, maiúscula entre as doses e minúscula entre os genótipos, diferem entre si pelo teste t a 5% de probabilidade.

4.3.5 Catalase (CAT)

A atividade da CAT não foi alterada nas folhas dos genótipos de *Brachiaria* com o fornecimento de Al. Contudo, a atividade da CAT nas folhas de *B. brizantha* cv. Xaraés foi 17% maior em relação à atividade da CAT para a *B. brizantha* cv. Marandu na dose de Al de 1,33 mmol L⁻¹ (Figura 9A).

Nas raízes, a atividade da CAT para a *B. brizantha* cv. Xaraés foi superior em 44% e 29% em relação a *B. brizantha* cv. Marandu, para os tratamentos de 0 e 1,33 mmol L⁻¹ de Al, respectivamente. Por sua vez, o cultivar Xaraés apresentou redução de 27% da atividade da CAT, enquanto que esta redução para o cultivar Marandu foi de 6%, com o fornecimento de Al na solução nutritiva (Figura 9B).

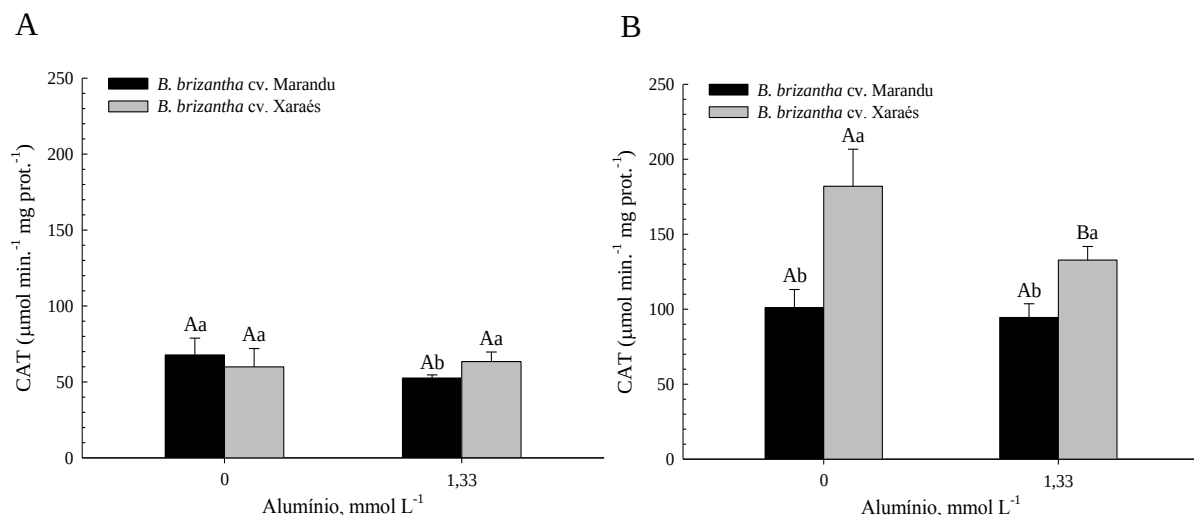


Figura 9. Atividade da catalase (CAT) nas folhas (A) e nas raízes (B) dos genótipos de *Brachiaria*, em resposta à adição de alumínio na solução nutritiva.⁽¹⁾

⁽¹⁾Médias seguidas por letras distintas, maiúscula entre as doses e minúscula entre os genótipos, diferem entre si pelo teste t a 5% de probabilidade.

4.3.6 Ascorbato peroxidase (APX)

Não foi constatada a atividade da enzima APX nas folhas dos genótipos de *Brachiaria*. No entanto, para as raízes, verificou-se que a atividade da APX para a *B. brizantha* cv. Marandu foi reduzida em aproximadamente 38% e para a *B. brizantha* cv. Xaraés em torno de 37%, em comparação com as atividades da APX determinadas nas plantas do tratamento controle (Figura 10).

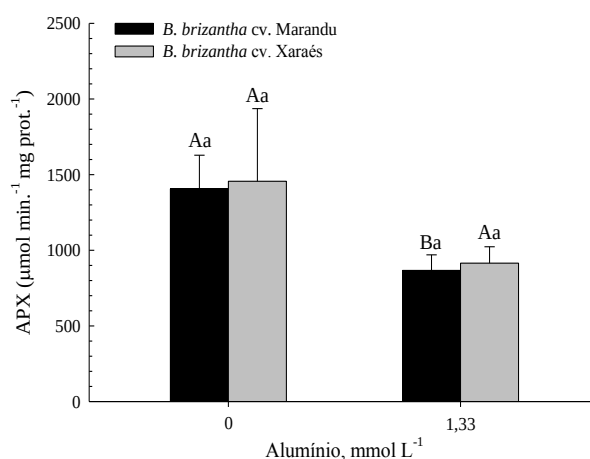


Figura 10. Atividade da ascorbato peroxidase (APX) nas raízes dos genótipos de *Brachiaria*, em resposta à adição de alumínio na solução nutritiva.⁽¹⁾

⁽¹⁾Médias seguidas por letras distintas, maiúscula entre as doses e minúscula entre os genótipos, diferem entre si pelo teste t a 5% de probabilidade.

4.3.7 Guaiacol peroxidase (GPOX)

A atividade da GPOX nas folhas dos genótipos de *Brachiaria* não foi alterada com a adição de Al na solução. Todavia, foi verificado que, nas folhas de *B. brizantha* cv. Xaraés a atividade enzimática foi 31% superior à atividade da GPOX constatada nas folhas de *B. brizantha* cv. Marandu na presença de Al (Figura 11A). Nas raízes do cultivar Xaraés verificou-se que a atividade da GPOX foi 39% maior em relação ao cultivar Marandu, no tratamento controle. Entretanto, o genótipo Xaraés apresentou redução de 35% da atividade da GPOX, com a adição de Al, ao passo que essa redução observada no genótipo Marandu foi de aproximadamente 3% (Figura 11B). A atividade dessa enzima nas raízes apresentou em média valores cinco vezes superiores, comparados aos valores verificados nas folhas.

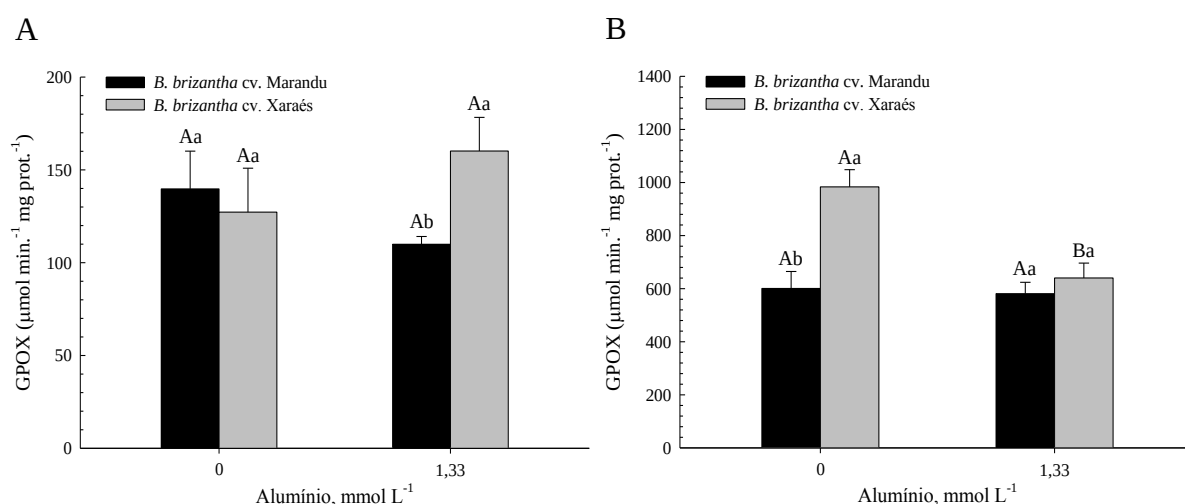


Figura 11. Atividade da guaiacol peroxidase (GPOX) nas folhas (A) e nas raízes (B) dos genótipos de *Brachiaria*, em resposta à adição de alumínio na solução nutritiva.⁽¹⁾

⁽¹⁾Médias seguidas por letras distintas, maiúscula entre as doses e minúscula entre os genótipos, diferem entre si pelo teste t a 5% de probabilidade.

4.3.8 Glutationa redutase (GR)

Para as lâminas foliares, o cultivar Xaraés mostrou aumento de 25% na atividade da GR com o fornecimento de Al na solução nutritiva, enquanto que para o cultivar Marandu esse valor se manteve praticamente o mesmo na ausência e na presença de Al (Figura 12A). Nas raízes de *B. brizantha* cv. Marandu, a atividade da GR foi 19% superior àquela da *B. brizantha* cv. Xaraés, na dose de Al de 1,33 mmol L^{-1} . Por sua vez, constatou-se nas raízes de *B. brizantha* cv. Marandu, redução de 17% na atividade da GR, e de 18% na *B. brizantha* cv. Xaraés, com a adição de Al na solução nutritiva (12B).

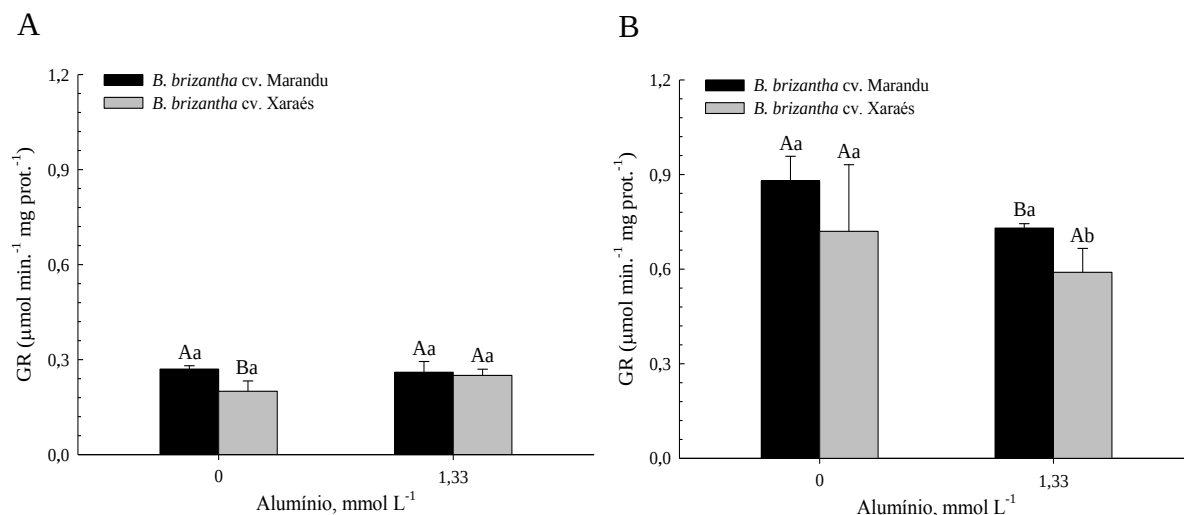


Figura 12. Atividade da glutatona redutase (GR) nas folhas (A) e nas raízes (B) dos genótipos de *Brachiaria*, em resposta à adição de alumínio na solução nutritiva.⁽¹⁾

⁽¹⁾Médias seguidas por letras distintas, maiúscula entre as doses e minúscula entre os genótipos, diferem entre si pelo teste t a 5% de probabilidade.

4.3.9 Compartimentação do alumínio nas raízes: absorção simplástica e Al trocável no apoplasto

A absorção de Al pelos genótipos de *Brachiaria* aumentou significativamente com a adição do elemento na solução nutritiva. Com relação à concentração total do metal nas raízes, constatou-se que o valor para o cultivar Xaraés foi apenas 3% superior àquele observado no cultivar Marandu. Por outro lado, na presença de Al na solução nutritiva, constatou-se que as raízes da *B. brizantha* cv. Marandu acumularam, respectivamente, 73% do Al no simplasto e 27% no apoplasto, do total de Al absorvido. Para a *B. brizantha* cv. Xaraés verificou-se que a absorção do elemento no simplasto e apoplasto correspondeu em torno de 61% e 39%, do total acumulado (Tabela 1).

Tabela 1 - Absorção total de Al, no simplasto e apoplasto pelos genótipos de *Brachiaria*, em resposta à adição de Al na solução nutritiva⁽¹⁾

Al	Al total		Al simplasto		Al apoplasto	
	<i>B. brizantha</i> cv. Marandu	<i>B. brizantha</i> cv. Xaraés	<i>B. brizantha</i> cv. Marandu	<i>B. brizantha</i> cv. Xaraés	<i>B. brizantha</i> cv. Marandu	<i>B. brizantha</i> cv. Xaraés
mmol L ⁻¹	-----mg kg ⁻¹ -----					
0	70,6 ± 39,7 Ba	49,4 ± 28,0 Ba	42,8 ± 22,4 Ba	33,3 ± 15,7 Ba	27,8 ± 53,3 Ba	16,1 ± 33,2 Ba
1,33	2.298,1 ± 471,3 Aa	2.358,4 ± 279,8 Aa	1.683,4 ± 231,0 Aa	1.443,4 ± 125,9 Aa	614,7 ± 275,9 Aa	915,0 ± 243,7 Aa

CV (%) Al total = 23,4; CV (%) Al simplasto = 28,5; CV (%) Al apoplasto = 45,5.

CV = coeficiente de variação

⁽¹⁾Médias seguidas por letras distintas, maiúscula entre as doses e minúscula entre os genótipos, diferem entre si pelo teste t a 5% de probabilidade.

4.3.10 Modificações anatômicas e ultraestruturais nas raízes

As observações realizadas por meio da microscopia de luz permitiram identificar as modificações nas estruturas radiculares devido à presença de Al na solução nutritiva. Os genótipos de *Brachiaria* na ausência de Al apresentaram organização típica e característica de gramíneas para a região da epiderme, do córtex e do sistema vascular (Figuras 13A, C, E e 14A, C, E). As alterações na anatomia radicular foram verificadas para ambos os genótipos de *Brachiaria*, quando na presença de Al. Nesse sentido, constatou-se a completa desorganização e desestruturação do sistema vascular, a distorção e o colapso das células do córtex, bem como a ruptura de células da epiderme (setas), além de significativa redução no diâmetro médio da raiz (Figuras 13B, D, F e 14B, D, F).

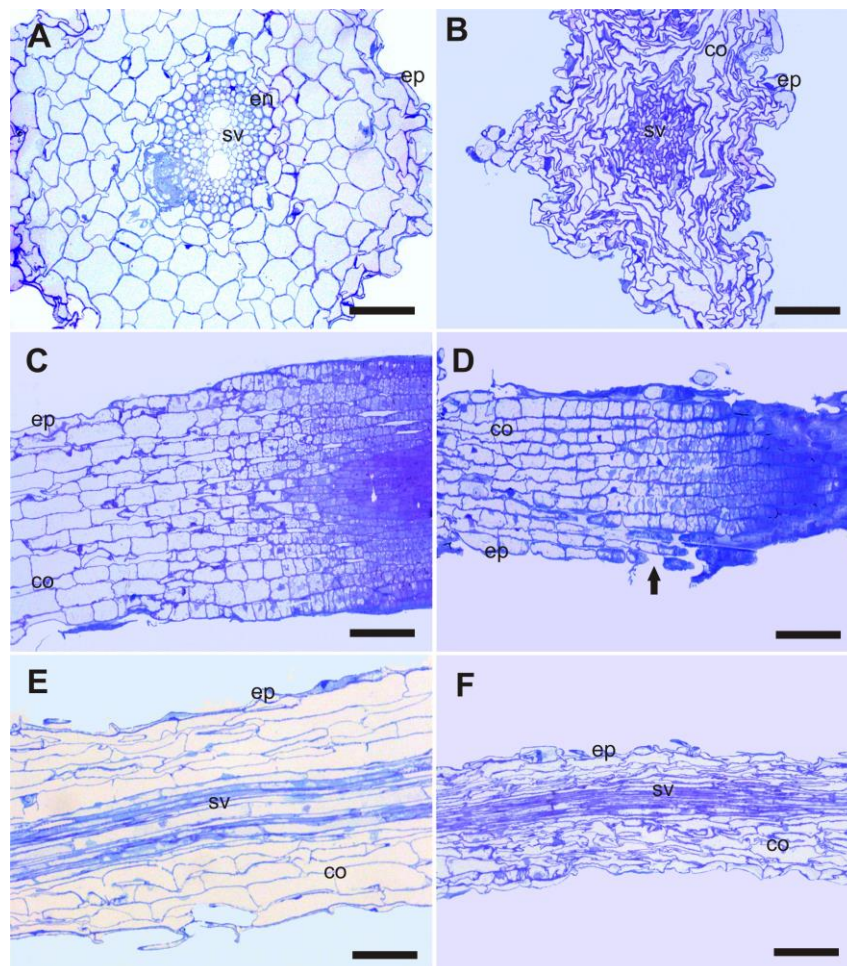


Figura 13. Seções transversais (A e B) e longitudinais (C, D, E e F) de raízes de *B. brizantha* cv. Xaraés, em função das doses de Al de 0 mmol L⁻¹ (A, C e E) e de 1,33 mmol L⁻¹ (B, D e F). ep = epiderme; co = córtex; sv = sistema vascular. Barras: A-B = 50 μm; C-D-E-F = 100 μm.

As modificações na organização e ordenação dos vasos condutores, assim como na integridade das células corticais possuem relevante importância para o processo de absorção e transporte de nutrientes. Por esse motivo, pode-se correlacionar a redução da massa seca da parte aérea dos genótipos de *Brachiaria*, com a limitação na absorção de nutrientes, devido às alterações morfoestruturais e anatômicas das raízes, quando na presença de Al.

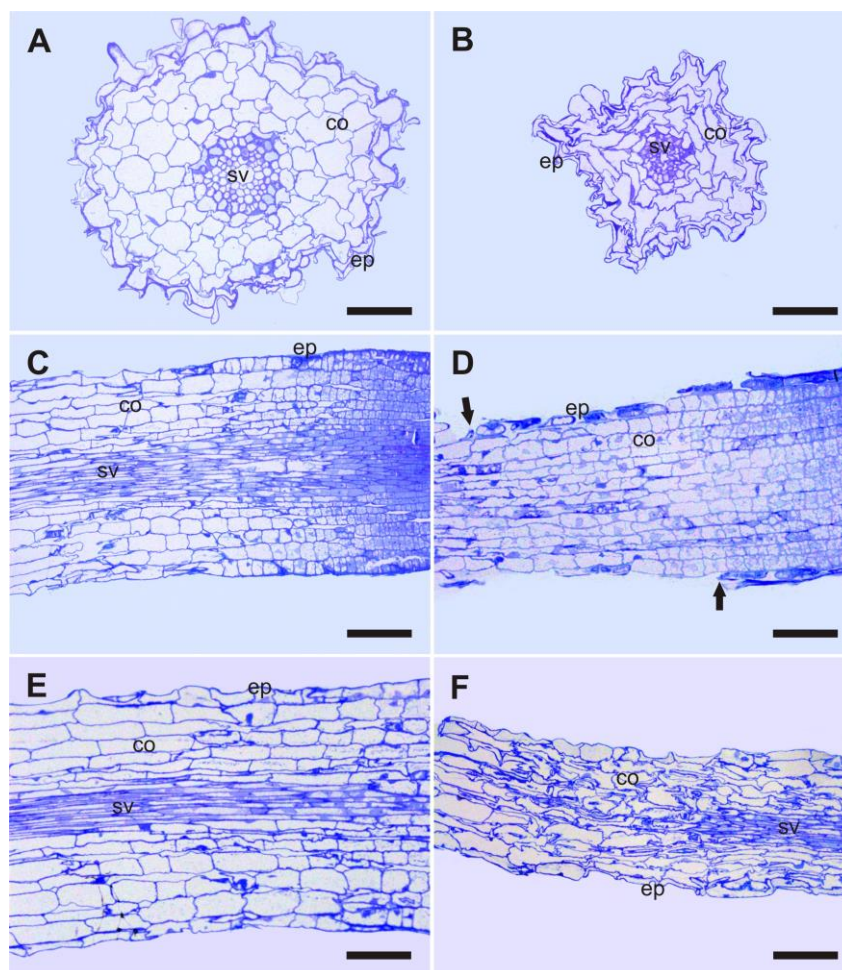


Figura 14. Seções transversais (A e B) e longitudinais (C, D, E e F) de raízes de *B. brizantha* cv. Marandu, em função das doses de Al de 0 mmol L⁻¹ (A, C e E) e de 1,33 mmol L⁻¹ (B, D e F). ep = epiderme; co = córtex; sv = sistema vascular. Barras: A-B = 50 µm; C-D-E-F = 100 µm.

As eletromicrografias obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura permitiram visualizar as alterações na superfície do tecido radicular, quando na presença de 1,33 mmol L⁻¹ de Al. Os ápices das raízes dos genótipos de *Brachiaria* exibiram a presença de pêlos radiculares e as células epidérmicas em perfeita organização, quando crescidas sem a presença do metal tóxico (Figuras 15A, B e 16A, B). Contrariamente na presença de Al, os ápices radiculares dos genótipos de *Brachiaria* apresentaram mudanças drásticas na

arquitetura das raízes (“curvatura”), ausência de pêlos radiculares, rupturas nas células epidérmicas (setas), resultando na descamação e rugosidade das células radiculares (Figuras 15C, D e 16C, D). Ademais, constatou-se que os danos na epiderme radicular da *B. brizantha* cv. Marandu foram notadamente mais drásticos aos danos observados na epiderme radicular da *B. brizantha* cv. Xaraés, o que também sugere maior eficiência do sistema antioxidante neste genótipo, atuando na maior preservação das estruturas celulares e, por fim, conferindo maior tolerância ao excesso de Al em relação ao cultivar Marandu.

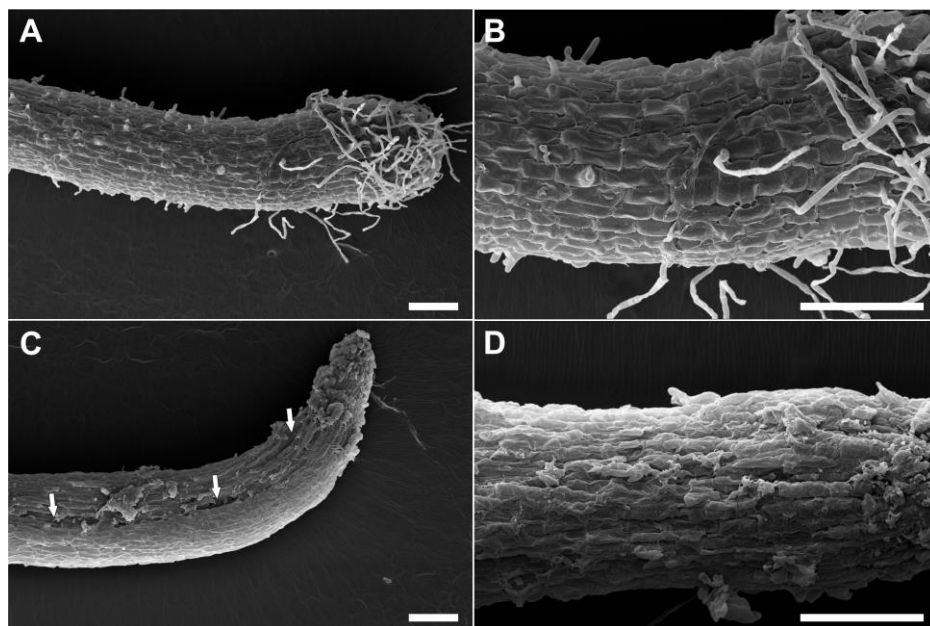


Figura 15. Microscopia eletrônica de varredura de raízes de *B. brizantha* cv. Xaraés, em função das doses de Al de 0 mmol L⁻¹ (A e B) e de 1,33 mmol L⁻¹ (C e D). Barras: A-B-C-D = 200 μm.

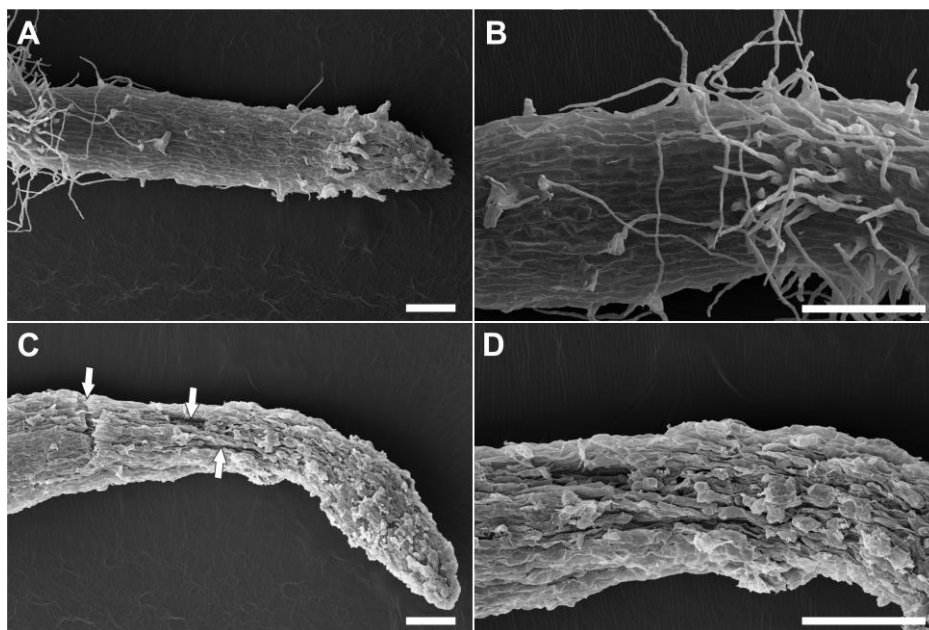


Figura 16. Microscopia eletrônica de varredura de raízes de *B. brizantha* cv. Marandu, em função das doses de Al de 0 mmol L⁻¹ (A e B) e de 1,33 mmol L⁻¹ (C e D). Barras: A-B-C-D = 200 μm.

4.4 Discussão

As análises de parâmetros produtivos (*e.g.*, como a produção de massa seca da parte aérea e de raízes), bioquímicos e anatômicos indicam que a tolerância ao Al pelos genótipos de *Brachiaria* está correlacionada com a capacidade de desenvolvimento e crescimento dessas plantas na presença do metal. Contudo, mesmo com a alteração na atividade de enzimas do sistema antioxidante e com os danos nas células radiculares, a *B. brizantha* cv. Xaraés demonstrou menores reduções para os parâmetros produtivos.

A concentração e o acúmulo do Al são predominantemente observados nas raízes dos vegetais, conforme constatado em vários estudos (GIANNAKOULA et al., 2010; ARROYAVE et al., 2011; RIBEIRO et al., 2012; ARROYAVE et al., 2013) fato pelo qual, o sistema radicular é o principal órgão afetado pelo elemento químico, mas também considerado como a primeira “barreira” de proteção ao excesso do metal - primeiro mecanismo de tolerância. Embora não tenha sido constatada diferença na concentração total de Al nas raízes para os genótipos de *Brachiaria* (o valor da concentração total de Al nas raízes do genótipo Xaraés foi 3% superior em relação ao genótipo Marandu), a análise da concentração de Al no simplasto revelou que o cultivar Marandu acumulou 17% mais Al neste compartimento, em relação ao cultivar Xaraés, ao passo que a concentração de Al trocável no apoplasto do genótipo Xaraés foi 49% superior àquela determinada no genótipo

Marandu. Esse fenômeno pode explicar, em parte, a causa dos maiores danos nas células epidérmicas radiculares da *B. brizantha* cv. Marandu, reveladas por meio de eletromicrografias, em comparação aos danos visualizados nos pêlos radiculares da *B. brizantha* cv. Xaraés, na presença de Al. Em consequência dos efeitos fitotóxicos é possível explicar que a redução da massa seca da parte aérea da *B. brizantha* cv. Marandu é consequência dos danos promovidos pelo metal tanto na epiderme radicular, quanto nas células das radiculares, com implicação na absorção de água e nutrientes (dados não apresentados).

O acúmulo de Al no meio celular proporciona a excessiva produção de ERO'S, as quais alteram a composição de macromoléculas da membrana plasmática (CHEN et al., 2012). O resultado é a peroxidação de lipídeos, considerada a primeira injúria causada pela presença do metal (CAKMAK; HORST, 1991). A peroxidação lipídica pode ser quantificada devido à formação de compostos como álcoois, alcanos e principalmente aldeídos [e.g., malondialdeído (MDA)]. Nesse sentido o MDA é considerado como indicativo dos danos causados pelo estresse oxidativo (MENDONZA, 2011). Estudos têm reportado a peroxidação de lipídeos em várias espécies, amendoim (YAMAMOTO et al., 2001), soja (CAKMAK; HORST, 1991), feijão-fava (CHEN et al., 2012) e em milho (GIANNAKOULA et al., 2010), como fator resultante da toxidez de Al. Entretanto, Boscolo et al. (2003) não constataram mudança na concentração de MDA e na atividade da CAT em raízes de dois genótipos de milho (Cat100-6, tolerante; S1587-17, sensível), com relação às concentrações de Al e ao tempo de exposição. No presente estudo, foi constatado que a concentração de MDA nas folhas é praticamente a mesma para o cultivar Xaraés na ausência e na presença de Al na solução nutritiva. Contudo, verificou-se o aumento na concentração de MDA nas raízes da *B. brizantha* cv. Xaraés, ou seja, possivelmente devido a maior retenção de Al nesse tecido vegetal e, por sua vez, devido ao menor transporte de Al à longa distância, pode-se explicar a redução das injúrias nas membranas celulares das lâminas foliares decorrentes do excesso de Al.

A maior atividade de enzimas do sistema antioxidante nas raízes, com relação à atividade enzimática verificada nas folhas dos genótipos de *Brachiaria*, provavelmente está relacionada com a maior concentração do metal no sistema radicular. Por esse fato, é possível que a maior atividade enzimática em células radiculares promoveu a redução na concentração do H₂O₂ nas raízes com relação aos valores encontrados nas lâminas foliares. Esse fato é fundamental, pois a produção de H₂O₂ nas raízes pode induzir a morte celular (PAN et al.,

2001; BOSCOLO et al., 2003; SIMONOVICOVÁ et al., 2004; TAMÁS et al., 2005) e consequentemente provocar alterações e disfunções fisiológicas nas plantas.

Em condições normais para o crescimento das plantas, mecanismos do sistema antioxidante promovem o adequado equilíbrio e proteção contra as ERO's. O estresse causado pelo excesso de Al resulta no desequilíbrio do sistema antioxidante e consequentemente na elevação da produção ERO's, refletindo em alterações fisiológicas nos tecidos das plantas (GRATÃO et al., 2005; GILL; TUTEJA, 2010). A presença de Al na solução nutritiva promoveu a redução na atividade da CAT e da GPOX para *B. brizantha* cv. Xaraés e da APX e GR para a *B. brizantha* cv. Marandu, nas raízes (Figuras 9B, 11B, 10 e 12B). Tamás, Huttová e Mistrík (2003), constataram que a atividade de peroxidases para o genótipo de cevada (cultivar Alfor) considerado sensível ao Al, foi aproximadamente duas vezes maior que a atividade de peroxidases constatada para o genótipo tolerante (cultivar Bavaria). Portanto, o controle da produção de ERO's se constitui em importante característica para determinadas plantas, a qual pode ser utilizada pela engenharia genética para o aumento da tolerância ao Al.

A redução da atividade enzimática observada nas raízes pode ser resultado da exposição prolongada ao Al (23 dias após a aplicação do Al na solução), visto que vários estudos abordam avaliações enzimáticas após algumas poucas horas da exposição do vegetal ao metal (CAKMAK; HORST, 1991; TAMÁS; HUTTOVÁ; MISTRÍK, 2003; GIANNAKOULA et al., 2010, CHEN et al., 2012). No entanto, a relação entre a presença de Al e o período de exposição ao metal requer o desenvolvimento de novos estudos com genótipos de *Brachiaria*. Vale ressaltar que devido ao período de exposição, a distorção e o colapso das células do córtex podem por consequência alterar as reações bioquímicas celulares e, por fim, reduzirem a atividade de enzimas do sistema antioxidativo. Também é importante considerar que, a capacidade da espécie forrageira em tolerar o Al por maior tempo do seu ciclo vegetativo (e até reprodutivo) pode ser traduzida em maior persistência da pastagem, e com menor impacto na degradação das áreas pastejadas.

O Al acumula-se inicialmente nas raízes de modo rápido, seguido por baixa taxa linear de acúmulo, caracterizada pela absorção simplástica (ZHANG; TAYLOR, 1989, 1990). O rápido acúmulo inicial de Al nas raízes é o reflexo da ligação do metal no apoplasto (HORST; WANG; ETICHA, 2010). Contudo, foi possível constatar para os dois genótipos de *Brachiaria*, que a quantidade de Al no simplasto foi superior aos valores verificados no apoplasto radicular (Tabela 1), o que por um lado possivelmente reflete na capacidade de armazenar o elemento no vacúolo (em genótipos tolerantes) e por outro, a quantidade de Al

presente no citoplasma, em genótipos sensíveis ao excesso do metal tóxico. A compartimentação do Al em apoplasto e simplasto foi reportada em genótipos de feijão (RANGEL; RAO; HORST, 2009) e em genótipos de trigo (TICE; PARKER; DeMASON, 1992), sendo objeto de estudo para obtenção de informações sobre a distribuição intracelular do elemento e a analogia com os mecanismos de tolerância ao Al. Vázquez et al. (1999) avaliaram a distribuição do Al em genótipo de milho tolerante (C 525 M) por meio de eletromicrografias e *energy-dispersive x-ray microanalysis* (EDXMA), concluindo que o Al pode transpassar rapidamente a membrana plasmática, contrariando a ideia de que o metal somente pode ser encontrado no simplasto após ocorrência de lesões celulares. Cabe destacar também que, atualmente genes homólogos, heterólogos e parólogos da família *ALMT* (*Aluminum-Activated Malate Transporter*) e *MATE* (*Multidrug and Toxic Compound Extrusion*) que codificam as proteínas transportadoras e que facilitam o efluxo de ácidos orgânicos aniônicos (citrato e malato) através de membrana plasmática têm sido caracterizados em diversas espécies mono e dicotiledôneas tolerantes ao Al (RYAN et al., 2011; MA et al., 2014). Adicionalmente, deve-se enfatizar também que, o mecanismo de inibição induzida por Al no alongamento da raiz ainda não está bem compreendida e ainda há uma discussão se as lesões primárias do Al são de origem apoplástica ou simplástica (HORST; WANG; ETICHA, 2010).

A transferência do Al do apoplasto para o simplasto, e conseqüentemente para o cilindro vascular central (xilema) realça a importância da elucidação de mecanismos intrínsecos que evitam o transporte do elemento para a parte aérea. Assim, a variação genética na mesma espécie sugere a existência de mecanismos de tolerância, os quais promovem a restrição do transporte à longa distância do metal. No caso do presente estudo, a *B. brizantha* cv. Marandu revelou maior concentração de Al nas folhas, em comparação à *B. brizantha* cv. Xaraés. Isso sugere que os mecanismos de tolerância (principalmente via simplástica) da *B. brizantha* cv. Xaraés são de suma importância, tendo como consequência redução do transporte de Al para as lâminas foliares (Figura 6).

A região meristemática, particularmente a zona de transição é o local de maior sensibilidade ao Al (SIVAGURU; HORST, 1998; KOLLMEIER; FELLE; HORST, 2000; HUANG et al., 2009). Como resultado da entrada de Al no citoplasma radicular e a ligação do metal à parede celular, têm sido verificados aumento na rigidez da parede e diminuição na elasticidade das células (HORST; WANG; ETICHA, 2010), como consequência do acúmulo de H_2O_2 , do ânion superóxido (O_2^-) e lignina (MATSUMOTO; MOTODA, 2012). O ânion superóxido é formado principalmente pela membrana plasmática associada ao

NADPH-oxidase e é dismutado para H_2O_2 e O_2 pela superóxido dismutase (SOD). O H_2O_2 fornece os elétrons para a polimerização de compostos fenólicos à lignina, o que confere a rigidez da parede celular. A distorção da parede celular provocada pela lignina pode induzir a quebra e rasgamento das células, o que resulta na formação de rupturas nas rizoderme e camadas mais externas do córtex (MATSUMOTO; MOTODA, 2012). Arroyave et al. (2013) avaliaram a epiderme radicular de *B. brizantha* e *B. ruzizienses* cultivadas na presença de Al, e constataram rupturas mais evidentes nas células epidérmicas e do córtex da *B. ruzizienses*, após 24 h de exposição ao metal.

A adição de Al na solução nutritiva promoveu a ruptura das células epidérmicas, descamação e colapso das células do córtex, bem como redução ou ausência de pêlos radiculares, além de grande desorganização do sistema vascular (Figuras 13B, D, F; 14B, D, F; 15C, D; e 16C,D), alterando os padrões celulares na região apical e reduzindo a capacidade de absorção de nutrientes (dados não apresentados). Estas alterações foram mais expressivas no cultivar Marandu, principalmente devido maior descamação e microfissuras na epiderme e ausência de pêlos radiculares quando na presença de Al, revelando ser genótipo menos tolerante ao excesso de Al em relação ao Xaraés.

O conhecimento referente ao estresse oxidativo, a compartimentação do Al no apoplasto e simplasto, são de suma importância para o esclarecimento dos mecanismos de tolerância. Portanto, estudos que abordam a fisiologia e a bioquímica de genótipos de *Brachiaria* podem fornecer novas percepções e informações referentes à distinção de genótipos com maior ou menor tolerância ao Al.

4.5 Conclusões

1. A concentração e acúmulo de Al nas folhas de *B. brizantha* cv. Marandu foi superior aos valores constatados para a *B. brizantha* cv. Xaraés, revelando a diferença entre os mecanismos de tolerância (vias apoplástica e simplástica) que evitam o transporte do metal para o xilema.

2. A maior retenção de Al nas raízes do cultivar Xaraés, e por sua vez, menor transporte à longa distância, indica a maior eficiência nos mecanismos de exclusão e de detoxificação interna.

3. As maiores atividades da APX e da GR no tecido radicular do cultivar Xaraés, em detrimento das atividades da CAT e da GPOX, conferem maior tolerância ao excesso de Al absorvido por este genótipo, bem como menor dano causado em estruturas celulares do sistema radicular.

4. A maior capacidade de acúmulo de Al em apoplasto é fundamental para maior tolerância ao excesso do metal.

Referências

- ALEXIEVA, V.; SERGIEV, I.; MAPELLI, S.; KARANOV, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant Cell and Environment**, Oxon, v. 24, p. 1337–1344, 2001.
- ARROYAVE, C.; BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C.; TOLRÀ, R. Aluminium-induced changes in root epidermal cell patterning, a distinctive feature of hyperresistance to Al in *Brachiaria decumbens*. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 105, p. 1477–1483, 2011.
- ARROYAVE, C.; TOLRÀ, R.; THUY, T.; BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Differential aluminum resistance in *Brachiaria* species. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 89, p. 11–18, 2013.
- AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 104, p. 280–292, 1998.
- BOSCOLO, P.R.S.; MENOSSE, M.; JORGE, R.A. Aluminum-induced oxidative stress in maize. **Phytochemistry**, Oxford, v. 62, p. 181–189, 2003.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, p. 248–254, 1976.
- CAKMAK, I.; HORST, W.J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 83, p. 463–468, 1991.
- CHEN, Q.; WU, K.W.; ZHANG, Y.N.; PHAN, X.H.; LI, K.Z.; YU, Y.X.; CHEN, L.M. Physiological and molecular responses of broad bean (*Vicia faba* L.) to aluminum stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 34, p. 2251–2263, 2012.
- DARKÓ, É.; AMBRUS, H.; STEFANOVITS-BÁNYAI, É.; FODOR, J.; BAKOS, F.; BARNABÁS, B. Aluminium toxicity, Al tolerance and oxidative stress in an Al-sensitive wheat genotype and in Al-tolerant lines developed by in vitro microspore selection. **Plant Science**, Clare, v. 166, p. 583–591, 2004.
- DIPIERRO, N.; MONDELLI, D.; BRUNETTI, G.; DIPIERRO, S. Changes in the ascorbate system in the response of pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) roots to aluminium stress. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 162, p. 529–536, 2005.
- EDREVA, A. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Washington, v. 30, p. 119–133, 2005.

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 119, p. 355-364, 2003.

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Oxidant and antioxidant signaling in plants: a reevaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant Cell and Environment**, Oxon, v. 28, p. 1056-1071, 2005.

FURLANI, A. M. C.; FURLANI, P. R. **Composição e pH de soluções nutritivas para estudos fisiológicos e seleção de plantas em condições nutricionais adversas**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1988. 34 p. (Boletim Técnico, 121).

GIANNAKOULA, A.; MOUSTAKAS, M.; SYROS, T.; YUPSANIS, T. Aluminum stress induces up-regulation of an efficient antioxidant system in the Al-tolerant maize line but not in the Al-sensitive line. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 67, p. 487–494, 2010.

GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 48, p. 909-930, 2010.

GRATÃO, P.L.; POLLE, A.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 32, p. 481-494, 2005.

HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, San Diego, v. 125, p. 189-198, 1968.

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**, Oxford, v. 106, p. 185-197, 2010.

HOSSAIN, M.A.; HOSSAIN, A.Z.; KIHARA, T.; KOYAMA, H.; HARA, T. Aluminum-induced lipid peroxidation and lignin deposition are associated with an increase in H₂O₂ generation in wheat seedlings. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 51, p. 223-230, 2005.

HUANG, C.F.; YAMAJI, N.; NISHIMURA, M.; TAJIMA, S.; MA, J.F. A rice mutant sensitive to Al toxicity is defective in the specification of root outer cell layers. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 50, p. 976-985, 2009.

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, Cell and Environment**, Malden, v. 29, p. 1309–1318, 2006.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, p. 137-238, 1965.

KOCHIAN, L.V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 46, p. 237-260, 1995.

KOLLMEIER, M.; FELLE, H.H.; HORST, W.J. Genotypical differences in aluminum resistance of maize are expressed in the distal part of the transition zone. Is reduced basipetal auxin flow involved in inhibition of root elongation by aluminum? **Plant Physiology**, Rockville, v. 122, p. 945-956, 2000.

KRAUS, T.E.; McKERSIE, B.D.; FLETCHER, R.A. Paclobutrazol-induced tolerance of wheat leaves to paraquat may involve increased antioxidant enzyme activity. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 145, p. 570-576, 1995.

LAVRES JUNIOR, J.; MORAES, M.F.; CABRAL, C.P.; MALAVOLTA, E. Influência genotípica na absorção e na toxidez de manganês em soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 173-181, 2008.

MA, J.F.; RYAN, P.R.; DELHAIZE, A. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 6, p. 273- 278, 2001.

MA, J.F.; CHEN, Z.C.; SHEN, R.F. Molecular mechanisms of Al tolerance in gramineous plants. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 381, p. 1-12, 2014.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319 p.

MATSUMOTO, H.; MOTODA, H. Aluminum toxicity recovery processes in root apices: possible association with oxidative stress. **Plant Science**, Clare, v. 185-186, p. 1-8, 2012.

MATSUNO, H.; URATANI, I. Physiological behavior of peroxidase isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black root. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 13, p. 1091-1101, 1972.

MENDOZA, M. Oxidative burst in plant-pathogen interaction. **Biotechnología Vegetal**, Santa Clara, v. 2, p. 67-75, 2011.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; BREUSEGEM, F. VAN. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 9, p. 490-498, 2004.

MORI, S.; KAWASAKI, A.; ISHIKAWA, S.; ARAO, T. A new method for evaluating symplastic cadmium absorption in the root of *Solanum melongena* using enriched isotopes ^{113}Cd and ^{114}Cd . **Soil Science and Plant Nutrition**, Oxon, v. 55, p. 294-299, 2009.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 22, p. 867-880, 1981.

PAN, J.; ZHU, M.; CHEN, H. Aluminum-induced cell death in root-tip cells of barley. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 46, p. 71-79, 2001.

RANGEL, A.F.; RAO, I.M.; HORST, W.J. Intracellular distribution and binding state of aluminum in root apices of two common bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes in relation to Al toxicity. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 135, p. 162-173, 2009.

RIBEIRO, C.; CAMBRAIA, J.; PEIXOTO, P.H.P.; JÚNIOR, E.M.F. Antioxidant system response induced by aluminum in two rice cultivars. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campos dos Goytacazes, v. 24, p. 107-116, 2012.

RYAN, P.R.; TYERMAN, S.D.; SASAKI, T.; FURUICHI, T.; YAMAMOTO, Y.; ZHANG, W.H.; DELHAIZE, E. The identification of aluminium-resistance genes provides opportunities for enhancing crop production on acid soils. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, p. 9-20, 2011.

SAS Institute. **SAS/STAT**: user's guide, version 8.0. Cary: SAS Institute, 2000.

SHARMA, P.; DUBEY, R. Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum. **Plant Cell Reports**, New York, v. 26, p. 2027-2038, 2007.

SIMONOVICOVÁ, M.; HUTTOVÁ, J.; MISTRÍK, I.; SIROKÁ, B.; TAMÁS, L. Root growth inhibition by aluminum is probably caused by cell death due to peroxidase-mediated hydrogen peroxide production. **Protoplasma**, Vienna, v. 224, p. 91-98, 2004.

SIVAGURU, M.; HORST, W.J. The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, p. 155-163, 1998.

SMITH, I.K.; VIERHELLER, T.L.; THORNE, C.A. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). **Analytical Biochemistry**, New York, v. 175, p. 408-413, 1988.

SPURR, A.R. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. **Journal of Ultrastructure Research**, San Diego, v. 26, p. 31-43, 1969.

SUMNER, M.E.; NOBLE, A.D. Soil acidification: the world story. In: RENGEL, Z. (Ed.). **Handbook of soil acidity**. New York: Marcel Dekker, 2003. p. 1-28.

TABALDI, L.A.; CARGNELUTTI, D.; ALVES, J.F.G.; PEREIRA, L.B.; CASTRO, G.Y.; MALDANER, J.; RAUBER, R.; ROSSATO, L.V.; BISOGNIN, D.A.; SCHETINGER, M.R.C. Oxidative stress is an early symptom triggered by aluminum in Al-sensitive potato plantlets. **Chemosphere**, Oxford, v. 76, p. 1402-1409, 2009.

TAMÁS, L.; HUTTOVÁ, J.; MISTRÍK, I. Inhibition of Al-induced root elongation and enhancement of Al-induced peroxidase activity in Al-sensitive and Al-resistant barley cultivars are positively correlated. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 250, p. 193-200, 2003.

TAMÁS, L.; BUDÍKOVÁ, S.; HUTTOVÁ, J.; MISTRÍK, I.; SIMONOVICOVÁ, M.; SIROKÁ, B. Aluminum-induced cell death of barley-root border cells is correlated with peroxidase- and oxalate oxidase-mediated hydrogen peroxide production. **Plant Cell Reports**, New York, v. 24, p. 189-194, 2005.

TICE, K.R.; PARKER, D.R.; DeMASON, D.A. Operationally defined apoplastic and symplastic aluminum fractions in roots tips of aluminum-intoxicated wheat. **Plant Physiology**, Rockville, v. 100, p. 309-318, 1992.

VÁZQUEZ, M.D.; POSCHENRIEDER, C.; CORRALES, I.; BARCELÓ, J. Change in apoplastic aluminum during the initial growth response to aluminum by roots of a tolerant maize variety. **Plant Physiology**, Rockville, v. 119, p. 435-444, 1999.

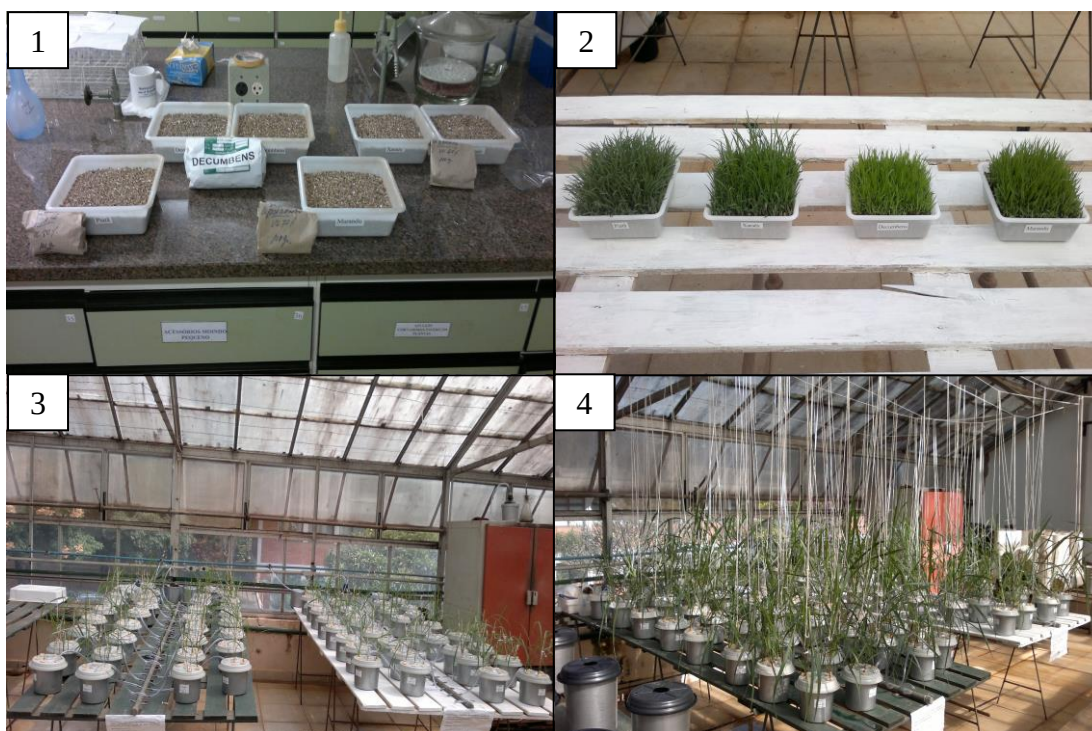
YAMAMOTO, Y.; KOBAYASHI, Y.; MATSUMOTO, H. Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, p. 199–208, 2001.

YAMAMOTO, Y.; KOBAYASHI, Y.; DEVI, S.R.; RIKIISHI, S.; MATSUMOTO, H. Oxidative stress triggered by aluminum in plant roots. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 255, p. 239-243, 2003.

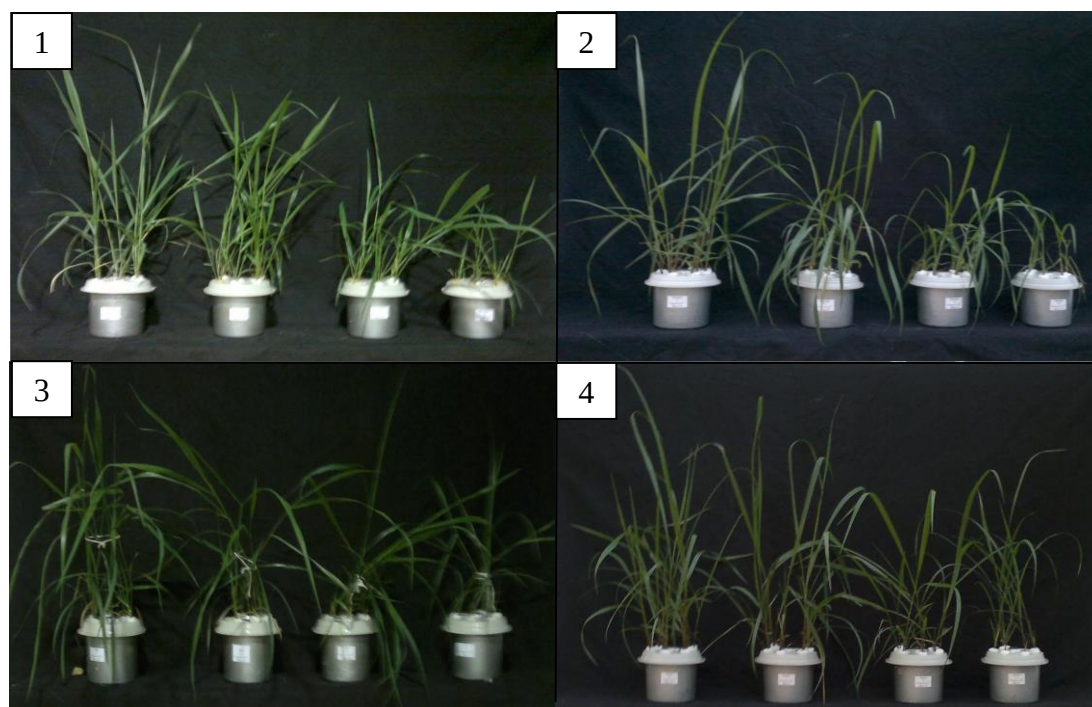
ZHANG, G.; TAYLOR, G.J. Kinetics of aluminum uptake by excised roots of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive cultivars of *Triticum aestivum* L. **Plant Physiology**, Rockville, v. 91, p. 1094-1099, 1989.

ZHANG, G.; TAYLOR, G.J. Kinetics of aluminum uptake in *Triticum aestivum* L.: identity of linear phase of Al uptake by excised roots of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive cultivars. **Plant Physiology**, Rockville, v. 94, p. 577-584, 1990.

APÊNDICES



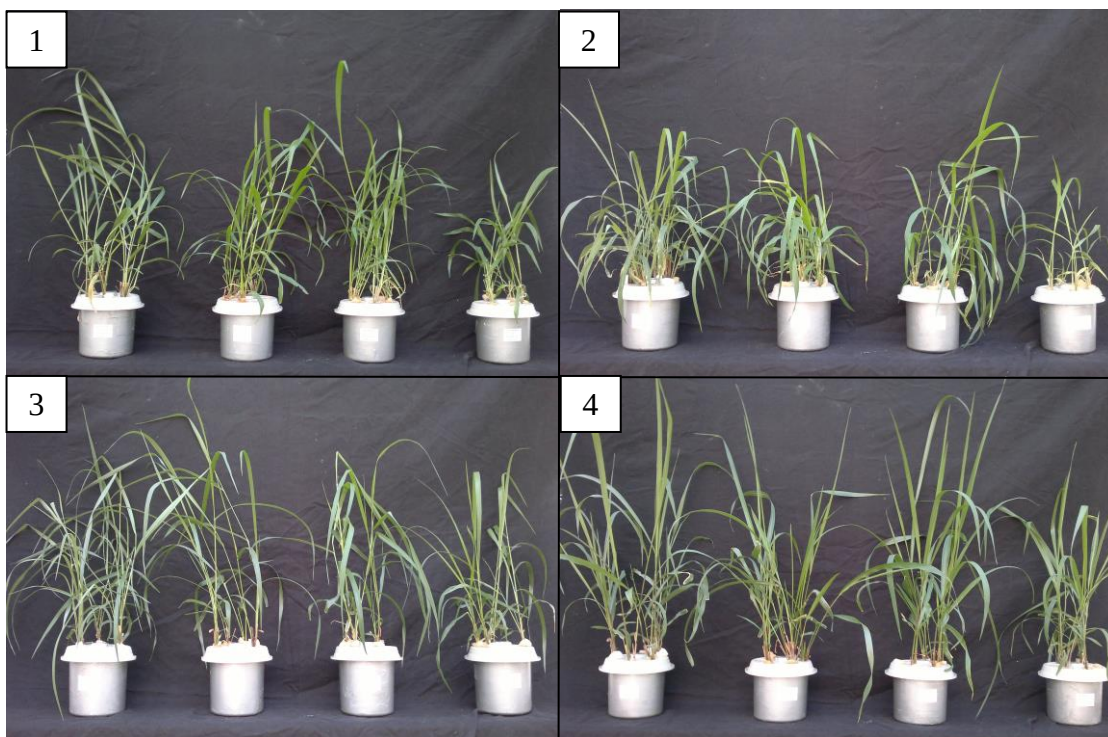
APÊNDICE A – Plantio [1], condução das mudas [2] e condução do experimento no primeiro período de crescimento [3 e 4].



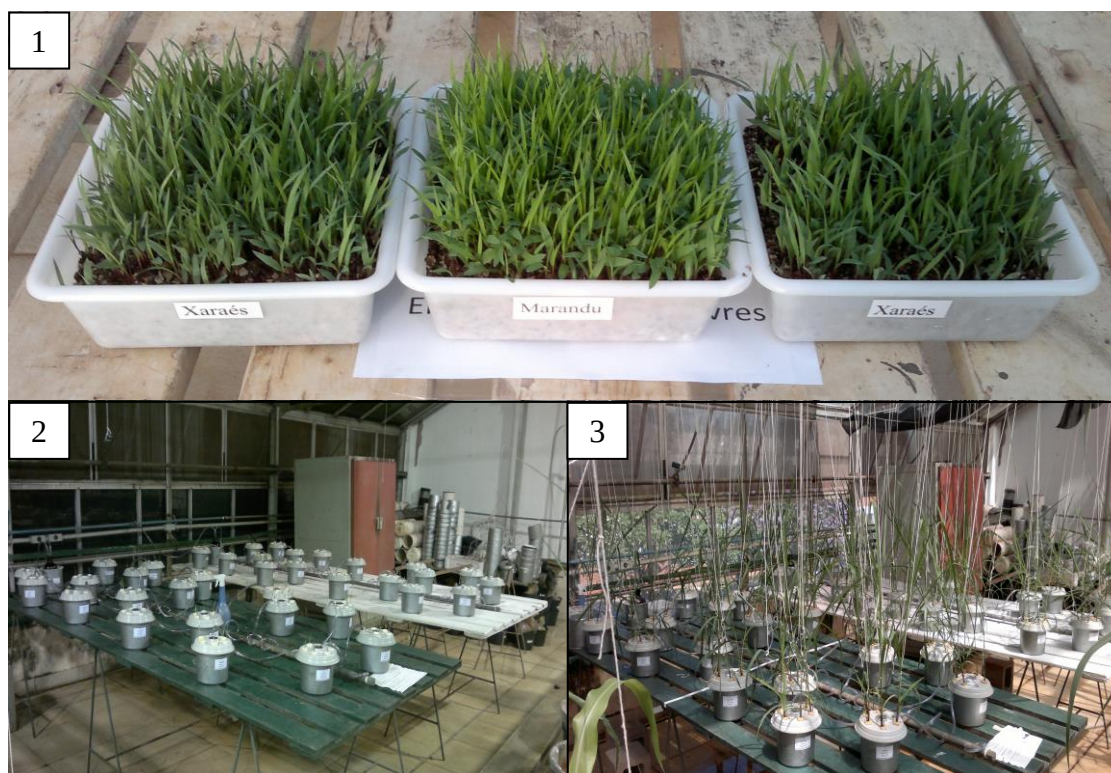
APÊNDICE B – Fotografias ilustrando o primeiro período de crescimento dos genótipos de *B. decumbens* cv. Basilisk [1], *B. brizantha* cv. Marandu [2], *B. brizantha* cv. Piatã [3] e *B. brizantha* cv. Xaraés [4], em resposta a aplicação das doses de Al: 0; 0,44; 0,89; 1,33 mmol L⁻¹ (respectivamente, da esquerda para a direita em cada conjunto de vasos).



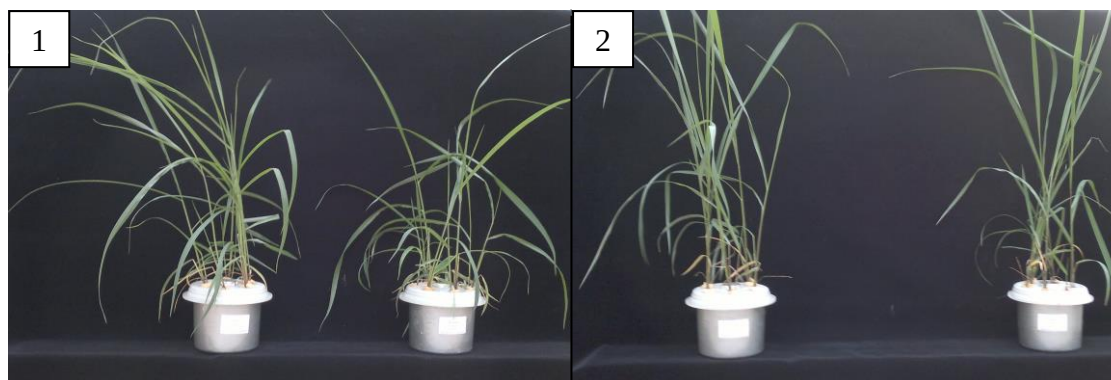
APÊNDICE C – Condução do experimento no segundo período de crescimento [1 e 2].



APÊNDICE D – Fotografias ilustrando o segundo período de crescimento dos genótipos de *B. decumbens* cv. Basilisk [1], *B. brizantha* cv. Marandu [2], *B. brizantha* cv. Piatã [3] e *B. brizantha* cv. Xaraés [4], em resposta a aplicação das doses de Al: 0; 0,44; 0,89; 1,33 mmol L⁻¹ (respectivamente, da esquerda para a direita em cada conjunto de vasos).



APÊNDICE E – Condução das mudas [1], instalação [2] e condução do 2º experimento [3].



APÊNDICE F – Fotografias do 2º experimento, ilustrando os genótipos de *B. brizantha* cv. Marandu [1] e *B. brizantha* cv. Xaraés [2], em resposta a aplicação das doses de Al: 0 e 1,33 mmol L⁻¹ (respectivamente, da esquerda para a direita em cada conjunto de vasos).