

# EXSUDAÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO E TEOR DE ALUMÍNIO EM DIFERENTES REGIÕES DE RAÍZES DE MILHO (*ZEA MAYS L.*)

Leonardo José Motta Campos<sup>1</sup>; Vera Maria Carvalho Alves<sup>2</sup>; Hélio Teixeira Prates<sup>2</sup>; Cristina Generosa de Senna Queiroz<sup>3</sup>; Jurandir Vieira Magalhães<sup>2</sup>; Gilson Vilhaça Excel Pitta<sup>2</sup>; Robert Eugene Schaffert<sup>2</sup>.

## 1-INTRODUÇÃO

O conhecimento dos mecanismos de tolerância ao  $Al^{+3}$  apresentados pelas plantas é fundamental para produção de cultivares tolerantes a este elemento. Contudo, as bases fisiológicas destes mecanismos não estão totalmente compreendidas (Kochian et al., 2004). Não existe ainda consenso sobre o sítio primário da ação tóxica do alumínio na célula, porém, sabe-se que o ápice radicular é o ponto chave no processo da ação tóxica do metal. Acredita-se que o alumínio provoque danos celulares, por sua influência negativa na parede celular, na membrana plasmática, no transporte de íons ou na tradução de sinais iniciados na membrana (Ma et al., 2001). Ácidos orgânicos exercem um importante papel na detoxificação interna e externa do  $Al^{+3}$ , pois possuem grupos carboxílicos que se ligam ao  $Al^{+3}$ , no simplasto ou no apoplasto (quando exsudados), reduzindo sua toxidez (Ryan et al., 2001). A exsudação de ácidos orgânicos por células de ápice de raiz, provocada pelo contato específico do  $Al^{+3}$  com estas células, diminui a atividade dos íons de  $Al^{+3}$  livres, pela formação de quelatos, reduzindo o contato destes íons com a parede celular e com a membrana plasmática (Ryan et al., 2001; Barceló et al., 1996). Em raízes de milho foi observada exsudação de ácidos orgânicos ativada pelo  $Al^{+3}$ , sendo o citrato o principal ânion orgânico exsudado (Pellet et al., 1995). Experimentos realizados até o momento tem detectado a presença destes ácidos em solução nutritiva, impossibilitando a localização da exsudação na raiz. O objetivo deste trabalho foi quantificar a exsudação de ácido cítrico em regiões da raiz, de três linhagens de milho com tolerância diferencial ao Al; verificar a contribuição de outras partes radiculares na exsudação de ácido cítrico, a relação entre a tolerância apresentada pelas plantas e sua exsudação, e a correlação entre a quantidade de ácidos exsudada com o teor de alumínio detectado na raiz.

## 2-MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas 3 linhagens de milho, desenvolvidas pela Embrapa Milho e Sorgo - Sete Lagoas (MG), com diferentes níveis de tolerâncias ao alumínio: Cateto - tolerante, L3 - tolerância intermediária e L53 - sensível ao alumínio (Alves et al. 2000). Sementes selecionadas foram esterilizadas e colocadas em papel de germinação umedecido com água deionizada. As sementes permaneceram em câmara de crescimento por quatro dias em condições de fotoperíodo de 12 horas

(24/18 °C dia/noite) e umidade relativa de 70 %. Após a germinação, as plântulas foram transferidas para recipientes contendo 8,5 L de solução nutritiva (Magnavaca, 1982) sem alumínio, pH 4,2 com arejamento constante, permanecendo nesta solução por 24 horas. A concentração e atividade do alumínio na solução, adicionado na forma de  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ , foi determinada a partir do programa GEOCHEM. Foi quantificada a exsudação de ácido cítrico em diferentes zonas da raiz (0 a 4 mm, 10 a 14 mm e 45 a 49 mm do ápice), em plantas expostas ou não ao Al ( $40 \mu\text{M}$  de atividade de  $\text{Al}^{+3}$ ) por 48 horas. A coleta e as condições analíticas foram adaptadas a partir de metodologias originais propostas por Newmann (1999) e Dinkelaker et al. (1997) e de experimentos posteriores (Campos et al., 2002). Após exposição ao  $\text{Al}^{+3}$ , as plantas foram transferidas para placas de acrílico forradas com papel filtro umedecido. No ponto selecionado para a coleta de ácidos orgânicos, discos de papel de cromatografia (Watmam) com 4 mm de diâmetro foram colocados abaixo e acima da raiz. Após duas horas, os discos foram retirados e colocados em tubos ependorff, contendo 1 ml de água deionizada. Todo o processo foi realizado a 4 °C de temperatura. Uma alíquota foi retirada, filtrada, e transferida para outro ependorff. Os ependorff foram armazenados a -20 °C, para análise posterior em HPLC seguindo metodologia de Campos et al. (2002). O limite de detecção para o ácido cítrico foi de  $0,3253 \mu\text{M}$  e a recuperação em torno de 98%. Para verificação do teor de  $\text{Al}^{+3}$  nas raízes de milho, as diferentes regiões das raízes (0 a 4 mm, 10 a 14 mm e 45 a 49 mm do ápice) foram coletadas em ependorff (24 segmentos por ependorff) e analisados conforme metodologia descrita por Silva (1999). O experimento consistiu de quatro repetições por tratamento, onde cada repetição foi composta por 12 plantas. Foi adotado um delineamento inteiramente casualizado, sendo a análise estatística realizada pelo programa Sisvar.

### 3-RESULTADOS E DISCUSSÃO

As raízes de todas as linhagens apresentaram exsudação de ácido cítrico mesmo sem contato com Al. A presença de alumínio na solução gerou um incremento na exsudação de ácido cítrico no ápice de todas as linhagens (Figura 01).

Região da raiz	Cateto		L3		L53	
	-Al	+Al	-Al	+Al	-Al	+Al
45-49 mm	11,238 aA	9,909 bA	9,065 aA	8,015 bA	7,266 aA	12,566 aB
10-14 mm	9,155 aA	14,038 bB	7,015 aA	15,805 bB	8,772 aA	8,150 aA
0-4 mm	9,730 aA	23,315 aB	10,154 aA	48,920 aB	7,414 aA	11,291 aB

**Figura 1.** Ácido cítrico exsudado (pmol. duas horas<sup>-1</sup>), em três pontos da raiz (0-4 mm, 10-14 mm do ápice e 45-49 mm do ápice) de três linhagens de milho com tolerância diferencial ao Al (Cateto-tolerante, L3 - tolerância mediana, L53-sensível) submetidas (+Al) ou não (-Al) a  $40 \mu\text{M}$  de atividade de  $\text{Al}^{+3}$  por 48 horas. Letras minúsculas comparam médias verticais e maiúsculas comparam médias horizontais (Tukey,  $p < 0,05$ ).

<sup>1</sup>Doutorando/ Biologia Vegetal/Universidade Federal de Minas Gerais; <sup>2</sup>Pesquisador/Embrapa Milho e Sorgo;

Considerando-se apenas a região do ápice ( 0-4mm), a maior taxa de exsudação ocorreu na L3, seguida por Cateto e L53. A linhagem L3 apresentou aumento de 380% em sua exsudação, quando submetidas ao tratamento com alumínio, enquanto na Cateto a elevação foi de 140%. Na linhagem L53 o incremento na exsudação proporcionado pela presença de alumínio foi de apenas 52% (Figura 01). Maiores taxas de exsudação de ácido cítrico na linhagem L3 também foram registradas por Alves et al. (2000), cujos resultados foram baseados em quantificação de citrato em alíquotas de solução nutritiva correspondente aos tratamentos com alumínio.

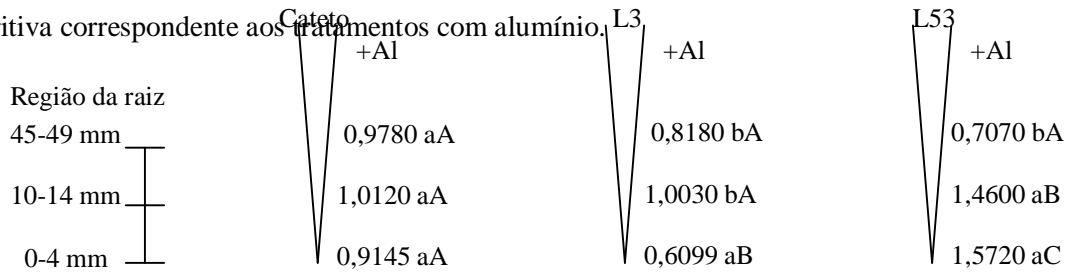


Figura 02. Teor de Al (mg. g massa seca<sup>-1</sup>) encontrado em três zonas da raiz (0-4 mm, 10-14 mm e 45-49 mm do ápice) das linhagens submetidas a 40μM de atividade de Al<sup>+3</sup> por 48 horas. Letras minúsculas comparam médias verticais e maiúsculas comparam médias horizontais (Tukey, p<0,05).

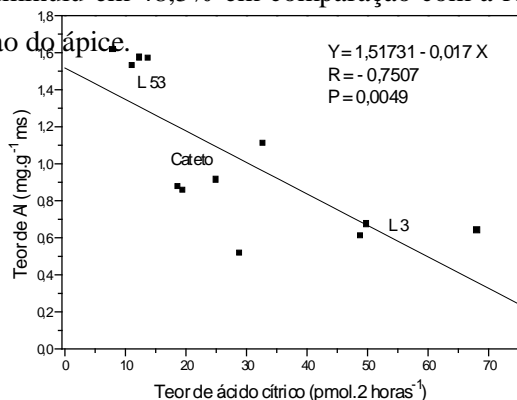
Examinando-se os resultados de exsudação de citrato nas três regiões da raiz (Figura 01), verifica-se que outras partes da raiz, além do ápice, podem exsudar quantidades significativas deste ácido. A maior taxa de exsudação foi de 48,92 pmol.2 horas<sup>-1</sup> no ápice (0 a 4 mm), em plantas da linhagem L3 submetidas à concentração de 40 μM de alumínio. Quantificando-se citrato na solução nutritiva na qual as raízes ficaram submersas, Pellet et al. (1995) observaram em plantas de milho exsudação de 250 pmol.ápice<sup>-1</sup>.hora<sup>-1</sup>, em condições de tratamento corresponde a 40 μM de atividade de Al<sup>+3</sup>. Piñeros et al. (2002) detectaram 400 pmol.hora<sup>-1</sup>.raiz<sup>-1</sup> em raízes de milho expostas a 80 μM de atividade de Al<sup>+3</sup>. A técnica utilizada neste trabalho, em diferentes regiões da raiz, permitiu a coleta de ácido orgânico presente somente na camada de células superficiais da raiz.

Na região da raiz situada ente 10 e 14 mm a partir do ápice, a presença de Al elevou a exsudação de ácido cítrico nas linhagens L3 e Cateto (124% e 53% respectivamente). Ainda nesta região, quando comparada ao ápice, registrou-se uma diminuição no ácido cítrico exsudado pelas linhagens L3 e Cateto (68 % e 40 % respectivamente) no tratamento com Al. Entre 45-49 mm do ápice, houve acréscimo de 73 % na exsudação na linhagem L53 induzido pelo Al (Figura 04), enquanto que em Cateto e L53, observou-se redução na exsudação de ácido cítrico nos tratamentos com Al, quando comparado com seus respectivos ápices.

Nas plantas da linhagem Cateto o teor de Al encontra-se distribuído uniformemente em todas as regiões analisadas. A linhagem L3 apresentou a menor concentração de Al localizada entre 0 a 4 mm do ápice radicular, enquanto a L53 revelou, nesta zona da raiz, o maior teor de Al (Figura 2).

<sup>3</sup>Professora/Universidade Federal de Minas Gerais (leojmc@yahoo.com.br)

Nas linhagens Cateto e L3, o teor de Al presente nas regiões entre 10 e 15 mm e entre 45 e 49 mm do ápice das raízes foi semelhante. Na linhagem L53 o teor de Al presente na região da raiz entre 45 a 49 mm diminuiu em 48,5% em comparação com a região entre 10 e 15 mm do ápice, que manteve teor igual ao do ápice.



**Figura 03.** Correlação entre teor de ácido cítrico exsudado e teor de Al detectado no ápice da raiz (0-4 mm) das linhagens de milho submetidas a 40 µM de atividade de Al<sup>+3</sup> por 48 horas.

Comparando-se a exsudação de ácido cítrico com o teor de alumínio na região compreendida entre 0-4 mm da raiz (Figura 3) em todas as linhagens, observa-se que a linhagem Cateto, embora seja considerada de maior tolerância a alumínio, exsuda menor quantidade de citrato que a linhagem L3, considerada de tolerância intermediária.

Esses resultados sugerem em Cateto a presença de outro mecanismo de tolerância complementar ou mais eficiente, que a exsudação de ácido cítrico. Por outro lado, a sensibilidade ao alumínio, representada pela linhagem L53, correspondeu a menor taxa de exsudação de ácido cítrico e ao maior teor de Al interno. Esses dados caracterizam a eficiência da exsudação de ácidos orgânicos nas linhagens tolerantes como um fator de proteção do ápice da raiz contra a toxidez de alumínio. Wenz et al. (2001) comparando duas espécies de braquiária com tolerância diferencial ao Al, observaram que *Brachiaria ruziziensis*, espécie menos tolerante, exsudou maiores quantidades de ácido cítrico e oxálico que *Brachiaria decumbens*, caracterizada como mais tolerante e esses autores identificam a exsudação de ácidos orgânicos como um mecanismo secundário de tolerância ao Al. Ryan et al. (2001) também argumentam ser pouco provável a existência de um único mecanismo que explicaria a tolerância ao Al em diversas culturas. A existência de outros mecanismos, tais como: composição e espessura da parede celular, exsudação de compostos fenólicos ou mecanismos de tolerância interna atuando em conjunto com a exsudação de citrato, poderiam justificar os resultados encontrados neste estudo.

#### 4-CONCLUSÕES

- A utilização de discos de papel de cromatografia, colocados diretamente na superfície da raiz, constitui-se numa ferramenta adequada para coleta de ácidos orgânicos exsudados

- A exsudação de ácido cítrico por raízes de milho ocorre tanto na presença como na ausência de alumínio, sendo estimulada por este íon
- A exsudação de citrato foi detectada em diferentes regiões da raiz, sendo maior no ápice
- Observou-se uma correlação negativa entre teor de ácido cítrico exsudado e teor de alumínio no ápice radicular. A sensibilidade ao alumínio, representada pela linhagem L53, correspondeu à menor taxa de exsudação de ácido cítrico e ao maior teor de Al interno.

## 5- BIBLIOGRAFIA

ALVES, V.M.C.; MAGALHÃES, J.V.; SHAFF, J.E., PIÑEROS, M.A.; PURCINO, A.A.C.; PARENTONI, S.N.; PITTA, G.V.E.; PRATES, H.T.; SCHAFFERT, R.E.; KOCHIAN, L.V. Exsudação de ácidos orgânicos como mecanismo de tolerância a alumínio em milho. In: XXIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo, Uberlândia. **Anais...**, 2000.

BARCELÓ J., POSCHENRIEDER C.H., VAZQUEZ M.D. & GUNSE B., Aluminium Phytotoxicity: A challenger for plant scientists. **Fertilizer Research**, v. 43, p. 217-223. 1996.

DINKELAKER, B.; HENGELER, C.; NEUMANN, G.; ELTROP, L.; MARSCHNER, H. Root exudates and mobilization of nutrients. In: RENNENBERG, H.; ESCHRICH, W.; ZEIGLER, H. (eds), **Trees-Contributions to modern tree physiology**. Backhuys Publishers: Leiden, 1997. p. 441-452.

KOCHIAN, L.V.; HOEKENGA, O.A. & PIÑEROS, M.A. How do crop plants tolerate acids soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorus efficiency. **Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.**, v. 46, p. 237-260, 2004.

CAMPOS, L.J.M.; ALVES, V.M.C.; PRATES, H.T.; QUEIROZ, C.G. DE S.; PITTA, G.V.E.; SCHAFFERT, R.E. Utilização da técnica de cromatografia líquida na determinação de ácidos orgânicos em raiz de milho (*Zea mays L.*). In: XXIV Congresso Brasileiro de Milho e Sorgo, Florianópolis. **Anais...**, 2002.

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

MAGNAVACA, R. **Genetic variability and the inheritance of aluminum tolerance in maize (*Zea mays L.*)**. 1982. 135 f. Tese. (Ph.D. Thesis) – University of Nebraska, Lincoln.

NEUMANN, G.; HAAKE, C; ROMHELD, V. Improved HPLC method for determination of phytosiderophores in root washings and tissue extracts. **Journal-of-Plant-Nutrition**, v. 22, n. 9, p. 1389-1402, 1999.

PELLET D.M., GRUNES D.L. & KOCHIAN L.V., Organic acid exudation as an aluminum tolerance mechanism in maize (*Zea mays L.*). **Planta**, v.196, p. 788-795, 1995.

PIÑEROS, M.A.; Magalhães, J.V.; ALVES, V.M.C.; KOCHIAN, L.V. The physiology and biophysics of aluminum tolerance based on root citrate exudation in maize. **Plant Physiology**, v. 129, p. 292-305, 2002.

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

RYAN P.R., DELHAISE E. & JONES D.L., Function and Mechanism of Organic Anion Exudation from Plant Roots. **Annu. Ver. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 52, p. 527-560, 2001.

SILVA, F. C., **Manual de Análises Químicas de Solos Plantas e Fertilizantes**. Embrapa Solos e Embrapa Informática Agropecuária, 1ª ed. Brasília, 1999. p. 204-208.