

EFEITO DO ALUMÍNIO SOBRE A PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS EM DOIS CULTIVARES DE ARROZ (*Oryza sativa* L.)

Alves, R. M. M.¹; Cambraia, J.²; Cano, M. A. O.²; Oliveira, J. A. de²; Ribeiro, C.³

1. Introdução

Os mecanismos de tolerância ao Al ainda não são conhecidos perfeitamente em nenhuma espécie vegetal. Há grande interesse em se conhecer estes mecanismos especialmente numa espécie como arroz, tida como uma das mais tolerantes, dentre as culturas de importância econômica. Um dos principais mecanismos apontados para a tolerância das plantas ao Al está associado à participação de ácidos orgânicos (KOCHIAN et al., 2004). Uma das hipóteses admite a produção e a exsudação, via canais de ânions, de certos ácidos orgânicos para a solução de cultivo onde complexariam o Al. Este mecanismo, denominado de “exclusão” tem sido o preferido por vários autores (DELHAIZE et al., 1993; RYAN et al., 2001), para explicar os resultados observados em várias espécies. CAMBRAIA et al. (1983), GONÇALVES et al. (2005) e outros, têm sustentado, entretanto, que isto pode não ser verdade para algumas espécies. Eles propõem que, pelo menos parte da tolerância, possa estar relacionada com o acúmulo dos ácidos orgânicos nos tecidos vegetais, onde complexariam o Al, reduzindo seus efeitos sobre o citoplasma. Este mecanismo, referido como mecanismo de “tolerância interna”, tem sido utilizado para explicar a tolerância ao Al em sorgo (CAMBRAIA et al., 1983, GONÇALVES et al., 2005), em hortênsia (MA et al., 1997) e em trigo-mouro (MA et al. 1998).

MACÊDO et al. (2001), trabalhando com dois cultivares tolerantes (IRA112 e IR6023) e dois sensíveis (Aiwu e IKP) de arroz, relatam não terem encontrado efeito do Al sobre a exsudação de citrato e apenas ligeiro estímulo na exsudação de malato e que as concentrações de ácido málico nos ápices radiculares não apresentaram qualquer relação com a tolerância ao Al.

Considerando que isto poderia não ser verdade para todos os cultivares de arroz e sob outras condições experimentais, resolveu-se desenvolver esta pesquisa com dois outros cultivares de arroz com tolerância diferencial ao Al. Este trabalho teve, pois, como objetivo avaliar o efeito do Al sobre os teores de ácidos orgânicos e as atividades de enzimas relacionadas com o metabolismo do ácido cítrico e ácido málico no cultivares Fernandes (tolerante) e Maravilha (sensível).

2. Material e métodos

No experimento foram utilizados dois cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.): Fernandes (CNA-1158) e Maravilha (CNA-6843-1), considerados tolerante e sensível ao Al. As sementes foram tratadas com H₂SO₄ conc. por 1 min, lavadas, tratadas com hipoclorito de sódio 2% (v/v) por 15 min e,

¹ (1) Pesquisador da Embrapa / Amapá; (2) Professores da Universidade Federal de Viçosa (UFV) / Pesquisadores do CNPq (2º e 3º); (3) Bolsista MS / Capes / UFV (rogerio@cpafap.embrapa.br)

finalmente, lavadas em água corrente e desmineralizada. Elas foram, então, colocadas para germinar em cartuchos de papel “germitest”, pH neutro, mergulhados em solução nutritiva de Clark (CLARK, 1975), pH 4,0, com um terço da força iônica original. Onze dias após a semeadura, as plântulas foram selecionadas quanto à uniformidade de tamanho e forma e transplantadas para recipientes de 1,6 L contendo solução nutritiva de Clark (CLARK, 1975), pH 4,0, com Al 0 e 1,0 mM aplicado na forma de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,

Decorridos quatorze dias, o experimento foi encerrado, as plantas foram removidas, lavadas em água corrente e em água desmineralizada e retiradas amostras para a determinação dos teores de ácidos orgânicos e da atividade enzimática. A fração de ácidos orgânicos foi separada passando-se os extratos vegetais através de colunas trocadora de cátions e trocadora de ânions, sucessivamente. O eluato final foi evaporado, retomado em etanol absoluto, os ácidos orgânicos transformados em derivados trimetilsililados e, então, quantificados por cromatografia gasosa (JHAM et al., 2002). Para a determinação das atividades das duas enzimas foram preparados extratos enzimáticos brutos conforme descrito por HAYES & MA (2003). A atividade da desidrogenase do malato (EC 1.1.1.37) foi determinada pelo decréscimo na concentração de NADH a 340 nm, a 25°C e a da sintase do citrato (EC 2.3.3.1) pelo decréscimo na concentração de acetil-CoA, medido por sua reação com o ácido 5,5'-ditio-bis-nitrobenzóico (DTNB), a 412 nm, a 25°C (HAYES & MA, 2003).

3. Resultados e discussão

Vários ácidos orgânicos foram detectados nos tecidos vegetais dos dois cultivares de arroz. Alguns dos considerados mais importantes no que concerne ao mecanismo de tolerância são apresentados no Quadro 1. Os teores do ácido t-aconítico ao contrário do observado em sorgo (CAMBRAIA et al., 1983) foram excepcionalmente baixos em arroz e aumentaram apenas no sistema radicular do cultivar Fernandes. No Maravilha o teor deste ácido no sistema radicular até mesmo reduziu.

Os teores de ácido málico aumentaram nas duas partes das plantas do cultivar Fernandes, permanecendo inalterados no cultivar Maravilha (Quadro 1). O cultivar Maravilha, contudo apresentou sempre teores mais elevados de ácido málico do que o cultivar Fernandes, tanto na presença quanto na ausência de Al na solução de cultivo. No cultivar Fernandes, apesar da elevação nos teores de ácido málico, induzidas pelo Al, o valor absoluto do teor deste ácido permaneceu ainda muito baixo, provavelmente, insuficiente para eliminar porção significativa da toxidez de Al, pelo menos em arroz e sob as condições experimentais aqui utilizadas. Em sorgo, o ácido málico foi apontado como o mais importante ácido orgânico associado com a tolerância interna ao Al (GONÇALVES et al., 2005). Em cultivares de arroz, diferentes dos utilizados neste experimento, entretanto, o ácido málico não foi considerado importante no mecanismo de tolerância ao Al (MACÊDO et al., 2001). Isto, contudo, não descarta a possibilidade do ácido málico participar do

mecanismo de tolerância ao Al baseado na sua exsudação para a solução de cultivo, conforme se sugere para trigo (DELHAIZE et al., 1993) e triticales (ZHANG, et al., 2003).

Os teores de ácido cítrico foram os mais elevados e os que sofreram as maiores aumentos absolutos nos tecidos vegetais das plantas tratadas com Al (Quadro 1). Os teores deste ácido aumentaram de cerca de 8 e 21 vezes atingindo teores de 13,3 e de 71,2 $\mu\text{g/g}$ de MF nas raízes e na parte aérea do cultivar Fernandes, respectivamente, permanecendo constante nas duas partes das plantas do cultivar Maravilha. Os resultados sugerem importante contribuição do ácido cítrico na tolerância interna do cultivar Fernandes ao Al. Além de sua considerável capacidade de complexar Al, o complexo citrato-Al poderia ser armazenado nos vacúolos reduzindo a atividade do Al no citoplasma (KOCHIAN et al., 2004).

Quadro 1 – Efeito do alumínio sobre os teores de alguns ácidos orgânicos nas raízes e parte aérea de dois cultivares de arroz.

| Ácidos orgânicos | Al (mM) | Teores de ácidos orgânicos ($\mu\text{g g}^{-1}\text{MF}$) | | | |
|------------------|------------|--|-----------|-------------|-----------|
| | | Sistema radicular | | Parte aérea | |
| | | Fernandes | Maravilha | Fernandes | Maravilha |
| t-aconítico | 0 | 0,03 Bb | 0,58 Aa | 0,09 Aa | 0,10 Aa |
| | 1 | 0,10 Aa | 0,05 Ab | 0,04 Aa | 0,09 Aa |
| Málico | 0 | 0,21 Bb | 1,39 Aa | 0,00 Bb | 5,13 Aa |
| | 1 | 0,53 Ba | 1,48 Aa | 0,59 Ba | 5,31 Aa |
| Cítrico | 0 | 1,64 Ab | 1,07 Aa | 3,39 Bb | 5,27 Aa |
| | 1 | 13,34 Aa | 1,54 Ba | 71,20 Aa | 4,96 Ba |

¹Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre tratamentos para cada cultivar e pela mesma letra maiúscula entre cultivares para o mesmo tratamento, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A atividade da desidrogenase do malato (MDH) não sofreu qualquer modificação nas duas partes das plantas dos dois cultivares quando tratados com Al (Quadro 2). O cultivar Fernandes, entretanto, independente de tratamento com Al e da parte da planta analisada, apresentou maior atividade desta enzima. Em triticales, HAYES & MA (2003), também, não observaram efeito do Al na atividade da MDH, descartando a indução desta enzima relacionada com a biossíntese de ácido málico como componente do mecanismo de tolerância ao Al.

A atividade da enzima sintase do citrato (CS), contudo, aumentou no cultivar Fernandes, tanto nas raízes (126%) como na parte aérea (57%) (Quadro 2). No cultivar Maravilha, isto não aconteceu; a enzima teve sua atividade reduzida em 24% nas raízes, não se alterando na parte aérea (Quadro 2). A atividade da CS foi sempre muito maior nas raízes do que na parte aérea, independente do tratamento

aplicado, nos dois cultivares. O cultivar Maravilha apresentou maior atividade da CS apenas nas raízes das plantas controle. Nas plantas tratadas com Al, a atividade desta enzima no cultivar Fernandes foi 2,4 vezes mais alta que no cultivar Maravilha. As respostas desta enzima se correlacionam com os aumentos nos teores de ácido cítrico induzidos por Al. LI et al. (2000), também, encontraram correlação entre níveis de Al, aumento da atividade da CS e aumento nas concentrações de ácido cítrico, em centeio. Tudo indica, portanto, que o Al ao induzir a biossíntese desta enzima, desencadeia a biossíntese de ácido cítrico essencial para a tolerância ao Al em arroz, pelo menos, para o cultivar Fernandes.

Quadro 2. Efeito do alumínio sobre as atividade de duas enzimas do metabolismo de ácidos orgânicos em dois cultivares de arroz.

| Cultivares | Al (mM) | Atividade Enzimática (μmol h ⁻¹ mg ⁻¹ de proteína) | |
|-------------------------|------------|--|-------------|
| | | Raízes | Parte aérea |
| Desidrogenase do malato | | | |
| Fernandes | 0 | 144,5 Aa ¹ | 63,2 Aa |
| | 1 | 145,2 Aa | 64,4 Aa |
| Maravilha | 0 | 116,9 Ba | 48,2 Ba |
| | 1 | 120,2 Ba | 46,5 Ba |
| Sintase do citrato | | | |
| Fernandes | 0 | 1,90 Bb ¹ | 0,07 Ab |
| | 1 | 4,29 Aa | 0,11 Aa |
| Maravilha | 0 | 2,37 Aa | 0,07 Aa |
| | 1 | 1,79 Bb | 0,06 Ba |

¹Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre tratamentos para cada cultivar e pela mesma letra maiúscula entre cultivares para o mesmo tratamento, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4. Conclusões

O tratamento com Al resultou em aumento nos teores de ácidos orgânicos nas duas partes das plantas do cultivar Fernandes. Dentre os ácidos orgânicos produzidos, o ácido cítrico foi aquele que atingiu os maiores teores, principalmente na parte aérea do cultivar Fernandes. O Al, também, aumentou neste cultivar a atividade da enzima sintase do citrato, envolvida na biossíntese do ácido cítrico e, portanto, tudo indica que o cultivar Fernandes utiliza este ácido orgânico para tolerar níveis elevados de Al em suas células.

5. Referências bibliográficas

CAMBRAIA, J., GALVANI, F.R., ESTEVÃO, M.M., SANT'ANNA, R. Effects of aluminum on organic acid, sugar and amino acid composition of the root system of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). **Journal of Plant Nutrition**, v. 6, p. 313-322. 1983.

- CLARK, R.B. Characterization of phosphatase of intact maize roots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 23, p. 458–460. 1975.
- DELHAIZE, E., CRAIG, S., BEATON, C.D., BENNET R.J., JAGADISH, V.C., RANDALL, P.J. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L) I. Uptake and distribution of aluminum in root apices. **Plant Physiology**, v. 103, p. 685–693. 1993.
- GONÇALVES, J.F.C., CAMBRAIA, J., MOSQUIM, P.R., ARAÚJO, E.F. Aluminum effect on the organic acid production and accumulation in sorghum. **Journal of Plant Nutrition**, v. 28, p. 507–520. 2005.
- HAYES, J .E., MA, J.F. Al-induced efflux of organic acid anions is poorly associated with internal organic acid metabolism in triticale roots. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, p. 1753–1759. 2003.
- JHAM, G. N., FERNANDES, S. A., GARCIA, C. F., SILVA, A. A. DA Comparison of GC and HPLC for the quantification of organic acids in coffee. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 99–104. 2002.
- 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**, v. 55, p. 459–493. 2004.
- LI, X. F.; MA, J. F.; MATSUMOTO, H. Pattern of aluminum-induced secretion of organic acids differs between rye and wheat. **Plant Physiology**, v. 123, p. 1537 – 1544. 2000.
- MA, J.F., HIRADATE, S., NOMOTO, K., IWASHITA, T., MATSUMOTO, H. Internal detoxification mechanism of Al in hydrangea: Identification of Al form in the leaves. **Plant Physiology**, v.113, p. 1033–39. 1997.
- MA, J.F., HIRADATE, S., MATSUMOTO, H. High aluminum resistance in buckwheat: II. Oxalic acid detoxifies aluminum internally. **Plant Physiology**, v. 117, p. 753–59. 1998.
- MACÊDO, C.E.C., KINET, J.M., LUTTS, S. Aluminum effect on citric and malic acid excretion in roots and calli of rice cultivars. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, p. 13–23. 2001.
- RYAN, P.R., DELHAIZE, E., JONES, D.L., Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 52, p. 527–560. 2001.
- ZHANG, X.G., JESSOP, R.S., ALTER, D. Organic acid exudation associated with aluminium stress tolerance in triticale and wheat. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 54, p. 979–985. 2003.