

## Exsudação de ácidos orgânicos como mecanismo de tolerância a alumínio em milho

Vera Maria Carvalho ALVES<sup>1</sup>, Jurandir Vieira de MAGALHÃES<sup>2</sup>, Jon E. SHAFF<sup>3</sup>, Miguel A. PIÑEROS<sup>3</sup>, Antônio Álvaro Corsetti PURCINO<sup>1</sup>, Sidney Netto PARENTONI<sup>1</sup>, Gilson Villaça Exel PITTA<sup>1</sup>, Hélio Teixeira PRATES<sup>1</sup>, Robert Eugene SCHAFFERT<sup>1</sup>, Leon V. KOCHIAN<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, 35.701-970 Sete Lagoas, MG., <sup>2</sup>Bolsista de doutorado da CAPES - Cornell University, <sup>3</sup>USDA/ARS, Ithaca, NY - [vera@cnpms.embrapa.br](mailto:vera@cnpms.embrapa.br)

### Introdução

O primeiro sintoma de toxidez é a inibição da elongação da raiz, o qual ocorre cerca de 1-2 h após a exposição a Al (Kochian, 1995). Evidências recentes demonstram que o ápice radicular é o sítio primário de indução da inibição do crescimento causada pelo Al. Aparentemente, em genótipos sensíveis, o Al inibe o transporte basipetal de auxinas entre a ZDT e a zona de alongamento imediatamente acima (ZE, 2-3 mm de comprimento), causando severa inibição do desenvolvimento radicular (Kollmeir et al., 2000).

Várias hipóteses têm sido formuladas para explicar os mecanismos pelos quais as plantas toleram o alumínio. Entretanto, os mecanismos fisiológicos exatos ainda não estão totalmente esclarecidos, provavelmente devido à variedade de efeitos provocados pela toxidez deste elemento. Os mecanismos de tolerância ao Al propostos na literatura podem ser classificados em mecanismos de exclusão e mecanismos de tolerância interna (Kochian, 1995). Os mecanismos de exclusão previnem o Al de atravessar a membrana plasmática e penetrar no simplasto. Os mecanismos de tolerância interna imobilizam, compartimentalizam ou detoxificam o Al que penetrou no simplasto. Tem sido sugerido que ácidos orgânicos atuam em ambos, na exclusão, via quelação do Al no apoplasto e na rizosfera e na detoxificação do Al do simplasto, onde ácidos orgânicos como citrato e malato podem quelar Al e reduzir e/ou prevenir o seu efeito tóxico a nível celular.

A exsudação de ácidos orgânicos quelando Al no apoplasto ou rizosfera tem sido reportado em genótipos tolerantes de trigo (málico e succínico, Ryan et al., 1995), milho (cítrico e málico, Pellet et al., 1995, Jorge e Arruda, 1997) e *Arabidopsis thaliana* (cítrico e málico, Degenhardt et al., 1998), dentre outras. Por outro lado, trabalhos realizados por Parker e Peddler (1998) e por Campbell (1999), com trigo e alfafa sugerem que a exsudação de ácidos orgânicos não é o único mecanismo envolvido na tolerância ao alumínio e que a criação de um modelo multifacetado é necessário.

O objetivo do presente trabalho foi estudar o envolvimento da exsudação de ácidos orgânicos na tolerância ao Al em milho.

### Metodologia

A primeira etapa para o desenvolvimento de estudos sobre tolerância a alumínio e exsudação de ácidos orgânicos foi a escolha e caracterização dos genótipos padrões. Foram escolhidos seis linhagens de milho (Cateto Al 237, SLP 181, L 1154, L 3, L 36 e L 53) com diferente “back ground” genético. Sementes destas linhagens foram desinfetadas com hipoclorito de sódio (5% por 15 min) e a seguir germinadas por três dias em placas de Petri, entre dois discos de papel de filtro umedecidos com água destilada, sendo posteriormente transplantadas para solução nutritiva de Magnavaca (1982), pH 4.5, onde permaneceram por 24 horas. Após esse período a solução nutritiva foi trocada, adicionando-se 0 e 40 µM de atividade de Al. O comprimento da raiz seminal foi medido no tempo zero e após 1, 2, 3, 4 e 5 dias de tratamento com Al.

Para os experimentos de exsudação de ácidos orgânicos por raízes intactas, foram utilizadas duas metodologias:

- Após desinfecção e germinação por três dias, as plântulas foram transplantadas para bandejas contendo 8 litros de solução estéril de 4.3 mM de  $\text{CaCl}_2$ , pH 4.5, onde permaneceram por 24 horas. Após esse período a solução foi trocada, adicionando-se 0 e 40  $\mu\text{M}$  de atividade de Al por 24 horas. A seguir as plântulas foram transferidas, em número de 5, para tubos Falcon de 50ml, contendo as mesmas soluções e o exsudato radicular foi coletado por 24 horas. Os ácidos orgânicos exsudados foram analisados utilizando-se eletroforese capilar.
- O experimento foi conduzido de maneira semelhante à anterior, diferindo entretanto quanto à solução nutritiva utilizada – solução completa (Magnava, 1982), ao período de tratamento com alumínio (48 horas) e ao método de análise de ácidos orgânicos – metodologia enzimática (kits diagnósticos para determinação de citrato e de malato Boehringer Mannheim 139.076 e 139.068)

### Resultados e discussão

As linhagens escolhidas foram classificadas em tolerantes (Cateto Al 237, SLP 181, L 1154, L 3) e sensíveis ao alumínio (L 36 e L 53), com base no comprimento de raiz seminal (Figura 1). A diferença entre linhagens tolerantes e sensíveis foi observada desde o primeiro dia de exposição ao alumínio.

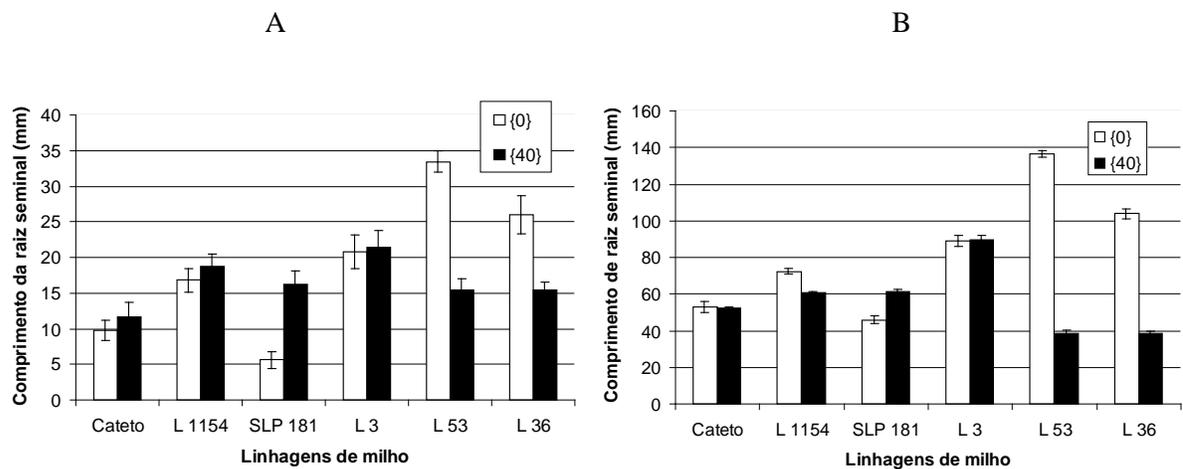


Figura 1. Comprimento da raiz seminal (mm) em seis linhagens de milho após exposição a 0 e 40  $\mu\text{M}$  de atividade de alumínio por um dia (A) e quatro dias (B).

Os resultados de exsudação de ácidos orgânicos obtidos com a utilização das duas metodologias foi bastante semelhante. Os ácidos orgânicos exsudados por todas as linhagens de milho foram o citrato e o malato. Entretanto a exsudação de malato foi bem inferior à exsudação de citrato e não houve correlação entre presença de alumínio no meio e exsudação de malato. O Al induziu a exsudação de citrato em todas as linhagens de milho, quando se utilizou solução de  $\text{CaCl}_2$  (Figura 2 A). Entretanto, não houve diferença significativa na exsudação de citrato entre as linhagens tolerantes Cateto Al 237, L 1154 e SLP 181 e as linhagens sensíveis L 53 e L 36. Apenas a linhagem tolerante L 3 exsudou significativamente mais citrato na presença de Al que as linhagens sensíveis. Quando se utilizou solução nutritiva completa, houve detecção de citrato na dose zero de Al, mas o comportamento das linhagens foi semelhante à metodologia anterior. Conclui-se que a exsudação de ácidos orgânicos pode não ser o único mecanismo envolvido na tolerância a alumínio em milho. Outros mecanismos como modificação do pH da rizosfera e proteção contra estresses oxidativos podem estar envolvidos, merecendo maiores estudos. Além disso, deve-se salientar que a utilização de maior número de genótipos, com diferente “back

ground” genético é de grande importância para esclarecer a ocorrência de diferentes mecanismos de tolerância dentro da mesma espécie.

## Conclusões

A exsudação de citrato e malato não é o único mecanismo envolvido na tolerância a alumínio em milho.

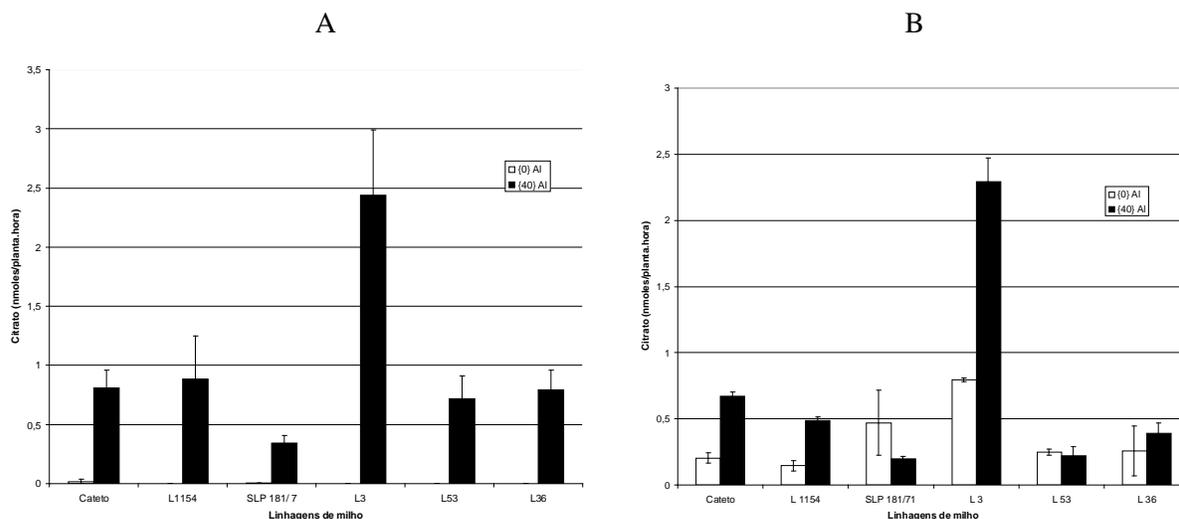


Figura 2. Exsudação de citrato por linhagens de milho em solução de 4,3 mM de Al (A) e solução nutritiva completa (B) na presença de 0 e 40 μM de alumínio.

## Referências bibliográficas

- CAMPBELL, T.A. Magnetic resonance imaging of absorbed aluminum in alfalfa roots. *J. Plant Nutr.*, 22:827-834, 1999.
- DEGENHARDT, J.; LARSEN, P.B.; HOWELL, S.H.; KOCHIAN, L.V. Aluminum resistance in the *Arabidopsis* mutant alr-104 is caused by an aluminum – induced increase in rhizosphere pH. *Plant Physiol.*, 117:19-27, 1998.
- JORGE, R.A.; ARRUDA, P. Aluminum induced organic acids exudation by roots of an aluminum – tolerant tropical maize. *Phytochemistry*, 45:675-681, 1997.
- MAGNAVACA, R. Genetic variability and the inheritance of aluminum tolerance in maize (*Zea mays* L). Lincoln/Nebraska, 1982. (tese de PhD).
- KOCHIAN, L.V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 46: 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 transitional zone, Is reduced basipetal auxin flow involved in inhibition of root elongation by aluminium? *Plant Physiol.*, 122: 945-956, 2000.
- PARKER, D.R.; PEDLER, J.F. Probing the “malate hypothesis” of differential aluminum tolerance in wheat by using other rhizotoxic ions as proxies for Al. *Planta*, 205:389-396, 1998.
- PELLET, D.M.; GRUNES, L.G.; KOCHIAN, L.V. Organic acid exudation as a aluminum – tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). *Planta*, 196:788-795, 1995.
- RYAN, P.R.; DELHAIZE, E.; RANDALL, P.J. Characterization of Al-stimulated efflux of malate from the apices of Al-tolerant wheat roots. *Planta*, 196:103-110, 1995.