



RUY RAPOSEIRAS<sup>1</sup>, ISABEL R.P. DE SOUZA<sup>2</sup>, VERA M.C.ALVES<sup>2</sup>, HÉLIO T. PRATES<sup>2</sup>, PAULO C. MAGALHÃES<sup>2</sup> E ROBERT E.SCHAFFERT<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bolsista recém-mestre McKnight. Foundation, <sup>2</sup>Embrapa Milho e Sorgo, CP 151, 35701-970, Sete Lagoas, MG - isabel@cnpms.embrapa.br

Suporte financeiro: McKnight Foundation

### Introdução

O Brasil encontra-se entre os três primeiros produtores mundiais de milho, com uma produção média de 47 milhões de toneladas na safra de 2002/2003 (CONAB, 2004). A maior parte desta produção concentra-se nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, correspondendo a 93% do total produzido no país (IBGE, 2002). Nas décadas de 80 e 90, a produtividade agrícola, principalmente de milho e soja, sofreu um forte impulso com a incorporação da fronteira agrícola do Cerrado. O Cerrado é formado por solos que apresentam limitações de natureza química à produção agrícola, dentre estas tem-se elevada acidez e toxidez de alumínio (Al). Portanto, a utilização de práticas de calagem e adubações adequadas, em conjunto com o uso de genótipos mais adaptados a estas condições, são formas necessárias para a exploração racional do Cerrado. Os mecanismos de tolerância ao Al propostos na literatura podem ser classificados em mecanismos de exclusão e mecanismos de tolerância interna (Taylor, 1991). 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 (Zheng et al., 1998). Tem sido sugerido que compostos fenólicos atuam em ambos, devido a sua capacidade de complexar metais como o alumínio e também por agir como um forte antioxidante em resposta a estresses abióticos. Fenólicos são compostos orgânicos que contêm um ou mais anéis aromáticos hidroxilados, incluindo alcalóides, flavonóides, terpenóides e glicosídeos. (Kochian et al., 2004). Alguns destes fenólicos tem sido encontrados como componentes da parede celular de várias monocotiledôneas (Harris e Harley, 1976; Shibuya, 1984). Em milho, Kidd et al (2001) sugeriram que a exsudação de fenólicos ativada por alumínio teve um papel importante na detoxificação de alumínio em ápices de raízes. Em algumas espécies lenhosas a tolerância ao alumínio foi correlacionada com uma maior concentração de compostos fenólicos solúveis nas raízes, por complexar fortemente o Al a pH neutro, detoxificando íons Al no citoplasma (Ofei-Manu et al., 2001). O objetivo deste trabalho foi identificar diferenças entre genótipos contrastantes quanto à tolerância ao alumínio, em relação a fenólicos solúveis totais e ligados à parede celular sob toxidez de alumínio.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### Genótipos contrastantes

Foram utilizadas duas linhagens de milho provenientes do programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo (CNPMS / EMBRAPA), Sete Lagoas/MG, previamente caracterizadas quanto à tolerância ao Al: Cateto 237 - tolerante e L53 – sensível (Alves et al., 2001).

### Desinfecção e germinação das sementes

As sementes foram desinfectadas por 10 min em hipoclorito de sódio a 0,5%, imediatamente lavadas em água destilada e colocadas para germinar em papel de germinação umedecido, permanecendo em câmara de crescimento com temperatura diurna de 27°C e noturna de 20°C, luminosidade de 540  $\mu\text{molm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , umidade relativa de 70% e fotoperíodo de 12h.

### Tratamentos

Quatro dias após, as plântulas foram selecionadas, transplantadas e dispostas em bandejas contendo solução nutritiva completa (Magnavaca, 1982), pH 4,2, sob aeração constante, onde as plântulas permaneceram por 24 horas. Após este período, as plântulas foram expostas à mesma solução nutritiva completa, na ausência de Al (tempo de 0h) e na presença de Al ( $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ ) na atividade de 39  $\mu\text{M}$  (tempo de 12, 24, 48 e 72 h). Ao final do experimento foi coletado o primeiro centímetro do ápice da raiz seminal de cada plântula, o qual foi lavado em água destilada, acondicionado em papel alumínio, imerso em nitrogênio líquido e armazenado a  $-80^\circ\text{C}$ .

### Delineamento experimental

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 4 repetições. O delineamento foi composto por 2 linhagens x 1 dose de Al x 5 períodos de exposição ao Al.

### Extração e quantificação dos ácidos fenólicos da parede celular

Foram utilizados 150 mg de ápices por tratamento por repetição para a extração de parede celular de acordo com o protocolo descrito por Souza et al. (2002) e toda a parede celular obtida foi utilizada no processo para liberação dos ácidos, os quais foram ressuspensos em 300  $\mu\text{L}$  de metanol 50%. A quantificação dos ácidos ferúlico, 5-5`diferúlico e cumárico foi realizada em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou HPLC) de acordo com o protocolo descrito por (Prates et al, 2002), tendo como padrões os ácidos ferúlico e o cumárico (Sigma-Aldrich Química, St. Louie, MO, EUA), disponíveis comercialmente, e o 5-5'diferúlico gentilmente fornecido pelo Dr. John Ralph do Departamento de Floresta da Universidade de Wisconsin-Madison, EUA.

### Quantificação de fenólicos solúveis totais

Cento e cinquenta miligramas de ápices de raiz foram macerados utilizando-se nitrogênio líquido e adicionando-se 1ml de HCl 1% em metanol, seguindo-se a metodologia Azul da Prússia, como descrito por Magalhães et al. (1997) com algumas modificações.

Construiu-se uma curva padrão utilizando-se o ácido ferúlico e leitura da absorvância a  $A_{720\text{ nm}}$ .

## **Resultados e Discussão**

Pela análise de variância-ANOVA (dados não mostrados), a interação linhagem\*tempo foi significativa a 1% para fenólicos totais, ácidos ferúlico e 5-5' diferúlico e significativa a 5% para o ácido cumárico. O desdobramento de tempo dentro de cada linhagem mostrou variações nas concentrações desses ácidos ao longo do tempo para Cateto 237 (tolerante) e L53 (sensível). Exceção feita para a concentração de fenólicos totais nas raízes da linhagem Cateto 237, cujo nível se manteve aproximadamente constante nos diferentes tempos de exposição ao alumínio (Figura 1). A linhagem L53, ao contrário, apresentou decréscimo significativo na concentração de fenólicos totais com o aumento do tempo de exposição ao alumínio. Compostos fenólicos tem várias funções importantes e estão amplamente distribuídos por toda a planta. Alguns deles tem sido descritos como capazes de se ligarem à íons Al mesmo sob condições de acidez (Tam & McColl, 1990). Wagatsuma et al. (2001) observaram uma melhora no crescimento de plantas em meio contendo Al em pH 4,8, quando diferentes compostos fenólicos foram adicionados ao meio. Ofei-Manu et al. (2001) verificaram correlação positiva e significativa entre tolerância ao Al e compostos fenólicos de raízes em algumas espécies arbóreas. Em relação ao tempo zero de exposição ao alumínio, a linhagem Cateto 237 apresentou elevação nas concentrações dos ácidos cumárico, ferúlico e 5-5' diferúlico, mantendo-os praticamente constantes durante os demais tempos de exposição (12 a 72 h) (Figuras 2, 3 e 4). A linhagem L53 apresentou decréscimo nas concentrações do ácido 5-5' diferúlico, enquanto para os ácidos ferúlico e cumárico, após haver redução nas concentrações até 24 h de exposição ao Al as mesmas voltaram a aumentar. Os resultados observados na L 53 podem estar relacionados a um espessamento da raiz em função da paralisação do crescimento radicular. Linhagens sensíveis de milho sob toxidez de Al (dados não mostrados) apresentaram redução no comprimento da raiz seminal, após 24 h de exposição a este elemento. Sugere-se que a paralisação do crescimento radicular na linhagem sensível esteja associada ao aumento na concentração dos ácidos ferúlicos e *p*-cumárico por meio da lignificação, a qual é considerada como fator responsável pela rigidez mecânica da parede celular (Fry, 1979). El-Basyouni & Towers (1964) relatam que os ácidos ferúlicos são precursores da biossíntese de lignina. Em gramíneas, ácidos ferúlico e *p*-cumárico são encontrados como componentes da hemicelulose e ligados a parte central da lignina na parede celular. Os resultados obtidos sugerem que os fenólicos possam ter participação nos mecanismos de tolerância ao alumínio em milho, considerando-se que a linhagem Cateto 237-tolerante foi capaz de manter a concentração de fenólicos totais, associada ao aumento nas concentrações dos ácidos *p*-cumárico, ferúlico e 5-5' diferúlico, na parede celular, sob toxidez de Al.

#### **LITERATURA CITADA**

Alves, V.M.C.; MAGALHÃES J.V.; SHAFF, J.E.; PIÑEROS, M.A.; PURCINO, 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. Caderno de Resumos do VIII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, Ilhéus – Bahia, 2 a 7 Setembro de 2001, 163 pp.

CONAB. Terceiro levantamento da safra agrícola 2003/2004 – Fevereiro/2004.

EL-BASYOUNI, S. and TOWERS, G.H.N. (1964). The phenolic acids in wheat. Changes during growth and development. Can. J. Biochem. 42, 203-210.

FRY, S.C. 1979. Phenolic components of the primary cell wall and their possible role in the hormonal regulation of growth. *Planta*. 145: 343-351.

HARRIS, P.J.; HARTLEY, R. D. Detection of bound ferulic acid in the cell walls of the Gramineae by ultraviolet fluorescence microscopy. *Nature* 259: 508-510, 1976

IBGE. Sistema IBGE de recuperação automática-SIDRA. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 12/03/2002.

KIDD, P.S., POSCHENRIEDER, C. and BARCELÓ, J. Does root exudation of phenolics play a role in aluminum resistance in maize (*Zea mays* L.). *Plant Nutrition. Food security and sustainability of agro-ecosystems*. 504-505, 2001.

KOCHIAN, L.V.; HOEKENGA, O.A.; PIÑEROS, M.A. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorus efficiency. *Annual Review of Plant Biology* 55: 459-493, 2004.

MAGALHÃES, P.C., RODRIGUES, W.A, DURÃES, F.O.M. Tanino no grão de sorgo. Bases fisiológicas e métodos de determinação. *Circular Técnica*. N.27, p.13-14, 1997.

MAGNAVACA, R. Genetic variability and the inheritance of aluminum tolerance in maize (*Zea mays* L.). 1982. Thesis (PhD)-Lincoln, Nebraska.

OFEI-MANU, P.; WAGATSUMA, T.; ISHIKAWA, S.; TAWARAYA, K. The plasma membrane strength of the root-tip cells and root phenolic compounds are correlated with Al tolerance in several common woody plants. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 47:359-375, 2001.

PRATES, H.T., SOUZA, I.R.P., PIRES, N.M., LOPES, M.J.C., NAVES, F.O. e TEIXEIRA, C. Quantificação dos ácidos ferúlico e 5-5' diferúlico de parede celular de milho. *Caderno de Resumos do XXIV Congresso Nacional de Milho e Sorgo*, Florianópolis-SC, 1 a 5 de setembro de 2002.

SHIBUYA, N. Phenolic acids and their carbohydrate esters in rice endosperm cell walls. *Phytochemistry*, 23: 2333-2237, 1984.

SOUZA, I.R.P., PRATES, H.T., LOPES, M. J. C., PIRES, N. M., NAVES, F.O., TEIXEIRA, C.

Ajuste de Metodologia de Extração de Parede Celular e de Libertação de Ácidos Fenólicos para Quantificação por HPLC. XXIV Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 01 a 05 de setembro de 2002 - Florianópolis – SC

TAM, S.C. and McColl, J.G. 1990. Aluminum and calcium-binding affinities of some organic ligands in acidic conditions. *J. Environ. Qual.*, 19, 514-520.

TAYLOR, G.J. Overcoming barriers to understanding the cellular basis of aluminium resistance. *Plant Soil*, 171:89-103, 1991.

WAGATSUMA, T., ISHIKAWA, S., AKIMOTO, T., TAWARAYA, K., and OFEIMANU, P. 2001. Mechanisms of higher tolerance of Al stress in phosphorus-deficient maize seedling; the significance of phenolics in Al resistance. *In Proceedings of XIV International Plant Nutrition Colloquium*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, in press.

ZHENG, S.J.; MA, J.F.; MATSUMOTO, H. High aluminum resistance in buckwheat. I. Al – induced specific secretion of oxalic acid from root tips. *Plant Physiol.*, 117: 457 – 751, 1998.

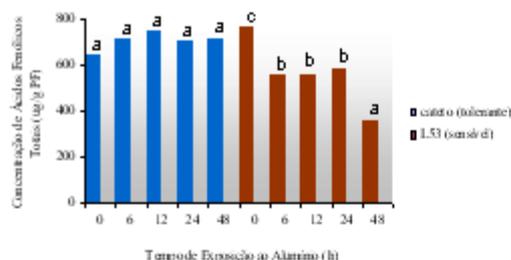


FIGURA 1. Concentração de fenólicos solúveis totais em raízes de linhagens de milho, Cateto Al 237 (tolerante) e L53 (sensível) submetidas a diferentes períodos de exposição a 39 µM de alumínio. Teste de Student a 5%, para desdobramento de tempo dentro de cada genótipo.

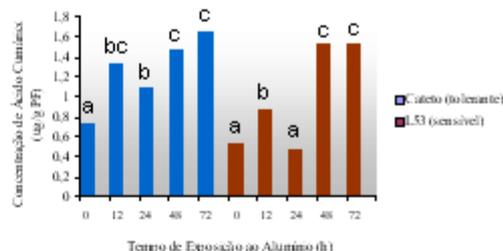


FIGURA 2. Concentração de ácido cumárico em raízes de linhagens de milho, Cateto Al 237 (tolerante) e L53 (sensível) submetidas a diferentes períodos de exposição a 39 µM de alumínio. Teste de Student a 5%, para desdobramento de tempo dentro de cada genótipo.

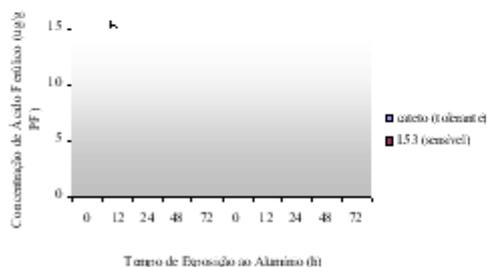


FIGURA 3. Concentração de ácido ferúlico em raízes de linhagens de milho, Cateto Al 237 (tolerante) e L53 (sensível) submetidas a diferentes períodos de exposição a 39 µM de alumínio. Teste de Student a 5%, para desdobramento de tempo dentro de cada genótipo.

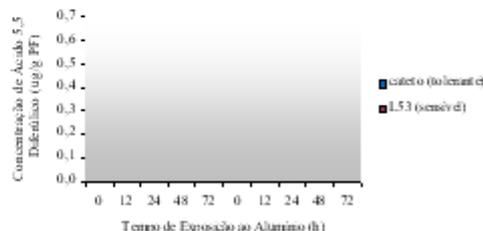


FIGURA 4. Concentração de ácido 5,5 diferúlico em raízes de linhagens de milho, Cateto Al 237 (tolerante) e L53 (sensível) submetidas a diferentes períodos de exposição a 39 µM de alumínio. Teste de Student a 5%, para desdobramento de tempo dentro de cada genótipo.

