

206

# Circular Técnica

Sete Lagoas, MG  
Dezembro, 2014

**Ubiraci Gomes de Paula Lana**  
Químico, D.Sc. em Genética,  
Analista da Embrapa Milho e  
Sorgo, Sete Lagoas, MG, ubiraci.  
lana@embrapa.br

**Lucas Fernandes da Silva**  
Estudante de mestrado da  
Universidade Federal de São João  
del Rei, lucasfernandes\_silva@  
hotmail.com

**Eliane Aparecida Gomes**  
Bióloga, DSc. em Genética,  
Pesquisadora em Microbiologia  
na Embrapa Milho e Sorgo, Sete  
Lagoas, MG, eliane.a.gomes@  
embrapa.br

**Cláudia Teixeira Guimarães**  
Engenheira Agrônoma, D.Sc. em  
Melhoramento Genético Vegetal,  
Pesquisadora da Embrapa Milho e  
Sorgo, Sete Lagoas, MG, claudia.  
guimaraes@embrapa.br

**Jurandir Vieira de Magalhães**  
Engenheiro Agrônomo, Ph.D. em  
Genética Molecular, Pesquisador  
da Embrapa Milho e Sorgo, Sete  
Lagoas, MG, jurandir.magalhaes@  
embrapa.br

**Vera Maria Carvalho Alves**  
Engenheira Agrônoma, Ph.D. em  
Nutrição Mineral, Pesquisadora  
da Embrapa Milho e Sorgo,  
Sete Lagoas, MG, vera.alves@  
embrapa.br

## Metodologia alternativa para quantificação de ácido cítrico em exsudados radiculares de linhagens de milho contrastantes quanto à tolerância ao alumínio

### Introdução

No Brasil, em torno de 127 milhões de hectares disponíveis para a utilização agrícola são compostos por solos ácidos (ROCHA, 1997), em que uma das principais limitações à produção vegetal é a toxidez de alumínio. O ápice radicular é o sítio primário da ação tóxica desse metal, que causa uma drástica inibição do crescimento do sistema radicular, restringindo a absorção de água e nutrientes (KOCHIAN et al., 1995). Vários estudos têm evidenciado a exsudação de ácidos orgânicos pelas raízes como o principal mecanismo de tolerância ao alumínio em espécies como trigo (ácido málico, DELHAIZE et al., 1993a; RYAN et al., 1995a,b; PELLET et al., 1996), milho (ácido cítrico, PELLET et al., 1995; JORGE; ARRUDA, 1997; PIÑEROS et al., 2002), *Arabidopsis thaliana* (ácido málico, HOEKENGA et al., 2003), chá, *Camellia sinensis* L. (ácido oxálico, MORITA et al., 2011) e sorgo (ácido cítrico, KOCHIAN et al., 2002; MAGALHÃES et al., 2007). Ácidos di e tricarboxílicos com massa molecular reduzida são capazes de formar complexos estáveis com o  $Al^{3+}$  presente na rizosfera, reduzindo ou mesmo anulando seus efeitos tóxicos, uma vez que tais complexos são incapazes de atravessar a membrana plasmática (KOCHIAN et al., 2004). Em valores de pH típicos do citosol, os ácidos orgânicos estão presentes em suas formas aniônicas, sendo o citrato capaz de formar complexos mais estáveis com  $Al^{3+}$  em relação ao malato e ao oxalato (MA et al., 2000, 2001).

Estudos genéticos sugerem que a tolerância ao Al em milho é uma característica de herança complexa (MAGNAVACA et al., 1987; PANDEY; GARDNER, 1992), envolvendo provavelmente múltiplos genes e, conseqüentemente, vários mecanismos fisiológicos (NINAMANGO-CÁRDENAS et al., 2003; PIÑEROS et al., 2005; GUIMARÃES et al., 2014). O principal mecanismo de tolerância ao Al em milho foi associado com a exsudação de citrato pela raiz, que tem sido frequentemente detectado pela técnica de eletroforese capilar (PELLET et al., 1995; PIÑEROS et al., 2002, 2005). Embora seja uma técnica bastante versátil, a eletroforese capilar requer que certos tipos de amostras passem por etapas de pré-tratamento antes de serem introduzidas no sistema eletroforético, podendo ocasionar o aumento do tempo de análise, maior risco de contaminação das amostras, perda de precisão das medidas, perda de analitos, além da manipulação indesejável de reagentes e solventes tóxicos (BAKER, 1995; MIRANDA et al., 2002). Na ausência de um equipamento de eletroforese capilar e de outros equipamentos mais sensíveis com o LCMS, uma alternativa para quantificação de ácidos orgânicos seria o uso de ensaios enzimáticos baseados na conversão do ânion citrato em oxaloacetato e acetato pela ação da enzima citrato liase (ANOOP et al., 2003; LIU et al., 2013).

Os objetivos deste trabalho foram padronizar um ensaio enzimático e determinar o teor de ácido cítrico em exsudados radiculares de genótipos de milho contrastantes quanto à tolerância ao alumínio.

## Material e métodos

### Germinação de sementes, coleta e purificação de exsudados radiculares

Sementes das linhagens de milho L53 e Cateto AI237, sensível e tolerante ao alumínio, respectivamente, foram tratadas com solução aquosa de hipoclorito de sódio 0,5% (m/v) por 5 minutos sob agitação constante e lavadas por oito vezes com água deionizada. As sementes foram posicionadas entre duas folhas de papel de germinação umedecidas em água deionizada por um período de quatro dias em câmara de crescimento com temperatura média de  $27 \pm 3$  °C e fotoperíodo de 12 horas. Posteriormente, cinco plântulas foram transferidas para copos plásticos perfurados, que foram acomodados em recipientes com capacidade para 8 litros de solução nutritiva completa (MAGNAVACA et al., 1987) sem alumínio por 24 horas. Em seguida, o copo contendo as plântulas foi transferido para tubo cônico contendo 50 mL contendo solução de  $\text{CaCl}_2$  4,3 mM, pH 4,5 por 30 minutos para lavagem das raízes. Para a coleta dos exsudados, o copo plástico com as plântulas foi transferido para novo tubo cônico contendo 50 mL de  $\text{CaCl}_2$  4,3 mM, pH 4,5, com atividade de  $\{39\} \mu\text{M}$  de Al, sob agitação constante de 50 rpm por um período de 24 horas. A solução foi purificada em coluna aniônica de prata OnGuard® II Ag (Dionex, Sunnyvale, CA) e tratada com 3,75 g de resina catiônica Dowex® 50WX8 (Sigma Aldrich St. Louis, MO) para remoção de íons inorgânicos. Posteriormente, as amostras foram congeladas a  $-80$  °C, liofilizadas e ressuscitadas em 1 mL de água ultrapura. As amostras foram submetidas à sonicação por 30 minutos, purificadas em filtro Millex®GV de  $0,22 \mu\text{m}$  (Millipore, Milford, USA) e armazenadas a  $-20$  °C.

### Quantificação de ácido cítrico por método enzimático baseado em espectrofotometria de absorção molecular UV/VIS

Inicialmente, uma curva padrão foi elaborada com cinco diferentes concentrações de ácido cítrico, variando entre 5 e 25 mg L<sup>-1</sup>, equivalente a 26 e 130  $\mu\text{M}$ , na mesma matriz analítica das amostras. Para avaliar a interferência dos íons da solução nutritiva foi também elaborada uma curva padrão sem a etapa de purificação da matriz com as resinas de troca iônica. A quantificação do ácido orgânico foi realizada com o kit comercial "Citric

Acid Assay Kit" (Megazyme, Wicklow, Ireland), com modificações. As determinações foram realizadas em espectrofotômetro UV/VIS UV-mini 1240 (Shimadzu Corporation, Columbia, MD) a 340 nm. Em uma cubeta de vidro de 1 cm de caminho óptico foram adicionados 1,8 mL de água ultrapura, 200  $\mu\text{L}$  da amostra ou padrão, 500  $\mu\text{L}$  de solução 1 (tampão), 200  $\mu\text{L}$  de solução 2 (NADH) e 20  $\mu\text{L}$  de suspensão 3 (L-malato desidrogenase e D-lactato desidrogenase). A cubeta foi vedada com filme plástico flexível e homogeneizada por inversão por dez vezes. A primeira leitura no espectrofotômetro (A1) foi realizada após incubação das amostras por 4 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  da solução 4 (citrato liase). A cubeta foi novamente vedada com filme plástico flexível e homogeneizada por inversão por dez vezes. A segunda leitura (A2) foi realizada após incubação das amostras por 5 minutos em temperatura ambiente. Uma amostra em branco contendo água ultrapura em substituição à amostra também foi realizada. Para quantificação do ácido cítrico, foi calculada a diferença de absorbâncias (A1 - A2) e subtraída a diferença da amostra em branco. Aos dados de absorbância obtidos foi ajustado um modelo de regressão linear simples, e como critério de aceitação foi adotado um coeficiente de correlação ( $R^2$ ) maior ou igual a 0,99.

## Resultados e discussão

O kit enzimático avaliado é recomendado, principalmente, para determinação de ácido cítrico em alimentos e bebidas, em que os níveis são elevados (Megazyme, Wicklow, Ireland). Apesar disso, o método enzimático apresentou linearidade no intervalo de concentração de 0 a 25 mg L<sup>-1</sup> de ácido cítrico, incluindo a etapa de purificação da matriz com as resinas de troca iônica, com valor de  $R^2$  igual a 0,9952 (Figura 1).

Esse comportamento não foi verificado na curva padrão elaborada sem a etapa de purificação com as resinas, indicando que a elevada concentração de cátions e ânions inorgânicos provenientes da solução nutritiva após a liofilização interfere na quantificação do ácido cítrico (dados não mostrados).

O ensaio enzimático para determinação de ácido cítrico é baseado na conversão do ânion citrato em

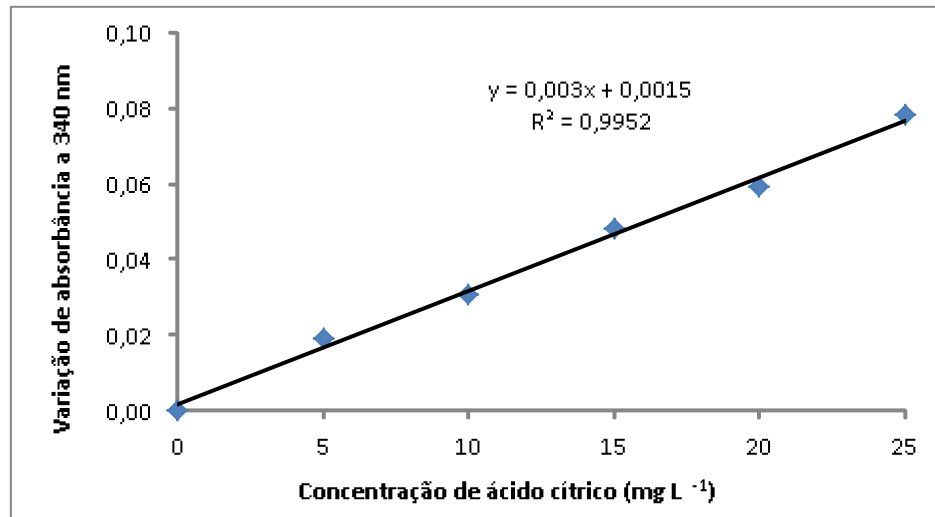


Figura 1. Curva padrão obtida para os valores de absorbância em função da quantidade de ácido cítrico (0 a 25 mg.L<sup>-1</sup>).

oxaloacetato e acetato pela ação da enzima citrato liase (CL). Em seguida, o oxaloacetato é convertido em L-malato e NAD<sup>+</sup>, na presença de NADH e da enzima L-malato desidrogenase (L-MDH). Entretanto, se a enzima oxaloacetato descarboxilase estiver presente na amostra, o produto oxaloacetato será convertido em piruvato. Assim, para assegurar que a determinação de ácido cítrico seja quantitativa, a enzima D-lactato desidrogenase (D-LDH) é utilizada para conversão de piruvato em D-lactato e NAD<sup>+</sup>. A quantidade de NAD<sup>+</sup> formada nas reações acima será diretamente proporcional à concentração de ácido cítrico. O consumo de NADH é medido pela diminuição da absorbância no comprimento de onda de 340 nm (DAGLEY, 1974; MOLLERING, 1989; DELHAIZE et al., 1993b).

Com base na curva padrão, determinou-se que a concentração de ácido cítrico nos exsudados da linhagem L53 foi igual a 8,36 mg L<sup>-1</sup>, enquanto o Cateto Al237 apresentou a concentração de 13,83 mg L<sup>-1</sup>, portanto dentro do intervalo de concentração da curva. Considerando que a massa molar do ácido cítrico é de 192,123 g mol<sup>-1</sup>, essas concentrações equivalem a 43,5 e 72,0 μM, respectivamente. Como as amostras foram concentradas 50 vezes antes da análise, a concentração dos exsudados de cinco plantas no período de 24 h foi igual a 0,87 μM para L53 e 1,44 μM para o Cateto Al237. Assim, a taxa de exsudação da linhagem L53 foi igual a 363 pmol planta<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, enquanto para o Cateto Al237 foi igual a 600 pmol planta<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Apesar da maior sensibilidade da eletroforese capilar em relação aos

métodos enzimáticos (JORGE; ARRUDA, 1997; PIÑEROS et al., 2005), os níveis de exsudação de ácido cítrico em milho detectados neste trabalho foram similares aos relatados em outros estudos baseados na quantificação por eletroforese capilar (PIÑEROS et al., 2002, 2005). Assim, a metodologia proposta poderá ser utilizada na caracterização do padrão de exsudação de ácido cítrico nas raízes de genótipos contrastantes de milho quanto à tolerância ao Al.

## Conclusão

A metodologia em estudo demonstrou-se apropriada para a quantificação de ácido cítrico em exsudados radiculares, permitindo sua detecção mesmo no genótipo de milho sensível ao alumínio que apresenta baixos níveis de exsudação. Esta metodologia poderá auxiliar nos estudos fisiológicos e moleculares com objetivo de investigar mais detalhadamente os mecanismos de tolerância ao alumínio baseados na exsudação de ácidos orgânicos em milho.

## Referências

ANOOP, V. M.; BASU, U.; McCAMMON, M. T.; McALISTER-HENN, L.; TAYLOR, G. J. Modulation of citrate metabolism alters aluminum tolerance in yeast and transgenic canola overexpressing a mitochondrial citrate synthase. *Plant Physiology*, Minneapolis, v. 13, p. 2205-2217, 2003.

- BAKER, D. R. **Capillary electrophoresis**. New York: John Wiley & Sons, 1995.
- DAGLEY, S. Citrate: UV spectrophotometric determination. In: BERGMAYER, H. U. (Ed.). **Methods of enzymatic analysis**. New York: Academic Press, 1974. v. 3, p. 1562-1565.
- 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**, Minneapolis, v. 103, p. 685-693, 1993a.
- DELHAIZE, E.; RYAN, P. R.; RANDALL, P. J. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 103, p. 695-702, 1993b.
- GUIMARAES, C. T.; SIMOES, C. C.; PASTINA, M. M.; MARON, L. G.; MAGALHAES, J. V.; VASCONCELLOS, R. C. C.; GUIMARAES, L. J. M.; LANA, U. G. de P.; TINOCO, C. F. S.; NODA, R. W.; BELICUAS, S. N. J.; KOCHIAN, L. V.; ALVES, V. M. C.; PARENTONI, S. N. Genetic dissection of Al tolerance QTLs in the maize genome by high density SNP scan. **BMC Genomics**, v. 15, n. 153, p. 1-14, 2014.
- JORGE, R.; ARRUDA, P. Aluminum-induced organic acid exudation by roots of an aluminum-tolerant tropical maize. **Phytochemistry**, New York, v. 45, p. 675-681, 1997.
- HOEKENGA, O. A.; VISION, T. J.; SHAFF, J. E.; MONFORTE, A. J.; LEE, G. P.; HOWELL, S. H.; KOCHIAN, L. V. Identification and characterization of aluminum tolerance loci in *Arabidopsis* (*Landsberg erecta* × *Columbia*) by quantitative trait locus mapping: a physiologically simple but genetically complex trait. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 132, p. 936-948, 2003.
- 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.; PENCE, N. S.; LETHAM, D. L.; PINEROS, M. A.; MAGALHAES, J. V.; HOEKENGA, O. A.; GARVIN, D. F. Mechanisms of metal resistance in plants: aluminum and heavy metals. **Plant and Soil**, The Hague, v. 247, p. 109-119, 2002.
- KOCHIAN, L. V.; HOEKENGA, O. A.; PINEROS, 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.
- LIU, M. Y.; CHEN, W. W.; XU, J. M.; FAN, W.; YANG, J. The role of *VuMATE1* expression in aluminium-inducible citrate secretion in rice bean (*Vigna umbellata*) roots **Journal of Experimental Botany**, London, v. 64, p. 1795-1804, 2013.
- MA, J. F. Role of organic acids in detoxification of Al in higher plants. **Plant Cell Physiology**, Minneapolis, v. 44, p. 482-488, 2000.
- MA, J. F.; RYAN, P. R.; DELHAIZE, E. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 6, p. 273-278, 2001.
- MAGALHÃES, J. V.; LIU, J.; GUIMARÃES, C. T.; LANA, U. G. P.; ALVES, V. M. C.; WANG, Y.; SCHAFFERT, R. E.; HOEKENGA, O. A.; PIÑEROS, M. A.; SHAFF, J. E.; KLEIN, P. E.; CARNEIRO, N. P.; COELHO, C. M.; TRICK, H. N.; KOCHIAN, L. V. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. **Nature Genetics**, New York, v. 39, p. 1156-1161, 2007.
- MAGNAVACA, R.; GARDNER, C. O. E.; CLARK, R. B. Inheritance of aluminium tolerance in maize. In: GABELMAN, H. W.; LOUGHMAN, B. C. (Ed.). **Genetic aspects of plant mineral nutrition**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. p. 201-212.
- MIRANDA, C. E. S.; CARRILHO, E.; GERVASIO, A. P.; GINE, M. F. Sistemas interfaceados de análise por injeção em fluxo e eletroforese capilar (FIA - CE): desafios, aplicações e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, p. 412-419, 2002.

MOLLERING, H. Citrate. In: BERGMEYER, H. U. (Ed.). **Methods of enzymatic analysis**. 3rd ed. Cambridge: VCH Publishers, 1989. v. 7, p. 2-12.

MORITA, A.; YANAGISAWA, O.; MAEDA, S.; TAKATSU, S.; ANDIKKA, T. Teaplant(*Camellia sinensis* L.) roots secrete oxalic acid and caffeine into medium containing aluminium. **Soil Science Plant Nutrition**, Tokyo, v. 57, p. 796-802, 2011.

NINAMANGO-CÁRDENAS, F. E.; GUIMARÃES, C. T.; MARTINS, P. R.; PARENTONI, S. N.; CARNEIRO, N. P.; PAIVA, E. Mapping QTLs for aluminum tolerance in maize. **Euphytica**, Wageningen, v. 130, p. 223-232, 2003.

PANDEY, S.; GARDNER, C. O. Recurrent selection for population, variety, and hybrid improvement in tropical maize. **Advances in Agronomy**, New York, v. 48, p. 1-87, 1992.

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

PELLET, D. M.; PAPERNIK, L. A.; KOCHIAN, L. V. Multiple aluminum-resistance mechanisms in wheat: roles of root apical phosphate and malate exudation. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 112, p. 591-597, 1996.

PIÑEROS, M.; MAGALHAES, J.; CARVALHO-ALVES, V. M.; KOCHIAN, L. V. The physiology and biophysics of an aluminum tolerance mechanism based on root citrate exudation in maize. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 29, p. 1194-1206, 2002.

PIÑEROS, M. A.; SHAFF, J. E.; MANSLANK, H. S.; CARVALHO-ALVES, V. M.; KOCHIAN, L. V. Aluminum resistance in maize cannot be solely explained by root organic acid exudation: a comparative physiological study. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 137, p. 231-241, 2005.

ROCHA, C. M. C. A região dos cerrados e as pesquisas desenvolvidas pela Embrapa Cerrados. In: SIMPÓSIO SOBRE OS CERRADOS DO MEIO NORTE, 1., 1997, Teresina. **Anais...Teresina: EMBRAPA-CPAMN**, 1997. p. 57-80.

RYAN, P. R.; DELHAIZE, E.; RANDALL, P. J. Characterization of Al-stimulated efflux of malate from the apices of Al-tolerant wheat roots. **Planta**, Berlin, v. 196, p. 103-110, 1995a.

RYAN, P. R.; DELHAIZE, E.; RANDALL, P. J. Malate efflux from root apices and tolerance to aluminum are highly correlated in wheat. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 22, p. 531-536, 1995b.

### Circular Técnica, 206

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
**Embrapa Milho e Sorgo**  
**Endereço:** Rod. MG 424 km 45 Caixa Postal 151  
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG  
**Fone:** (31) 3027 1100  
**Fax:** (31) 3027 1188  
**E-mail:** www.embrapa.br/fale-conosco/sac  
1ª edição  
1ª impressão (2014): on line

Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento

GOVERNO FEDERAL  
**BRASIL**  
PÁTRIA EDUCADORA

### Comitê de publicações

**Presidente:** Sidney Netto Parentoni  
**Secretário-Executivo:** Elena Charlotte Landau  
**Membros:** Antonio Claudio da Silva Barros, Dagma Dionísia da Silva, Maria Marta Pastina, Monica Matoso Campanha, Paulo Eduardo de Aquino Ribeiro e Rosângela Lacerda de Castro

### Expediente

**Revisão de texto:** Antonio Claudio da Silva Barros  
**Normalização Bibliográfica:** Rosângela Lacerda de Castro  
**Tratamento das ilustrações:** Alexandre Esteves  
**Edição eletrônica:** Alexandre Esteves