

## Exsudação de Citrato e Tolerância ao Alumínio em Sorgo

VERA ALVES<sup>1</sup>, JURANDIR V. DE MAGALHÃES<sup>1</sup>, JON SHAFF<sup>2</sup>, ROBERT E. SCHAFFERT<sup>1</sup>, CLÁUDIA T. GUIMARÃES<sup>1</sup> E LEON V. KOCHIAN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, CEP 35.701-970, Sete Lagoas, MG, (31)37791057, E-mail: [vera@cnpms.embrapa.br](mailto:vera@cnpms.embrapa.br), <sup>2</sup>US Plant, Soil and Nutrition Laboratory, USDA/ARS

Adaptação a solos ácidos, ácidos orgânicos, mecanismos de tolerância ao alumínio

### INTRODUÇÃO

O primeiro sintoma de toxidez de Al (Al) é a inibição do crescimento radicular, o qual ocorre cerca de 1-2 h após a exposição a Al, sendo o ápice radicular o sítio primário da ação fitotóxica do Al. Os mecanismos de tolerância ao Al propostos na literatura podem ser classificados em mecanismos de exclusão e mecanismos de tolerância interna. Os mecanismos de exclusão previnem o Al de atravessar a membrana plasmática e penetrar no simplasto, enquanto os mecanismos de tolerância interna, por sua vez, imobilizam, compartimentalizam ou detoxificam o Al que penetrou no simplasto. Os mecanismos de exclusão propostos na literatura incluem a ligação do Al na parede celular, a modulação do pH da rizosfera, e a exsudação pelas raízes de compostos que formam quelatos com o Al, dentre outros. Tem sido sugerido que os ácidos orgânicos atuam em ambos os mecanismos, na exclusão, via quelação do Al no apoplasto e na rizosfera, e na detoxificação do Al simplástico, onde ácidos orgânicos podem quelar Al e reduzir e/ou prevenir o seu efeito tóxico a nível celular. O objetivo deste trabalho foi o de estudar a exsudação de ácido cítrico pela raiz como mecanismo de tolerância ao Al em sorgo.

### MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas duas linhagens semi-isogênicas de sorgo, ATF 10B, tolerante ao alumínio e ATF 8B, sensível, provenientes do Programa de Melhoramento de Sorgo da Embrapa Milho e Sorgo. Em todos os experimentos utilizou-se a mesma metodologia para o crescimento das plântulas. As sementes de cada genótipo foram desinfetadas com hipoclorito de sódio 10% por 15 min, lavadas com água ultrapura 8 vezes e colocadas para germinar em caixas de acrílico entre duas folhas de papel de filtro umedecida, durante 3 dias a 26°C. A seguir as plântulas de cada genótipo foram transplantadas para bandejas de 8 L contendo solução nutritiva de Magnavaca (1982), pH 4.0, onde permaneceram por 24 horas em câmara de crescimento. Os tratamentos com Al foram iniciados a partir de 24h de crescimento, momento em que efetuou-se a troca de solução por outra de constituição idêntica mas contendo Al na forma de  $AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ . O período de tratamento e as atividades de alumínio na solução variaram de acordo com os objetivos de cada experimento, sendo que o programa GEOCHEM-PC foi utilizado para se estimar as atividades desejadas de Al.

O crescimento da raiz seminal das linhagens de sorgo ATF10B e ATF8B foi avaliado diariamente nas atividades de 0 e 27  $\mu M$  de alumínio. O comprimento da raiz seminal foi medido com uma régua imediatamente antes da aplicação dos tratamentos com Al e diariamente, durante 6 dias.

A relação entre exsudação de ácidos orgânicos e tolerância a Al em sorgo foi avaliada utilizando-se duas metodologias diferentes. No primeiro experimento avaliou-

se a exsudação de ácidos orgânicos apenas no primeiro centímetro da raiz seminal. Foram avaliadas as linhagens ATF 10B e ATF 8B em quatro atividades de Al (0, 11, 27 e 39 $\mu$ M) e em três tempos de exposição (1, 3 e 6 dias). Após o crescimento das plântulas e aplicação dos tratamentos, como descrito anteriormente, as plântulas foram transferidas por 1 hora, para solução de 4,3 mM de CaCl<sub>2</sub> pH 4,5, sendo o Al adicionado na forma de AlCl<sub>3</sub>, de acordo com as atividades estudadas, com o objetivo de lavagem e condicionamento do sistema radicular. Após esse período, foram confeccionados rolos com papel de filtro umedecido com a mesma solução de condicionamento das raízes, contendo dez plântulas cada um, sendo que cerca de 1,5 cm do ápice radicular ficaram descobertos. Cada rolo foi recoberto com uma tira de lâmina plástica e acondicionado em compartimentos de placas de cultura contendo 4 ml da mesma solução de lavagem. O exsudato radicular proveniente do primeiro centímetro da raiz seminal foi coletado por um período de seis horas, após o qual a solução de coleta foi passada por resina de prata (Dionex on GuardIIAg), para retirada do cloro, e em resina catiônica para retirada do cálcio e do alumínio. A seguir 1ml de cada amostra foi congelado e liofilizado. As amostras foram ressuspensas em 0,2 ml de água ultra pura e analisadas em aparelho de eletroforese capilar utilizando-se tampão pH 8,2 (dodeciltrimetilamonio-DOTAB, ácido salicílico e TRIS).

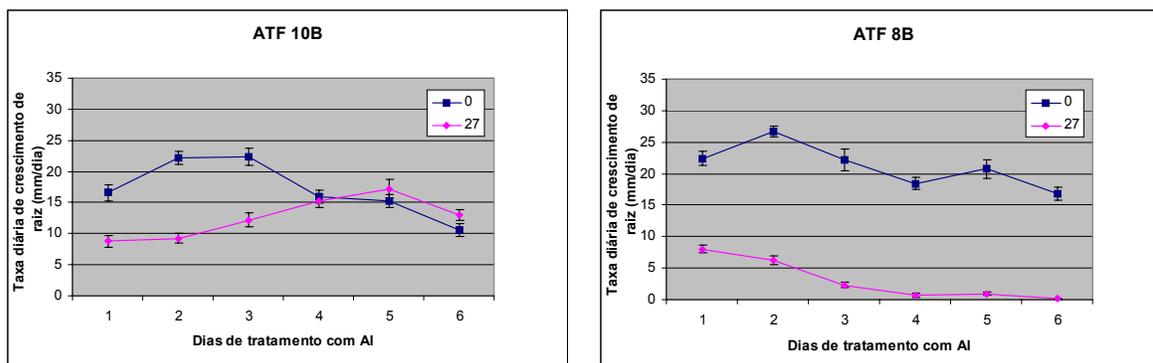
No segundo experimento, a exsudação de ácidos orgânicos foi avaliada no sistema radicular total, utilizando-se as mesmas linhagens, e avaliando-se as atividades de 0 e 27 $\mu$ M de Al nos tempos de exposição de 1, 3 e 6 dias. Uma hora antes da coleta de exsudato as plântulas foram transferidas para solução composta de 4,3 mM de CaCl<sub>2</sub> pH 4,5, sendo o Al adicionado na forma de AlCl<sub>3</sub>, de acordo com as atividades estudadas. Para a coleta de exsudato, foram utilizados tubos de plástico contendo 45ml das mesmas soluções. O exsudato foi coletado durante 6 horas, sendo que a metodologia de concentração e análise foi a mesma utilizada no experimento de coleta em ápices radiculares.

Para se avaliar por quanto tempo a taxa de exsudação de citrato se mantém constante após o término do período de exposição ao Al, após 24 horas de tratamento com 27  $\mu$ M de atividade de Al, as plântulas foram transferidas para solução 4,3 mM de CaCl<sub>2</sub> pH 4,5, porém sem Al, sendo assim feita a coleta do exsudato do ápice radicular da ATF 10B .

O conteúdo de citrato nos primeiros 50 mm das raízes seminais das duas linhagens semi-isogênicas de sorgo, ATF 10B – tolerante ao alumínio e ATF 8B – sensível, foi avaliado após um, três e seis dias de exposição a 0 e 27 $\mu$ M de atividade de Al.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A linhagem ATF8B apresentou redução acentuada na taxa de crescimento da raiz seminal após apenas 24 h de exposição a 27 $\mu$ M de atividade de Al (Figura 1). Decorridos quatro dias da aplicação do tratamento com Al, o crescimento radicular desta linhagem foi praticamente paralisado, o que comprova sua grande sensibilidade ao Al. Por outro lado, a linhagem ATF10B apresentou redução menos acentuada na taxa de crescimento radicular que aquela observada em ATF8B, nas primeiras 24 horas de exposição ao Al. A partir de 48h, verificou-se um aumento na taxa de crescimento radicular do tratamento com 27 $\mu$ M de atividade de Al em relação ao tratamento controle, sendo que após 4 dias de tratamento com Al, não houve diferença entre as taxas de crescimento com e sem Al. Isso demonstra haver um claro componente de indução na tolerância ao Al na linhagem ATF10B.



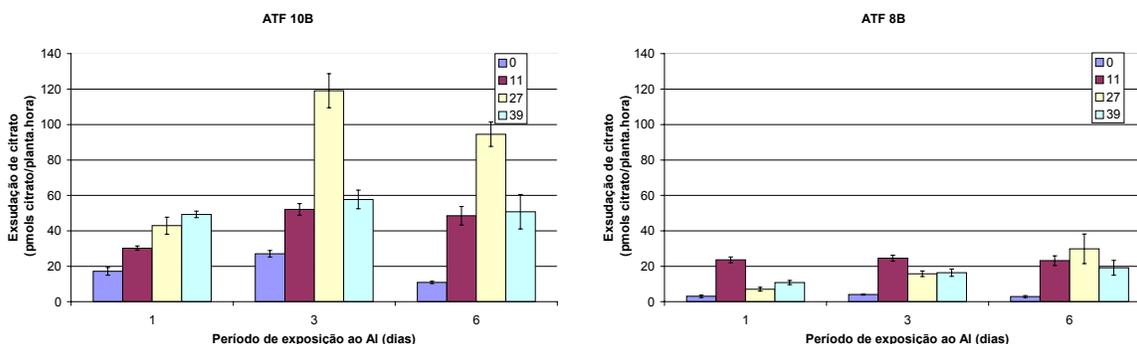
**Figura 1.** Taxa diária de crescimento de raiz de duas linhagens semi-isogênicas de sorgo, ATF 10B – tolerante ao alumínio e ATF 8B – sensível, em duas atividades de alumínio (0 e 27 $\mu$ M).

O aumento na taxa de crescimento radicular após dois dias de tratamento com Al foi confirmado quando se avaliou a exsudação de citrato por ápices de raízes e pelo sistema radicular total nas duas linhagens de sorgo. Utilizando-se ambas as metodologias, verificou-se um aumento acentuado na taxa de exsudação de citrato de ATF 10B após 3 dias de exposição a 27  $\mu$ M de Al (Figuras 2 e 3). A linhagem ATF 8B, sensível ao Al, não apresentou taxa elevada de exsudação de citrato em resposta aos tratamentos com Al. A exsudação de citrato em ATF10B em resposta ao Al não foi imediata, havendo um claro componente de indução da exsudação em sorgo, a semelhança do observado para o crescimento radicular.

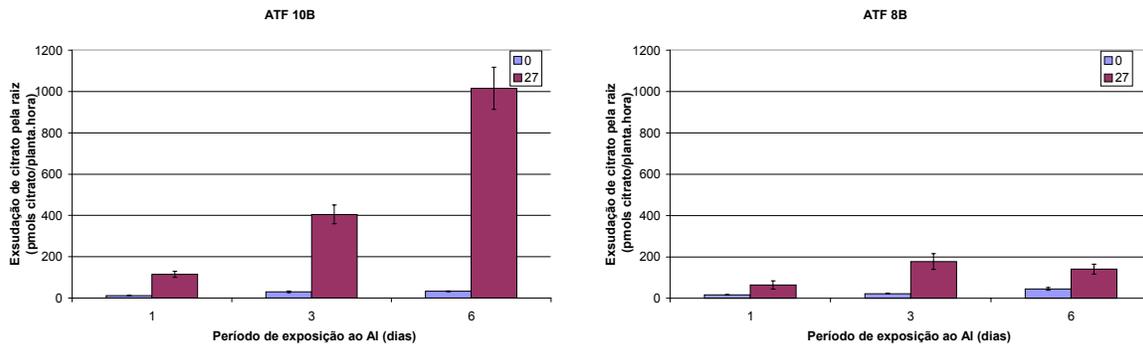
A taxa de exsudação de citrato, quando se avaliou a raiz total, foi bastante superior à taxa de exsudação no primeiro centímetro radicular, indicando haver, em sorgo, exsudação em outras partes da raiz, e não apenas no primeiro centímetro da raiz seminal.

O aumento da exsudação de citrato na linhagem tolerante, em resposta aos tratamentos com Al, indica que este é um importante mecanismo de tolerância ao Al em sorgo.

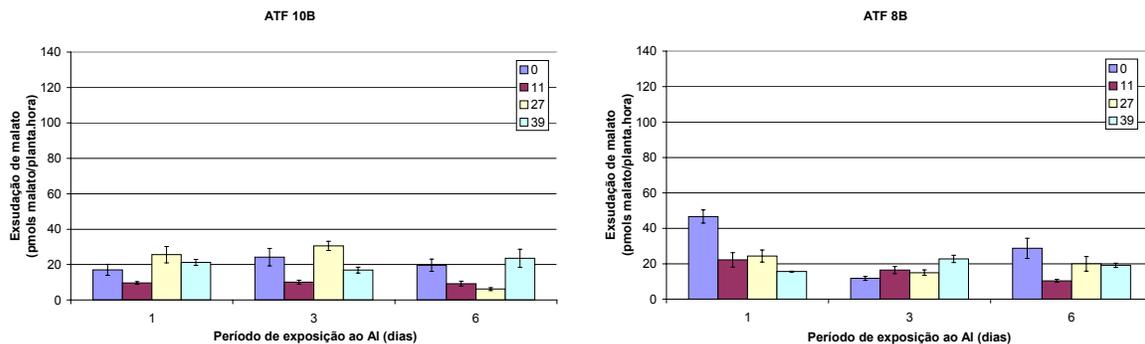
Não foi observada nenhuma correlação entre a exsudação de malato e a tolerância a alumínio em sorgo (Figura 4).



**Figura 2.** Exsudação de citrato por ápices de raiz em duas linhagens semi-isogênicas de sorgo, ATF 10B – tolerante ao alumínio e ATF 8B – sensível, após um, três e seis dias de exposição a 0, 11, 27 e 39 $\mu$ M de atividade de Al.



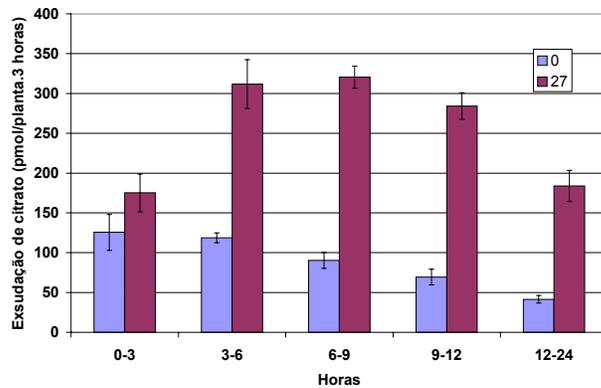
**Figura 3.** Exsudação de citrato pelo sistema radicular total de duas linhagens semi-isogênicas de sorgo, ATF 10B – tolerante ao alumínio e ATF 8B – sensível, após um, três e seis dias de exposição a 0 e 27 μM de atividade de Al.



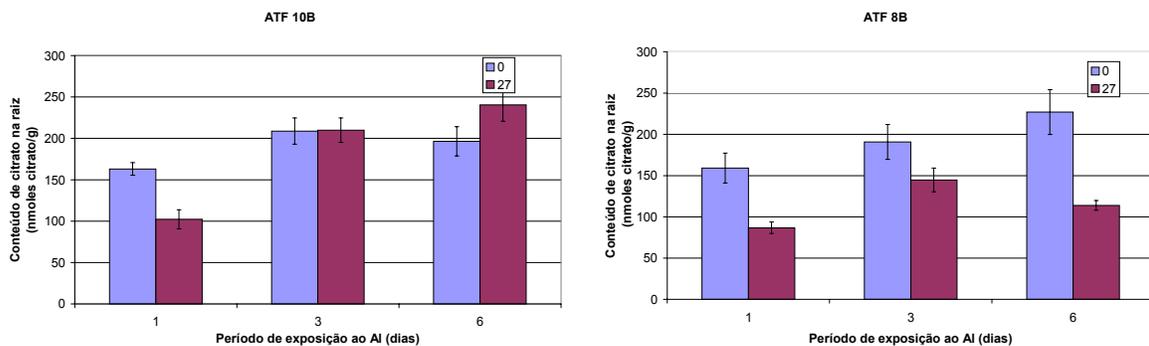
**Figura 4.** Exsudação de malato por ápices de raiz em duas linhagens semi-isogênicas de sorgo, ATF 10B – tolerante ao alumínio e ATF 8B – sensível, após um, três e seis dias de exposição a 0, 11, 27 e 39 μM de atividade de Al.

Na Figura 5 são apresentados os resultados da avaliação da manutenção da taxa de exsudação, após a supressão do tratamento com 27 μM de atividade de Al. A menor taxa de exsudação de citrato nas primeiras 3 horas de coleta pode ter ocorrido em decorrência da manipulação das plantas durante a confecção dos rolos. A partir desse período, verificou-se que a taxa de exsudação se manteve constante até 9 h após o término do tratamento com Al, decrescendo a partir deste tempo. Isso indica que após 9 horas sem Al no meio de cultivo, a concentração deste elemento no apoplasto não foi suficiente para manter a taxa de exsudação de citrato, em comparação aos níveis iniciais.

Ao contrário do que foi verificado para a exsudação de citrato, não houve aumento do conteúdo de citrato no ápice radicular de ATF10B em resposta à presença de Al no meio de cultivo (Figura 6). Isso indica que a exsudação de citrato pela linhagem tolerante de sorgo, ATF 10B, em resposta ao Al, deve-se a componentes não apenas de síntese, mas principalmente de transporte.



**Figura 5.** Exsudação de citrato pelo ápice radicular da linhagem de sorgo, ATF 10B – tolerante ao alumínio, após um, três e seis dias de exposição a 0 e 27 $\mu$ M de atividade de Al. A coleta de exsudato radicular foi realizada em intervalos de 0-3, 3-6, 6-9, 9-12 e 12-24 horas após a suspensão do tratamento com Al.



**Figura 6.** Conteúdo de citrato nos primeiros 50 mm das raízes seminais de duas linhagens semi-isogênicas de sorgo, ATF 10B – tolerante ao alumínio e ATF 8B – sensível, após um, três e seis dias de exposição a 0 e 27 $\mu$ M de atividade de Al.

Pelo exposto, conclui-se que: a) existe nítida evidência de que o mecanismo de tolerância a Al em sorgo é um mecanismo de exclusão; b) a exsudação de citrato é o principal mecanismo de tolerância a Al em sorgo; c) é evidente o caráter de indução na tolerância ao Al em sorgo; d) a exsudação de citrato por raízes de sorgo, em resposta ao Al deve-se, além do componente de síntese, principalmente a um componente de transporte.