

EXSUDAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS POR DOIS CULTIVARES DE ARROZ (*Oryza sativa* L.), SUBMETIDOS A NÍVEIS TÓXICOS DE ALUMÍNIO

Alves, R. M. M. (1¹); Cambraia, J. (2); Cano, M. A. O. (2); Oliveira, J. A. de (3).

INTRODUÇÃO

Um dos principais mecanismos de tolerância ao Al, manifestado por várias espécies vegetais, baseia-se na capacidade que as plantas teriam de sintetizar e exsudar para o meio de cultivo certos ácidos orgânicos (KOCHIAN et al., 2004). Estes ácidos orgânicos seriam capazes de complexar a forma monomérica e mais tóxica do Al, diminuindo sua fitotoxicidade. A indução à exsudação parece ser especificamente regulada pelo Al e o sítio de sua secreção parece ser a zona distal de transição (KOLLMEIER et al., 2001).

A exsudação de ácidos orgânicos para o meio nutritivo pode se dar basicamente de dois modos. Quando ocorre imediatamente após a exposição das plantas ao Al é chamada exsudação “Padrão I”, que, segundo alguns autores, requer apenas a ativação de canais aniônicos preexistentes na membrana plasmática (LI et al., 2000; MA, 2000; MA et al., 2001). Quando a exsudação do ácido orgânico ocorre algum tempo depois, às vezes até algumas horas após a exposição das plantas ao Al, admite-se que está havendo síntese *de novo* de proteínas, provavelmente, envolvidas no metabolismo ou no transporte dos ácidos orgânicos (LI et al., 2000; MA, 2000). Este padrão de exsudação, é chamado “Padrão II”.

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 (FAGERIA et al., 1988), respectivamente, fornecidos pela Embrapa / Arroz e Feijão, em Goiânia, GO.

As sementes, selecionadas, quanto ao tamanho e forma, foram escarificadas quimicamente com H₂SO₄ concentrado por 1 min e, em seguida, lavadas em água corrente e água desmineralizada. As sementes foram, então, tratadas com hipoclorito de sódio 2% (v/v) por 15 minutos, para esterilização superficial, seguindo-se novamente lavagem 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, conforme descrito por PEIXOTO et al. (2001).

(1) Pesquisador da Embrapa / Amapá.; (2) Professor da Universidade Federal de Viçosa / Pesquisador do CNPq; (3) Professor da Universidade Federal de Viçosa. (rogerio@cpafap.embrapa.br)

Onze dias após a semeadura, as plântulas foram selecionadas quanto à uniformidade de tamanho e forma e transplantadas em número de cinquenta para recipientes de 1,0 L, contendo solução nutritiva de Clark (CLARK, 1975), pH 4,0, onde receberam os tratamentos com Al 0 e 1,0 mM, aplicados na forma de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, durante um período de sete dias. Após um, três, cinco e sete dias de cultivo, antes do ajuste do pH e após homogeneização das soluções de cultivo por alguns segundos, foram retiradas amostras de 5 mL e os teores de ácidos málico e cítrico determinados enzimaticamente em alíquotas de 0,45 mL, pela técnica descrita por DELHAIZE et al. (1993).

No caso do ácido cítrico, em função de interferência de componentes da solução nutritiva, constatada em ensaios preliminares, as alíquotas coletadas da solução de cultivo (24h; 3d; 5d e 7d), foram previamente purificadas por cromatografia de troca-iônica, conforme descrito por CAMBRAIA et al. (1983). Após esta purificação e secagem, o resíduo sólido obtido foi retomado em 3 mL de água desmineralizada e o teor de ácido cítrico determinado pela técnica enzimática descrita por DELHAIZE et al. (1993).

Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial (2 x 2) constituídos dos seguintes fatores: dois cultivares (Fernandes e Maravilha), dois níveis de Al (0 e 1 mM), com 3 repetições, no delineamento inteiramente casualizado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A exsudação dos ácidos málico e cítrico aumentou com o tempo de tratamento das plantas, tanto na ausência quanto na presença de Al no meio de cultivo (Figuras 1 e 2).

Na ausência de Al, o incremento médio diário na concentração de ácido málico exsudado pelo cultivar Fernandes, foi similar nos dois cultivares de arroz (Figura 1). Ao longo do período experimental, contudo, o cultivar Maravilha manteve concentrações de ácido málico ligeiramente mais elevadas do que o Fernandes.

Na presença de Al, o incremento médio diário na concentração de ácido málico na solução nutritiva, também, não foi muito diferente nos dois cultivares (Figura 1). Ao longo do período experimental, entretanto, o cultivar Fernandes exsudou para o maior de cultivo e manteve uma concentração de ácido málico de 2 a 3 vezes mais elevada do que o Maravilha. Esta forte exsudação ocorreu no período de vinte e quatro horas. A partir deste tempo, a exsudação se manteve mas numa taxa muito menor. No cultivar Maravilha nada disso aconteceu, mantendo-se a taxa de exsudação baixa e contínua até o final do ensaio.

A exsudação de ácido málico observada neste experimento foi similar à relatada por vários autores (KOLLMEIER et al., 2001; PIÑEROS e KOCHIAN, 2001; OSAWA e MATSUMOTO (2001) e ZHANG et al. (2001)), em trigo e em milho e é consistente com o Padrão I de exsudação (LI et al. 2000; MA, 2000), que não requer a biossíntese prévia de proteínas para seu início de operação.

Ainda, com respeito ao ácido málico, os dois cultivares apresentaram diferentes respostas frente ao Al. O cultivar Fernandes, na presença de Al, apresentou exsudação média 2,6 vezes maior, enquanto o cultivar Maravilha 6,5 % menor do que os respectivos controles na ausência de Al.

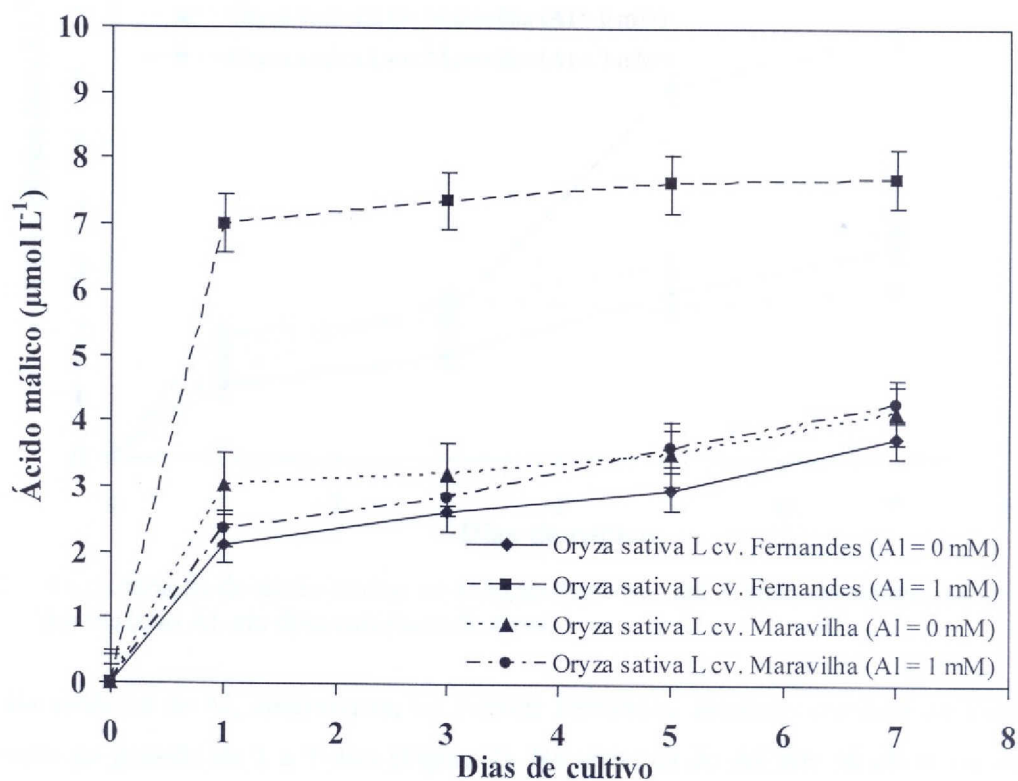


Figura 1. Concentração de ácido málico na solução nutritiva, em função do tempo, na presença ou ausência do Al, em dois cultivares de arroz.

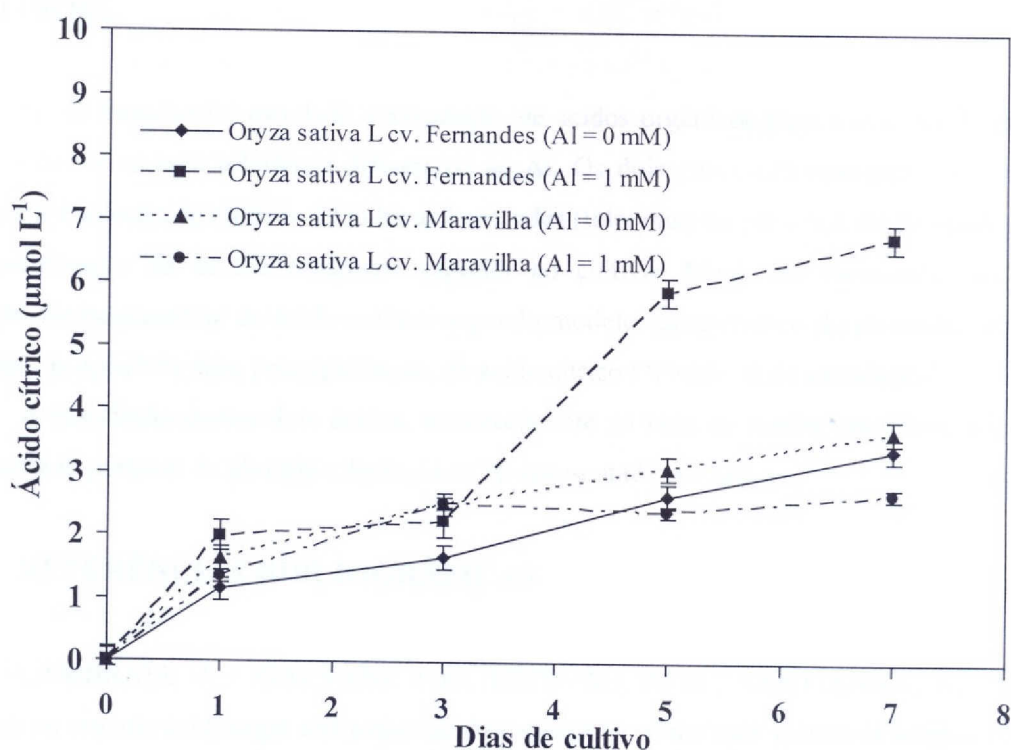


Figura 2 – Concentração de ácido cítrico na solução nutritiva, em função do tempo, na presença ou ausência do Al, em dois cultivares de arroz.

Na ausência de Al, observou-se, no cultivar Fernandes, aumento contínuo na exsudação de ácido cítrico no período de 1 a 7 dias (Figura 2). Na presença do Al, não se observou incremento significativo na exsudação do ácido cítrico até o terceiro dia. A partir daí, a exsudação aumentou abruptamente, atingindo no último dia uma concentração cerca 6 vezes maior que o controle. Este tipo de resposta caracteriza o chamado Padrão II. Este padrão de exsudação foi observado em centeio (LI et al., 2000), triticale (HAYES e MA, 2003; MA e FURUKAWA, 2003) e requer maior período de tempo entre a exposição das plantas ao Al e a ocorrência efetiva da exsudação do ácido. Este maior tempo requerido pelas espécies que desenvolvem o padrão II de exsudação, é necessário para que haja a ativação da maquinaria para a síntese *de novo* de proteínas envolvidas no transporte e/ou no metabolismo dos ácidos orgânicos (LI et al., 2000; MA, 2000).

No caso do cultivar Maravilha, não se observou modificação significativa na exsudação de ácido cítrico, nem com o tempo de tratamento e nem com a presença de Al.

Aparentemente, pois, no cultivar tolerante de arroz (Fernandes) prevalece uma combinação de padrões de exsudação, que propicia sua maior tolerância frente a níveis tóxicos de Al. O ácido málico parece exercer um papel na exclusão do Al no início da exposição, para em seguida entrar em ação o ácido cítrico, mais efetivo na complexação do Al, impedindo a ação fitotóxica deste cátion por mais tempo (KOCHIAN et al., 2004).

CONCLUSÕES

Neste trabalho foi estudada a exsudação de ácidos orgânicos para a solução de cultivo por cultivares de arroz, com tolerância diferencial ao Al. Os dois cultivares exsudaram ácido cítrico e málico para a solução de cultivo. O cultivar Fernandes (tolerante) na presença de Al manteve sempre uma concentração de ácidos orgânicos superior ao cultivar Maravilha (sensível). No início, a exsudação foi basicamente de ácido málico, segundo modelo característico do chamado “Padrão I de exsudação” e, após três dias, principalmente, de ácido cítrico (“Padrão II de exsudação”).

A exsudação destes dois ácidos, provavelmente ao lado de outros mecanismos, parece ser componente importante da elevada tolerância ao Al apresentada por arroz.

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.; 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**, v. 103, p. 695 – 702. 1993.

FAGERIA, N.K., WRIGHT, R.J., BALIGAR, V.C. Rice cultivars response to aluminum in nutrient solution. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**, v. 19, p. 1133 – 1142. 1988.

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.

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.

KOLLMEIER M.; DIETRICH, P.; BAUER, C. S.; HORST, W. J.; HEDRICH, R. Aluminum activates a citrate-permeable anion channel in the aluminum-sensitive zone of the maize root apex. A comparison between an aluminum-sensitive and an aluminum-resistant cultivar. **Plant Physiology**, v. 126, p. 397 – 410. 2001.

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. Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants. **Plant and Cell Physiology**, v. 41, p. 383–390. 2000.

MA, J. F.; FURUKAWA, J. Recent progress in the research of external Al detoxification in higher plants: a minireview. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 97 p. 46–51. 2003.

MA, J.F.; RYAN, P.R.; DELHAIZE, E. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. **Trends in Plant Science**, v. 6, p. 273–278. 2001.

OSAWA, H.; MATSUMOTO, H. Possible involvement of protein phosphorylation in aluminum-responsive malate efflux from wheat root apex. **Plant Physiology**, v. 126, p. 411–420. 2001.

PEIXOTO, P.H.P.; CAMBRAIA, J.; MOSQUIM, P.R.; MOREIRA, M.A. Aluminum effects on fatty acid composition and lipid peroxidation of a purified plasma membrane fraction of root apices of two sorghum cultivars. **Journal of Plant Nutrition**, v. 24, p. 1061 – 1070. 2001.

PIÑEROS, M.A.; KOCHIAN, L.V. A patch-clamp study on the physiology of aluminum toxicity and aluminum tolerance in maize. Identification and characterization of Al³⁺-induced anion channels. **Plant Physiology**, v. 125, p. 292–305. 2001.

ZHANG, W.H.; RYAN, P.R.; TYERMAN, S.D. Malate-permeable channels and cation channels activated by aluminum in the apical cells of wheat roots. **Plant Physiology**, v. 125 p. 1459–1472. 2001.