



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA
BAHIA CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS,
AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM SOLOS E QUALIDADE DE
ECOSSISTEMAS CURSO DE MESTRADO**

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE GENÓTIPOS
DE GIRASSOL SOB ESTRESSE POR ALUMÍNIO**

DANIEL DA SILVA DE JESUS

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
MARÇO – 2012**

ASPECTOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE GENÓTIPOS DE GIRASSOL SOB ESTRESSE POR ALUMÍNIO

DANIEL DA SILVA DE JESUS

Biólogo

Universidade Estadual da Bahia, 2006

Dissertação submetida ao Colegiado de Curso de Pós-Graduação em Solos e Qualidade de Ecossistemas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Solos e Qualidade de Ecossistemas, Área de Concentração: Nutrição mineral de plantas.

Orientador: Prof. Dr. André Dias de Azevedo Neto

FICHA CATALOGRÁFICA

J58

Jesus, Daniel da Silva de.

Aspectos fisiológicos e bioquímicos de genótipos de girassol sob estresse por alumínio / Daniel da Silva de Jesus. -- Cruz das Almas, BA, 2012.

62f.; il.

Orientador: André Dias de Azevedo Neto.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

Ficha elaborada pela Biblioteca Central - UFRB.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E
BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SOLOS E QUALIDADE
DE ECOSISTEMAS**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
DANIEL DA SILVA DE JESUS**

Prof. Dr. André Dias de Azevedo Neto
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB
(Orientador)

Prof.Dr. Clovis Pereira Peixoto
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB

Dr. Onildo Nunes de Jesus
Embrapa Mandioca e Fruticultura

Dissertação homologada pelo Colegiado do Curso de Mestrado em Solos e
Qualidade de ecossistemas em
Conferindo o Grau de Mestre em Solos e Qualidade de Ecossistemas
em.....

Dedico

À minha família, sem exceções, que nos momentos em que mais precisei, demonstraram em definitivo que constituem uma porção mágica (aquela que resolve) na minha vida. Mônica, minha companheira de tantas batalhas, Murilo e seus familiares que sabem o quanto sou chato e maluco quando estou empenhado em fazer alguma coisa. A todos que torceram por mim e me acompanharam em todo o tempo.

Agradecimentos

Em primeiro lugar a Deus, pois sempre agradeço a ele por cada detalhe da minha história de vida.

À toda minha família, em especial, Dona Letícia e Seu Gonzaga que me educaram e me conduziram da melhor maneira, meus irmãos pelo apoio irrestrito e meus sobrinhos, inesgotáveis fontes de distração e carinho.

À Mônica minha companheira, que se mostrou paciente e afetuosa durante este período.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, e ao Programa de Pós-Graduação em Solos e Qualidade de Ecossistemas por terem me dado a oportunidade de avançar meus conhecimentos.

À FAPESB e CAPES pelo apoio financeiro concedido

Ao excelente orientador, e agora amigo, Drº André Dias de Azevedo Neto, por ter tido paciência e transmitir tanto conhecimento.

À Clemilton, como ele mesmo diz um “amigo-irmão”, pelas conversas e discussões que também me auxiliaram durante este processo.

Ao amigo Geovanni, exemplo de seriedade nas horas de trabalho.

Aos estagiários do laboratório de Bioquímica, Pedro Paulo, Ana Carla, Orlane, Danilo, Vitor e Bárbara, que deram grande apoio em vários momentos complicados.

Aos amigos do mestrado em Solos e Qualidade de ecossistemas, além daqueles de outros programas como Marcos Humberto, Luana e Jeferson de Sá, pelas conversas e orientação.

Ao corpo de professores do Programa de Solos e Qualidade de Ecossistemas, pela atenção e apoio.

Ao corpo técnico do laboratório de microbiologia e de química analítica, em especial Zozilene Nascimento (Lene), Márcio, Marcos e Cristiano os quais sempre estiveram dispostos a ajudar.

SUMÁRIO

Página

RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO.....	1

Capítulo 1

A TOLERÂNCIA DE PLANTAS DE GIRASSOL AO ALUMÍNIO ESTÁ ASSOCIADA À MANUTENÇÃO DO TEOR DE FÓSFORO NAS RAÍZES.....	13
--	----

Capítulo 2

SOLUTOS ORGÂNICOS, DANOS DE MEMBRANAS E TEOR RELATIVO DE ÁGUA E DE PIGMENTOS EM FOLHAS E RAÍZES DE VARIEDADES DE GIRASSOL COM TOLERÂNCIA DIFERENCIADA AO ALUMÍNIO	27
CONSIDERAÇÕES FINAIS	53

ASPECTOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE GENÓTIPOS DE GIRASSOL SOB ESTRESSE POR ALUMÍNIO

Autor: Daniel da Silva de Jesus

Orientador: Prof. André Dias de Azevedo Neto

RESUMO: Solos ácidos compreendem aproximadamente 50% das terras potencialmente aráveis do mundo e utilizáveis para a produção de alimentos. A presença do Al tóxico é um dos principais problemas limitantes ao desenvolvimento das culturas nestas regiões. Este trabalho teve como objetivo identificar a partir de 25 genótipos de girassol, um tolerante e um sensível ao Al, com vistas à identificação de parâmetros fisiológicos e/ou bioquímicos que possam servir como indicadores da tolerância do girassol a este estresse. Os resultados obtidos na seleção dos genótipos mostraram que Catissol, EXP 11-26, H-860 HO e H-358 foram os mais tolerantes e IAC Uruguai, AG 960, EXP 44-49, IAC Iarama, BRS-G27, EXP 887 e H-251 os mais sensíveis, quando comparados entre si. Também foi verificado que os teores de N e K nas folhas e raízes e o teor de P nas folhas não apresentaram relação com a tolerância. Em contraste, a manutenção do teor de P nas raízes das plantas estressadas, parece desempenhar um papel importante na tolerância ao Al em girassol, sugerindo sua utilização como um marcador fisiológico para a seleção de tolerância ao Al nesta espécie. A variedade Catissol (tolerante) e a IAC-Uruguai (sensível), foram utilizadas para avaliar as respostas fisiológicas e bioquímicas ao estresse por Al ao longo do tempo. Os dados evidenciaram reduções na integridade das membranas e no teor relativo de água e depigmentos na variedade IAC-Uruguai, em contraste com a Catissol. Os resultados de carboidratos solúveis, aminoácidos e prolina livre em ambas as variedades sugerem que o acúmulo destes solutos, principalmente nas raízes de Catissol, pode ter um importante papel na tolerância do girassol ao estresse por Al.

Palavras chave: *Helianthus annuus*, solos ácidos, tolerância

BIOCHEMICAL AND PHISYOLOGICAL ASPECTS OF SUNFLOWER GENOTYPES UNDER ALUMINIUM STRESS

Author: Daniel da Silva de Jesus

Adviser: André Dias de Azevedo Neto

ABSTRACT: Acids soils comprise approximately 50% of arable land the world and potentially usable for the food production. The presence of toxic Al is a major problem limiting the development of crops in these regions. This study aimed to identify from 25 sunflower genotypes, tolerant and sensitive ones to Al, with a view to identifying physiological and/or biochemical parameters that can serve as indicators of sunflower tolerance to this stress. The results in the selection of genotypes showed that Catissol, 11-26 EXP, OH and H-860 H-358 were the most tolerant and IAC-Uruguay, AG 960, EXP 44-49, IAC Iarama, BRS-G27, 887 and EXP H-251 more sensitive compared between themselves. They also found that the levels of N and K in leaves and roots and P content in leaves did not correlate with tolerance. In contrast, the maintenance of P content in roots of stressed plants, seems to play an important role in Al tolerance in sunflower, suggesting its use as a physiological marker for the selection of Al tolerance in this species. The Catissol variety (tolerant) and IAC-Uruguay (sensitive) were used for assess the physiological and biochemical responses to aluminium stress to over time. The data showed reduction in the percentage of membrane integrity, relative water content and pigments in IAC-Uruguay variety, in contrast to Catissol variety. The results of soluble carbohydrates, amino acids and free proline in both varieties suggest that accumulate of these solutes, mainly in the roots of Catissol, may play an important role in stress tolerance of the girassol to Al³⁺.

Key words: *Helianthus annuus*, acids soils, tolerance

INTRODUÇÃO

Solos ácidos e alguns aspectos da toxicidade do alumínio em plantas

Solos ácidos compreendem aproximadamente 50% das terras potencialmente aráveis do mundo e utilizáveis para a produção de alimentos. A maioria destes solos apresenta características topográficas adequadas para a mecanização, no entanto, os cultivos estão sujeitos à toxicidade por manganês (Mn) e principalmente alumínio (Al) (KOCHIAN et al., 2004). Cerca de 60% dos solos ácidos do mundo localizam-se em zonas tropicais e subtropicais (KOCHIAN et al., 2004).

No Brasil, aproximadamente 70% do território é composto por solos ácidos (QUAGGIO, 2000). Em termos gerais, grande parte dos solos caracteristicamente ácidos no território brasileiro é encontrada na região do Cerrado. Aspectos positivos como a facilidade de mecanização, correção, possibilidade de irrigação, elevada profundidade, friabilidade, porosidade e boa drenagem interna dos solos, concorrem para que esta região seja considerada dentre aquelas de maior potencial agrícola do país (KER *et al.*, 1992). As savanas brasileiras ocupam uma área de aproximadamente dois milhões de Km² contemplando 23% do território nacional (IBGE, 2004).

No estado da Bahia, o cerrado predomina na região oeste, perfazendo um total de 27% da área territorial, sendo, portanto o segundo maior bioma do estado (IBGE, 2004). Atualmente a região oeste do estado é reconhecida como uma zona de vigorosa expansão agropecuária e agroindustrial, cuja intensificação se deu na década de 80 e vem registrando taxas acima das contabilizadas pelo país desde o início dos anos 1990 (SEAGRI, 2008).

O alumínio compõe mais de 7% da crosta terrestre e é o terceiro elemento mais abundante depois do oxigênio e silício. Raízes de plantas estão desta forma, quase sempre expostas ao alumínio em alguma forma (MA et al., 2001). Este metal ocorre em diferentes formas no solo e parte da dificuldade em estudar os processos que ocorrem nas plantas, em decorrência da ação deste metal, pode ser atribuída à complexa química do mesmo. Na solução do solo o cátion trivalente (Al³⁺) predomina em condições ácidas (pH<5), enquanto as formas Al(OH)²⁺ e Al(OH)₂⁺ se originam com o incremento do pH. Em pH

próximo da neutralidade encontra-se a fase sólida Al(OH)_3 , gipsita, enquanto o Al(OH)_4^- ou aluminato predomina em condições alcalinas. Muitos cátions trivalentes são tóxicos para as plantas e, como a toxicidade do alumínio é restrita a condições ácidas, geralmente assume-se que o Al seja a principal espécie fitotóxica (DELHAIZE et al., 1995).

Um dos primeiros e mais importantes efeitos da toxicidade do alumínio parece ser a inibição do crescimento radicular que pode se manifestar após poucos minutos de exposição (KOCHIAN et al., 2004). Este elemento se acumula preferencialmente no ápice radicular, apontado como sítio primário de sua ação inibitória (PANDA et al., 2009). Após exposições mais prolongadas do sistema radicular das plantas ao Al, a toxidez se manifesta por meio de um conjunto de sintomas, que expressam o efeito contínuo deste íon sobre o crescimento do sistema radicular, da parte aérea e na absorção e utilização de nutrientes (FAGERIA, et al., 1989).

Com relação a nutrição mineral, diversos estudos mostram que a toxidez por alumínio causa deficiência nos teores de macro e micronutrientes (FAGERIA et al., 1988; SAMAC, 2003). O Espaço Livre Aparente (ELA), uma região adensada por cargas negativas devido à presença dos grupos carboxílicos de pectinas, apresenta menor funcionalidade, nas raízes expostas ao alumínio. Esta região apresenta uma ampla capacidade de troca catiônica sendo fundamental à retenção de cátions como Ca^{2+} e Mg^{2+} . O Al pode ser retido nestes grupos funcionais, reduzindo a capacidade de absorção de outros cátions devido à competição pelos ânions do ELA (MACHADO, 1997). A inibição de canais iônicos e de transportadores nas membranas plasmáticas também pode ser a causa da redução da absorção de cátions (LIU e LUAN, 2001). O Al interage com a membrana plasmática e provavelmente causa o bloqueio de transportadores específicos de íons na raiz (PANDA et al., 2009). A absorção de Ca^{2+} e Mg^{2+} são normalmente os mais deprimidos pelo Al quando comparado com outros minerais importantes (RENGEL e ROBINSON, 1989). Os íons Al e Mg^{2+} competem pelos transportadores de membrana (RENGEL e ROBINSON, 1989; RENGEL, 1990). Estes íons possuem raios hidratados similares e desta maneira os sítios de ligação das enzimas não os distinguem bem (BOSE et al., 2010). O Al também interage e causa o bloqueio de canais de K^+ em células radiculares (LIU e LUAN, 2001).

A deficiência de fósforo é considerada a principal causa da redução do crescimento de plantas submetidas ao estresse por Al (QUARTIN et al., 2001). A toxidez de alumínio pode estar associada ao aumento no teor de fósforo no sistema radicular e redução contínua no teor da parte aérea (MARCKLON e SIM, 1992). Reduções na concentração desse elemento nas folhas podem estar relacionadas com seu acúmulo nas raízes, sendo normalmente associado à formação de fosfato de alumínio (BRACCINI et al., 1998). Nesta forma o fósforo pode ser acumulado na superfície da raiz, na parede celular ou no interior das células da raiz (TAYLOR, 1991). Conforme Zheng et al (2005) a formação do complexo Al-P na parede celular, em especial na forma de compostos insolúveis como $Al_4(PO_4)_3$, pode ser importante para retardar a entrada do Al no apoplasto. Com relação ao N o Al interfere de maneira contrastante dependendo da espécie e da concentração de alumínio no ambiente radicular (CHEN, 2006). Alguns autores sugerem que o Al causa inibição da captação, da redução e da atividade do sistema de transporte do $(NO_3)^-$ (CAMBRAIA et al., 1989; PURCINO et al., 2003). Em contraste outros trabalhos tem mostrado que o Al estimula a captação de $(NO_3)^-$ e o crescimento radicular (NICHOL et al., 1993).

Outros efeitos tóxicos do Al nas plantas têm sido atribuídos a várias vias fisiológicas e bioquímicas, embora o exato mecanismo ainda não esteja totalmente compreendido (ROY et al., 1988). Desta maneira, a despeito da extensa literatura existente e das inúmeras hipóteses, não há ainda um consenso sobre os mecanismos fisiológicos de toxicidade do Al (VITORELLO, 2005). O Al reage com inúmeros sítios nas células, alvos potenciais de injúria, como a parede celular, o citoesqueleto, o núcleo e, principalmente, a membrana plasmática (KOCHIAN et al., 2004). Vários trabalhos apontam a membrana plasmática como um dos alvos primários do Al em nível celular (MERIGA et al., 2004). Na superfície da membrana o Al interage com os fosfolipídios causando perda de fluidez da bicamada, promove a peroxidação de lipídios e altera diversas funções fundamentais (PANDA et al., 2009).

Outros estudos indicam que o Al interfere nas relações hídricas das plantas (DETTERS et al., 1986; ALI et al., 2007). Reduções do volume do sistema radicular pode não ser a única razão para a deficiência hídrica causada pelo Al em plantas (BARCELÓ e POSCHENRIEDER, 1990). O Al induz

decréscimos na condutividade hidráulica das células do córtex (ZHAO et al., 1987) e demais tecidos da raiz (KRUGER e SUCOFF, 1989; BARCELÓ et al., 1996). Xiao (2002) observou que o Al reduz o teor água das raízes e caule de *Dimocarpus longan*, porém não causa alteração nas folhas quando comparadas com as plantas controle. Simon et al. (1994) mostraram que o Al diminui a eficiência do uso da água em uma cultivar de tomate, apresentando maiores níveis de redução na transpiração do que na assimilação de CO₂. Ainda neste trabalho, foi verificado que a eficiência no uso da água em outras cultivares estudadas não foi afetada pelo Al, pois ocorreram reduções na transpiração proporcionalmente às reduções na assimilação de CO₂. Desta maneira é provável que o Al interfira de maneira diferenciada nas relações hídricas comparando-se as espécies (CHEN, 2006).

Alguns estudos mostram que o estresse por Al causa decréscimos na assimilação de CO₂ em muitas espécies de plantas (XIAO, 2002; PEIXOTO et al. 2002; JIANG et al., 2008). A fotoinibição de ambos doadores e aceptores do fotossistema II induzida pelo Al pode estar associada a inibição do crescimento (JIANG et al., 2008). Os efeitos causados pelo estresse na fotossíntese pode estar relacionado a diminuição do conteúdo de clorofila, redução do fluxo de elétrons e degradação da estrutura dos tilacóides (PETTERSSON et al., 1985; ROY et al., 1988). Ao mesmo tempo que o Al causa diminuição na absorção de luz devido a redução na concentração de clorofila, verifica-se maior dissipação de energia nas folhas das plantas estressadas e menores danos foto-oxidativos por excesso de luz (JIANG et al., 2008). Entretanto, mais pesquisas são necessárias para se compreender os mecanismos pelos quais o Al afeta a fotossíntese (AKAYA e TAKENAKA, 2001).

Alguns trabalhos envolvendo os efeitos do estresse por Al sobre parâmetros bioquímicos têm sido desenvolvidos. O aminoácido prolina pode proteger tecidos vegetais contra estresses podendo atuar como uma molécula de armazenamento de N, osmólito e protetor hidrofóbico de enzimas e estruturas celulares (GREENWAY e MUNNS, 1980). Os carboidratos compreendem uma grande categoria de solutos compatíveis que incluem hexoses, dissacarídeos, açúcares alcoólicos e complexos, os quais são acumulados durante os estresses (JOUVE et al., 2004). Vários trabalhos evidenciam que plantas expostas ao Al apresentam acúmulo de prolina (ALI et

al.,2007; GIANNAKOULA et al., 2008) e carboidratos (KHAN et al., 2000; GIANNAKOULA et al., 2008) nos tecidos de folhas e raízes.

Diferentes estresses ambientais induzem a síntese de novas proteínas nas plantas, os quais possivelmente apresentam valor adaptativo para as plantas aumentarem sua capacidade de sobrevivência (DUBEY, 1999). Desta forma o Al pode induzir a expressão de genes e síntese de proteínas envolvidas no metabolismo de ácidos orgânicos ou de transporte destas moléculas (MA et al., 2001) e de enzimas antioxidativas como a glutathione S-transferase, peroxidase e superóxido dismutase (PANDA et al., 2009). A síntese de proteínas pode ser diminuída nas plantas expostas ao Al e isso provavelmente ocorre devido ao efeito na distribuição de ribossomos no retículo plasmático (ROY et al, 1988). Menores teores de proteínas podem também serem atribuídos ao aumento da hidrólise proteica (GOMES et al., 1985).

Os aminoácidos são potentes ligantes para alguns metais e sua exsudação em resposta ao Al já foi documentada (KOVÁČIK et al., 2010). Assim como a prolina, estas moléculas podem atuar no ajustamento osmótico baixando o potencial osmótico das raízes, ser fonte de energia utilizável (esqueleto carbônico) e de armazenamento de nitrogênio durante períodos infraótimos de crescimento (HEUER, 1999). Em algumas espécies foram verificados acúmulos de aminoácidos livres devido ao estresse por Al (CAMBRAIA et al., 1983). Por vezes este resultado é o reflexo de aumentos na biossíntese (KOVÁČIK et al., 2010) ou no metabolismo de proteínas (CAMBRAIA et al., 1983).

O girassol e a toxidez por Al

O girassol (*Helianthus annuus L.*) é uma dicotiledônea anual pertencente à família Asteraceae, originária do continente Norte Americano. O cultivo do girassol tem como objetivo principal a geração de sementes, as quais produzem uma das mais importantes fontes de óleo comestível do mundo. A semente de girassol possui, em média, 24% de proteínas, 47% de material graxo, 20% de carboidratos totais e 4% de minerais (MANDARINO, 2005). O óleo de girassol é considerado excelente possuindo alto nível de ácidos graxos

insaturados, como o linoleico (60% em média) essencial à alimentação e saúde humana, além de boa estabilidade oxidativa, dentre outras características (MANDARINO, 2005). Quando obtido por prensagem mecânica a frio, o óleo de girassol é considerado uma boa fonte de vitamina E e de polifenóis (MANDARINO, 2005).

Com o lançamento do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), pelo Governo Federal brasileiro em 2004, surgem novas perspectivas ao cultivo de sementes oleaginosas como o girassol. Além da produção de óleo comestível o girassol passa a ser alternativa para a produção de biodiesel, na substituição de combustíveis fósseis, derivados do petróleo, utilizados em motores de ignição por compressão. Inerentes ao programa biodiesel estão diversos atributos de impacto ambiental e social. O consumo puro pode reduzir a emissão de dióxido de carbono - CO₂ em mais de 78%, quando comparado ao consumo de diesel convencional; grande número de empregos em atividades agrícolas e industriais; e o fortalecimento do Programa Nacional de Fortalecimento da Agricultura Familiar –PRONAF (LIMA, 2005).

O girassol figura entre as cinco maiores culturas de oleaginosas do mundo, ficando atrás da soja, colza, algodão e amendoim (USDA, 2011). A mesma agência classifica o Brasil como segundo maior produtor de oleaginosas. Porém considerando especificamente o girassol, a produtividade brasileira ainda está muito abaixo dos principais países. Enquanto Rússia, EU-27 e Ucrânia respondem por 24%, 22% e 21,5% da produção mundial, respectivamente, o Brasil produz apenas 0,2%. Pode-se inferir que a produção, o processamento e o consumo da oleaginosa, bem como dos seus principais derivados (óleo e farelo), ainda estão muito abaixo do potencial brasileiro (LAZZAROTO et al., 2005).

O girassol apresenta moderada tolerância aos déficits hídrico e salino (LIMA, 2005), porém exige solos férteis e sem Al. Esta espécie é muito sensível a acidez do solo e não tolera níveis de saturação por alumínio trocável superiores a 5% (BLAMEY et al., 1987). Segundo Castro e Oliveira (2005) a acidez pode limitar o desenvolvimento do sistema radicular, intensificando os problemas nutricionais associados ao déficit hídrico e reduzindo o potencial produtivo da cultura. A principal região produtora de girassol no Brasil é a dos cerrados, caracterizada por solos muito intemperizados, geralmente ácidos,

pobres em nutrientes e muitas vezes com elevados níveis de saturação de alumínio trocável (CASTRO, 2005). A calagem é uma forma comum de reverter à condição indesejável de muitos solos tropicais que normalmente, em seu estado natural, apresenta elevada acidez no solo. Esta prática é importante para manter o pH acima de 5,5 em CaCl_2 , precipitando o alumínio e elevando os teores das bases trocáveis no solo.

Entretanto, dentro do tópico de agricultura sustentável, um ponto que deverá se tornar cada vez mais importante é a seleção de genótipos capazes de maximizar a eficiência de utilização dos insumos e minimizar o risco imposto pela combinação de diversas características restritivas do ambiente. Neste sentido, diversos trabalhos indicam que as plantas e cultivares apresentam uma tolerância amplamente variável ao Al no meio (BALIGAR et al., 1995; BRACCINI et al., 1998; LIN e CHEN 2011). Isto sinaliza na direção de um aumento dos programas de seleção para adaptação aos estresses (FERREIRA et al., 2006).

Pesquisas em genótipos que sejam tolerantes ao estresse por Al^{+3} podem ser um caminho para a manutenção e incremento da produção em solos ácidos (FOY, 1984). Neste sentido os resultados de avaliações nutricionais e dos parâmetros bioquímicos podem ser utilizados na descrição da tolerância diferencial de plantas sob estresse por Al (BRACCINI et al., 1998; ZHENG et al., 2005; GIANNAKOULA et al., 2008). Além disso, trabalhos nesta linha podem contribuir para uma maior compreensão dos mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos neste tipo de estresse.

A variabilidade genética inter e intraespecífica oferecem valiosas ferramentas ao estudo dos mecanismos e a identificação de marcadores fisiológicos e bioquímicos que levam à maior tolerância de um genótipo. Estudos nesta ótica podem fornecer subsídios importantes para programas de melhoramento, tanto através da genética clássica, como através da engenharia genética (DIX et al., 1986).

Este trabalho teve como objetivo identificar genótipos de girassol, tolerante ao Al, com vistas a identificação de parâmetros fisiológicos e/ou bioquímicos que possam servir como indicadores da tolerância do girassol a este estresse.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKAYA, M.; TAKENAKA, C. Effects of aluminum stress on photosynthesis of *Quercus glauca* Thunb. **Plant Soil**, v.237, p.137-146, 2001.
- ALI, B.; HASAN, S.A.; HAYAT, S.; HAYAT, Q.; YADAV, S.; FARIDUDDIN, Q.; AHMAD, A. A role for brassinosteroids in the amelioration of aluminium stress through antioxidant system in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek). **Environ. Exp. Bot.**, v.62, p.153–159, 2008.
- BALIGAR, V. C., ANGHINONI, I.; PITTA, G. V. E. Aluminum effects on plant and nutrient uptake parameters of soil and solution grown sorghum genotypes. **J. Plant Nutr.**, v.18, p.2325-2338, 1995.
- BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C.; VÁZQUEZ, M. D.; GUNSE, B. Aluminium phytotoxicity. A challenge for plant scientists. **Fert. Res.**, v.43, p.217–223, 1996.
- BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. **J. Plant Nutr.**, v.13, p.1-37, 1990.
- BLAMEY, F. P. C.; EDWARDS, D. G.; ASHER, C. J. **Nutritional disorders of sunflower**. Brisbane: University of Queensland, 1987. p.72.
- BOSE, J., BABOURINA, O., SHABALA, S.; RENGEL, Z. Aluminium-induced ion transport in Arabidopsis: the relationship between Al tolerance and root ion flux. **J. Exp. Bot.**, v.61, p.3163–3175, 2010.
- BRACCINI, M. C. L.; MARTINEZ, H. E. P.; PEREIRA, P. R.; SAMPAIO, G.; N. F.; SILVA E. A. M. Tolerância de genótipos de cafeeiro ao alumínio em solução nutritiva. I. Crescimento e desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular. **Rev. Bras. Ci. Solo**, v.22, p.435-442, 1998.
- CAMBRAIA, J.; GALVANI, F. R.; ESTEVÃO, M. M.; SANTANA, R. Effects of aluminum on organic acid, sugar and amino acid composition on the root system of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). **J. Plant Nutr.**, v.6, p.313-322, 1983.
- CAMBRAIA, J., PIMENTA, J. A., ESTEVÃO, M. M.; SANT'ANNA, R. Aluminum effects on nitrate uptake and reduction in sorghum. **J. Plant Nutr.**, v.12, p.1435-1445, 1989.
- CASTRO, C. de; OLIVEIRA, F.A. de. Nutrição e adubação do girassol. In: LEITE, R.M.V.B. de C.; BRIGHENTI, A.M.; CASTRO, C. (ED.). **Girassol no Brasil**, Londrina: Embrapa Soja, 2005. p.641.
- CHEN, L. S. Physiological responses and tolerance of plant shoot to aluminum toxicity. **J. Plant Physiol. Mol. Biol.**, v.32, p.143-155, 2006.

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 Physiol.** v.3, p.685-693, 1993.

DELHAIZE, E.; RYAN P.R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiol.**, v.107, p.315-321, 1995.

DETTERS, M.; SERVAIS, J. P.; WULFERT, E. Neurotoxic cations induce membrane rigidifications and membrane fusion at micromolar concentrations. **Biochem. Biophys. Acta**, v.855, p.271–276, 1986.

DIX, P. J., MCLYSAGHT, U. A.; PLUKETT, A. Salt stress: resistance mechanisms and in vitro selection procedures. In: **Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications** (Withes, L. A. and Alderson, P. C., ED.): p.469-479, 1986.

DUBEY, R. S. Protein Synthesis by Plants Under Stressful Conditions. In: PESSARAKLI, M. (ED.). **Handbook of plant and crop stress**, Tukson: Marcel Dekker, Inc., 1999. p.365-397.

FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V. C.; WRIGHT, R.J. Aluminum toxicity in crop plants. **J. Plant Nutr.**, New York, v.11, p.303-319, 1988.

FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V. C.; WRIGHT, R. J. The effects of aluminum on growth and uptake of Al and P by rice. **Pesq. Agrop. Bras.**, v.24, p.677-682, 1989.

FERREIRA, R. P.; MOREIRA, A.; RASSINI J. B. **Toxidez de alumínio em culturas Anuais**. Embrapa Pecuária. Documentos, 63, 2006.

FOY, C.D. Physiological effects of hydrogen, aluminum and manganese toxicities in acid soil. In: ADAMS, F. (ed.). **Soil acidity and liming**. Madison: ASA-CSSA-SSSA, n.12, p.57-97, 1984.

GREENWAY, H.; MUNNS, R. Mechanism of salt tolerance in nonhalophytes. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, v.31, p.149-190, 1980.

GOMES, M. M. S.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANNA. R.; ESTEVÃO, M. M. Aluminum effects on uptake and translocation of nitrogen in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). **J. Plant Nutr.**, v.8, p.457-465, 1985.

HEUER, B. Osmoregulatory Role of Proline in Plants Exposed to Environmental Stresses. In: PESSARAKLI, M. (ED.). **Handbook of plant and crop stress**, Tukson: Marcel Dekker, Inc., 1999. p.675-695.

JIANG, H. X.; CHEN L. S.; ZHENG J. G.; HAN S.; TANG N.; SMITH, B. R. Aluminum-induced effects on photosystem II photochemistry in citrus leaves assessed by the chlorophyll a fluorescence transient. **Tree Physiol.**, v.28, p.1863-1871, 2008.

JOUVE, L.; HOFFMANN, L.; HAUSMAN, J. F. Polyamine, carbohydrate, and proline content changes during salt stress exposure of aspen (*Populus tremula* L.): involvement of oxidation and osmoregulation metabolism. **Plant Biol.**, v.6, p.74–80, 2004.

KER, J. C.; PEREIRA, N. R.; CARVALHO, J. R.; CARVALHO JÚNIOR, W.; CARVALHO FILHO, A. Cerrado: solos, aptidão e potencialidade agrícola. In: **Simpósio sobre manejo e conservação do solo no Cerrado**, Goiânia, 1990. Anais. São Paulo: Fundação Cargill, p. 1-31, 1992.

KOCHIAN L. V.; HOEKENGA O. A.; PIÑEROS M. A. How do crop plant tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v.55, p.459, 2004.

KOVÁČIK, J.; KLEJDUS, B. and HEDBAVNY, J. Effect of aluminium uptake on physiology, phenols and amino acids in *Matricaria chamomilla* plants. **J. Hazar. Mat.**, v.178, p.949–955, 2010.

KRUGER, E.; SUCOFF, E. Aluminum and the hydraulic conductivity of *Quercus rubra* L. root systems. **J. Exp. Bot.**, v.40, p.659-665, 1989.

LAZZAROTTO, J.J.; ROESSING, A. C.; MELLO, H.C. O agronegócio do girassol no Brasil. In: LEITE, R.M.V.B. de C.; BRIGHENTI, A.M.; CASTRO, C. (ED.). **Girassol no Brasil**, Londrina: Embrapa Soja, 2005. p.641.

LIMA, P. C. R. O biodiesel e o desenvolvimento social da bahia. Biblioteca digital da câmara. **Centro de Documentação e Informação Coordenação de Biblioteca**. In:<http://bd.camara.gov.br>, 2005.

LIN, Y-H.; CHEN, J-H. Effects of aluminum on nutrient uptake in different parts of four pineapple cultivars. **Afri. J. Agr. Res.** v.6, p.1438-1446, 2011.

LIU, K.; LUAN, S. Internal aluminium block of plant inward K⁺ channels. **Plant Cell**, v.13, p.1453–1465, 2001.

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

MACÊDO, C. E. C.; JAN, V. V. S. Effect of aluminum stress on mineral nutrition in rice cultivars differing in aluminum sensitivity. **Rev. Bras. Eng. Agr. Amb.**, v.12,p.363–369, 2008.

MACHADO, P. L. O. de A. **Considerações Gerais sobre a Toxicidade do Alumínio nas Plantas**. Embrapa Solos. Documentos, nº 2, 1997.

MARCKLON, A. E. S.; SIM, A. Modifying effects of a non-toxic level of aluminium on phosphate fluxes and compartmentation in root cortex of intact ryegrass seedlings. **J. Exp. Bot.**, v.43, p.1483-1490, 1992.

MERIGA, B.; REDDY, K.; RAO, K. R.; REDDY, L. A.; KISHOR, P. B. K. Aluminum-induced production of oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA damage in seedlings rice (*Oryza sativa*). **J. Plant Physiol.**, v.161, p.63-68, 2004.

NICHOL, B. E.; OLIVEIRA, L. A.; CLASS, A. D. M.; SIDDIQI, M. Y. The Effects of Aluminum on the Influx of Calcium, Potassium, Ammonium, Nitrate, and Phosphate in an Aluminum-Sensitive Cultivar of Barley (*Hordeum vulgare* L.). **Plant Physiol.**, v.101, p.1263-1266, 1993.

OLIVEIRA, I. P.; COSTA, K. A. P.; SANTOS, K. J. G.; MOREIRA, F. P. Considerações sobre a acidez dos solos de cerrado. **Rev. Elet. Fac. Montes Belos**, v.1, p. 01-12. 2005.

PANDA, S. K.; BALUSKA, F.; MATSUMOTO, H. Aluminum stress signaling in plants. **Plant Signal. Behav.**, v.4 p.592–597. 2009.

PEIXOTO, P. H. P. ; DA MATTA, F. M.; CAMBRAIA, J. Responses of the photosynthetic apparatus to aluminum stress in two sorghum cultivars. **J. Plant Nutr.**, v.25, p.821-832, 2002.

PETTERSSON, A.; HAELLBOM, L.; BERGMAN, B. Physiological and structural responses of the cyanobacterium *Anabaena cylindrica* to aluminum. **Physiol. Plant**, v.63, p.153-158, 1985.

PINTRO, J.; BARLOY, J.; FALLAVIER, P. Aluminum effects on the growth and mineral composition of corn plants cultivated in nutrient solution at low aluminum activity. **J. Plant Nutr.**, v.19, p.729–741, 1996.

PURCINO, A. A. C.; ALVES, V. M. C.; PARENTONI, S. N.;BELELE, C. L.; LOGUERCIO, L. L. Aluminum Effects on Nitrogen Uptake and Nitrogen Assimilating Enzymes in Maize Genotypes with Contrasting Tolerance to Aluminum Toxicity. **J. Plant Nutr.**, v.26, p.31-61, 2003.

QUAGGIO, J. A. **Acidez e calagem em solos tropicais**. Campinas: Instituto Agronomico de Campinas, 2000.

QUARTIN, V. L.; AZINHEIRA, H. G.; NUNES M. A. Phosphorus deficiency is responsible for biomass reduction of triticale in nutrient solution with aluminum. **J. Plant Nutr.**, v.24, p.1901–1911, 2001.

RENGEL, Z.; ROBINSON, D. L. Competitive Al^{3+} inhibition of net Mg^{2+} uptake by intact *Lolium multiflorum* roots. I. Kinetics. **Plant Physiol.**, v.91, p.1407-1413, 1989.

RENGEL, Z. Competitive Al^{3+} inhibition of net Mg^{2+} uptake by intact *Lolium multiflorum* roots. II. Plant age effects. **Plant Physiol.**, v.93, p.1261-1267, 1990.

ROY, A. K., SHARMA, A.; TALUKDER, G. Some Aspects of Aluminum Toxicity in Plants. **Bot. Rev.**, v.54, p.145-178, 1988.

SALVADOR, J. O.; MOREIRA, A.; MALAVOLTA, E.; CABRAL, C.P. Influência do alumínio no crescimento e na acumulação de nutrientes em mudas de goiabeira. **R. Bras. Ci. Solo**, v.24, p.787-796, 2000.

SAMAC, D.A.; TESFAYE, M. Plant improvement for tolerance to aluminum in acid soils - a review. **Plant Cell. Tiss. Organ. Cult.**, v.75, p.189–207, 2003.

SEAGRI - Secretaria da Agricultura Irrigação e Reforma Agrária. **Região oeste da Bahia**, 2008.

SIMON, L.; SMALLEY T. J.; JONES, J. B. Jr; LASSEIGNE, F. T. Aluminum toxicity in tomato. Part 2. Leaf gas exchange, chlorophyll content, and invertase activity. **J. Plant Nutr.**, v.17, p.307-317, 1994.

TAYLOR G. J. Current views of the aluminum stress response: the physiological basis of tolerance. **Plant Biochem. Physiol.**, v.10, p.57–93, 1991.

USDA, **United States Department of Agriculture**. Disponível em: http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome?navid=USDA_PUBS. Acesso em dezembro, 2011.

VITORELLO, V. A.; CAPALDI, F. R.; STEFANUTO, V. A.; Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. **Braz. J. plant Physiol.**, v.17, p.129-143, 2005.

YANG, Y. H.; CHEN, S. M. Physiological effects of aluminium/calcium ratios on aluminium toxicity of mungbean seedling growth. **J. plant nutr.**, v.24, p.585-597, 2001.

XIAO, X. X. **The physiological and biochemical response of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) to aluminum stress and rectification of aluminum toxicity**. Ph.D thesis, Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University (in Chinese). 2002.

ZHAO, X. J.; SUCOFF, E.& STADELMANN, E. J. Al^{3+} and Ca^{2+} alteration of membrane permeability of *Quercus rubre* root cortex cells. **Plant Physiol.**, v.83, p.159-162, 1987.

ZHENG, S. J.; YANG, J. L.; He, Y. F.; Yu, X. H.; ZHANG, L.; YOU, J. F.; SHEN, R. F. & MATSUMOTO, H. Immobilization of Aluminum with Phosphorus in Roots Is Associated with High Aluminum Resistance in Buckwheat. **Plant Physiol.**, v.138, p.297–303, 2005.

Capítulo 1

A TOLERÂNCIA DE PLANTAS DE GIRASSOL AO ALUMÍNIO ESTÁ ASSOCIADA À MANUTENÇÃO DO TEOR DE FÓSFORO NAS RAÍZES ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Capítulo submetido ao periódico Revista Brasileira de Ciências do Solo

A TOLERÂNCIA DE PLANTAS DE GIRASSOL AO ALUMÍNIO ESTÁ ASSOCIADA À MANUTENÇÃO DO TEOR DE FÓSFORO NAS RAÍZES⁽²⁾

Daniel da Silva de Jesus⁽³⁾ & André Dias de Azevedo Neto⁽⁴⁾

RESUMO

A cultura do girassol é considerada uma das mais promissoras para o agronegócio. Entretanto, apesar de exibir adaptabilidade em diferentes condições de solo e clima, é uma planta muito sensível ao alumínio (Al). Considerando que as espécies vegetais desenvolveram diferentes mecanismos para conviver com o Al, este trabalho avaliou o efeito do estresse por Al sobre o crescimento e teores de NPK em 25 genótipos de girassol. Os resultados obtidos mostraram que Catissol, EXP 11-26, H-860 HO e H-358 foram os mais tolerantes e IAC Uruguai, AG 960, EXP 44-49, IAC Iarama, BRS-G27, EXP 887 e H-251 os mais sensíveis, quando comparados entre si. Também foi verificado que os teores de N e K nas folhas e raízes e o teor de P nas folhas não apresentaram relação com a tolerância. Em contraste, a manutenção do teor de P nas raízes das plantas estressadas, parece desempenhar um papel importante na tolerância ao Al em girassol, sugerindo sua utilização como um marcador fisiológico para a seleção de tolerância ao Al nesta espécie.

Termos de indexação: nutrição mineral, crescimento, seleção, tolerância ao alumínio, *Helianthus annuus*.

SUMMARY: ALUMINUM TOLERANCE IN SUNFLOWER PLANTS IS ASSOCIATED WITH THE MAINTENANCE OF PHOSPHORUS CONTENT IN THE ROOTS

⁽²⁾Parte da dissertação de Mestrado do primeiro autor apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Solos e Qualidade de Ecossistemas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB. Recebido para a publicação em / / .

⁽³⁾Doutorando do programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS. E-mail: dasilva_jesus@yahoo.com.br

⁽⁴⁾Professor Adjunto do Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, UFRB, Bolsista CNPq. Campus Universitário de Cruz das Almas, Cruz das Almas (BA), CEP 44380-000. E-mail: andre@ufrb.edu.br.

Sunflower crop is regarded as the most promising for agribusiness. However, despite displaying adaptable to different soil and climate conditions this plant is very sensitive to aluminum (Al). Considering that the different plant species have developed different mechanisms to cope with Al, this work evaluated the effect of Al stress on plant growth and NPK contents in 25 sunflower genotypes. The results showed that Catissol, EXP 11-26, H-860 HO and H-358 were the most Al-tolerant and IAC-Uruguai, AG 960, EXP 44-49, IAC Iarama, BRS-G27, EXP 887 and H-251 the most Al-sensitive, when compared among them. We also observed that N and K contents in leaves and roots and P content in the leaves were not related with Al-tolerance. In contrast, the maintenance of P content in roots of stressed plants seems to play an important role in Al-stressed sunflower plants, suggesting that it could be used as a physiological marker during the screening for Al tolerance in this species.

Index terms: mineral nutrition, growth, screening, aluminum tolerance, Helianthus annuus

INTRODUÇÃO

A cultura do girassol é considerada uma das mais promissoras para o agronegócio brasileiro, apresentando grandes possibilidades de expansão, a médio e longo prazo. Atualmente no Brasil a produção, o processamento e o consumo desta oleaginosa e seus derivados, estão ainda aquém da capacidade (LAZZAROTTO et al., 2005). O girassol exibe adaptabilidade em diferentes condições de solo e clima tolerando, por exemplo, baixas temperaturas e situações de déficit hídrico (CASTRO & OLIVEIRA, 2005). Em relação a outras culturas, esta espécie não exige condições especiais de fertilidade do solo. Entretanto, exige a avaliação da acidez do solo, pois o girassol é uma planta muito sensível a estas condições e não tolera níveis de saturação por alumínio trocável superiores a 5% (BLAMEY et al., 1987; CASTRO & OLIVEIRA, 2005).

A presença do alumínio tóxico é amplamente reconhecida como danosa ao desenvolvimento de culturas agrícolas. A raiz é o sitio de contato primário entre a planta e o alumínio, podendo sofrer mudanças no desenvolvimento e na

morfologia. Estas alterações diminuem a capacidade da planta em obter água e nutrientes do solo, reduzindo a produtividade e aumentando a sensibilidade à seca (SAMAC & TESFAYE, 2003; PANDA et al., 2009). Os danos gerados no sistema radicular culminam na interferência do potencial da planta em explorar recursos minerais do solo, podendo levar a distúrbios na absorção e na distribuição dos elementos nas plantas.

O Al também afeta os teores de N, podendo ocorrer alterações na redução e na assimilação do nitrato nas plantas (JUSTINO et al., 2006). Em estudo realizado com sorgo foi verificado que o alumínio diminuiu os níveis de N total em cultivares sensíveis, enquanto que nos tolerantes nenhuma alteração consistente foi encontrada (KELTJENS & ULDEN, 1987). Em milho, Purcino et al., (2003) indicaram que o alumínio diminui os níveis de nitrogênio independente do grau de tolerância ao estresse. Resultados como estes sugerem que o efeito do Al sobre os níveis de N nas plantas depende da espécie.

A interação entre a toxidez de alumínio com os níveis de fósforo, por exemplo, tem sido bastante investigada, devido à semelhança dos resultados encontrados em muitas espécies. Segundo, Taylor, (1991) complexos insolúveis de alumínio com o fósforo, são formados e podem se acumular na superfície, na parede celular ou no interior de células da raiz. Entretanto, outros pesquisadores sugerem que a tolerância está associada com a acumulação de Al e P nas raízes (ZHENG et al., 2005; SUN et al., 2008).

Alguns estudos indicam que o estresse por alumínio afeta a absorção de potássio nas espécies vegetais (MACEDO & VERONIQUE, 2008; SILVA et al., 2009). Um mecanismo bastante aceito entre os pesquisadores é que o Al age bloqueando canais de K^+ na membrana plasmática (KOCHIAN, 1995). Em linhagens sensíveis de milho, reduções mais pronunciadas dos níveis de K^+ foram acompanhadas por um maior acúmulo de Al nas raízes (GIANNAKOULA et al., 2008). Em arroz, os teores de K não são alterados pelo Al em um cultivar de tolerante, mas decrescem no sensível, sendo sugerido que este parâmetro pode ser um marcador nutricional para avaliação da tolerância ao Al nesta espécie (MACEDO & VERONIQUE, 2008). Estas pesquisas demonstram a existência desempenho diferenciado tanto entre as espécies quanto entre

cultivares sob estresse por Al, indicando a necessidade de mais pesquisas nesta área do conhecimento.

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do estresse por Al sobre o crescimento e teores de NPK em 25 genótipos de girassol.

MATERIAIS E MÉTODOS

Sementes de 25 diferentes genótipos de girassol foram semeadas em copos plásticos de 200 mL, contendo areia lavada. As sementes foram irrigadas diariamente com solução nutritiva de Clark (Clark, 1975) contendo 0,0 ou 0,15 mmol L⁻¹ de AlCl₃.6H₂O. Sete dias após a emergência, as plântulas de cada tratamento foram transferidas para recipientes plásticos contendo 12 L da mesma solução nutritiva utilizada na germinação. O pH foi ajustado em 4,0 ± 0,2, sendo monitorado diariamente e corrigido com HCl ou NaOH. As soluções nutritivas foram renovadas semanalmente e o volume completado diariamente com água destilada. O sistema foi mantido sob arejamento intermitente, de 15 minutos a cada três horas, por meio de compressor de ar acoplado a um temporizador.

Trinta dias após a emergência as plantas foram coletadas, separadas em folhas, caules e raízes, e transferidas para estufa com circulação forçada por 72 h a 65°C. Após a secagem, o material foi pesado determinando-se desta forma a massa seca total das plantas.

Para a determinação dos teores de minerais foram elaborados extratos a partir de 0,1 g de tecido vegetal (folhas e raízes) seco triturado em moinho. Procedeu-se em seguida a digestão ácida das amostras sendo utilizada uma mistura de H₂SO₄(conc) e H₂O₂ a 30%, conforme descrito por Jones (2001). Em seguida, o digerido foi diluído para 100 mL com água deionizada para as determinações espectrofotométricas de fósforo e de nitrogênio, conforme descrito em Faithfull (2002) e Weatherburn (1967), respectivamente, e para a determinação fotométrica de potássio. As análises de cada extrato foram realizadas em duplicata.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em um arranjo fatorial 2 (níveis de Al) x 25 (genótipos), com quatro repetições. Os

dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A massa seca total de todos os genótipos avaliados foi severamente afetada pela presença de 0.15 mM de $AlCl_3$ na solução nutritiva. Dessa forma, pode-se verificar na Figura 1 que as reduções na produção de massa seca variaram de 70% a 93%. Estes resultados estão de acordo com os de outros autores, os quais caracterizam o girassol como uma espécie sensível ao Al (BLAMEY et al., 1987; CASTRO & OLIVEIRA, 2005). O Al é altamente tóxico para as plantas, inicialmente causando a inibição do alongamento radicular, em decorrência de danos na estrutura do ápice da raiz. Essa restrição afeta a absorção de nutrientes pelas raízes e, conseqüentemente, o crescimento e o desenvolvimento são seriamente prejudicados (ZHENG, 2010). Na parte aérea das plantas os efeitos tóxicos do Al comprometem a integridade do aparato fotossintético (CHEN et al., 2010) e do sistema fotoprotetor (CHEN, 2006), fundamentais para os processos de produção de biomassa vegetal.

O critério adotado para classificar os genótipos como tolerantes ou sensíveis foi a produção relativa de MST. Assim, a análise estatística mostra que os genótipos Catissol (70% redução) e EXP 11-26 (72,4% red.), H-860 HO (72,5% red.), H-358 (73,5% red.) foram tolerantes, enquanto IAC Uruguai (93% red.), AG 960 (92,2% red.), EXP 44-49 (90,1% red.), IAC Iarama (89,2% red.), BRS-G27 (89% red.), EXP 887 (88,3% red.) e H-251 (87,1% red.) foram sensíveis ao estresse por Al, quando comparados entre si.

Na tabela 1, verifica-se que os teores de N em ambas as partes apresentaram pouca variação entre os genótipos, tanto em condições controle como de estresse por alumínio. Por outro lado, avaliando-se o efeito do alumínio sobre os teores deste elemento nas folhas de cada genótipo, nota-se que os níveis de N não foram alterados pelo estresse. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Graham (2001) e Chen et al. (2006), mas diferem daqueles reportados por Cambraia et al. (1990) e Justino et al. (2006). Resultados contrastantes podem estar relacionados, entre outros fatores, à espécie estudada e ao tempo de exposição e forma de aplicação do estresse.

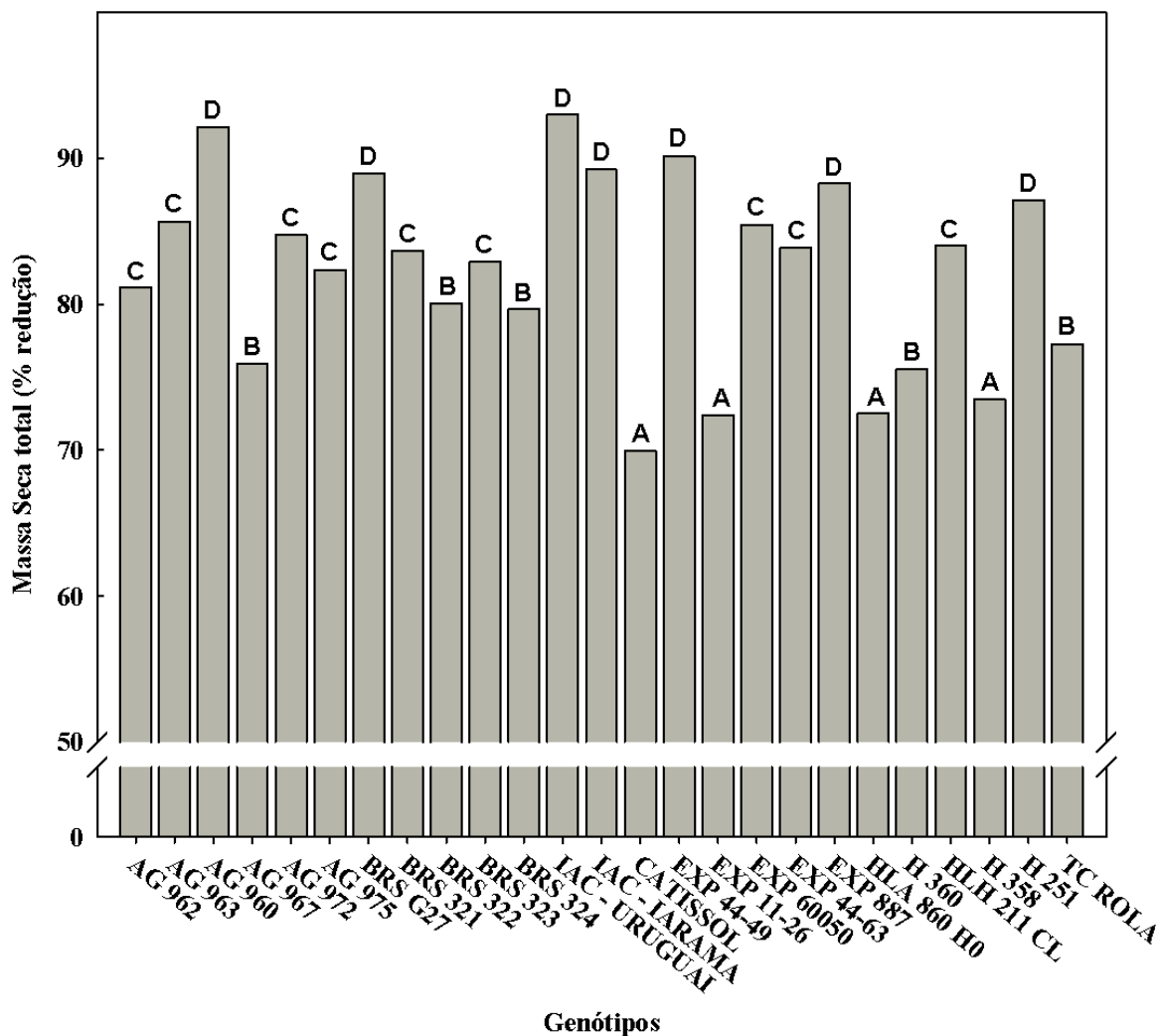


Figura 1. Percentagem de redução da massa seca total de 25 diferentes genótipos de girassol cultivados em casa de vegetação durante 20 dias em solução nutritiva de Clark contendo $0,15 \text{ mmol L}^{-1}$ de AlCl_3 . Médias seguidas de mesmas letras, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 1. Teores de N, P e K em folhas e raízes de 25 diferentes genótipos de girassol, cultivados em casa de vegetação por 20 dias em solução nutritiva de Clark (controle) ou solução nutritiva contendo 0,15 mmol L⁻¹ de AlCl₃ (E). Genótipos caracterizados como sensíveis (S) e genótipos caracterizados como tolerantes (T).

	N (mmol g ⁻¹ MS)				P (mmol g ⁻¹ MS)				K (mmol g ⁻¹ MS)			
	Folha		Raiz		Folha		Raiz		Folha		Raiz	
	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E
AG 962	3,44Aa	3,37Aa	1,89Aa	2,53Aa	0,086Aa	0,088Aa	0,090Bb	0,148Da	1,54Aa	1,56Ba	1,86Ba	1,83Bb
AG 963	3,67Aa	3,47Aa	2,45Aa	2,55Aa	0,083Aa	0,076Ab	0,083Bb	0,149Da	1,35Ba	1,19Da	1,77Ca	1,70Ba
AG 960 (S)	2,50Ba	1,97Ba	2,45Ba	1,81Aa	0,075Ba	0,073Ba	0,084Bb	0,143Da	1,45Ba	1,19Db	1,87Ba	1,16Db
AG 967	3,51Aa	3,36Aa	2,55Aa	2,66Aa	0,087Aa	0,078Ab	0,110Ab	0,181Ba	1,44Ba	1,31Ca	2,01Ba	1,87Bb
AG 972	3,43Aa	3,20Aa	2,72Aa	2,73Aa	0,080Aa	0,076Aa	0,082Bb	0,158Da	1,58Aa	1,44Ba	1,99Ba	1,92Aa
AG 975	3,55Aa	3,33Aa	1,93Aa	1,51Ba	0,079Aa	0,076Aa	0,090Bb	0,132Ea	1,40Bb	1,63Aa	2,02Ba	2,04Aa
BRS G27 (S)	3,55Aa	3,26Aa	1,77Aa	1,84Aa	0,082Aa	0,073Bb	0,099Bb	0,191Ba	1,87Aa	1,44Bb	2,03Ba	1,79Bb
BRS 321	3,34Aa	3,26Aa	1,52Aa	1,76Aa	0,077Ba	0,073Ba	0,091Bb	0,165Ca	1,59Aa	1,46Ba	1,74Ca	1,73Ba
BRS 322	3,16Aa	2,96Aa	2,02Aa	1,94Aa	0,079Aa	0,076Aa	0,078Bb	0,148Da	1,37Ba	1,09Db	1,90Ba	1,67Bb
BRS 323	3,04Aa	2,99Aa	1,63Aa	1,82Ba	0,082Aa	0,078Aa	0,095Bb	0,164Ca	1,23Ba	1,05Da	1,53Da	1,65Ba
BRS 324	3,03Aa	2,80Aa	1,97Aa	1,91Aa	0,076Ba	0,073Ba	0,094Bb	0,162Ca	1,57Aa	1,54Ba	1,94Ba	1,61Bb
URUGUAI (S)	2,59Ba	2,44Ba	1,80Aa	1,48Ba	0,070Ba	0,070Ba	0,089Bb	0,154Da	1,34Ba	1,34Ca	1,49Da	1,45Ca
IARAMA (S)	2,48Ba	2,38Ba	0,76Ba	0,99Ba	0,077Ba	0,075Ba	0,100Bb	0,238Aa	1,45Ba	1,35Ca	1,95Ba	1,20Db
CATISSOL (T)	2,50Ba	2,55Ba	2,31Aa	1,01Bb	0,076Ba	0,081Aa	0,116Aa	0,114Fa	1,40Bb	1,68Aa	2,23Aa	1,66Bb
EXP 44-49 (S)	2,02Ba	2,10Ba	0,56Ba	1,07Ba	0,073Ba	0,077Aa	0,093Bb	0,144Da	1,39Bb	1,69Aa	1,91Ba	1,25Db
EXP 11-26 (T)	2,39Ba	2,67Aa	2,14Aa	0,94Bb	0,072Bb	0,081Aa	0,122Aa	0,132Ea	1,87Aa	1,36Cb	2,27Aa	1,68Bb
EXP 60050	3,32Aa	3,18Aa	1,90Aa	2,11Aa	0,081Aa	0,078Aa	0,091Bb	0,195Ba	1,59Aa	1,50Ba	1,75Ca	1,73Ba
EXP 44-63	3,27Aa	3,06Aa	2,21Aa	2,17Aa	0,081Aa	0,074Bb	0,093Bb	0,163Ca	1,25Ba	1,08Da	2,01Ba	1,88Aa
EXP 887 (S)	3,42Aa	2,92Aa	1,87Aa	2,07Aa	0,081Aa	0,078Aa	0,090Bb	0,171Ca	1,40Ba	1,36Ca	1,93Ba	1,77Ba
HLA 860 HO (T)	3,09Aa	3,01Aa	2,34Aa	0,90Bb	0,072Bb	0,080Aa	0,101Bb	0,139Ea	1,41Ba	1,43Ba	2,31Aa	1,69Bb
H 360	2,52Ba	2,05Ba	0,64Ba	1,19Ba	0,083Aa	0,078Aa	0,103Ab	0,193Ba	1,39Ba	1,28Ca	2,16Aa	1,48Cb
HLA 211 CL	2,50Ba	2,17Ba	0,57Ba	1,40Ba	0,076Ba	0,071Ba	0,096Bb	0,226Aa	1,47Ba	1,25Cb	2,00Ba	1,70Bb
H 358 (T)	3,25Aa	2,91Aa	0,56Ba	0,82Ba	0,070Ba	0,076Aa	0,091Bb	0,123Fa	1,26Ba	1,23Ca	1,91Ba	1,33Db
H251 (S)	2,51Ba	2,17Ba	0,57Ba	1,07Ba	0,078Aa	0,075Ba	0,093Bb	0,183Ba	1,30Ba	1,30Ca	1,71Aa	1,52Ca
TC ROLA	2,34Ba	2,14Ba	0,58Ba	0,91Ba	0,079Aa	0,076Aa	0,096Bb	0,149Da	1,41Ba	1,34Ca	1,51Ba	1,70Ba

Médias seguidas de mesmas letras, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas para cada nutriente em cada parte da planta, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Os teores de N nas raízes variaram significativamente, entre as plantas, tanto no tratamento controle (0,56 a 2,72 mmol g⁻¹ MS) como no de estresse (0,82 a 2,73 mmol g⁻¹ MS). Avaliando-se o efeito do Al sobre os teores radiculares de N em cada genótipo verifica-se uma redução em apenas três (Catissol, EXP 11-26 e HLA 860 HO), todos tolerantes.

Os efeitos do estresse sobre os teores de N nas raízes destes genótipos pode ter sido o resultado de um efeito de diluição, haja vista o maior crescimento desta região nestes genótipos (dados não publicados). Desta forma, não foi verificada uma relação deste fenômeno com a tolerância ou sensibilidade dos genótipos de girassol ao estresse por Al.

O estresse por Al reduziu os teores de P nas folhas de AG-963, AG-967, BRS-G27 e EXP 44-63 e aumentou em EXP 11-26 e HLA-860-HO (Tabela 1). Alguns estudos mostram que a translocação do P para a parte aérea das plantas submetidas ao Al pode ser afetada e que este fenômeno está

relacionado com a tolerância ao Al (CALBO & CAMBRAIA, 1980; MARCKLON & SIM, 1992). Entretanto, neste estudo a maioria dos genótipos avaliados não apresentou alteração nos níveis de P foliar. Wenzl et al. (2002), avaliando dois cultivares de *Brachiaria*, diferindo no grau de tolerância, indicaram que os teores de fósforo nas folhas não foram alterados pela presença de Al em ambos os cultivares. A manutenção dos teores de P nas folhas de plantas de sorgo é uma característica importante, evitando o comprometimento do metabolismo deste nutriente (PEREIRA et al., 2008).

Nas raízes, os teores de P foram semelhantes entre as plantas controle, em contraste com as estressadas, cujos valores oscilaram entre 0,114 e 0,238 mmol g⁻¹ MS (Tabela 1), indicando desempenho diferenciado entre os genótipos de girassol na presença do Al tóxico. Com exceção dos genótipos Catissol e EXP 11-26 (ambos tolerantes) foram verificados aumentos das concentrações de P radicular em todos os outros genótipos, sendo este efeito mais pronunciado em IAC Iarama (137%).

O fósforo pode ser acumulado na forma de precipitados insolúveis com o alumínio na superfície da raiz, na parede celular ou nas células da raiz (TAYLOR, 1991). Esta interação Al-P pode estar relacionada a uma diminuição dos níveis de Al translocado para a parte aérea, o que poderia comprometer ainda mais a integridade das plantas Zheng et al., (2005). Estes autores reportaram que a tolerância de genótipos de *Fygopyrum esculentum* ao Al poderia estar relacionada ao maior acúmulo de P e de Al nas raízes. Em contraste, outros autores associaram o grau de tolerância a uma menor precipitação de P nas raízes (CALBO & CAMBRAIA, 1980; DINIZ & CALBO, 1990), o que está de acordo com os dados obtidos neste trabalho.

A Figura 2 mostra a relação entre os percentuais de aumento do teor de fósforo nas raízes e a percentagem de redução da massa seca dos 25 genótipos avaliados. Observa-se que os genótipos com menores reduções no crescimento (tolerantes) também apresentaram os menores incrementos nos níveis de fósforo radicular, evidenciando que este parâmetro pode ser um marcador nutricional útil na identificação de genótipos de girassol tolerantes ao Al.

Com relação ao K, os resultados mostram que o alumínio interfere de maneira muito diferente nos genótipos testados (Tabela 1).

Nas folhas, o estresse aumentou os teores de K nos genótipos AG-975, Catissol e EXP 44-49 e reduziu em AG-960, BRS-G27, BRS-322, EXP 11-26 e HLA-211-CL. Nas raízes, a presença do Al na solução nutritiva reduziu os teores de K em quatorze genótipos, independentemente do nível de tolerância ao estresse, nos demais não foram verificadas alterações. Os efeitos do alumínio sobre o K podem variar dependendo da espécie, do genótipo e da intensidade do estresse.

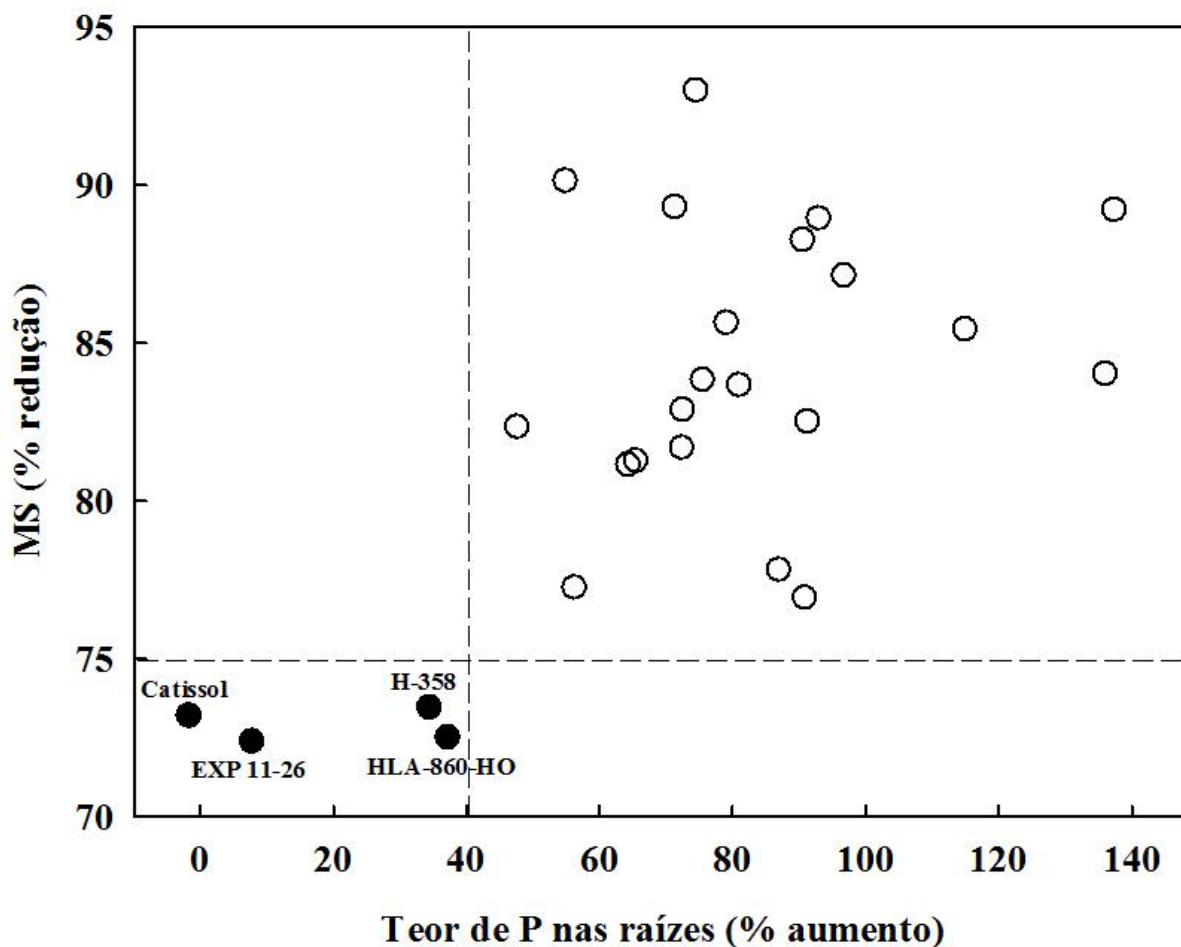


Figura 2. Relação entre a percentagem de aumento do teor de fósforo nas raízes e a percentagem de redução da massa seca de 25 diferentes genótipos de girassol cultivados em casa de vegetação durante 20 dias sob $0,15 \text{ mmol L}^{-1}$ de AlCl_3 .

Em citros, as concentrações de K tanto na raiz quanto na parte aérea só foram afetadas quando as plantas foram submetidas a concentrações de Al maiores que $178 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ (LIN & MYHRE, 1991). Giannakoula et al., (2008) encontraram diminuição dos teores de K nas raízes de ambos genótipos,

sensível e tolerante, com o incremento de Al na solução nutritiva. Por outro lado, Lin & Chen, (2011) não encontraram alterações nos teores de K em quatro cultivares de *Ananas comosus* L. expostas a concentrações de 0,1 a 0,3 mmol L⁻¹ de Al. Nesta pesquisa não foram encontradas evidências que relacionassem os teores de K à tolerância ou sensibilidade do girassol ao estresse por Al.

Considerando que a tolerância ao Al é uma resposta de caráter multigênico (BIANCHI-HALL et al., 2000) e que os mecanismos fisiobioquímicos envolvendo o fósforo e a tolerância ao Al ainda não estão bem elucidados, nossos resultados indicam a necessidade de investigações futuras sobre os mecanismos de tolerância ao alumínio em plantas de girassol.

CONCLUSÕES

1. Os genótipos Catissol, EXP 11-26, H-860-HO e H-358 foram os mais tolerantes e IAC Uruguai, AG-960, EXP 44-49, IAC Iarama, BRS-G27, EXP 887 e H-251 os mais sensíveis ao Al.

2. Os teores de N e K nas folhas e raízes e o de P nas folhas não apresentaram relação com a tolerância, isto é, não foram considerados bons indicadores fisiológicos para a tolerância ao Al.

3. A manutenção do teor de P nas raízes das plantas estressadas parece desempenhar um papel importante na tolerância do girassol ao estresse por Al, sugerindo sua utilização como marcador fisiológico durante a seleção para tolerância ao Al nesta espécie.

LITERATURA CITADA

BALIGAR, V. C.; FAGERIA, N.K. Soil Aluminum Effects on Growth and Nutrition of Cacao. **Soil Sci. Plant Nutr.**, v.51,p.709-713, 2005.

BIANCHI-HALL, C. M.; CARTER, T. E. Jr.; BAILEY, M. A.; MIAN, M. A. R.; RUFTY, T. W.; ASHLEY, D. A.; BOERMA, H. R.; ARELLANO, C.; HUSSEY, R. S.; PARROT, W. A. Aluminium tolerance associated With quantitative trait loci derived from soybean PI 416937 in hydroponics. **Crop Sci.**, v.40, p.538-545, 2000.

- BLAMEY, F. P. C.; EDWARDS, D. G.; ASHER, C. J. **Nutritional disorders of sunflower**. Brisbane: University of Queensland, 1987. p.72.
- CALBO, A. G.; CAMBRAIA, J. Efeito do alumínio sobre a composição mineral de dois cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench). **Rev. Ceres**, Viçosa, v.27, p.369-378, 1980.
- CAMBRAIA, J., PIMENTA, J. A., ESTEVÃO, M. M.; SANT'ANNA, R. Aluminum effects on nitrate uptake and reduction in sorghum. **J. Plant Nutr.**, v.12, p.1435-1445, 1989.
- CAMBRAIA, J.; GOMES, M.M. S.; SANT'ANNA, R.; ESTEVÃO, M. M. Efeito de diferentes níveis de alumínio na solução nutritiva sobre a composição da fração nitrogenada em sorgo. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, v.2, p.47-52, 1990.
- CASTRO, C. de; OLIVEIRA, F.A. de. Nutrição e adubação do girassol. In: LEITE, R.M.V.B. de C.; BRIGHENTI, A.M.; CASTRO, C. (ED.). **Girassol no Brasil**, Londrina: Embrapa Soja, 2005. p.641.
- CHEN, L. S. Physiological Responses and Tolerance of Plant Shoot to Aluminum Toxicity. **J. Plant Phys. Mol. Bio.**, v.32, p.143-155, 2006.
- CHEN, L. S.; QI, Y. P.; JIANG, H. X.; YANG, L. T.; YANG, G. H. Photosynthesis and photoprotective systems of plants in response to aluminum toxicity. **Afri. J. Biot.**, v.9 p.9237-9247, 2010.
- CLARCK, J. Characterization of phosphatase of intact maize roots. **J. Agri. Food Chem.**, v.23, p.458-460, 1975.
- DINIZ, V. de P. M.; CALBO, M.E.R. Efeito da aplicação foliar de fósforo sobre a toxidez de alumínio em plantas de tomate. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.** v.2, p.57-61, 1990.
- FAITHFULL, N.T. **Methods in agricultural chemical analysis: a practical handbook**. Wallingford: CABI Publishing, 2002. 266p.
- GALVEZ, L.; CLARK, R.B. Nitrate and ammonium uptake and solution pH changes for Al-tolerant and Al-sensitive sorghum (*Sorghum bicolor*) genotypes grown with and without aluminium. **Plant Soil**, v.134 p.179-188, 1991.

- GIANNAKOULA, A.; MOUSTAKASA, M.; MYLONAB P.; PAPADAKISC, I.; YUPSANISD, T. Aluminum tolerance in maize is correlated with increased levels of mineral nutrients, carbohydrates and proline, and decreased levels of lipid peroxidation and Al accumulation. **J. Plant Phys.** v.165, p.385-396, 2008.
- JONES Jr., J. B. **Laboratory guide for conducting soil tests and plant analysis**. Boca Raton: CRC Press, 2001, p.363.
- JUSTINO, G. C.; CAMBRAIA, J.; OLIVA, M. A.; OLIVEIRA, J. A. de. Absorção e redução de nitrato em duas cultivares de arroz na presença de alumínio. **Pesq. Agrop. Bras.**, v.41, p.1285-1290, 2006.
- KELTJENS, W. G.; ULDEN, P. S. R. van. Effects of Al on nitrogen (NH_4^+ and NO_3) uptake, nitrate reductase activity and proton release in two sorghum cultivars differing in Al tolerance. **Plant Soil**, v.104, p.227-234, 1987.
- KOCHIAN, L.V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.46, p.237-260, 1995.
- LAZZAROTTO, J. J.; ROESSING, A. C.; MELLO, H. C. O agronegócio do girassol no Brasil. In: LEITE, R.M.V.B. de C.; BRIGHENTI, A.M.; CASTRO, C. (ED.). **Girassol no Brasil**, Londrina: Embrapa Soja, 2005. p.641.
- LIN, Z.; MYHRE, D. L. Differential response of citrus rootstocks to aluminum levels in nutrient solutions: II. Plant mineral concentrations. **J. Plant. Nutr.**, v.14, 1239–1254, 1991.
- MACÊDO, C.E.C.; JAN, V.V.S. Effect of aluminum stress on mineral nutrition in rice cultivars differing in aluminum sensitivity. **Rev. Bras. Eng. Agr. Amb.**, v.12, p.363–369, 2008.
- MARCKLON, A. E. S.; SIM, A. Modifying effects of a non-toxic level of aluminium on phosphate fluxes and compartmentation in root cortex of intact ryegrass seedlings. **J. Exp. Bot.**, v.43, p.1483-1490, 1992.
- PANDA, S. K.; BALUSKA, F.; MATSUMOTO, H. Aluminum stress signaling in plants. **Plant Sign. & Beh.** v.4, p.592-597, 2009.

- PEREIRA, J.M.; CAMBRAIA, J.; FONSECA JÚNIOR, E.M. da; RIBEIRO, C. Efeito do alumínio sobre a absorção, o acúmulo e o fracionamento do fósforo em sorgo. **Bragantia**, v.67, p.961-967, 2008.
- PURCINO, A. A. C.; ALVES, V. M. C.; PARENTONI, S. N.; BELELE, C. L.; LOGUERCIO, L. L. Aluminum Effects on Nitrogen Uptake and Nitrogen Assimilating Enzymes in Maize Genotypes with Contrasting Tolerance to Aluminum Toxicity. **J. Plant Nutr.**, v.26, p.31-61, 2003.
- SAMAC, D.A.; TESFAYE, M. Plant improvement for tolerance to aluminum in acid soils – a review. **Plant Cell**, v.75, p.189–207, 2003.
- SILVA, S.; PINTO-CARNIDE, O.; MARTINS-LOPES P.; MATOS, M.; GUEDES-PINTO H.; SANTOS, C. Differential aluminium changes on nutrient accumulation and root differentiation in an Al sensitive vs. tolerant wheat. **Environ. Exp. Bot.**, v.68, p.91-98, 2010.
- SUN, Q. B.; SHEN, R. F.; ZHAO, X. Q.; CHEN, R. F.; DONG, X. Y. Phosphorus Enhances Al Resistance in Al-resistant *Lespedeza bicolor* but not in Al-sensitive *L. cuneata* Under Relatively High Al Stress. **Annu. Bot.**, v.102 p.795–804, 2008.
- TAYLOR G.J. Current views of the aluminum stress response: the physiological basis of tolerance. **Curr. Top. Plant Biochem. Physiol.**, v.10, p.57-93, 1991.
- WEATHERBURN, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Anal. Chem.**, v. 39, p. 971-974, 1967.
- WENZL, P.; MAYER, J.E.; RAO, I.M. Aluminum stress inhibits accumulation of phosphorus in root apices of aluminum-sensitive but not aluminum-resistant *Brachiaria* cultivar. **Plant Nutr.**, v.25, p.1821–1828, 2002.
- ZHENG, S.J. Crop production on acidic soils: overcoming aluminium toxicity and phosphorus deficiency. **Annu. Bot.**, v.106, p.183–184, 2010.
- ZHENG, S. J.; YANG, J. L.; He, Y. F.; Yu, X. H.; ZHANG, L.; YOU, J. F.; SHEN, R. F.; MATSUMOTO, H. Immobilization of Aluminum with Phosphorus in Roots Is Associated with High Aluminum Resistance in Buckwheat. **Plant Physiol.**, v.138, p.297–303, 2005.

Capítulo 2

**SOLUTOS ORGÂNICOS, DANOS DE MEMBRANAS E TEOR RELATIVO DE
ÁGUA E DE PIGMENTOS EM FOLHAS E RAÍZES DE VARIEDADES DE
GIRASSOL COM TOLERÂNCIA DIFERENCIADA AO ALUMÍNIO**

SOLUTOS ORGÂNICOS, DANOS DE MEMBRANAS E TEOR RELATIVO DE ÁGUA E DE PIGMENTOS EM FOLHAS E RAÍZES DE VARIEDADES DE GIRASSOL COM TOLERÂNCIA DIFERENCIADA AO ALUMÍNIO

Daniel da Silva de Jesus & André Dias de Azevedo Neto

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar variáveis fisiológicas e bioquímicas das variedades de girassol, Catissol e IAC-Uruguai, respectivamente tolerante e sensível ao Al. Sementes destas variedades foram germinadas em papel germitest. Sete dias após a germinação as plântulas foram transferidas para solução nutritiva ou solução nutritiva contendo 0,15 mM de $AlCl_3$. Com 1, 5, 10 e 15 dias de estresse, foram coletadas amostras de folhas e raízes e determinados os teores de carboidratos solúveis, prolina livre, aminoácidos livres e proteínas solúveis, os danos membranares e o teor relativo de água e de pigmentos. Foram verificadas reduções na integridade das membranas e no teor relativo de água e de pigmentos apenas na variedade IAC-Uruguai, em contraste com a variedade Catissol. Os resultados de carboidratos solúveis, aminoácidos e prolina livre em ambas as variedades sugerem que o acúmulo destes solutos, principalmente nas raízes de Catissol, pode ter um importante papel na tolerância do girassol ao estresse por Al.

Termos de indexação: pigmentos, teor relativo de água, danos de membrana, *Helianthus annuus*.

SUMMARY: ORGANIC SOLUTES, MEMBRANE DAMAGE AND RELATIVE WATER CONTENT AND PIGMENTS IN LEAVES AND ROOTS OF VARIETIES OF THE SUNFLOWER WITH ALUMINUM TOLERANCE DIFFERENTIATED

This work aimed to evaluate the physiological and biochemical sunflower varieties, Catissol and IAC-Uruguai, respectively tolerant and sensitive to Al. Seeds of these varieties were germinated in germitest paper. Seven days after

germination the seedlings were transferred to nutrient solution or nutrient solution containing 0,15mM of AlCl₃. With 1, 5, 10 and 15 days of stress, were collected samples of leaves and roots and measured soluble carbohydrates, free proline, free amino acids and soluble proteins, membrane integrity absolute percentual, relative water content and pigments. Reductions observed in the percentage of membrane integrity, TRA and pigments only in the IAC-Uruguai, in contrast to the Catissol variety. The results of soluble carbohydrates, amino acids and free proline in both varieties suggest that the accumulate of these solutes, mainly in the roots of Catissol, may have an important role in stress tolerance of sunflower to Al.

Index terms: pigments, relative water content, membrane damage, Helianthus annuus.

INTRODUÇÃO

A toxidez por alumínio figura entre os mais importantes fatores limitantes do crescimento e da produtividade vegetal (BARCELÓ & POSCHENRIEDER, 2002; KOCHIAN et al., 2005). Em solos com baixo pH, o alumínio é solubilizado e mesmo em concentrações micromolares causa sérios prejuízos a diversas culturas (DELHAIZE & RIAN 1995; KOCHIAN et al., 2005).

Restrições do crescimento de plantas, submetidas a diferentes fatores de estresse, incluindo a toxidez por alumínio, não podem ser atribuídas a uma única causa, pois resultam de muitos processos fisiológicos e bioquímicos integrados (MATSUMOTO, 2000; MALTAIS & HOUDE, 2002).

O alumínio causa interferência nas relações hídricas e na permeabilidade das membranas das células vegetais (DETTERS et al., 1986; ALI et al., 2008). A reduzida capacidade de absorção de água pelas plantas na presença do alumínio está associada à inibição do crescimento radicular (BARCELÓ & POSCHENRIEDER, 2002). Adicionalmente, o alumínio reduz a condutividade hidráulica do córtex e demais tecidos da raiz (ZHAO, 1987).

Na membrana plasmática os efeitos do Al podem acontecer por interação direta deste cátion com os sítios carregados da membrana. O Al interage com o grupo cabeça da fosfatidilcolina, com o qual possui uma

afinidade 500 vezes maior do que outros cátions. Desta forma o Al desloca cátions como Ca^{2+} que formam pontes entre os fosfolipídios da membrana causando distúrbios estruturais (AKESON et al., 1989; AKESON & MUNNS, 1989). De forma indireta, o estresse por alumínio pode causar danos aos ácidos graxos poli-insaturados das membranas devido ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (MOSSOR-PIETRASZEWSKA, 2001).

Em adição, alguns resultados indicam diferenças no desempenho de plantas tolerantes e sensíveis ao Al quanto a concentração de pigmentos (PEIXOTO et al., 2002) e de solutos orgânicos compatíveis (GIANNAKOULA et al., 2008).

Os carboidratos são considerados uma categoria importante de solutos compatíveis, os quais são acumulados como resposta a vários estresses (JOUVE et al., 2004). Dessa forma, o acúmulo de carboidratos pode concorrer para a diminuição do potencial osmótico e menor inibição do crescimento radicular em plantas tolerantes ao Al (TABUCHI et al., 2004).

Diferentes estresses ambientais também induzem a síntese de novas proteínas nas plantas, as quais possivelmente apresentam valor adaptativo aumentando sua capacidade de sobrevivência (DUBEY, 1999; HAMILTON et al., 2001). A exsudação de ácidos orgânicos é talvez o mecanismo mais investigado associado à tolerância dos vegetais ao estresse por alumínio. Apesar deste mecanismo não estar completamente elucidado, sabe-se que durante o estresse as plantas são estimuladas a sintetizar novas proteínas que atuarão na síntese e transporte dos ácidos orgânicos pelas células das raízes (KOCHIAN et al., 2005; DELHAIZE et al., 2007). O Al induz ainda a expressão de alguns genes que codificam enzimas antioxidativas como a glutathione S-transferase, peroxidase e superóxido dismutase (PANDA et al., 2009). Dessa forma, em alguns casos tem sido verificada uma relação entre as variações nos teores protéicos e o grau de tolerância ao alumínio (HOUDE & DIALLO, 2008; GIANNAKOULA et al., 2010).

De maneira semelhante, variações nos teores de aminoácidos radiculares também podem representar um importante papel fisiológico na tolerância dos vegetais ao alumínio (WANG et al., 2006; KOVÁČIK et al., 2010). Os aminoácidos são moléculas que exibem cargas elétricas em pH fisiológico

(NELSON & COX, 2008) o que lhes confere potencial para interagir internamente com diversos íons, entre eles o alumínio (KOVÁČIK et al., 2010). Além de atuarem no ajustamento osmótico reduzindo o potencial hídrico das raízes (HEUER, 1999), estas moléculas podem ser fonte de energia utilizável e de armazenamento de nitrogênio durante períodos infra-ótimos de crescimento (RABE, 1999).

Dentre os compostos nitrogenados solúveis, a prolina tem sido o mais amplamente estudado, em contraste com outros que também são acumulados em resposta aos estresses (AZEVEDO NETO et al., 2009). Este aminoácido apresenta potencial antioxidativo, protegendo as membranas da ação tóxica de ROS (ALIA & MOHANTY, 1997; GILL & TUTEJA, 2010). O acúmulo de prolina durante condições adversas também pode funcionar como dreno alternativo do fluxo de elétrons fotossintéticos já que na sua biossíntese há consumo de NADPH (SZABADOS & SAVOURÉ, 2010).

O desempenho das plantas mediante a toxidez do alumínio é bastante variável (SCOTT & FISHER, 1989). Tais diferenças são salientadas a partir de estudos comparativos entre espécies ou mesmo variedades, e podem estar relacionadas ao maior grau de tolerância ao Al (RANGEL et al., 2007; YANG et al., 2011). Considerando que o melhoramento é uma das alternativas para aumento da produtividade das plantas em solos ácidos, estudos fisiológicos e bioquímicos podem fornecer informações para uma melhor compreensão dos mecanismos de tolerância e fornecer subsídios para a obtenção de genótipos mais tolerantes ao Al (ECHART & CAVALLI-MOLINA, 2001).

Desta maneira este trabalho teve como objetivo avaliar variáveis fisiológicas e bioquímicas de duas variedades de girassol diferindo quanto ao grau de tolerância ao alumínio.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal, condições de crescimento e tratamentos

Sementes das variedades de girassol Catissol e IAC-Uruguaí foram germinadas em papel germitest. Estas variedades foram caracterizadas como tolerante e sensível ao Al, respectivamente, com base em experimento

preliminar com 25 diferentes genótipos de girassol. Após a germinação as plântulas foram transferidas para copos plásticos (200 mL) contendo areia lavada irrigada diariamente com solução nutritiva de Clark (1975), onde permaneceram por cinco dias. Em seguida as plântulas foram transferidas para bacias plásticas, contendo 12 L de solução nutritiva de Clark (1975) e sob aeração constante, onde permaneceram por cinco dias, para efeito de aclimatação.

Após este período foram iniciados os tratamentos: controle (solução nutritiva de Clark (1975)) ou estresse (solução nutritiva de Clark (1975) contendo AlCl_3 a 0,15 mM). O nível das soluções foi completado diariamente com água destilada e a renovação, realizada semanalmente, até a coleta do material. O pH da solução nutritiva foi monitorado diariamente e mantido em $4,5 \pm 0,2$. Foram realizadas quatro coletas, com 1, 5, 10 e 15 dias de estresse.

Análise de solutos orgânicos

Para as determinações de solutos orgânicos, o extrato bruto foi obtido macerando-se 1,0 g de tecidos liofilizados de folhas e raízes, com 8mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0, contendo EDTA 0,1 mM. O homogeneizado foi filtrado em tecido de musselina e centrifugado a $12000 \times g$ por 15 min. O sobrenadante foi armazenado em ultra freezer (-80°C) e utilizado para as determinações de carboidratos solúveis, prolina livre, aminoácidos livres e proteínas solúveis. Todas as etapas para a obtenção do extrato bruto foram executadas a 4°C .

A determinação de carboidratos solúveis foi realizada colorimetricamente (490 nm) em uma alíquota de 0,5 mL do extrato, pelo método do fenol-ácido sulfúrico, utilizando-se a D-(+)-glucose como padrão (DUBOIS et al., 1956). A prolina livre foi determinada colorimetricamente a 520 nm, em uma alíquota de 1,0 mL do extrato, utilizando-se a ninhidrina como reagente específico e a prolina pura como padrão (BATES et al., 1973). Os aminoácidos livres totais foram determinados colorimetricamente pelo método da ninhidrina (570 nm), em uma alíquota de 0,5 mL do extrato, utilizando-se a L-leucina pura como padrão (YEMM & COCKING, 1955). As proteínas solúveis foram determinadas colorimetricamente (595 nm) pelo método de ligação ao corante, em uma

alíquota de 0,1 mL do extrato, utilizando-se a albumina de soro bovino pura como padrão (BRADFORD, 1976).

Danos membranares (DM), teor relativo de água (TRA) e pigmentos

A determinação do teor relativo de água (TRA) foi realizada no par de folhas mais jovem e completamente expandido, através das determinações da massa fresca (MF), túrgida (MT) e seca (MS) de discos de folhas, por meio da fórmula:

$$CRA = (MF - MS) \times 100 / (MT - MS) \text{ (BARR \& WATHERLEY, 1962).}$$

Nas mesmas folhas utilizadas para determinação do TRA foi determinada a percentagem de integridade absoluta – PIA (estimativa de danos membranares), através das determinações da condutividade livre (CL) e da condutividade total (CT), usando a fórmula: $PIA = 100 - (CL \times 100/CT)$ (PIMENTEL et al., 2002).

O teor de clorofila a, clorofila b e de carotenóides (carotenos e xantofilas) foi determinado espectrofotometricamente em extrato etanólico a 95%, conforme metodologia descrita por Lichtenthaler & Buschmann (2001), utilizando as fórmulas:

$$c_a (\mu\text{g/ml}) = 13,36 A_{664,1} - 5,19 A_{648,6}$$

$$c_b (\mu\text{g/ml}) = 27,43 A_{648,6} - 8,12 A_{664,1}$$

$$c_{(x+c)} (\mu\text{g/ml}) = (1000 A_{470} - 2,13 c_a - 97,64 c_b)/209$$

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em um arranjo fatorial 4 (coletas) \times 2 (variedades) \times 2 (níveis de Al), com quatro repetições. Os dados obtidos foram comparados através de suas médias e respectivos desvios-padrões, pelo teste de Scott Knott.

RESULTADOS

Solutos orgânicos

Na Figura 1 pode-se verificar que o efeito do estresse sobre os teores de carboidratos solúveis nas folhas da variedade tolerante (Catissol) foi diferente do observado no sensível (IAC-Uruguai). No tolerante, o nível de carboidratos

solúveis nas folhas das plantas estressadas não foi afetado até o quinto dia de exposição ao Al (Fig. 1A). Entretanto, foram observadas reduções de 12 e 40% aos 10 e 15 dias de estresse, respectivamente.

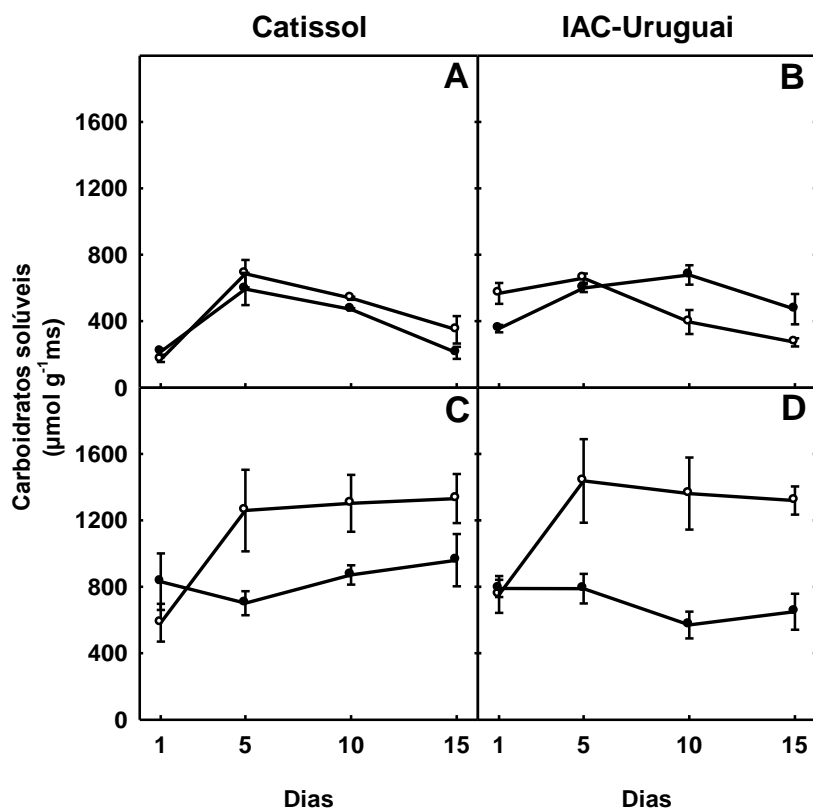


Figura 1. Teor de carboidratos solúveis nas folhas (A e B) e raízes (C e D) das variedades de girassol tolerante (Catissol) e sensível (IAC-Uruguai) ao alumínio, cultivadas sob condições controle (○) ou de estresse por alumínio (●). As plantas foram coletadas com 1, 5, 10 e 15 dias de cultivo. Tratamento controle = solução nutritiva de Clark e tratamento de estresse = solução nutritiva contendo 0,15 mM de AlCl₃. Valores representam as médias de quatro repetições e seus respectivos desvios padrões.

Nas folhas da variedade sensível, o alumínio reduziu em 37% o teor de carboidratos solúveis após um dia de estresse (Fig. 1B). Em contraste, aos 10 e 15 dias o teor de carboidratos nas folhas das plantas estressadas foi 72 e 73%, respectivamente, mais elevado que nas controle.

Ao contrário das folhas, o efeito do estresse sobre os carboidratos solúveis nas raízes foi semelhante em ambas as variedades. Dessa forma, aos 5, 10 e 15 dias de estresse, respectivamente, foram verificadas reduções de 44, 33 e 28% nos carboidratos solúveis do tolerante (Fig. 1C) e de 45, 58 e 51% no sensível (Fig. 1D).

Na Figura 2 verifica-se que alterações nos teores foliares de aminoácidos livres causadas pelo estresse por Al só ocorreram na variedade IAC-Uruguai (sensível). Nesta variedade, o estresse reduziu em 25 e 18% os aminoácidos livres com 1 e 5 dias de estresse, respectivamente. Aos 10 dias não foram observadas diferenças entre os tratamentos e, aos 15 dias o teor de aminoácidos nas folhas das plantas estressadas foi 22% mais elevado do que nas controle (Fig. 2B).

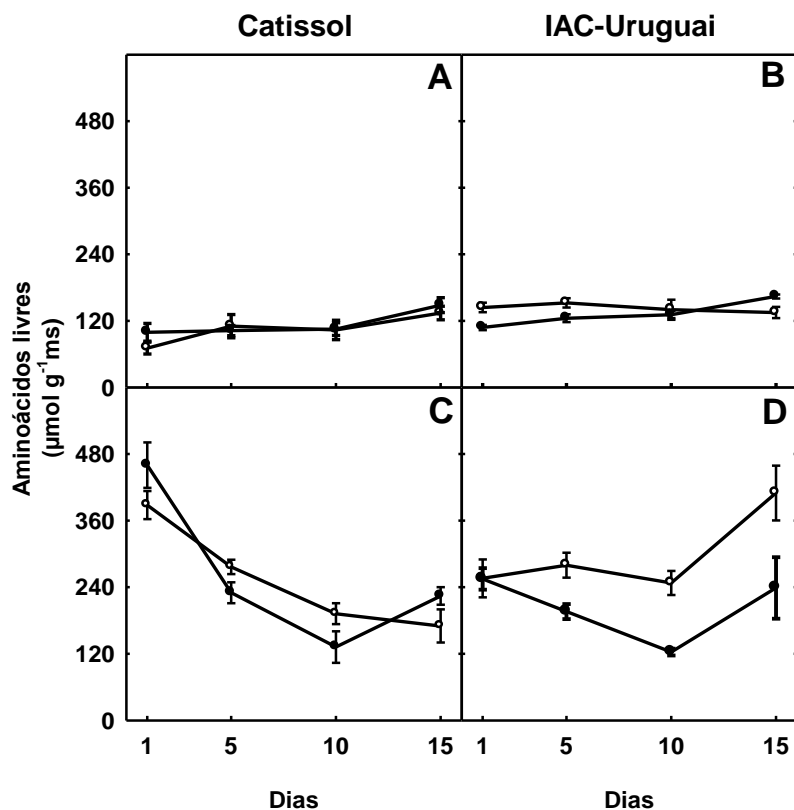


Figura 2. Teor de aminoácidos livres nas folhas (A e B) e raízes (C e D) das variedades de girassol tolerante (Catissol) e sensível (IAC-Uruguai) ao alumínio, cultivadas sob condições controle (○) ou de estresse por alumínio (●). Detalhes adicionais como na Figura 1.

Nas raízes da variedade Catissol, os teores de aminoácidos livres nas plantas estressadas variaram em relação aos das controle durante o período experimental. Dessa forma, os aminoácidos aumentaram com um dia de estresse (19%), diminuíram aos 5 (17%) e 10 dias (31%) e voltaram a aumentar aos 15 dias (32%).

Nas raízes de IAC-Uruguai, os teores de aminoácidos livres foram reduzidos em 30, 50, e 42%, respectivamente, aos 5, 10 e 15 dias de estresse por Al (Fig. 2D).

Os teores foliares de prolina livre aumentaram com o tempo em ambas as variedades, entretanto este aumento foi mais conspícuo nas folhas das plantas estressadas (Fig. 3A e 3B). Dessa forma, aos 10 e 15 dias de estresse, respectivamente, foram verificados aumentos de 82 e 112% nos teores de prolina na variedade Catissol e de 112 e 46% na IAC-Uruguai.

Nas raízes foi verificado contrastes entre as variedades. Assim, os teores radiculares de prolina aumentaram na variedade Catissol e diminuíram na IAC-Uruguai (Fig 3C e 3D).

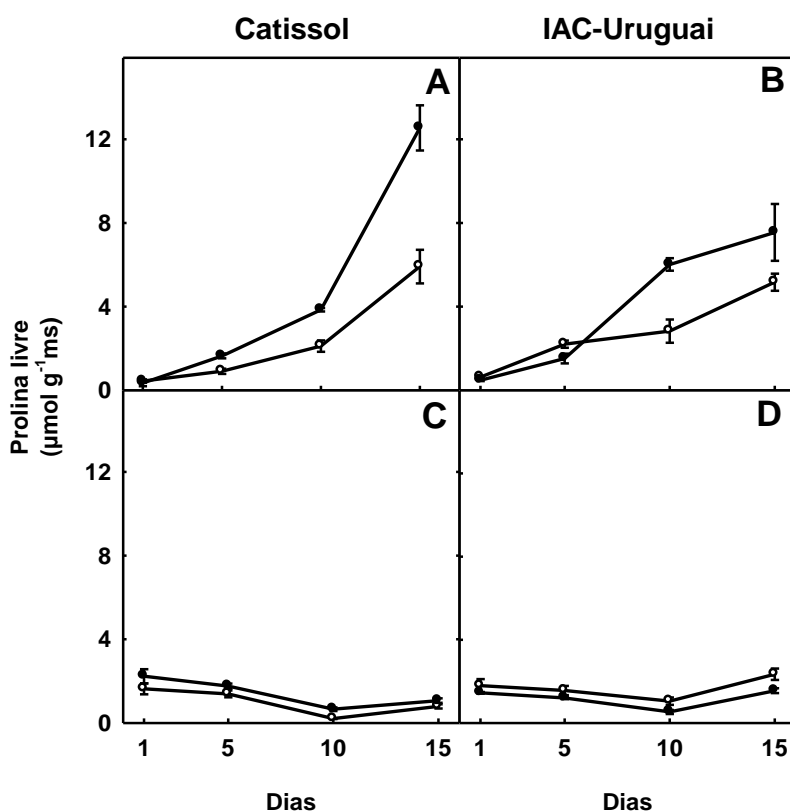


Figura 3. Teor de prolina livre nas folhas (A e B) e raízes (C e D) das variedades de girassol tolerante (Catissol) e sensível (IAC-Uruguai) ao alumínio, cultivadas sob condições controle (○) ou de estresse por alumínio (●). Detalhes adicionais como na Figura 1.

Os efeitos do estresse por Al nos teores de proteínas solúveis nas folhas de ambas as variedades variaram com o tempo (Fig. 4). Dessa forma, nas folhas de Catissol as proteínas solúveis aumentaram com 1 (41,5%) e 15 dias (62%) de estresse (Fig. 4A). Aos 5 e 10 dias de estresse, não foram observadas diferenças significativas entre os teores foliares de proteínas solúveis de ambos os tratamentos.

Nas folhas da variedade IAC-Uruguai, as proteínas solúveis diminuíram com 1 (31%) e 10 dias (30%) de estresse (Fig. 4B). Entretanto aos 15 dias o estresse aumentou em 110% o teor de proteínas solúveis nas folhas das desta variedade.

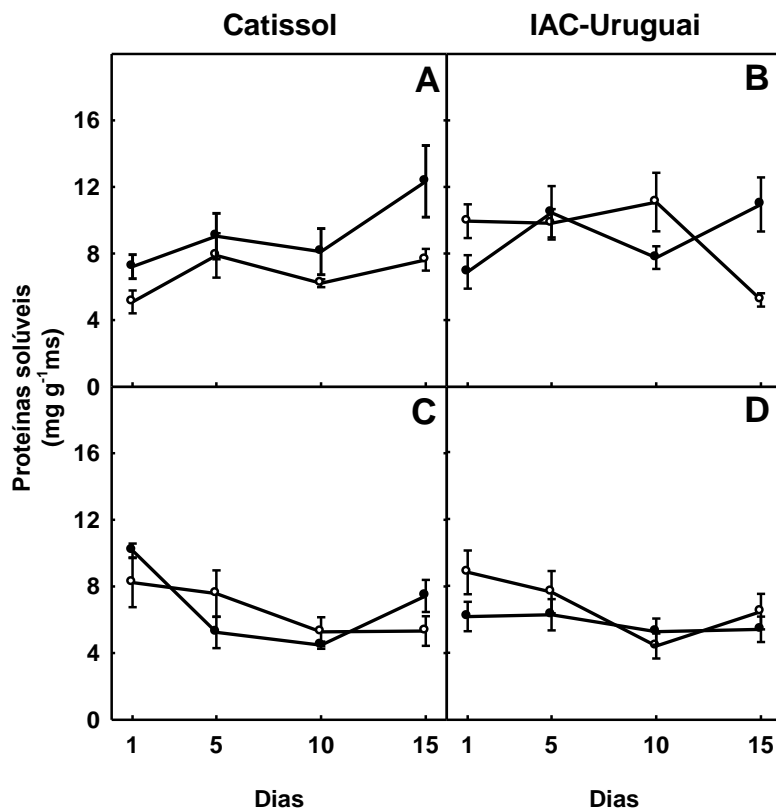


Figura 4. Teor de proteínas solúveis nas folhas (A e B) e raízes (C e D) das variedades de girassol tolerante (Catissol) e sensível (IAC-Uruguai) ao alumínio, cultivadas sob condições controle (○) ou de estresse por alumínio (●). Detalhes adicionais como na Figura 1.

Os níveis de proteínas solúveis nas raízes de ambas as variedades foram pouco alterados pelo estresse ao longo do período experimental. Assim, a variedade Catissol apresentou um aumento de 39,5% nas proteínas solúveis apenas aos 15 dias de estresse (Fig. 4C). Em contraste, nas raízes da variedade IAC-Uruguai foi verificada uma redução de 30% no teor de proteína solúveis apenas no primeiro dia de exposição ao Al (Fig. 4D).

Danos membranares, teor relativo de água e pigmentos

A Figura 5 mostra as estimativas de danos membranares expressas como percentagem de integridade absoluta (PIA) e o teor relativo de água

(TRA) nas variedades de girassol avaliadas. Verifica-se que na Catissol não foram verificadas diferenças entre a PIA das plantas controle e das estressadas (Fig. 5A). Por outro lado, o estresse por Al reduziu a PIA das plantas estressadas de IAC-Uruguai aos 10 (26%) e 15 dias (39%) (Fig. 5B).

De maneira semelhante aos danos membranares, apenas a variedade IAC-Uruguai apresentou redução no TRA com o prolongamento do estresse. Desta maneira foi verificada uma redução de 11% no TRA aos 10 e 15 dias de estresse (Fig. 5C e 5D).

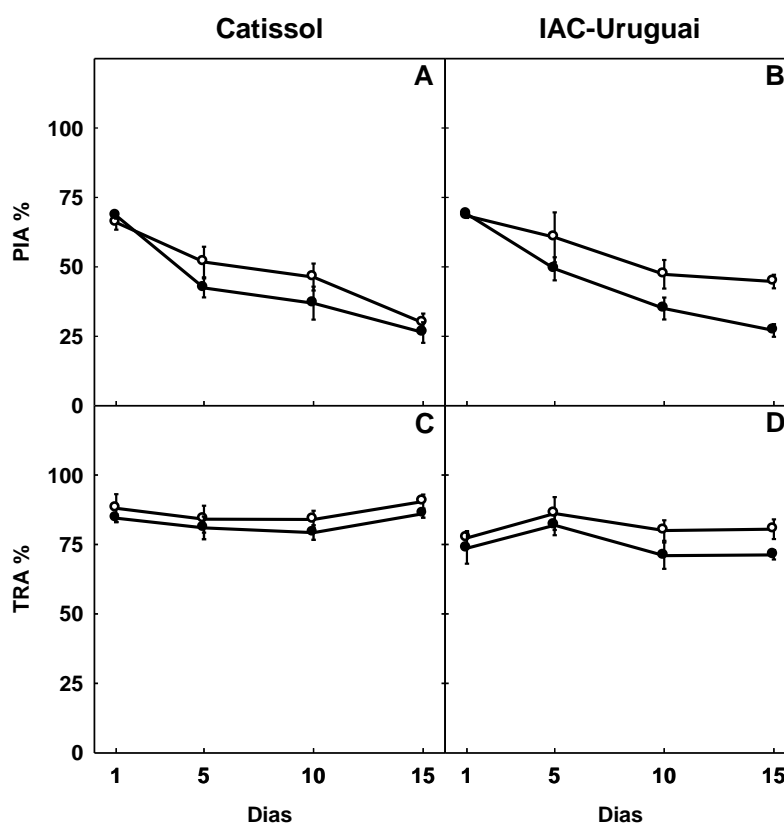


Figura 5. Percentagem de integridade absoluta - PIA (A e B) e teor relativo de água - TRA (C e D) das variedades de girassol tolerante (Catissol) e sensível (IAC-Uruguai) ao alumínio, cultivadas sob condições controle (○) ou de estresse por alumínio (●). Detalhes adicionais como na Figura 1.

Na figura 6A verifica-se que o estresse não causou alterações nos teores de clorofila a, b e de carotenóides de Catissol. Entretanto, na IAC-Uruguai, o estresse causou reduções de 18, 17 e 22%, respectivamente nos teores de clorofila a, b e de carotenóides no fim do período experimental (Fig. 6B).

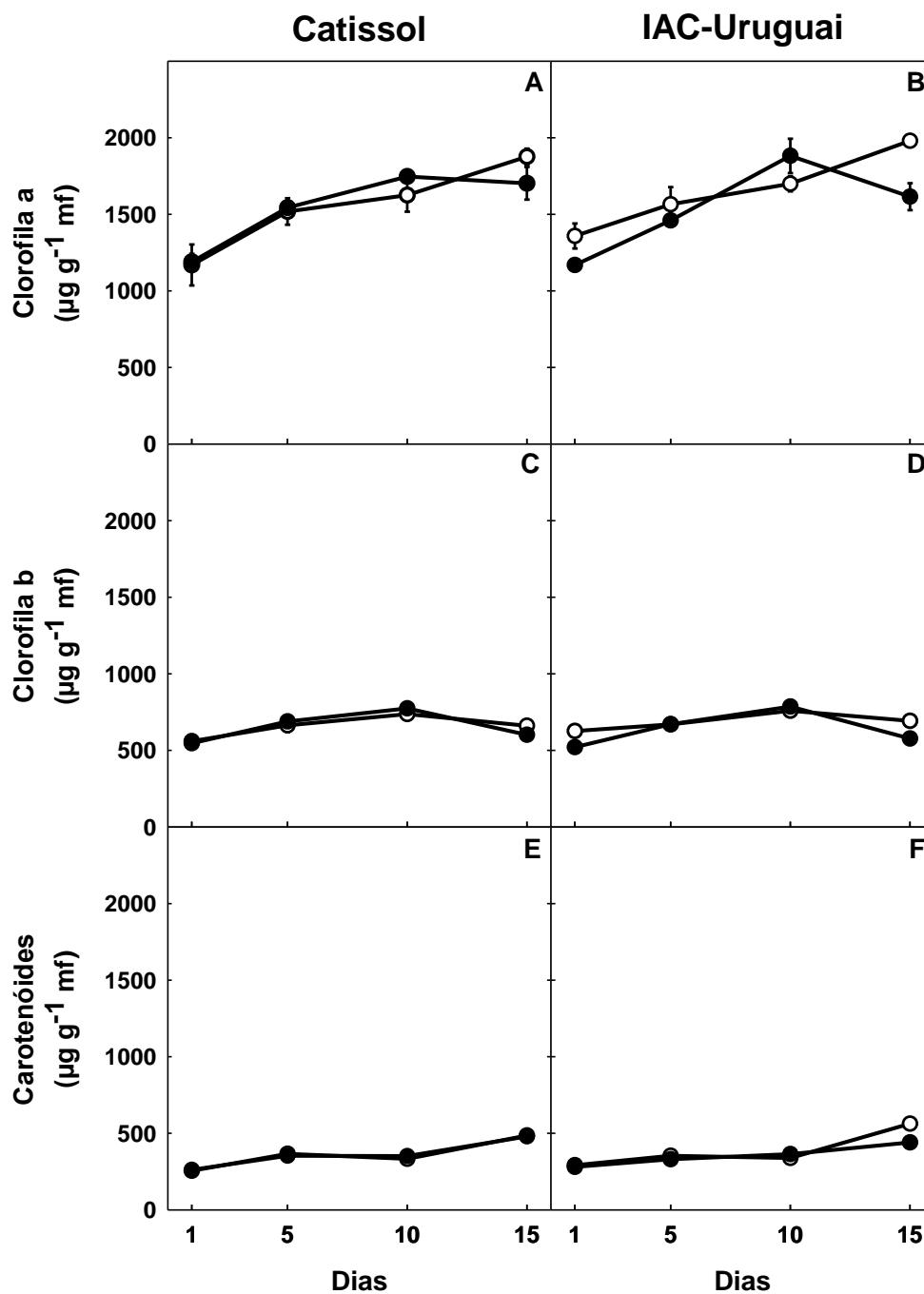


Figura 6. Teor de clorofila a (A e B) de clorofila b (C e D) e de carotenóides (E e F) das variedades de girassol tolerante (Catissol) e sensível (IAC-Uruguai) ao alumínio, cultivadas sob condições controle (○) ou de estresse por alumínio (●). Detalhes adicionais como na Figura 1.

DISCUSSÃO

Estresses abióticos afetam diferentes processos celulares como crescimento, fotossíntese, particionamento de carbono, metabolismo de

aminoácidos e carboidratos e homeostase osmótica (MUNNS, 2002; AZEVEDO NETO et al., 2009; AZEVEDO NETO et al., 2010). Os carboidratos e os aminoácidos compreendem a principal categoria de solutos compatíveis e apresentam grande sensibilidade aos estresses ambientais (GIANNAKOULA et al., 2007; ROSA et al., 2009).

Dessa forma, aos 10 e 15 dias de estresse, foi observada uma pequena redução do teor de carboidratos nas folhas da variedade tolerante, em contraste com um grande aumento nas da variedade sensível. Isto sugere um maior custo energético para a osmorregulação através da síntese de carboidratos na variedade sensível (AZEVEDO NETO et al., 2009). Em adição, este acúmulo de carboidratos nas folhas também pode ter resultado de distúrbios induzidos pelo alumínio na translocação de açúcares para as raízes da variedade sensível. A observação que a redução nos teores de carboidratos nas raízes das plantas estressadas foi mais pronunciada na variedade sensível suporta esta hipótese. Chen et al., (2005) também verificaram que o aumento do conteúdo de carboidratos nas folhas de plantas de Citros sob estresse por alumínio foi o resultado de uma redução do crescimento e da translocação.

O estresse por alumínio não induziu alterações substanciais nos teores de aminoácidos livres nas folhas e raízes da variedade tolerante, em contraste com o observado na sensível. Nesta variedade, o efeito do estresse sobre os aminoácidos foi semelhante ao observado nos carboidratos. Nas folhas, os teores destes solutos diminuíram com o estresse de curto prazo e aumentou no fim do período experimental. Nas raízes, os teores de ambos os solutos diminuíram significativamente a partir do primeiro dia de estresse.

Nas plantas superiores, o metabolismo dos carboidratos e dos aminoácidos é co-regulado (FERRARIO-MÉRY et al., 1998). Dessa forma, para que ocorra assimilação do nitrogênio em aminoácidos, são necessários esqueletos de carbono provenientes do metabolismo dos carboidratos (HELDT, 2005). Isto pode explicar o fato dos teores de aminoácidos livres terem diminuído simultaneamente com os dos carboidratos em ambas as partes da planta.

Corroborando com esta hipótese, os teores de aminoácidos e carboidratos nas raízes da variedade IAC-Uruguai apresentaram correlação

positiva ($r= 0,534$, $p>0.05$), enquanto nas condições controle, para a mesma variedade, não foram evidenciados correlação para este efeito.

Além de poderem atuar no ajustamento osmótico (HEUER, 1999), estas moléculas podem ajudar no controle do pH citosólico, na desintoxicação do excesso de NH_4^+ (GILBERT et al. 1998), na manutenção da homeostase iônica, da relação C/N e na estabilização de macromoléculas, membranas e organelas (BOHNERT & SHEN 1999; BRAY et al. 2000). Estes solutos também podem ser fonte de energia utilizável e de armazenamento de nitrogênio durante períodos infra-ótimos de crescimento (RABE, 1999) e ajudar na remoção de radicais livres (SMIRNOFF & CUMBES 1989). Em contraste com o observado no sensível, a manutenção dos teores de aminoácidos livres nas folhas e raízes de Catissol pode, ao menos parcialmente, estar relacionada com a maior tolerância desta variedade ao estresse por alumínio.

A prolina é uma molécula extensivamente estudada no contexto das respostas de plantas aos diversos estresses ambientais, incluindo a toxidez por Al (KHAN et al., 2000; SHARMA & DIETS, 2006). Sob condições de estresse, o acúmulo deste aminoácido em muitas espécies de plantas apresenta correlação direta com a tolerância (ASHRAF & FOOLAD, 2007). Nesta pesquisa, os resultados referentes aos teores de prolina nas raízes estão de acordo com estas observações, isto é, aumentou nas raízes estressadas da variedade tolerante e diminuiu nas da sensível. Este resultado corrobora com a hipótese de que a biossíntese de aminoácidos na variedade sensível foi afetada pela menor disponibilidade de carboidratos induzida pelo Al.

Incrementos no conteúdo de prolina são frequentemente associados ao aumento da sua biossíntese, diminuição da degradação, decréscimos da síntese protéica ou hidrólise de proteínas (CHAREST & PHAN, 1990; HEUER, 1999). Considerando que os teores de proteínas solúveis nas raízes da tolerante não diminuíram com o estresse, é provável que a síntese *de novo* e/ou a inibição da degradação tenham sido os mecanismos responsáveis pelo incremento dos níveis deste aminoácido nesta variedade.

Tem sido sugerido que incrementos na síntese de proteínas em plantas expostas ao Al podem ser devido ao aumento na expressão de genes relacionados direta ou indiretamente com a tolerância ao Al (SNOWDEN et al., 1995; YANG et al., 2007). Neste trabalho, o estresse não induziu diferenças

substanciais nos teores de proteínas solúveis, com exceção de um aumento nas folhas de ambas as variedades, no final do período experimental. Dessa forma, as proteínas solúveis não se relacionaram com os caracteres de tolerância ou sensibilidade das variedades estudadas. Adicionalmente, não foi observada neste trabalho, uma relação entre as variações nos teores de proteínas solúveis e de aminoácidos que indicassem uma relação causa-efeito de biossíntese protéica ou de proteólise.

A tolerância diferenciada para elementos tóxicos também pode estar associada a diferenças na estrutura e função das membranas (FOY et al., 1978). As membranas celulares são o primeiro alvo de muitos estresses em plantas e a manutenção de sua integridade e estabilidade sob tais condições é um componente importante da tolerância ao Al nas plantas (TABALDI et al., 2007). Neste cenário, o efeito deletério do Al sobre a integridade das membranas (PIA) só foi observado na variedade Uruguai, aos 10 e 15 dias de estresse. De acordo com Thornton et al. (1986) o tempo de exposição pode gerar um aumento absoluto nos danos causados pela toxidez do Al. O Al age diretamente deslocando cátions como o Ca^{2+} que formam pontes entre os fosfolipídios da membrana causando distúrbios estruturais (AKESON et al., 1989; AKESON & MUNNS, 1989). Indiretamente, a toxidez causada por este metal eleva os níveis de ROS, levando a destruição de ácidos graxos poli-insaturados das membranas (MOSSOR-PIETRASZEWSKA, 2001).

Tem sido sugerido que a prolina e outros aminoácidos estão entre os principais compostos envolvidos na proteção das membranas contra os danos causados pelos estresses (KOVÁČIK et al., 2010). O acúmulo destes aminoácidos tem sido associado à eliminação de ROS e decréscimos da peroxidação lipídica (ASHRAF & FOOLAD, 2007; KOVÁČIK et al., 2010). Considerando que o estresse aumentou o teor de prolina e demais aminoácidos nas raízes da Catissol e diminuiu nas da IAC-Uruguai, é provável que as membranas das células radiculares da variedade sensível tenham sido mais afetadas pelo estresse que as da tolerante.

Assim como verificado para a integridade das membranas, o efeito do estresse por Al sobre o TRA só foi observado na variedade sensível, aos 10 e 15 dias. Tem sido considerado que o principal sintoma da toxidez por Al é a redução do volume do sistema radicular e que isto gera uma menor capacidade

de captação de íons e de água (PANDA et al., 2009). Em adição, os íons Al podem afetar as propriedades das membranas aumentando a permeabilidade para não-eletrólitos e diminuindo sua permeabilidade para água (ZHAO et al., 1987). Os resultados deste trabalho estão de acordo com esta afirmação, pois a redução na integridade das membranas da variedade sensível apresentou uma relação direta com o TRA.

Além disso, considerando que a raiz é o primeiro órgão diretamente exposto ao estresse por Al e o que os teores de todos os solutos orgânicos foram maiores nas raízes da variedade Catissol (tolerante), este acúmulo pode ter contribuído para uma melhor absorção de água e seu fluxo para a parte aérea. Assim, estes resultados sugerem que o acúmulo de solutos nas raízes pode, ao menos em parte, explicar a maior tolerância da Catissol ao estresse por alumínio, quando comparada à IAC-Uruguai. Resultados semelhantes foram reportados para seca (AZEVEDO NETO et al., 2010) e salinidade (AZEVEDO NETO et al., 2004).

A concentração de pigmentos nas folhas da variedade tolerante não foi alterada, enquanto na variedade sensível ocorreu uma redução nos teores de clorofilas a e b e de carotenóides aos 15 dias de estresse. Alguns trabalhos têm demonstrado que, em determinadas espécies vegetais, os teores de clorofilas são afetados pelo Al nos genótipos sensíveis (ZAVAS et al., 1996; MIHAJLOVIC et al., 2008). Em contraste, genótipos de tomate diferindo na tolerância ao alumínio não apresentaram qualquer modificação nos teores de clorofilas sob diferentes níveis de Al (SIMON et al., 1994). Estes resultados sugerem que a relação entre os teores de pigmentos e a tolerância ao Al pode variar entre as espécies vegetais.

As reduções nos teores de carotenóides na variedade sensível podem estar relacionadas com o aumento nos danos das membranas. A redução no teor de carotenóides ocorreu concomitantemente à redução na integridade das membranas. Os carotenóides apresentam como uma das principais funções a fotoproteção nos tecidos fotossintéticos (BARTLEY & SCOLNIK, 1995), minimizando os danos fotooxidativos induzidos pela maioria dos estresses ambientais (TIMKO, 1998).

Os resultados de carboidratos solúveis, aminoácidos e prolina livre em ambas as variedades sugerem que a acumulação destes solutos,

principalmente nas raízes de Catissol, pode ter um importante papel na tolerância do girassol ao estresse por Al. Apesar das informações sobre o papel dos solutos orgânicos sejam insuficientes para concluir que eles são universalmente associados com a tolerância das plantas ao estresse por alumínio os dados sugerem um importante papel destas moléculas como marcadores bioquímicos da tolerância nos programas de melhoramento do girassol.

CONCLUSÕES

1. As alterações nos teores de solutos orgânicos apresentaram contrastes entre as duas variedades, indicando um papel destas moléculas no grau de tolerância ao Al no girassol.

2. As reduções na PIA e TRA verificados na IAC-Uruguaí em contraste com a Catissol confirmaram as diferenças no grau de tolerância ao Al em variedades de girassol.

3. Os teores de carboidratos solúveis, aminoácidos livres e prolina se mostraram bons marcadores da tolerância diferenciada ao alumínio em variedades de girassol, podendo servir como informações básicas em programas de melhoramento desta espécie.

LITERATURA CITADA

AKESON M. A.; MUNNS D.N. Lipid bilayer permeation by neutral aluminum citrate and by three alpha-hydroxycarboxylic acids. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 984, p.200–206, 1989.

AKESON, M.; MUNNS, D.; BURAU, R.G. Adsorption of Al³⁺ to phosphatidyl choline vesicles. **Biochim. Biophys. Acta**, v.986, p.33-40, 1989.

ALI, B.; HASAN, S.A.; HAYAT, S.; HAYAT, Q.; YADAV, S.; FARIDUDDIN, Q.; AHMAD, A. A role for brassinosteroids in the amelioration of aluminium stress through antioxidant system in mung bean (*Vigna radiata* L.). **Environ. Exp. Bot.**, v.62 p.153–159, 2008.

ALIA, S. P. P.; MOHANTY, P. Involvement of proline in protecting thylakoid membranes against free radical-induced photodamage. **J. Photochem. Photobiol.**, v.38 p.253–257, 1997.

ASHRAF, M.; FOOLAD, M.R. Roles of glycinebetaine and proline in improving plant abiotic stress tolerance. **Environ. Exp. Bot.**, v.59 p.206-216, 2007.

AZEVEDO NETO, A. D.; PRISCO, J. T.; ENÉAS FILHO, J.; LACERDA, C. F.; SILVA, J. V.; COSTA, P. H. A. da; GOMES FILHO, E. Effects of salt stress on plant growth, stomatal response and solute accumulation of different maize genotypes. **Braz. J. Plant Physiol.**, v. 16, n. 1, p. 31-38, 2004.

AZEVEDO NETO, A. D.; NOGUEIRA, R. J. M. C.; MELO FILHO, P. A.; SANTOS, R. C. Physiological and biochemical responses of peanut genotypes to water deficit. **J. Plant Inter.**, v.5, p.1-10, 2010.

AZEVEDO NETO, A. D.; PRISCO, J. T.; GOMES FILHO, E. Changes in Soluble Carbohydrates, Soluble Amino-Nitrogen, Soluble Proteins and Free Amino Acids in Leaves and Roots of Salt-Stressed Maize Genotypes. **J. Plant Inter.**, v.4 p.137-144, 2009.

BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Fast root growth responses, root exudates and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. **Env. Exp. Bot.**, v.48, p.75-92, 2002.

BARR, H.D.; WEATHERLEY, P.E.A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficit in leaves. **Aust. J. Biol. Sci.**, v.15 p.413-428, 1962.

BARTLEY, G.E.; SCOLNIK, P.A. Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. **Plant Cell**, v.7, p.1027-1038, 1995.

BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant Soil**, v.39, p.205-207, 1973.

BOHNERT H. J.; SHEN; B. Transformation and compatible solutes. **Sci. Hort.**, v.78 p.237–260, 1999.

BRADFORD, M.M.A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v.72, p.246-254, 1976.

BRAY, E.A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p.1158-1249.

CHEN, L.S.; QI, Y.P.; SMITH, B.; LIU, X.H. Aluminum-induced decrease in CO₂ assimilation in citrus seedlings is unaccompanied by decreased activities of key enzymes involved in CO₂ assimilation. **Tree Physiol.**, v.25p.317-324, 2005.

CLARK, J. Characterization of phosphatase of intact maize roots. **J. Agr. Food Chem.**, v.23, p.458-460, 1975.

DELHAIZE, E.; GRUBER, B. D.; RYAN, P.R. The roles of organic anion permeases in aluminum resistance and mineral nutrition. **FEBSLett**, v.581, p.2255–2262, 2007.

DELHAIZE, E.; RYAN P.R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiol.**, v.107, p.315-321, 1995.

DETTERS, M.; SERVAIS, J. P.; WULFERT, E. Neurotoxic cations induce membrane rigidifications and membrane fusion at micromolar concentrations. **Biochem. Biophys. Acta**, p.855, p.271–276, 1986.

DUBEY, R. S. Protein Synthesis by Plants Under Stressful Conditions. In: PESSARAKLI, M. (ED.). **Handbook of plant and crop stress**, Tukson: Marcel Dekker, Inc., 1999. p.365-397.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v.28, p.350-356, 1956.

ECHART, C. L.; CAVALLI-MOLINA, S. Fitotoxicidade do alumínio: efeitos, mecanismos de tolerância e seu controle genético. **Ci. Rural**, v.31, p.531-541, 2001.

FOY, C. D.; CHANCY, R. L.; WHITE, M.C. The physiology and metal toxicity in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, v.29 p.511-566, 1978.

FERRARIO-MÉRY S., VALADIER M. H.; FOYER C.H. Overexpression of nitrate reductase in tobacco delays drought-induced decreases in nitrate reductase activity and mRNA. **Plant Physiol.**, 117: 293–302, 1998.

GIANNAKOULA, A.; MOUSTAKAS, M.; MYLONA, P.; PAPADAKIS, I.; YUPSANIS, T. Aluminum tolerance in maize is correlated with increased levels of mineral nutrients, carbohydrates and proline, and decreased levels of lipid peroxidation and Al accumulation. **J. Plant Physiol.**, v.165, p.385-396, 2008.

GIANNAKOULA, A.; MOUSTAKAS, M.; SYRUS, T.; YUPSANIS, T. Aluminum stress induces up-regulation of an efficient antioxidant system in the Al-tolerant maize line but not in Al-sensitive line. **Environ. Exp. Bot.**, v. 67p.487-494, 2010.

GILBERT, G. A.; GADUSH, M. V.; WILSON, C.; MADORE, M. A. Amino acid accumulation in sink and source tissues of *Coleus blumei* Benth. during salinity stress. **J. Exp. Bot.**, v. 49.p. 107 – 114, 1998.

GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiol. Biochem.** v.48 p.909-930, 2010.

HAMILTON, C.A.; GOOD, A. G.; TAYLOR G.J. Induction of vacuolar ATPase and mitochondrial ATP synthase by aluminum in an aluminum-resistant cultivar of wheat. **Plant Physiol.** v.125 p.2068-2077, 2001.

HELDT, H.W. **Plant biochemistry.** 3th ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. 522 p.

HEUER, B. Osmoregulatory Role of Proline in Plants Exposed to Environmental Stresses. In: PESSARAKLI, M. (ED.). **Handbook of plant and crop stress**, Tukson: Marcel Dekker, Inc., 1999. p. 675-695.

HOUDE M.; DIALLO, A.O. Identification of genes and pathways associated with aluminum stress and tolerance using transcriptome profiling of wheat near - isogenic lines. **BMC Genomics**, v.9 p.400, 2008.

JOUBE L.; HOFFMANN L.; HAUSMAN J-F. Polyamine, carbohydrate, and proline content changes during salt stress exposure of aspen (*Populus tremula* L.): involvement of oxidation and osmoregulation metabolism. **Plant Biol.**, v.6 p.74–80, 2004.

KOCHIAN, L. V.; PIÑEROS, M. A.; HOEKENGA, O.A. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. **Plant Soil**, v.274, p.175-195, 2005.

KOVÁČIK J.; KLEJDUS, B.; HEDBAVNY, J. Effect of aluminium uptake on physiology, phenols and amino acids in *Matricaria chamomilla* plants. **J. Hazard. Mat.**, v.178 p.949–955, 2010.

LICHTENTHALER H. K.; BUSCHMANN C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. **Curr. Prot. Food Anal. Chem.**, 2001.F4.3.1 – F 4.3.8.

MALTAIS K.; HOUDE M.A new biochemical marker for aluminium tolerance in plants. **Physiol. Plantar.**, v.115 p.81–86, 2002.

MATSUMOTO, H. Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. **Inter. Rev. Cytol.**, San Diego, v.200, p.1-46, 2000.

MIHAILOVIC, N.; DRAZIC, G.; VUCINIC, Z. Effects of aluminium on photosynthetic performance in Al-sensitive and Al-tolerant maize inbred lines. **Photosynthetica**, v.46, p.476-480, 2008.

MOSSOR-PIETRASZEWSKA, T. Effect of aluminium on plant growth and metabolism. **Acta Biochim. Pol.**, v.3, p.673-686, 2001.

MUNNS R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant. Cell Environ.**, v.25 p.239-50, 2002.

NELSON, D.; COX, M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. New York. W. H. Freeman and Company 2008, p.1252.

PANDA, S. K.; BALUSKA, F.; MATSUMOTO, H. Aluminum stress signaling in plants. **Plant Signal. Behav.**, v.4 p.592–597, 2009.

PEIXOTO, P. H. P. ; DA MATTA, F. M.; CAMBRAIA, J. Responses of the photosynthetic apparatus to aluminum stress in two sorghum cultivars. **J. Plant Nutr.**, v.25, p.821-832, 2002.

PIMENTEL, C.; SARR, B.; DIOUF, O.; ABOUD, A. C. S.; ROY-MACULEY, H. Tolerância Protoplasmática foliar à seca, em dois genótipos de caupi cultivadas em campo. **Rev. Univ. Rur. Série Ciências da Vida**, v.22, p.07-14, 2002.

RABE, E. Altered nitrogen metabolism under environmental stress conditions. In: PESSARAKLI, M. (ED.). **Handbook of plant and crop stress**, Tusson: Marcel Dekker, Inc., 1999. p.675-695.

RANGEL, A.F.; RAO I.M.; HORST, W.J. Spatial aluminium sensitivity of root apices of two common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes with contrasting aluminium resistance. **J. Exp. Bot.**, v.58 p.3895-3904, 2007.

ROSA, M.; PRADO, C.; PODAZZO, G.; INTERDONATO, R.; GONZALEZ, J.A.; HILAL, M.; PRADO, F.E. Soluble sugars: metabolism, sensing, and abiotic stress. **Plant Signal. Behav.**, 4: 388–393, 2009.

SCOTT, B.J.; FISHER J.A. Selection of genotypes tolerant to aluminium and manganese. In: A.D. Robson (Ed), **Soil Acidity and Plant Growth**, Academic Press, Australia. 1989, p. 167-203.

SHARMA, S.S.; DIETZ, K.J. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. **J. Exp. Bot.**, v.57 p.711-726, 2006.

SIMON, L.; KIEGER, M.; SUNG, S.S.; SMALLEY, T.J. Aluminum toxicity in tomato. Part 2. Leaf gas exchange, chlorophyll content, and invertase activity. **J. Plant Nutr.**, v.17 p.307-317, 1994.

SMIRNOFF N.; CUMBES Q. J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. **Phytoch.**, v.28, p.1057- 1060, 1989.

SNOWDEN, K.C.; RICHARDS, K.D.; GARDNER, R.C. Aluminum-induced genes: induction by toxic metals, low calcium, and wounding and pattern of expression in root tips. **Plant Physiol.**, v.107 p.341-348, 1995.

SZABADOS, L.; SAVOURÉ A. Proline: a multifunctional amino acid. **Trends Plant Sci.**, v.15 p.89–97, 2010.

TABALDI, L. A.; NICOLOSO, F. T.; CASTRO, G. Y. ; CARGNELUTTI, D.; GONÇALVES, J. F.; RAUBER, R.; SKREBSKY, E. C.; SCHETINGER, M. R. C.; MORSCH, V. M.; BISOGNIN D. A. Physiological and oxidative stress responses of four potato clones to aluminum in nutrient solution. **Braz J. Plant Physiol.**, v.19, p.211-222, 2007.

TABUCHI, A., KIKUIA, S.; H. MATSUMOTO. Differential effects of aluminum on osmotic potential and sugar accumulation in the root cells of Al-resistant and Al-sensitive wheat. **Physiol. Plantar.**, v.120 p.106-112, 2004.

THORNTON, F.C.; SCHAEDELE, M.; RAYNAL, D.J. Effects of aluminum on growth, development, and nutrient composition of honeylocust (*Gleditsia triacanthos* L.) seedlings. **Tree Physiol.**, v.2 p.307-316, 1986.

TIMKO, M.P. **Pigment biosynthesis: Chlorophylls, heme, and carotenoids.** Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1998.

WANG, P.; BI, S.; WANG, S.; DING, Q. Variation of wheat root exudates under aluminum stress. **J. Agri. Food Chem.**, v.54, p.10040-10046, 2006.

YANG, L.T.; JIANG, H.X.; TANG, N.; CHENG, L.S. Mechanisms of aluminum-tolerance in two species of citrus: secretion of organic acid anions and immobilization of aluminum by phosphorus in roots. **Plant Sci.**, v.180, p.521-530, 2011.

YANG, Q.; WANG, Y.; ZHANG, J.; SHI, W.; QIAN, C.; PENG, X. Identification of aluminum responsive proteins in rice roots by a proteomic approach: cysteine synthase as a key player in Al response. **Proteomics**, v.7 p.737-749, 2007.

YEMM, E.W.; COCKING, E.C. The determination of amino-acids with ninhydrin. **Analyst.**, v.80, p.209-213, 1955.

ZAVAS, T.; SYMEONIDIS, L.; KARATAGLIS, S. Responses to aluminium toxicity effects of two populations of *Piptatherum miliaceum* (L.) Cosson. **JAgron Crop Sci**, v.177 p.25-32, 1996.

ZHAO, X. J.; SUCOFF, E.; STADELMANN, E. J. Al^{3+} and Ca^{2+} alteration of membrane permeability of *Quercus rubra* root cortex cells. **Plant Physiol**, v.83, p.159-162, 1987.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados desta pesquisa permitem confirmar que o Girassol se mostra relativamente mais sensível ao alumínio do que outras culturas. Mesmo considerando a variedade Catissol, a qual apresentou o maior grau de tolerância à toxidez por alumínio, o rendimento da massa seca ficou abaixo daquelas verificadas em culturas como o sorgo, o milho e o trigo, quando submetidas a concentrações semelhantes ou mesmo acima da utilizada neste trabalho.

Por outro lado foi verificado que a manutenção dos teores de fósforo nas raízes apresenta associação com a tolerância do girassol ao alumínio. Desta maneira, é possível que o caráter de tolerância esteja de alguma forma envolvido com um melhor aproveitamento da fração de fósforo disponível para a planta.

Em outro cenário o trabalho permitiu verificar que a variedade sensível apresenta redução no percentual de integridade da membrana, no teor relativo de água e no teor de pigmentos, quando exposta ao Al, algo não verificado na variedade tolerante. Essa constatação sugere que estas alterações podem estar relacionadas com a sensibilidade do girassol ao estresse por Al.

Deve-se ainda salientar que estes danos ocorreram a longo prazo, mostrando que o estresse se intensifica nos últimos períodos experimentais, e assim a tolerância deve envolver mecanismos que se expressem ao longo de todo o período de exposição ao Al.

Esta pesquisa também serviu para mostrar que o acúmulo de solutos orgânicos, se associa com a tolerância ao alumínio em plantas de girassol. Este resultado foi particularmente evidente nas raízes, primeiro sítio de contato da planta com o Al.

Por fim, pode-se inferir que os resultados desta pesquisa revelaram, um marcador nutricional (teor de P nas raízes), três bioquímicos (teores de carboidratos solúveis, aminoácidos livres e prolina livre nas raízes), e dois fisiológicos (PIA e TRA), relacionados com a tolerância do girassol ao estresse por Al. Ainda mais, estes dados sugerem novas pesquisas com o intuito de investigar o papel específico destes marcadores na tolerância do girassol bem como sua utilização em programas de melhoramento genético desta espécie.