

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE AGRONOMIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**  
**CIÊNCIA DO SOLO**

**TESE**

**Estudos da Tolerância ao Alumínio em Arroz de  
Sequeiro e Seus Efeitos Sobre a Interface  
Solo-Planta**

**Everaldo Zonta**

**2003**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – CIÊNCIA DO SOLO**

**ESTUDOS DA TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM ARROZ DE SEQUEIRO E  
SEUS EFEITOS SOBRE A INTERFACE SOLO-PLANTA**

**EVERALDO ZONTA**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Manlio Silvestre Fernandes**

*e Co-orientação da Professora*  
**Rosane Nora Castro**

Tese submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Philosophiae  
Doctor** em Agronomia, Área de  
Concentração em Ciência do Solo

Seropédica  
Fevereiro de 2003

ZONTA, Everaldo

ESTUDOS DA TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM ARROZ DE SEQUEIRO E SEUS EFEITOS SOBRE A INTERFACE SOLO-PLANTA. Seropédica. Rio de Janeiro. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Agronomia. 2003. 139 pag. 21 tabelas. 45 figuras.

Orientador:

I. Fernandes, Manlio Silvestre. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Agronomia. III. Estudos da tolerância ao alumínio em arroz de sequeiro e suas interfaces radiculares.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE AGRONOMIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – CIÊNCIA DO SOLO**

EVERALDO ZONTA

Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Ciência do Solo, como requisito parcial para obtenção do grau de **Philosophiae Doctor** em Agronomia.

TESE APROVADA EM 11/02/2003

---

Manlio Silvestre Fernandes. Ph.D. UFRRJ  
(Orientador)

---

Rosane Nora Castro. Dra. UFRRJ  
(Co-orientador)

---

Fábio Lopes Olivares. Dr. UENF

---

Eduardo Lima. Dr. UFRRJ

---

Marcos Gervásio Pereira. Dr. UFRRJ.

Para chegar ao fim das coisas,  
o primeiro passo é julgá-las possíveis  
(Luiz XIV)

## **DEDICATÓRIA**

Dedico à  
Evânia, Caio e Joanna

## **AGRADECIMENTO**

Agradeço à Deus.

## **BIOGRAFIA**

Everaldo Zonta, nascido em Seara, SC, é Técnico em Agropecuária pela Escola Agrotécnica Federal de Concórdia. Ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em 1988, onde obteve os Títulos de Engenheiro Agrônomo e Licenciado em Ciências Agrícolas até 1993. Foi bolsista de IC pelo CNPq entre 1990 e 1993, e Bolsista de Mestrado entre 1994 e 1996, quando obteve o título de MSc pelo Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo da UFRRJ. Em 1997 ingressou no Programa de Doutorado do CPGA-CS e foi contratado como Professor Substituto do Departamento de Fitotecnia da UFRRJ, solicitando neste mesmo ano rescisão de contrato para em 1998 assumir o Cargo de Professor Assistente do Departamento de Solos da UFRRJ, onde havia sido aprovado em primeiro lugar em concurso público de provas e títulos. Desde então leciona na disciplina de Fertilidade do Solo e Fertilidade do Solo e Manejo da Adubação de Pastagens. É Editor Assistente da Revista Universidade Rural – Série Ciências da Vida.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO GERAL .....</b>	<b>I</b>
<b>GENERAL ABSTRACT .....</b>	<b>III</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>1</b>
<b>O ESTADO DA ARTE .....</b>	<b>4</b>
1.1. Solos Ácidos no Brasil e no Mundo .....	4
1.2. O Al e seus Efeitos Tóxicos .....	7
1.3. Os Mecanismos de Tolerância .....	10
1.4. Moléculas Orgânicas na Agricultura .....	16
1.5. Estratégias para Cultivo em Solos Ácidos .....	17
1.6. O Arroz de Sequeiro no Brasil .....	18
<b>CAPÍTULO I – METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DA ÁREA E DO COMPRIMENTO RADICULAR APLICADAS EM ARROZ DE SEQUEIRO SUBMETIDO A ESTRESSE POR ALUMÍNIO .....</b>	<b>20</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>21</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>22</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>25</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
3.1. Condições de Cultivo das Plantas .....	27
3.2. Determinação da Área e do Comprimento Radicular pelo Método Foloelétrico e por Análise de Imagens .....	30
3.3. Aquisição das Imagens dos Sistemas Radiculares via Câmara Fotográfica Digital e via Scanner .....	32
3.4. Efeito da Densidade de Varredura do Scanner na Aquisição de Imagens e Determinação de Área e Comprimento Radicular .....	33
3.5. Determinação de um Protocolo para Aquisição de Parâmetros Radiculares de Plântulas Jovens .....	33
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
4.1. Determinação de Área, Comprimento e Raio Radicular pelo Método Foloelétrico e por Análise de Imagem .....	34
4.2. Aquisição das Imagens dos Sistemas Radiculares via Câmara Fotográfica Digital e via Scanner .....	37
4.3. Efeito da Densidade de Varredura do Scanner na Aquisição de Imagens e Determinação de Área e Comprimento Radicular .....	39
4.4. Protocolo para Aquisição de Parâmetros Radiculares de Plântulas Jovens .....	41
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>46</b>
<b>CAPÍTULO II – ALTERAÇÕES EM PARÂMETROS MORFOLÓGICOS DE RAÍZES DE CULTIVARES DE ARROZ DE SEQUEIRO SUBMETIDAS AO ALUMÍNIO .....</b>	<b>47</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>48</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>49</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>50</b>

<b>2.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>53</b>
2.1.	Ontogenia radicular e Al .....	56
<b>3.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>59</b>
3.1.	Seleção das Variedades .....	59
3.2.	Tratamentos.....	59
3.3.	Condução dos Experimentos.....	60
3.4.	Coleta dos Dados de Área Radicular, Comprimento Radicular e Número de Eixos Secundários .....	60
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>63</b>
4.1.	Respostas ao Al Sobre Baixo Nível de Nutrientes .....	63
4.1.1.	<i>Período de 4 Dias de Exposição ao Al.....</i>	<i>64</i>
4.1.2.	<i>Período de 15 Dias de Exposição ao Al.....</i>	<i>70</i>
4.2.	Respostas ao Al Sobre Alto Nível de Nutrientes .....	75
4.2.1.	<i>Período de 4 Dias de Exposição ao Al.....</i>	<i>77</i>
4.2.2.	<i>Período de 15 Dias de Exposição ao Al.....</i>	<i>82</i>
4.3.	Análise conjunta dos dados.....	87
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>89</b>
<b>CAPÍTULO III – ATENUAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS DO ALUMÍNIO POR ÁCIDOS ORGÂNICOS EM CULTIVARES DE ARROZ.....</b>		<b>90</b>
<b>RESUMO .....</b>		<b>91</b>
<b>ABSTRACT.....</b>		<b>92</b>
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>93</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>94</b>
2.1.	Evolução na Determinação de Ácidos Orgânicos .....	98
<b>3.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>100</b>
3.1.	Estabilidade dos Ácidos Orgânicos em Solução.....	100
3.2.	Condições Cromatográficas .....	101
3.3.	Efeito da Adição Externa de Ácidos Orgânicos .....	101
3.4.	Coleta de Amostra para Análise de Ácidos Orgânicos Exudados e Contidos no Sistema Radicular .....	102
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>103</b>
4.1.	Estabilidade de Ácidos Orgânicos em Solução .....	103
4.2.	Efeito da Adição Externa de Ácidos Orgânicos .....	105
4.3.	Exudação de Ácido Cítrico e Ácido Málico .....	108
4.4.	Complexação Interna do Al por Ácido Cítrico e Ácido Málico .....	111
4.5.	Considerações a Cerca do Mecanismo de Tolerância Estudado.....	113
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>114</b>
<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>		<b>115</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>		<b>117</b>
<b>ANEXOS .....</b>		<b>135</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição global de solos com problemas de acidez. USDA 2002.....	5
Figura 2. Mapas de Solos do Brasil. a) áreas com limitação de Al e/ou Ca+Mg; e b) áreas sem nenhuma limitação ao cultivo. EMBRAPA, 2002.....	6
Figura 3. Modelos propostos por Ma <i>et al</i> (2001) para ativação da exudação de ácidos orgânicos. ....	14
Figura 4. Absorção e distribuição Al em plantas acumuladoras. Abreviaturas: Cit, citrato; Ox, oxalato; Pm, membrana plasmática. Ma <i>et al</i> (2001). ....	15
Figura 5. Modelo condensado para biossíntese e exudação de ácido cítrico e málico. Bucio <i>et al</i> , 2000. ....	16
Figura 6. Distribuição da radiação fotossinteticamente ativa sobre a bancada de cultivo das plantas. ....	29
Figura 7. Temperatura máxima e mínima do ar (°C). As barras à direita são os desvios padrões das temperaturas. ....	29
Figura 8. Umidade relativa máxima e mínima do ar (%). As barras à direita são os desvios padrões da umidade. ....	30
Figura 9. Medidor fotoelétrico licor, modelo LI 300 (a) e sistema computacional para aquisição de imagem via <i>scanner</i> (b). ....	32
Figura 10. Câmara fotográfica digital Kodak DC 40 utilizada para captura de imagens. ....	32
Figura 11. Correlação linear simples para área radicular total (ART; a) e comprimento radicular total (CRT; b) pelo método do medidor fotoelétrico (ME) e pelo método de análise digital de imagem (MD). O R <sup>2</sup> e os coeficientes lineares são significativos à 1%. ....	35
Figura 12. Correlação linear simples para área radicular total (ART) determinada pelo método do medidor fotoelétrico (ME) e pelo método de análise digital de imagem (MD) de plântulas de arroz não submetidas ao Al (a) ou submetidas ao Al (b). O R <sup>2</sup> e os coeficientes lineares são significativos à 1%, exceto para (b), onde R <sup>2</sup> é significativo a 5%. ....	35
Figura 13. Comparação entre: a) Área radicular total (ART, cm <sup>2</sup> ) obtida via <i>scanner</i> e por câmara fotográfica digital, e b) comprimento radicular total (CRT, mm <sup>2</sup> ) obtido via imagens digitalizadas por <i>scanner</i> e por câmara fotográfica digital. O R <sup>2</sup> e os coeficientes lineares são significativos à 1%, exceto para (a), onde R <sup>2</sup> é significativo a 5%. ....	38
Figura 14. Efeito da densidade de varredura na área radicular total de plântulas de arroz (variedade Comum Branco) crescidas por 5 dias em solução nutritiva completa (as linhas pontilhadas representam os desvios padrões de cada ponto). ....	40
Figura 15. Relação teórica entre densidade da varredura, tamanho do arquivo e espessura de 1 pixel, para uso de apenas 1 cor (preto – 1 bit). ....	41
Figura 16. Comparação entre a área radicular total (ART) e comprimento radicular total (CTR) determinado entre o medidor fotoelétrico e de imagens adquiridas por câmara fotográfica digital (CFD) ou <i>scanner</i> . As barras indicam a DMS. ....	42
Figura 17. Atividade de Al livre em função do nível adicionado, em solução nutritiva de Furlani e Furlani Modificada, em concentração total e meio força iônica (A) e em função do pH (B). ....	60
Figura 18. Imagem de raiz esqueletonizada da variedade Comum Branco submetida a 320 μmol de Al. A) sistema radicular total (altura 142,4 mm e largura 128,3 mm) e, B) destaque de uma quadrícula (altura e largura de 30,0 mm). ....	61
Figura 19. Reduções relativas de área radicular total (ART) e comprimento radicular total (CRT) nas variedades Comum Branco e Caiapó, quando submetidas a doses crescentes de Al e baixos níveis nutricionais, por períodos de 4 dias (A e B) e 15 dias (C e D). ....	64
Figura 20. Reduções relativas de área (a) e comprimento radicular (b) das raízes principais e laterais, e, valores absolutos de área radicular (c) e comprimento (d), da variedade Caiapó, submetida a doses crescentes de Al e baixos níveis nutricionais, por 4 dias. ....	66
Figura 21. Redução relativa do comprimento radicular (a) das raízes principais e laterais, valores absolutos de comprimento (b), da variedade Caiapó, submetida a doses crescentes de Al e baixos níveis nutricionais, por 4 dias. ....	66
Figura 22. Reduções relativas de área (a) e comprimento radicular (b) das raízes principais e laterais, e, valores absolutos de área radicular (c) e comprimento (d), da variedade Comum Branco, submetida a doses crescentes de Al e baixos níveis nutricionais, por 4 dias. ....	68
Figura 23. Redução relativa do comprimento radicular (a) das raízes principais e laterais, valores absolutos de comprimento (b), da variedade Comum Branco, submetida a doses crescentes de Al e baixos níveis nutricionais, por 4 dias. ....	69

Figura 24. Reduções relativas de área (a) e comprimento radicular (b) das raízes principais e laterais, e, valores absolutos de área radicular (c) e comprimento (d), da variedade Caiapó, submetida a doses crescentes de Al e baixos níveis nutricionais, por 15 dias.....	71
Figura 25. Redução relativa do comprimento radicular (a) das raízes principais e laterais, valores absolutos de comprimento (b), da variedade Caiapó, submetida a doses crescentes de Al e baixos níveis nutricionais, por 15 dias.....	71
Figura 26. Reduções relativas de área (a) e comprimento radicular (b) das raízes principais e laterais, e, valores absolutos de área radicular (c) e comprimento (d), da variedade Comum Branco, submetida a doses crescentes de Al e baixos níveis nutricionais, por 15 dias.....	74
Figura 27. Redução relativa do comprimento radicular (a) das raízes principais e laterais, valores absolutos de comprimento (b), da variedade Comum Branco, submetida a doses crescentes de Al e baixos níveis nutricionais, por 15 dias. ....	74
Figura 28. Reduções relativas de área radicular total (ART) e comprimento radicular total (CRT) nas variedades Comum Branco e Caiapó, quando submetidas a doses crescentes de Al e altos níveis nutricionais, por períodos de 4 dias (A e B) e 15 dias (C e D). ....	77
Figura 29. Reduções relativas de área (a) e comprimento radicular (b) das raízes principais e laterais, e, valores absolutos de área radicular (c) e comprimento (d), da variedade Caiapó, submetida a doses crescentes de Al e altos níveis nutricionais, por 4 dias. ....	78
Figura 30. Redução relativa do comprimento radicular (a) das raízes principais e laterais, valores absolutos de comprimento (b), da variedade Caiapó, submetida a doses crescentes de Al e altos níveis nutricionais, por 4 dias.....	79
Figura 31. Reduções relativas de área (a) e comprimento radicular (b) das raízes principais e laterais, e, valores absolutos de área radicular (c) e comprimento (d), da variedade Comum Branco, submetida a doses crescentes de Al e altos níveis nutricionais, por 4 dias. ....	81
Figura 32. Redução relativa do comprimento radicular (a) das raízes principais e laterais, valores absolutos de comprimento (b), da variedade Comum Branco, submetida a doses crescentes de Al e altos níveis nutricionais, por 4 dias.....	81
Figura 33. Reduções relativas de área (a) e comprimento radicular (b) das raízes principais e laterais, e, valores absolutos de área radicular (c) e comprimento (d), da variedade Caiapó, submetida a doses crescentes de Al e altos níveis nutricionais, por 15 dias. ....	83
Figura 34. Redução relativa do comprimento radicular (a) das raízes principais e laterais, valores absolutos de comprimento (b), da variedade Caiapó, submetida a doses crescentes de Al e altos níveis nutricionais, por 15 dias.....	83
Figura 35. Reduções relativas de área (a) e comprimento radicular (b) das raízes principais e laterais, e, valores absolutos de área radicular (c) e comprimento (d), da variedade Comum Branco, submetida a doses crescentes de Al e altos níveis nutricionais, por 15 dias.....	86
Figura 36. Redução relativa do comprimento radicular (a) das raízes principais e laterais, valores absolutos de comprimento (b), da variedade Comum Branco, submetida a doses crescentes de Al e altos níveis nutricionais, por 15 dias. ....	86
Figura 37. Cromatogramas do ácido cítrico (exógeno) no tempo 0 e ao final do período experimental (15 dias). ....	104
Figura 38. Redução relativa da área radicular (RRART, %) das variedades de arroz Caiapó (CA) e Comum Branco (CB) submetidas aos tratamentos a 0 e 160 $\mu\text{mol Al L}^{-1}$ (-Al e +Al), combinadas com 0 e 160 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ácido cítrico (-cit e +cit). A barra indica a DMS. ....	105
Figura 39. Redução relativa do comprimento radicular (RRCRT, %) das variedades de arroz Caiapó (CA) e Comum Branco (CB) submetidas aos tratamentos a 0 e 160 $\mu\text{mol Al L}^{-1}$ (-Al e +Al), combinadas com 0 e 160 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ácido cítrico (-cit e +cit). A barra indica a DMS. ....	106
Figura 40. Redução relativa da área radicular (RRART, %) das variedades de arroz Caiapó e Comum Branco submetidas aos tratamentos a 0 e 160 $\mu\text{mol Al L}^{-1}$ (-Al e +Al), combinadas com 0 e 160 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ácido málico (-mal e +mal). A barra indica a DMS. ....	107
Figura 41. Redução relativa do comprimento radicular (RRCRT, %) das variedades de arroz Caiapó (CA) e Comum Branco (CB) submetidas aos tratamentos a 0 e 160 $\mu\text{mol Al L}^{-1}$ (-Al e +Al), combinadas com 0 e 160 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ácido málico (-mal e +mal). A barra indica a DMS. ....	107
Figura 42. Exudação de ácidos orgânicos pelas variedades de arroz Comum Branco (CB) e Caiapó (CA), na presença (+) ou ausência (-) de Alumínio (Al), por um período de 4 dias de exposição ao elemento. A barra ao lado da legenda indica a DMS para cada ácido, respectivamente.....	110
Figura 43. Exudação de ácidos orgânicos pelas variedades de arroz Comum Branco (CB) e Caiapó (CA), na presença (+) ou ausência (-) de Alumínio (Al), por um período de 15 dias de	

	exposição ao elemento. A barra ao lado da legenda indica a DMS para cada ácido, respectivamente.....	110
Figura 44.	Conteúdo de ácidos orgânicos acumulados nas raízes das variedades de arroz Comum Branco (CB) e Caiapó (CA), na presença (+) ou ausência (-) de Alumínio (Al), por um período de 4 dias de exposição ao elemento. A barra ao lado da legenda indica a DMS para cada ácido, respectivamente.....	111
Figura 45.	Conteúdo de ácidos orgânicos acumulados nas raízes das variedades de arroz Comum Branco (CB) e Caiapó (CA), na presença (+) ou ausência (-) de Alumínio (Al), por um período de 15 dias de exposição ao elemento. A barra ao lado da legenda indica a DMS para cada ácido, respectivamente.....	112

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.	Algumas características das variedades de arroz utilizadas nos experimentos.....	27
Tabela 2.	Solução nutritiva de Furlani & Furlani (1988) modificada e doses de Alumínio.....	28
Tabela 3.	Área radicular total (ART), comprimento radicular total (CRT) e raio médio radicular (RMR), determinados pelo método fotoelétrico e pelo método digital.....	34
Tabela 4.	Significância do teste F e coeficiente de variação (CV) dos diferentes métodos para avaliação do efeito do Al, variedades e sua interação, para os parâmetros: a) área radicular total (ART); b) comprimento radicular total (CRT) e c) raio médio radicular (RMR). ....	36
Tabela 5.	Valores da área radicular total (ART), comprimento radicular total (CRT) e raio médio radicular (RMR) das variedades de arroz de sequeiro submetidas as doses de 0 e 160 $\mu\text{mol}$ de Al, estimados pelo método digital. ....	37
Tabela 6.	Redução relativa de área radicular total (RRART), redução relativa do comprimento radicular total (RRCRT) e aumento relativo do raio médio radicular (ARRMR), obtidos a partir dos parâmetros adquiridos via método da análise digital de imagens.....	37
Tabela 7.	Coefficientes de variação dos parâmetros área radicular total (ART), comprimento radicular total (CRT), área das raízes principais (ARP), comprimento das raízes principais (CRP), área das raízes laterais (ARL) e comprimento das raízes laterais (ARL) em função do método empregado para aquisição de imagem (Scanner e Câmara Fotográfica Digital-CFD) e época da coleta. ....	39
Tabela 8.	Estimativas de área radicular total (ART) e comprimento radicular total (CRT) obtido por diferentes operadores, utilizando o protocolo estabelecido durante a comparação dos métodos.....	45
Tabela 9.	Parâmetros morfológicos e topológicos do sistema radicular das variedades Caiapó e Comum Branco cultivadas em solução nutritiva por 5 dias, livres de condições de estresses ....	59
Tabela 10.	Redução relativa e valores absolutos do número de raízes principais (NRP), número de raízes laterais (NRLP), na distância médias entre raízes laterais (DMRL) e no raio médio radicular da variedade Caiapó, submetida a doses crescentes de Al e baixos níveis nutricionais, por 4 dias.....	67
Tabela 11.	Redução relativa do número de raízes principais (NRP), número de raízes laterais (NRLP), na distância médias entre raízes laterais (DMRL) e no raio médio radicular da variedade Comum Branco, submetida a doses crescentes de Al e baixos níveis nutricionais, por 4 dias. ..	69
Tabela 12.	Redução relativa do número de raízes principais (NRP), número de raízes laterais (NRLP), na distância médias entre raízes laterais (DMRL) e no raio médio radicular da variedade Caiapó, submetida a doses crescentes de Al e baixos níveis nutricionais, de Al por 15 dias.....	72
Tabela 13.	Redução relativa e valores absolutos do número de raízes principais (NRP), número de raízes laterais (NRLP), na distância médias entre raízes laterais (DMRL) e no raio médio radicular da variedade Comum Branco, submetida a doses crescentes de Al e baixos níveis nutricionais, por 15 dias. ....	75
Tabela 14.	Redução relativa e valores absolutos do número de raízes principais (NRP), número de raízes laterais (NRLP), na distância médias entre raízes laterais (DMRL) e no raio médio radicular da variedade Caiapó, submetida a doses crescentes de Al e altos níveis nutricionais, por 4 dias.....	79
Tabela 15.	Redução relativa e valores absolutos do número de raízes principais (NRP), número de raízes laterais (NRLP), na distância médias entre raízes laterais (DMRL) e no raio médio radicular da variedade Comum Branco, submetida a doses crescentes de Al e altos níveis nutricionais, por 4 dias.....	82

Tabela 16. Redução relativa e valores absolutos do número de raízes principais (NRP), número de raízes laterais (NRLP), na distância médias entre raízes laterais (DMRL) e no raio médio radicular da variedade Caiapó, submetida a doses crescentes de Al e altos níveis nutricionais, de Al por 15 dias. ....	84
Tabela 17. Redução relativa e valores absolutos do número de raízes principais (NRP), número de raízes laterais (NRLP), na distância médias entre raízes laterais (DMRL) e no raio médio radicular (RMR) da variedade Comum Branco, submetida a doses crescentes de Al e altos níveis nutricionais, por 15 dias. ....	87
Tabela 18. Exudação de alguns ácidos orgânicos por deferentes espécies de plantas em respostas a estímulos ambientais.....	95
Tabela 19. Estimulação específica de ácido málico nas raízes de trigo pelo Al. Dados Delhaize <i>et al</i> (1993b).....	97
Tabela 20. Tempo de retenção e área integrada de cada ácido orgânico contido na amostra padrão, com intervalo de 6 meses em água. Valores obtidos por triplicata.....	103
Tabela 21. Área integrada de cada ácido orgânico contido na amostra padrão e após a ressuspensão. Os valores são médios de triplicatas.....	104

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Cromatograma dos padrões dos ácidos na coluna SUPELCOGEL C-610H. SUPELCO, 1999. ....	135
Anexo 2. Curvas de calibração utilizadas para determinação dos ácidos de interesse (ácido cítrico, málico e oxálico).....	136
Anexo 3. Cromatograma típico da amostra padrão no tempo 0. Novembro de 2000.....	137
Anexo 4. Cromatograma típico da amostra padrão após 6 meses de armazenamento. Abril de 2001.....	137
Anexo 5. Perfil cromatográfico da exudação de ácidos orgânicos por Caiapó e Comum Branco, respectivamente, submetidas a 160 $\mu\text{mol}$ de Al por 4 dias. ....	138
Anexo 6. Perfil cromatográfico de ácidos orgânicos contidos no sistema radicular das variedades de arroz de sequeiro Caiapó e Comum Branco, respectivamente submetidas a 160 $\mu\text{mol}$ de Al por 4 dias. ....	138

## LISTA DE SÍMBOLOS

Al	Alumínio
ARP	Área das raízes principais
ARL	Área das raízes laterais
ART	Área radicular total
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMP	Comprimento médio de raízes principais
CML	Comprimento médio de raízes laterais
CRP	Comprimento das raízes principais
CRL	Comprimento das raízes laterais
CRT	Comprimento radicular total
DAL	dias de exposição ao Al
DAP	dias após plantio
DAT	dias após transplante
DC40	Câmara Digital Kodak Modelo DC40
DMRL	Distância média entre raízes laterais no eixo principal
DPI	dots per inch = pontos por polegada
HPLC	CLAE
NRP	Número de raízes principais
NRL	Número de raízes laterais
NRLP	Número de raízes laterais por eixo principal
Ton	Tonelada

## RESUMO GERAL

ZONTA, Everaldo. **Estudos da tolerância ao alumínio em arroz de sequeiro e seus efeitos sobre a interface solo-planta**. Seropédica: UFRRJ, 2003. 139 p. (Tese, Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo)

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a tolerância diferencial de variedades de arroz de sequeiro e seus efeitos sobre a morfofisiologia dos sistemas radiculares, tendo sido estabelecidos os seguintes objetivos específicos: a) estabelecer uma metodologia para quantificar o sistema radicular e suas variantes; b) avaliar o grau das modificações rizomorfogênicas em variedades de arroz tolerantes ao Al; c) avaliar a exudação radicular e a complexação interna com ácidos orgânicos como mecanismos de tolerância ao Al. Os estudos foram conduzidos com as variedades Comum Branco e Caiapó, ambas de sequeiro, sob condições de crescimento controladas em solução nutritiva sob alto e baixo nível nutricional em duas épocas distintas, até o estágio máximo de 15 dias de exposição ao Al. Os parâmetros radiculares foram avaliados com auxílio de técnicas de análise de imagens. Os ácidos orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência. Alguns protocolos tiveram que ser estudados a fim de padronizar as medições diretas e indiretas necessárias. Dentre as conclusões obtidas, com relação à determinação dos parâmetros radiculares, observa-se que o medidor fotoelétrico subestima os valores de área e comprimento radicular, além de não discriminar a tolerância diferencial ao Al, quando comparado com o método da análise digital das imagens. A aquisição das imagens de raízes, para serem processadas pelo SIARCS, deve ser feita preferencialmente com scanner, já que a câmara fotográfica digital também subestima a área radicular e não diferencia totalmente a tolerância varietal em plântulas de arroz de sequeiro. A melhor densidade para varredura do scanner e digitalização é de 300 dpi, e o protocolo elaborado no decorrer destas fases experimentais deve ser seguido, evitando assim aumentos nos erros experimentais. Com relação ao efeito do Al nos diferentes níveis nutricionais e tempo de exposição, a variedade de alta tolerância ao Al (Comum Branco), quando na presença de Al, a qualquer tempo ou, disponibilidade nutricional, desde que o Al esteja com mesma atividade em solução, apresenta menor redução dos parâmetros radiculares. A variedade tolerante ao Al (Caiapó) apresenta grau variado de tolerância, de acordo com a disponibilidade de nutrientes; sob baixa disponibilidade, Caiapó mostra-se de fato menos tolerante ao Al que Comum Branco; sob alta disponibilidade, Caiapó mostra-se ao longo do tempo mais tolerante que Comum Branco. Ainda, o parâmetro raio radicular das raízes principais, mostrou em qualquer situação testada, menor alteração na Comum Branco do que na Caiapó. Com base nestas conclusões, pode-se afirmar efetivamente que a variedade Comum Branco tolera o Al, e que a variedade Caiapó pode aclimatar-se ao Al, quando sob maior disponibilidade nutricional. Com relação à ação dos ácidos cítrico e málico na tolerância: a metodologia para determinação de ácidos orgânicos exsudados pelas raízes de plântulas de arroz é eficiente. O ácido cítrico tem um poder complexante do Al maior que o ácido málico. Quando adicionado isoladamente, o ácido málico promove um estímulo tanto na área como no comprimento radicular total. O efeito atenuador dos ácidos cítrico e málico é mais acentuado na variedade Caiapó. Embora, a variedade Comum Branco tem maior capacidade de atenuar o efeito do Al pelas quantidades de ácidos cítrico e málico, principalmente, exudados, e, acumuladas em seu sistema radicular.

**Palavras chave:** Mecanismos de tolerância ao Al; análise de imagem; ácidos orgânicos; sistema radicular.

## GENERAL ABSTRACT

ZONTA, Everaldo. **Studies of the aluminum tolerance in upland rice and the effects on the soil-plant interface.** Seropédica: UFRRJ, 2003. 139 p. (Thesis, Doctor in Agronomy, Soil Science).

This study was accomplished with the general objective of evaluating the aluminum differential tolerance of upland rice and its effects on the morphofisiology of the root systems. The following goals were predetermined: a) to establish a method to quantify the root system and its variants; b) to evaluate the degree of rizomorphogenic modifications in Al tolerant rice plants; c) to evaluate the root exudation as a mechanism for Al tolerance, and to assess the value of complexation with organic acids as a mechanism of Al tolerance. The study was conducted with the Comum Branco and Caiapó rice variety's, both upland rice, grown under controlled environment. The plants were cultivated in nutrient solution, with high and low doses of nutrients, in two different periods, to the maximum of 15 days of exposition to Al. The root parameters were appraised with the aid of image analyzing techniques. The content of organic acids was measured by high efficiency liquid chromatography. Some protocols had to be adapted, to standardize the necessary direct and indirect measurements. In regard the determination of root parameters, the photoelectric meter underestimates the root length and the root area values. Besides, it does not discriminate the differential tolerance to Al, when compared with the method of the digital image analyzing. The acquisition of the root images, to be processed by the program SIARCS, should be obtained preferentially with a scanner. The digital photographic camera underestimates the root area, and it does not completely differentiate the varietal tolerance in the upland rice seedling. The best density for scanning the image is of 300 dpi, and the protocol elaborated in these experiments should be followed to avoid the increasing in the experimental errors. Regarding Al's effect in the different nutrition levels, and time of exposition, when in the presence of Al, at any time or nutritional level, as long as Al activity is kept the same, the rice variety with high tolerance to Al (Comum Branco) presents the least reduction of the root parameters. The plants just tolerant to Al (Caiapó) present varied degree of tolerance to the element in the nutrient solution. This is in conformity with the nutrient availability. Under low nutrient availability, Caiapó is less Al tolerant than Comum Branco; under high nutrient availability, Caiapó is more tolerant, and for a longer period of time than Comum Branco. Also, the parameter ray of the main roots revealed, in any tested situation, least alterations in the Comum Branco than in Caiapó. Based on these conclusions, it can be stated that the variety Comum Branco is Al tolerant, and the variety Caiapó can be Al tolerant, when under high nutrient availability. In regard to the effect of the citric and malic acids on the Al tolerance, the method for determining the organic acids exudated by the rice seedling roots is efficient. The citric acid has an Al complexant power highest than the malic acid. When added separately, the malic acid promotes an inducement in the development of root area and of the total root length. The attenuation effect of the citric and malic acids is more accentuated in the variety Caiapó. However, the Comum Branco has higher attenuation of Al effect capacity, due to the amount of citric and malic acids exudated and accumulated in the root system.

**Key words:** Mechanisms of tolerance to Al; image analysis; organic acids; system radicular.

## INTRODUÇÃO GERAL

O alumínio é o terceiro elemento mais abundante da crosta terrestre (8% da constituição), e com o processo natural ou antrópico de acidificação dos solos, a estabilidade química dos compostos de Al é reduzida aumentando a solubilidade dos minerais. O  $Al^{+3}$  é então liberado para a solução do solo em maior ou menor quantidade, tornando-se potencialmente prejudicial ao desenvolvimento e produção da maioria das plantas cultivadas (Ma *et al*, 2001).

Solos ácidos ocorrem em todas as partes do mundo onde há clima tropical e subtropical. No Brasil, ocorrem com uma frequência de aproximadamente 60% dos solos cultivados e constituem junto ao estresse hídrico estacional, a principal limitação à produção vegetal (Sanchez & Logan, 1992), além de que a ocorrência frequente de Al em horizontes sub-superficiais (Olmos & Camargo, 1976) confina o crescimento radicular à camada superficial, agravando as conseqüências dos períodos secos (Fageria & Zimmermann, 1979).

Porém, ao longo do seu ciclo evolutivo, algumas espécies vegetais, desenvolveram mecanismos de tolerância ao  $Al^{+3}$ , minimizando os efeitos tóxicos deste elemento, de onde se vislumbra a possibilidade de utilizá-las para cultivo em solos ácidos, reduzindo assim o custo com corretivos.

As técnicas tradicionais para a viabilização da agricultura, nos solos tropicais com elevada saturação por alumínio, têm enfatizado o uso de correção química do solo (aplicação de calcário) e aplicação de elevadas doses de nutrientes, particularmente de adubação fosfatada. Mas, a adequação do solo aos requerimentos de plantas geneticamente melhoradas e com alta exigência nutricional, é parte de uma estratégia que implica no uso oneroso de insumos, reduzindo a capacidade competitiva de pequenos agricultores, com insuficiência de capital.

Os mecanismos de tolerância ao  $Al^{+3}$  em plantas cultivadas são ainda pouco conhecidos e/ou elucidados, e provavelmente, ocorrem de maneira diferenciada entre as espécies (MA *et al*, 2001), e, embora exista um grande número de pesquisas sobre o efeito tóxico do alumínio em plantas cultivadas, que produziram um volume significativo de informações, onde as técnicas de seleção obtiveram relativo sucesso na identificação de materiais relativamente tolerantes, continuam porém incertas quais são

as disfunções primárias e quais deveriam ser mais propriamente consideradas como efeitos secundários (Tice *et al*, 1992; Kochian, 1995; Rout *et al*, 2001), que são preponderantes nos estudos que envolvem os estudos dos mecanismos de tolerância.

Uma alternativa antiga, mas de crescente difusão nos centros de pesquisa de agricultura tropical, enfatiza a adaptação da planta às condições do solo, através da exploração da variabilidade genotípica. De acordo com Sanchez & Salinas (1981), a seleção de variedades produtivas tolerantes à toxicidade de alumínio é o principal componente do manejo da acidez do solo. Na mesma direção, outros autores (Fageria *et al*, 1988; Taylor, 1991; Baligar *et al*, 1993) têm mostrado a importância desse trabalho, estudando a viabilidade intra-genótipos, onde fica clara a existência da variabilidade a tolerância ao Al, necessárias a esses programas (Wright, 1989; Kochian, 1995), e que forneceriam o material necessário aos estudos básicos relacionados.

Particularmente, em arroz, uma série de trabalhos já foi publicada, e evidenciam uma grande variabilidade nos níveis de tolerância, porém poucos são os trabalhos que tratam dos eventuais mecanismos de tolerância que devem existir, principalmente nas variedades do tipo tradicionais (também nomeadas como crioulos ou variedades locais) de sequeiro. Em geral esses trabalhos tem se centrado em medições das raízes principais como indicativos de tolerância e mais raramente alguns tem demonstrado com sucesso a existência de variedades que mantêm sua produtividade sob Al, em condições de campo.

A compreensão dos mecanismos básicos relacionados a tolerância diferencial na cultura do arroz é essencial para identificação de genes para tolerância ao Al, que será, seguramente, a via mais promissora no futuro próximo para a síntese de variedades adaptadas aos nossos solos, por processos tradicionais ou biotecnológicos (Wheeler *et al*, 1992). Assim, o exame da morfologia dos sistemas radiculares e suas interfaces rizosféricas, além dos eventuais mecanismos envolvidos, não podem ser negligenciados (De Willigen & Noordwijk, 1987; Noordwijk & Geijn, 1996), especialmente para a cultura do arroz, alimento básico ( $75 \text{ kg habitante}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ ), produzido em parte sob condição de sequeiro, em áreas com níveis altos de Al, por pequenos produtores. Essas áreas (65% das cultivadas com arroz) são responsáveis por 40% da produção nacional, devido a suas baixas produtividades, limitadas primeiramente, pela acidez do solo, seguido por estresse hídrico estacional, fósforo e nitrogênio, sucessivamente.

Procurando preencher mais uma lacuna no estudo de mecanismos de tolerância ao Al, em arroz, este trabalho tem como objetivos:

- Estabelecer uma metodologia que permita quantificar o sistema radicular e suas variantes;
- Avaliar o grau das modificações nos parâmetros radiculares, tais como números de raízes principais e laterais, diâmetro médio e parâmetros derivados, em variedades de arroz tolerantes ao Al;
- Avaliar o grau de complexação do Al por ácidos orgânicos produzidos no ciclo do ácido cítrico.
- Avaliar a exudação radicular como mecanismo de tolerância ao Al;
- Avaliar a complexação interna com ácidos orgânicos como mecanismo de tolerância ao Al.

Para o melhor cumprimento dos objetivos e entendimento dos resultados, este trabalho de tese foi dividido em três capítulos, onde são abordados os seguintes tópicos, especificamente:

- CAPÍTULO I – METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DA ÁREA E DO COMPRIMENTO RADICULAR APLICADOS EM ARROZ DE SEQUEIRO SUBMETIDO A ESTRESSE DE ALUMÍNIO;
- CAPÍTULO II – ALTERAÇÕES EM PARÂMETROS MORFOLÓGICOS DE RAÍZES DE CULTIVARES DE ARROZ DE SEQUEIRO SUBMETIDAS AO ALUMÍNIO, e,
- CAPÍTULO III – ATENUAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS DO ALUMÍNIO POR ÁCIDOS ORGÂNICOS EM VARIEDADES DE ARROZ.

Foi também, inicialmente, introduzido um, tópico especial, onde em linhas gerais, sucintamente discute-se o Estado da Arte no que tange o assunto “Alumínio”, situando esse trabalho na área e permitindo que cada capítulo fosse mais explícito a cerca do proposto.

## O ESTADO DA ARTE

A acidez do solo, especificamente a presença de  $Al^{+3}$  (Al) a níveis tóxicos para a maioria das plantas cultivadas, é um dos principais fatores que limitam a produção agrícola, e as alternativas de manejo mais utilizadas para contornar a toxidez provocada pelo Al fundamentam-se no uso de duas práticas. Uma delas é a prática da calagem, que consiste na precipitação do Al solúvel pela adição de calcário ao solo. Embora esta seja uma prática tradicional e largamente empregada na agricultura, sua eficiência limita-se à camada superficial do solo, já que a incorporação do calcário a maiores profundidades é economicamente inviável, favorecendo o desenvolvimento radicular apenas na camada superficial do solo, o que torna a planta mais susceptível aos períodos de veranicos, sendo esse efeito mais acentuado nos sistemas de plantio direto, onde pouco se utilizam implementos agrícolas para revolver o solo.

Outra prática que tem sido adotada com êxito é o desenvolvimento de variedades com melhor adaptação a esses ambientes desfavoráveis, e é nesta linha que se tem desenvolvido trabalhos, procurando gerar tecnologia aos pequenos produtores, descapitalizados, e que a nível nacional e mundial, são responsáveis pela produção de alimentos, onde a escassez de recursos faz com que as técnicas de correção do solo baseadas na adição de neutralizantes não sejam efetuadas ou então efetuadas de forma inadequada e/ou ineficientes, pode-se conjecturar que a utilização da prática de calagem apenas para o fornecimento de Ca e Mg, associada ao uso de genótipos mais adaptados às condições de solos com elevada saturação por Al, são estratégias de grande potencial para a produção sustentável.

A seguir, serão discutidas de forma concisa as questões pertinentes a distribuição dos solos ácidos, os efeitos do íon em plantas cultivadas, os mecanismos até então mais enfáticos reunidos por diferentes autores na área e o cultivo do arroz de sequeiro no Brasil.

### 1.1. Solos Ácidos no Brasil e no Mundo

O alumínio é o metal em maior abundância (8%) presente na crosta terrestre (Delhaize & Ryan, 1995; Matsumoto, 2000; Rout *et al*, 2001). Vários trabalhos têm relatado-o como um dos principais agentes que contribuem para a baixa produtividade

dos cereais no mundo (Matsumoto, 2000), mesmo que em quantidades micromolares. As maiores reservas de alumínio ocorrem como  $\text{Al}(\text{OH})_3$  ou silicatos de alumínio, formas não fitotóxicas aos seres vivos (Delhaize & Ryan, 1995, Harris *et al*, 1996). Em solos ácidos ( $\text{pH} < 5$ ), presentes em cerca de 40% superfície terrestre (Kochian, 1995), e 70% dos solos potencialmente cultiváveis do mundo (Piñeros *et al*, 2002; Figura 1), o alumínio se solubiliza em sua espécie fitotóxica  $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{+3}$  e é convencionalmente chamado  $\text{Al}^{3+}$  (Kochian, 1995, Harris *et al*, 1996).

Em especial, nas regiões subdesenvolvidas onde predominam solos tropicais, Sanchez & Logan (1992), afirmam que um terço destes apresentam severos problemas com a toxidez por Al. Tal premissa pode estar subestimando a real distribuição percentual, visto que esses países localizam-se em grande parte no hemisfério sul, onde, a própria escassez de recursos gera cultivos inadequados em solos já naturalmente bastante intemperizados, levando a degradação destas áreas. Larsen *et al* (1996;1998) oportunamente afirma que a toxidez por Al é um problema que afeta o uso das terras em escala global, devido principalmente a atividade do homem.



Figura 1. Distribuição global de solos com problemas de acidez. USDA 2002.

Especificamente, no Brasil, a toxidez por Al é também um problema intrínseco dos solos e representa 60% do território brasileiro cultivado ou com potencial para atividade agrícola (Brondani & Paiva, 1996), excetua-se destes, as áreas que podem ainda por uso inadequado, se tornarem ácidas e as áreas com problemas somente de deficiência de Ca e Mg. Acrescentando-se estes outros problemas ao computo total, o montante de solos que podem ser considerados ácidos, pode alcançar valores de 84% (Figura 2).

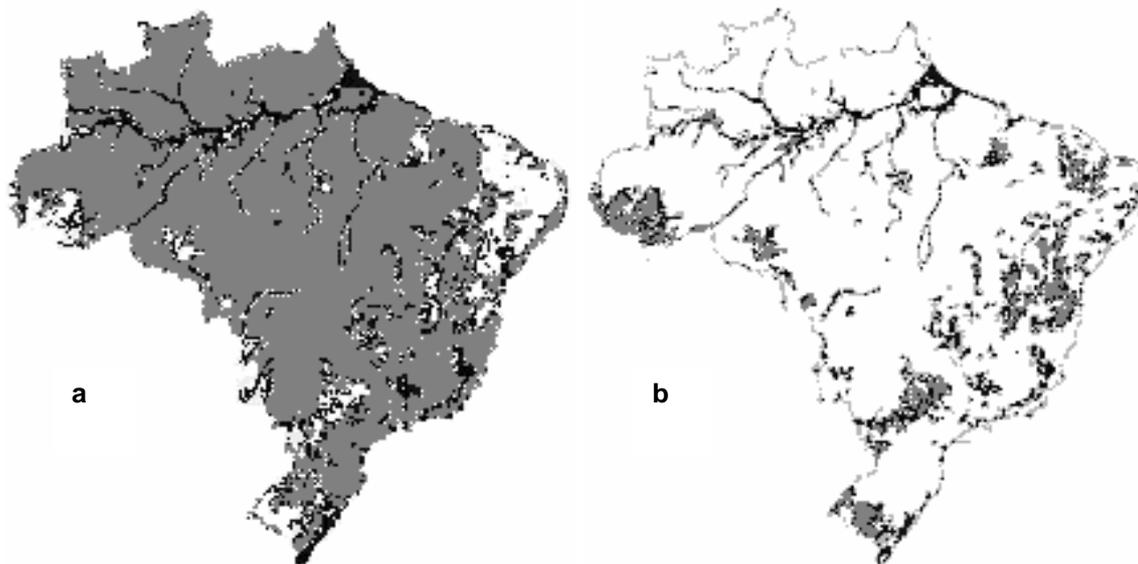


Figura 2. Mapas de Solos do Brasil. a) áreas com limitação de Al e/ou Ca+Mg; e b) áreas sem nenhuma limitação ao cultivo. EMBRAPA, 2002.

Destaca-se, entre as grandes formações ecofisiográficas de solos com níveis de Al trocável maiores que  $0,3 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$  (extraídos com KCl 1M), a região dos cerrados, a área de Latossolos Amarelos presentes nas chamadas terras altas da região Amazônica, os tabuleiros costeiros da orla litorânea do país e ainda os planaltos subtropicais que vão do Sul do Paraná ao Norte do Rio Grande do Sul.

Particularmente, o Cerrado tem sido considerado como uma das últimas grandes fronteiras mundiais disponíveis para a expansão agropecuária, assumindo importância estratégica para o Brasil. Ele ocupa 205 milhões de hectares do território nacional e, apresenta excelentes qualidades no que se refere à topografia, luminosidade, temperatura e propriedades físicas do solo, a despeito da baixa fertilidade natural e dos problemas de acidez. (Embrapa/CNPS, 2002).

Estes fatos fizeram com que, estudos em adaptação de plantas a solos ácidos, com ênfase em tolerância a toxidez por Al tenham sido historicamente uma importante linha da pesquisa agrícola no país, resultando por exemplo, em um aumento de produtividade média de 60%, e, a produção de grãos passando de 6 para mais de 27 milhões de ton grãos  $\text{ano}^{-1}$ , entre os anos de 1970 e 1999. O aumento da produção também foi decorrente da expansão da fronteira agrícola, onde foi observada a duplicação da área cultivada na região dos cerrados. Nesta região ecofisiográfica, nas últimas três décadas, 15 milhões de ha passaram a ser utilizados para produção agrícola, produzindo 30% da safra do país de arroz, milho e soja, 20% do café e 15% do feijão (Embrapa/CNPAC, 2000).

Todo este progresso na área de adaptação de plantas cultivadas a ambientes com acidez (superficial e/ou sub-superficial), foi fruto de pesquisas principalmente nas áreas de fertilidade do solo, nutrição mineral de plantas, manejo de agrossistemas, genética e melhoramento. O advento de novas técnicas, como a biologia molecular, devem num futuro próximo, somar conhecimentos às linhas de pesquisa tradicionais supracitadas, contribuindo para o desenvolvimento de variedades cada vez mais adaptados à estes ambientes.

## 1.2. O Al e seus Efeitos Tóxicos

Os efeitos do Al nas plantas vem sendo estudado a muitos anos, sendo verificado na literatura uma extensiva gama de trabalhos a respeito deste tema, podendo-se citar os de Bollard & Butler (1966); Foy *et al*, (1978); Kochian, (1995); Matsumoto (2000) e Rout *et al* (2001), entre outros.

Em alguns casos, em baixas concentrações, o Al pode favorecer o crescimento dos vegetais ou induzir outros efeitos desejáveis (Foy & Fleming, 1982; Foy *et al*, 1978; Mendonça, 1991 Mendonça *et al*, 1991a e b; Vasconcelos *et al*, 2002). Façanha & Façanha (2002), encontraram valores de 120, 125 e 110 % de crescimento relativo sob baixos níveis de Al sob condições de solução nutritiva completa e alta disponibilidade de P. Também Ferreira *et al* (1986), em arroz, identificou algumas variedades altamente tolerantes, que reduziam não significativamente sua produção na presença de Al e 15% deles, ainda, apresentaram aumento na produção, sob condições de campo.

Em outros casos, a resposta de determinada planta pode ser utilizada como indicativo da presença, como é o caso das hortências, onde sua cor varia de acordo com o nível de Al a que é submetida. Neste caso, a planta desenvolve cor rosa à baixos níveis de Al, e azul à altos níveis (3959 mg de Al kg<sup>-1</sup> de peso seco). Sob níveis intermediários, tonalidades intermediárias surgem. A coloração azul é desenvolvida nas sépalas de hortênsia pela formação de um complexo entre “delphinidin 3-glucoside”, Al e o ácido “3-caffeoylquinic”, onde o Al provavelmente exerce um papel de estabilizante da interação entre os dois compostos orgânicos. Mesmo assim, aproximadamente 80% do Al total nas folhas da hortênsia estão presentes em uma forma solúvel, sugerindo já a existência de um mecanismo de complexação interna (Ma *et al*, 2001).

Esses efeitos são porém em sua maioria, dependentes de uma série de outras variáveis intrínsecas à planta ou relativas ao seu meio de cultivo, e em geral não menos

reproduzíveis que as respostas relativas a sintomas efetivos de toxidez, visto que naquele caso, a resposta é inespecífica.

O primeiro sintoma de toxidez, que acontece inclusive em variedades tidas como tolerantes (porém em menor grau), indiscutivelmente é a inibição da elongação do sistema radicular, a qual ocorre cerca de 1-2 h após a exposição ao Al (Kochian, 1995). Este cátion, quando em contato com as raízes, promove rapidamente a paralisação do crescimento radicular, tornando-as atrofiadas em função da morte ou injúria do meristema radicular. Especificamente, a parte distal da zona de transição no ápice das raízes, onde as células estão entrando em fase de alongamento, é o sítio da ação tóxica primária do Al (Sivaguru & Horst, 1998).

O Al, além de interferir na divisão celular da raiz principal e das raízes laterais, aumenta a rigidez da parede celular, reduz a replicação do DNA, altera o espaço livre de Donnan, altera as proteínas de transporte na membrana (Cronan, 1991; Jentschke *et al*, 1991; Meharg, 1993) e desfavorece a atividade de muitas enzimas (Slaski, 1990; Copeland & DeLima, 1992). Esses autores também informam que o Al, em variedades sensíveis, forma complexos estáveis com ácidos nucléicos, favorecendo a sua precipitação. Sobre as moléculas de ácidos nucléicos, o Al interfere, principalmente por modificar a conformação espacial da dupla hélice, devido a interações com as cargas residuais dos grupamentos fosfato.

Ainda, o Al, fixa fósforo em formas menos disponíveis nas superfícies da raízes, diminuindo a respiração desta, além de interferir na atividade das enzimas de fotofosforilação, reduzindo a absorção, transporte, e a eficiência de uso de água e vários nutrientes essenciais (Ca, Mg, K, P e Fe), entre outros efeitos diretos e indiretos (Fleming *et al*, 1974; Nichol & Oliveira, 1995).

Outro efeito prejudicial do Al está na mudança da homeostase celular do  $\text{Ca}^{2+}$  e da competição por canais de  $\text{Ca}^{2+}$ . A inibição da absorção celular de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo  $\text{Al}^{3+}$  afeta, em maior ou menor intensidade, vários processos celulares, tais como, mitose, citocinese, gravitropismo, crescimento polar, correntes citoplasmáticas e sinalização celular (Huang *et al*, 1996).

Estudos recentes têm indicado que interações do Al com elementos envolvidos na transdução de sinais, responsáveis pela comunicação da célula com o ambiente são, aparentemente, eventos primários da toxidez causada pelo Al. O Al teria como alvos no interior da célula, a fosfatidilinositol-bifosfato e a proteína Gp, moléculas responsáveis pela produção de dois importantes mensageiros secundários, o inositol-1,4,5-trifosfato e

o diacilglicerol, ocorrendo rápidas disfunções metabólicas na planta (Jones & Kochian, 1995; Haug *et al*, 1984; Shi *et al*, 1993).

O Al pode ainda promover alterações na permeabilidade da membrana plasmática devido a alterações na fluidez e na densidade do empacotamento dos fosfolípídeos, aumento na síntese de lignina, prejudicando o processo de alongação celular, inibição da absorção de O<sub>2</sub> nos ápices radiculares devido à interferência no fluxo de elétrons na mitocôndria e a danos ao fotossistema II, reduzindo a taxa fotossintética (Jones & Kochian, 1995).

Diversas alterações de citoesqueleto têm sido relatadas e correlacionadas com os efeitos tóxicos do Al<sup>3+</sup> (Brancaflor *et al*, 1998, Sivaguru *et al*, 1999). Ainda não se sabe se o efeito do Al<sup>3+</sup> sobre o citoesqueleto ocorre através de ligação do íon com a actina e tubulina, ou se é um resultado da interação do Al<sup>3+</sup> com o conjunto parede celular-membrana plasmática-citoesqueleto (Horst *et al*, 1999).

Na parte aérea, os sintomas de toxicidade de alumínio não são facilmente identificáveis. Nas folhas, estes se assemelham a deficiência de fósforo, retardando o crescimento global da planta, o que pode levar a ocorrência de folhas pequenas, escuras e com maturidade precoce, além do encurtamento dos talos. Elevadas concentrações de Al também pode induzir a deficiência e sintomas de deficiência de ferro em arroz, sorgo e trigo (Clark *et al*, 1981; Furlani & Clark, 1981). Em síntese, plantas afetadas por Al também apresentam sintomas de deficiência de nutrientes, tais como P, Ca, Mg, K e Mo, devido à interferência do Al nos processos de absorção, transporte e uso destes nutrientes. Tais deficiências aparentemente ocorrem porque o Al induz a deposição de calose nos canais plasmodesmáticos, inibindo fisicamente o transporte simplástico entre células (Sivaguru *et al*, 2000).

Embora não influencie na germinação de sementes, o alumínio desfavorece o desenvolvimento do coleóptilo e o estabelecimento radicular inicial (Nosko *et al*, 1988). A inibição do crescimento de raiz pode ser visualizada então, 2 a 4 dias depois da iniciação de germinação da semente (Bennet & Breen 1991).

Particularmente, como já afirmado, é na raiz que se verifica o principal sintoma de toxicidade e maior sinal de danos, sendo que a inibição do crescimento longitudinal é utilizada para discriminar espécies e variedades tolerantes das demais (Bennet *et al*, 1991; Delhaize & Ryan, 1995; Kochian, 1995; Ryan *et al*, 1993; Rout *et al*, 2001). O retardamento no desenvolvimento radicular pode ocorrer através da inibição do crescimento da parede celular, através da morte das células do meristema radicular, ou

por ambos os mecanismos. O engrossamento das raízes, tanto principais como laterais, também é um sintoma comum, porém menos discriminatório que a avaliação do comprimento. Além destes sintomas também pode haver falhas na ramificação das raízes, ou alterações nos padrões de ramificação (Zonta *et al*, 2002).

Plantas jovens, em geral, são mais suscetíveis as injúrias causadas pelo Al, quando comparadas com mais desenvolvidas (Thawornwong & van Diest, 1974).

### **1.3. Os Mecanismos de Tolerância**

A tolerância ao Al pode ser inter e intra-específica, sendo controlada por diferentes genes, os quais agem através de rotas bioquímicas distintas. Estes mecanismos podem ser classificados em mecanismos de exclusão e mecanismos de tolerância interna (Taylor, 1995; Kochian, 1995). A principal diferença entre os mesmos é o sítio de detoxificação de Al: simplasto (interno) ou apoplasto (exclusão). Os mecanismos de exclusão desfavorecem que o Al atravesse a membrana plasmática e penetre no simplasto. Os mecanismos de tolerância interna imobilizam, compartimentalizam ou detoxificam o Al que penetrou no simplasto (Zheng *et al*, 1998a).

Entre os mecanismos de exclusão propostos, estão incluídas as ligações do Al à parede das células, modificação do pH da rizosfera, exsudação pelas raízes de compostos que formam quelatos com o Al (Foy, 1988; Taylor, 1988; Kochian, 1995; Rout *et al*, 2001), principalmente.

A baixa capacidade de troca catiônica (CTC) da parede celular da raiz tem sido associada à tolerância ao Al. Segundo este modelo, plantas com elevada CTC radicular adsorvem mais Al, elevando a concentração desse metal próximo às células. No entanto, para algumas espécies de plantas, não há nenhuma relação entre a CTC radicular e a tolerância ao Al. Embora a membrana plasmática seja considerada como um dos alvos do Al, em alguns casos, ela pode atuar como uma barreira à absorção deste elemento para o interior da célula. Foi observado que a densidade de cargas elétricas negativas presentes em membranas das células dos ápices radiculares de trigo eram, em média, 26% superior no genótipo sensível quando comparado ao tolerante (Yermiyahu *et al*, 1997). Desta forma, alterações na composição dos fosfolipídios da membrana plasmática podem contribuir para a tolerância ao Al, por dificultar a interação deste com a membrana plasmática.

Especificamente, com relação a modificação do pH da rizosfera, seria necessário que o pH da solução ao redor da superfície das raízes seja maior do que 5,0, precipitando, assim, o Al e ligando-o aos grupos carboxílicos da parede celular, antes que este atinja o plasmalema (Matsumoto *et al*, 1976), Para que valores de pH mais altos do que 5,0, sejam atingidos no apoplasto da raiz, o vegetal precisa acumular uma maior quantidade de ânions do que de cátions no citoplasma, para que possa haver a excreção de ânions OH<sup>-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou RCOO<sup>-</sup> (Kirby, 1968), ou um maior consumo de H<sup>+</sup> que atuariam no simporte de cátions, determinando mudanças na solubilidade do Al e outros elementos. Logo, o consumo de prótons do meio teria papel preponderante neste sentido. Foy *et al* (1982) foi que primeiro relatou os efeitos devido as variações de pH no solo induzidas por plantas de trigo tolerantes ao Al, desvelando um dos possíveis mecanismos de tolerância ainda estudados até o momento. Certas plantas absorvem nitrogênio preferencialmente na forma de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, em relação à forma de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Fernandes & Rossiello, 1995) e, como consequência dessa absorção diferencial, há um maior ou menor influxo de H<sup>+</sup> (simporte) pela raiz, o que promoveria a elevação do pH na rizosfera.

Em café, Bracinni *et al* (1998) encontraram variação em média de até 0,3 unidades de pH em plantas tolerantes. Esses valores, por sua vez são baixos, de acordo com os apresentados por Keltjens (1997). Esse autor, encontrou para milho e sob condições hidropônicas supridas com N-NO<sub>3</sub>, um acréscimo nos valores de pH da rizosfera de 0,55 a 0,89, ao passo que na presença de N-NH<sub>4</sub> tiveram um decréscimo de 0,84 a 1,48.

De acordo com Marschner (1995), a capacidade tampão do solo e o pH inicial são os principais fatores que determinam a extensão na qual as raízes podem alterar o pH da rizosfera. A capacidade tamponante de pH depende dos teores de argila e de matéria orgânica, os quais podem neutralizar as mudanças de pH induzidas pelas raízes.

Por outro lado, Ramos *et al* (2002) encontrou uma atividade alta das ATP-ases das membranas de variedades de arroz de sequeiro quando submetidas ao Al. Esse fato poderia levar a sugerir que nesta cultura, o próton poderia competir com o Al, minimizando a injúria causada por esse elemento, conforme proposto por Grauer & Horst (1992).

Outra barreira a o Al para atingir as regiões sensíveis do meristema radicular é a mucilagem, que é uma substância formada por polissacarídeos, que reveste a superfície radicular. Em plantas de trigo tolerantes ao Al, a síntese contínua de mucilagem nos

ápices radiculares dificulta a penetração do Al, protegendo as regiões de crescimento da raiz. A mucilagem pode ser responsável por reter até 35% do Al presente no apoplasto (Archambault *et al*, 1996).

A síntese de calose, um poliglicosídeo formado por unidades de 1,3-a-glucano que se acumula na parede celular, também é uma resposta das plantas aos diversos tipos de estresses (Simmons *et al*, 1992). Alguns genótipos de trigo sensíveis ao Al produzem mais calose do que genótipos tolerantes quando expostos a este elemento (Horst *et al*, 1997; Zhang *et al*, 1994; Lugany *et al*, 1995). A enzima 1,3- a-glucanase está incluída na família das proteínas PR (relacionadas a patogêneses), já que muitas de suas isoformas são induzidas durante infecções fúngicas. Análises do padrão de síntese do mRNA da 1,3-a-glucanase, isolado de ápices radiculares de trigo, demonstram que a expressão deste gene é fortemente regulada pela presença de Al (Cruz-Ortega *et al*, 1993). Desta forma, o padrão de síntese de calose pode ser um bom indicativo do grau de injúria que o Al causa nas raízes, podendo, inclusive, ser utilizado como um parâmetro de seleção.

Ainda, dentre os mecanismos de exclusão vários trabalhos demonstram alterações na síntese de proteínas em ápices radiculares para diferentes espécies de plantas, quando expostas ao Al (Cançado & Paiva, 1999). Também, a indução a síntese de proteínas específicas parece também estar relacionada à resposta das plantas ao estresse causado pelo Al. Tais quelantes são liberados no apoplasto e/ou na rizosfera, impedindo que o Al atinja seus sítios de toxidez. Uma importante classe desses quelantes são os ácidos orgânicos de baixo peso molecular provenientes do ciclo dos ácidos tricarbóxicos. O Al, uma vez complexado pela molécula exsudada pela raiz, perde seu efeito fitotóxico.

Na literatura são relatados trabalhos que demonstram a exsudação de ácidos orgânicos, em diferentes culturas, como decorrência da aplicação de doses de Al (Ryan *et al*, 2001). Delhaize *et al*, (1993a; 1993b) em trabalhos realizados com trigo, verificaram que o Al estimulou a exsudação dos ácidos málico e succínico.

Basu *et al* (1994) observaram o acúmulo significativo de proteínas em solução nutritiva contendo Al, onde genótipos tolerantes de trigo haviam sido cultivados. Segundo os autores, tais proteínas poderiam ter uma ação semelhante aos ácidos orgânicos, complexando o Al solúvel. Para milho, foi observada a exsudação dos ácidos cítrico, málico e trans-aconítico (Pellet *et al*, 1995, Jorge e Arruda, 1997).

Nesta linha, destaca-se a atividade da enzima citrato sintase, na qual vários trabalhos de modificação da expressão genética vêm sendo desenvolvidos. Uma das evidências mais convincentes sobre o envolvimento da exsudação de ácidos orgânicos na tolerância ao Al foi apresentado por Fuente *et al*, (1997), em estudos desenvolvidos com plantas de tabaco e mamão transgênicas, os autores verificaram uma elevada produção da enzima citrato sintase, quando as plantas foram submetidas a diferentes concentrações de Al. Em função dessa super produção e exsudação de citrato, as plantas transgênicas apresentaram aumento significativo na tolerância ao Al. Li *et al*, (2000), realizando ensaios com plantas de centeio transgênico, também constataram o aumento da atividade da enzima citrato sintase quando estas foram expostas ao Al.

Dois modelos foram propostos por Ma *et al* (2001; Figura 3) para explicar a indução desse mecanismo. No primeiro modelo (I) o Al ativa um canal iônico na membrana acontecendo então a exsudação do ácido orgânico. Esse estímulo pode acontecer de três maneiras:

- (1) O Al atua diretamente com a proteína do canal;
- (2) O Al atua sobre um receptor específico (R) na superfície da membrana ou sobre a própria membrana desencadeando um efeito cascata via mensageiros secundários que ativa então o canal iônico; ou
- (3) O Al atravessa a membrana, entra no citoplasma e ativa o canal diretamente ou através de mensageiros secundários. Em milho, esse é o modelo provável de ativação do efluxo dos ácidos orgânicos.

No modelo II de resposta, o Al interage com a célula via uma proteína receptora (R) da membrana, que ativa a transcrição dos genes que codificam as proteínas envolvidas no metabolismo de ácidos orgânicos ou de seu transporte através da membrana plasmática (Ma *et al*, 2001).

Esse último mecanismo é, porém especulativo, ao contrário do modelo I de resposta, onde estudos já identificaram alguns componentes.

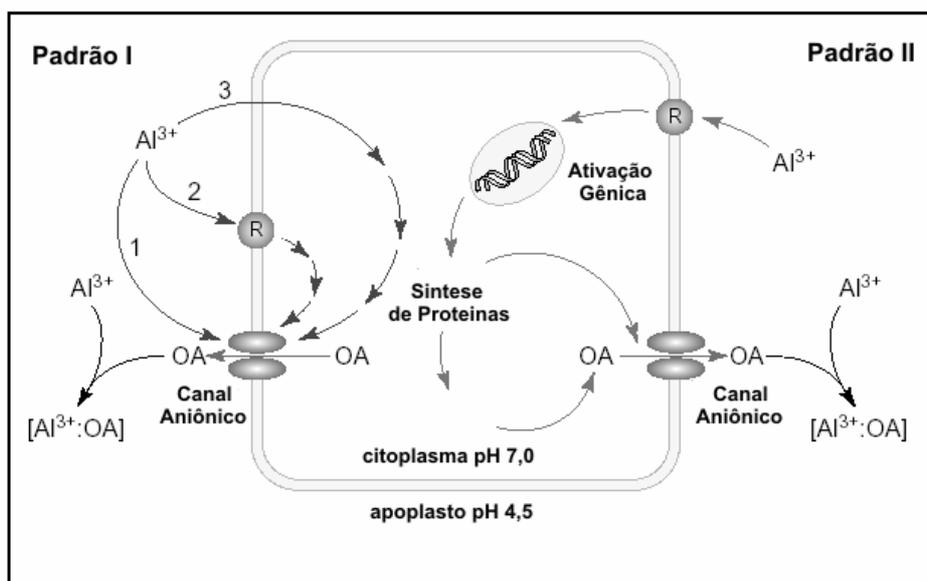


Figura 3. Modelos propostos por Ma *et al* (2001) para ativação da exudação de ácidos orgânicos.

A segunda classe de mecanismos de tolerância ao Al, e a que favorece a neutralização deste no interior da planta, que também pode estar relacionada à complexação de ácidos orgânicos. O Al pode ser complexado por ácidos orgânicos (Foy, 1988; Taylor, 1988; Kochian, 1995) e mantido inativo no citoplasma (Taylor, 1988), nos vacúolos (Helyar, 1980; Taylor, 1988; Rout *et al*, 2001) ou nas interações com calmodulina (Suhayda & Haug, 1986; Rout *et al*, 2001), prevenindo os seus efeitos tóxicos nos processos metabólicos.

Ma *et al* (2001) sugeriu um modelo desse mecanismo, baseado em plantas que acumulam citrato em seus vacúolos, a partir da alteração da atividade das enzimas envolvidas no ciclo do ácido cítrico, direcionando as vias de síntese ou degradação, podendo ou não conduzir a uma acumulação do ácido no citoplasma.

O ácido cítrico e outros, bloqueiam a ação fitotóxica do Al, com a formação de quelatos, especialmente com o ácido cítrico, ao mesmo tempo que mantém uma adequada disponibilidade de P (Klimashevskii & Chernysheva, 1980; Cambraia *et al*, 1983; Lee & Foy, 1986; Miyasaka *et al*, 1991; Miyasawa *et al*, 1992) já que no entanto, no interior da célula, o pH, na maioria das espécies vegetais, se aproxima da neutralidade: 6,8 a 7,9 (Kurkdjian e Guern, 1989), o que sugeriria que o Al precipitaria como hidróxido ou fosfato ou então seria complexado por grupos orgânicos. Além de que, seria difícil visualizar algum movimento do Al dentro da célula que não seja complexado na forma solúvel (Foy, 1988).

Ma *et al* (2001), propuseram um mecanismo de absorção e distribuição de várias formas de Al em plantas acumuladoras, como é o caso do trigo preto (*Fagopyrum esculentum*). O alumínio é absorvido na raiz por um mecanismo qualquer, ainda não bem conhecido, provavelmente como  $Al^{3+}$ . Uma vez que atravesse a membrana plasmática, o Al é complexado por oxalato. Quando o Al é translocado para a parte aérea, acontece uma troca de ligante. No xilema a complexação ocorre com o citrato. Uma vez translocado para as células foliares, há neo formação do complexo com oxalato, que é armazenado então no vacúolo. Um esquema é apresentado na Figura 4.

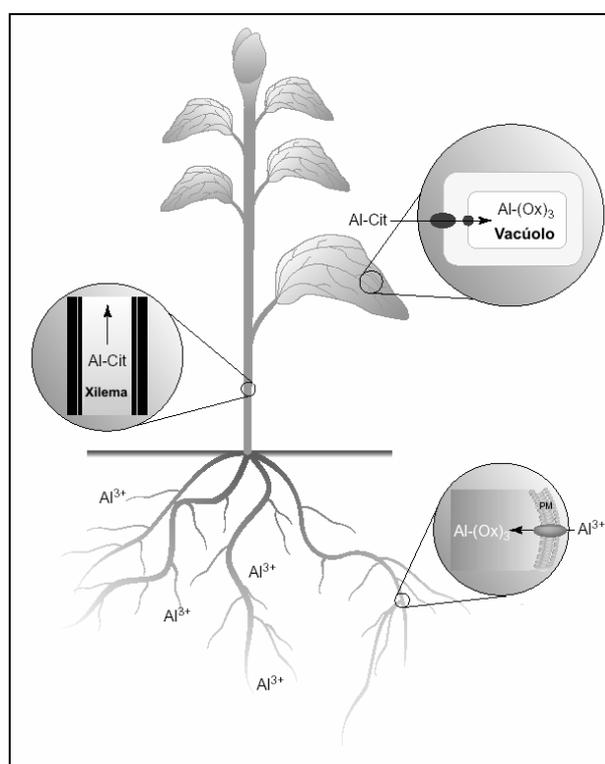


Figura 4. Absorção e distribuição Al em plantas acumuladoras. Abreviaturas: Cit, citrato; Ox, oxalato; Pm, membrana plasmática. Ma *et al* (2001).

A capacidade de complexação dos ácidos, independente de ser interna ou externamente, está relacionada com a posição dos grupos  $OH/COOH$  da principal cadeia carbônica da molécula. Os ácidos mais eficientes para a complexação e desintoxicação do Al são o cítrico, o tartárico, o oxálico e o málico; no grupo de eficiência moderada, destacam-se o malônico e o salicílico e, no grupo de baixa eficiência, o succínico, o láctico e o fórmico (Huang & Violante, 1986; Hue *et al*, 1986; Miyasaka *et al*, 1991; Miyasawa *et al*, 1992; Delhaize *et al*. 1993a e b).

Por fim, um resumo de ambos os mecanismos de tolerância ao Al envolvidos com a síntese e exudação de ácidos orgânicos é apresentado na Figura 5. Esse talvez seja o melhor modelo para explicar os eventos envolvidos, visto que seria difícil imaginar mecanismos funcionando independentes, ou melhor, como poderia haver exudação sem um acúmulo interno. Da mesma forma, a maioria dos pesquisadores da área sempre detectaram Al no interior de praticamente todas as plantas tidas como tolerantes, por mecanismos de exclusão do Al, mesmo que em pequenas quantidades.

Acerca do tempo de resposta e das quantidades exudadas e encontradas no interior das células vegetais, haverá uma discussão prévia no capítulo III deste trabalho, mesmo que independente de qual mecanismo estaria atuando em arroz, de acordo com Foy (1968), essas plantas devem indiscutivelmente manter sua capacidade de crescimento e expansão radicular, que será abordado do capítulo II.

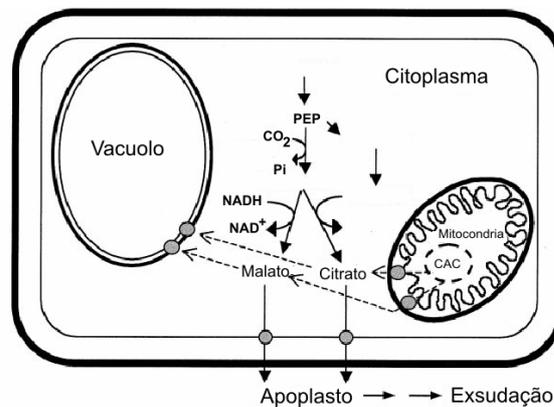


Figura 5. Modelo condensado para biossíntese e exudação de ácido cítrico e málico. Bucio *et al*, 2000.

#### 1.4. Moléculas Orgânicas na Agricultura

Na realidade, os sistemas radiculares acrescentam grandes quantidades de carbono ao solo, em suas mais diversas formas. Como já observado, alguns ácidos orgânicos são secretados, por estarem diretamente envolvidos na tolerância das plantas ao Al. Além destes, uma variedade rica de açúcares, aminoácidos, vitaminas e outras substâncias.

As quantias de carbono acrescentadas à rizosfera durante o crescimento ativo da raiz raramente excedem 1% de peso seco (Nye, 1981) sob condições normais de crescimento. Porém, essas taxas podem ser 2 a 4 vezes mais altas sob condições de estresse, onde, dependendo da espécie de planta e condições ambientais, até 40% do carbono fixado pelas plantas pode ser depositada diretamente na rizosfera (Linche &

Whipps, 1990), o que significaria 5 - 25% do C líquido assimilados pela planta, resultando em uma perda líquida de fotossintatos.

Além da proveniência dos sistemas radiculares, esses mesmos ácidos podem se formar a partir da mineralização da matéria orgânica de origem animal ou vegetal adicionada ao solo, obviamente, além de todos os demais compostos resultantes de sua decomposição e/ou mineralização. Nesse ponto, é importante ressaltar que um grande número de trabalho tem procurado estudar os efeitos desses produtos na neutralização do Al do solo.

### **1.5. Estratégias para Cultivo em Solos Ácidos**

Como já comentado existem de fato hoje, duas linhas concretas para o uso de solos ácidos: o uso da calagem e o de variedades tolerantes. A primeira é a alternativa mais viável para grandes áreas, visto que em se tratando de variedades tolerantes ao Al e/ou eficientes no uso de Ca e Mg, indiscutivelmente sempre serão obtidas produções menores quando estas forem comparadas com variedades comerciais de uso em grande escala.

Uma linha alternativa, talvez já conhecida a muitas décadas, porém mais estudada nos últimos 15 anos, resultado do aumento das áreas cultivadas em sistema de plantio direto, onde a aplicação de calcário em cobertura gera efeitos ainda discutíveis e onde seria inviável o uso de variedades tolerantes visto às baixas produtividades, seria o uso de resíduos orgânicos. Até então, essa linha não tinha despertado interesse visto que os seus resultados apresentam-se sempre em um prazo maior do que as duas alternativas supra citadas.

O uso de calcário pode ser limitante, pois baseado em uma estimativa de apenas 1 ton de calcário  $\text{ha}^{-1} 20\text{cm}^{-1}$ , tem-se uma necessidade de algo em torno de 500 milhões de toneladas  $3 \text{ anos}^{-1}$ . Sabendo-se por outro lado, que nossas reservas giram em torno de 45 bilhões de toneladas (Brasil - Ministério de Minas e Energia, 2001), isso nos propiciaria essa medida corretiva por 240 anos. Felizmente o uso das terras no Brasil, representa uma necessidade de apenas um terço dessa quantidade, o que prolongaria nossas reservas para uns 700 anos. Mas, são produzidos em média 35 milhões de ton  $\text{ano}^{-1}$  pelas empresas mineradoras, para fins de uso agrícola, o que prolongaria então nossas reservas por até 1500 anos (excetuando-se nestes cálculos as quantidades utilizadas pela indústria de cimento). Esses dados também evidenciam que a calagem é

uma prática adotada por pequena parte dos produtores, em geral os mais capitalizados, donos de grandes propriedades.

Dessa forma, concordando com Yamada (2000), é necessário conviver com a acidez do solo, sabendo-se que na busca de uma agricultura sustentável é importante aumentar o teor de matéria orgânica do solo (através de maior produção de matéria seca e menor mineralização, via abaixamento do pH, que diminui a atividade das bactérias nitrificadoras) e aprofundar o sistema radicular (através eventualmente da gessagem), e da utilização, (quando possível, principalmente em pequenas propriedades) de variedades tolerantes.

### **1.6. O Arroz de Sequeiro no Brasil**

O arroz de sequeiro ocupa no Brasil, 2,4 milhões de ha, ou 65% do da área total cultivada com a cultura (Barbosa Filho & Yamada, 2002), e devidos a suas baixas produtividades (em média de 1,5 até 1,8 ton ha<sup>-1</sup>) comparado com a produção em sistema irrigado (de 3 a 5 ton ha<sup>-1</sup>), é responsável por 45% da produção nacional, que está em torno de 12 milhões de ton ano<sup>-1</sup> (IBGE, 2002).

Estes dados, se comparados com os das décadas de 80 e 90, nos mostram uma gradual redução em área plantada sob sequeiro. Na década de 80, esta representava 76% e na de 90, 70% do total. Por outro lado, nestas mesmas épocas, as produções correspondiam a 60% e 50% respectivamente da área cultivada, podendo indicar um decréscimo nas produtividades. Uma observação mais realista nos mostra porém, o que houve foi um aumento da área cultivada com arroz irrigado de até 15% , e uma redução da área de cultivo de arroz de sequeiro nas duas últimas décadas. Assim, mesmo com uma menor representatividade em termos de área e produção nacional, a produtividade aumentou, passando, de em média 1,2 ton ha<sup>-1</sup> na década de 80 para a mínima atual de 1,5 ton ha<sup>-1</sup>.

Em parte, essa melhoria nas produtividades foi devida aos avanços da agricultura para áreas marginais, onde se tem buscado estratégias para adaptar essas plantas a esses ambientes, com o lançamentos das variedades Araguaia, Rio Paranaíba (Pereira et al., 1990), Guarani, Caiapó (Pereira & Campelo, 1994) e Carajás (Pereira & Campelo, 1996), que exerceram efetiva contribuição para o expressivo volume produzido desse cereal na região.

Contudo, com o lançamento comercial destas variedades, mesmo, portadoras de alto potencial genético de rendimento, a busca de genótipos mais tolerantes ao estresse ambiental e eficientes no uso de nutrientes, se faz necessário, pois uma fração de tecnologia e insumos teve que ser introduzida nas áreas sob cultivo dessas variedades. Nessa premissa, o estudo das variedades locais, é de vital importância, sendo verdadeiros reservatórios genéticos para mecanismos de tolerância a estresses. Em particular, parte destes reservatórios pode provir do Maranhão, que apresenta uma grande quantidade de variedades locais, até por ser a segunda maior área plantada com a cultura no cenário nacional (IBGE, 2002).

E, não menos importante, é o papel que a cultura representa aos pequenos produtores, peças fundamentais na estabilidade da produção de alimentos do país, em geral, confinados às condições marginais de assistência e recursos econômicos. Aumentos de produtividade, sem oneração dos custos de produção, com o uso desse material genético e biotecnologia poderia garantir sua permanência no campo sob condições dignas de vida.

**CAPÍTULO I – METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO  
DA ÁREA E DO COMPRIMENTO RADICULAR  
APLICADAS EM ARROZ DE SEQUEIRO SUBMETIDO A  
ESTRESSE POR ALUMÍNIO**

## RESUMO

Com o objetivo de estabelecer uma rotina para obtenção e quantificação de parâmetros radiculares os métodos fotoelétricos e a análise digital de imagens foram comparados. Ainda, neste último método, foram avaliadas duas possibilidades de obtenção de imagens das raízes: através do uso de *scanner* e via câmara fotográfica digital. Para tal, foram conduzidos ensaios com 4 variedades de arroz de sequeiro (Comum Branco, Caiapó, Ligeiro Vermelho e Rabo de Burro), com tolerância diferencial ao Al, em solução nutritiva modificada à  $\frac{1}{4}$  da força iônica original. Os dados obtidos, com plântulas de arroz em presença ou não de Al, nos permitem concluir que o medidor fotoelétrico subestima os valores de área e comprimento radicular, além de não discriminar a tolerância diferencial ao Al, quando comparado ao método da análise digital das imagens. A aquisição das imagens de raízes devem ser obtidas preferencialmente com *scanner*, já que a câmara fotográfica digital subestima a área radicular, e não diferencia totalmente a tolerância varietal ao Al. A melhor densidade para varredura do scanner no momento da digitalização é de 300 dpi e o protocolo elaborado no decorrer destas fases experimentais deve ser seguido, evitando assim aumentos nos erros experimentais.

**Palavras chave:** parâmetros radiculares; análise digital de imagens; protocolo para determinação.

## ABSTRACT

With the objective of establishing a routine to obtain and quantify root parameters, the photoelectric method and the digital image analyzing technique were compared. Also, in the last, two possibilities for obtaining the root images were appraised – the usage of a scanner and with a digital photograph camera. For such, experiments with 4 cultivate of upland rice (Comum Branco, Caiapó, Ligeiro Vermelho and Rabo de Burro) were conducted. It was also tested the Al differential tolerance of rice seedlings, cultivated in nutrient solution modified to  $\frac{1}{4}$  of the original ionic force, and with and without Al in the medium. The data obtained allows the conclusion that the photoelectric meter underestimates the root length and root area values. Besides, it does not discriminate the differential tolerance to Al, when compared with the method of the digital image analyzing. The acquisition of the root images should be obtained preferentially with a scanner. The digital photographic camera underestimates the root area, and it does not completely differentiate the varietal Al tolerance in the upland rice seedling. The best density for scanning the image is of 300 dpi, and the protocol elaborated in these experiments should be followed to avoid the increasing in the experimental errors.

**Key words:** root parameters; digital analysis of images; protocol for determination.

## 1. INTRODUÇÃO

A aquisição de informações sobre os padrões de crescimento e das características morfológicas do sistema radicular tem se desenvolvido nos últimos anos em consonância com a maior disponibilidade de novas técnicas analíticas. Como ferramenta para a avaliação da eficiência da absorção e utilização de nutrientes, a quantificação do sistema radicular dos diversos genótipos de plantas exige métodos que combinem rapidez e precisão, diante da necessidade de examinar um número relativamente extenso de amostras.

Uma série de métodos já foi proposta, dentre os mais conhecidos, podem ser destacados o da intercessão e o dos medidores fotoelétricos. Nos últimos anos com o advento da tecnologia digital, os métodos de análise de imagens tem sido apontados como uma alternativa viável para mensuração de parâmetros radiculares, devido a sua alta eficácia e precisão, quando comparados aos métodos mais antigos, que não são suficientes para fornecer todos os parâmetros necessários ao entendimento dos sistemas radiculares, sendo em geral, necessário artifícios matemáticos para este fim.

Neste capítulo foi feita a comparação entre o método da medição fotoelétrica direta e o da análise digital de imagens, através do programa SIARCS 3.0®, da EMBRAPA, para determinação da área e do comprimento radicular. Estas variáveis serão utilizadas para avaliar a precisão dos métodos de aquisição de imagem de raízes, em especial quando se pretende avaliar um grande número de amostras. O uso da análise digital de imagens também possibilita, por meio de um programa de computador para edição de imagens, segmentar os parâmetros estudados para as raízes principais e laterais.

Com o objetivo de estabelecer uma rotina para obtenção e quantificação de parâmetros radiculares foram comparados os métodos fotoelétricos e a análise digital de imagens, sendo que neste último método, foram avaliadas duas possibilidades de obtenção de imagens das raízes: através do uso de scanner e via câmara fotográfica digital, através do qual pretende-se estabelecer uma rotina para obtenção e quantificação de parâmetros radiculares.

Para alcançar o objetivo, os seguintes propósitos específicos foram estabelecidos:

1. Comparar o método fotoelétrico para determinação da área e do comprimento radicular com o método de análise digital de imagens;
2. Comparar as diferentes formas de aquisição das imagens (*scanner* e câmara fotográfica digital);
3. Determinar qual a melhor densidade de varredura do scanner a ser utilizada para a aquisição das imagens;
4. Estabelecer uma rotina eficiente e precisa para mensuração da área e do comprimento radicular.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

De maneira geral, os parâmetros mais utilizados na avaliação da eficiência na absorção de nutrientes das plantas são a massa fresca ou seca, a área superficial, o comprimento e o raio médio do sistema radicular (Nye & Tinker, 1977; Marchener, 1995). Embora cada parâmetro citado apresente limitações e vantagens quanto ao seu uso, a área superficial e o comprimento de raízes são preferidos e mais utilizados para a expressão das taxas de absorção de água e de nutrientes (Nye & Tinker, 1977), além de refletir os efeitos bióticos e abióticos do meio.

O método da interseção, tradicionalmente empregado para determinar parâmetros radiculares, não permite a determinação direta da área e do diâmetro radicular, que determinam em parte o potencial de uma planta para absorção de água e nutrientes. Esses parâmetros radiculares são os indicadores mais sensíveis de respostas de plantas às condições ambientais e edáficas (Kaspar *et al*, 1991).

A maioria das medidas aplicadas na avaliação do comprimento do sistema radicular era baseada no método de linha-interseção de Newman (1966) *apud* Kasper & Ewing (1997) onde era requerida intensiva utilização de mão-de-obra. Posteriormente, método de Newman foi modificado por Tennant (1975), sendo utilizado durante muitos anos em estudos que envolviam o sistema radicular de plantas. Métodos como medições diretas do comprimento radicular, com régua (Ahlrichs *et al*, 1990) ou com curvímeter diretos ou em fotocópias das raízes (Lynch & Van Beem, 1993), podem ser utilizados, tendo como principais desvantagens a demora na obtenção dos resultados e o uso restrito em plântulas, além da precisão dúbia e aplicabilidade principalmente às raízes principais.

Para minimizar as limitações destes métodos, novas técnicas foram desenvolvidas, tais como a determinação da área radicular com a utilização de medidores eletrônicos de área (Kemp, 1976). O autor comparou os métodos da interseção e fotoelétrico na determinação da área, do comprimento e do raio médio radicular, enfatizando a precisão e o menor tempo de operação neste último. Recentemente, também Rossiello *et al* (1995) compararam o método fotoelétrico com o da interseção, utilizando um medidor LI-COR 3000. Os autores obtiveram uma

alta correlação, e maior velocidade no processamento radicular de milho, que apresentam diâmetro relativamente grande quando comparado com arroz.

A quantificação ou avaliação de sistemas radiculares de pequena extensão (<100 m comprimento total, <6 g massa fresca total) pode ser simplificada com o emprego da análise de imagem (Costa *et al*, 2000). Também, em sistemas radiculares mais desenvolvidos, com o mesmo método é possível a partir de uma subamostra, chegar-se a valores precisos dos parâmetros requeridos (Fernandes *et al*, 2001).

Na última década, sistemas de análises de imagens foram adaptados, com sucesso, para determinação do comprimento radicular, utilizando, principalmente câmaras de vídeo para digitalizar as imagens (Lebowitz, 1988; Harris & Campbell, 1989; Zoon & Van Tienderen 1990; Pan & Bolton, 1991; Farrell *et al*, 1993; Murphy & Smucker, 1995).

A resolução e tamanho da área capturada pelas câmaras de vídeo, são determinados pelo tamanho da ordem de captura de imagem, pela lente e pela distância da máquina fotográfica ao objeto. Os sistemas de captura de imagem mais antigos possuíam normalmente definição da ordem 512 x 512, linhas e colunas respectivamente, o que resultava em uma definição máxima de captura de objetos da ordem de 0,3 a 0,7 mm (Kasper & Ewing, 1997). Dowdy *et al* (1995), utilizando uma câmara de fotográfica de melhor definição (2800 x 1728), observou que seria possível capturar objetos de até 0,16 mm e que até 6 metros de raízes poderiam ser medidos em uma área de 0,074 m<sup>2</sup> (0,317 x 0,235 m).

Pan & Bolton (1991) utilizando um scanner com uma resolução de 23,6 pixels mm<sup>-1</sup>, foram capazes de medir um fio de cabelo com o diâmetro de 0,13 mm, disposto diretamente sobre a superfície do equipamento, que tinha uma área de 0,064 m<sup>2</sup> (0,216 por 0,297 m), ou seja, apenas 14 % menor que a área utilizada por Dowdy *et al* (1995). No mesmo trabalho os autores demonstraram que o *scanner* de mesa também poderia ser usado para obter imagens digitais de raízes, principalmente, sabendo-se que quando comparados com a maioria das câmaras de vídeo, os *scanners* de mesa apresentam a vantagem de possuírem maior resolução.

Imagens digitalizadas de raízes, permitem ainda a aplicação da teoria fractal, onde se pode com apenas um valor – o da própria dimensão fractal – sintetizar uma grande quantidade de parâmetros morfológicos, tais como comprimento, número de ápices e grau de ramificação (Zonta *et al*, 2000a).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas raízes de plântulas de 4 variedades de arroz (*Oriza sativa*) de sequeiro (Comum Branco, Caiapó, Rabo de Burro e Ligeiro Vermelho) submetidas a duas doses de alumínio (Al; 0 e 160  $\mu\text{mol}$ ). Essas variedades, contrastantes quanto ao hábito de crescimento, tolerância ao Al, produtividade e origem (Tabela 1), foram cedidas pelo Banco Ativo de Germoplasma da EMBRAPA – Arroz e Feijão (Acordo de Transferência de Material-II, N° 2, de 1999).

Tabela 1. Algumas características das variedades de arroz utilizadas nos experimentos.

Cultivar	Características	Fonte*
Comum Branco	Variedade local, coletada no Maranhão, com altos teores de proteína no grão e baixa produtividade, <b>altamente tolerante</b> ao Al	1,2,3,5
Caiapó	Cultivar melhorada, medianamente <b>tolerante</b> ao Al	4,6,5
Ligeiro Vermelho	Raça local, coletada no Maranhão, <b>medianamente sensível</b> ao Al	1,2,4
Rabo de Burro	Raça local, coletada no Maranhão, <b>sensível</b> ao Al	1,2,4

\*1. Mendonça, 1991; 2. Mendonça *et al*, 1991a; 3. Zonta *et al*, 2000b; 4. Mezavilla *et al*, 1998; 5. Vasconcelos *et al*, 1996; 6. Ramos, 1998.

#### 3.1. Condições de Cultivo das Plantas

As sementes foram germinadas em areia lavada e transplantadas 5 dias após a emergência para vasos de PVC (75 mm de diâmetro) contendo 1 L de solução nutritiva proposta por Furlani & Furlani (1988) modificada e a 1/4 da força iônica (Tabela 2). Para realização do experimento foi feita uma modificação da solução original, aumentando-se o conteúdo de K, em função das exigências da cultura, além da fonte e da quantidade de Al. O emprego dos quatro variedades e das doses de Al, teve como objetivo abranger uma grande variação nos parâmetros de sistema radicular. Os reagentes utilizados foram de alta pureza, das marcas Sigma®, Merk® ou Tedia®.

A água utilizada para preparo das soluções estoque, solução nutritiva, escorva dos recipientes e frascos sempre tinha condutividade menor que 0,05  $\text{m}\Omega$ , conseguida por um sistema de ultra purificação Puritec®, com pré-destilação e pré-deionização.

Tabela 2. Solução nutritiva de Furlani & Furlani (1988) modificada e doses de Alumínio.

Solução nutritiva				Relação final	
Solução	Componente	g/litro estoque	ml / litro solução	Elemento	mg/litro
1	Nitrato de Cálcio (4 H <sub>2</sub> O)	270,0	1,2	Ca	57,3
	Nitrato de Amônio	33,8		K	60,0
2	Cloreto de Potássio	52,8	0,9	Mg	8,1
	Sulfato de Potássio	44,0		N-NO <sub>3</sub>	59,1
	Nitrato de Potássio	24,6		N-NH <sub>4</sub>	7,4
3	Nitrato de Magnésio (6 H <sub>2</sub> O)	142,6	0,6	P	0,4
4	Fosfato de Potássio	17,6	0,1	S	6,9
5	Sulfato Ferroso (7 H <sub>2</sub> O)	24,1	0,3	Cl	7,6
	Na EDTA	25,1		Fe	1,3
6	Cloreto de Manganês (4 H <sub>2</sub> O)	2,34	0,3	Mn	0,16
	Ácido Bórico	2,04		B	0,09
	Sulfato de Zinco (7 H <sub>2</sub> O)	0,88		Zn	0,05
	Sulfato de Cobre (5 H <sub>2</sub> O)	0,2		Cu	0,02
	Molibdato de Sódio (2 H <sub>2</sub> O)	0,26		Mo	0,03
7	Cloreto de Alumínio (6 H <sub>2</sub> O)	9,64	1,0	Al	160
			4,0	( $\mu$ mol/litro)	320
			8,0		
			16,0		640

O ensaio foi conduzido em câmara de crescimento, mantendo-se um fotoperíodo de 14 horas de luz, com uma intensidade de  $264 \pm 8 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-2}$  (Figura 6), ideais para crescimento do arroz (Fageria, 1989).

O fotoperíodo foi controlado por temporizador cíclico de 24 horas e a intensidade luminosa necessária foi obtida pela combinação de lâmpadas fluorescentes tipo “luz do dia” e lâmpadas “grolux” da marca Sylvânia. A temperatura média no interior da câmara foi de  $25,1 \pm 4,8^\circ\text{C}$  e a umidade relativa do ar de  $70,2 \pm 22,6\%$ . Os valores máximos e mínimos de temperatura e umidade relativa do ar são apresentados nas Figura 7 e Figura 8, respectivamente.

A manutenção da temperatura e da umidade relativa do ar na faixa requerida para cultura, foi feita com auxílio de um refrigerador de ar e um umidificador de ambientes que funcionavam em conjunto, controlados por um sistema eletrônico de sensores desenvolvido pelo Dr. Pedro Machado.

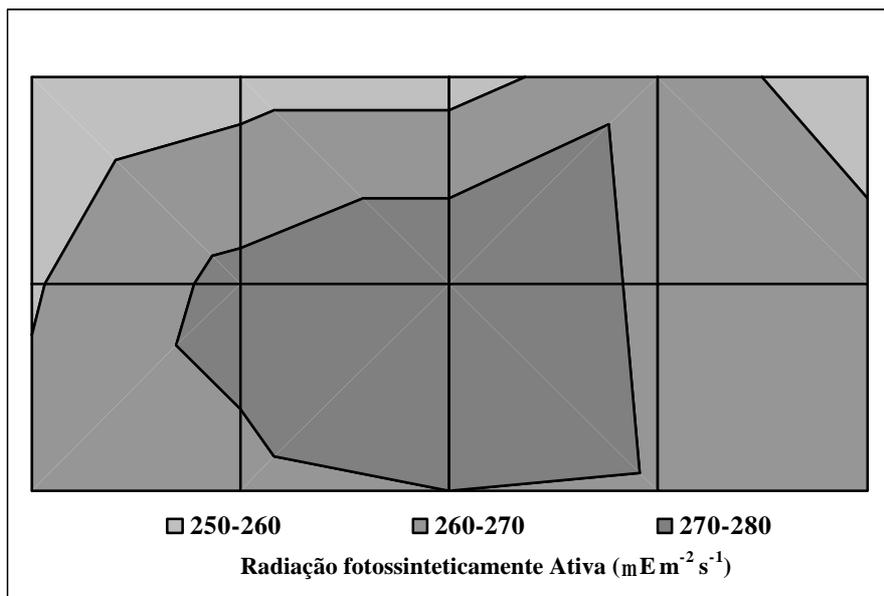


Figura 6. Distribuição da radiação fotossinteticamente ativa sobre a bancada de cultivo das plantas.

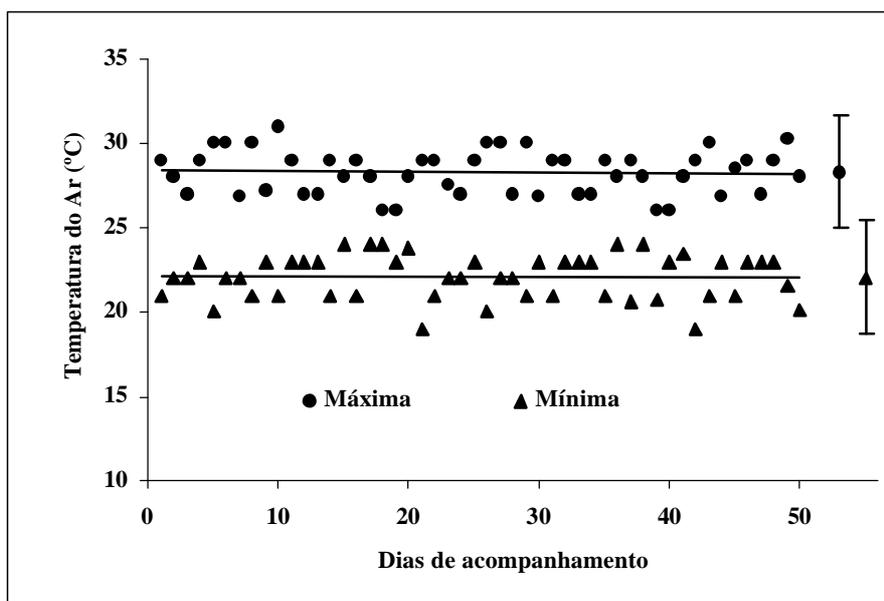


Figura 7. Temperatura máxima e mínima do ar (°C). As barras à direita são os desvios padrões das temperaturas.

Foram realizados dois experimentos com as variedades, utilizando três repetições. O primeiro experimento, teve duração de 120 horas (5 dias) e o segundo duração de 240 horas (10 dias). No experimento de 5 dias não foi realizada a troca da solução nutritiva, e no de 10 dias, foi feita apenas uma troca aos 5 dias. O pH em ambos

ensaios foi monitorado diariamente, e quando necessário ajustado para  $4,2 \pm 0,1$  com NaOH ou HCl (0,1 N).

Os tratamentos foram dispostos ao acaso dentro da câmara de crescimento e no momento de monitoramento e/ou ajuste do pH redistribuídos ao acaso.

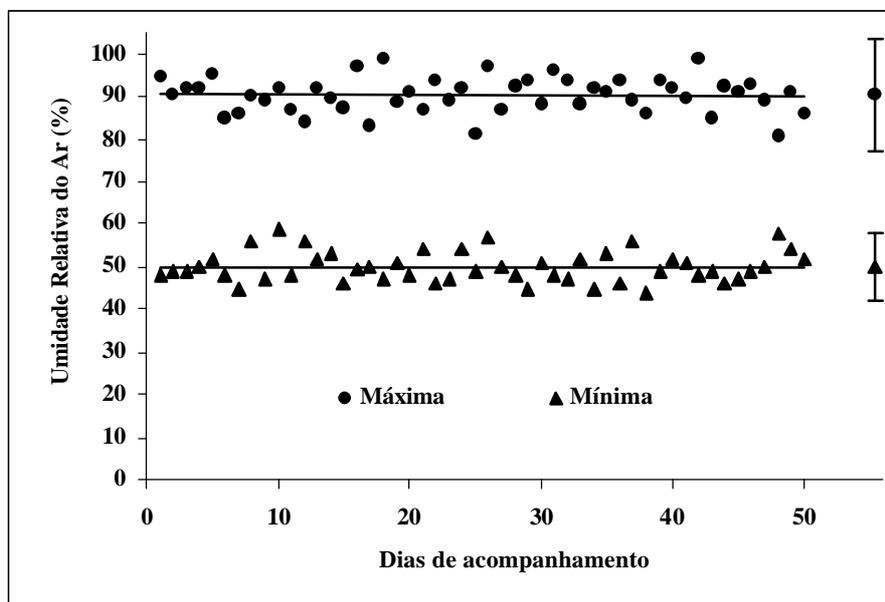


Figura 8. Umidade relativa máxima e mínima do ar (%). As barras à direita são os desvios padrões da umidade.

### 3.2. Determinação da Área e do Comprimento Radicular pelo Método Foloelétrico e por Análise de Imagens

Para a avaliação dos parâmetros radiculares foi utilizado um medidor eletrônico fotoelétrico Licor, modelo LI 3000, com definição de  $10 \text{ mm}^2$ , pré-ajustado a partir de áreas variáveis conhecidas de 0,5, 1, 2 e  $5 \text{ cm}^2$ , resultando em um erro provável de 2,4%, pouco superior à precisão fornecida pelo fabricante (2%; Zonta, 1996), e um scanner Genius Color Page-CS com 300 pontos por polegada (dpi; dots per inch) de resolução ótica, acoplado a um microcomputador Pentium MMX 266 MHz.

Após terem sido expostas às soluções contendo as diferentes concentrações de Al, por 5 e 10 dias de exposição, as raízes foram seccionadas na altura do colo das quatro variedades nos dois experimentos (5 e 10 dias de exposição ao Al), e após isto elas foram dispostas em folha de acetato tamanho A4 dobrado ao meio e contendo uma pequena quantidade de solução de NaCl 0,9%, sendo dispersas com auxílio de uma pinça. O uso de NaCl, foi feito para diminuir a tensão superficial da água junto às raízes (JORGE, comunicação pessoal). O excesso de solução era então retirado com auxílio

de uma bomba de vácuo. Após esta etapa, as raízes foram digitalizadas com uma resolução de 600 dpi (resolução interpolada) e quantização de 256 tons de cinza (gray scale) com 8-bit. Os arquivos de imagem gerados foram salvos com formato BMP (bitmap, Microsoft-Windows), por requerimento do programa SIARCS<sup>®</sup> 3.0 (Embrapa-CNPDIA). As mesmas folhas de acetato com as raízes dispersas, após reidratadas, eram passadas diretamente no medidor de área, que tem como princípio a quantidade de luz interceptada entre fonte emissora e fotodiodo sensível. Dessa forma, o valor da leitura é imediatamente proporcional ao tamanho do objeto.

Tradicionalmente, o processo centrava-se na distribuição das raízes sobre o scanner diretamente, porém isso se tornava trabalhoso, dessa forma, resolveu-se refazer a metodologia, o que possibilitou também o uso do dispersante, que se aplicado diretamente sobre o equipamento poderia danificá-lo.

De acordo com Brasil (2001), o processamento das imagens divide-se em duas etapas. A primeira etapa de pré-processamento das imagens, onde são usados programas de edição de imagens para correção de fundo e brilho, através da ferramenta de ajuste de brilho-contraste-intensidade. Nesta etapa também é usada uma ferramenta de borracha para eliminar da imagem problemas de bordas e sombreamentos. Após a primeira etapa, as imagens são processadas pelo programa SIARCS<sup>®</sup> 3.0 (Embrapa-CNPDIA), sendo segmentadas com auxílio de um filtro de *thresholding*, com base na distribuição de tons de cinza de cada pixel, sendo completada com a binarização da imagem. Para a quantificação da área radicular, o programa utiliza um algoritmo de integração, que quantifica a área ocupada com as raízes através da técnica conhecida como cálculo de momentos de ordem zero (Cruvinel *et al*, 1996).

Em seqüência, é utilizado um algoritmo de “esqueletonização” e/ou “afinamento”, que remove progressivamente os pixels das bordas das raízes na imagem binária, até que resulte um eixo médio com largura de 1 pixel e com mesmo comprimento e forma da imagem inicial.

Os pixels destes eixos “esqueletonizados” são contados determinando-se o comprimento total em milímetros, centímetros ou metros de raízes. Todos estes procedimentos foram efetuados através de comandos manuais interativos dentro dos softwares, sendo necessário repetir para cada imagem todas as operações protocoladas.

No caso do medidor fotoelétrico, o comprimento radicular total (CRT) e o raio médio radicular (RMR) foram determinados de acordo com a metodologia proposta por Rossiello *et al* (1995).

Os dados foram tratados estatisticamente como um fatorial  $A \times B \times C$ , sendo: A - forma de aquisição dos parâmetros (ME ou MD); B – variedades de arroz de sequeiro e C – doses de Al.



Figura 9. Medidor fotoelétrico licor, modelo LI 300 (a) e sistema computacional para aquisição de imagem via *scanner* (b).

### 3.3. Aquisição das Imagens dos Sistemas Radiculares via Câmara Fotográfica Digital e via Scanner

Utilizou-se o mesmo sistema de captura da imagem no *scanner*, descrita no item 3.2, e uma câmara fotográfica digital, marca Kodak, modelo DC 40, com uma ordem de grandeza de captura de imagem de 360 X 640 pixel (Figura 10).



Figura 10. Câmera fotográfica digital Kodak DC 40 utilizada para captura de imagens.

A aquisição das imagens das raízes via *scanner*, foi feita da mesma maneira que descrito anteriormente (item 3.2). Após isso, o sistema radicular das plântulas foi fotografado com lente de aumento de 4X acoplada a câmara, a uma distância fixa de 20 cm e iluminação uniforme. Após a obtenção da imagem, estas eram transferidas para computador e armazenadas também no formato BMP, porém, neste caso utilizando o

padrão de cores do equipamento (24 bits – RGB 256 tons, com área de 756 x 504 pixel), sendo então a densidade real de pontos proporcional à área focalizada (por isso a distância teve que ser fixa). Posteriormente foi feita a conversão para tons de cinza em um programa de edição de imagens. As etapas de processamento diferiram apenas para as imagens adquiridas via câmara DC40, onde se fazia necessária a conversão da imagem para tons de cinza antes do pré-processamento.

#### **3.4. Efeito da Densidade de Varredura do Scanner na Aquisição de Imagens e Determinação de Área e Comprimento Radicular**

A densidade ideal de varredura do scanner foi determinada utilizando-se raízes de plântulas de arroz, variedade Comum Branco, crescidas em solução nutritiva completa, sem Al, durante 5 dias nas condições descritas no item 3.1. sendo utilizadas 3 repetições.

Foram feitas digitalizações da mesma imagem em densidades variando de 50 a 600 dpi em intervalos de 50 dpi. A imagem de uma mesma raiz foi digitalizada 4 vezes por definição adotada, girando-se 90° no sentido horário a cada varredura. As imagens eram armazenadas no formato BMP e as etapas de pré-processamento e processamento foram idênticas.

#### **3.5. Determinação de um Protocolo para Aquisição de Parâmetros Radiculares de Plântulas Jovens**

No decorrer dos experimentos que foram conduzidos para atender as propostas, foi estruturado um protocolo para aquisição de parâmetros radiculares de plântulas. Para tal, foram utilizadas informações provenientes de estudos desenvolvidos no Depto de Solos (França, 1996; Zonta; 1996, Zonta *et al*, 2001, entre outros), com cultivo de plantas em solução nutritiva. Todos os procedimentos, desde os prévios ao cultivo, até a obtenção do dado bruto, eram anotados em planilhas, para serem cruzados ao final dessa etapa.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Determinação de Área, Comprimento e Raio Radicular pelo Método Fotoelétrico e por Análise de Imagem

Quando comparados o conjunto de dados (4 variedades e 2 doses de Al), tendo como fator principal da análise de variância o método para obtenção do parâmetro, os resultados, altamente significativos da análise de variância ( $p > 0,01\%$ ) indicaram que o método fotoelétrico subestimou a área radicular total (ART), e conseqüentemente o comprimento radicular total (CRT) e raio médio radicular (RMR) em relação aos dados obtidos pela análise de imagem (Tabela 3). A subestimação do CRT e RMR deve-se a dependência direta destes parâmetros à área radicular detectada pela fotocélula. Já no método digital, o comprimento é determinado pela esqueletonização, logo, sua dependência é devida somente ao volume, o que contribui na redução do erro.

Tabela 3. Área radicular total (ART), comprimento radicular total (CRT) e raio médio radicular (RMR), determinados pelo método fotoelétrico e pelo método digital.

Parâmetro	Fotoelétrico		Digital	
ART (cm <sup>2</sup> )	15,36	b	27,44	a
CRT (cm)	67,09	b	224,71	a
RMR (mm)	0,473	a	0,259	b

\*Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de tukey à 5%.

O emprego do método digital resultou em aumento de aproximadamente 72% ART e 190% de CRT, comparado com o método fotoelétrico (Figura 11). Provavelmente, tal diferença esteja relacionada à translucidez e ao pequeno diâmetro das raízes de menor diâmetro. Para avaliar a possível influência do diâmetro das raízes, os resultados gerados foram divididos em dois grupos distintos: resultados de ART de plântulas submetidas aos tratamentos com Al e das plantas testemunhas, visto que poderia haver nas plantas tratadas com Al um aumento de diâmetro e assim uma menor diferença em ART entre os métodos. A Figura 12 mostra que as diferenças em ART das plantas submetidas ao Al apresentaram valores mais próximos entre os métodos, onde a ART foi subestimada em apenas 30% pelo método fotoelétrico, enquanto que para as plantas não submetidas ao Al, essa subestimativa chegou a 88%. Os menores

resultados de ART obtidos pelo método fotoelétrico provavelmente devem-se a inabilidade do aparelho em registrar parte das pequenas raízes laterais emergentes, ou seja, que tenham uma área transversal menor que  $10 \text{ mm}^2$ , que seria a precisão do aparelho utilizado.

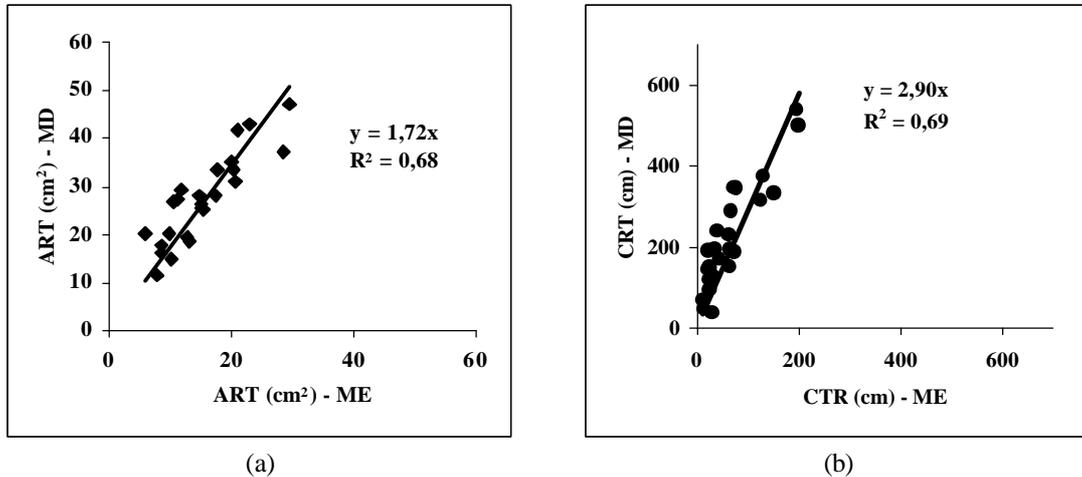


Figura 11. Correlação linear simples para área radicular total (ART; a) e comprimento radicular total (CRT; b) pelo método do medidor fotoelétrico (ME) e pelo método de análise digital de imagem (MD). O  $R^2$  e os coeficientes lineares são significativos à 1%.

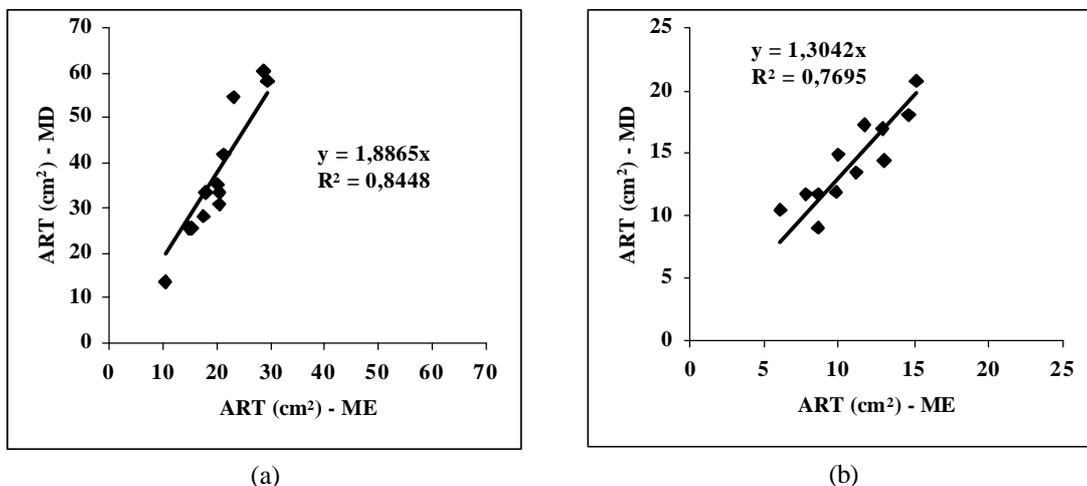


Figura 12. Correlação linear simples para área radicular total (ART) determinada pelo método do medidor fotoelétrico (ME) e pelo método de análise digital de imagem (MD) de plântulas de arroz não submetidas ao AI (a) ou submetidas ao AI (b). O  $R^2$  e os coeficientes lineares são significativos à 1%, exceto para (b), onde  $R^2$  é significativo a 5%.

O estudo da interação método de aquisição, variedades e doses de AI, permitiu avaliar a possibilidade de que, mesmo subestimando os parâmetros radiculares estudados, ambos pudessem discriminar a tolerância ao AI conhecida e previamente descrita para cada variedade. Na Tabela 4 são apresentados os valores de significâncias

do teste F para os parâmetros estudados e os respectivos coeficientes de variação. Praticamente para todos os parâmetros, o método fotoelétrico não conseguiu discriminar a tolerância diferencial, exceto para o raio médio radicular (RMR). O método fotoelétrico não foi capaz de avaliar as modificações de ART e CRT, devidas ao efeito do Al, não sendo observadas significâncias através do teste F. Como já discutido, a ausência de significância para ART e CRT deve-se a inabilidade do aparelho em analisar as raízes laterais. Já para CRT, a não significância deve-se ao uso da ART para o cálculo desse parâmetro, e, em parte devido aos altos coeficientes de variação apresentados pelos parâmetros, quando determinados por esse método.

Tabela 4. Significância do teste F e coeficiente de variação (CV) dos diferentes métodos para avaliação do efeito do Al, variedades e sua interação, para os parâmetros: a) área radicular total (ART); b) comprimento radicular total (CRT) e c) raio médio radicular (RMR).

Parâmetro →	ART		CRT		RMR	
	ME	MD	ME	MD	ME	MD
Método →	%		%		%	
Fonte de variação	%		%		%	
Al	0,00	0,00	0,02	0,17	0,09	5,15
Variedades	5,07	0,32	8,66	4,95	2,90	3,39
Al × Variedades	36,70	3,06	32,87	1,07	31,62	2,52
CV	24,44	17,29	54,79	33,77	25,95	19,60

Por outro lado, o método digital, apresentou alta significância para todos os parâmetros empregados para a distinção das variedades em classes de tolerância ao Al e permitiria então calcular os outros parâmetros e taxas derivadas, tais como redução relativa da área radicular e/ou redução relativa do crescimento radicular com uma melhor precisão do que com dados obtidos pelo método fotoelétrico.

Na Tabela 5 são apresentadas as médias de ART, CRT e RMR obtidas pelo método digital. O método apontou para variações em praticamente todos os parâmetros, demonstrando claramente o efeito das variedades e do Al. Por outro lado, extraíndo-se a redução relativa da área (RRART), redução relativa do comprimento radicular total (RRCRT) e aumento relativo do raio médio radicular (ARRMR) é que torna-se possível a comparação das variedades de forma condizente com a classificação prévia apresentada na Tabela 1.

Os dados apresentados na Tabela 6, revelam que o parâmetro ART discriminou as variedades quanto a tolerância ao Al, ratificando o comportamento observado na Tabela 1, além deste ser o parâmetro que melhor expressou as diferenças varietais e do efeito do Al. Os parâmetros CRT e RMR separou as plantas em dois grupos apenas. Um

primeiro grupo onde os parâmetros avaliados foram significativamente afetados pelo Al – Ligeiro Vermelho e Rabo de Burro, e um segundo onde os parâmetros não foram afetado pelo Al - Caiapó e Comum Branco. O coeficiente de variação alto também pode ter contribuído para tal efeito.

Dessa forma, parece ficar demonstrado que a ART é um parâmetro que deve ser utilizado na discriminação da tolerância ao Al.

Tabela 5. Valores da área radicular total (ART), comprimento radicular total (CRT) e raio médio radicular (RMR) das variedades de arroz de sequeiro submetidas as doses de 0 e 160  $\mu\text{mol}$  de Al, estimados pelo método digital.

Variedades	ART ( $\text{cm}^2$ )		CRT (cm)		RMR (mm)	
	0 Al	160 Al	0 Al	160 Al	0 Al	160 Al
Comum Branco	39,38a* A	27,79a B	239,33ab A	195,67 a A	0,221 a A	0,233b A
Caiapó	31,93ab A	21,36ab B	186,33b A	119,67 a A	0,284 a A	0,305 a A
Ligeiro Vermelho	37,44ab A	19,30ab B	406,54a A	160,19 a B	0,173 a B	0,277 a A
Rabo de Burro	27,37b A	13,65b B	252,66ab A	161,67 a B	0,199 a B	0,280 a A

\*Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente à 5% pelo teste de Tukey. Letras minúsculas contrastam médias entre linha e maiúsculas entre colunas.

Tabela 6. Redução relativa de área radicular total (RRART), redução relativa do comprimento radicular total (RRCRT) e aumento relativo do raio médio radicular (ARRMR), obtidos a partir dos parâmetros adquiridos via método da análise digital de imagens.

Variedades	RRART (%)	RRCRT (%)	ARRMR (%)
Comum Branco	29,43	18,24	5,43
Caiapó	33,10	35,78	7,39
Ligeiro Vermelho	48,45	60,60	60,12
Rabo de Burro	50,13	36,01	40,70

#### 4.2. Aquisição das Imagens dos Sistemas Radiculares via Câmara Fotográfica Digital e via Scanner

Pelo emprego do *scanner* para aquisição das imagens dos sistemas radiculares foram obtidos valores de ART de 29% e de CRT de 51% a mais em relação aos resultados obtidos com o emprego da câmara fotográfica digital (CFD; Figura 13), comparando-se os dados indiscriminadamente quanto a variedade, adição de Al ou época da coleta.

Pelas diferenças de magnitudes observadas, quando se contrasta os resultados da CFD e a obtenção de imagens via *scanner*, fica demonstrada que o primeiro método é menos eficaz na aquisição de imagens, e que o emprego dos parâmetros obtidos por este método, poderia levar a conclusões equivocadas no tocante a separação das variedades quanto a tolerância ao Al ou ao uso para cálculos de influxos ou efluxos radiculares.

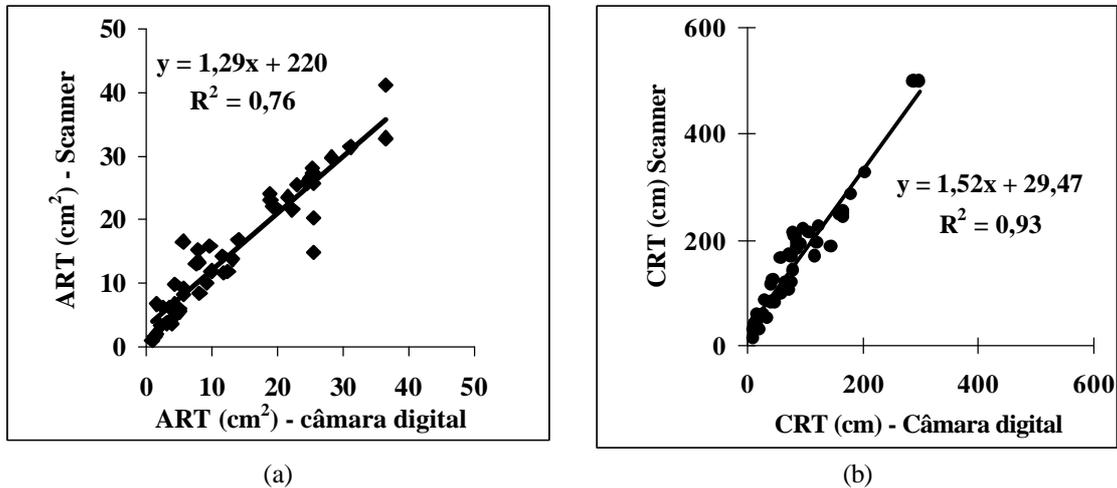


Figura 13. Comparação entre: a) Área radicular total (ART, cm<sup>2</sup>) obtida via *scanner* e por câmara fotográfica digital, e b) comprimento radicular total (CRT, mm<sup>2</sup>) obtido via imagens digitalizadas por *scanner* e por câmara fotográfica digital. O R<sup>2</sup> e os coeficientes lineares são significativos à 1%, exceto para (a), onde R<sup>2</sup> é significativo a 5%.

A vantagem teórica, proposta por vários autores, do uso da CFD é que esta possibilita considerável economia de tempo, e minimiza os riscos de manuseio excessivo das amostras (Mezavilla *et al*, 1998) adaptando-se à determinações de rotina, pode ser contestada para uso em plântulas, que apresentam pequeno raio radicular, que levam a grandes coeficientes de variação, como pode ser observado na Tabela 7. Os menores coeficientes foram conseguidos, quando foram analisadas somente as raízes principais das plântulas. Esta característica sugere que o equipamento utilizado não apresenta definição suficiente para ser empregado na aquisição de parâmetros radiculares, tais como ART e CRT.

As imagens adquiridas via *scanner* apresentaram coeficientes de variação sempre menores, quando comparados com CFD, o que caracteriza um menor erro. Com o desenvolvimento das plântulas, este coeficiente torna-se menor ainda (Tabela 7).

A CFD tem como vantagem seu uso com raízes de maior diâmetro, visto não a rapidez da aquisição dos parâmetros e também pelo tamanho do arquivo gerado, já que as imagens digitalizadas via *scanner* ocuparam um espaço de disco rígido 30 vezes maior que as imagens digitalizadas por CFD, pois esta salva as imagens no formato

JPG, que é compactado, tendo com isso uma perda de sua qualidade, e em muitos casos informações das raízes laterais.

Tabela 7. Coeficientes de variação dos parâmetros área radicular total (ART), comprimento radicular total (CRT), área das raízes principais (ARP), comprimento das raízes principais (CRP), área das raízes laterais (ARL) e comprimento das raízes laterais (ARL) em função do método empregado para aquisição de imagem (Scanner e Câmara Fotográfica Digital-CFD) e época da coleta.

Parâmetro	5 DAT		10 DAT	
	<i>Scanner</i>	CFD	<i>Scanner</i>	CFD
ART	27,74	35,39	15,84	18,86
CRT	37,88	42,53	15,31	53,43
ARP	31,15	37,67	16,07	18,02
CRP	33,67	40,24	13,77	18,41
ARL	23,75	33,79	16,74	31,19
CRL	42,80	46,58	17,67	42,13

#### 4.3. Efeito da Densidade de Varredura do *Scanner* na Aquisição de Imagens e Determinação de Área e Comprimento Radicular

Um aumento na área radicular, parâmetro preferencial para estudos de sistemas radiculares, pode ser observado na Figura 14. Com o aumento da densidade de varredura do *scanner* a área radicular tende a aumentar até 200 dpi, a partir do qual não ocorrem variações significativas. A estabilização do aumento da área radicular na densidade de 200 dpi pode ser decorrente da obtenção das imagens de todas as raízes finas, já que em tese, estas poderiam não ter sido capturada nas varreduras de menor densidade. Por outro lado, a 200 dpi, o desvio padrão continua elevado, quando comparado com densidades de varreduras maiores que 300 dpi.

O não aumento da área radicular pode ser devido a que nesta densidade, a digitalização das raízes mais finas já foi conseguida. Por outro lado, o desvio padrão continua elevado, quando comparado com valores maiores que 300 dpi.

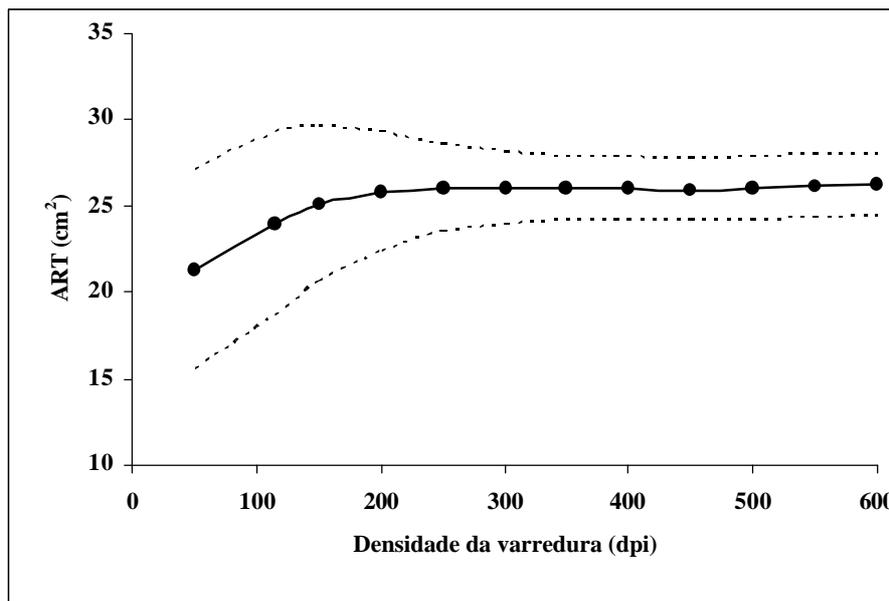


Figura 14. Efeito da densidade de varredura na área radicular total de plântulas de arroz (variedade Comum Branco) crescidas por 5 dias em solução nutritiva completa (as linhas pontilhadas representam os desvios padrões de cada ponto).

A Figura 15 mostra a relação teórica entre a densidade da varredura, tamanho do arquivo e menor diâmetro de raiz que pode ser adquirida, e aponta para uma definição de 400 dpi como a ideal. Uma definição de 400 dpi proporciona o reconhecimento de raízes com diâmetro de 0,054 mm, ou seja, 3,4 vezes menor que o diâmetro encontrado para as raízes da variedade Ligeiro Vermelho (2 x RMR; Tabela 5). Por outro lado, a mesma figura mostra que o tamanho do arquivo de armazenamento da imagem aumenta exponencialmente, e dessa forma, parece ser coerente o uso de uma definição de 300 dpi para adquirir imagens de sistemas radiculares de plântulas de arroz onde, é possível a captura de raízes de até 0,07 mm de diâmetro, com baixo desvio padrão e um tamanho menor de arquivo de armazenamento.

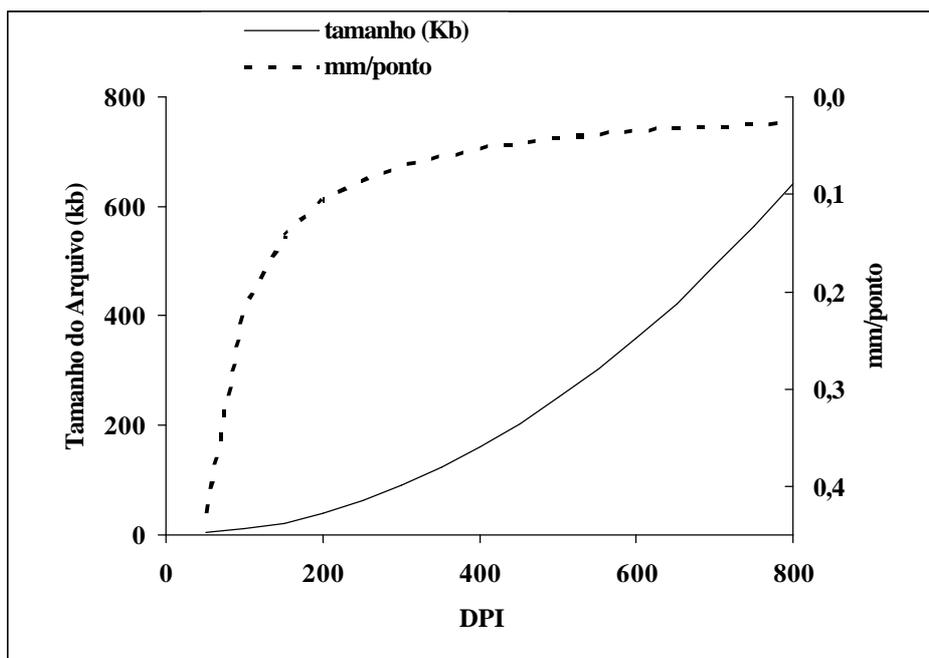


Figura 15. Relação teórica entre densidade da varredura, tamanho do arquivo e espessura de 1 pixel, para uso de apenas 1 cor (preto – 1 bit).

#### 4.4. Protocolo para Aquisição de Parâmetros Radiculares de Plântulas Jovens.

Do conjunto de informações contidas nos itens 4.1, 4.2 e 4.3 é possível construir a Figura 16, de onde pode ser constatada a diferença entre o método de aquisição dos parâmetros radiculares. Indiscutivelmente, tanto a ART como o CRT apresentaram a seguinte ordem de grandeza quando comparados os métodos e formas de aquisição das imagens: método digital com imagens adquiridas por *scanner* > método digital com imagens adquiridas por CFD > método fotoelétrico.

Aplicações específicas de cada um dos métodos são possíveis, conforme descrito por vários autores (Rossiello *et al*, 1995; Mezavilla *et al*, 1998), porém, no trabalho em questão, o uso de *scanner* é o recomendado, a uma definição de 300 dpi.

Por outro lado, no desenrolar dos experimentos observaram-se pequenos problemas de execução, tais como o desenvolvimento de fungos e algas, que prejudicavam o crescimento das plântulas, além disto, no momento do preparo das amostras, aquisição e pré-processamento das imagens, ocorrem pequenas variações devido à experiência do operador.

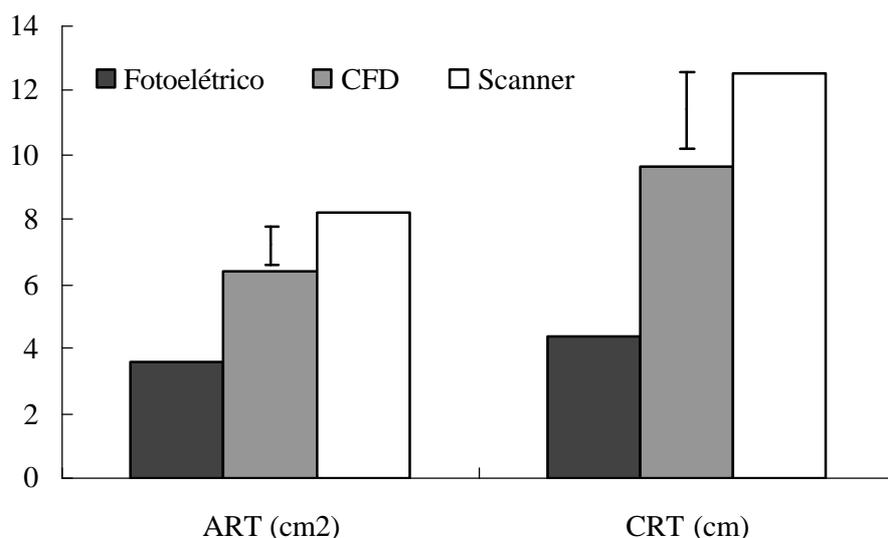


Figura 16. Comparação entre a área radicular total (ART) e comprimento radicular total (CTR) determinado entre o medidor fotoelétrico e de imagens adquiridas por câmara fotográfica digital (CFD) ou *scanner*. As barras indicam a DMS.

Para minimizar os problemas levantados e normatizar as etapas para os trabalhos seguintes, com auxílio das anotações dos operadores, foi estabelecido um protocolo para germinação, crescimento, digitalização e análise de sistemas radiculares de plântulas de arroz, que é descrito abaixo:

### ***I. Esterilização das sementes e germinação das plântulas***

- I.1. Agitar as sementes, utilizando uma relação de 100 sementes para aproximadamente 100 mL de uma solução 4% hipoclorito de sódio (Jones & Darrah, 1993), durante 30 minutos em agitador orbital.
- I.2. Drenar o hipoclorito e adicionar o mesmo volume de água ultra-pura. Este procedimento deve ser executado 5 vezes.
- I.3. Transferir as sementes para papel GERMITEX® previamente esterilizado em autoclave e umedecido (duas vezes seu peso seco) ou para areia lavada também previamente autoclavada. Se for usado papel GERMITEX®, este deve ser acondicionado em embalagens herméticas de PVC, a fim de manter-se a umidade necessária para a germinação.

- I.4. Transferir o material para estufa de germinação, com temperatura alternada (20 e 30°C; dia e noite respectivamente), ou em câmara de crescimento com temperatura contínua de 28°C, por aproximadamente 10 dias.
- I.5. Monitorar diariamente as condições ambientais das câmaras e a umidade do meio de germinação.

## **II. Crescimento das plântulas**

- II.1. Depois de completada a etapa de germinação as plântulas são selecionadas quanto a sua uniformidade visualmente, e, transferidas para os vasos de PVC com capacidade de 1 L, contendo a solução nutritiva, à força iônica selecionada. Após 24 horas, devem ser aplicados os tratamentos com Al (Tempo zero).
- II.2. Acompanhar o desenvolvimento das plantas até a data de coleta, monitorando pH e efetuando as trocas de solução, conforme necessário.
- II.3. Ao final do tempo experimental, coletar as plantas e separá-las em parte aérea e raiz.
- II.4. A parte aérea pode ser secada em estufa até peso constante para outras determinações.

## **III. Aquisição das imagens dos sistemas radiculares**

- III.1. Distribuir o sistema radicular sobre uma folha de acetato tamanho “A4” ou “Carta”. Esse procedimento aumenta a vida útil do *scanner*, evitando a ocorrências de riscos sobre a superfície do aparelho, que podem ser confundidos com raízes finas, além de permitir o uso de um dispersante líquido, visto a dificuldade de distribuir as raízes sobre a superfície.
- III.2. Dispersar as raízes com solução de NaCl 0,9%, de forma que não haja sobreposição dos eixos. Não utilizar água, pois a maior tensão superficial dificulta sua retirada após a dispersão das raízes.
- III.3. Retirar o excesso da solução com auxílio de uma bomba de vácuo ou utilizando pequenos pedaços de papel filtro seguros com uma pinça.
- III.4. Dispor uma outra folha de acetato sobre as raízes (se não utilizar folha dobrada).
- III.5. Observar se não houve a formação de gotículas ou linhas de água laterais as raízes.

- III.6. Marcar uma escala conhecida na folha de acetato
- III.7. Situar as folhas de acetato sobre a superfície de leitura do *scanner*;
- III.8. Para raízes de plântulas cultivadas em solução nutritiva, faz-se necessário que o fundo da imagem seja de cor escura e opaca, bem contrastante com as raízes. Se a proteção da tampa do *scanner* for branca ou outra cor clara, inserir um fundo escuro (Matiello *et al*, 2002).
- III.9. Acionar a configuração padrão do equipamento e alterar apenas para 8-bits (tons de cinza) e 300 dpi.
- III.10. Digitalizar a imagem e armazenar no disco rígido, utilizando para nomear apenas o número máximo de caracteres aceito pelo processador das imagens, no formato TIF ou BMP para que não haja perda da definição.

#### **IV. Pré-processamento**

- IV.1. O pré-processamento, como descrito no item 3.2, (em softwares de edição de edição de imagem) consiste na retirada de objetos espúrios gerados na aquisição da imagem e no uso inicialmente da ferramenta de equalização automática da figura digitalizada;
- IV.2. Aplicar a ferramenta borracha, utilizando a mesma cor do fundo da imagem, para reduzir marcar de bordas;
- IV.3. Se não foi colocada escala, adicionar, com auxílio de programa de edição de imagens;
- IV.4. Varrer visualmente a imagem observando se ainda existe algum objeto estranho;
- IV.5. Salvar a imagem;
- IV.6. Se houver interesse em obter parâmetros das raízes principais e laterais, utilizar a ferramenta borracha para eliminar as raízes laterais, terciárias e de menor calibre. Dentre os procedimentos, este é o que demanda mais tempo (segmentação manual);
- IV.7. Salvar a imagem com nome distinto da anterior, para que não haja sobreposição dos arquivos e a perda da imagem do sistema radicular completo (salvar arquivo com formato BMP e/ou TIFF; não utilizar o formato JPG, por ser esta uma extensão de compressão, ocasionando perdas de informação (Paciornick *et al*, 2000).

## V. *Processamento*

- V.1. Dependendo do programa que será utilizado. No caso do SIARCS, especificamente, seguir os itens abaixo.
- V.2. Abrir a imagem;
- V.3. Reconhecer a raiz com o filtro de limiarização *thresholding*;
- V.4. Aplicar as ferramentas de binarização;
- V.5. Reconhecer a escala;
- V.6. Calcular a área radicular;
- V.7. Aplicar a ferramenta de esqueletonização;
- V.8. Calcular o comprimento radicular;
- V.9. Salvar a imagem esqueletonizada para proceder manualmente à contagem do número de eixos;

Estes procedimentos, foram realizados três vezes, com operadores distintos, sendo utilizada a variedade Comum Branco, não submetida ao AI e crescida por 5 dias em solução nutritiva completa. Os parâmetros utilizados para confirmação da eficácia do método foram a ART e o CRT. Na Tabela 8 são apresentados os resultados obtidos, sendo constatado não haver variação significativa na área e no comprimento, além de um menor coeficiente de variação quando comparados aos obtidos nos experimentos anteriores, demonstrando que o protocolo, e em parte o treinamento dos operadores, propicia uma redução no CV% e resultados mais confiáveis.

Tabela 8. Estimativas de área radicular total (ART) e comprimento radicular total (CRT) obtido por diferentes operadores, utilizando o protocolo estabelecido durante a comparação dos métodos.

Parâmetro	Operador A		Operador B		Operador C		CV%
ART (cm <sup>2</sup> )	15,36	a*	14,32	a	17,15	a	12,51
CRT (cm)	67,09	a	70,82	a	59,36	a	18,56

\*Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente à 5% pelo teste de Tukey.

## 5. CONCLUSÕES

Os dados obtidos, com plântulas de arroz submetidas ou não ao AI, permitem concluir que:

1. O medidor fotoelétrico subestima os valores de área e comprimento radicular, além de não discriminar a tolerância diferencial ao AI, quando comparado ao método da análise digital das imagens;
2. A aquisição das imagens de raízes, para serem processadas pelo SIARCS, devem ser obtidas preferencialmente com *scanner*, já que a câmara fotográfica digital também subestima a área radicular, e não diferencia totalmente a tolerância varietal em plântulas de variedades de arroz de sequeiro;
3. A melhor densidade para varredora do *scanner* no momento da digitalização é de 300 dpi.
4. O protocolo elaborado no decorrer destas fases experimentais demonstrou reduções nos erros experimentais.

**CAPÍTULO II – ALTERAÇÕES EM PARÂMETROS  
MORFOLÓGICOS DE RAÍZES DE CULTIVARES DE  
ARROZ DE SEQUEIRO SUBMETIDAS AO ALUMÍNIO**

## RESUMO

O estudo objetiva avaliar as modificações morfológicas radiculares em variedades de arroz submetidas ao estresse de Al e em diferentes disponibilidades de nutrientes. Especificamente pretende-se verificar quais as variações de área e comprimento radicular total; verificar quais as variações de área e comprimento radicular das raízes principais e laterais; avaliar o grau de ramificação do sistema radicular e seus parâmetros derivados. Para atender a tais objetivos, duas variedades de arroz de sequeiro, com graus variados de tolerância ao Al (Comum Branco - altamente tolerante e Caiapó - tolerante), foram cultivadas em solução com ausência de Al e na presença de 40, 160 e 320  $\mu\text{mol}$  de Al. A solução nutritiva inicialmente concentrada, foi diluída por 4 e 15 dias. Foram medidos os parâmetros número, área e comprimento de raízes principais, laterais e totais, com auxílio da análise digital de imagens. Vários parâmetros derivados foram calculados, como comprimento médio de raízes principais, comprimento médio de raízes laterais, distância média entre raízes laterais no eixo principal, número de raízes laterais por eixo principal, raio médio radicular e raio médio das raízes principais, além das reduções relativas de ambos. Os dados experimentais permitiram as seguintes conclusões: a variedade de alta tolerância ao Al (Comum Branco), quando na presença de Al, a qualquer tempo ou disponibilidade nutricional, desde que o Al esteja com mesma atividade em solução, apresenta menor redução dos parâmetros radiculares. A variedade tolerante ao Al (Caiapó) apresenta grau variado de tolerância ao elemento, de acordo com a disponibilidade nutricional à que esta exposta; sob baixa disponibilidade nutricional, Caiapó mostra-se de fato menos tolerante ao Al que Comum Branco; sob alta disponibilidade nutricional, Caiapó mostra-se ao longo do tempo mais tolerante que Comum Branco. O parâmetro raio radicular das raízes principais revelou, em qualquer situação testada, menor alteração na Comum Branco do que em Caiapó. Com base nestas conclusões, pode-se afirmar efetivamente que a variedade Comum Branco tolera o Al e que a variedade Caiapó pode aclimatar-se ao Al, quando estiver em condições de maior disponibilidade de nutrientes.

**Palavras chave:** alterações rizomorfológicas; parâmetros radiculares; tolerância ao Al.

## ABSTRACT

The study aims to evaluate the degree of rizomorphogenic modifications in rice plants submitted to Al's stress, grown under different nutritional availability levels. Specifically it pretends to verify variations in total root area and length; variations in the area and length of the main and lateral roots; evaluate the root ramification degree and the derived parameters. Two upland rice varieties, with varied degree of Al tolerance (Comum Branco - highly tolerant, and Caiapó - tolerant) were grown, in the absence of Al and with dosages of 40, 160 and 320  $\mu\text{mol}$  of Al. The nutrient solution was initially concentrated and then diluted by 4 and 15 days. There were measured by image digital analyzing the parameters, area and length of main, lateral and total roots. Several derived parameters were calculated, such as average length of main and lateral roots; average distance among lateral roots in the main axis; number of lateral roots in the main axis; average ray root and average ray of the main roots, besides the respective reductions on both parameters. In the presence of Al, despite nutrition availability, and time of exposition, as long as Al activity is kept the same, the rice variety with high tolerance to Al (Comum Branco) presents the least reduction of the root parameters. The variety just tolerant to Al (Caiapó) presents varied degree of tolerance. This is in conformity with the nutrient availability. Under low nutrient availability, Caiapó is less Al tolerant than Comum Branco; under high nutrient availability, Caiapó is more tolerant, and for a longer period of time than Comum Branco. Also, the parameter ray of the main roots revealed, in any tested situation, least alterations in the Comum Branco than in Caiapó. Based on these conclusions, it can be stated that the variety Comum Branco is Al tolerant, and the variety Caiapó can be Al tolerant, when under high nutrient availability.

**Key Words:** rizomorphological alterations; root parameters; Al tolerance.

## 1. INTRODUÇÃO

A rizicultura brasileira de sequeiro, em sua grande parte, é desenvolvida em solos ácidos, com elevados teores de alumínio trocável e baixa disponibilidade de nutrientes, apresentando nessas condições, baixa produtividade evidenciada pela extensa área cultivada - aproximadamente 65% da área total cultivada com arroz – que origina apenas 45% da produção total do cereal. Os outros 50% da produção são resultantes do cultivo de 36% da área com arroz irrigado e 10% de arroz de várzea, e que em geral são variedades menos tolerantes ao Al. Nestes casos, a inundação por si, através da auto calagem, promove a elevação do pH, fazendo com que o Al precipite (Fageria, 1984).

Os cultivos de arroz de sequeiro, principalmente nas regiões centro-oeste e nordeste, são realizados por pequenos agricultores, em geral descapitalizados e que não utilizam ou utilizam pequenas quantidades de insumos, e, sementes oriundas de plantios anteriores. Por este motivo, nos trabalhos desenvolvidos com arroz de sequeiro, tem-se utilizado variedades locais, não melhoradas, pois estas podem ter conservado, em maior grau, genes para a expressão da tolerância ao alumínio. Esta tolerância é um fator importante para garantir um bom desenvolvimento do sistema radicular do arroz, permitindo, além desta peculiaridade própria, a aquisição de água e nutrientes em maiores profundidades, o que tem especial importância em condições de estresses hídricos sazonais e em solos com baixa fertilidade natural. Em síntese, essa característica favorece uma maior exploração do solo além de ser uma considerável reserva de genes para programas de melhoramento voltados para este fim.

O alumínio pode reduzir e/ou paralisar consideravelmente a divisão celular do meristema apical das raízes, resultando em uma drástica redução no sistema radicular (Rout *et al*, 2001), desta forma a taxa de alongação das raízes principais (seminal ou nodal) tem sido empregada como um critério para avaliar a toxicidade do alumínio, e a resposta diferencial do comprimento (principalmente) das raízes principais, também sendo empregado para avaliar o grau da variação genética na tolerância ao alumínio. Recentes trabalhos em solução nutritiva e uso de análise digital de imagens, tem utilizado parâmetros tais como área e comprimento radicular total, entre outros (Zonta *et al*, 2000a; Zonta *et al*, 2000b), o que permite imediata observação dos efeitos da injúria de alumínio, e principalmente avaliar as variações na ramificação lateral, em

geral discriminada na maior parte dos estudos relativos aos assuntos, e que pode ser um fator importante da tolerância diferencial, já que, o tempo de diferenciação e emergência de um primórdio radicular secundário pode estar estreitamente associado ao desenvolvimento do ápice da raiz primária, sugerindo uma conexão entre morfogênese radicular, tolerância ao Al e a nutrição da planta. Foy *et al* (1993), relata que em soja, é através do crescimento das raízes, que se pode saber se existe ou não tolerância, esta pode ser determinada também pela habilidade na aquisição de nutrientes, especificamente Ca, P, Mg e Fe.

Um mecanismo, tal qual proposto por Foy *et al* (1993) para a soja poderia estar associado às variedades de arroz tolerantes ao Al, visto que a injúria ao sistema radicular, independentemente da classificação quanto a tolerância, acontece, variando apenas seu grau de intensidade, além de que em estudos de longa duração, podem acontecer, por efeitos de aclimação, ontogenia e outros mecanismos de reparo à nível celular, respostas diferenciadas ao Al, quanto comparadas com estudos de curto prazo Gho & Lee (1999).

Outra consideração importante é o uso de variedades com alto grau de distinção nestes estudos (p.e. variedades altamente tolerante vs. altamente sensível), onde, algum parâmetro não poderia ser contrastado em virtude da drástica retração do sistema radicular que as variedades mais sensíveis sofrem. A alternativa proposta neste capítulo é o uso de variedades com grau variado de tolerância, porém, menos distantes e no mínimo medianamente tolerante, pois o objetivo é o estudo do mecanismo de tolerância e não da sensibilidade.

Alguns trabalhos têm utilizado complexos índices topológicos para determinar a configuração ou magnitude do sistema radicular de plantas (principalmente dicotiledôneas), em pequenos períodos iniciais de desenvolvimento, porém, estes índices podem estar restritos a esses períodos, visto a complexidade dos sistemas radiculares mais desenvolvidos, ainda que também, os programas computacionais que permitem automatizar esse tipo de atividade, nos são ainda inacessíveis, como por exemplo, o WinRHIZO®, que além dos parâmetros tradicionais de área e comprimento, fornece automaticamente uma série de parâmetros, tais como magnitude topológica do sistema, volume, entre outros (Pouleur, 2003).

Particularmente em arroz, além do sistema radicular mais denso de que em dicotiledôneas, o tempo de resposta se faz importante, e manualmente, a quantificação de índices topológicos como os propostos por Fitter (1991) se tornariam extremamente

trabalhosos. Nielsen *et al*, (1999) e Zonta *et al*, (2002), sugeriam o uso da dimensão fractal, mas, necessitam-se antes destas aplicações, um melhor entendimento dos parâmetros morfológicos radiculares, de sua dinâmica e das dimensões fractais bidimensionais ou tridimensionais relativas a cada instante.

A alternativa foi então utilizar um programa de fácil acesso (SIARCS 3.0), para aquisição dos parâmetros tradicionais (área e comprimento), e com auxílio de programas de edição de imagens de fácil acesso, manualmente obter outros parâmetros que podem ajudar no entendimento das modificações radicular quanto da submissão de plântulas de arroz ao Al, já que existe necessidade de aprofundar os estudos morfológicos, visando uma melhor compreensão da tolerância do sistema radicular no seu conjunto.

Dessa forma, este trabalho tem como objetivo avaliar as modificações morfológicas radiculares em variedades de arroz submetidas à doses crescentes de Al, em dois tempos diferentes de exposição (4 e 15 dias), sob disponibilidades variáveis de nutrientes. Como objetivos específicos tem-se:

1. Verificar as principais variações de área e comprimento radicular total;
2. Identificar as principais modificações de área e comprimento das raízes principais e laterais;
3. Avaliar o grau de ramificação do sistema radicular e seus parâmetros derivados.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Em trabalho publicado ao final da década dos anos 60, Fleming & Foy (1968) explicaram as respostas ao Al entre as variedades de trigo “Atlas” (tolerante) e “Monon” (sensível) como decorrentes de diferenças em danificação morfológica às raízes laterais e ápices radiculares. Os autores concluíram que a tolerância do trigo era determinada pela sua capacidade de continuar a divisão celular e a alongação mesmo sob estresse. Este processo era desenvolvido para a modificação do ambiente radicular espacial com o objetivo de diminuir a concentração do Al presente no meio, e, manter áreas meristemáticas viáveis, mesmo sob injúria, a partir das quais novos tecidos poderiam ser desenvolvidos depois de superado do estresse. Esses autores perceberam que o efeito tóxico do Al era localizado, e que as diferenças varietais observadas eram devidas a uma série de eventos que começavam ao nível celular e refletiam os órgãos, principalmente nas raízes, decorrentes da interferência do metal na divisão celular. Embora o trabalho de Fleming & Foy (1968), contivesse tão claras sugestões, é interessante verificar que a demonstração inequívoca de que o sítio primário de toxidez em trigo é o ápice radicular, foi somente constatada em trabalhos que datam do início da década de 90 (Bennet & Breen, 1991; Ryan *et al*, 1993).

Como os ápices radiculares são constituídos de diferentes órgãos (coifa, meristema, zona de alongação e região madura; Sasaki *et al*, 1996), muitos esforços têm sido realizados para examinar em detalhe em qual destas regiões realmente ocorre a lesão primária. Estudos que demonstram que a alongação radicular, como processo fisiológico, apresenta maior grau de sensibilidade que a própria divisão celular, são recente (Kochian, 1995). Nos últimos cinco anos, grande parte da pesquisa tem centrado seu interesse na sensibilidade desses eventos, que se processam em escalas da ordem micro a milímetros a partir do extremo apical.

Numa avaliação do estado da arte, Taylor (1991) chamou a atenção sobre tal linha de abordagem, que tem focalizado cada vez mais nossa atenção sobre eventos ocorrendo nos primeiros milímetros do ápice, durante breves períodos de tempo. Esse autor comentou que mesmo assim, a pesquisa não tem sido capaz de identificar sem ambigüidade quais desses efeitos são relevantes para a expressão da resposta ao estresse de Al em si, em especial qual a importância das lesões citossólicas em relação as

extracitossólicas, e perguntou-se se realmente podem ser ignorados efeitos em outras regiões da raiz ou aqueles cuja expressão dependa de escalas de tempo superiores a minutos ou horas (p.e. ciclo celular, Kochian, 1995).

Existe, é claro, a percepção de que as respostas ao estresse, de curto não são similares às de longo prazo, devido a que as últimas envolvem processos como fotossíntese e translocação de carboidratos às raízes, inibição de absorção de nutrientes, operação de mecanismos de sinalização, síntese e indução de metabólitos de defesa e modificações no balanço hormonal radicular, entre outros aspectos (Foy, 1988; Fageria *et al.*, 1988; Bennet & Breen, 1991; Rengel, 1992; Kochian, 1995). O exemplo mais claro disto, talvez, seja a perda da sensibilidade da alongação de raízes seminais num mesmo genótipo quando exposto por poucas horas ou por vários dias a soluções contendo Al (Fageria *et al.*, 1988; Costa de Macedo *et al.*, 1997).

A informação disponível sobre processos de diferenciação nodal e lateral e de indução de raízes adventícias, é relativamente escassa, e os mecanismos de expressão gênica que os controlam estão começando a serem elucidados (Lorbiecke & Sauter, 1999). Por outro lado, outra das conclusões de Fleming & Foy (1968), a da manutenção de atividade meristemática, incluindo divisão celular durante ou depois de finalizado o estresse, evoca mecanismos de danificação e reparo de DNA. Na sua revisão sobre este tópico, Britt (1996) menciona que provavelmente as raízes possam experimentar uma ampla faixa de danificação e, portanto possam ter desenvolvido uma resposta adaptativa, embora não mencione o papel do Al ou outros cátions trivalentes como possíveis agentes danificantes. Avanços nas áreas mencionadas podem contribuir em uma melhor compreensão dos mecanismos de rizomorfogênese e de como os mesmos podem ser modulados em longo prazo pelo estresse por Al, conforme proposto por Vasconcelos *et al.* (2002), que enfatiza ainda a necessidade específica de estudos da tolerância das raízes laterais do arroz ao Al.

Costa de Macedo, *et al.* (1998) estudando plantas de arroz, realizou uma interessante observação de que quando variedades de grau diferencial de tolerância ao Al foram avaliadas após oitenta dias de crescimento em soluções contendo níveis elevados de Al (500 – 1000  $\mu\text{M}$ ), as tolerantes se distinguiram das sensíveis não por um maior comprimento radicular, mas pelo fato de exibir ramificação lateral ativa em oposição às sensíveis, que apresentaram raízes gelatinosas, com sintomas típicos de intoxicação com Al. Esses autores sugeriram que as variedades tolerantes de arroz podem se “aclimatar” ao elemento.

A variedade Comum Branco, foi comparado por Mendonça (1991), com um material sensível (IAC 899), sendo observado que após três semanas de exposição a 370  $\mu\text{M}$  de Al, o genótipo tolerante não mostrou reduções significativas em características como comprimento, área e volume radicular total, enquanto o sensível mostrou reduções drásticas no crescimento radicular, acompanhado de um aumento no raio médio das raízes.

Experimentos subseqüentes, desenvolvidos no Departamento de Solos da UFRRJ, mostraram que Comum Branco produziu mais massa seca de raízes e parte aérea, quando comparados com IAC 47 e IAC 125, variedades considerados tolerantes, quando submetidos a uma solução nutritiva completa. Em outra série de experimentos, conduzidos também no Departamento de Solos, em soluções salinas simples ( $\text{CaCl}_2$ ,  $0,1\mu\text{M} + \text{ClAl}_3$ , a  $\text{pH } 4,0 \pm 0,01$ ), foram comparadas as elongações radiculares relativas, das raízes principais, de Comum Branco, Caiapó, Araguaia e IAC 899, observando-se que as concentrações críticas de Al para proporcionar 50% de redução na elongação Radicular Relativa (ERR%) foram: 8 (IAC 899), 68 (Araguaia), 91 (Caiapó) e 510 (Comum Branco), em  $\mu\text{M Al L}^{-1}$ , confirmando a grande superioridade de Comum Branco, em relação aos genótipos melhorados (Vasconcelos *et al*, 2002). Pode-se sugerir que o aumento da massa seca radicular na variedade tolerante foi devido a uma manutenção na diferenciação celular radicular, mesmo que esse parâmetro tenha sido negligenciado para as raízes laterais.

Por outro lado, quando Comum Branco e IAC 899 foram submetidos a uma solução nutritiva diluída e o pH foi rigidamente controlado para evitar flutuações decorrentes de absorção iônica, aquele genótipo mostrou um padrão peculiar: a ERR só decresceu significativamente no nível de 160  $\mu\text{M}$  e manteve sua taxa de elongação estabilizada aproximadamente a 30% abaixo do controle mesmo com a duplicação da dose de Al. Em comparação, IAC 899 sofreu reduções significativas a partir de 80  $\mu\text{M Al L}^{-1}$  e atingiu valores mínimos de 37% ou 18% ao nível superior (320  $\mu\text{M}$ ), segundo o período de exposição fosse de nove ou doze dias. Sob estresse de Al, uma raiz seminal de IAC 899, severamente estressada por exposição a 160  $\mu\text{M}$  de Al por 48 horas, alonga um máximo de 3 mm, o que significa uma EER de apenas de 6-7% com relação a um controle não estressado. Tais raízes fracassaram em emitir laterais, enquanto que nas mesmas condições, raízes de Comum Branco emitem laterais que conseguem alongar significativamente, conforme observação visual feita por Vasconcelos *et al* (2002).

## 2.1. Ontogenia radicular e Al

**Raízes nodais:** o arroz possui uma única raiz de origem embrionária, isto é, uma única raiz seminal. Todas as raízes subsequentes são formadas respectivamente nos nós, a partir do coleótilo. Em cada nó, repetem-se os mesmos quatro processos básicos: diferenciação, desenvolvimento, emergência e posterior crescimento, de acordo a seguinte ordem: uma região de enraizamento e uma folha na parte basal do nó, e uma outra região de enraizamento e um perfilho na parte superior (Hoshikawa, 1993). As raízes originadas do nó, ditas nodais ou adventícias, são consideradas eixos primários. Em condições livres de estresse, a estrutura morfológica, e histológica de raízes seminais e nodais é similar (Harada & Yamasaki, 1993).

O comprimento das raízes nodais depende da parte do eixo do colmo onde são formadas, e de sua posição no nó (inferiores ou superiores). Em geral, raízes originadas da diferenciação de primórdios imediatamente abaixo do nó, são de menor comprimento que as originadas acima do nó. A duração do período de alongação de cada eixo radicular é relativamente curto, e processa-se desde sua emergência até a emergência da 2ª ou 3ª folha superior. As taxas diárias de alongação são variáveis, refletindo condições de crescimento, posição de sua formação e tipo de raiz (inferior ou superior). Em condições livres de estresse ambiental ou nutricional, as taxas máximas são da ordem de 30-40 mm dia<sup>-1</sup>, e existe a observação de que raízes nodais com maiores taxas de alongação, mostram tendência a maior comprimento final, após a cessação do período de alongação (Harada & Yamasaki, 1993).

Do ponto de vista do estresse do Al sobre o crescimento radicular, a região de máxima responsividade é o ápice (Ryan *et al*, 1993), isto é, os primeiros 20-30 mm do extremo apical compreendendo a coifa (e a camada de mucigel associada), a região menstemática e a região de alongação e diferenciação celular. Os efeitos do estresse parecem decorrer primariamente da inibição da alongação celular antes que de um bloqueio na divisão celular (que também ocorre) ou da danificação da atividade secretória das células periféricas da coifa (Ryan *et al.*, 1993; Kochian, 1995).

Macroscopicamente, os efeitos discerníveis são o engrossamento dos ápices, os quais tornam-se escurecidos, de cor marrom. O número, área e volume dos pêlos radiculares é diminuído ao igual que a ramificação lateral (Care, 1995; Mendonça *et al*,

1997). Raízes laterais iniciam-se mais próximas ao ápice radicular, em comparação aos controles não estressados.

**Ramificação lateral:** O primórdio radicular secundário diferencia-se endógenamente a uma certa distância do ápice de um eixo nodal, a partir da atividade mitótica localizada em células do periciclo, exteriores aos vasos do protofloema, (Harada & Yamasaki, 1993). Em arroz, um eixo nodal completamente alongado, possui muitas ramificações laterais, dando um comprimento total de 6-15m, e um colmo produtivo pode apresentar, em média 28-30 raízes nodais alongadas. As raízes laterais (ou laterais primárias) são de dois tipos, segundo seu diâmetro: grossas (0,14 - 0,18mm), em forma de “L”, e finas (0,07 - 0,09mm), em forma de “S”. Harada & Yamasaki (1993) dão os seguintes valores médios para densidade de emergência ( $n^0$  de laterais por unidade de comprimento de raiz materna): raízes grossas, entre 0,5 - 1,5  $\text{cm}^{-1}$ ; finas: 15-20  $\text{cm}^{-1}$ . As raízes grossas podem ser discernidas das finas pelo fato de serem as únicas a ramificar subsequentemente, dando origem a raízes terciárias (com diâmetro entorno de 0,05-0,07mm). Também de interesse para efeitos de caracterização, é que a densidade de laterais não é uniforme ao longo do eixo primário, sendo seu número máximo, na parte média do mesmo (Harada & Yamasaki, 1993).

Sob estresse de Al, é comum a observação de uma redução em densidade de emergência de laterais, conduzindo a uma redução em comprimento e área radicular total, tal como observado na variedade sensível IAC 899 por Mendonça *et al* (1997) em exposição de longo prazo (3 semanas a 370 $\mu\text{M}$  de Al), ou de períodos muito, mais curtos (50% de redução relativa a 160 $\mu\text{M}$  Al, após 4 dias, Vasconcelos, *et al.*, 1996).

O tempo de diferenciação-emergência de um primórdio radicular secundário, está estreitamente associado ao desenvolvimento do ápice da raiz primária qual se desenvolve. A distância ápice - 1<sup>a</sup> lateral mostra uma correlação positiva com a taxa de alongação da raiz nodal e com o diâmetro do ápice da mesma (Harada & Yamasaki, 1993). Como, sob estresse de Al, ambos os processos (taxa de alongação do ápice e taxa de diferenciação de primórdios), são diferencialmente afetados, seria de interesse testar se diferença em sensibilidade/toxicidade entre variedades, estão associadas, não somente à taxa de alongação relativa de um ápice primeiro, mais a distância ápice - 1<sup>a</sup> lateral. Este último indicador poderia fornecer uma informação mais abrangente (não necessariamente mais precisa), do efeito do Al.

O estudo do efeito do Al sobre o padrão de ramificação lateral, complexo como é, é de interesse numa outra direção. Bennet & Breen (1991), destacaram que muitos

estresses experimentados pelas raízes intensificam-se com o tempo. O crescimento apical pode cessar, mas as raízes podem reter o potencial para reassumir seu crescimento após o estresse cessar. Persistindo as condições, a única estratégia restante, é a planta explorar novas direções de crescimento, através da iniciação de laterais. Este comportamento indicaria que a morfogênese radicular estaria conectada à tolerância ao Al (Bennet & Breen, 1992). Os autores foram enfáticos afirmando neste trabalho, que as raízes laterais são de grande importância na determinação da tolerância ao Al em uma cultura, já que o primórdio radicular lateral, origina-se a partir da atividade mitótica de grupos de células do periciclo, mas a sua emergência através da endoderme e córtex, cria, na base da jovem radícula, uma via apoplástica temporária (Charlton, 1991), que propicia à difusão e possível penetração intracelular de Al, conduzindo a uma redução na emergência de laterais. Dessa forma os eventos parecem indicar que o Al interfere com a atividade de meristemática depois que as raízes laterais emergem (Silva *et al*, 2001).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Seleção das Variedades

As variedades Comum Branco e Caiapó foram pré-selecionadas com base nas semelhanças de características morfológicas apresentadas, tais como: área radicular total, comprimento radicular, número de eixos principais, número médio de raízes laterais por eixo principal, número de raízes laterais por cm de raiz principal, e por sua tolerância diferencial. Esses valores foram obtidos a partir das imagens armazenadas obtidas dos estudos do Capítulo I. As características estudadas foram baseadas no tratamento testemunha (0 Al), com 5 dias de crescimento após o transplante. Os parâmetros área e comprimento radicular foram determinados pelo programa SIARCS e os índices topológicos foram obtidos por contagem manual e outros obtidos a partir de derivações específicas (ver item 3.4, deste capítulo).

O uso de variedades com parâmetros morfológicos radiculares similares sob condições ótimas de crescimento, tiveram o objetivo de diminuir a variabilidade intra-genotípica e conseqüentemente na análise estatística, o efeito de variedade isoladamente, além de acentuar o efeito da interação variedade  $\times$  Al.

Tabela 9. Parâmetros morfológicos e topológicos do sistema radicular das variedades Caiapó e Comum Branco cultivadas em solução nutritiva por 5 dias, livres de condições de estresses

Parâmetro	Caiapó*	Comum Branco
Área radicular total	10,2 cm <sup>2</sup>	11,4 cm <sup>2</sup>
Comprimento radicular	132,3 cm	142,5 cm
Índices topológicos		
Número de eixos principais	5,6	6,0
Número de raízes laterais por eixo principal	36,5	40,1
Número de raízes laterais por raiz principal	28,2	30,1
Distancia do ápice da raiz seminal e a primeira raiz lateral	0,4 cm	0,5 cm

\*Os valores dos parâmetros para ambas as variedades não apresentam diferenças significativas quando comparados pelo teste de Tukey a 5%.

#### 3.2. Tratamentos

Foi feita a combinação fatorial de 4 doses de Al (0, 40, 160 e 320  $\mu$ mol), 2 tempos de exposição ao Al (96 horas ou 4 dias e 360 horas ou 15 dias) e, 2

concentrações de nutrientes. As duas concentrações de nutrientes utilizadas foram obtidas a partir da solução de Furlani & Furlani (1988) modificada (Tabela 2), utilizando-se a concentração total recomendada (Força Iônica Total – FI) e ½ da concentração recomendada (½ FI), com o objetivo de simular diferentes condições de fertilidade. O Al foi adicionado na forma de  $\text{AlCl}_3$ , previamente preparado de acordo com as recomendações de Kinraide & Parker (1987), onde a quantidade Al necessária para a solução estoque foi diluída em  $\text{HCl}$   $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e ajustada a  $\text{pH } 4,0 \pm 0,1$  por adição de  $\text{KOH}$  ou  $\text{HCl}$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , para evitar a complexação e maximizar o efeito do Al, conforme especiações modeladas com o software GEOCHEM-PC.

As quantidade da solução estoque adicionadas para obtenção de cada dose constam na Tabela 2 (Capítulo I).

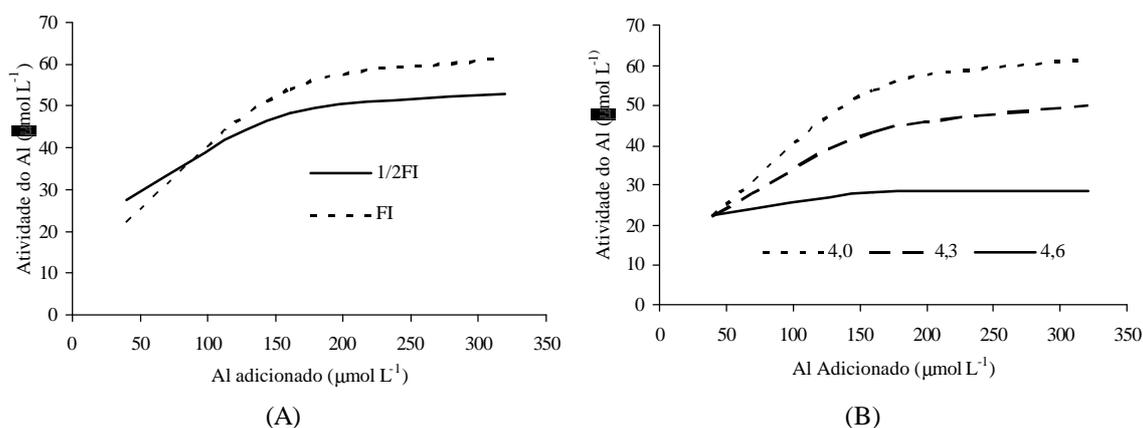


Figura 17. Atividade de Al livre em função do nível adicionado, em solução nutritiva de Furlani e Furlani Modificada, em concentração total e meio força iônica (A) e em função do pH (B).

### 3.3. Condução dos Experimentos

Os experimentos foram conduzidos seguindo-se o protocolo estabelecido no item 4.4 do Capítulo I, germinando-se 50 sementes, em areia lavada previamente autoclavada, por 10 dias, sendo então feita uma seleção visual das plantas mais uniformes quanto a raiz e parte aérea para serem submetidas aos tratamentos de baixo e alto nível de nutrientes e as três doses do Al.

### 3.4. Coleta dos Dados de Área Radicular, Comprimento Radicular e Número de Eixos Secundários

Seguiu-se o protocolo estabelecido no item 4.4 do Capítulo I, onde foi adicionado o processo de contagem manual dos ápices radiculares.

Para a proceder à contagem dos ápices radiculares, após a esqueletonização do sistema radicular, as imagens foram salvas no formato BMP pelo programa SIARCS. Em um programa de edição de imagens traçou-se uma grade com lados de dois cm, para facilitar a contagem.

As imagens eram impressas em folhas A4 e procedia-se a uma contagem manual do número de ápices esqueletonizados por célula. Para evitar-se erros, a contagem dos ápices foi feita nos sentidos vertical e horizontal. Se a soma do total das colunas não coincidissem com a soma do total das linhas, a contagem era refeita. A figura mostra o esquema utilizado para contagem do número de ápices. A contagem somente do ápice garantia a contagem da uma única vez.

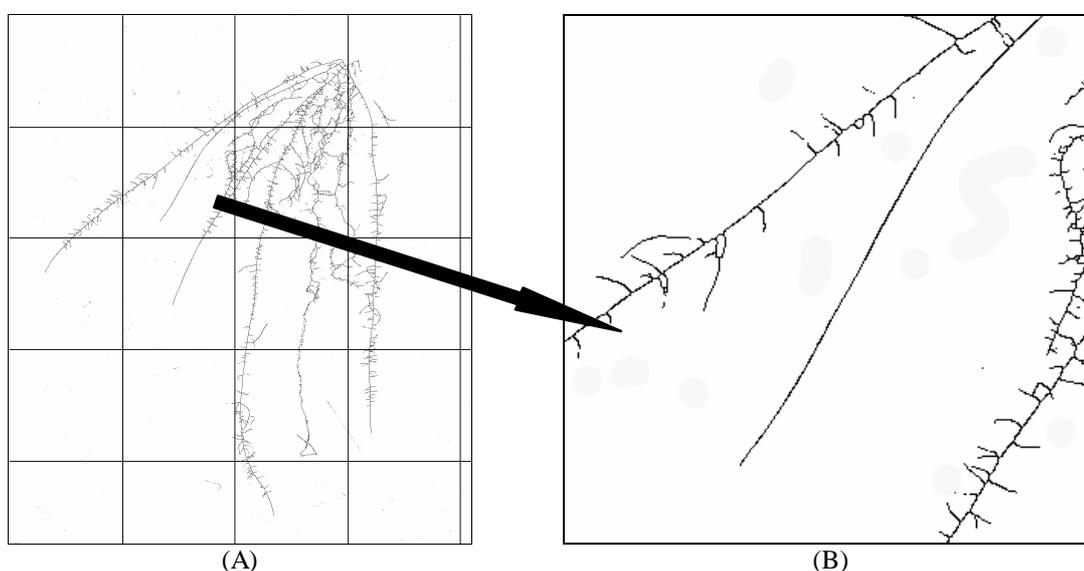


Figura 18. Imagem de raiz esqueletonizada da variedade Comum Branco submetida a 320  $\mu\text{mol}$  de Al. A) sistema radicular total (altura 142,4 mm e largura 128,3 mm) e, B) destaque de uma quadrícula (altura e largura de 30,0 mm).

O número de raízes primárias, através de contagem, foi obtido diretamente do monitor do computador, visto o pequeno número de raízes e devido ao pequeno desenvolvimento das plântulas. Dessa forma, a subtração do número total de ápices do número de raízes principais (NRP) resultava em número de raízes laterais (NRL).

Quando obtidos esses parâmetros, outras relações alométricas puderam ser calculadas. O comprimento médio das raízes principais (CMP) e o comprimento médio das raízes laterais (CML), foram calculados de acordo com as equações 1 e 2, respectivamente. A distância média entre raízes laterais no eixo principal (DMRL) foi obtida pela equação 3 e o número de raízes laterais por eixo principal (NRLP) pela equação 4.

$$CMP = CRP / NRP \quad (\text{Equação 1})$$

$$CML = CRL / NRL \quad (\text{Equação 2})$$

$$DMRL = NRL / CRP \quad (\text{Equação 3})$$

$$NRLP = NRL / NRP \quad (\text{Equação 4})$$

O raio médio radicular (RMR) foi calculado através da equação 5, considerando-se que as raízes um segmento cilíndrico uniforme.

$$RMR = \frac{ART}{2pCRT} \quad (\text{Equação 5})$$

As reduções relativas de todos os parâmetros avaliados foram calculadas a partir da equação da taxa de alongação relativa (Pintro *et al*, 1995), modificada:

$$RR_y = \frac{yAl_x}{yAl_0} 100 \quad (\text{Equação 6})$$

Onde,  $RR_y$  é a redução relativa do parâmetro,  $yAl_x$  é o valor absoluto do parâmetro em uma determinada dose de Al e  $yAl_0$  é o valor absoluto do parâmetro na dose 0 de Al.

Os dados foram testados para cada época independentemente, visto a grande heterogeneidade das variâncias.

Para avaliar o efeito das doses de Al e do nível de nutrição sobre as duas variedades, aplicou-se o seguinte modelo fatorial para cada tempo de exposição:

$$Y_{ijk} = m + F_i + A_j + C_k + FA_{ij} + FC_{ik} + AC_{jk} + FAC_{ijk} + \text{erro}(i,j,k) \quad (\text{Equação 7})$$

F = força iônica da solução (i = 1, 2); A = concentração do Al adicionado (j = 1, 2, 3, 4); T = variedades (k = 1, 2).

Para as variáveis independentes, força iônica (F) e Cultivares (C), as médias foram discriminadas pelo próprio teste F, e quando para concentração de Al e as demais interações, utilizou-se. O teste Tukey (P<0,05) foi empregado para a comparação das médias da concentração de Al e suas interações que apresentavam significância (P<0,05) na análise da variância.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Respostas ao Al Sobre Baixo Nível de Nutrientes

O tempo de exposição de quatro dias (4d) ao Al afetou significativamente ( $p < 0,05$ ) o desenvolvimento da área radicular total (ART) e o comprimento radicular total (CRT) das variedades de arroz de sequeiro Caiapó e Comum Branco, independente da concentração adicionada. A variedade Caiapó apresentou uma maior redução de ART (até 70%), quando comparada a variedade mais tolerante (Comum Branco), que apresentou uma redução máxima de 38% (Figura 19a).

No mesmo período de exposição, o CRT também foi reduzido significativamente em maior proporção na variedade Caiapó (Figura 19b), chegando a reduções de 72%, quando comparada com plantas não expostas ao Al. A variedade Comum Branco apresentou uma redução menos intensa, sendo no máximo 20% o que ocorreu quando as plantas foram expostas a 320  $\mu\text{mol}$  de Al.

Aos 15 dias de exposição ao Al, ambas variedades apresentaram significativa, porém menor redução de ART, quando estudado o efeito do Al (Figura 19c). Entre variedades, o parâmetro ART não mostrou diferença significativa. A ausência de diferença entre as variedades deveu-se em grande parte à uma retomada de crescimento da variedade Caiapó nesse período mais longo de exposição ao Al (15d), já que a redução relativa (RR) da ART foi menos intensa (Figura 19a e c).

As variedades apresentaram diferenças significativas no tocante ao CRT para as doses de 160 e 320  $\mu\text{mol}$  de Al e 15d de exposição ao Al. Para Caiapó foi verificada uma redução de até 19%, quando comparada com Comum Branco (Figura 19d).

Estes dados concordam com os de Vasconcelos *et al* (1996), onde, para a variedade Comum Branco, em soluções simples ou completas contendo Al, após curtos ou longos períodos de exposição esses efeitos também ocorreram, quando esta foi comparada com uma variedade sensível (IAC 899). Ramos (1998) encontrou os mesmos padrões de respostas, porém o autor contrastou a variedade Caiapó com a variedade IAC 1289, tendo aquela como padrão de tolerância e esta como padrão de sensível, encontrado valores semelhantes nos padrões de redução de comprimento radicular para a variedade IAC, com os de Vasconcelos (1996). Por outro lado, contrastando os dados de Ramos (1998) e Vasconcelos (1996), é possível observar uma superioridade de

tolerância de Comum Branco sobre Caiapó, em períodos curtos de exposição ao Al. A maior tempo de exposição (15d), os dados sugerem uma maior capacidade de aclimação da variedade Caiapó, quando comparado com Comum Branco. Esse efeito em Caiapó, sugere uma maior capacidade de aclimação à exposição externa ao Al, assim como os resultados encontrados para arroz por Costa de Macedo *et al*, (1997).

Zonta *et al* (2000), mostraram um efeito na variedade Comum Branco, independente de tempo de exposição e concentração do meio de cultivo, indicando que aparentemente existe uma resposta genética definida, induzida *per se* pela concentração externa de Al, concordando com o sugestionado por Foy *et al*, (1968).

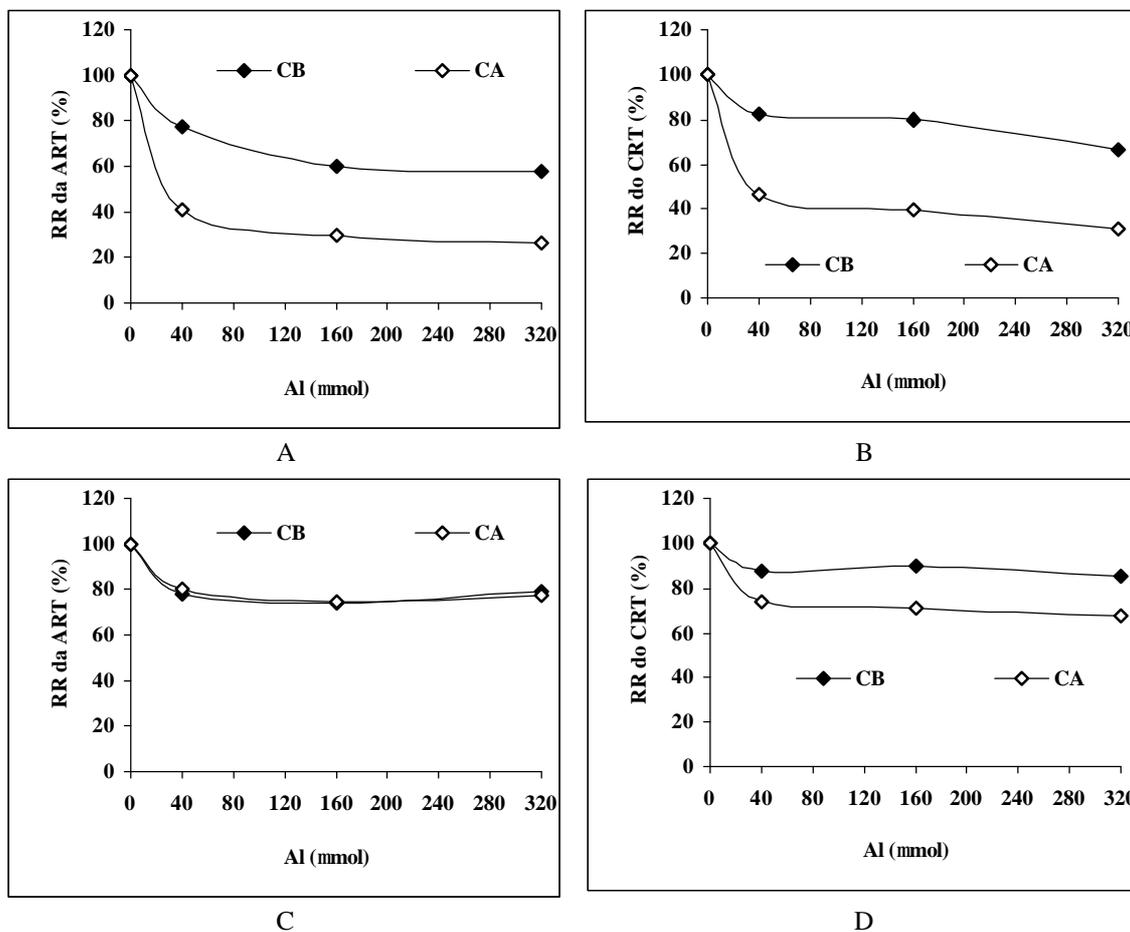


Figura 19. Reduções relativas de área radicular total (ART) e comprimento radicular total (CRT) nas variedades Comum Branco e Caiapó, quando submetidas a doses crescentes de Al e baixos níveis nutricionais, por períodos de 4 dias (A e B) e 15 dias (C e D).

#### 4.1.1. Período de 4 Dias de Exposição ao Al

O efeito da drástica redução da ART aos 4d de exposição ao Al na variedade Caiapó deveu-se à redução significativa ocorrida tanto na área das raízes laterais, quanto

nas raízes principais (Figura 20a). Neste período, a área das raízes principais foi 1,4 vezes maior do que a área das raízes laterais (Figura 20c) para a dose de 0  $\mu\text{mol}$  de Al e, e 2,3, 2,15 e 2,0 vezes maior quando submetidas às doses de 40, 160 e 320  $\mu\text{mol}$  de Al, respectivamente. O CRT também foi afetado de maneira semelhante, havendo uma redução significativa tanto nas raízes principais quanto nas laterais (Figura 20b). Inversamente à área, as raízes laterais foram o principal componente do sistema total (Figura 20d), representando 66,8% do CRT no tratamento 0  $\mu\text{mol}$  de Al. Essa contribuição do sistema radicular secundário, na redução do comprimento total, aumentou não significativamente, com a exposição ao Al, atingindo valores em torno de 70% para as plantas expostas ao Al.

Por outro lado, ao compararmos na variedade Caiapó, o comprimento média das raízes em função do Al adicionado, é possível visualizar um aumento na redução relativa do comprimento médio das raízes laterais (Figura 21a), mesmo que em valores absolutos estas sejam 21 vezes mais curtas que as raízes principais na dose 0  $\mu\text{mol}$  de Al e de 10 a 4 vezes mais curtas, para as demais doses de Al (Figura 21b). Mesmo essa magnitude não representou redução significativa em termos de comprimento absoluto das raízes laterais, diferenciando-se claramente das raízes principais, onde houve uma drástica redução (relativa e absoluta). Tal comportamento pode ser justificado pela redução da distância média das raízes laterais (DMRL) nos eixos principais (Tabela 10), demonstrando uma maior emissão de raízes laterais por eixo principal. Esse mesmo efeito foi descrito em café por Braccini *et al*, (1998). Mesmo que a redução na DMRL tenha sido expressiva, não foi suficiente para promover um aumento significativo do número de raízes laterais por eixo principal (NRLP; Tabela 10), que sofreu uma redução de 63,2% para a maior dose de Al. Paralela a esta redução também foi verificado um decréscimo no número total de raízes laterais (NRL). Em nenhum tratamento, o número de raízes principais foi afetado significativamente pela adição de qualquer dose de Al.

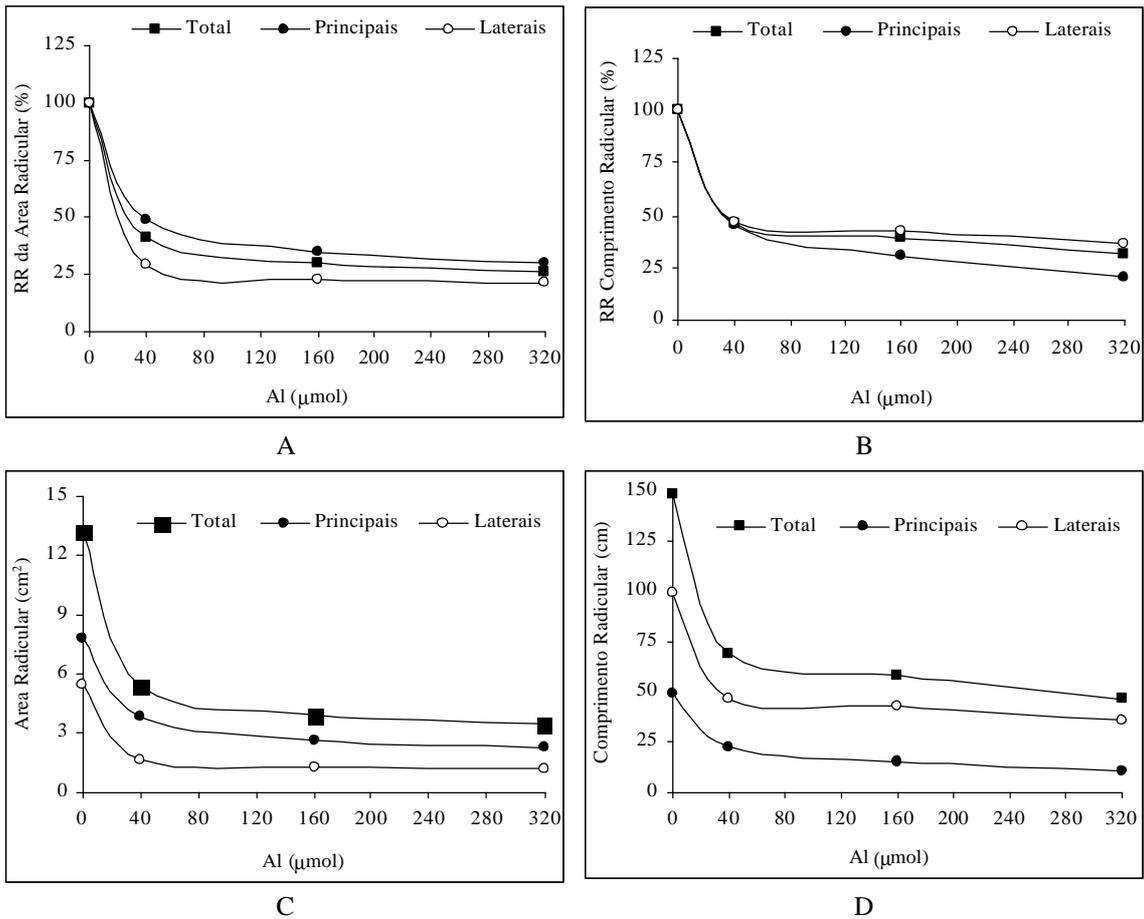


Figura 20. Reduções relativas de área (a) e comprimento radicular (b) das raízes principais e laterais, e, valores absolutos de área radicular (c) e comprimento (d), da variedade Caiapó, submetida a doses crescentes de Al e baixos níveis nutricionais, por 4 dias.

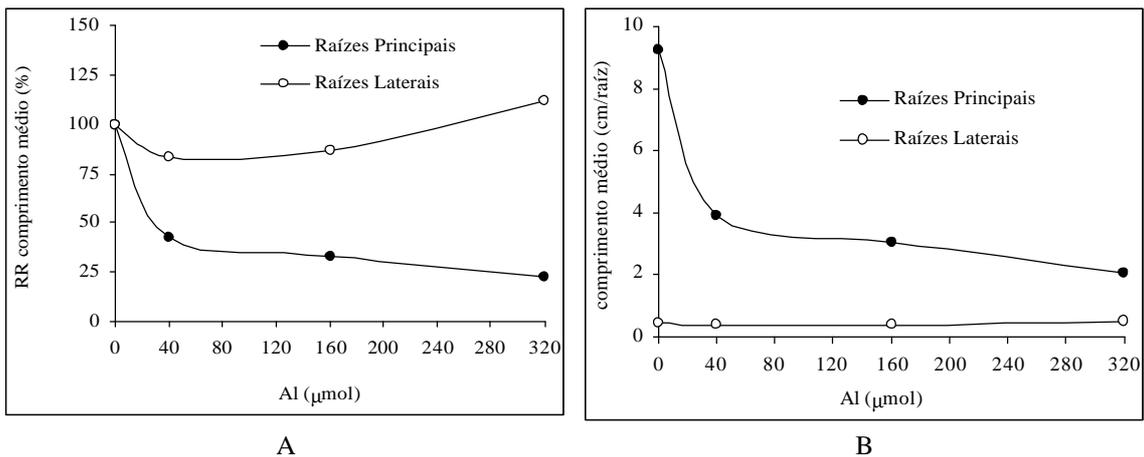


Figura 21. Redução relativa do comprimento radicular (a) das raízes principais e laterais, valores absolutos de comprimento (b), da variedade Caiapó, submetida a doses crescentes de Al e baixos níveis nutricionais, por 4 dias.

Tabela 10. Redução relativa e valores absolutos do número de raízes principais (NRP), número de raízes laterais (NRLP), na distância médias entre raízes laterais (DMRL) e no raio médio radicular da variedade Caiapó, submetida a doses crescentes de Al e baixos níveis nutricionais, por 4 dias.

Redução Relativa					
Al ( $\mu\text{mol}$ )	NRP	NRL	NRLP	DMRL	RMR
<b>0</b>	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
<b>40</b>	106,3	56,5	53,2	80,2	88,0
<b>160</b>	93,8	49,8	53,2	62,4	75,6
<b>320</b>	93,8	32,7	34,8	64,1	83,5
Valores absolutos					
Al ( $\mu\text{mol}$ )	NRP	NRL	NRLP	DMRL (cm)	RMR (cm)
<b>0</b>	5,3a	216a	40,6a	0,23a	0,0142a
<b>40</b>	5,7a	122b	21,6b	0,18b	0,0125a
<b>160</b>	5,0a	108b	20,3b	0,14b	0,0107a
<b>320</b>	5,0a	71c	14,1c	0,15b	0,0119a

Valores seguidos da mesma letra entre linha não diferem à 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Por sua vez, o raio médio radicular (RMR) da variedade Caiapó, apresentou uma redução também não significativa, contrariando todas as informação da literatura sobre este assunto, que destacam o efeito do Al no engrossamento do sistema radicular das plantas. Esse comportamento pode ser observado, quando são comparados somente os diâmetros das raízes principais. Ao aplicar-se a equação 5 à área e comprimento das raízes principais, pode-se observar um aumento gradual do raio médio das raízes principais da variedade Caiapó, proporcional as doses de Al aplicadas, de 0,25mm na dose 0  $\mu\text{mol}$  de Al para 0,35mm na dose 320  $\mu\text{mol}$  de Al. Observa-se também aumento do RMR, quando comparadas as variedades onde não há emissão de raízes laterais, conforme demonstrado por Vasconcelos *et al* (2002) em arroz, onde a variedade sensível praticamente não desenvolveu raízes laterais.

Na variedade Comum Branco, com um maior grau de tolerância ao Al, as reduções da área das raízes principais e laterais foram menos intensas (Figura 22a) quando comparadas com as ocorridas na variedade Caiapó (menos tolerante ao Al; Figura 20a) para o mesmo período (4d) de exposição ao Al. Os valores reais de área das raízes principais, também representaram maior parte do montante total (Figura 22c). Também para o comprimento das raízes principais e laterais teve menor redução (Figura 22b) quando comparados com os valores em Caiapó (Figura 20b). Assim como naquela

variedade, Comum Branco proporcionalmente, investiu mais carbono em comprimento das raízes laterais (Figura 22d).

O comprimento médio das raízes principais foi afetado significativamente pelo Al, com uma redução de 22 a 27%, para as doses de 0 e 320  $\mu\text{mol}$  de Al, respectivamente (

Figura 23a e

Figura 23b), enquanto o comprimento médio das raízes laterais teve um aumento significativo neste parâmetro para as doses de 160 e 320  $\mu\text{mol}$  de Al. Tal fato a diferenciou grandemente da variedade Caiapó, onde o efeito do Al, principalmente na raízes principais foi mais acentuado (Figura 21a).

A variedade Comum Branco, para o período de 4d de exposição ao Al, apresentou em média 1 eixo radicular principal a mais que a variedade Caiapó conforme pode ser comparado comparando-se os dados da Tabela 11 e Tabela 10.

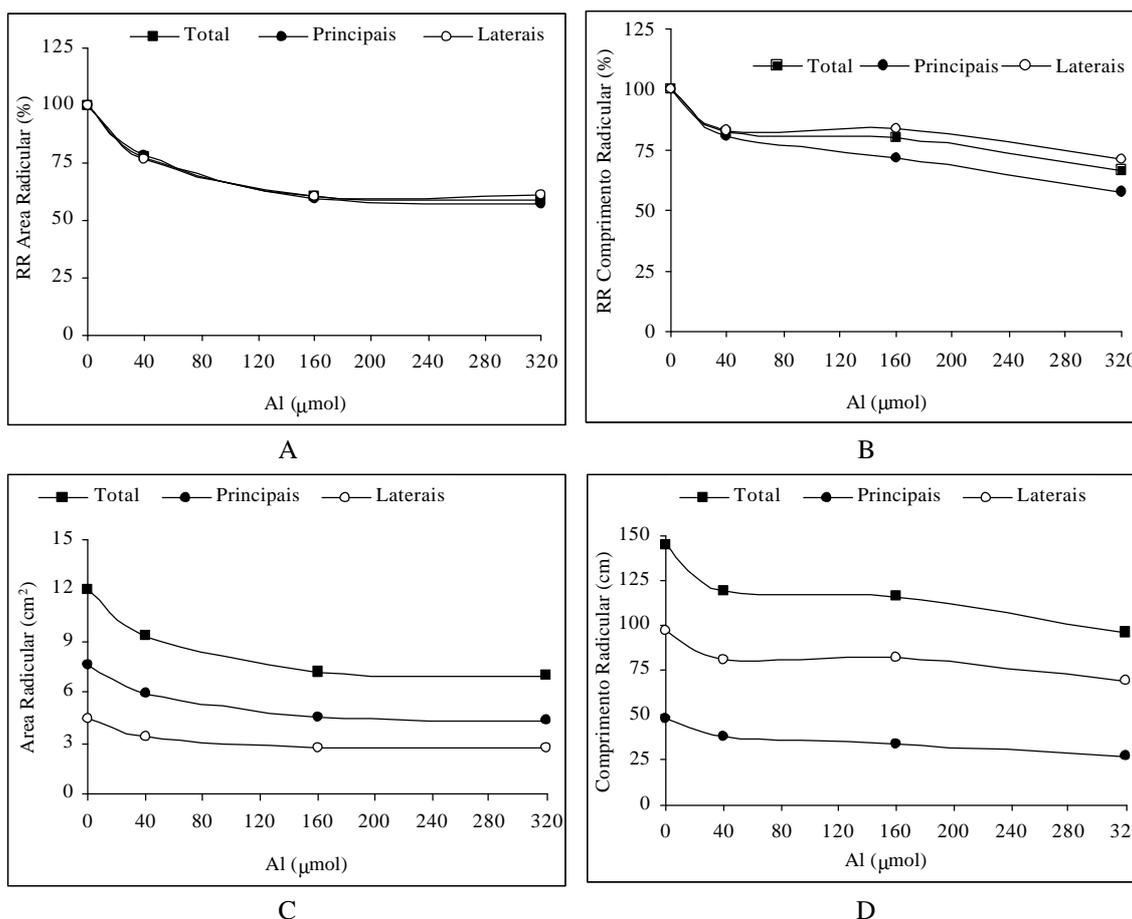


Figura 22. Reduções relativas de área (a) e comprimento radicular (b) das raízes principais e laterais, e, valores absolutos de área radicular (c) e comprimento (d), da variedade Comum Branco, submetida a doses crescentes de Al e baixos níveis nutricionais, por 4 dias.

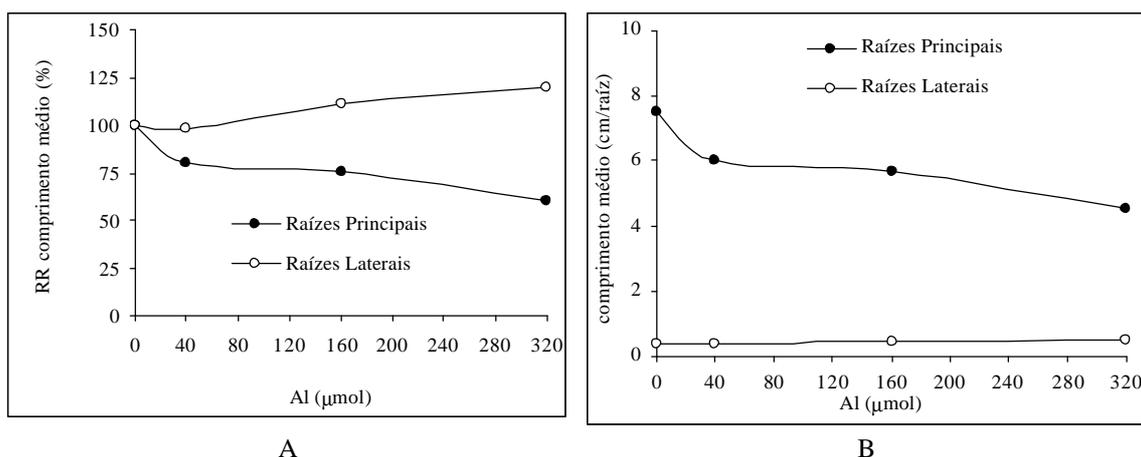


Figura 23. Redução relativa do comprimento radicular (a) das raízes principais e laterais, valores absolutos de comprimento (b), da variedade Comum Branco, submetida a doses crescentes de Al e baixos níveis nutricionais, por 4 dias.

Especificamente, o Al não alterou significativamente esse parâmetro na variedade Comum Branco (Tabela 11). Por outro lado, o número de raízes laterais e consequentemente o número de raízes laterais por eixo principal foi significativamente afetado, mas em menor intensidade que na variedade menos tolerante (Tabela 10).

Tabela 11. Redução relativa do número de raízes principais (NRP), número de raízes laterais (NRLP), na distância médias entre raízes laterais (DMRL) e no raio médio radicular da variedade Comum Branco, submetida a doses crescentes de Al e baixos níveis nutricionais, por 4 dias.

Reduções Relativas					
Al (μmol)	NRP	NRL	NRLP	DMRL	RMR
<b>0</b>	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
<b>40</b>	100,0	85,0	85,0	94,7	94,0
<b>160</b>	94,7	75,6	79,8	95,0	74,9
<b>320</b>	94,7	59,5	62,8	96,4	87,6
Valores Absolutos					
Al (μmol)	NRP	NRL	NRLP	DMRL (cm)	RMR (cm)
<b>0</b>	6,3a	238a	37,5a	0,20a	0,0132a
<b>40</b>	6,3a	202b	31,9b	0,19a	0,0124a
<b>160</b>	6,0a	180b	29,9b	0,19a	0,0099a
<b>320</b>	6,0a	141c	23,6c	0,19a	0,0116a

Valores seguidos da mesma letra entre linha não diferem à 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Para ambos as variedades, a relação alométrica - distancia média das raízes laterais nos eixos principais (DMRL) - não foi afetada significativamente (Tabela 11), a despeito do ocorrido com a variedade Caiapó no mesmo período. Tal fato deve-se a menor intensidade na redução do número de raízes laterais, o que não alterou o raio médio radicular, quando estudado o efeito do Al, assim como ocorrido com o raio médio das raízes principais, que apresentaram valores médios de 0,23 mm, quando as expostas ou não ao Al. Estes dados concordam com os indicados por Harada & Yamasaki (1993) para a cultura do arroz, sob condições de ausência de estresses.

#### **4.1.2. Período de 15 Dias de Exposição ao Al**

Aos 15 dias (15d) de exposição ao Al foi também observada uma redução significativa da área radicular total (ART; Figura 19c) da variedade Caiapó, porém não diferindo da variedade Comum Branco. Esse comportamento é decorrente da menor redução relativa tanto da área das raízes principais, como das raízes laterais (Figura 24a). Uma possível explicação para a não existência de diferenças pode estar relacionada a uma “aclimação” ao Al, que pode ter ocorrido quando a variedade foi submetida a um período maior de exposição ao Al. Para o período, destaca-se também um aumento significativo da área das raízes laterais sobre a área das principais (Figura 24b).

Com relação ao comprimento radicular total da variedade Caiapó, comparando-se o efeito do Al, observa-se uma redução significativa, duas vezes menor nas raízes laterais, nas doses de 160 e 320  $\mu\text{mol}$  de Al (Figura 24b). O comprimento médio destas raízes estabilizou-se em torno de 400  $\mu\text{m}$  (Figura 24d). Esse aumento foi decorrente da estimulação na elongação das raízes laterais, o que pode ser observado pelo aumento significativo do seu comprimento médio (Figura 25a), enquanto que nas raízes principais, os valores decaíram com a exposição ao Al, estabilizando-se na dose de 160  $\mu\text{mol}$  de Al, com 11  $\mu\text{m}$  de comprimento médio (Figura 25b).

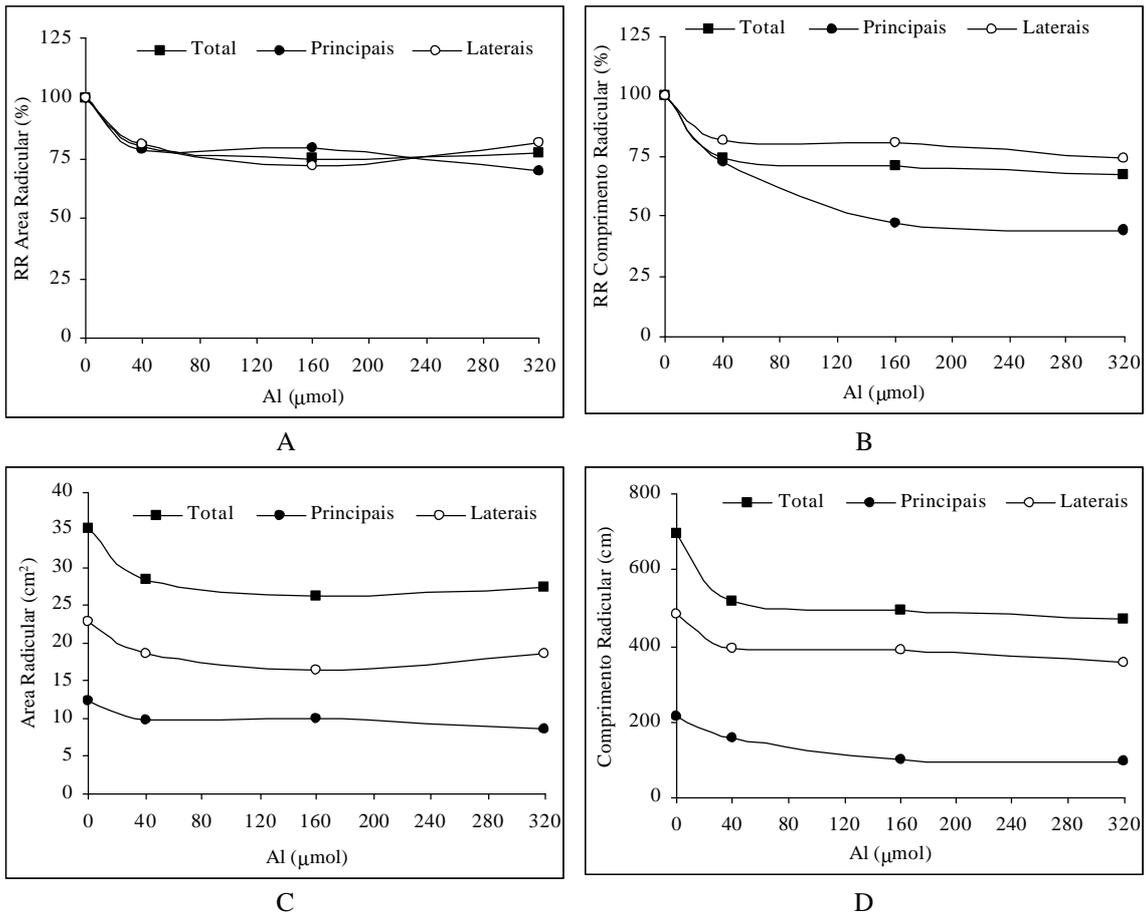


Figura 24. Reduções relativas de área (a) e comprimento radicular (b) das raízes principais e laterais, e, valores absolutos de área radicular (c) e comprimento (d), da variedade Caiapó, submetida a doses crescentes de Al e baixos níveis nutricionais, por 15 dias.

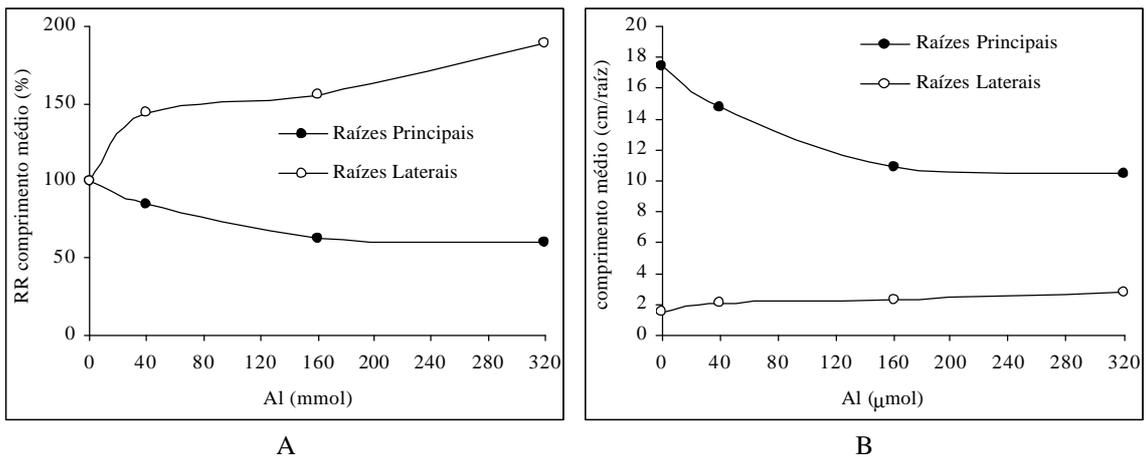


Figura 25. Redução relativa do comprimento radicular (a) das raízes principais e laterais, valores absolutos de comprimento (b), da variedade Caiapó, submetida a doses crescentes de Al e baixos níveis nutricionais, por 15 dias.

Para o maior período de exposição ao Al, o número de eixos radiculares principais da variedade Caiapó, foi afetado significativamente para todas as doses de Al (Tabela 12). Ao se comparar a dose 0 com a dose 320  $\mu\text{mol}$  de Al, observar-se uma redução de 2,3 eixos por planta, essa característica não havia sido constatada no período mais curto de exposição ao Al, demonstrando que o período de 4 dias foi insuficiente para que essa diferença se tornasse evidente.

O número de raízes laterais também foi afetado significativamente (Tabela 12), bem como o número de raízes laterais por eixo principal. A distância média das raízes laterais nos eixos principais não foi alterada quando estudado o efeito da exposição ao Al, porém esta distância foi maior quando comparada com o período de 4d de exposição (Tabela 10 e Tabela 12, respectivamente), demonstrando uma maior velocidade média da elongação radicular sobre a emissão de raízes laterais na variedade Caiapó, quando exposta a um período mais prolongado ao Al. Lorbiecke & Sauter (1999) alertaram para necessidade de estudos a mais longo prazo, pois, as informações disponíveis sobre processos de diferenciação nodal e lateral e de indução de raízes adventícias, é relativamente escassa, e os mecanismos de expressão gênica que os controlam estão começando a serem elucidados.

Tabela 12. Redução relativa do número de raízes principais (NRP), número de raízes laterais (NRLP), na distância médias entre raízes laterais (DMRL) e no raio médio radicular da variedade Caiapó, submetida a doses crescentes de Al e baixos níveis nutricionais, de Al por 15 dias.

Reduções Relativas					
Al ( $\mu\text{mol}$ )	NRP	NRL	NRLP	DMRL (cm)	RMR (cm)
<b>0</b>	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
<b>40</b>	86,2	56,5	65,6	129,1	108,3
<b>160</b>	75,6	51,8	68,5	91,6	105,3
<b>320</b>	73,2	39,2	53,6	112,3	115,0
Valores Absolutos					
Al ( $\mu\text{mol}$ )	NRP	NRL	NRLP	DMRL (cm)	RMR (cm)
<b>0</b>	12,3a	325a	26,4a	0,66a	0,0081a
<b>40</b>	10,6b	183b	17,3b	0,85a	0,0088a
<b>160</b>	9,3b	168b	18,1b	0,60a	0,0085a
<b>320</b>	9,0b	127b	14,1b	0,74a	0,0093a

Valores seguidos da mesma letra entre linhas não diferem à 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O raio médio radicular, não foi afetado significativamente pela adição de Al (Tabela 12), porém foram inferiores quando comparados com o menor tempo de

exposição ao Al (Tabela 10). A redução do raio médio radicular deve-se à um aumento proporcional maior no comprimento radicular total do que na área radicular total, visto a alta taxa de emissão de raízes laterais no período. Já o raio médio das raízes principais, sofreu aumento significativo, passando de 0,093 mm para 0,145 mm nas duas maiores doses de Al, ou seja, representando um aumento de quase 60%.

A variedade Comum Branco apresentou um comportamento distinto quando comparado com a Caiapó para o período de 15 dias. Houve redução significativa na área das raízes laterais na concentração de 40  $\mu\text{mol}$  de Al, quando essa média foi contrastada com 0  $\mu\text{mol}$  de Al (Figura 26a), e, para as doses de 160 e 320  $\mu\text{mol}$  de Al houve um aumento gradual de área das raízes laterais, porém estes não foram significativos (Figura 26b), o que a distinguiu da Caiapó (Figura 25a e Figura 25c).

O comprimento radicular seguiu a mesma tendência da área radicular, com redução significativa do comprimento das raízes principais nas doses de 160 e 320  $\mu\text{mol}$  de Al e um aumento não significativo de comprimento das raízes laterais para as mesmas doses, quando comparadas com as doses de 0 e 40  $\mu\text{mol}$  de Al (Figura 25b e d).

A redução no comprimento médio radicular tanto das raízes principais, com nas laterais, foi significativo apenas na concentração de 160  $\mu\text{mol}$  de Al (Figura 27a e b), ocasionada pelo decréscimo do valor absoluto do comprimento das raízes principais nesta concentração de Al.

Os demais parâmetros radiculares apresentados na Tabela 13, não apresentaram diferenças significativas entre si em função da exposição ao Al. Destacam-se *per se*, quando comparados ao valores apresentados pela variedade Caiapó para o mesmo período, devido ao Al não ter ocasionado redução do número de raízes principais e laterais. Apresentaram também, quando comparado com a variedade mais sensível, uma menor distância entre as raízes laterais nos eixos principais, devido ao grande número de raízes laterais contabilizadas nesta variedade, mesmo que o número de raízes principais tenha sido superior.

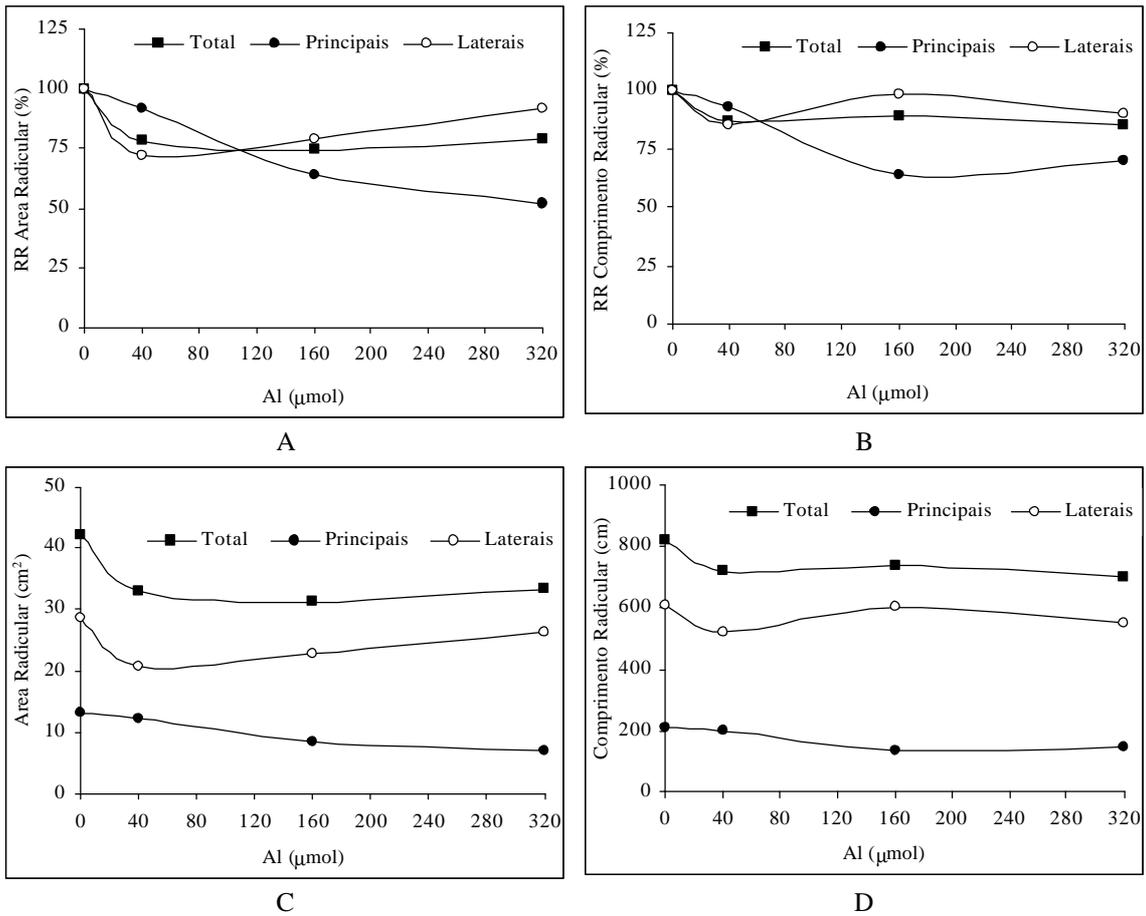


Figura 26. Reduções relativas de área (a) e comprimento radicular (b) das raízes principais e laterais, e, valores absolutos de área radicular (c) e comprimento (d), da variedade Comum Branco, submetida a doses crescentes de Al e baixos níveis nutricionais, por 15 dias.

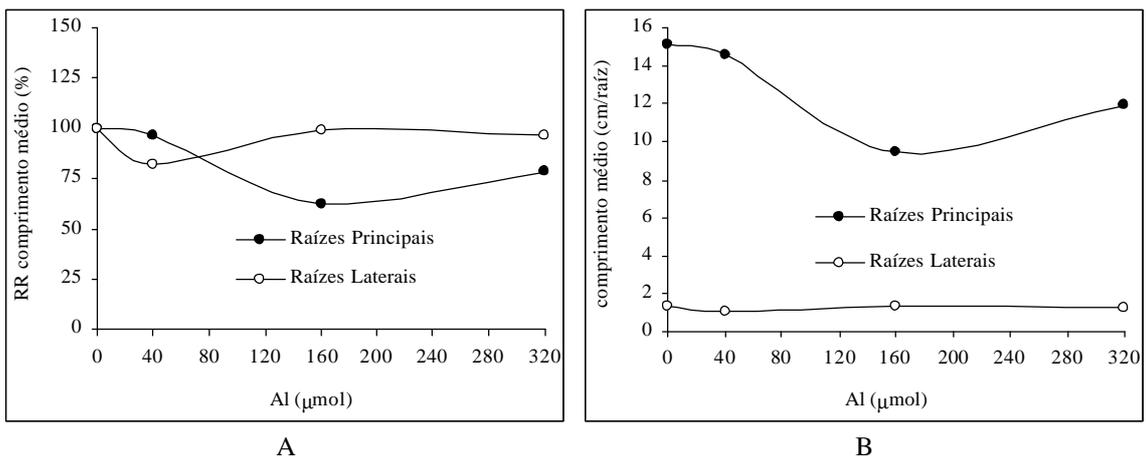


Figura 27. Redução relativa do comprimento radicular (a) das raízes principais e laterais, valores absolutos de comprimento (b), da variedade Comum Branco, submetida a doses crescentes de Al e baixos níveis nutricionais, por 15 dias.

Tabela 13. Redução relativa e valores absolutos do número de raízes principais (NRP), número de raízes laterais (NRLP), na distância médias entre raízes laterais (DMRL) e no raio médio radicular da variedade Comum Branco, submetida a doses crescentes de Al e baixos níveis nutricionais, por 15 dias.

Reduções Relativas					
Al ( $\mu\text{mol}$ )	NRP	NRL	NRLP	DMRL	RMR
<b>0</b>	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
<b>40</b>	106,3	56,5	54,4	71,8	89,6
<b>160</b>	93,8	49,8	52,8	72,2	82,7
<b>320</b>	93,8	32,7	34,6	69,5	92,7
Valores Absolutos					
Al ( $\mu\text{mol}$ )	NRP	NRL	NRLP	DMRL (cm)	RMR (cm)
<b>0</b>	14,0a	469a	33,5a	0,45a	0,0082a
<b>40</b>	13,6a	489a	36,0a	0,40a	0,0073a
<b>160</b>	14,3a	465a	32,5a	0,29a	0,0067a
<b>320</b>	12,5a	439a	35,1a	0,34a	0,0076a

Valores seguidos da mesma letra entre linhas não diferem a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

#### 4.2. Respostas ao Al Sobre Alto Nível de Nutrientes

A exposição de 4 dias (4d) ao Al, sob altos níveis nutricionais, afetou significativamente ( $p < 0,05$ ) a área radicular total (ART) e o comprimento radicular total (CRT) nas variedades de arroz de sequeiro Caiapó e Comum Branco independente da concentração adicionada. A variedade Caiapó apresentou a maior e mais intensa redução de ART, inclusive na dose de 40  $\mu\text{mol}$  de Al (50% de redução relativa), quando comparada com a variedade Comum Branco, que apresentou uma redução gradual com o aumento dos níveis de Al no meio (Figura 28a), atingido o máximo de redução, 37%, na maior dose de Al.

No mesmo período de exposição, a redução mais expressiva do CRT foi verificada na variedade Caiapó (Figura 28b). Estas reduções, em torno de 71%, foram próximas as encontrada para  $\frac{1}{2}\text{FI}$ , quando comparada com plantas não expostas ao Al. Quanto a variedade Comum Branco, a redução máxima, de 31%, aconteceu no maior nível de Al (320  $\mu\text{mol}$  de Al). Por outro lado, para a dose 40  $\mu\text{mol}$  de Al a variedade Caiapó reduziu o CRT em 49%, enquanto a Comum Branco teve uma aumento de 4% em seu crescimento radicular, evidenciando um pequeno estímulo (mesmo que não

significativo nas condições experimentais vigentes) do Al ao desenvolvimento do sistema radicular.

É freqüente a observação que a adição de Al na solução, resulta não em inibição mas em estimulação da taxa de alongação radicular. Tais respostas estimulatórias, ocorrem geralmente a níveis considerados sub-tóxicos para as diferentes espécies (em trigo: Parker, 1995, Samuels *et al*, 1997, em milho: Lugany *et al*, 1995; em sorgo: Baligar *et al*, 1993, em arroz de sequeiro: Mendonça, 1991; Mendonça *et al*, 1991a e b; Vicente *et al*, 1998a; Vasconcelos *et al*, 2002), e tem sido observadas tanto em genótipos sensíveis quanto tolerantes, mas a freqüência e persistência do efeito parece ser maior nestes últimos, tal como observado em arroz por Howeler & Cadavid (1976), Fageria *et al* (1989) e Vicente *et al* (1998b).

Os mecanismos propostos para explicar estes efeitos estimulatórios sobre o crescimento radicular, incluem, entre outros, na maior eficiência da absorção de Fe e P, alterações na distribuição de reguladores de crescimento; prevenção de toxidez de Fe e Mg e redução de eletronegatividade apoplástica, facilitando a difusão de anions (Fernandes *et al*, 1984; Fageria *et al*, 1988, Fageria *et al*, 1989, Fernandes & Rossiello, 1995). Em todos os trabalhos mencionados, verifica-se que estas respostas foram obtidas após vários dias de exposição das plantas, a baixos níveis de Al, em soluções nutritivas completas. Portanto, os efeitos do Al sobre a absorção de nutrientes podem ser expressão de efeitos crônicos, operando na escala de dias ou semanas.

Com 15 dias de exposição ao Al, a ART das variedades não apresentou diferença significativa (Figura 28c). Comum Branco teve uma variação máxima de 4% de redução, enquanto que Caiapó teve na dose 40  $\mu\text{mol}$  de Al, um aumento de 15% em ART.

O CRT das variedades também não foi afetado significativamente pelo Al quando as plantas foram expostas por 15 dias ao elemento, chegando no máximo a 23% de redução para a variedade Comum Branco e 15% para a variedade Caiapó (Figura 28c).

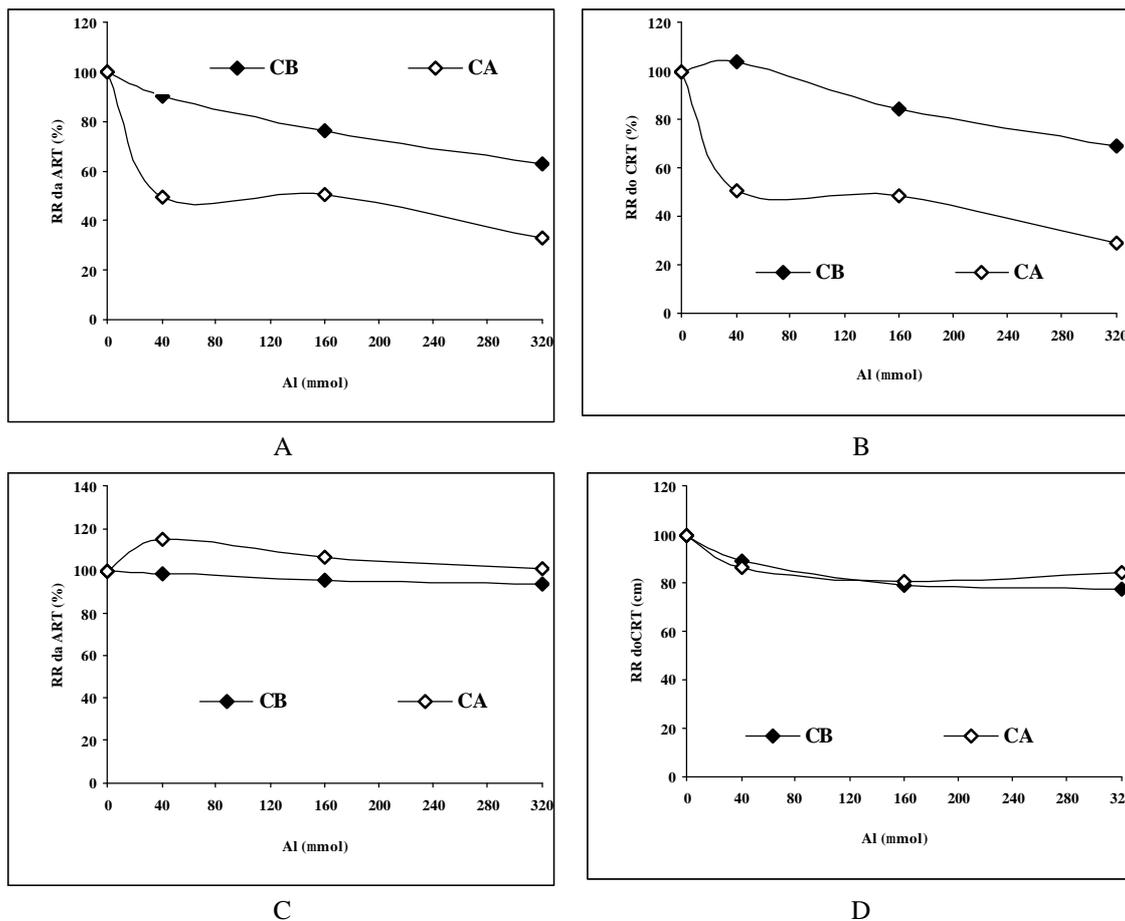


Figura 28. Reduções relativas de área radicular total (ART) e comprimento radicular total (CRT) nas variedades Comum Branco e Caiapó, quando submetidas a doses crescentes de Al e altos níveis nutricionais, por períodos de 4 dias (A e B) e 15 dias (C e D).

#### 4.2.1. Período de 4 Dias de Exposição ao Al

O efeito do Al na área das raízes principais e laterais em função da exposição no período de 4 dias em condições de altos níveis nutricionais foi semelhante (Figura 29a e c) a quando as plantas foram expostas pelo mesmo período sob menor nível nutricional (Figura 20a e c). Em especial, no maior nível de Al (320  $\mu\text{mol}$  de Al) houve uma redução significativa na área das raízes principais, o que propiciou uma maior redução relativa da ART, comparativamente aos demais níveis de Al.

Para o comprimento também foram observadas reduções semelhantes que sob menor nível nutricional e podem ser observados na Figura 29b. A soma da redução não significativa do comprimento das raízes principais e laterais, levaram a uma redução de 33,4 cm do comprimento total, valor que distinguiu o nível 320  $\mu\text{mol}$  de Al dos outros dois menores níveis (Figura 29d).

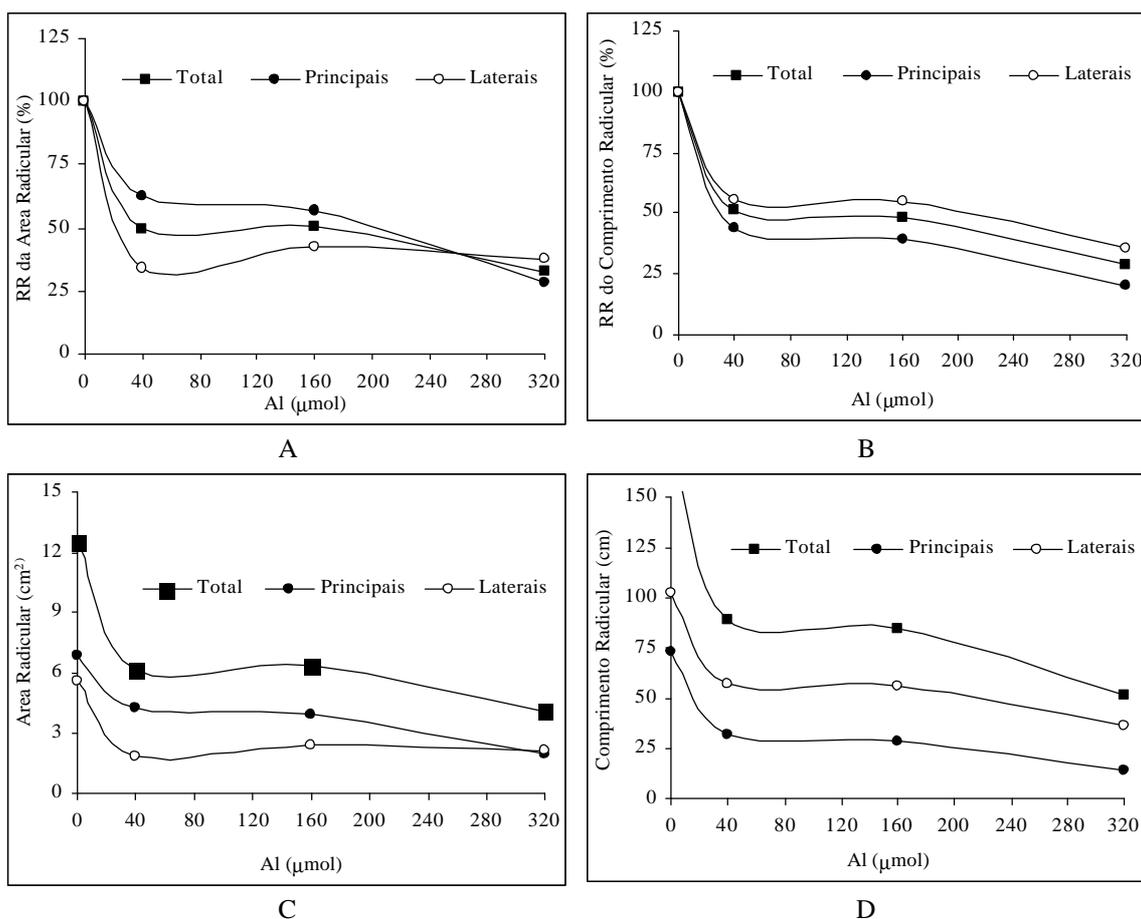


Figura 29. Reduções relativas de área (a) e comprimento radicular (b) das raízes principais e laterais, e, valores absolutos de área radicular (c) e comprimento (d), da variedade Caiapó, submetida a doses crescentes de Al e altos níveis nutricionais, por 4 dias.

Na Figura 30a pode ser observada a redução relativa do comprimento médio das raízes principais e laterais da variedade Caiapó, sendo constatadas reduções de até 75% do comprimento das raízes principais, acompanhando os valores encontrados quando a variedade foi desenvolvida na presença de Al e baixos níveis de nutrientes. Já o comprimento médio das raízes laterais manteve-se na média de 0,49 cm, sem alterações significativas quando as raízes foram expostas ao Al. Essa classe de raízes, quando expostas ao Al em baixa concentração de nutrientes, teve uma pequena redução nas doses mais baixas de Al, retomando seu crescimento na maior concentração de Al. Essa característica diferencia a variedade quanto ao seu grau de tolerância ao Al, quando submetida a baixo e alto nível de nutrientes. No alto nível nutricional, as raízes laterais ou de menor diâmetro como um todo, apresentaram-se menos prejudicadas do que no caso conjunto de estresse mineral e Al. Tal fato deve-se a uma redução significativa da distância das raízes laterais nos eixos principais (Tabela 14), que passou de 0,29 cm

para 0,16 cm no maior nível de Al, embora o número de raízes laterais por raiz principal tenha sido reduzido de forma gradual e significativa.

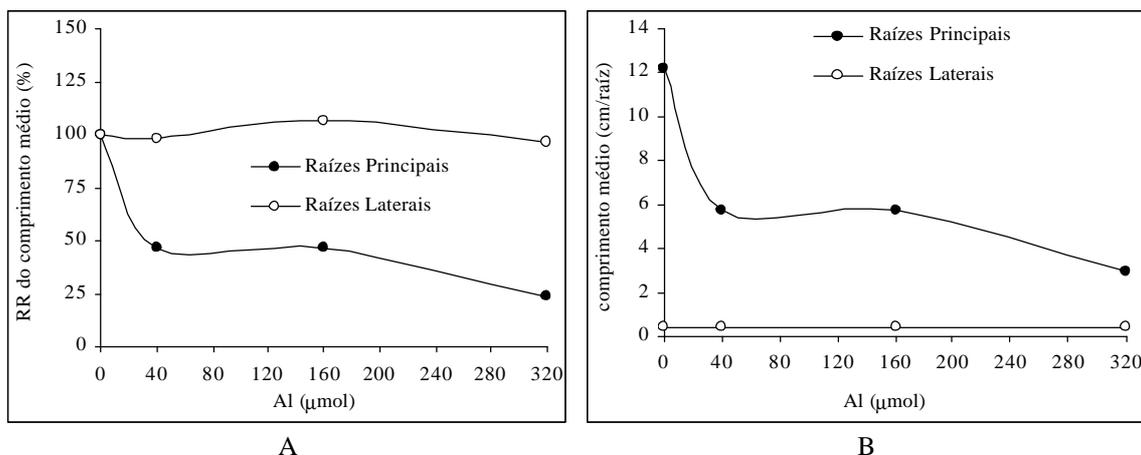


Figura 30. Redução relativa do comprimento radicular (a) das raízes principais e laterais, valores absolutos de comprimento (b), da variedade Caiapó, submetida a doses crescentes de Al e altos níveis nutricionais, por 4 dias.

Tabela 14. Redução relativa e valores absolutos do número de raízes principais (NRP), número de raízes laterais (NRLP), na distância médias entre raízes laterais (DMRL) e no raio médio radicular da variedade Caiapó, submetida a doses crescentes de Al e altos níveis nutricionais, por 4 dias.

Redução Relativa					
Al (μmol)	NRP	NRL	NRLP	DMRL	RMR
0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
40	93,3	56,5	60,6	77,3	97,8
160	83,3	51,1	61,4	76,4	104,7
320	83,3	36,9	44,3	54,0	112,3
Valor absoluto					
Al (μmol)	NRP	NRL	NRLP	DMRL (cm)	RMR (cm)
0	6,0a	249a	41,5a	0,29a	0,0113a
40	5,6a	141b	25,1b	0,23b	0,0110a
160	5,0a	127b	25,4b	0,22b	0,0118a
320	5,0a	92b	18,4c	0,16c	0,0127a

Valores seguidos da mesma letra entre linhas não diferem à 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O número de raízes principais manteve-se inalterado (Tabela 14), mesmo que em média, sob o nível 0 de Al, essas plantas apresentassem um eixo radicular principal a mais do que quando expostas ao Al.

O raio médio radicular também não foi significativamente alterado pela exposição ao Al (Tabela 14), porém, como quando comparam-se os diâmetros das raízes

principais, é possível notar um aumento significativo do raio médio (44%), passando de 0,15 mm quando expostas ao nível 0, para 0,22 mm na dose de 320  $\mu\text{mol}$  de Al.

Na variedade Comum Branco, para o período de exposição ao Al de 4d em condições de alto suprimento de nutriente, os dados mostraram um comportamento diferenciado do que quando esta foi exposta neste mesmo período, em baixo suprimento de nutrientes. Mesmo havendo redução de ART sob o mais alto nível de Al, as plantas apresentam na dose de 40  $\mu\text{mol}$  de Al, um aumento da área das raízes principais, e um decréscimo da ART das raízes laterais (Figura 31a e Figura 31c), que se igualaram por ocasião da adição de 160  $\mu\text{mol}$  de Al em termos de RR. Por outro lado, com 320  $\mu\text{mol}$  de Al, Comum Branco apresentou um comportamento totalmente diferenciado e inverso, onde houve uma retomada de área das raízes laterais e redução da área das raízes principais. Comportamento semelhante foi observado para a variedade aos 15d, sob baixos níveis nutricionais (Figura 26a e Figura 26c), onde a área das raízes principais representou porém um montante menor que o caso em tela.

Por sua vez, o comprimento das raízes principais foi alterado significativamente apenas entre as doses 40 e 320  $\mu\text{mol}$  de Al, com um aumento de 3,6% e redução de 31%, respectivamente (Figura 31b). O comprimento das raízes laterais não foi significativamente alterado. Em decorrência deste aumento e/ou redução significativa da área das raízes principais, os valores médios dos eixos radiculares principais tenderam a apresentar valores absolutos maiores no nível 40  $\mu\text{mol}$  de Al e menores no nível 320  $\mu\text{mol}$  de Al, respectivamente de 10,47 cm e 6,52 cm (Figura 31d).

Quanto à elongação radicular principal, houve variações significativas na distância média das raízes laterais nos eixos principais, onde, no nível de 40  $\mu\text{mol}$  de Al, a maior distância (0,31cm) resultou em aumento de 11% do parâmetro e no nível de 320  $\mu\text{mol}$  de Al, foi registrada uma redução de 40,7% de distância entre raízes laterais (Tabela 15).

Os demais parâmetros, com número de raízes principais, laterais, laterais por eixos principal e até mesmo raio médio radicular e raio médio das raízes principais não sofreram alterações significativas em função das doses crescentes de Al (Tabela 15).

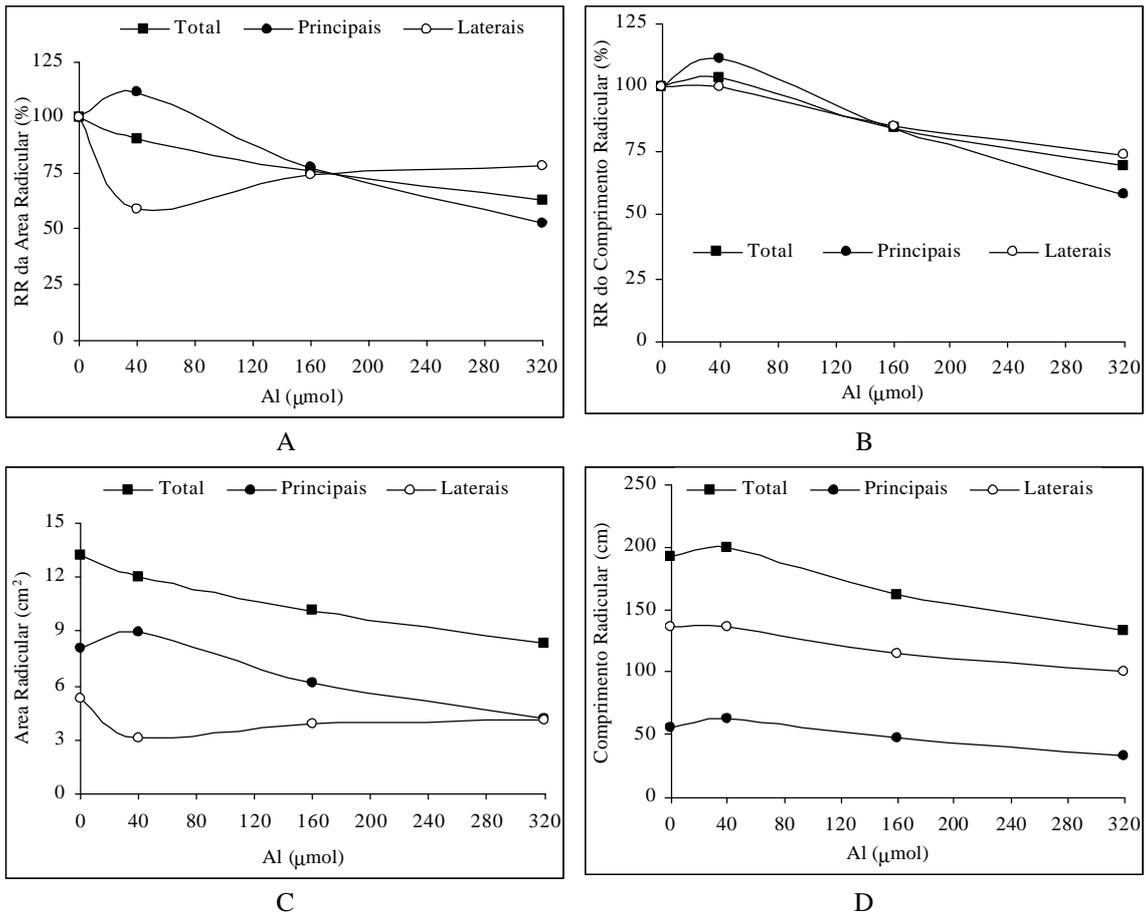


Figura 31. Reduções relativas de área (a) e comprimento radicular (b) das raízes principais e laterais, e, valores absolutos de área radicular (c) e comprimento (d), da variedade Comum Branco, submetida a doses crescentes de Al e altos níveis nutricionais, por 4 dias.

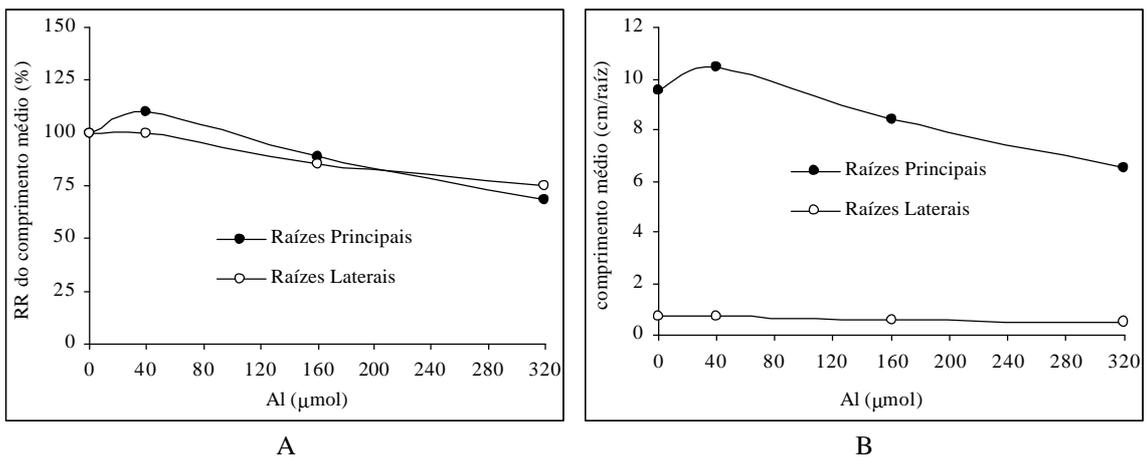


Figura 32. Redução relativa do comprimento radicular (a) das raízes principais e laterais, valores absolutos de comprimento (b), da variedade Comum Branco, submetida a doses crescentes de Al e altos níveis nutricionais, por 4 dias.

Tabela 15. Redução relativa e valores absolutos do número de raízes principais (NRP), número de raízes laterais (NRLP), na distância médias entre raízes laterais (DMRL) e no raio médio radicular da variedade Comum Branco, submetida a doses crescentes de Al e altos níveis nutricionais, por 4 dias.

Redução relativa					
Al ( $\mu\text{mol}$ )	NRP	NRL	NRLP	DMRL	RMR
<b>0</b>	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
<b>40</b>	101,7	100,6	99,0	111,1	87,4
<b>160</b>	94,9	99,0	104,3	84,6	90,4
<b>320</b>	84,7	97,9	115,5	59,3	90,7
Valores Absolutos					
Al ( $\mu\text{mol}$ )	NRP	NRL	NRLP	DMRL (cm)	RMR (cm)
<b>0</b>	5,9a	200a	33,9a	0,28ab	0,0110a
<b>40</b>	6,0a	202a	33,6a	0,31a	0,0096a
<b>160</b>	5,6a	198a	35,4a	0,24b	0,0099a
<b>320</b>	5,0a	196a	39,2a	0,17c	0,0099a

#### 4.2.2. Período de 15 Dias de Exposição ao Al

Como visto na Figura 28c, a variedade Caiapó foi a que apresentou maior ART quando submetida ao Al. Essa diferenciação deveu-se ao efeito do Al na área das raízes laterais prioritariamente (Figura 33a e Figura 33c), que aumentaram significativamente mais do que as raízes principais, nas doses de 40 e 160  $\mu\text{mol}$  de Al. Esse efeito foi capaz de diferenciar a variedade quando se comparada com o mesmo período de exposição ao Al sob baixo nível nutricional (Figura 24a e Figura 24c), quando a área das raízes principais e laterais apresentaram reduções significativas.

Houve redução de CRT, em decorrência da redução intensa das raízes principais como também em menor grau das laterais (Figura 33b e Figura 33d). Quanto a este parâmetro, a variedade Caiapó diferenciou-se a Comum Branco, por esta, não ter apresentado redução no CRT (Figura 24b e Figura 24d).

Sob altos níveis nutricionais, a variedade Caiapó, apresentou maior comprimento médio das raízes principais, quando comparada com os mesmo período sob baixo nível nutricional (Figura 34a e Figura 34b). Apenas no nível de 40  $\mu\text{mol}$  de Al, o comprimento médio das raízes laterais apresentou uma pequena redução, que foi retomada nos níveis maiores de Al.

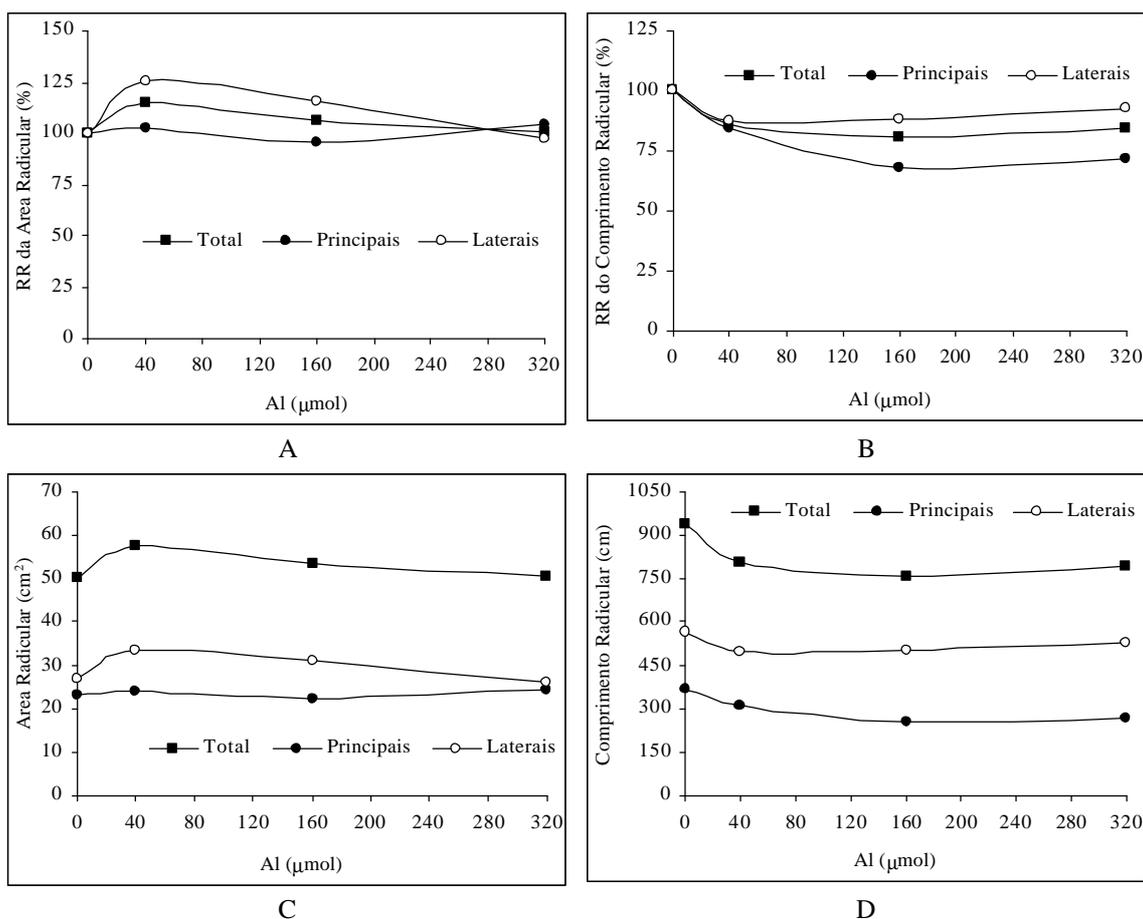


Figura 33. Reduções relativas de área (a) e comprimento radicular (b) das raízes principais e laterais, e, valores absolutos de área radicular (c) e comprimento (d), da variedade Caiapó, submetida a doses crescentes de Al e altos níveis nutricionais, por 15 dias.

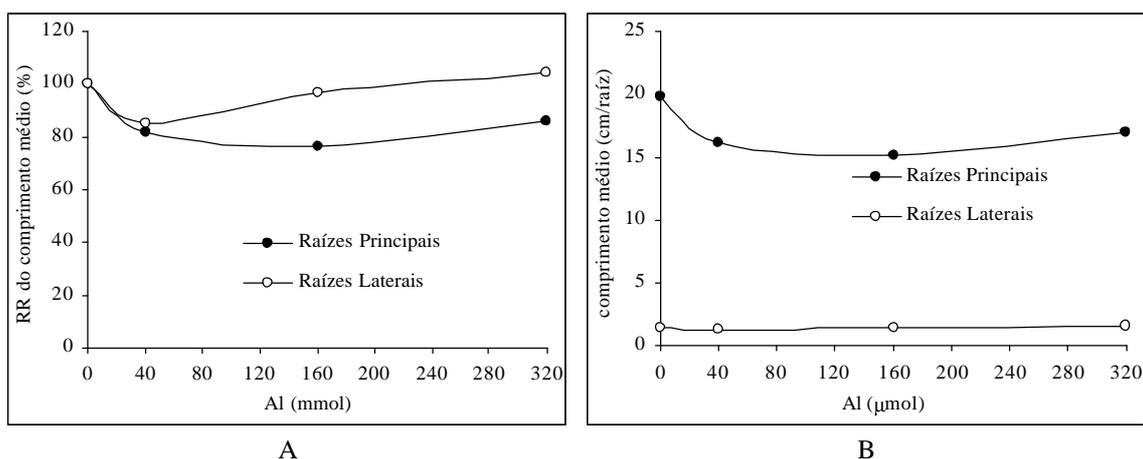


Figura 34. Redução relativa do comprimento radicular (a) das raízes principais e laterais, valores absolutos de comprimento (b), da variedade Caiapó, submetida a doses crescentes de Al e altos níveis nutricionais, por 15 dias.

O número de raízes principais sofreu uma redução significativa (Tabela 16), porém, inferior do que a verificada no mesmo período sob baixos níveis nutricionais (Tabela 12). O número de raízes laterais, embora não tenha variado significativamente

em função do Al (Tabela 16), diferenciou-se grandemente se comparado com o mesmo período de exposição sob baixos níveis nutricionais, onde o Al reduziu até 60% o número de raízes laterais na maior dose de Al (Tabela 12). A redução do NRP e manutenção do NRL, propiciou a um aumento não significativo do número de raízes laterais por eixo principal, e a uma redução significativa na distância entre as raízes laterais nos eixos principais (Tabela 16).

A variedade Caiapó também apresentou nestas condições um grande aumento do raio médio radicular (de até 33%, no nível 40  $\mu\text{mol}$  de Al; Tabela 16). Este comportamento não foi verificado em nenhum dos ensaios realizados anteriormente. A despeito destes aumentos, o raio médio das raízes principais sofreu um acréscimo mais acentuado, de até 45%, no maior nível de Al, onde foi observado valores de 0,14 mm, contrastando com os 0,10 mm no nível 0  $\mu\text{mol}$  de Al.

Os dados nos indicam um elevado investimento de carboidratos no sistema radicular, para uma possível aclimação da variedade. Tal suposição é reforçada pelo aumento do volume radicular, evidenciado tanto pelo aumento de ART e RMR, com a redução de CRT.

Tabela 16. Redução relativa e valores absolutos do número de raízes principais (NRP), número de raízes laterais (NRLP), na distância médias entre raízes laterais (DMRL) e no raio médio radicular da variedade Caiapó, submetida a doses crescentes de Al e altos níveis nutricionais, de Al por 15 dias.

Redução relativa					
Al ( $\mu\text{mol}$ )	NRP	NRL	NRLP	DMRL	RMR
<b>0</b>	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
<b>40</b>	103,8	102,3	98,6	82,7	132,9
<b>160</b>	89,8	91,4	101,8	74,7	131,7
<b>320</b>	83,9	88,9	106,0	80,8	119,2
Valores absolutos					
Al ( $\mu\text{mol}$ )	NRP	NRL	NRLP	DMRL (cm)	RMR (cm)
<b>0</b>	18,6a	390a	20,9a	0,95a	0,0085b
<b>40</b>	19,3a	399a	20,7a	0,78b	0,0113a
<b>160</b>	16,7b	356a	21,3a	0,71b	0,0112a
<b>320</b>	15,6b	346a	22,2a	0,77b	0,0102a

Valores seguidos da mesma letra entre linhas não diferem à 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

As raízes principais (Figura 35a e Figura 35c) da variedade Comum Branco, para o período de exposição de 15 dias ao Al sob altos níveis nutricionais, apresentou comportamento semelhante do que quando exposta pelo mesmo período sob baixos níveis nutricionais (Figura 26a e Figura 26c). As marcantes diferenças aconteceram em termos de magnitude dessa classe de raízes, onde, quando sob baixo nível nutricional, a variedade exibiu quase que 50% a menos de área de raízes principais, do que sob alto nível nutricional. As raízes laterais, por sua vez, exibiram um aumento significativo de em área radicular (Figura 35a e Figura 35c), quando comparadas para as duas situações.

Com relação ao comprimento radicular a variedade Comum Branco apresentou um comportamento na RR deste parâmetro idêntico ao caso anterior (Figura 26b e Figura 35b), salvo ao aumento na magnitude do sistema, que foi neste caso significativamente maior (Figura 26d e Figura 35d).

Os valores da RR do comprimento médio das raízes principais e laterais, também apresentaram as mesmas tendências da variedade crescido sob baixos níveis nutricionais por 15d (Figura 36a e Figura 27a, respectivamente), salvo em magnitude (Figura 36b e Figura 19b, respectivamente), onde neste caso, a variedade Comum Branco exibiu até 22,5 cm de comprimento médio das raízes principais, um valor 1,5 vezes maior que sob baixo nível nutricional, para o nível 0  $\mu\text{mol}$  de Al. Neste mesmo sentido, outra pequena diferença observado, foi que quando exposta a 320  $\mu\text{mol}$  de Al sob baixos níveis nutricionais, houve uma tendência a maior comprimento médio das raízes principais, mesmo que não significativo.

Particularmente, o número de eixos principais teve uma redução relativa significativa no maior nível (12,5%), quando comparado com 40  $\mu\text{mol}$  de Al, que exibiu 17,6 eixos principais (Tabela 17). Para o mesmo nível de Al (40  $\mu\text{mol}$ ) sob baixos níveis nutricionais, a variedade também exibiu um menor número de eixos principais (13,6 eixos, em média; Tabela 13), muito próxima ao efeito de 320  $\mu\text{mol}$  de Al. Os valores de raio médio radicular também apresentaram um aumento significativo em todos os níveis de exposição ao Al (Tabela 17).

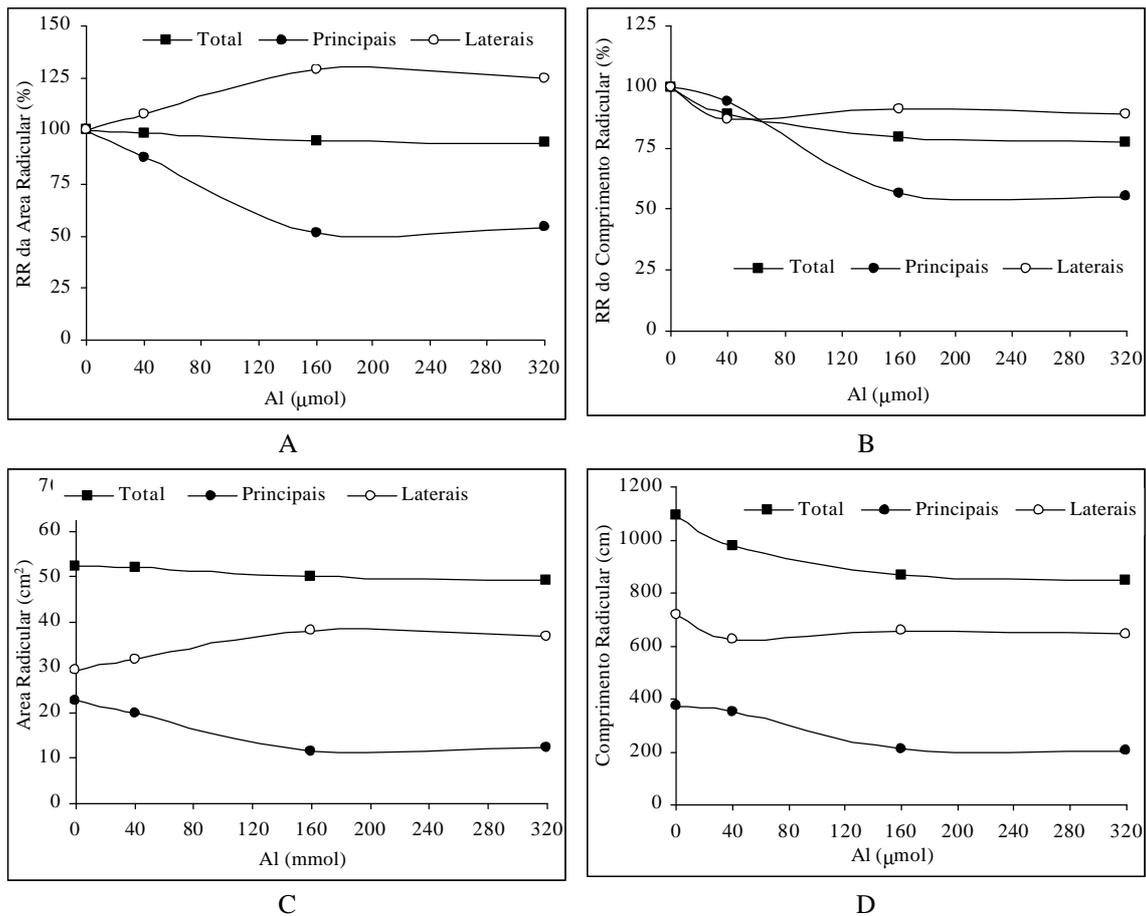


Figura 35. Reduções relativas de área (a) e comprimento radicular (b) das raízes principais e laterais, e, valores absolutos de área radicular (c) e comprimento (d), da variedade Comum Branco, submetida a doses crescentes de Al e altos níveis nutricionais, por 15 dias.

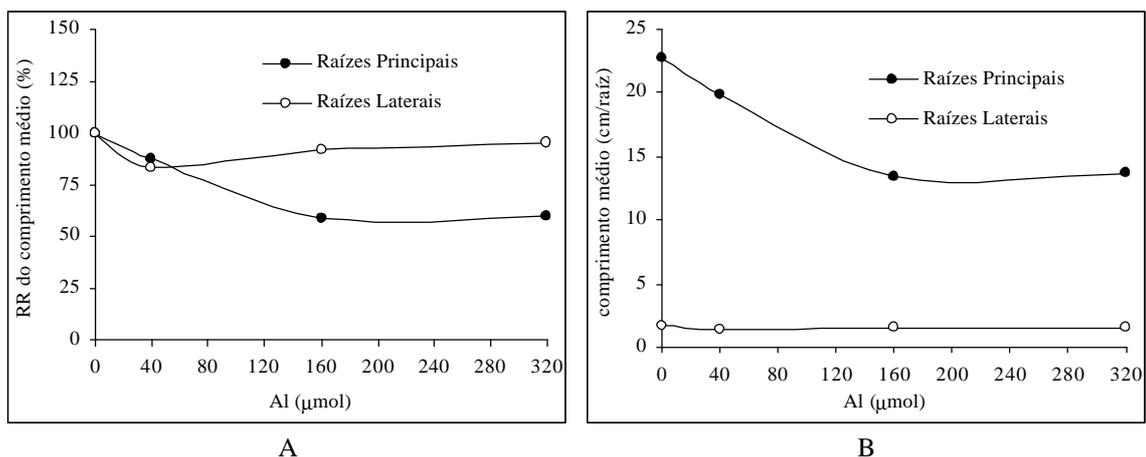


Figura 36. Redução relativa do comprimento radicular (a) das raízes principais e laterais, valores absolutos de comprimento (b), da variedade Comum Branco, submetida a doses crescentes de Al e altos níveis nutricionais, por 15 dias.

Foi verificada redução da distância média das raízes laterais nos eixos principais, provavelmente em decorrência a redução do número de eixos principais, como efeito

compensatório (Tabela 17), já que o número de raízes laterais e sua relação com o número de eixos principais não apresentou diferença significativa entre as doses de Al. Diferenças nesses parâmetros ocorreram em magnitude, quando esses resultados foram comparados com os provenientes do mesmo período de exposição ao Al porém sob baixos níveis nutricionais (Tabela 13).

Tabela 17. Redução relativa e valores absolutos do número de raízes principais (NRP), número de raízes laterais (NRLP), na distância médias entre raízes laterais (DMRL) e no raio médio radicular (RMR) da variedade Comum Branco, submetida a doses crescentes de Al e altos níveis nutricionais, por 15 dias.

Redução relativa					
Al ( $\mu\text{mol}$ )	NRP	NRL	NRLP	DMRL	RMR
<b>0</b>	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
<b>40</b>	106,3	56,5	54,4	71,8	110,8
<b>160</b>	93,8	49,8	52,8	72,2	120,1
<b>320</b>	93,8	32,7	34,6	69,5	121,4
Valores Absolutos					
Al ( $\mu\text{mol}$ )	NRP	NRL	NRLP	DMRL (cm)	RMR (cm)
<b>0</b>	16,3ab	422a	25,9a	0,88a	0,0077b
<b>40</b>	17,6a	440a	25,0a	0,80a	0,0085a
<b>160</b>	15,6ab	419a	26,8a	0,50b	0,0092a
<b>320</b>	14,9b	395a	26,5a	0,52b	0,0093a

Valores seguidos da mesma letra entre linhas não diferem à 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

### 4.3. Análise conjunta dos dados

Uma apreciação do conjunto de dados permite afirmar que a variedade mais tolerante, de acordo com a classificação prévia, é aquela que apresenta menores modificações em função da submissão ou não ao Al, tanto em baixo quanto em altos níveis nutricionais. Esse comportamento demonstra na variedade Comum Branco um efeito estático de tolerância diferencial da variedade Caiapó, que apresentou graus variados de redução e/ou aumento relativo dos parâmetros radiculares em função do nível de Al ou nutricional.

Zonta *et al* (2000) estudando os efeitos da morfologia radicular sobre uma variedade de arroz tolerante ao Al, concluiu que desconexo da força iônica de uma solução ou tempo de exposição, a redução inicial em taxa de alongação ou comprimento total do sistema radicular, manifestou-se independentemente, conformando uma

resposta genética definida, induzida *per se* pela concentração externa de Al. No mesmo sentido o autor concluiu que em períodos mais prolongados de exposição ao Al, ocorre um favorecimento do crescimento lateral sobre o axial, comportamento similar foi observado neste estudo.

A variedade Caiapó, por sua vez, apresentou valores absolutos dos parâmetros radiculares e valores relativos destes, variáveis com o tempo de exposição ao Al e com a força iônica da solução, mostrando uma maior plasticidade do sistema radicular, mesmo que, de acordo com Vasconcelos (1996), a variedade Comum Branco, possua um nível de tolerância bastante superior à Caiapó. Ramos (1998), havia alertado para a necessidade de verificar se comportamentos variáveis da variedade Caiapó, tais como retomada do crescimento radicular, fossem mantidos no tempo e se é dependente da concentração de Al, já que no trabalho da autora, houve uma evidência, onde uns limitados conjuntos de dados sugerem que a variedade Caiapó apresenta algum mecanismo similar à Comum Branco à tolerância ao Al

Foy (1968), em trigo, concluiu que a tolerância é dada pela habilidade de uma variedade em continuar a divisão celular e alongação sob estresse de Al. Esse tipo de conclusão pode ser perfeitamente aplicada para a variedade Comum Branco, e em parte a Caiapó, se para esta for considerada a relação direta do efeito tempo e nível nutricional à que esta submetida.

Os dados em seu conjunto permitem afirmar que a variedade Comum Branco tolera o Al, e que a variedade Caiapó pode aclimatar-se ao Al, quando as demais condições ambientais favorecerem seu desenvolvimento, estão mais sujeitos a controle genético e ontogenética, do que Caiapó, mais sujeita a modulação metabólica e ambiental (Noordwijk & Geijn, 1996), assim como seus componentes morfológicos do sistema radicular, e suas taxas de desenvolvimento e crescimento.

## 5. CONCLUSÕES

Os presentes dados permitem concluir que:

1. A variedade de alta tolerância ao Al (Comum Branco), quando na presença de Al, a qualquer tempo ou disponibilidade nutricional, desde que o Al esteja com mesma atividade em solução, apresenta menor redução dos parâmetros radiculares;
2. A variedade tolerante ao Al (Caiapó), apresenta grau variado de tolerância a este elemento, de acordo com a disponibilidade nutricional à que esta exposta;
3. Sob baixa disponibilidade nutricional, Caiapó mostra-se menos tolerante ao Al que Comum Branco e, sob alta disponibilidade nutricional, Caiapó mostra-se, a longo tempo, mais tolerante que Comum Branco; e,
4. O parâmetro raio radicular das raízes principais revelou em qualquer situação testada, menor alteração na Comum Branco do que em Caiapó.

**CAPÍTULO III – ATENUAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS  
DO ALUMÍNIO POR ÁCIDOS ORGÂNICOS EM  
CULTIVARES DE ARROZ**

## RESUMO

Com o objetivo de verificar o efeito complexante do ácido cítrico e do ácido málico sobre o Al, foram conduzidos vários ensaios com plântulas de arroz de sequeiro das variedades Comum Branco e Caiapó, sob condições controladas de crescimento, além da avaliação da exudação dos ácidos orgânicos e de possíveis alterações nos seus conteúdos internos radiculares em função do Al. Pode-se concluir que: o método para determinação de ácidos orgânicos exsudados dos sistemas radiculares de plântulas de arroz é eficiente para tal fim; que o ácido cítrico tem um poder de complexar o Al maior que o ácido málico; que quando adicionado isoladamente, promove um estímulo tanto na área como no comprimento radicular total e que o efeito atenuador dos ácidos cítrico e málico foram mais acentuados na variedade Caiapó. Embora, a variedade Comum Branco tem maior capacidade de atenuar o efeito do Al, pelas maiores quantidades de ácidos cítrico e málico, principalmente, exsudados e acumulados em seu sistema radicular.

**Palavras chave:** complexação de Al; ácido cítrico; ácido málico.

## **ABSTRACT**

The objective of this study was to verify the Al complexant effect of citric and malic acid. Also, to evaluate the root exudation of the organic acids, and possible alteration in their internal root contents as a consequence of Al levels. Several experiments were conducted with upland rice seedlings of the varieties Comum Branco and Caiapó, under controlled growth conditions. The method for determining the organic acids exudated by the rice seedling roots is efficient. The citric acid has an Al complexant power highest than the malic acid. When added separately, the malic acid promotes an inducement in the development of root area and of the total root length. The attenuation effect of the citric and malic acids is more accentuated in the variety Caiapó. However, the Comum Branco has highest attenuation of Al effect capacity, due to the amount of citric and malic acids exudated and accumulated in the root system.

**Key words:** Al complexation; citric acid; malic acid.

## 1. INTRODUÇÃO

A exudação de ácidos orgânicos tem sido um dos mecanismos apontados como responsáveis pela tolerância ao alumínio de uma grande parte das plantas cultivadas, porém são escassas as informações sobre esse mecanismo no arroz, além disso e quase que inexistente a informação se a detoxificação seria externa ou interna nesta cultura. Como ponto de partida, pode-se postular uma hipótese de trabalho admitindo a existência deste mecanismo e ainda considerar a atuação conjunta de mecanismos externos e internos de detoxificação por meio de ácidos orgânicos. Nas variedades tolerantes, inicialmente, a fim de garantir a expansão radicular, ativariam os mecanismos de exclusão do simplasma, e posteriormente a complexação interna garantiria a manutenção do desenvolvimento das raízes laterais, terciárias e de menor ordem, pois no surgimento destas, há rompimento das barreiras de proteção da raiz principal (endoderme), por onde o Al poderia ter contato mais íntimo com as células que estão em processo de divisão e/ou alongação.

Outro ponto importante, inclusive nas demais espécies vegetais cultivadas que já foram utilizadas nestes trabalhos, é saber se a quantidade do ácido exudado isoladamente é suficiente para complexar o Al presente no meio de crescimento destas plantas, já que ver-se-á, pela revisão da literatura, que a exudação desses pode ser inespecífica, ou melhor, pode ocorrer quando a planta está submetida a qualquer estresse biótico ou abiótico, e, neste caso seja de toxidez por metais, seja por estresses induzidos pela deficiência mineral (Ryan *et al*, 2001).

Assim, esse trabalho tem por objetivo avaliar a magnitude do efeito complexante de ácidos orgânicos em arroz de sequeiro, onde especificamente pretendeu-se:

1. Quantificar o efeito complexante de cada um desses ácidos isoladamente;
2. Estabelecer um protocolo que permita quantificar a exudação total do sistema radicular;
3. Verificar o efeito do ácido cítrico e málico adicionados externamente para complexação do Al;
4. Quantificar os teores de ácidos cítricos, málico e oxálico exudados pelo sistema radicular de plântulas de arroz; e,
5. Quantificar os teores de ácido cítrico, málico e oxálico acumulado no sistema radicular de plântulas de arroz;

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Uma grande quantidade de substâncias são exudadas pelas raízes, entre elas podem ser citados, açúcares, compostos aminados, ácidos orgânicos, ácidos graxos, esteróis, nucleotídeos, flavonas, enzimas e outras substâncias. Destes, os ácidos orgânicos tem interesse especial com relação à toxicidade por Al e outros metais ou ao nível nutricional da planta (Jones, 1998; Ryan, 2001), participando como componentes chave no sistema operacional da interface solo-raiz (Búcio *et al*, 2000).

Em teoria, nem todos os ácidos orgânicos apresentam potencial para a complexação com Al. A capacidade de detoxificação está relacionada com a posição relativa dos grupamentos OH<sup>-</sup> e COOH na cadeia principal dos ácidos orgânicos e das constantes de dissociação. Entre os ácidos orgânicos que apresentam maior capacidade de complexar o Al estão o citrato, oxalato e malato. Esses ácidos são mais eficientes na amenização da toxidade de alumínio, em contraste com os ácidos fórmico, maléico, acético (Mijazawa *et al*, 1992). Mijazawa *et al* (1992) determinaram a atividade tóxica do alumínio em função da concentração do ligante presente e concluíram que o ácido cítrico e oxálico tem maior poder complexante em relação ao ácido málico. Os autores utilizaram plantas de trigo (onde a quantidade restante de Al na solução seria proporcional ao inverso da redução do crescimento radicular) como testemunha, além de eletrodo seletivo para fluoreto (determinação direta do Al) e o programa Geochem. Delhaize *et al* (1993a) por sua vez, determinaram um efeito quelante de alumínio pelos ácidos málico e cítrico, maior do que o observado para o ácido succínico. Hue *et al* (1986), ressaltou a forte capacidade de amenização do Al-tóxico pelo ácido cítrico.

Tipicamente, as raízes contêm diversos ácidos orgânicos que variam em comprimento de cadeia, como o lactato, acetato, oxalato, succinato, fumarato, citrato, malato, isocitrato e aconiato, que são produzidos no ciclo do ácido cítrico (ou Ciclo de Krebs), e, dependendo da intensidade do seu funcionamento, é possível o acúmulo destes nas células e, possivelmente, sua exudação para o meio externo (Ryan *et al*, 2001).

O envolvimento de ácidos orgânicos em mecanismos efetivos de detoxificação interna de Al também foi sugerido nesta década na década de 90, por Rengel (1992), embora Struthers & Sieling na década de 50, aventaram a hipótese que os ácidos cítrico, oxálico, tartárico, málico, malónico e láctico poderiam ser eficientes na prevenção da

toxidez por Fe e Al. Jones (1961) sugeriu que em espécies tolerantes, ácidos orgânicos poderiam complexar o Al evitando a precipitação de Al-P, que poderia ocorrer normalmente nas plantas não tolerantes em condições de pH fisiológico. Helyar (1980) também sugeriu a existência de um mecanismo de detoxificação interna, baseado na complexação e sua posterior compartimentalização vacuolar.

Recentemente, outros autores (Ma *et al.*, 1998a; Pintro *et al.*, 1997; Ryan *et al.*, 2001; Barceló *et al.*, 2002) têm mostrado que esses ácidos podem estar envolvidos em detoxificação interna, ligando-se com Al no vacúolo, local onde, por exemplo, o ácido málico é normalmente armazenado. O mecanismo proposto já foi apresentado no tópico “Estado da Arte”.

Na Tabela 18, são apresentados indícios de exudação de ácidos orgânicos por diferentes espécies em respostas a estímulos ambientais.

Tabela 18. Exudação de alguns ácidos orgânicos por diferentes espécies de plantas em respostas a estímulos ambientais.

Espécie	Ácido orgânico	Estímulo	Taxa de exudação nmol / ápice / hora	Referência
Triticum aestivum line ET3	Malato	+Al	2.0	Ryan <i>et al.</i> , 1995
Triticum aestivum cv Atlas 66	Malato	+Al	0,92	Osawa & Matsumoto, 2001
Brassica napus	Malato / Citrato	-P		Hoffland <i>et al.</i> , 1989
Zea mays cv SA 3	Citrato	+Al	0,25	Pellet <i>et al.</i> , 1995
Zea mays tolerant selection from cv IAC-TAIUBA	Citrato	+Al	0,13	Jorge & Arruda, 1997
Zea mays cv ATP-Y	Citrato	+Al	1,3	Kolmeier <i>et al.</i> 2001
<b>nmol / g Raiz / h</b>				
Feijão Preto	Citrato / Malato	+Al +La	150/50 50/2	Silva <i>et al.</i> , 2001
Secale cereale cv King	Citrato / Malato	+Al	26-70 / 15-35	Li <i>et al.</i> , 2000b
Oryza sativa cv Senatore	Citrato	+Al	44	Ma <i>et al.</i> , 1997
Cassia tora	Citrato	-Al +Al	106 268	Ishikawa <i>et al.</i> , 2000
Glycine max var. Suzunari	Citrato	+Al	115	Yang <i>et al.</i> , 2000
Glycine max genotype PI 416937	Citrato	+Al	49	Silva <i>et al.</i> , 2001
Miscanthus sinensis	Citrato	+Al	9,7	Kayama, 2001
Galium saxatile	Citrato	+Al	70	Schöttelndreier <i>et al.</i> , 2001
Rumex acetosella	Oxalato	+Al	105	
Camellia sinensis cv Yabukita	Citrato	+Al	0,17	Morita <i>et al.</i> , 2001
	Oxalato	+Al	35	
Fagopyrum esculentum cv Jianxi	Oxalato	+Al	15	Zheng <i>et al.</i> , 1998b
Colocasia esculenta cv Bunlong	Oxalato	+Al	47	Ma & Miyasaka, 1998
Arabidopsis thaliana	Citrato	+Cu	122	Murphy <i>et al.</i> , 1999
Zea mays	Citrato / Malato	Deficiência Nutricional	430	Jones & Darrah, 1993
<b>nmol / planta / dia</b>				
Oriza sativa	Citrato / Malato	+Al	8000	Costa de Macêdo <i>et al.</i> , 2001.
<b>nmol / planta / hora</b>				
Chickpea	Malato / citrato		2.0 / 0,4	Ryan <i>et al.</i> , 2001
<b>% da testemunha</b>				
Zea mays	Citrato / Malato	+Al	600 – 1200 / 258 - 403	Pintro <i>et al.</i> , 1997

Ma *et al.* (1998) concluíram que a tolerância ao Al em trigo preto seria resultado da complexação interna do Al por ácido oxálico. Este comportamento foi observado por

outros autores (Pintro *et al*, 1997; Braccini *et al*, 1998), onde as concentrações de Al nas raízes de trigo preto, milho e café, não variaram significativamente entre variedades tolerantes ou não ao Al, havendo porém diferenças significativas no desenvolvimento das plantas tolerantes.

Delhaize *et al* (1993b) observaram a amenização do efeito da toxidez do Al sobre uma plântula alumínio-sensível, com a adição externa de ácido málico na solução contendo 50  $\mu\text{M}$  de Al. Esses autores se utilizaram desse artifício para confirmar o efeito da exclusão do alumínio da raiz de plântulas de trigo Al-tolerantes, visto que estas acumulam relativamente menos alumínio no ápice radicular que as Al-sensíveis. Zheng *et al* (1998) observaram visualmente esse efeito da exudação em trigo preto, quando houve excreção de ácido oxálico, em ápices radiculares expostos à 0 e 150  $\mu\text{M}$  de Al por 3h, na presença de um corante específico para Al (hematoxilina). Jones (1998) também demonstrou que a excreção desses ácidos acontece, principalmente, na região de alongação radicular.

Relacionando a quantidade de substâncias exudadas para a rizosfera de ápices com 0,5 mm radiais e 5 mm extensão axial, Schenkel *et al* (1999) encontraram em feijão, citrato e malato nas concentrações de 300  $\mu\text{M}$  e 400  $\mu\text{M}$  respectivamente por ápice.

Delhaize *et al* (1993a), tentando confirmar o efeito do alumínio na ativação dos genes controladores da extrusão de ácido málico pelo ápice radicular, num experimento de curta duração, plantas Al-tolerantes e Al-sensíveis foram expostas por 60 minutos a solução contendo 200  $\mu\text{M}$  de Al. Durante esse período o autor acompanhou a evolução da concentração de ácido málico no meio e observou que tanto a variedade tolerante como a sensível, na ausência de Al em solução não diferiram na quantidade de ácido excretado, assim como a sensível não respondeu a presença de Al. Uma provável explicação para este comportamento pode ser devido a um mecanismo de ativação, onde o Al, seria a chave do sistema.

A especificidade do íon Al, como ativador do gene Alt1, responsável, no caso do trigo carazinho ou plântulas neo-isogênicas tolerantes, pela extrusão de ácido málico pelo ápice da raiz foi confirmado por Delhaize *et al* (1993b), a partir de vários tratamentos, incluindo doses de P, já que era possível que uma deficiência de P na solução pela adição de alumínio, estivesse estimulando a exudação. No mesmo tratamento utilizaram-se dois íons trivalentes, Fe e La, e os resultados obtidos encontram-se na Tabela 19. Cabe ressaltar que as concentrações de La inibiram a

elongação radicular, porém não resultaram em aumento da quantidade de ácido málico exudado.

Tabela 19. Estimulação específica de ácido málico nas raízes de trigo pelo Al. Dados Delhaize *et al* (1993b).

Tratamento	Ácido málico exudado (nmol plântula <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
0 Al; 2 µM P <sub>i</sub>	< 0,08
50 µM Al; 0 P <sub>i</sub>	3,57 ± 0,08
0 Al; 0 P <sub>i</sub>	< 0,08
50 µM Al; 100 µM P <sub>i</sub>	2,57 ± 0,08
50 µM LaCl <sub>3</sub>	< 0,08
50 µM FeCl <sub>3</sub>	< 0,08

Outros trabalhos demonstram que o ácido cítrico pode ser um exudado importante como mecanismo de tolerância ao Al de acordo com Mijazawa *et al* (1992). Ma *et al* (1997) relataram secreção específica de ácido cítrico em espécies Al-tolerantes de Acácia. Ápices radiculares de milho excretam predominantemente ácido cítrico (Jorge *et al.*, 1997).

O ácido oxálico também tem sido descrito como o responsável pela tolerância ao Al em várias espécies, como trigo preto (Zheng *et al.*, 1998), trigo (Miyasawa *et al.*, 1992), taro (Ma & Miyasaka, 1998). O ácido succínico foi identificado como produto de excreção, mas em concentrações menores. A exudação radicular de ácidos orgânicos também está envolvida na tolerância diferencial de cevada e outras espécies (Rengel, 1992).

Em arroz, Antunes *et al* (1998) observaram que a aplicação externa de 400 µM de ácido cítrico, a uma solução salina simples contendo 0,1 mM Ca e 160 µM de Al, reverte totalmente os efeitos da toxidez de Al sobre a elongação radicular na variedade de arroz Maravilha, parcialmente em Caiapó, mas não IAC 47. Particularmente, a variedade Maravilha foi classificada por Mendonça (1991) como altamente tolerante, enquanto a variedade Caiapó, foi classificada como medianamente tolerante por Vasconcelos *et al* (2002) e a variedade IAC 47 como sensível por Mendonça (1991). Isso sugere a hipótese, de que pode haver a exudação de ácidos orgânicos nas variedades tolerantes em um determinado nível, não suficiente para eliminar o efeito do Al e que nas variedades com menor ou tolerância nula, esse mecanismo não é efetivo.

Costa de Macedo *et al* (2001), estudaram a exudação dos ácidos málico e cítrico em meio de cultura, assim como o acúmulo do ácido málico nas raízes e em calos derivados de embriões de arroz de tolerância diferencial (IRAT 112 e IR6023 -

resistentes ao alumínio; Aiwu e IKP - variedades sensíveis) ao Al como um possível mecanismo de resistência ao metal, comparando-as a concentrações de 0, 250 e 500 $\mu$ M de alumínio, adicionado na forma de  $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$ , e concluiu que apenas o malato em um período de 24 horas foi ligeiramente estimulado, não havendo diferença nas quantidades detectadas nos ápices radiculares. Um adendo deve ser feito a esse trabalho, visto que, os níveis de Al utilizados por Costa de Macedo (2001) são altos, bem aquém dos níveis que poderiam reduzir em 50% o sistema radicular (Vasconcelos *et al*, 2002), além do qual seria difícil a comparação do efeito fitotóxico do Al. Porém, a autora informa que a redução relativa do sistema radicular, nestas condições foi baixa, tanto nas variedades tolerantes como nas sensíveis. Esse efeito pode ser decorrente a fonte de Al utilizada, que segundo Kinraide & Parker (1987), diminui o efeito fitotóxico do Al na solução, o que levou Costa de Macedo *et al*, (2001) a ressaltar em suas conclusões que há necessidade de novos estudos, inclusive para avaliar outros ácidos orgânicos.

Devem ser registrados os importantes avanços feitos com o desenvolvimento de linhas quase isogênicas em trigo, que diferem na expressão gênica para efluxo induzido de malato, sob controle de um único gene (Delhaize *et al*, 1993b). Esta é uma metodologia de grande interesse, embora se saiba que muito provavelmente a resistência ao Al em trigo (e outras gramíneas cultivadas) é multigênica e ligada à vários braços cromossômicos (Pellet *et al.*, 1995).

Também é um avanço muito significativo o trabalho de Fuente *et al* (1997), que mostraram a indução de tolerância em plantas transgênicas de tabaco e goiaba, com a introdução de um gene bacteriano que super expressa a citrato sintetase, induzindo portanto, elevados fluxos detoxificantes de citrato, que virtualmente “imunizam” essas espécies sensíveis contra a injúria de Al. Por fim, Conway & Toenniessen (1999) comunicaram o desenvolvimento de uma variedade transgênica de arroz tolerante ao Al, que se utiliza do mesmo mecanismo para tal.

## **2.1. Evolução na Determinação de Ácidos Orgânicos**

A determinação de ácidos orgânicos exudados de sistemas radiculares ou encontrados naturalmente em solo ou extratos celulares, tem evoluído nos últimos anos, sem dúvida, reflexo da difusão do uso da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) entre os grupos de pesquisa.

Estas substâncias já foram determinadas usando métodos como a cromatografia gasosa (Hloss *et al*, 1984), ou métodos bioquímicos (Delhaize *et al*, 1993b). Atualmente todos os trabalhos na área são conduzidos através da determinação por CLAE (Ma *et al*, 1997; Ma *et al*, 1998a; Ma *et al*, 1998b; Zheng *et al*, 1998; Campos *et al*, 2002; entre outros).

No entanto, para otimizar a obtenção de resultados com esta técnica, em exudados de raízes de plantas, são necessários ajustes metodológicos, podendo assim, esta técnica constituir-se como uma ferramenta eficiente para a compreensão de mecanismos de tolerância ao  $Al^{+3}$  (Campos *et al*, 2002).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

Foram utilizadas as variedades de arroz sequeiro Comum Branco e Caiapó, tolerantes ao Al em graus distintos, devidamente identificadas no Capítulo II.

Para cumprir com os objetivos propostos, duas linhas de experimentos foram idealizadas. A primeira para determinar o efeito complexante do Al com dois ácidos orgânicos: málico e cítrico, em solução nutritiva, tendo como indicador o desenvolvimento das raízes da variedade Caiapó. A segunda linha de experimentos foi conduzida objetivando avaliar as quantidades daqueles dois ácidos e do oxálico, exudados e contidos no interior dos sistemas radiculares de plântulas das variedades Caiapó e Comum Branco.

Salvo as particularidades de cada conjunto de experimentos, abaixo relacionados, o protocolo para cultivo das plantas, foi o descrito no Capítulo I, incluindo as soluções nutritivas utilizadas.

A contaminação com inóculos de microorganismos, também poderia comprometer os resultados, pois estes poderiam utilizar os ácidos orgânicos, além de açúcares, como fonte de energia, ou mesmo ocasionar aumentos na exsudação (Jones & Darrah, 1993), e para tal, adotou-se a prática de submeter a solução nutritiva a luz UV, por um período de 20 min, sendo que as lâminas nunca tinha espessura maior que 5 cm para garantir a eficiência da esterilização.

#### **3.1. Estabilidade dos Ácidos Orgânicos em Solução**

Uma mistura de ácidos orgânicos (ácido cítrico, málico, oxálico, fumárico e benzóico, da marca Sigma - St. Louis, MO, USA, de concentração 100  $\mu$ M, pH 4), que seriam utilizados para calibrar o cromatógrafo (ver condições cromatográficas, item 3.2), foram armazenados sob condições ambientais, à pH 4,0, em frasco transparente, e analisado no tempo 0 e 6 meses depois. Diluições dessa solução foram utilizadas para obtenção das curvas de calibração para os ácidos de interesse. Também foi testado o efeito da concentração de 10 vezes das soluções contendo os possíveis exudados. Para tal a amostra era analisada inicialmente antes de submetida à concentração.

Imediatamente, era levada a um rotavapor à 50°C, sob vácuo para sofrer a concentração, e após esse procedimento, resuspendida ao volume inicial e analisada novamente.

### **3.2. Condições Cromatográficas**

As condições cromatográficas foram idealizadas como base nos procedimentos descritos por Ma & Miyasaka (1998) e Zheng *et al* (1998), com ligeiras alterações de acordo com as condições disponíveis de trabalho, principalmente do equipamento e da coluna disponível em nosso laboratório. Utilizou-se um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE; Perkin Elmer, Norwalk, CO, USA) constituído de uma bomba LC200, um detetor LC785A UV/VIS e um auto amostrador ISS 200, sendo os dados cromatográficos e espectrais recolhidos em integrador PE Nelson modelo 1022. A coluna utilizada foi troca iônica (SUPELCOGEL C-610), de 300 x 7,8 mm, e como fase móvel empregou-se uma solução ácido fosfórico 0,1%, de grau espectroscópico (Marca Tédia®) com fluxo de 0,5 mL/min, de acordo com recomendações do fabricante. O cromatograma obtido pelo fabricante (SUPELCO, 1999), para os ácidos estudados é apresentado no Anexo 1 (pág. 135). Padrões com concentração variável foram utilizados para quantificar os ácidos, sendo que as curvas de calibração utilizadas encontram-se no Anexo 2 (pág. 136).

As amostras foram filtradas previamente em membranas de nylon 0,47 µm e 50 µl foram injetados no sistema. O tempo total de corrida foi de 25 minutos e após esse tempo aumentou-se o fluxo para 1,0 mL/min, para lavar o sistema.

A detecção foi realizada a 211 nm, o que coincidiu muito proximamente com a faixa utilizada por Ma & Miyasaka (1998) e Zheng *et al.* (1998), que trabalharam com 210 nm.

### **3.3. Efeito da Adição Externa de Ácidos Orgânicos**

A solução nutritiva utilizada foi a descrita no Capítulo I, diluída a ½ da força iônica original e pH 4,0±0,01. As plântulas foram submetidas às doses de 0 e 160 µmol de Al (suficiente para promover uma redução de 50% da área e comprimento radicular da variedade tolerante) combinadas com duas doses de ácido cítrico (0 e 160 µmol) e duas de ácido málico (0, e 160 µmol), por um período de 7 dias. No tempo 0 e aos 7

dias, uma alíquota de 10 ml da solução de cada parcela experimental foi coletada e analisada por CLAE nas condições acima descritas. Ao final dos 7 dias, as plantas também foram coletadas e os parâmetros radiculares (área e comprimento radicular total) determinados de acordo com o protocolo descrito no Capítulo I.

### **3.4. Coleta de Amostra para Análise de Ácidos Orgânicos Exudados e Contidos no Sistema Radicular**

Foram coletados 200 mL de amostra da solução nutritiva, com e sem Al no tempo 0 e ao final de cada experimento de cada parcela. As amostras tiveram seus volumes reduzidos 10 vezes no rotavapor a 50°C sob vácuo, e foram armazenadas em frascos âmbar na geladeira a 5°C. Procedia-se então a filtração em membrana 0,47 µm e um volume de 50 µL injetado no sistema CLAE.

O conteúdo de ácido cítrico, málico e oxálico eram obtidos subtraindo-se os valores obtidos das áreas relativas dos picos correspondentes no tempo 0, que em geral eram insignificantes.

Também, ao final do experimento, as plântulas eram segmentadas em raiz e parte aérea, e adotando a metodologia proposta no Capítulo I, as imagens do sistema radicular total eram digitalizadas e arquivadas para análise posterior com auxílio do SIARCS®.

Após a digitalização das imagens, as raízes eram imediatamente acondicionadas em frascos de polipropileno na presença de etanol 80% e armazenadas em geladeira até serem preparados os extratos de acordo com a metodologia proposta por Silva *et al* (2001), quando eram maceradas manualmente, as frações polares separadas com auxílio de funis de decantação.

A fração de interesse era armazenada em frascos âmbar e acondicionada novamente em geladeira, até o momento de injeção (10 µL) no sistema CLAE, também após filtração em membrana 0,47 µm.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Estabilidade de Ácidos Orgânicos em Solução

Na Tabela 20, são apresentados os resultados de tempo de retenção ( $t_R$ ) e área relativa para cada ácido da amostra padrão, no intervalo de 6 meses. Houve diferenças entre o tempo de retenção dos ácidos, que não foram suficientes para dificultar a distinção dos respectivos picos destes produtos nos cromatogramas (Anexo 3 e Anexo 4; pág. 137). As pequenas diferenças no  $t_R$ , maior após 6 meses de armazenamento, podem ser atribuídas a protonação e/ou deprotonação dos ácidos, porém o intervalo de tempo foi mantido.

Com relação às quantidades detectadas, a maior redução ocorreu com o ácido cítrico (4,06%) para o período de 6 meses, que também não seriam suficientes para ocasionar resultados significativos ou não das demais amostras, visto que está dentro da faixa de erro informada pelo fabricante da coluna e do sistema CLAE. Os demais ácidos também tiveram variação de área integrada, da mesma forma não significativa (Tabela 20; os cromatogramas dos padrões são apresentados no Anexo 3 e no Anexo 4, na pág. 137).

Tabela 20. Tempo de retenção e área integrada de cada ácido orgânico contido na amostra padrão, com intervalo de 6 meses em água. Valores obtidos por triplicata.

Ácido	Parâmetro Avaliado	Nov / 2000	Abr / 2001
Oxálico	$t_R$ (min)	8,46a	8,96a
	Área relativa	845221a	853165a
Cítrico	$t_R$ (min)	10,68 <sup>a</sup>	10,37a
	Área relativa	87253a	85691a
Málico	$t_R$ (min)	12,37a	12,03a
	Área relativa	135116a	130471a
Fumárico	$t_R$ (min)	20,12a	21,32a
	Área relativa	176143a	175896a
Benzóico	$t_R$ (min)	27,63a	27,80a
	Área relativa	67925a	63695a

(a) Valores seguidos da mesma letra entre colunas não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5%.

A concentração à 50°C também não ocasionou problemas maiores na quantificação, visto que os ácidos foram totalmente recuperados quando ressuspensos ao volume inicial, como mostrado na Tabela 21.

Tabela 21. Área integrada de cada ácido orgânico contido na amostra padrão e após a ressuspensão. Os valores são médios de triplicatas.

Ácido	Amostra padrão	Após ressuspensão
Oxálico	853165a	865236a
Cítrico	85691a	85267a
Málico	130471a	129362a
Fumárico	175896a	176543a
Benzóico	63695a	62956a

Valores seguidos da mesma letra entre colunas não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey à 5%.

Quanto ao protocolo para desenvolvimento das plantas e coletas dos possíveis exudados (Figura 37), houve uma redução da área integrada, porém não significativa, de 1,4% na quantidade de ácido cítrico na solução durante o tempo de experimentação de 15 dias.

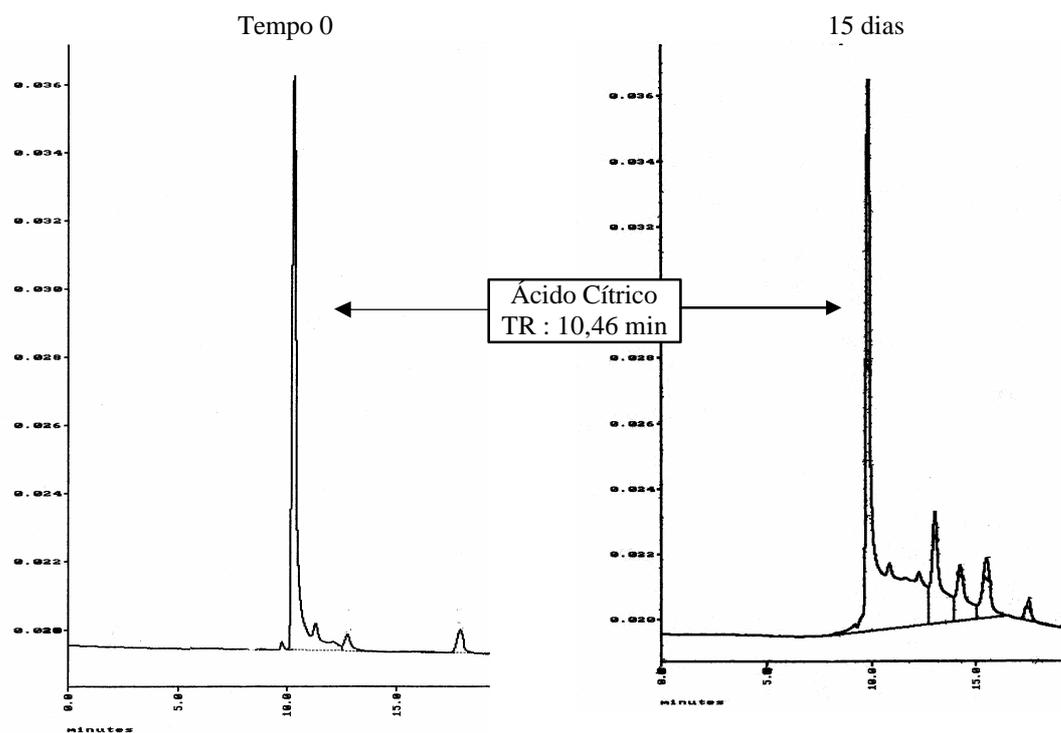


Figura 37. Cromatogramas do ácido cítrico (exógeno) no tempo 0 e ao final do período experimental (15 dias).

## 4.2. Efeito da Adição Externa de Ácidos Orgânicos

O efeito do Al sobre as variedades, em termos de redução relativa de área e comprimento radicular (RRART e RRCRT, respectivamente) repetiu-se, conforme discutido no Capítulo II, para as variedades Comum Branco e Caiapó crescidas na presença de Al por um período de 4 dias.

Isoladamente o ácido cítrico na concentração adicionada não ocasionou efeitos significativos na ART e CRT das variedades, evidenciadas pelas suas reduções relativas (Figura 38 e Figura 39).

Na variedade Caiapó, quando adicionado o ácido cítrico na presença de Al, houve uma amenização significativa de RRART em 33,7%, enquanto que na variedade Comum Branco, esta atenuação foi de 26,9%. A RRCRT, por sua vez, nestas mesmas condições foi atenuada em 26,3% na Caiapó e 29,8% na Comum Branco, que não diferiram significativamente.

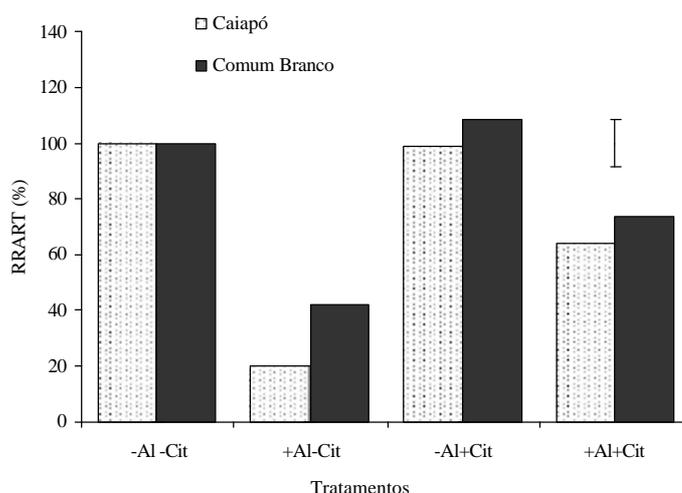


Figura 38. Redução relativa da área radicular (RRART, %) das variedades de arroz Caiapó (CA) e Comum Branco (CB) submetidas aos tratamentos a 0 e 160  $\mu\text{mol Al L}^{-1}$  (-Al e +Al), combinadas com 0 e 160  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de ácido cítrico (-cit e +cit). A barra indica a DMS.

Zonta *et al* (2001), trabalhando com uma concentração de 320  $\mu\text{mol}$  e ácido cítrico e 160  $\mu\text{mol}$  de Al, encontraram resultados semelhantes, porém com uma resposta mais acentuada e significativa de atenuação da RRART em ambas as variedades. Também para CRT, o autor encontrou respostas de maiores magnitudes e significativas entre as variedades, provavelmente, devido a menor força iônica à que as plantas

estavam submetidas (1/4 da força iônica total recomendada). Zonta *et al* (2001), atribuíram esse maior efeito do ácido cítrico na variedade Caiapó do que no Comum Branco, a uma possível complexação interna do Al, nesta última, não só por ácido cítrico, mas provavelmente também por outros ácidos de baixo peso molecular e integrante dos mecanismos metabólicos, principalmente, do ciclo do ácido cítrico (Ryan *et al*, 2001).

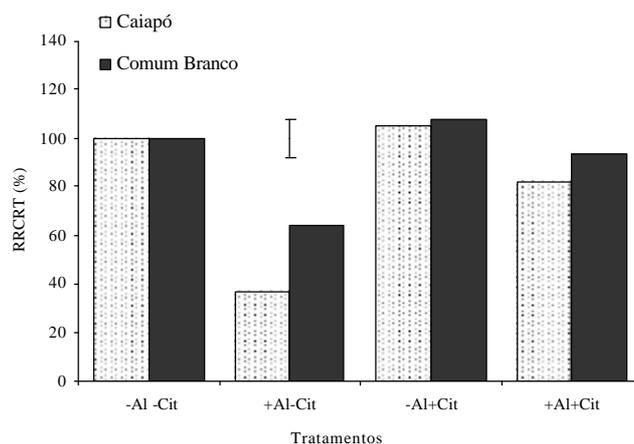


Figura 39. Redução relativa do comprimento radicular (RRCRT, %) das variedades de arroz Caiapó (CA) e Comum Branco (CB) submetidas aos tratamentos a 0 e 160  $\mu\text{mol Al L}^{-1}$  (-Al e +Al), combinadas com 0 e 160  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de ácido cítrico (-cit e +cit). A barra indica a DMS.

O ácido málico, quando adicionado externamente na concentração de 160  $\mu\text{mol}$  de Al, fez com que houvesse aumentos significativos na ART e CRT das variedades. Na variedade Caiapó, o ácido málico aumentou não significativamente 10,6% a ART (Figura 40), enquanto que na Comum Branco, esse aumento foi de 21,4%. O CRT foi mais estimulado por esse ácido, onde houve incrementos de 26,0% e 29,2% do parâmetro quando o ácido málico foi adicionado na ausência do Al (Figura 41). Efeitos estimulatórios por ácidos de baixo peso molecular, em baixas concentrações foram apontados por Camargo *et al* (2001) e podem ser atribuídos a seus efeitos hormonais.

Na presença do Al, o ácido málico ocasionou atenuação na RRART significativa na variedade Caiapó, 19,8% e não significativa na Comum Branco de 12,8% (Figura 40). Seu efeito atenuante na RRCTR foi também mais acentuado e significativo na variedade Caiapó (20,0%), e menor e não significativo (9,2%) na Comum Branco (Figura 41).

Esses dados confirmam os citados na literatura, onde vários autores evidenciaram um maior efeito complexante do ácido cítrico quando comparado com o ácido málico (Hue *et al*, 1986; Delhaize *et al*, 1993a).

Zheng *et al* (1998), em trabalho com milho, encontrou resultados semelhantes, porém neste caso, malato amenizou levemente a toxidez do Al, quando comparado com o cítrico e oxálico na variedade sensível, sugerindo que a exudação, principalmente de ácido cítrico, poderia representar uma economia de C quando da submissão ao Al.

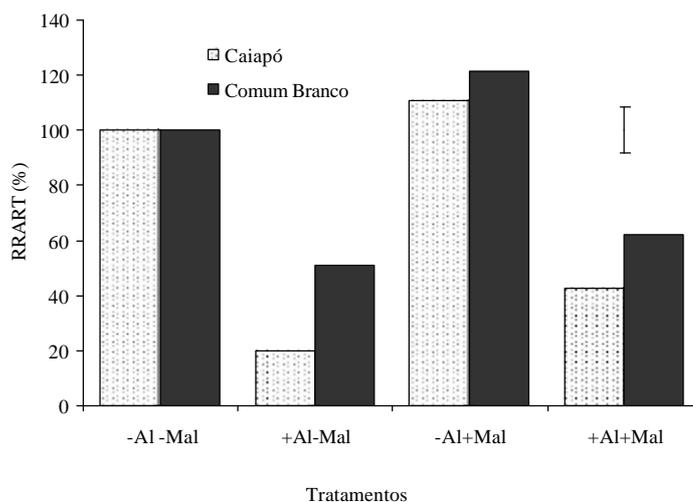


Figura 40. Redução relativa da área radicular (RRART, %) das variedades de arroz Caiapó e Comum Branco submetidas aos tratamentos a 0 e 160  $\mu\text{mol Al L}^{-1}$  (-Al e +Al), combinadas com 0 e 160  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de ácido málico (-mal e +mal). A barra indica a DMS.

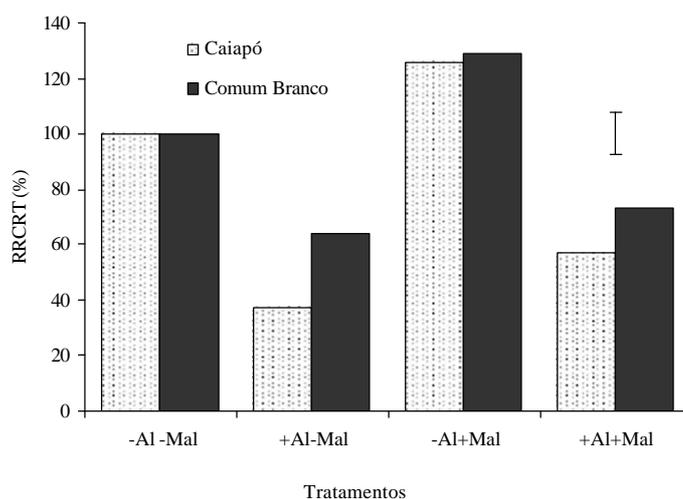


Figura 41. Redução relativa do comprimento radicular (RRCRT, %) das variedades de arroz Caiapó (CA) e Comum Branco (CB) submetidas aos tratamentos a 0 e 160  $\mu\text{mol Al L}^{-1}$  (-Al e +Al), combinadas com 0 e 160  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de ácido málico (-mal e +mal). A barra indica a DMS.

Em seu conjunto, os dados evidenciam um efeito maior na variedade Caiapó, da adição de ambos ácidos na atenuação das reduções relativas de área e comprimento radicular total, o que pode ser atribuído a um mecanismo diferencial de tolerância, interno ou externo, relacionado ou não aos ácidos orgânicos (Ma *et al*, 2001), que poderá ser discutido melhor quando da apresentação dos dados dos itens 4.3 e 4.4 deste capítulo.

### 4.3. Exudação de Ácido Cítrico e Ácido Málico

Tanto na ausência, bem como na presença de Al, a variedade Comum Branco exudou no período de 4 dias uma quantidade significativamente maior (30,1 e 42,1%, respectivamente) de ácido cítrico em comparação com a variedade Caiapó, conforme mostrado na Figura 42. Comparando-se também as quantidades exudadas pelas duas variedades, somente na presença de Al, é possível observar que a variedade Comum Branco exudou aproximadamente 0,884  $\mu\text{mol}$  deste ácido a mais que a Caiapó no período de 4 dias (Anexo 5, pág.138). Isso significaria que a variedade Comum Branco manteve no período uma taxa de aproximadamente 9,2  $\text{nmol de ácido cítrico planta}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , maior que Caiapó.

Em termos de grandeza absoluta, a variedade mais tolerante conseguiu externar no período 1,381  $\mu\text{mol}$  de ácido cítrico  $\text{planta}^{-1}$ , o que leva a uma taxa de 14,38  $\text{nmol planta}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Esse valor é condizente com os apresentados por Ryan *et al* (2001), em sua revisão sobre o do assunto, quando os dados são expressos com base na massa da raiz. Por outro lado, é uma quantidade relativamente baixa se comparada com os montantes encontrados por Kirk *et al* (1999), 337  $\text{nmol cm de raiz}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , contra 0,115  $\text{nmol cm de raiz}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , conseguidos nestes experimentos. Porém, estes autores verificaram em seus experimentos o efeito da exudação de citrato sob deficiência de P. Isso inclusive pode explicar os maiores teores encontrados na solução de cultivo, na ausência de Al, para a variedade Comum Branco, uma variedade tradicional, que conforme já destacado, apresenta, ao que parece pelos estudos já conduzidos, não só alta tolerância ao Al, mas também alta eficiência no uso de nutrientes (Zonta, 1996). Este mesmo mecanismo, tem sido vislumbrado por diferentes autores como um mecanismo efetivo para sobrevivência de plantas em solos com baixos teores de P (Ryan *et al*, 2001; Kirk *et al*, 1999; Ma, 2001).

O oxalato também foi exudado pelas duas variedades, porém para o período de 4 dias, em quantidades ínfimas, quando comparadas com a quantidade de ácido cítrico, não havendo diferenças significativas entre variedades ou mesmo na interação destas com presença ou ausência de Al (Figura 42).

Já os conteúdos de ácido málico foram afetados significativamente em ambas variedades na presença do Al. Inversamente ao ocorrido quando do uso do ácido cítrico, as duas variedades responderam na mesma intensidade, não diferindo significativamente entre si, mesmo na ausência do Al (Figura 42).

Para um período mais longo de exposição ao Al (15 dias), as tendências de exudação foram mantidas (Figura 43). O oxalato continuou a ser excretado por ambas variedades, tanto na presença como na ausência do Al, em quantidades não diferentes estatisticamente, porém, em decorrência ao maior período de exposição uma quantidade até 7 vezes maiores da substância puderam ser detectadas.

O ácido cítrico, principalmente na variedade altamente tolerante ao Al, teve um acréscimo de 304% da quantidade exudada quando esta variedade foi submetida ao Al. Na variedade Caiapó, o aumento da exudação desse ácido foi de 228%, quando comparada também à sua testemunha (ausência de Al). Essa quantidade de ácido málico exudada pela variedade Comum Branco, leva a uma taxa média, para o período, muito maior do que a observada para o período mais curto de exposição, chegando neste caso a  $19,9 \text{ nmol ácido cítrico planta}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Se este valor for comparado em termos de área radicular, a quantidade obtida será  $0,03 \text{ nmol cm raiz}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , o que representaria uma redução na taxa de efluxo do ácido, porém, sabendo-se que grande parte deste ácido é excretado diretamente pelos ápices radiculares (Barceló *et al*, 2002), esse comportamento reforça a hipótese de que a contribuição das raízes laterais é de suma importância na manutenção do crescimento radicular de plantas tolerantes ao Al, visto que para o período houve um aumento significativo do número de raízes laterais, o que garantiu uma taxa média de 27,7% maior de exudação, quando comparada com a taxa média para um menor período de exposição.

De uma forma geral, os dados contrastam com os apresentados por Costa de Macedo *et al* (2001), pois apresentaram valores distintamente menores para a cultura do arroz. O autor concluiu não ser este um mecanismo de tolerância ao Al efetivo em arroz, mesmo que tenha encontrado valores de mmol destes mesmos ácidos nas variedades estudadas.

É importante ressaltar que não se espera que as quantidades encontradas desses ácidos sejam suficientes para complexar todo o Al presente na solução, mas que reduza a atividade do Al na rizosfera, já que a redução dos parâmetros radiculares, tanto em variedades sensíveis como tolerantes, obviamente em graus distintos sempre acontecerá

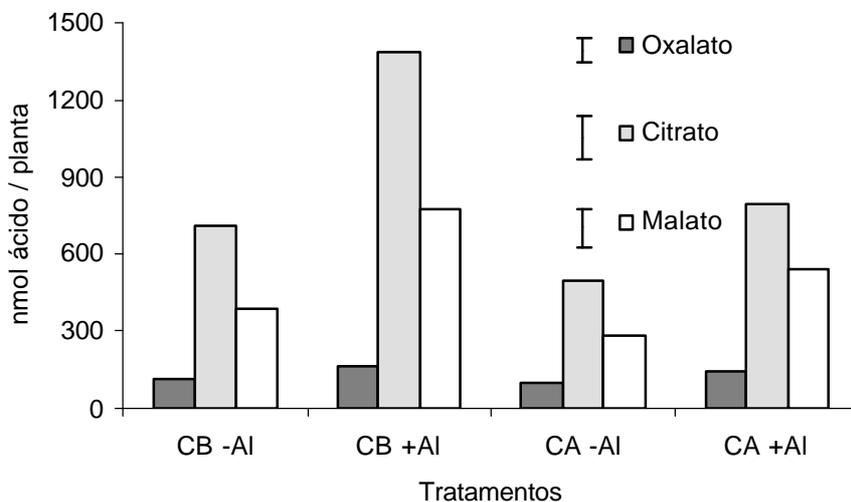


Figura 42. Exudação de ácidos orgânicos pelas variedades de arroz Comum Branco (CB) e Caipó (CA), na presença (+) ou ausência (-) de Alumínio (Al), por um período de 4 dias de exposição ao elemento. A barra ao lado da legenda indica a DMS para cada ácido, respectivamente.

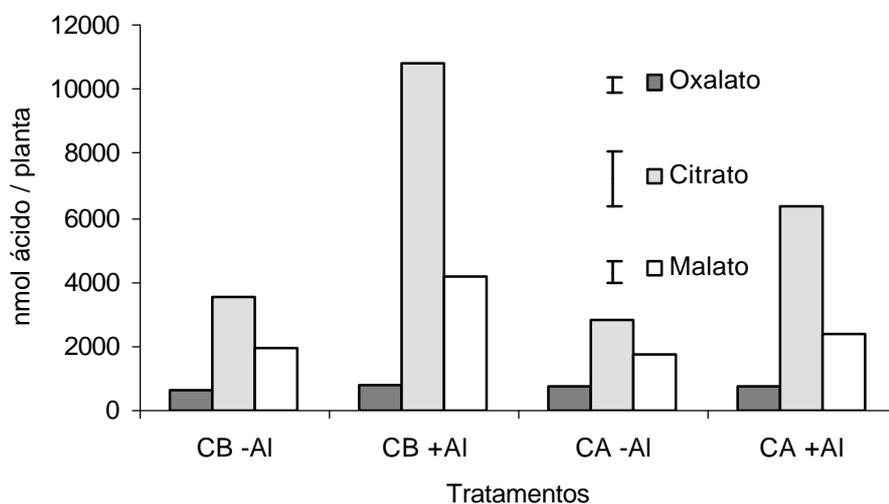


Figura 43. Exudação de ácidos orgânicos pelas variedades de arroz Comum Branco (CB) e Caipó (CA), na presença (+) ou ausência (-) de Alumínio (Al), por um período de 15 dias de exposição ao elemento. A barra ao lado da legenda indica a DMS para cada ácido, respectivamente.

#### 4.4. Complexação Interna do Al por Ácido Cítrico e Ácido Málico

Quando as variedades foram submetidas ao estresse por Al por um curto período de tempo, a quantidade dos ácidos acumulada em seus tecidos radiculares foi significativamente superior para a variedade mais tolerante (Comum Branco), conforme mostrado na Figura 44. Essa variedade acumulou 83,3% a mais de ácido cítrico quando comparada com ausência de Al e 81% a mais de ácido quando comparada com a variedade Caiapó submetida ao Al. A variedade Comum Branco acumulou também significativamente mais ácido oxálico quando submetida ao Al e quando comparada com a variedade Caiapó (Anexo 6, pág. 138).

As quantidades de ácido málico não diferiram significativamente entre as variedades, ou quando da sua submissão ao Al, mostrando que o mecanismo de transporte deste ácido, para o meio externo parece ser mais eficiente do que o mecanismo que atua sobre o transporte de ácido cítrico. Essa inferência pode ser feita comparando-se a Figura 42 e a Figura 44, onde observa-se que a variedade Comum Branco mantém significativamente exudação quando exposta ao Al, não acumulando o ácido málico em seu sistema radicular, mesmo que a despeito das diferenças quantitativas com o ácido cítrico.

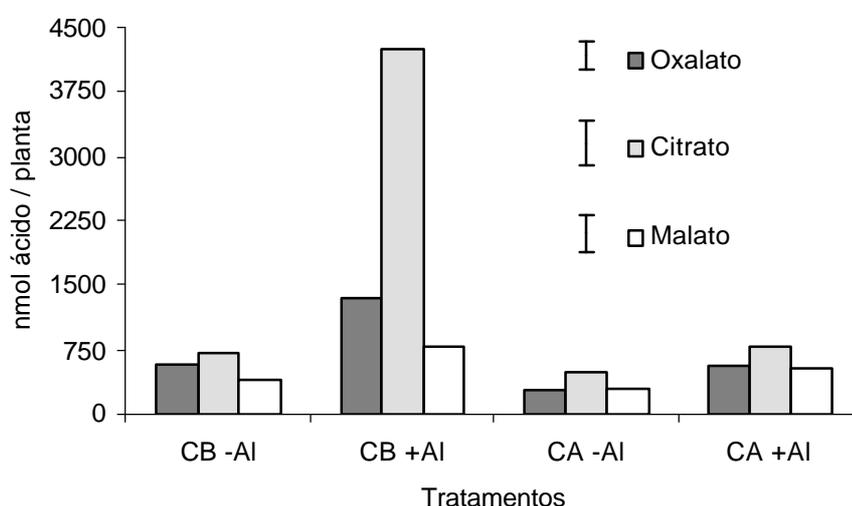


Figura 44. Conteúdo de ácidos orgânicos acumulados nas raízes das variedades de arroz Comum Branco (CB) e Caiapó (CA), na presença (+) ou ausência (-) de Alumínio (Al), por um período de 4 dias de exposição ao elemento. A barra ao lado da legenda indica a DMS para cada ácido, respectivamente.

Para um período maior de exposição ou não ao Al, as quantidades acumuladas dos ácidos foram maiores em comparação com um menor período de exposição (Figura

44 e Figura 45), ocasionados pelo próprio desenvolvimento do sistema radicular, que em média quadruplicou seu volume (Capítulo II).

Na variedade Comum Branco, as quantidades de todos os ácidos estudados foram significativamente superiores quando esta foi submetida ao estresse por Al. Já para a variedade Caiapó as diferenças foram significativas apenas para ácido cítrico.

Comparando a variedade Caiapó com a Comum Branco, sob submissão ao Al, observa-se que a quantidade de ácido cítrico acumulada naquela foi 63,1% menor, assim como as quantidades dos demais também foram também significativamente menores (Figura 45).

Para a variedade Comum Branco o acúmulo significativo de ácido oxálico pode indicar ineficiência do mecanismo de transporte deste para o meio externo.

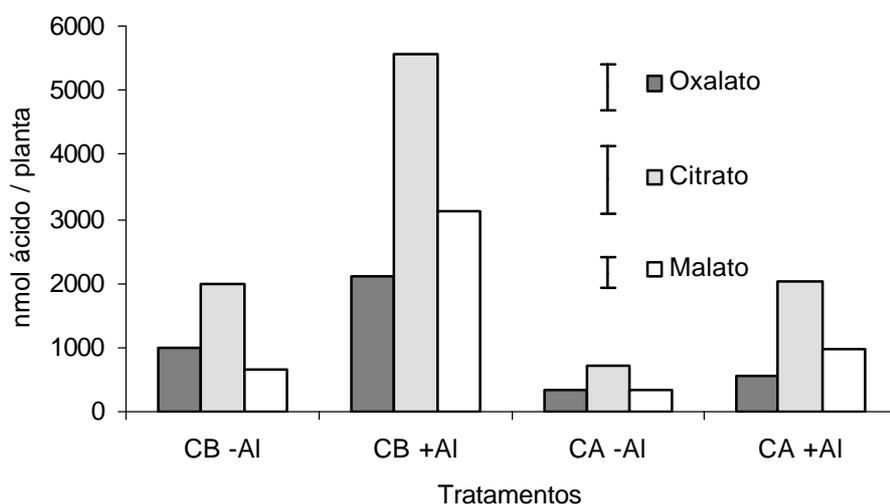


Figura 45. Conteúdo de ácidos orgânicos acumulados nas raízes das variedades de arroz Comum Branco (CB) e Caiapó (CA), na presença (+) ou ausência (-) de Alumínio (Al), por um período de 15 dias de exposição ao elemento. A barra ao lado da legenda indica a DMS para cada ácido, respectivamente.

Neste estudo, as diferenças encontradas em ambas as variedades quando submetidas ao Al foram sempre maiores que as relatadas na literatura, tal comportamento, em parte pode ser explicado porque os inúmeros trabalhos têm sido feitos utilizando-se somente os ápices radiculares principais, negligenciando o papel dos ápices das raízes laterais, que apresentam proporcionalmente uma quantidade de área ativa muito maior.

Os dados, por sua vez, concordam com os de Menosso *et al* (2002), que mostrando que a variedade tolerante de soja acumulou, na ausência de Al, 54% do total

dos ácidos orgânicos identificados, e o grupo sensível, 46%. Lee & Foy (1986) também encontraram, em extratos de raízes de feijão, maiores acúmulos de ácidos na variedade tolerante, com 52%, contra 48% na variedade sensível. Cambraia *et al* (1983) também encontraram maiores acúmulos de ácidos na variedade tolerante de sorgo, com 69%, contra 31%, na variedade sensível.

Individualmente, o ácido cítrico apresentou o valor mais elevado, tanto na solução sem Al, como na solução com Al, a curto ou longo tempo, indicando ser uma característica da espécie (Popp & Kinzel, 1981).

#### **4.5. Considerações a Cerca do Mecanismo de Tolerância Estudado**

À luz dos presentes dados pode-se inferir que o arroz apresenta efetivamente a complexação do Al por ácidos orgânicos como um mecanismo de tolerância ao Al, mesmo que essas quantidades fossem relativamente baixas quando vislumbrada a dose de Al utilizadas ( $160 \mu\text{mol de Al L}^{-1}$ ) em comparação com as quantidades exudadas ou acumuladas (em 5 vezes menor no período de 15 dias). O computo da quantidade total revela um máximo de  $25,1 \mu\text{mol}$  total de ácidos, que físico-quimicamente não poderiam evitar que a quantidade de Al utilizada ocasionasse danos a planta, porém, com certeza reduzem a atividade do Al em solução, assim como podem complexar o Al que por ventura penetrasse na célula vegetal, via meristema de crescimento, via rompimento da endoderme quando da emissão de raízes laterais.

A presença de quantidades razoáveis de oxalato nos tecidos radiculares também sugere algum mecanismo tal qual proposto por Ma *et al* (2001), onde este ácido poderia estar sendo utilizado para o armazenamento do Al nos vacúolos.

Cabe ressaltar também que em solução nutritiva o efeito do Al é exacerbado, se comparado com as mesmas quantidades em solo, onde numerosas interações com o elemento pode ocorrer, visto a complexidade intrínseca do sistema.

## 5. CONCLUSÕES

Os presentes dados nos permitem concluir que:

1. Os métodos aplicados para determinação de ácidos orgânicos exudados dos sistemas radiculares de plântulas de arroz são eficientes para tal fim;
2. O ácido cítrico tem um poder complexante do Al maior que o ácido málico;
3. Adicionado isoladamente, o ácido málico promove um estímulo tanto na área como no comprimento radicular total;
4. O efeito atenuador da adição dos ácidos cítrico e málico são mais acentuados na variedade Caiapó.
5. A variedade Comum Branco teve maior capacidade de atenuar o efeito do Al pelas quantidades de ácidos cítrico e málico, exudadas e acumuladas em seu sistema radicular.

## CONCLUSÕES GERAIS

Dentre as conclusões obtidas, pode-se ressaltar que, com relação a determinação dos parâmetros radiculares: o medidor fotoelétrico subestima os valores de área comprimento radicular, além de não discriminar a tolerância diferencial ao Al, quando comparado com o método da análise digital das imagens; a aquisição das imagens de raízes, para serem processadas pelo SIARCS, deve ser obtida preferencialmente com scanner, já que a câmara fotográfica digital também subestima a área radicular, e não diferencia totalmente a tolerância varietal em plântulas de variedades de arroz de sequeiro. A melhor densidade para varredura do scanner no momento da digitalização é de 300 dpi, e o protocolo elaborado no decorrer destas fases experimentais deve ser seguido evitando assim aumentos nos erros experimentais.

Com relação ao efeito do Al em diferentes níveis nutricionais e tempos de exposição: a variedade de alta tolerância ao Al (Comum Branco), quando na presença de Al, a qualquer tempo ou disponibilidade nutricional, desde que o Al esteja com mesma atividade em solução, apresenta menor redução dos parâmetros radiculares; a variedade tolerante ao Al (Caiapó), apresenta grau variado de tolerância ao elemento, de acordo com a disponibilidade nutricional à que esta exposta; sob baixa disponibilidade nutricional, Caiapó mostra-se, de fato, menos tolerante ao Al que Comum Branco; sob alta disponibilidade nutricional, Caiapó mostra-se a longo tempo mais tolerante que Comum Branco, e, o parâmetro raio radicular das raízes principais, revelou em qualquer situação testada, menor alteração na Comum Branco do que em Caiapó. Com base nestas conclusões, pode-se afirmar efetivamente que a variedade Comum Branco tolera o Al, e que a variedade Caiapó pode aclimatar-se ao Al, quando está sob maior disponibilidade nutricional.

Com relação à ação dos ácidos cítrico e málico na tolerância: a metodologia para determinação de ácidos orgânicos exudados dos sistemas radiculares de plântulas de arroz é eficiente para tal fim, que o ácido cítrico tem um poder complexante do Al maior que o ácido málico, que quando adicionado isoladamente, o ácido málico promove um estímulo tanto na área como no comprimento radicular total e que o efeito atenuador dos ácidos cítrico e málico são mais acentuados na variedade Caiapó; A variedade Comum Branco tem maior capacidade de atenuar o efeito do Al pelas

quantidades de ácidos cítrico e málico, principalmente, exudadas e acumuladas em seu sistema radicular.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHLRICH, J.L.; KARR, M.C.; BALIGAR, V.C.; WRIGHT, R.J. Rapid bioassay of aluminum toxicity in soil. *Plant and Soil*, The Hague, v.122, p.279-285, 1990.
- ANTUNES, M.V.M.; ROSSIELLO, R.O.P.; ZONTA, E.; GENÚNCIO, G.C. Efeito do ácido cítrico exógeno sobre área e comprimento radicular em três cultivares de arroz. Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, 23., Caxambu, 1998. Resumos. Lavras: UFLA/SBCS/SBM, p.340. 1998.
- ARCHAMBAULT, D.J.; ZHANG, G.; TAYLOR, G.J. Accumulation of Al in root mucilage of an Al-resistant and Al-sensitive cultivar of wheat. *Plant Physiol.*, 112: 1471-1478. 1996.
- BALIGAR, V.C.; CAMPBELL, T.A.; WRIGHT, R.J. Differential responses of alfalfa clones to aluminum-toxic acid soil. *Journal of Plant Nutrition*, v.16, n.2, p.219-233, 1993.
- BARBER, S.A. Soil nutrient bioavailability - a mechanistic approach. New York, John Wiley & Sons, Inc., 398p. 1984.
- BARBOSA FILHO, M.P. & YAMADA, T. Upland Rice Production in Brasil. *Better Crops International*. V. 16. 43-46. Special Supplement. 2002.
- BARCELO, J; POSCHENRIEDER, C. Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. *Environmental and Experimental Botany* 48: 75-92. 2002.
- BASU U., GODBOLD D. & TAYLOR G.J. Aluminium resistance in *Triticum aestivum* L. associated with enhanced exudation of malate. *Journal of Plant Physiology* 144, 747-753. 1994.
- BOLLARD, E. G., AND G. W. BUTLER. Mineral Nutrition of Plants. *Ann. Rev. Plant Physio.* 17: 77-112. 1966.
- BRACCINI, M.C.L.; MARTINEZ, H.E.P.; PEREIRA, P.R.G.; SAMPAIO, 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. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v.22, n.3, p.435-442, 1998.
- BRANCAFLOR ED, JONES DL, GILROY S. Alterations in the cytoskeleton accompany aluminum-induced growth inhibition and morphological changes in primary roots of maize. *Plant Physiol.* 118: 159-172. 1998.

- BRASIL - MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. Informe mineral. Brasília – DF. 24 pag. 2000.
- BRASIL, F.C. Estudos de Características Radiculares de uma Pastagens de *Brachiaria Humidicola* com Auxílio de Análise Digital de Imagens. Tese de Mestrado. UFRRJ. 2001
- BRITT, A.B. DNA damage and repair in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* 47: 75-100. 1996.
- BRONDONI, C. & PAIVA, E. Análise de “RFLP” da tolerância à toxidez do alumínio no cromossomo 2 do milho. *Pesq. Agrop. Brasil.* 30(8), 575-579. 1996.
- BUCIO, J.L.; JACOBO, M.F.N; RODRÍGUEZ, V.R; ESTRELLA, L.H. Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. *Plant Science* 160 : 1–13. 2000.
- CAMARGO, F.A.O.; ZONTA, E.; SANTOS, G. A.; ROSSIELLO, R. O. P. Aspectos fisiológicos e caracterização da totoxidez de ácidos orgânicos voláteis em plantas. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 31, n. 3, p. 523-529, 2001.
- 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). *Journal of Plant . Nutrition* , New York, v. 6, p. 313-322. 1983.
- CAMPOS, L.J.M; PRATES, H.T; PITTA, G.V.E; QUEIROZ, C.G.S; SCHAFFER, R.E; ALVES, V.M.C. Determinação de ácidos orgânicos em exsudatos de raízes de milho pela técnica de HPLC. XXIV Congresso Nacional de Milho e Sorgo. Florianópolis. 6 pag. 2002.
- CANÇADO, G.M.A., PAIVA, E. Genética e Bioquímica da Tolerância de Plantas ao Alumínio. In: *Inter-relação Fertilidade, Biologia do Solo e Nutrição de Plantas.* (Eds) José Oswaldo Siqueira et al. Viçosa: SBCS, Lavras: UFLA/DCS, pp : 363-388. 1999.
- CARE, D. A. The effects of aluminium concentration on root hairs in white clover (*Trifolium repens* L.). *Plant Soil*, 171:159-162, 1995
- CARVER, B.F.; OWNBY, J.D. Acid soil tolerance in wheat. *Advances in Agronomy* , 54: 117-173, 1995.
- CHARLTON, W.A. Lateral root initiation. In: Y. Waisel; A. Eshel; U. Kafkafi. (Eds). *Plant roots : the hidden half.* Marcel Dekker. pag. 103-128. 1991.

- CLARK R.B., PIER H.A., KNUDSEN D., MARANVILLE J.W., Effect of trace element deficiencies and excesses on mineral nutrients in sorghum, *J. Plant Nutr.* 3:357–374. 1981.
- CONWAY, G; TOENNIESSEN, G. Feeding the world in the twenty-first century. *Nature* 402, 55-58. 1999.
- COPELAND L., DELIMA M.L., The effect of aluminium on enzyme activities in wheat roots, *J. Plant Physiol.* 140:641–645. 1992.
- COSTA DE MACEDO, C.; KINET, J.M.; VAN SINT JAN, V. Effects of duration and intensity of aluminium stress on growth parameters in four rice genotypes differing in aluminium sensitivity. *Journal of Plant Nutrition*, v.20, p.181-193, 1997.
- COSTA DE MACEDO, C.E; KINET, J.M; LUTIS, S. Aluminum effects on citric and malic acid excretion in root and calli of rice cultivars. *RBFV.* 13(1)13-23. 2001.
- COSTA, C., DWYER, L.M., HAMILTON, R.I., HAMEL, C., NANTAIS, L., SMITH, D.L. A Sampling Method for Measurement of Large Root Systems with Scanner-Based Image Analysis. *Agron. J.* 92:621-627. 2000.
- CRONAN C.S., Differential adsorption of Al, Ca, and Mg by roots of red spruce (*Picea rubens* Sarg.), *Tree Physiol.* 29:511–566. 1991.
- CRUVINEL, P.E; CRESTANA, S; JORGE, L.A.C. Métodos e aplicações do processamento de imagens digitais. In: CRESTANA, S. et al (eds). *Instrumentação Agropecuária.* Embrapa-SPI. Brasília DF. 1996.
- CRUZ-ORTEGA R., OWNBY, J.D. A protein similar to PR (pathogenesis-related) proteins is elicited by metal toxicity in wheat roots. *Physiol Plant* 89:211-219. 1993.
- DE WILLIGEN, P.; VAN NOORDWIJK, M. Roots, plant production and nutrient use efficiency. Wageningen: Agricultural University, 282p. 1987.
- DELHAIZE, E, *et al.* Aluminium tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) I. Uptake and Distribution of Aluminum in root apices. *Plant Pysiol.* 103:685-693. 1993a.
- DELHAIZE, E, *et al.* Aluminium tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) II. Aluminum-stimulated excretion of malic adic from root apcies. *Plant Physiol.* 103:695-702. 1993b.
- DELHAIZE, E., RYAN, P. R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiol.* 107:315-321. 1995.

- DOWDY, R.H., SMUCKER, A.J.M., DOLAN, M.S., FERGUSON, J.C. Automated image analysis for separating plant root debris elutriated from soil cores. *Plant and Soil* 200: 91-94, 1998.
- EMBRAPA-CNPS. Principais Limitações dos Solos do Brasil. Autores: Fernando Cezar S. do Amaral, fernando@cnps.embrapa.br; Nilson Rendeiro Pereira, nilson@cnps.embrapa.br; Waldir de Carvalho Junior, waldir@cnps.embrapa.br. Data de publicação no site: 31/05/1999. <http://www.cnps.embrapa.br/search/pesqs/tema3/tema3.html>. Consultado em 23/10/2002.
- FAÇANHA, A.R; OKOROKOVA-FAÇANHA, A.L. Inhibition of Phosphate Uptake in Corn Roots by Aluminum-Fluoride Complexes. *Plant Physiology*, Vol. 129, pp. 1763–1772. 2002.
- FAGERIA, N. K. Adubação e Nutrição Mineral da Cultura de Arroz. Ed. Campus. Rio de Janeiro, 341 p. 1984.
- FAGERIA, N.K.; BALIGAR, V.C.; WRIGHT, R.J. Aluminum toxicity in crop plants. *Journal of Plant Nutrition*, v.11, p.153-156, 1988.
- FAGERIA, N.K.; BALIGAR, V.C.; WRIGHT, R.J. The effects of aluminum on growth and uptake of Al and P by rice. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 24: 677-682, 1989.
- FAGERIA, N.K.; ZIMMERMANN, F.J.P. Seleção de cultivares de arroz para tolerância à toxidez de alumínio em solução nutritiva. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.14, n.2, p.141-147, 1979.
- FARRELL, R.E., WALLEY, F.L., LUKEY, A.P., GERMIDA, J.J. Manual and digital line-intercept methods of measuring root length: A comparison. *Agron. J.* 85:1233-1237. 1993.
- FERNANDES, A. M.; NASCIMENTO, R. J.; KUBOTA, F. C.; BRASIL, F. C.; ARAÚJO, A. P.; TEIXEIRA, M. G. Tamanho da amostra para determinação de caracteres radiculares e eficiência de absorção de fósforo em feijoeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 28., jul. 2001, Londrina. Ciência do solo: Fator de produtividade competitiva com sustentabilidade. Resumos. Londrina: Embrapa Soja, p. 104. Resumo n.0337. 2001.
- FERNANDES, M.S.; ROSSIELLO, R.O.P. Mineral nitrogen in plant physiology and plant nutrition. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.14, p.111-148, 1995.

- FERNANDES, M.S.; ROSSIELLO, R.O.P.; ARRUDA, M.L.R. Relações entre capacidade de troca de cátions de raízes e toxidez de alumínio em duas gramíneas forrageiras. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.19, n.5, p.631-637, 1984.
- FERREIRA, R. de P.; SALGADO, L.T.; JORGE, H.D. Tolerância de cultivares de arroz ao alumínio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.21, n.12, p.1257-1260. 1986.
- FITTER, A.H. Characteristics and functions of root system. In: Waisel, Y; Eschel, A; Kafkafi, U. (eds). *Plants roots, the hidden half*. Dekker, New York. pag. 1-20. 1991.
- FLEMING A.L., SCHWARTZ, J.W., FOY C.D., Soil: Aluminium toxicity in plants, *Agron. J.* 66:715–719. 1974.
- FLEMING. A.; FOY, C.D. Root structure reflects differential aluminum tolerance in wheat varieties. *Agronomy Journal* 60: 172-176, 1968.
- FOY C.D., CHANEY, R.L., WHITE, M.C., The physiology of metal toxicity in plants, *Annu. Rev. Plant Physiol.* 29:511–566. 1978.
- FOY C.D., FLEMING A.L., Aluminium tolerance of two wheat cultivars related to nitrate reductase activities, *J. Plant. Nutr.* 5 :1313–1333. 1982.
- FOY C.D, CARTER J.R. TE, DUKE J.A, AND DEVINE TE. Correlation of shoot and root growth and its role in selecting for aluminum tolerance in soybean. *J Plant Nutr* 16: 305-325. 1993.
- FOY, C.D. Plant adaptation to acid aluminum-toxic soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, New York, v.19, p. 959-987, 1988.
- FRANÇA, M.G.C. Análise do Crescimento e do Acúmulo de Nitrogênio em Duas Cultivares de Arroz Contrastantes em Hábito de Crescimento. Tese de Mestrado. UFRRJ. 1995.
- FUENTE, J.M. de la; RAMIREZ-RODRIGUEZ, V; CABRERA-PONCE, J.L.; HERRERA-ESTRELA, L. Aluminium tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science*, v.276, p.1566-1568, 1997
- FURLANI P.R.; CLARK, R.B. Screening sorghum for aluminum tolerance in nutrient solution. *Agronomy Journal*, v.73, p.587-594, 1981.
- FURLANI, A.M.C.; FURLANI, P.R. Composição e pH de soluções nutritivas para estudos fisiológicos e seleção de plantas em condições nutricionais adversas. Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, 34p. (Boletim Técnico, 121). 1988.

- GHO, C.H; LEE, Y. Aluminium Uptake and Aluminium-Induced Rapid Root Growth Inhibition of Rice Seedlings. *Journal of Plant Biology*. 42:151-158. 1999.
- GRAUER, U.E., W. J. HORST. Modelling cation amelioration of aluminium phytotoxicity. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 56, 166-172. 1992.
- GUIMARÃES, E.P.; NEVES, P.C.F. Base genética dos cultivares de arroz ... *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.31, n.5, p. 349-347, 1996.
- HARADA, J.; YAMASAKI, K. Roots *In: Science of the rice plant. V. Morphology.* (Matsuo, T; Hoshikawa, K., Eds. ) Food and Agriculture Policy Research Center, Tokyo, 1993.
- HARRIS W.R., BERTHON G, DAY, J.P., EXLEY, C., FLATEN, T.P., FORBES, W.F., KISS, T., ORVIG, C., ZATTA, P.F. Speciation of aluminum in biological systems. *J. Toxicol. Env. Health.* 48, 543-568. 1996.
- HARRIS, G.A., CAMPBELL G.S. Automated quantification of roots using a simple image analyzer. *Agron. J.* 81:935-938. 1989.
- HAUG A.R., Molecular aspects of aluminium toxicity, *CRC Critical Rev. Plant Sci.* 1:345-373. 1984.
- HELYAR, K. R. Effects of aluminium and manganese toxicities on legume growth. In Andrew, C.S. y Kamprath, E.J., (eds). Commonwealth scientific and industrial research organization. Melbourne, Austraulia. pp. 207-231. *In: Res. Anal. Pastos Tropicales*, CIAT. Colombia 2:18, 1980.
- HOFFLAND, E; FINDENEGG G.R; NELEMANS, J.A. Solubilization of rock phosphate by rape. II. Local root exudation of organic acids as a response to P-starvation. *Plant Soil* 113:161-65. 1989.
- HORST W.J., SCHMOHL N., KOLLMEIER M., BALUSKA F., SIVAGURU M., Does aluminium affect root growth of maize through interaction with the cell wall-plasma membrane cytoskeleton continuum? *Plant and Soil.* 215:163-174. 1999.
- HORST, W.J;PUSCHEL, A.K; SCHMOHL, N. Induction of callose formation is a sensitive marker for genotypic aluminium sensitivity in maize. *Plant Soil* 192:23-30. 1997.
- HOSHIKAWA, K. Rice Seed, germination and seedlings. *In: Science of the nice plant. V.1. Morphology.* T. Matsuo e K. Hoshikawa (Eds). Food and Agriculture Policy Research Center. Tokyo, 1993. P. 91-132.

- HOWELLER R.H. & CADAVID, L.F. Screening of rice varieties for tolerance to Al toxicity in nutrient solutions as compared with field screening. *Agronomy Journal*, 68:551-555,1976
- HUANG J.W., SHAFF J.E., GRUNES D.L., KOCHIAN L.V., Aluminium effects on calcium fluxes at the root apex of aluminium-tolerant and aluminium-sensitive wheat cultivars, *Plant Physiol.* 98 (1992) 230–237. 1992.
- HUANG, J.W., PELLET, D.M., PAPERNIK, L.A., AND KOCHIAN, L.V. Aluminum interactions with voltage-dependent calcium transport in plasma membrane vesicles isolated from roots of aluminum-sensitive and -resistant wheat cultivars. *Plant Physiol.* 110, 561–569. 1996.
- HUANG, P. M.; VIOLANTE, A. Influence of organic acids on crystallization and surface properties of precipitation products of aluminum. In: HUANG, P. M.; SCHNITZER, M. (Ed.). *Interactions of soil minerals with natural organic and microbes*. Madison: Soil Science of America, p. 159-221. 1986.
- HUE, N. V.; CRADDOCK, G. R.; ADAMS, F. Effect of organic acids on aluminum toxicity in subsoils. *Soil Science Society of America Proceedings*, Madison, v. 5, p. 28-34, 1986.
- IBGE, Levantamento Sistemático da Produção Agrícola 1996. <http://www.ibge.gov.br>. Consultado em 20/12/2002.
- JACOB-NETO, J. The interactions of H<sup>+</sup>/OH<sup>-</sup> exchanges between roots and rhizosphere with plant nutrition and aluminium effects. Cap. 3. Thesis PhD. University of Dundee. 1993.
- JENTSCHKE, G., SCHLEGEL, H., GODBOLD, D.L., The effect of aluminium on uptake and distribution of magnesium and calcium in roots of mycorrhizal Norway spruce seedlings, *Physiol. Plant.* 82: 266–270. 1991.
- JONES DL, KOCHIAN LV Aluminium inhibition of the inositol 1,4,5-triphosphate signal transduction pathway in wheat roots: a role in aluminium toxicity? *Plant Cell* 7: 1913-1922.1995.
- JONES, D.L. Organics acids in the rhizosphere – a critical review. *Plant and Soil*, 205:25-44. 1998.
- JONES, D.L.; DARRAH PR. Re-sorption of organic compounds by roots of *Zea mays* and its consequences in the rhizosphere. *Plant and Soil* 153, 47-59.1993.
- JONES, L.H. Aluminum uptake and toxicity in plants. *Plant and Soil*, v.13, p. 297, 1961.

- JORGE R.A., ARRUDAS, P. Aluminum-induced organic acids exudation by roots of an aluminum-tolerant tropical maize. *Phytochemistry* 45: 675-681. 1997.
- KASPAR, T.C., BROWN, H.J., KASSMEYER, E.M.. Corn root distribution as affected by tillage, wheel traffic, and fertilizer placement. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 55:1390-1394. 1991.
- KASPAR, T.C.; EWING, R.P. ROOTEDGE: Software for measuring root length from desktop scanner images. *Agronomy Journal*, v.89, 1997.
- KAYAMA, M., Comparison of the aluminium tolerance of *Miscanthus sinensis* Anderss and *Miscanthus sacchariflorus* Bentham in hydroculture. *Int. J. Plant Sci.* 162, 1025– 1031. 2001.
- KELTJENS, W.G. Plant adaptation and tolerance to acid soils; its possible Al avoidance – A review. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PLANT-SOIL INTERACTIONS AT LOW pH, 4., Viçosa, 1997. *Proceedings...* MONIZ, A.C.; FURLANI, A.M.C.; SCHAFFERT, R.E.; FAGERIA, N.K.; ROSOLEM, C.A.; CANTARELLA, H, eds. *Plant-soil interactions at low pH: sustainable agriculture and forestry production*. Campinas/Viçosa, SBCS, 1997. p.109-117.
- KELTJENS, W.G.; LOENEN, E. van. Effects of aluminium and mineral nutrition on growth and chemical composition of hydroponically grown seedlings of five different forest tree species. *Plant and Soil*, The Hague, v.104, p.39-50, 1989.
- KEMPH, G.S. Measuring fibrous roots with leaf area meter. *J. Range Management*, 29: 85-86, 1976.
- KERVEN, G.L.; ASHER, C.J.; EDWARDS, D.G.; OSTATEK-BOCZYNSKI, Z. Sterile solution culture techniques for aluminum toxicity studies involving organic acids. *Journal of Plant Nutrition*, v.14, n.9, p.975-985, 1991.
- KINRAIDE, T.B.; PARKER, D.R. Non-phytotoxicity of the aluminium sulfate ion,  $AlSO_4^+$ . *Physiologia Plantarum*, v.71, p.202-212, 1987.
- KIRBY, E. A. Influence of ammonium and nitrate nutrition on the cation-anion balance and nitrogen and carbohydrate metabolism of white mustard plants grown in dilute nutrient solution. *Soil Science*, Baltimore, v. 105, p. 133-141, 1968.
- KIRK, G.J.D, SANTOS E.E, FINDENEGG G.R. Phosphate solubilization by organic anion excretion from rice (*Oryza sativa* L.) growing in aerobic soil. *Plant Soil* 211:11–18. 1999.

- KLIMASHEVSKII, E. L.; CHERNYSHEVA, N. F. Content of organic, acids and physiologically active compounds in plants differing in their susceptibility to the toxicity of Al<sup>3+</sup>. Soviet Agricultural Sciences, Washington, v. 2, p. 5-8, 1980.
- KOCHIAN, L.V. Cellular mechanism of aluminum toxicity and resistance in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, v.46, p.237-260. 1995.
- KOLLMEIER, M., DIETRICH, P., BAUER, C.S., HORST, W.J., HEDRICH, R.,.. Aluminum activates a citrate permeable anion channel in the aluminum-sensitive zone of the maize root apex. A comparison between an aluminum-sensitive and an aluminum-resistant cultivar. Plant Physiol. 126, 397–410. 2001
- KURKDJIAN, A.; GUERN, J. Intracellular pH: measurement and importance in cell activity. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, Palo Alto, v. 40, p. 271-303, 1989.
- LARLEN, P.B.; DEGENHARDT, J.; TAI, C.; STEPHEN, H.H.; KOCHIAN, L.V. Aluminum-resistant Arabidopsis mutants that exhibit altered patterns of aluminum accumulation and organic acid release from roots. Plant Physiology, v.117, n.1, p.9-17, 1998.
- LARLEN, P.B.; TAI, C.; KOCHIAN, L.V; HOWELL, S.H. Arabidopsis mutants with increased sensitivity to aluminum. Plant Physiology, v.110, p.743-751, 1996.
- LEBOWITZ, R.J. Digital image analysis measurement of root length and diameter. Environ. Exp. Bot. 28:267-273. 1988.
- LEE, E. H.; FOY, C. D. Aluminum tolerances of two snapbean cultivars related to organic acid content evaluated by high performance liquid chromatography. Journal of Plant Nutrition, New York, v. 9, p. 1481-1498, 1986.
- LI, X.F., MA, J.F., HIRADATE, S., MATSUMOTO, H., Mucilage strongly binds aluminium but does not prevent roots from aluminium injury in *Zea mays*. Physiol. Plant 108, 152–160. 2000
- LI, X.F., MA, J.F., MATSUMOTO, H.,.. Pattern of aluminium- induced secretion of organic acids differs between rye and wheat. Plant Physiol. 123, 1537–1543. 2000.
- LORBIECKE, R; SAUTER, M. Adventitious root growth and cell cycle induction in deepwater rice (*Oryza sativa* L.). Plant Physiol. 119: 21-29. 1999.
- LUGANY, M.; POSCHENRIEDER, C.; BARCELÓ, J. Monitoring of aluminum induced inhibition of root elongation in four maize cultivars differing in tolerance to aluminum and proton toxicity. Physiologia Plantarum, v.93, p.265-271, 1995.

- LYNCH, J., AND VAN BEEM, J. Growth and architecture of seedling roots of common bean genotypes. *Crop Science* 33: 1253-1257. 1993.
- LYNCH, J.M. & J.M. WHIPPS. Substrate flow in the rhizosphere. *Plant Soil*. 129 : 1-10 . 1990.
- MA, J.F.; HIDRANTE, S.; NOMOTO, K; IWASHITA, T; MATSUMOTO, H. Internal detoxification mechanism of Al in *Hidrangea*. *Plant Physiology*, v.113, p.1033-1039, 1997.
- MA, J.F.; HIRADATE, S.; MATSUMOTO, H. High aluminum resistance in buckwheat. *Plant Physiology*, v.117, p.753-759, 1998.
- MA, J.F.; ZHENG, S.J.; FENG LI, X; TAKRDA, K.; MATSUMOTO, H. A rapid hydroponic screening for aluminum tolerance in barley. *Plant and Soil*, v.191, p.133-137, 1997.
- MA, J.F; RYAN, P.R; DELHAIZE, E. Aluminium Tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *TRENDS in Plant Science*. v. 6, n.6, p.1360 – 1385, 2001.
- MA, Z.; MIYASAKA, S.C. Oxalate exudation by taro in response to Al. *Plant Physiology*, v.118, p.861-865, 1998.
- MARSCHNER H. Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd Ed., Academic Press. 1995.
- MATSUMATO H., HIRASAWA F., TORKAI H., TAKAHASI E., Localization of absorbed aluminium in pea root and its binding to nucleic acids, *Plant Cell Physiol*. 17:127–137. 1976.
- MATSUMOTO, H. Cell biology of aluminium toxicity and tolerance in higher plants. *Int. Rev. Cytol*. 200: 1-46. 2000.
- MATTIELLO, E.M; MAURI, J; MATTIELLO, J.D; BRASIL, F.C; ZONTA, E; PEREIRA, M.G. Calibração de metodologia para estudos de sistema radicular de *Coffea canephora* com auxílio de análise digital de imagem. *FERTBIO* 2002. 4 pag. Rio de Janeiro. Anais do... CD-Row. 2002.
- MEHARG A.A., The role of the plasmalemma in metal tolerance in angiosperms, *Physiol. Plant*. 88:191–198. 1993.
- MENDONÇA, M.L.; ROSSIELLO, R.O.P.; FERNANDES, M.S.; ZONTA, E. Alkalinization as a mechanism of Al-rhizotoxicity escape in rice. In: *Plant-soil interactions at low pH: sustainable agriculture and forestry production*. MONIZ, A.C. *et al.* (Eds.) Campinas: Brazilian Soil Science Society, p.273. 1997.

- MENDONÇA, M.L.S. Estudo dos mecanismos de tolerância ao alumínio e sua variabilidade genotípica em arroz (*Oryza sativa* L.). Itaguaí: UFRRJ, 176p. (Tese de Mestrado). 1991.
- MENDONÇA, M.L.S.; FERNANDES, M.S.; ROSSIELLO, R.O.P. e FREIRE, L.R. Avaliação de 50 genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.) do Estado do Maranhão pela tolerância a alumínio em solução nutritiva. III Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal. UFV/SBFV, Viçosa, Resumos. p.39. 1991a.
- MENDONÇA, M.L.S.; ROSSIELLO, R.O.P. & FERNANDES, M.S. Caracterização de mecanismos de tolerância a toxidez de Al em arroz (*Oryza sativa* L.). III Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal. UFV/SBFV, Viçosa, Resumos. p.39. 1991b.
- MEZAVILLA, E.V.; GENUNCIO, G.C.; BRASIL, FC; ZONTA, E; ROSSIELLO, ROP. Avaliação do Crescimento Radicular de Plântulas de Arroz Por Meio de Análise de Imagens. In: XXIII REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 1998, Caxambú. FertBIO 98- Resumos da XXIII Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas. FLA/SBCS/SBM. v. 01, p. 377-377. 1998.
- MIYASAKA, S. C.; BUTA, J. G.; HOWELL, R. K.; FOY, C. D. Mechanism of aluminum tolerance in snapbeans: root exudation of citric acid. *Plant Physiology*, Rockville, v. 96, p. 737-743, 1991.
- MIYASAWA, M.; CHIERICE, G. O.; PAVAN, M. A. Amenização da toxicidade de alumínio a raízes do trigo pela complexação com ácidos orgânicos. *Revista Brasileira de ciência do Solo*, Campinas, v. 16, p. 209-215, 1992.
- MONIZ ET AL.(ED.) *Plant Soil Interactions at Low pH: sustainable agriculture and floresty production*. Campinas: Brazilian Soil Science Society, 1997.
- MORITA, A., FUJII, Y., YOKOTA, H., Effect of aluminium on exudation of organic anions in tea plants. In: Horst, W.J., Schenk, M.K., Burkert, A., Claassen, N., et al. (Eds.), *Plant Nutrition—Food Security and Sustainability of Agro-ecosystems*. Kluwer Acad. Publ, Dordrecht, pp. 508–509. 2001.
- MURPHY AS, EISINGER WR, SHAFF JE, KOCHIAN LV, TAIZ L. Early copper induced leakage of KC from *Arabidopsis* seedlings is mediated by ion channels and coupled to citrate efflux. *Plant Physiol*. 121:1375–82. 1999.

- MURPHY, S.L., SMUCKER. A.J.M. Evaluation of video image analysis and line-intercept methods for measuring root systems of alfalfa and ryegrass. *Agron. J.* 87:865-868. 1995.
- NEWMAN, E.I. A method of estimating the total length of root in a sample. *J. Appl. Ecology* 3:139-145. 1966.
- NICHOL B.E., OLIVEIRA L.A., Effects of aluminium on the growth and distribution of calcium in roots of an aluminium-sensitive cultivar of barley (*Hordeum vulgare*), *Can. J. Bot.* 73:1849–1858. 1995.
- NIELSEN, K.L; MILLER, C.R; BECK, D; LYNCH, J.P. Fractal geometry of root systems: Field observations of contrasting genotypes of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under different phosphorus regimes. *Plant and Soil* 206, 181-190. 1999.
- NOORDWIJK, M. van; GEIJN, S.C. van der. Root, shoot and soil parameters required for process-oriented models of crop growth limited by water or nutrients. *Plant and Soil*, v.183, p.1-25, 1996.
- NYE, P.H. Changes of pH across the rhizosphere induced by roots. *Plant and Soil* 61, 7–26. 1981
- NYE, P.H.; TINKER, P.B. Solute movement in the soil-root system. Oxford: Blackwell, 342p. 1977.
- OLMOS, J.J.L.; CAMARGO, M.N. Ocorrência de alumínio tóxico nos solos do Brasil, sua caracterização e distribuição. *Ciência e Cultura*, .28, p.171-180, 1976.
- OSAWA, H., MATSUMOTO, H., Differential regulation of Al-induced release of malate and K<sup>+</sup> in the root apex of wheat. In: Horst, W.J., Schenk, M.K., Buerkert, A., Claassen, N., et al. (Eds.), *Plant Nutrition—Food Security and Sustainability of Agro-ecosystems*. Kluwer Acad. Publ, Dordrecht, pp. 488–489. 2001.
- PACIORNIK, S.; SCURI, A. Processamento de imagens: Aplicações científicas e industriais. 2ª Edição. Deptº Ciência das matérias e metalurgia, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Coordenação Central de Extensão, 2000.
- PAN, W.L., BOLTON. R.P. Root quantification by edge discrimination using a desktop scanner. *Agron. J.* 83:1047-1052. 1991.
- PARKER, D.H. Root growth analysis: an underutilized approach to understanding aluminium rhizotoxicity. *Plant and Soil*, 171: 151-157, 1995.

- PELLET, D.M., D.L. GRUNES, L.V. KOCHIAN. Organic acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). *Planta* 196:788-795. 1995.
- PEREIRA, J. A.; CAMPELO, G. J. de A. Caiapó; cultivar de arroz de sequeiro de ciclo médio para o Piauí. Teresina: EMBRAPA-CPAMN, 3p. (EMBRAPA-CPAMN. Comunicado Técnico, 59). 1994.
- PEREIRA, J. A.; CAMPELO, G. J. de A. Carajás; cultivar de arroz de sequeiro precoce e resistente ao acamamento. Teresina: EMBRAPA-CPAMN, 3p. (EMBRAPA-CPAMN. Comunicado Técnico, 64). 1996.
- PEREIRA, J. A.; CAMPELO, G. J. de A.; BEZERRA, J. R. C. Araguaia e Rio Paranaíba; cultivares de arroz de sequeiro para o Piauí. Teresina: EMBRAPA-UEPAE de Teresina, 5p. (EMBRAPA-UEPAE de Teresina. Comunicado Técnico, 47). 1990.
- PIÑEROS, M.A., MAGALHAES, J.V., ALVES, V.M.C., V. KOCHIAN, L.V. The Physiology and Biophysics of an Aluminum Tolerance Mechanism Based on Root Citrate Exudation in Maize. *Plant Physiology*, Vol. 129, 1194–1206, 2002.
- PINTRO, J.; BARLOY, J.; FALLAVIER, P. Aluminium toxicity in corn plants cultivated in a low ionic strength nutrient solution. II. distribution of Al in the Principal root tip zone. *R. Bras. Fisiol. Vege.*, v.7, n.2, p.129-134, 1995.
- PINTRO, J.; BARLOY, J.; FALLAVIER, P. Possível mecanismo de tolerância do milho através da detoxicação interna do alumínio pelos ácidos orgânicos. Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, 26., Rio de Janeiro, 1997. Anais... Rio de Janeiro: SBCS, (CD ROM). 1997.
- POPP, M. und KINZEL H. Changes in the organic acid content of some cultivated plants induced by mineral ion deficiency. *J. Exp. Bot.* 32, 1-8. 1981:
- POULEUR, S. Accuracy of Measurements with Mac/WinRHIZO. Regent Instruments. Technical. <http://www.regent.qc.ca/products/rhizo/RHIZOhardware.html>. note #3. Consultado em 20/01/2003.
- RAMOS, F.T.; ROSSIELLO, R.O.P.; OLIVARES, F.L.; COSTA, A.P.S.; DORNELLES, M.S. Avaliação da penetração de corantes radiculares para detecção da tolerância diferencial ao alumínio em cultivares de arroz contrastantes. Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, 23., Caxambu, 1998. Resumos... Lavras: UFLA/SBCS/SBM, p.328. 1998.

- RENGEL, Z. Role of calcium in aluminum toxicity. *New Phytologist*, v.121, p.499-513, 1992.
- ROSSIELLO, R.O.P.; ARAÚJO, A.P.; MANZATTO, C.V.; FERNANDES, M.S. Comparação dos métodos fotoelétrico e da interseção na determinação de área, comprimento e raio médio radicular. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.30, p.633-639, 1995.
- ROUT G.R., SAMANTARAY S., DAS, P., Aluminium toxicity in plants: a review. *Agronomie*, 21: 3-21. 2001.
- RYAN P.R., DITOMASO J.M., KOCHIAN L.V., Aluminium toxicity in roots. An investigation of spatial sensitivity and the role of root cap, *J. Exp. Bot.* 44:437–446. 1993.
- RYAN, P.R., DELHAIZE, E., RANDALL, P.J., Characterization of Al-stimulated efflux of malate from the apices of Al-tolerant wheat roots. *Planta* 196, 103–110. 1995.
- RYAN, PR, DELHAIZE, E, JONES, DL. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52:527-560. 2001.
- SAMUELS, TIMMY D., KÜÇÜKAKYÜZ, KÖKSAL AND RINCÓN-ZACHARY, M. Aluminum partitioning patterns and root growth as related to the aluminum sensitivity and aluminum tolerance in wheat. *Plant Physiol.*, 113: 527-534. 1997.
- SANCHEZ, P.A.; LOGAN, T.J. Myths and science about the chemistry and fertility of soils in the tropics. In: LAL, R.; SANCHEZ, P.A. (eds.). *Myths and science of soils of the tropics*. Madison: Soil Science Society of America, p.35-46. (SSSA, Special publication, 29). 1992.
- SANCHEZ, P.A.; SALINAS, J.G. Low-input technology for managing Oxisols and Ultisols in tropical America. *Advances in Agronomy*, v.34, p.280-406, 1981.
- SASAKI, M.; YAMAMOTO, M.; MATSUMOTO, H. Lignin deposition induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum*) roots. *Physiologia Plantarum*, v.96, p.193-198, 1996.
- SCHOTTELNDREIER, M., NORDDAHL, M.M., STROM, L., FALKENGREN-GRERUP, U. Organic acid exudation by wild herbs in response to elevated Al concentrations. *Ann. Bot.* 87, 769–775. 2001.

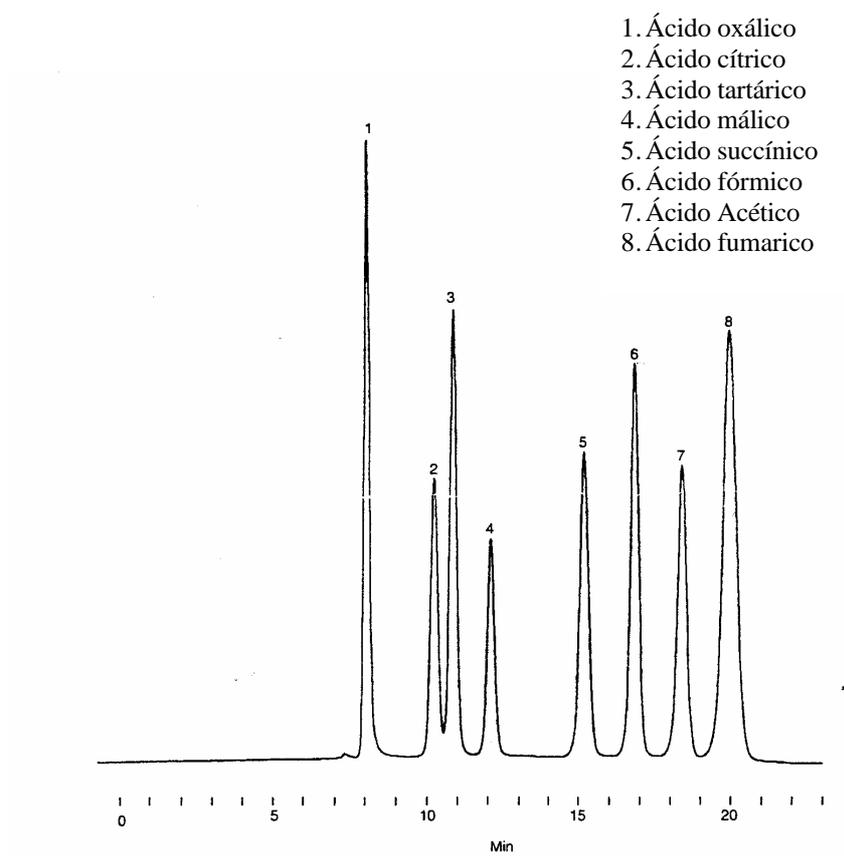
- SHI, B., CHOU, K., HAUG, A. Aluminium impacts elements of the phosphoinositide signalling pathway in neuroblastoma cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v.121, n.2, p.109-118, 1993.
- SILVA, I.R.; SMYTHA, T.J.; C. RAPER, D.; CARTER, T.E.; RUFTYB, T.W. Differential aluminum tolerance in soybean: An evaluation of the role of organic acids. *Physiologia Plantarum* 112: 200–210. 2001
- SIMMONS CR, LITTS JC, HUANG N, RODRIGUEZ RL Structure of a rice beta-glucanase gene regulated by ethylene, cytokinin, wounding, salicylic acid and fungal elicitors. *Plant Mole Biol* 18: 33-45. 1992.
- SIVAGURU M, FUJIWARA T, SAMAJ J, BALUSKA F, YANG Z, OSAWA H Aluminum-induced 1,3-b -D-glucan inhibits cell-to-cell trafficking of molecules through plasmodesmata. A new mechanism of aluminum toxicity in plants. *Plant Physiol.* 124: 991-1005. 2000.
- SIVAGURU, M; BALUSKA, F; VOLKMANN, D; FELLE, H; HORST, W.J. Impacts of aluminum on the cytoskeleton of maize root apex. Short-term effects on the distal part of the transition zone. *Plant Physiol.* 119: 1073-1082. 1999.
- SIVAGURU, M; HORST, W.J. The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize. *Plant Physiol.* 116: 155-163. 1998.
- SLASKI, J.J., Response of calmodulin-dependent and calmodulin-independent NAD kinase to aluminium in root tips from various cultivated plants, *J. Plant Physiol.* 136: 40–44. 1990.
- STRUTHERS, P.; SIELING, D.H. Effect of organic anions on phosphate precipitation by iron and aluminum as influenced by pH. *Soil Science*, v.69, p.205-213, 1950.
- SUHAYDA, C.A., HAUG, A., Organic acids reduce aluminium toxicity in maize root membranes, *Physiol. Plant.* 68:189–195. 1986.
- SUPELCO. Sigma-Aldrich Co Columns & Guard Columns HPLC. [http://www.sigmaaldrich.com/Brands/Supelco\\_Home.html](http://www.sigmaaldrich.com/Brands/Supelco_Home.html) -. Consultado em 1999.
- TAYLOR, G.J. Current views of aluminium stress response: the physiological basis of tolerance. *Curr. Top. Plant Biochem. Physiol.*, 10: 57-93, 1991.
- TAYLOR, G.J. Overcoming barriers to understanding the cellular basis of aluminium resistance. In: DATE, R.A.; GRUNDON, N.J.; RAYMENT, G.E.; PROBERT, M.E. (Eds.) *Plant Soil Interactions at Low pH: Principles and Management*. Dordrecht: Kluwer Academic, p.255-269. 1995.

- TAYLOR, G.J., The physiology of aluminium tolerance in higher plants, *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 19:1179–1194. 1988.
- TENNANT, D. A test of a modified line intersect method of estimating root length. *J. Ecol.* 63:995-1001. 1975.
- THAWORNWONG, N., van DIEST, A., Influences of high acidity and aluminium on the growth of lowland rice, *Plant and Soil* 41:141–159. 1974.
- TICE, K.R.; PARKER, D.R.; DEMANSON, D.A. Operationally defined apoplastic and simplastic aluminium fractions in root tips of aluminum intoxicated wheat. *Plant Physiology*, v.100, p.309-318, 1992.
- USDA, Natural Resources Conservation Service – NRCS. World Soil Resources Map Index, Washington, D.C., [http:// www.nrcs.usda.gov/ technical/ worldsoils/ mapindx](http://www.nrcs.usda.gov/technical/worldsoils/mapindx). consultado em 23/10/2002.
- VASCONCELOS, S.S. Métodos de avaliação da tolerância à toxicidade de alumínio em cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.). Seropédica: UFRRJ, 134p. (Tese de Mestrado). 1997.
- VASCONCELOS, S.S., ROSSIELLO, R.O.P.; JACOB NETO, J.; VASCONCELOS, L.G., FEBRER, M.C. Níveis Críticos de toxicidade de alumínio em plantulas de arroz. XII Congresso Latino Americano de Ciência do Solo. Águas Lindoia, SP. CD ROM. 4p. 1996,
- VASCONCELOS, S.S., ROSSIELLO, R.O.P.; JACOB NETO, J.; VASCONCELOS, L.G., FEBRER, M.C. Níveis Críticos de toxicidade de alumínio em plantulas de arroz. XII Congresso Latino Americano de Ciência do Solo. Águas Lindoia, SP. 1996, CD ROOM. 4p.
- VASCONCELOS, S.S.; JACOB-NETO, J.; ROSSIELLO, R.O. P. Differential root responses to aluminum stress among brazilian rice genotypes. *Journal Plant Nutrition*. 25(3)655-669. 2002.
- VICENTE, F.M.P.; ROSSIELLO, R.O.P.; PEREIRA, M.B. Características indicativas de sensibilidade ao alumínio em arroz. I. Crescimento em solução nutritiva. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.33, n.1, p.9-15, 1998a.
- VICENTE, F.M.P.; ROSSIELLO, R.O.P.; PEREIRA, M.B. Características indicativas de sensibilidade ao alumínio em arroz. II. Correlação canônica com produção. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.33, n.1, p.49-54, 1998b.
- WHEELER, D.M.; EDMEADES, D.C.; CHRISTIE, R.A.; PUTTERILL, J.; GARDNER, R. Effect of aluminum and pH on relative yield and plant chemical

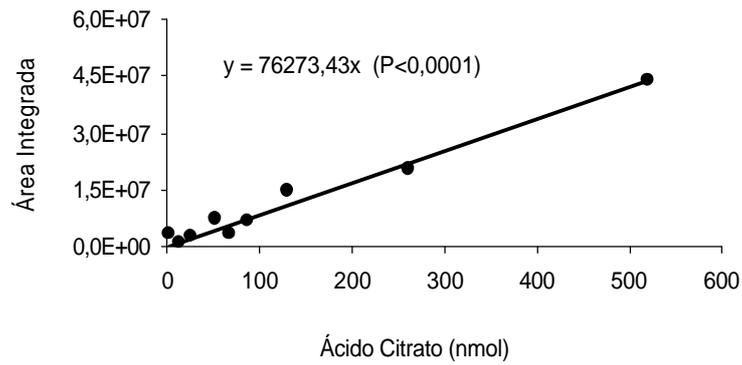
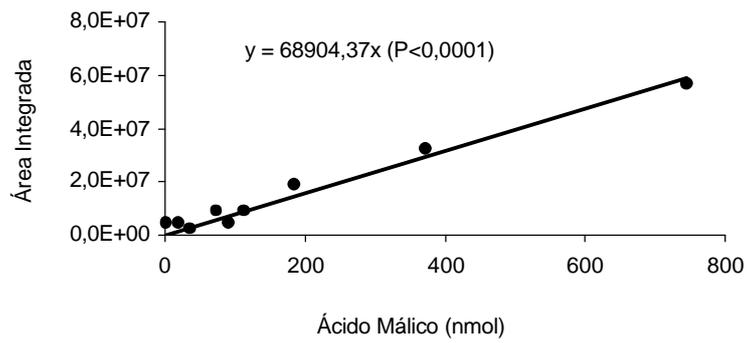
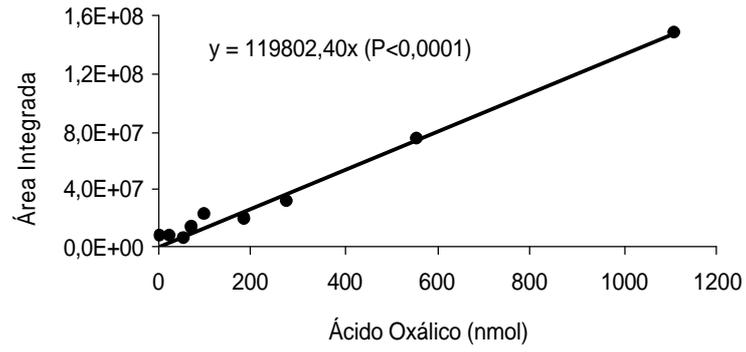
- concentrations of 7 dicotyledonous species grown in solution culture at low ionic strength. *Journal of Plant Nutrition*, v.15, n.4, p.419-433, 1992.
- WRIGHT, R.J. Soil aluminum toxicity and plant growth. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, v.20, n.15/16, p.1479-1497, 1989.
- YAMADA, T. Convivendo com a acidez do solo. *Informações Agronômicas*. POTAFÓS. n° 91. 2000.
- YANG, Z.M., SIVAGURU, M., HORST, W.J., MATSUMOTO, H., Aluminum tolerance is achieved by exudation of citric acid from roots of soybean. *Physiol. Plant* 110, 72–77. 2000.
- YERMIYAHU, U., D.K. BRAUER AND T.B. KINRAIDE. Sorption of aluminum to plasma membrane vesicles isolated from root of Scout 66 and Atlas 66 wheat. *Plant Physiol.* 115:1119-1125. 1997.
- YERMIYAHU, U., G. RYTWO, D.K. BRAUER AND T.B. KINRAIDE. Binding and electrostatic attraction of lanthanum (La<sup>3+</sup>) and aluminum (Al<sup>3+</sup>) to wheat root plasma membranes. *J. Membr. Biol.* 159:239-252. 1997.
- YERMIYAHU, U., S. NIR, G. BEN-HAYYIM, U. KAFKAFI AND T.B. KINRAIDE. Root elongation in saline solution related to calcium binding to root cell plasma membranes. *Plant and Soil* 191:67-76. 1997.
- ZHANG, G; HODDINOTT, J; TAYLOR, G.J. Characterization of 1,3 b glucan (callose) synthesis in roots of *Triticum aestivum* in response to aluminum toxicity. *J. Plant Physiol.* 144: 229-234. 1994.
- ZHENG, S.J.; MA, J.F.; MATSUMOTO, H. High aluminum resistance in buckwheat. I. Al – induced specific secretion of oxalic acid from root tips. *Plant Physiology*, v.117, p. 745-751, 1998a.
- ZHENG, S.J; MA, J.F; MATSUMOTO, H. Continuous secretion of organic acids is relate to aluminium resistance during relatively long-term exposure to aluminium stress. *Physiologia Plantarum.* 103:209-214. 1998b.
- ZONTA, E. Caracterização fisiológica da resposta à adubação nitrogenada em duas cultivares de arroz. Seropédica: UFRRJ, 164p. Tese de Mestrado. 1996.
- ZONTA, E; LOPES, C.O; VIEIRA, A.C.; FERREIRA, M.; SOUTO,R.L.; ROSSIELLO, R.O.P. Uso da dimensão fractal na investigação dos efeitos de alumínio nas raízes de arroz. In: XXIV REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 2000, Santa Maria - RS. Anais. Santa Maria: SBCS. v. 1. 2000a

- ZONTA, E.; VASCONCELOS, SS; ROSSIELLO, ROP; SOUTO, RL. Efeitos do estresse de alumínio sobre a morfologia radicular de uma cultivar tolerante de arroz de sequeiro. In: XXIV REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS 2000. Santa Maria. Anais. Santa Maria - RS: Universidade Federal de Santa Maria, 2000b.
- ZONTA, E; PEREIRA, M.G.P; LIMA, E; COMETTI, N.N; CHAGAS, K.A; SOUTO, R.L; ROSSIELLO, R.O.P; Tolerância ao Al em Arroz: uma característica variável com disponibilidade de nutrientes e cultivar. Fertbio2002. Rio de Janeiro. CD rom. 4 pag. 2002.
- ZONTA, E; SOUTO, R.L; ROSSIELLO, R.O.P; Amenização da toxicidade do alumínio por ácido cítrico em dois cultivares de arroz de sequeiro. CBCS. Anais. Londrina.PR. 2001.
- ZOON, F.C., VAN TIENDEREN, P.H. A rapid quantitative measurement of root length and root branching by microcomputer image analysis. Plant Soil 126:301-308. 1990.

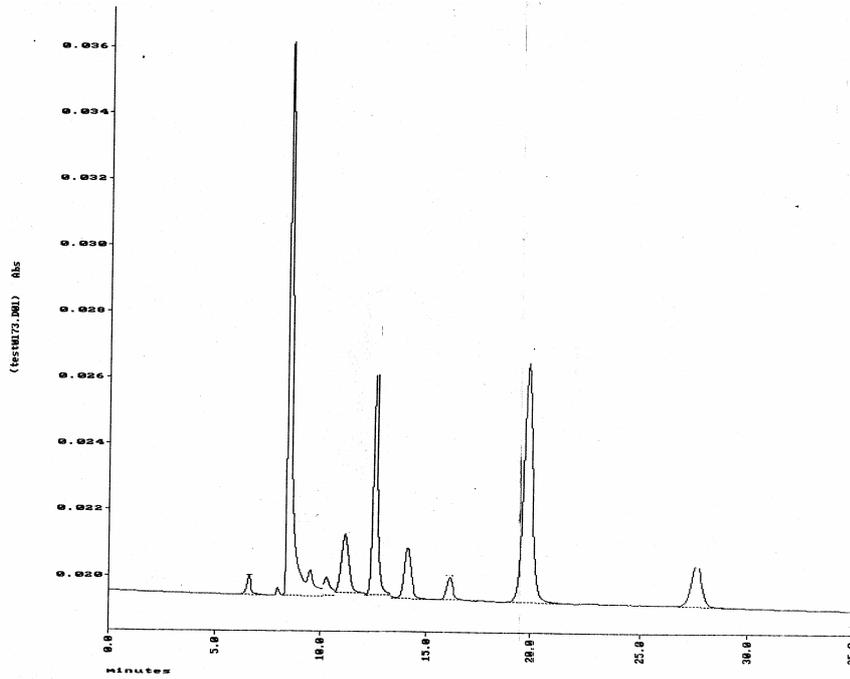
## ANEXOS



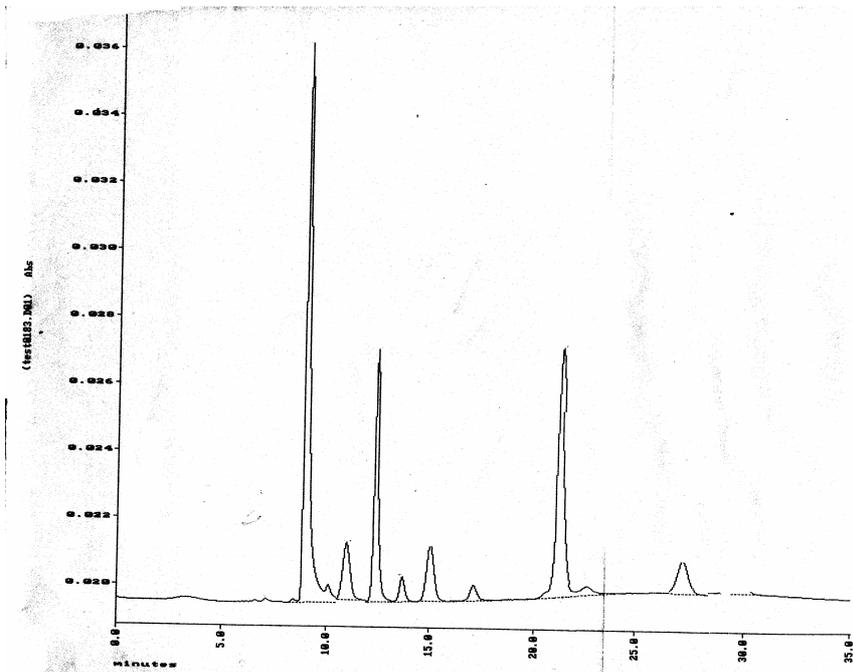
Anexo 1. Cromatograma dos padrões dos ácidos na coluna SUPELCOGEL C-610H. SUPELCO, 1999.



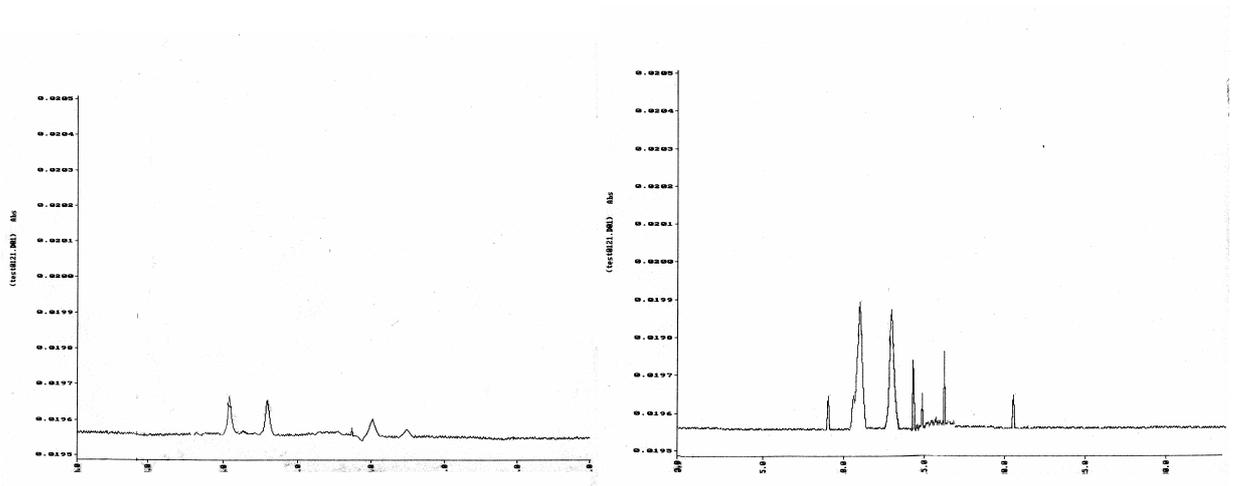
Anexo 2. Curvas de calibração utilizadas para determinação dos ácidos de interesse (ácido cítrico, málico e oxálico).



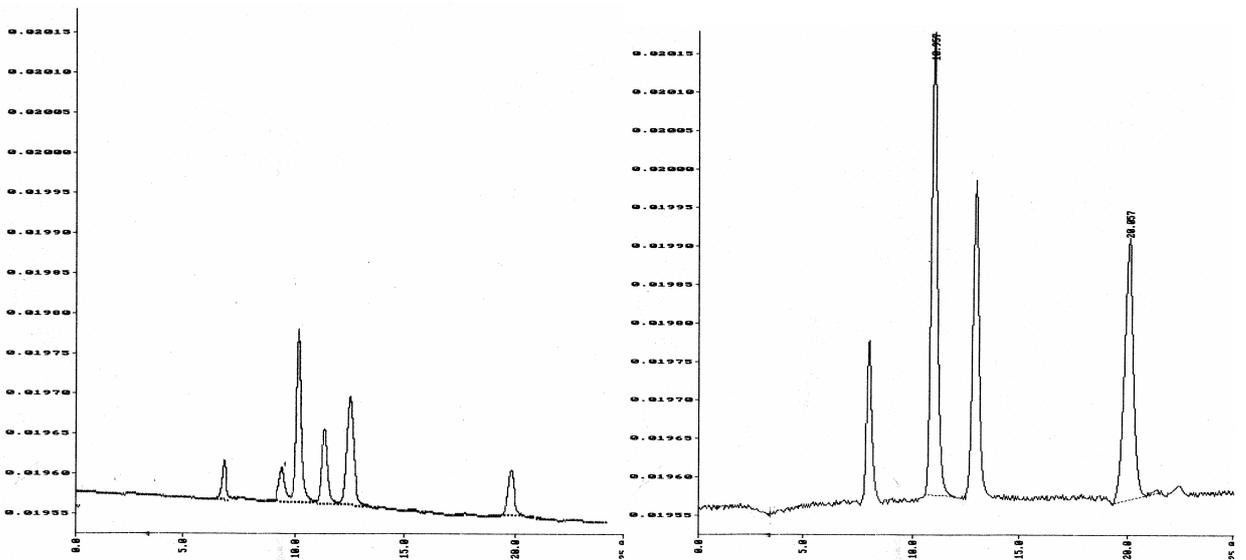
Anexo 3. Cromatograma típico da amostra padrão no tempo 0. Novembro de 2000.



Anexo 4. Cromatograma típico da amostra padrão após 6 meses de armazenamento. Abril de 2001.



Anexo 5. Perfil cromatográfico da exudação de ácidos orgânicos por Caiapó e Comum Branco, respectivamente, submetidas a 160  $\mu\text{mol}$  de Al por 4 dias.



Anexo 6. Perfil cromatográfico de ácidos orgânicos contidos no sistema radicular das variedades de arroz de sequeiro Caiapó e Comum Branco, respectivamente submetidas a 160  $\mu\text{mol}$  de Al por 4 dias.