

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

EXSUDAÇÃO DE MALATO E TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO TÓXICO  
EM AVEIA HEXAPLÓIDE

Cássio Barcellos Hervé  
Biólogo/PUCRS

Dissertação apresentada como um dos requisitos  
à obtenção do grau de Mestre em Fitotecnia  
Ênfase Melhoramento e Biotecnologia Vegetal

Porto Alegre (RS), Brasil  
Agosto de 2013



DEDICO

*Aos meus pais Ana Maria  
Barcellos Hervé e Hegel  
Mesquita Hervé e aos meus  
irmãos Marcos e Bruno.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente a Professora Dra. Carla Andréa Delatorre, pela paciência e dedicação em todos os ensinamentos. À minha família por estar sempre ao meu lado, em especial a minha noiva, Fernanda Casa Nova pelo incentivo, compreensão e amor incondicional.

# EXSUDAÇÃO DE MALATO E TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO TÓXICO EM AVEIA HEXAPLÓIDE<sup>1</sup>

Autor: Cássio Barcellos Hervé  
Orientadora: Carla Andréa Delatorre

## RESUMO

A presença de alumínio (Al) reduz o rendimento em solos ácidos ou em áreas onde o subsolo possui pH abaixo de cinco. O alumínio limita o crescimento radicular e, conseqüentemente, a absorção de água e nutrientes. Esta pesquisa tem como objeto analisar a exsudação de malato como mecanismo principal de tolerância ao alumínio tóxico em genótipos de aveia hexaplóide e identificar o grau de tolerância ao alumínio em genótipos elite não selecionados diretamente para esta característica. Neste estudo os genótipos de aveia foram avaliados em solução nutritiva. Foi utilizado, como parâmetro de comparação da tolerância ao Al, a média e distribuição de frequência de recrescimento radicular após a exposição ao Al. O recrescimento da raiz principal dos genótipos elite foi comparado com os controles UFRGS 17 (tolerante) e UFRGS 930598-6 (sensível). Foram avaliadas as linhagens UFRGS 057005-1 e UFRGS 057022-2, e as cultivares comerciais URS Guria, URS Torena, URS Penca, URS Guará, URS Charrua, URS Tarimba, URS Taura, URS Guapa e URS 21. A amplitude de recrescimento da raiz dentro de cada genótipo foi elevada, sendo a menor de 15mm e a maior de 44mm. As cultivares URS Charrua e URS Guapa demonstraram tolerância superior a UFRGS 17. URS Tarimba, apesar da média similar a UFRGS 17, mostrou distribuição de frequência mais positiva. URS Torena, UFRGS 057005-1 e URS Penca classificaram-se como intermediárias, sendo inferiores a UFRGS 17. Nenhum dos genótipos elite apresentou médias de recrescimento igual ou inferior às obtidas pelo controle sensível, UFRGS 930598-6. A exsudação de malato é considerada um mecanismo de tolerância ao Al, quelando estes íons, comum em cereais. O genótipo UFRGS 17, ao contrário de UFRGS 930598-6, exsudou quantidades mensuráveis de malato na solução em resposta ao Al (49,33nmol/planta). Apesar disso, houve acúmulo de Al tanto em raiz, quanto em parte aérea, havendo quantidade significativamente maior na raiz.

---

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (54p.) Agosto, 2013.

# MALATE EXUDATION AND TOXIC ALUMINUM TOLERANCE IN HEXAPLOID OAT<sup>1</sup>

Autor: Cássio Barcellos Hervé  
Orientadora: Carla Andréa Delatorre

## ABSTRACT

The presence of aluminum (Al) in either acid soils or in areas with low pH in the subsoil limits crop yield. It reduces root growth therefore, constraining water and nutrient uptake. Superior oat (*Avena sativa* L.) genotypes not directly selected for Al tolerance were evaluated in hydroponic solution in this study. The root regrowth mean and the frequency distribution after Al treatment were used to compare the tolerance. UFRGS 17 (tolerant) and UFRGS 930598-6 (sensitive) were used as controls. The lines UFRGS 057005-1 and UFRGS 057022-2, and the cultivars URS Guria, URS Torena, URS Penca, URS Guará, URS Charrua, URS Tarimba, URS Taura, URS Guapa and URS 21 were evaluated. The root regrowth amplitude for each genotype was considered high and varied from 15 mm to 44mm. URS Charrua and URS Guapa were considered more tolerant than UFRGS 17. URS Tarimba, despite the similar mean to UFRGS 17, displayed a more positive frequency distribution. URS Torena, UFRGS 057005-1 and URS Penca fell within the intermediate class, inferior to UFRGS 17. None of the genotypes showed root regrowth means equal or inferior to UFRGS 930598-6. By chelating ions, malate exudation is considered a common mechanism for aluminum tolerance in cereal. UFRGS 17, opposite to UFRGS 930598-6, exuded measurable amounts of malate in the solution in response to Al (49,33nmol/plant). In spite of the exudation, Al was found in the roots as well as in the shoots, with significantly higher amounts in the roots.

---

<sup>1</sup> Master of Science dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (54p.) August, 2013.

## SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Hipóteses científicas .....	3
1.2 Hipótese secundária .....	3
1.3 Objetivo principal .....	3
1.4 Objetivos específicos .....	3
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	5
2.1 A importância da aveia .....	6
2.2 O alumínio no solo .....	7
2.3 O efeito do alumínio nas plantas .....	8
2.3.1 Inibição do crescimento radicular .....	9
2.3.2 Alterações na parede celular .....	10
2.3.3 Alterações na membrana plasmática .....	11
2.3.4 Estresse oxidativo .....	12
2.3.5 Dano ao DNA .....	13
2.4 Mecanismos de tolerância ao alumínio .....	13
2.4.1 Fluxo iônico .....	14
2.4.2 Sistema antioxidante .....	14
2.4.3 Exsudação de ácidos orgânicos .....	16
2.4.4 Secreção de mucilagem .....	18
2.4.5 Sequestro e redistribuição do Al <sup>3+</sup> .....	18
2.4.6 Sinalização .....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	21
3.1 Material Vegetal .....	21
3.2 Preparo das sementes .....	25
3.3 Recrescimento .....	25
3.4 Malato exsudado na solução .....	28
3.5 Acúmulo de alumínio nos órgãos vegetais .....	29
3.6 Malato presente na mucilagem .....	29
3.7 Histolocalização de Al .....	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31
4.1 Análise de recrescimento .....	31
4.2 Fenotipagem de genótipos elite de aveia hexaplóide .....	34
4.3 Histolocalização do Al .....	42
4.4 Malato exsudado na solução .....	43
4.5 acúmulo de alumínio nos órgãos vegetais .....	45

5 CONCLUSÕES .....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49



## RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Genealogia dos genótipos elite de aveia hexaplóide.....	22
2. Composição da solução nutritiva: fontes minerais usadas e concentração final.....	27
3. Distribuição das formas de Al disponíveis na solução hidropônica em pH 4.0.....	41
4. Distribuição das formas de Al disponíveis na solução hidropônica em pH 4.5.....	41
5. Concentração de Al nas raízes e parte aérea dos genótipos UFRGS 17 e UFRGS 930598 após 24 horas de exposição ao Al.....	46

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Frequência de recrescimento da raiz principal após choque de Al (740 $\mu$ M).....	32
2. Distribuição de frequência do comprimento total da raiz principal após término do experimento (sete dias).....	32
3. Alteração de direção do crescimento da raiz de plantas de aveia e presença de mucilagem em resposta a exposição a 740 $\mu$ M Al.....	33
4. Distribuição de frequência de recrescimento de genótipos elite de aveia hexaplóide após choque de Al (740 $\mu$ M).....	35
5. Comparação do recrescimento da raiz após exposição ao alumínio entre genótipos elite de aveia hexaplóide.....	38
6. Histolocalização de Al em cortes transversais de raízes de genótipos de aveia hexaplóide, submetidas ao tratamento com Al através do método de coloração via hematoxilina. (A e B) URS Guapa, (C e D) UFRGS 17 expostos a 500 $\mu$ M e 1000 $\mu$ M de Al, respectivamente. Cor roxa localiza Al (aumento 100x).....	42

## 1 INTRODUÇÃO

O alumínio (Al) é um elemento químico facilmente encontrado na crosta terrestre que em presença de solos ácidos ( $\text{pH} < 5$ ), se solubiliza, assumindo a forma  $\text{Al}^{3+}$ , tóxico para as plantas. Diferentes cultivares de espécies vegetais apresentam diferentes níveis de tolerância ao Al e diferentes mecanismos fisiológicos em resposta a este elemento.

Em aveia (*Avena sativa* L.), como nos demais cereais, a presença de  $\text{Al}^{3+}$  em solos ácidos tem como efeito primário a inibição do crescimento radicular, podendo ser constatada horas após a exposição, limitando a absorção de água, e conseqüentemente restringindo o crescimento. O estresse causado por  $\text{Al}^{3+}$ , quando mais prolongado, resulta em estresse oxidativo, peroxidação de lipídeos e desestabilidade de membranas. Pela série de estresses resultantes, a presença de Al em solos ácidos é considerada um importante fator limitante no rendimento de grãos em cereais.

A característica tolerância ao  $\text{Al}^{3+}$  é geneticamente herdável, sendo os mecanismos genéticos e fisiológicos responsáveis por esta característica ainda pouco compreendidos. Em alguns cultivares é apontada a possibilidade de uma detoxificação interna, através do metabolismo antioxidante, resultando em redução do estresse oxidativo. Outro sistema seria de detoxificação externa,

através da exsudação de ácidos orgânicos capazes de formar complexos com o Al evitando, ou diminuindo, sua interação com a planta.

A presente pesquisa busca investigar o desempenho de genótipos de aveia quanto à tolerância ao Al. A identificação dos diferentes mecanismos fisiológicos capazes de promover a tolerância ao Al permite que combinando estas estratégias, seja possível o desenvolvimento de genótipos de aveia mais adaptados a esta condição de estresse, assim como outras espécies vegetais.

Devido à má alimentação atual e o contínuo aumento populacional, é estimado um aumento de 40% na demanda alimentícia até o ano de 2030. Quando será necessário estratégias que permitam um aumento na produção de grãos em áreas já ocupadas, como o aumento de rendimento de plantas alimentícias em presença de solos ácidos (Julian *et al.*, 2013).

Duas linhas de trabalho foram desenvolvidas nesta pesquisa, uma buscando quantificar a produção e exsudação de malato e o conteúdo de Al em tecidos de genótipos contrastantes, e outra avaliando a tolerância ao Al em genótipos elite não selecionados diretamente para tolerância a este estresse e o acúmulo de Al nas raízes destes.

### **1.1 Hipóteses científicas**

O mecanismo principal de tolerância ao Al em UFRGS 17 é apoplástico, o qual depende da exsudação de ácidos orgânicos.

Considerando que não houve seleção direta para tolerância ao Al durante o processo de melhoramento, a ocorrência desta é variada nos genótipos elite.

### **1.2 Hipótese secundária**

A exsudação de malato em resposta à exposição ao Al é diferenciada entre genótipos sensíveis e tolerantes de aveia hexaplóide, contribuindo para a tolerância ao Al.

### **1.3 Objetivo principal**

Analisar a exsudação de malato como mecanismo principal de tolerância ao alumínio tóxico em genótipos de aveia hexaplóide e identificar o grau de tolerância ao Al em genótipos elite não selecionados diretamente para esta característica.

### **1.4 Objetivos específicos**

Quantificar o acúmulo de alumínio nos órgãos vegetais de plantas de UFRGS 17 (tolerante) e UFRGS 930598-6 (sensível) expostas ao Al.

Verificar a existência de malato nas raízes e mucilagem em condições de presença e ausência de estresse por alumínio, nos genótipos UFRGS 17 e UFRGS 930598-6.

Comparar a liberação de malato na solução hidropônica, em condição de estresse por Al e sem o estresse, e entre os genótipos UFRGS 17 (tolerante) e UFRGS 930598-6 (sensível).

Fenotipar, quanto à tolerância ao Al, genótipos elite de aveia hexaplóide desenvolvidos pelo Programa de Melhoramento de Aveia da UFRGS.

Visualizar o acúmulo de Al nos tecidos de raiz dos genótipos elite em decorrência do incremento da dose de Al.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O Al é o terceiro elemento em ordem de abundância na crosta terrestre (Clarke & Washington, 1924). As plantas, com suas raízes fixadas ao solo, comumente se deparam com grandes quantidades deste elemento. No entanto, para que esta exposição cause danos, é necessário que o pH do solo esteja abaixo de 5, o que é uma característica presente em cerca de 50% dos solos que permitem a prática agrícola por todo o mundo (MA et al., 2001; Piñeros *et al.*, 2002). O solo ácido (pH<5) faz com que o Al presente, se solubilize, na forma de  $Al^{3+}$ , tóxico. Assim, interagem com a superfície celular ou são absorvidos pelas plantas, causando diversas alterações fisiológicas e bioquímicas. Tais alterações prejudicam diretamente o metabolismo das plantas, tendo seus efeitos variados de acordo com a espécie vegetal (Delhaize *et al.*, 2012).

A aveia, juntamente com outros cereais de importância agrônômica, tem como fator limitante de rendimento, o solo ácido com presença de Al. Uma estratégia muito utilizada na agricultura é a aplicação de calcário, visando elevar o pH do solo, diminuindo assim os danos causados devido à acidez do solo. No entanto, esta prática quando associada ao sistema de plantio direto não é totalmente eficaz, pois tem sua ação restrita às camadas mais superficiais do solo. Assim, o desenvolvimento do sistema radicular pode

tornar-se limitante, especialmente se associado à deficiência hídrica. A compreensão de diferentes mecanismos de tolerância ao Al e o melhoramento genético ainda são vistos como a melhor maneira de resolver estes problemas (Degenhardt *et al.*, 1998; Echart & Cavalli-molina 2001).

Genótipos de aveia tolerantes ao Al e adaptados às condições brasileiras têm sido desenvolvidos (Sánchez-chacón *et al.*, 2000) pelos programas de melhoramento. No entanto, o mecanismo de tolerância ainda não é conhecido.

A identificação dos mecanismos utilizados por cada genótipo permitiria a piramidização destes mecanismos, na condição de genes aditivos e, por consequência, incrementos no nível de tolerância ao Al.

## **2.1 A importância da aveia**

A aveia pertence à família Poaceae e, das diversas espécies do gênero *Avena*, duas são mais cultivadas, a *Avena sativa* L., conhecida como aveia branca e a *Avena strigosa* K. conhecida como aveia preta, ou vermelha (Suttie & Reynolds, 2004).

A aveia é um cereal de estação fria e, portanto sua produção é maior em regiões de temperaturas mais baixas, como as encontradas no sul do Brasil, Uruguai, Argentina e Chile. Porém, devido a sua alta variabilidade e adaptação, hoje em dia seu cultivo pode ser realizado nas mais variadas regiões do mundo (Murphy & Hoffman, 1992). A aveia é um cereal que apresenta várias possibilidades de utilização, como: alimentação animal, forragem verde, feno, silagem ou componente da ração animal e na alimentação humana, através dos grãos (Marshall *et al.*, 2013). Também sendo utilizada como cobertura e



proteção do solo, a fim de manter a permeabilidade do solo, diminuir a erosão, permitir a reciclagem dos nutrientes e aumentar a atividade biológica (Primavesi, 2006). Na região Sul e em partes das regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, é cultivada para obtenção de grãos e palha, para cobertura, proteção e preparo do solo para as culturas de verão, devido à utilização do sistema de plantio direto (Ceccon *et al.*, 2004; Suttie & Reynolds, 2004).

O cultivo de aveia no Brasil, mais precisamente na região Sul, iniciou pela introdução de variedades desenvolvidas para os ambientes dos Estados Unidos e Argentina, as quais apresentaram pouca adaptação ao clima do Brasil. Desde o início da implantação do cultivo de aveia no Rio Grande do Sul, o objetivo era primeiramente a utilização como forragem verde e pasto para os animais, e posteriormente para a colheita dos grãos. Como as variedades de aveia utilizadas não estavam totalmente adaptadas ao clima do Brasil, os grãos eram de baixa qualidade e não eram utilizados para alimentação humana, inviabilizando sua comercialização. Os grãos de aveia tinham que ser importados, do Uruguai e Argentina. Estas limitações estimularam o início dos programas de melhoramento de aveia (Federizzi, 2002).

## **2.2 O alumínio no solo**

O Al é o metal predominante na crosta terrestre (Kumari *et al.*, 2008), onde é comumente encontrado em óxidos ou alumino silicatos, inofensivos às plantas. Porém, quando em presença de solos ácidos ( $\text{pH} < 5$ ), o Al se solubiliza, assumindo a forma trivalente ( $\text{Al}^{3+}$ ), altamente tóxico para as plantas (Ma & Furukawa, 2003). O  $\text{Al}^{3+}$  é solúvel na água retida no solo, entrando em contato com as raízes das plantas.

Grande parte dos solos aráveis do mundo, cerca de 30%, são solos ácidos (Uexküll & Mutert, 1995). Dentre os quais, grande parte está localizada nas regiões tropicais e subtropicais, atingindo países em desenvolvimento, onde a quantidade de comida não é abundante e o estresse por Al representa um dos fatores limitantes da produção de grãos colocando a segurança alimentar em risco (Liu *et al.*, 2008; Kochian *et al.*, 2005).

A acidificação dos solos é um processo contínuo, ocorrendo naturalmente, e acelerado pela ação do homem. A liberação de contaminantes na atmosfera pelas indústrias e o uso de fertilizantes contendo amônia e amida, são ações que contribuem para que a acidez do solo aumente. Na América Latina, os solos ácidos, apresentando pouca quantidade de cátions, nitrogênio e fosfato disponíveis para as plantas, em conjunto com a alta quantidade de Al tóxico são fatores que limitam a produção agrícola (Tabaldi *et al.*, 2009).

### **2.3 Efeito do alumínio nas plantas**

O Al interfere em diversos processos celulares, alguns detectáveis em minutos após a exposição e outros, de longo prazo, levam horas ou até dias para que possam ser observados. As respostas observadas em longo prazo podem ocorrer devido a uma cadeia de respostas em decorrência à exposição ao  $Al^{3+}$ , como o estresse oxidativo (Kochian *et al.*, 2005). O estudo dos efeitos do Al nas plantas, assim como dos mecanismos de tolerância, são essenciais para que novos cultivares sejam desenvolvidos com maior tolerância aos solos ácidos (Nava, 2005).

As principais consequências do estresse são inibição do crescimento radicular, causando a deficiência de nutrientes e limitação hídrica (Degenhardt

*et al.*, 1998); interações com a parede celular; alterações na fluidez da membrana plasmática; competição por canais iônicos, além de interferência no funcionamento enzimático e indução da planta ao estresse oxidativo (Kochian *et al.*, 2005).

### **2.3.1 Inibição do crescimento radicular**

Um dos primeiros efeitos do Al nas plantas é a inibição do crescimento radicular, podendo ser constatada minutos após a exposição. Enquanto a maior parte do Al interage com a região apoplástica, aos poucos o Al vai penetrando as células. De imediato é inibido o crescimento e alongamento das células da raiz e em exposições prolongadas, o Al interage com o núcleo celular, resultando na inibição da divisão celular (Hartwig *et al.*, 2007). A inibição do crescimento radicular resulta em raízes menores, prejudicando a absorção de água e minerais, afetando o crescimento da planta como um todo.

A zona de transição entre a região de divisão celular e a região de alongamento é considerada a mais sensível ao Al, pois as células desta zona são competentes para o rápido alongamento com a vacuolização e reorganização do citoesqueleto devido as propriedades mecânicas de suas paredes (Sivaguru & Horst, 1998; Verbelen *et al.*, 2006).

Recentemente foram identificados em *arabidopsis* dois genes, *ATR-4* e *ALT2*, envolvidos na redução da raiz na presença de Al. Esses genes foram identificados em mutantes onde houve supressão da hipersensibilidade ao Al do mutante *als3* (Rounds & Larsen, 2008; Nezames *et al.*, 2012). Sugere-se que o Al atue danificando o DNA, e que a inibição do crescimento radicular, pelo menos em parte, surja a partir da detecção e resposta a esse dano por

TANMEI/ALT2 e ATR. Ambos ativamente impedem a progressão do ciclo celular e forçam a diferenciação do centro quiescente (Rounds & Larsen, 2008; Nezames *et al.*, 2012).

### 2.3.2 Alterações na parede celular

Em decorrência da exposição ao Al, foram observadas modificações na parede celular de células radiculares de diferentes cultivares de trigo (*Triticum aestivum* L.). A parede celular apresentou uma composição diferenciada de polissacarídeos na região de crescimento, resultando em uma parede mais espessa e mais rígida, embora não tenha sido descartada a possibilidade de uma interação direta entre Al e parede celular (Tabuchi & Matsumoto, 2001). Em cevada (*Hordeum vulgare*), o Al causou redução na síntese de celulose (Teraoka *et al.*, 2002).

O Al tem alta afinidade por grupos fosfatos, sulfato e carbóxilos, podendo afetar muitos componentes celulares (MacKinnon *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 1999). Parte dos alvos do Al são componentes da parede celular, tais como pectinas, onde afeta negativamente as propriedades mecânicas da parede celular (Barceló *et al.*, 1996; Poschenrieder *et al.*, 2008). Em milho, observa-se rigidez da parede, causada possivelmente pela troca do  $\text{Ca}^{+2}$  por Al (Jones *et al.*, 2006).

O  $\text{Ca}^{+2}$  em condições normais se liga as pectinas auxiliando na manutenção da estrutura destas. O Al, devido à carga, consegue se ligar com mais força as pectinas removendo o  $\text{Ca}^{+2}$ . E os sintomas de toxidez são amenizados por elevada atividade externa de  $\text{Ca}^{+2}$  (Rengel & Zhang, 2003).

### 2.3.3 Alterações na membrana plasmática

A membrana plasmática é onde ocorrem os primeiros contatos do simplasto com o Al, podendo resultar em alterações na permeabilidade da membrana. Também é onde os primeiros sinais de tolerância ao Al podem aparecer de acordo com a sua constituição (Wagatsuma *et al.*, 2005). O Al tem a capacidade de se ligar fortemente onde há cargas negativas (grupos carboxila e fosfatos da membrana plasmática). Desta maneira, interfere nos sítios de ligação de cátions como  $\text{Ca}^{2+}$ . Resultando em alteração das interações iônicas e fluidez da membrana (Barceló *et al.*, 1996; Kochian *et al.*, 2005), modificando o potencial de membrana e a atividade de canais iônicos (Rengel & Zhang, 2003), inibindo a bomba de prótons ( $\text{H}^+$ -ATPase) (Ahn *et al.*, 2001) e causando peroxidação de lipídeos (Yamamoto *et al.*, 2001).

O Al também estimula a síntese de calose, depositada no apoplasto, podendo ser visualizada como uma região mais espessa na raiz (Kochian *et al.*, 2005). A calose é um polissacarídeo (polímero de glicose com ligação  $\beta$ -1,3) sintetizado por uma proteína da membrana, depositado na parede celular e sua síntese pode ser induzida em resposta a diferentes estresses como baixas temperaturas, patógenos e metais (Piršelová & Matušíková, 2013). Comumente acumulada também em plasmodesmata, seu objetivo é proteger a célula da entrada do íon. No entanto, acaba por impedir a entrada de outros íons, causando uma barreira de absorção de Al e nutrientes. O Al também altera a deposição de microtúbulos e filamentos de actina (Grabski & Schindler, 1995) no citoesqueleto, interferindo na multiplicação celular, crescimento e alongamento, resultando na formação de uma estrutura similar a um calo (Sivaguru *et al.*, 1999).

### 2.3.4 Estresse oxidativo

O estresse por Al, assim como o estresse por temperatura, luz, deficiência de água e outros fatores bióticos e abióticos, pode causar estresse oxidativo (Devi *et al.*, 2003; Panda *et al.*, 2008; Castilhos *et al.*, 2011). O estresse oxidativo promove um aumento significativo de espécies reativas de oxigênio (EROs), que são radicais livres, que em excesso podem causar diversos danos para as plantas. O Al gera produção de superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila em raízes (Achary *et al.*, 2012; Achary *et al.*, 2008; Achary & Panda, 2010; Castilhos *et al.*, 2010) e em folhas (Achary *et al.*, 2012). No milho (*Zea mays* L.) foi constatado que o estresse oxidativo em resposta ao Al causa danos sérios às células, inclusive acarretando em morte celular de células da extremidade da raiz (Boscolo *et al.*, 2003). Em batata (Tabaldi *et al.*, 2009) e pepino (Pereira *et al.*, 2010) também foram constatadas alterações nas atividades enzimáticas e na severidade do estresse oxidativo em presença de Al.

As EROs se apresentam em forma de radicais hidroxil, perhidroxi, superóxidos, peróxidos de hidrogênio e oxigênio singleto. Estes radicais livres são produzidos normalmente pelas plantas, resultando dos processos de respiração e fotossíntese, como produto da redução do oxigênio. Em equilíbrio com a produção destes compostos, está o sistema antioxidante, formado por enzimas e componentes não enzimáticos, com função de controlar os radicais livres evitando danos as células. Diversos estresses bióticos e abióticos interferem nesse equilíbrio, acarretando no aumento dos níveis de EROs, e conseqüentemente, danificando estruturas celulares (Gill & Tuteja, 2010). Estima-se que 1 a 5% do oxigênio resulta na formação de EROs, que em caso

de não ser vencida pelo metabolismo antioxidante, pode causar a peroxidação de lipídios, gerando danos à membrana plasmática, proteínas e ácidos nucléicos (Tabaldi *et al.*, 2009).

### **2.3.5 Dano ao DNA**

Uma consequência do tratamento de Al é o aumento da fragmentação de DNA (Rounds & Larsen, 2008). No solo, a exposição ao Al por ser constante, geraria dano ao DNA suficiente para ativar as rotas mediadas por *ALT2* e *ATR*, o que causaria eventualmente a diferenciação da raiz (Nezames *et al.*, 2012). Além da fragmentação, o Al em eucariotos altera a topologia do DNA, alterando de B-DNA para a forma intermediária B-Z e para a conformação Z-DNA. Tais alterações são capazes de alterar as funções do DNA, devido ao fato de o mesmo se apresentar em forma mais ou menos condensada. Quanto mais condensada, maior dificuldade de expressão, e quanto menos condensada maior dificuldade de silenciamento gênico.

Em *Allium cepa*, a exposição à elevada concentração de  $Al^{3+}$  induziu dano ao DNA e morte em células radiculares, onde foi constatada a presença de cálcio como sinalizador secundário (Achary *et al.*, 2013).

## **2.4 Mecanismos de tolerância ao alumínio**

Uma das principais maneiras de quantificar a tolerância ao Al em plantas é através de metodologias que medem a inibição do crescimento radicular em resposta ao Al, tomando como medida o comprimento da raiz principal em presença e ausência deste elemento. No entanto, em aveia, resultados mais consistentes têm sido obtidos com a análise do recrescimento radicular, em

cultivos hidropônicos, após exposição ao alumínio. Utilizando este sistema, com populações de linhagens recombinantes, foi possível descobrir que a tolerância ao Al em aveia hexaplóide é geneticamente herdável e controlada por um par de alelos com ação gênica de tolerância (Sánchez-chacón *et al.*, 2000; Nava, 2005; Castilhos *et al.*, 2011). Porém os mecanismos fisiológicos responsáveis pela tolerância ainda não são completamente compreendidos.

#### **2.4.1 Fluxo iônico**

Foi constatado, que em ecótipos tolerantes de *Arabidopsis thaliana*, quando em presença de Al, ocorria um aumento do pH da superfície da ponta da raiz por meio de modificações no fluxo iônico, diminuindo a toxidez do Al e aumentando a tolerância a este elemento. Verificou-se que este aumento no pH era devido ao maior influxo de prótons H<sup>+</sup>, em resposta ao Al, resultando em aumento do pH na região da rizosfera, e conseqüentemente, diminuindo sua toxicidade (Degenhardt *et al.*, 1998). Em trigo, é observado que células de raiz carregadas negativamente, acumulam cátions tóxicos, como Al<sup>3+</sup>, e podem reduzir estes efeitos, através da redução do potencial elétrico das células. O íon H<sup>+</sup> apresenta a capacidade de se ligar a receptores na superfície celular, diminuindo o potencial elétrico e diminuindo os efeitos tóxicos causados pelo Al (Kinraide *et al.*, 1992).

#### **2.4.2 Sistema antioxidante**

A exposição ao Al, causa um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), levando ao estresse oxidativo. Para evitar os danos causados devido ao estresse oxidativo, as plantas possuem uma série de



enzimas, com função de neutralizar seus efeitos. As enzimas atuantes no metabolismo antioxidante incluem a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), monodehidroascorbato redutase (MDHAR), dehidroascorbato redutase (DHAR) e glutathiona redutase (GR), além de compostos não enzimáticos como ácido ascórbico (ASH), glutathiona (GSH) e carotenóides (Gill & Tuteja, 2010). Analisando a atividade destas enzimas antioxidantes, em presença de Al, foi observado, nas mais variadas espécies vegetais, uma relação entre tolerância ao Al e a atividade das enzimas do sistema antioxidante (Gill & Tuteja, 2010; Martins *et al.*, 2013). A maior eficiência no sistema antioxidante resulta em menores danos causados pelo estresse oxidativo em resposta ao Al, possibilitando uma maior tolerância ao Al.

Em presença de Al, o estresse oxidativo se mostrou menos severo, em genótipos tolerantes, enquanto que em genótipos sensíveis, o estresse oxidativo foi mais severo. (Boscolo *et al.*, 2003; Tabaldi *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2010). Esta relação foi observada na comparação entre plantas de *Plantago almogravensis* com *Plantago algarbiensis*, onde o Al foi responsável pelo aumento dos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em *P. algarbiensis* (sensível) e diminuição dos mesmos em *P.almogravensis* (tolerante). A planta sensível também aumentou a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT nas raízes, assim como APX, CAT e guaiacol peroxidase nas folhas, enquanto a atividade da SOD diminuiu no tolerante, sugerindo que a *P. almogravensis* apresenta um sistema antioxidante capaz de neutralizar as EROs e assim reduzir o estresse oxidativo causado por Al, enquanto *P. algarbiensis* mesmo com o aumento da atividade enzimática, não consegue neutralizar as EROs, resultando no acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que irá resultar em oxidação de proteínas nas raízes (Martins *et al.*,

2013). Comportamento similar foi observado em soja preta (Wu *et al.*, 2013), batata (Tabaldi *et al.*, 2007), pepino (Pereira *et al.*, 2010), entre outros. Em aveia, testes realizados com genótipos tolerantes ao alumínio desenvolvidos por diferentes programas de melhoramento, constatou acúmulo de Al nos tecidos vegetais e verificou menor estresse oxidativo e oxidação de lipídeos causados por Al, quando comparado ao genótipo sensível, sugerindo que a tolerância seja, pelo menos parcialmente devida à atuação do sistema antioxidante (Castilhos *et al.*, 2011).

### **2.4.3 Exsudação de ácidos orgânicos**

Um dos principais mecanismos de defesa contra o Al é a exsudação de ácidos orgânicos pelas raízes. Estes atuam como agentes quelantes, formando complexos com o  $Al^{3+}$ , e assim, diminuindo sua disponibilidade e impedindo sua interação com a planta. Os ácidos orgânicos exsudados variam de acordo com o genótipo e espécie vegetal, sendo o citrato e malato os mais comuns (Kidd *et al.*, 2001; Ryan & Delhaize 2010). As raízes de trigo (*Triticum aestivum*) exsudam principalmente malato, as raízes de milho (*Zea mays*) citrato. Em aveia (*Avena sativa*) inicialmente foi atribuído ao citrato o principal exsudado (Zheng *et al.*, 1998), posteriormente, foi observada a exsudação de ambos, citrato e malato em resposta ao alumínio (Ryan *et al.*, 2009). Mais recentemente observou-se que apenas a exsudação de malato é aumentada pela presença de Al (Radmer *et al.*, 2012), podendo variar de acordo com a cultivar estudada. Outras espécies como o trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*) exsudam oxalato (Kochian *et al.*, 2005). Destes, o citrato

apresenta maior capacidade de detoxificação de Al, seguido por oxalato e malato, respectivamente (Zheng *et al.*, 1998).

Estudos realizados com trigo relacionam a tolerância ao Al com a exsudação de ácidos orgânicos, mais especificamente o malato (Delhaize *et al.*, 1993). O gene *ALMT1* (*Aluminum Activated Malate Transporter*) é o principal gene responsável pela tolerância ao Al em trigo, codificando um transportador de malato, que atua no efluxo ativo deste em resposta a presença do Al. A perda desse gene resulta na diminuição da tolerância ao Al (Sasaki *et al.*, 2004).

Foi encontrada correlação entre os níveis de tolerância ao Al e a expressão do gene *ALMT1* em genótipos de trigo (Raman *et al.*, 2005). Em cevada (*Hordeum vulgare*) transgênica, expressando o gene *ALMT1* foi atingida uma maior tolerância tanto em condições de hidroponia quanto em solos ácidos (Delhaize *et al.*, 2004). Vários outros membros da família *ALMT* foram identificados em cereais (Magalhães, 2006). A presença, na maioria dos genótipos de trigo tolerantes ao Al<sup>3+</sup>, de alterações (repetições em *tandem*) no promotor de *TaALMT1* (Sasaki *et al.*, 2006) e a correlação com efluxo de malato (Raman *et al.*, 2008) sugere que as diferenças não estão na proteína produzida, mas sim na expressão do gene. O grupo de pesquisas de Plantas de Lavoura, do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, recentemente identificou uma sequência possivelmente ortóloga a esse gene em aveia, sendo um indício que a exsudação de malato que será testada neste trabalho, possa estar relacionada com a tolerância ao Al em aveia (Schneider, 2012).

É sugerida a exploração deste mecanismo para incrementar o rendimento na produção de cereais em presença de solos ácidos (Julian *et al.*, 2013). Em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) e mamão (*Carica papaya*) já existem transgênicos, através da alteração da síntese de citrato, com maior tolerância ao Al associada a uma maior síntese deste ácido orgânico (Fuente *et al.*, 1997).

#### **2.4.4 Secreção de mucilagem**

Em soja, foi verificado o efeito da secreção de mucilagem quanto à tolerância ao Al, resultando em maior concentração de Al na raiz onde a mucilagem foi retirada, obteve-se uma grande quantidade de Al na mucilagem, sugerindo que o Al se ligue na mucilagem e ela funcione como uma barreira física (Cai *et al.*, 2013). Em um trabalho anterior, realizado com trigo, foi encontrada uma quantidade de Al maior em raízes onde a mucilagem foi mantida intacta, quando comparada com as raízes onde esta mucilagem foi retirada, sugerindo um importante papel da mucilagem na tolerância ao Al (Archambault *et al.*, 1996). *Vigna unguiculata* é outra espécie vegetal onde maior sensibilidade ao Al foi demonstrada em relação a menor quantidade de mucilagem (Horst *et al.*, 1982).

#### **2.4.5 Sequestro e redistribuição do Al<sup>3+</sup>**

Em arábida, através da seleção de mutantes sensíveis ao Al<sup>3+</sup>, foi possível a identificação de um gene chamado *ALS3*, necessário para a tolerância ao Al. Através de análises de imunolocalização foi verificado seu acúmulo na membrana celular das células que expressam este gene. O

transportador ALS3 é necessário para a movimentação do Al, possivelmente da raiz aos feixes vasculares, para sua redistribuição e sequestro em tecidos menos sensíveis. A perda da capacidade de redistribuir o Al presente no simplasto, leva ao acúmulo na raiz, aumentando os efeitos tóxicos do Al, resultando em um fenótipo hipersensível ao Al conforme observado em *als3-1* (Larsen *et al.*, 2005).

É proposto que *ALS3* está associado com outros dois transportadores conhecidos para tolerância ao Al, incluindo ortólogos de arroz (*Oryza sativa*) *Nrat1*, que é um transportador *Nramp* responsável pela entrada de Al no simplasto das células radiculares (Xia *et al.*, 2010), e em *arabidopsis* *ALS1* (Larsen *et al.*, 2007), que é responsável pelo sequestro do Al interno para dentro do vacúolo celular.

#### **2.4.6 Sinalização**

Vários mecanismos foram sugeridos como sensores ou envolvidos com a cadeia de transdução do sinal de Al, por exemplo, a diminuição da elasticidade da parede celular (Gunsé *et al.*, 1997; Ma *et al.*, 2004), alteração da fluidez e do potencial da membrana (Sivaguru *et al.*, 2003) efeito da alteração da homeostase iônica (Ahn *et al.*, 2001), inibição da via da fosfolipase C (PLC) (Ramos *et al.*, 2007), tráfego por vesículas de membrana (Illéš *et al.*, 2006), alteração do citoesqueleto (Sivaguru *et al.*, 1999), aumento dos níveis citoplasmáticos de  $\text{Ca}^{2+}$  (Rengel & Zhang, 2003), inibição do transporte de auxinas (Kollmeier *et al.*, 2000; Doncheva *et al.*, 2005), alteração dos níveis de óxido nítrico (Illéš *et al.*, 2006; Tian *et al.*, 2007), entre outras. No entanto, até o momento esta etapa não foi elucidada.

Dois fatores de transcrição foram identificados e relacionados à tolerância ao Al, STOP1 e ART1 (Yamaji *et al.*, 2009). Em mutantes *stop1* de *Arabidopsis*, a expressão do gene *AtALMT1*, que é responsável por uma proteína de membrana, transportadora de malato ativada por Al, foi afetada, deixando de ser expresso, aumentando os efeitos tóxicos do Al nas raízes (Iuchi *et al.*, 2007). Em outros estudos com STOP1, é sugerida também, sua atuação na expressão de outros genes, como o *ALS3*, responsável pelo sequestro do Al para compartimentalização (Sawaki *et al.*, 2009). Já o fator de transcrição ART1, embora essencial para a tolerância ao Al, ainda não está totalmente esclarecido quais os genes ele pode estar relacionado, sendo esperado ou uma relação com genes responsáveis pela manutenção da parede celular e expansão celular, ou proteínas de membrana responsáveis pelo sequestro do Al para o vacúolo (Yamaji *et al.*, 2009).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Material Vegetal**

Para a fenotipagem da tolerância ao Al via análises de recrescimento, o material vegetal constou de genótipos de aveia hexaplóide: as linhagens UFRGS 057005-1 e UFRGS 057022-2 e as cultivares comerciais URS Guria, URS Torena, URS Penca, URS Guará, URS Charrua, URS Tarimba, URS Taura, URS Guapa e URS 21; acrescidas dos controles UFRGS 17 (tolerante) e UFRGS 930598-6 (sensível). Todos os genótipos foram desenvolvidos pelo Programa de Melhoramento Genético de Aveia da UFRGS na Estação Experimental Agronômica em Eldorado do Sul, RS. A genealogia desses genótipos é apresentada na TABELA 1.

TABELA 1. Genealogia dos genótipos elite de aveia hexaplóide.

Genótipo	Genealogia*
URS Guapa	UPF 17 Resel. // Guaiba Sel. / CTC 84B993
URS Tarimba	UFRGS 987016-1 / UFRGS 19
URS 21	UFRGS 10 / CTC 84B993
URS Taura	UFRGS 970216-2 (F <sub>3.4</sub> ) / UFRGS 970461 (F <sub>7.8</sub> )
URS Guria	UFRGS 987015-2 / UFRGS 960195-2
URS Torena	UFRGS 984111-4 / UFRGS 988109-1
UFRGS 057005-1	UFRGS 984111-4 / UFRGS988109-1
URS Penca	UFRGS 995078-2 / UFRGS 006054-4
URS Guará	UFRGS 987016-1 / UFRGS 970497-1
UFRGS 057022-2	UFRGS 987016-1 / UFRGS 970497-1
URS Charrua	UFRGS 984126-1 / UFRGS 984109-7
UFRGS 17	Coronado <sup>2</sup> / Cortez <sup>3</sup> / Pendek / ME1563 // 76-29 / 76-23 / 75-28 / CI833
UFRGS 930598-6	UFRGS 15 / UFRGS 881920

\*Desmembramento da genealogia:

Guaiba Sel. = seleo dentro de linha Q87 / 28 = CP16CRcpx / C7512 // SRcpx / 74C8014 = irmã da UFRGS 16 e da UFRGS 881920

CTC 84B993 = CI8235 / Ken631 / MN720183

UFRGS 987016-1 = Irmã URS Guapa = UPF 850380 Resel. // Guaiba sel. / CTC 84B993

UFRGS 19 = UFRGS 841110 / UFRGS 884021-1

UFRGS 841110 = CRcpx / SRcpx // Barrow 79

UFRGS 884021-1 = Coker 81C72 // Coronado<sup>2</sup> / Cortez<sup>3</sup> / Pendek / ME 1563

UFRGS 10 = C1217 // Coronado / BCL

UFRGS 970216-2 = UFRGS 881971 // Pc68 / 5\*Starter (F<sub>4</sub>)

UFRGS 881971 = (Q172/86) = Cocker 81C72 // Coronado<sup>2</sup> / Cortez<sup>3</sup> / Pendek / ME 1563

UFRGS 970461 = UFRGS 15 / UFRGS 14

UFRGS 15 = Coronado<sup>2</sup> / Cortez<sup>3</sup> / Pendek / Me1563 // C16CRcpx / 74C8014

UFRGS 14 = 80SA65 // Coronado<sup>2</sup> / Cortez<sup>3</sup> / Pendek / ME 1563

UFRGS 970497-1 = UFRGS 881920 / UFRGS 14

UFRGS 984111-4 = PC68/5\*STARTER (F<sub>4</sub>) / UFRGS 10

UFRGS 988109-1 = UFRGS 884110 / UFRGS 884021 = Irmã da UFRGS 19 e URS 22



UFRGS 995078-2 = UFRGS 10 / PAUL

UFRGS 006054-4 = PC68/5\*STARTER (F<sub>4</sub>) // UFRGS 8

UFRGS 8 = OA338 / X2682-1

UFRGS 984126-1 = Amagalon / 4\*Ogle 1543 // UFRGS 881971

UFRGS 984109-7 = UFRGS 881971// PC68/5\*STARTER (F<sub>4</sub>)

**Coronado** = Santa Fe / 2\*Clinton /3/ Sac // Hajira / Joannette /4/ New Nortex / Landhafer /5/  
Black Mesdag / Ab 101 = CI 6671 // New Nortex / Landhafer /3/ CI 7650

Santa Fe = Seleção de uma aveia Argentina

Clinton = D69 / Bond (= Richland / Green Russian // Bond)

Sac = Iowa No. D69 / Bond (Mesma genealogia de Clinton)

Hajira = Seleção vinda da Argélia para os Estados Unidos

Joannette = Cultivar introduzida da França nos Estados Unidos

New Nortex = Seleção dentro de Red Rust Proof Appler

Appler = Seleção dentro de Red Rust Proof

Red Rust Proof = seleção dentro de Red Algerian ou introduzida do México nos Estados Unidos

Landhafer= Seleção dentro de Red Algerian (*Avena sterilis*)

Black Mesdag = Seleção dentro de Black President

Black President = Desconhecida, derivada de variedade obtida dos Países Baixos, a qual era derivada de Landrace originária das Províncias Bálticas

Ab 101 = *A. abyssinica* (CD4549) / *A. strigosa* (CD3820)

CD3820 = também chamada La Estanzuela

CI 7650 = Black Mesdag / Ab 101

**Cortez** = irmã de Coronado

**Pendek**=Flamingsgold / Binder

Flamingsgold = Von Lochows Gelb / Blanche de Sibérie

Von Lochows Gelb = Seleção dentro de Markische Landsorte (originária de Mecklenburg, Germany)

Blanche de Sibérie = Desconhecida, originária da Rússia

Binder = Seleção dentro de Carstens III

Carstens III = Carstens II / Von Lochow's Gelbhafer

Carstens II = Carstens I / Ligowo II

Carstens I = desconhecida, originária de Schleswig-Holstein, Alemanha

Ligowo II = Seleção dentro de Ligowo de Vilmorin

Ligowo de Vilmorin = Seleção dentro da aveia Ligowo, originária da Rússia

Lochow's Gelbhafer = Seleção dentro de Markische Landsorte (variedade da Alemanha)

**ME1563** = desconhecida (nome refere-se a Middle East)

**CRcpx**= uma de várias combinações de linhagens puras de variedades comerciais x *A. sterilis*

**Paul** = CI9221 / Hudson // RL3038 / Dal /3/ RPB120-73 / RL3038 // Noble /4/ O 2998-22 /5/ O 2557-A-6-100 /3/ RL3038 / Dal // Noble (aonde O 2998-22 = 02998-22, O 2557-A-6-100 = 02557-A-6-100, RL3038 = OT201)

CI9221 = *A. sterilis* (Clave 8377) / Kytö

Kytö = seleção dentro da landrace Kuopio / Guldregn (Originária da Finlândia)

Hudson = Seleção dentro de Sixty-day

Sixty-day = *ver abaixo*

RL3038 = RL3038-76-320-419-2-7-3 = Pendek\*2 / CAV2648 /3/ CI3034 // Rodney\*4 / RL2942 /5/ Pendek\*2 / CAV5165 /4/ OT183\*2 /3/ OT182 // CAV2647 / 2\*Rodney

**Amagalon** = *Avena magna* (CI 8330) / *Avena longiglumis* (CW 57, coletada 30 km leste de Rabat em direção a Meknes , Marrocos)

**Starter** = Dal /3/ Garland / Burnett // Diana / CI 8344 /4/ Noble = Dal /3/ Mn 67231 /2/ Diana / CI8344 /4/ Noble

Dal = X660 / Beedee

X660 = Belar / Trispernia

Beedee = Beacon // Hawkeye / Victoria ou Beacon\*2 // Hawkeye / Victoria

Belar = Seleção dentro de Sunrise

Trispernia = Landrace da Romênia

Sunrise = Seleção dentro de cruzamento natural entre aveias da Algéria, encontrada na Longerenong Experimental Farm, Victoria, New South Wales, Austrália

Beacon = Larain // Victory / Legacy /3/ Victory / Black Mesdag /4/ Vanguard ou Gold Rain / Alaska // Legacy / Victoria /3/ RL452 /4/ Vanguard ou Gold Rain / Alaska // Legacy / Victoria /3/ Victory / Black Mesdag // Vanguard ou outros

Hawkeye = Richland / Green Russian

Victoria = Desconhecida, seleção massal sobre três linhagens de aveia; originária de La Estanzuela, Colônia, Uruguai

Richland = Seleção dentro de Kherson

Green Russian = Desconhecida

Kherson = introduzida do Sul da Rússia nos Estados Unidos em 1896

Larain = desconhecida

Victory = seleção dentro de Milton

Milton = Seleção dentro da Landrace Schleswig-Holstein (originária da Suécia)

Legacy = Banner / Eighty-Day

Banner = Seleção dentro da Silvermine

Silvermine = desconhecida, cultivar dos Estados Unidos

Eighty-Day = desconhecida, relacionada à Sixty-Day

Sixty-Day = linhagem derivada de Kherson

Vanguard = Hajira / Banner

Gold Rain = Seleção dentro de Milton

Alaska = Seleção dentro de Tobolsk

Tobolsk = Desconhecida, introduzida da Rússia nos Estados Unidos

Garland = Hawkeye / Victoria // Garry /3/ Clintland

Garry = Hajira / Banner // Victoria /3/ Victory

Clintland = Landhafer / 4\*Clinton

Burnett = Victoria // Hajira / Banner /3/ Colo

Diana = vários pedigrees disponíveis:

Purdue 549B3-1-1 / Purdue 543C2-132P = Clintland /3/ Clinton\*2 / Ark 674 // Milford /6/ Roxton /3/ Victoria // Hajira / Banner /4/ Ajax /3/ Victoria // Hajira / Banner (Ottawa 3928-5-8) /5/ Clinton / Bond // PI 174544-3ou

Roxton /3/ Victoria // Hajira / Banner /4/ Ajax /3/ Victoria // Hajira / Banner /5/ Clinton / Bond // PI 174544-3 /6/ Clintland /3/ Clinton\*2 / Ark. 674 // Milfordou

Roxton / RL 1276 // Ajax / RL 1276 /3/ Clinton / Bond // PI 174544 /4/ Clintland /3/ Clinton\*2 / Ark 674 // Milford (RL 1276 = Victoria // Hajira / Banner)

...entre outros pedigrees

Noble = Tippecanoe /14/ CI 7676 /13/ Putnam\*5 / Minn313 /12/ Putnam\*5 / Minn313 /10/

Minhafer /9/ MO-2-205 /8/ Clinton\*7 / Landhafer /7/ Clinton\*7 / Landhafer /6/ Clinton\*7 /

Landhafer /4/ RL2105 /3/ Clinton // Boone / Cartier /5/ Clinton\*7 / Landhafer /4/ RL2120 /3/

Clinton // Boone / Cartier /11/ Putnam\*5 / Minn313\*2 // Albion

Tippecanoe = Mo.0-025 /6/ Clinton\*7 / Landhafer (Purdue 5124)\*2 /4/ Clinton /2/ Boone / Cartier /3/ Canada RL 2105 / 5/ Purdue 5124\*3 /4/ Clinton /2/ Boone / Cartier /3/ Canada RL 2105 /5/ Purdue 5124

Putnam = Clinton // Boone / 2\*Cartier

Boone = Victoria / Richland (cruzamento denominado XS1098; originária de Arlington Farm, Rosslyn, Virginia, USA)

Cartier = Tobolsk / Early Triumph (ou Alaska / Early Triumph)

Para avaliação do acúmulo de Al nos órgãos vegetais e exsudação de malato pelas raízes, foram utilizados somente os genótipos UFRGS 17 e UFRGS 930598-6 devido ao seu contraste quanto a tolerância ao Al. A UFRGS 17 é uma variedade comercial desde 1996 e registrada na LVEC (*List of Varieties Eligible for Certification*) da OECD (*Organization for Economic Co-operation and Development*) e UFRGS 930598-6 é uma linhagem do Programa de Melhoramento Genético de Aveia da UFRGS.

### **3.2 Preparo das sementes**

As sementes utilizadas foram selecionadas de forma a apresentarem tamanho similar, descascadas (remoção da lema e pálea) e desinfetadas com hipoclorito de sódio 2% (v/v) com adição de 2% (v/v) de Tween 20 por três minutos, enxaguadas três vezes com água esterelizada, e pré-germinadas em papel germinador. As sementes foram dispostas sobre tela plástica e as raízes imersas em solução nutritiva, cuja composição é apresentada na Tabela 2.

### **3.3 Recrescimento**

Sementes de UFRGS 17 e UFRGS 930598-6, considerados tolerante e sensível ao Al, respectivamente, foram selecionadas com tamanho similar e

preparadas conforme descrito à cima. A germinação durou, aproximadamente 48 horas a 23°C, acrescido de 12h a 19°C. Após este período, 50 sementes germinadas de cada genótipo foram selecionadas e transferidas para recipientes plásticos com capacidade de 3,5 L. Os recipientes foram divididos em duas partes, cada parte contendo 10 sementes de cada um dos genótipos a ser testado (UFRGS 17 e UFRGS 930598-6). No total, foram utilizados cinco recipientes, totalizando 50 sementes de cada genótipo. As sementes foram dispostas sobre tela plástica e as raízes imersas em solução nutritiva, com pH 4,0. A redução do pH foi devido a maior quantidade de  $Al^{3+}$  disponível na solução em comparação a estudos anteriores realizados com pH 4,5.

Em um segundo experimento foram avaliadas, quanto à tolerância ao alumínio, às linhagens UFRGS 057005-1 e UFRGS 057022-2 e as cultivares comerciais URS Guria, URS Torena, URS Penca, URS Guará, URS Charrua, URS Tarimba, URS Taura, URS Guapa e URS 21; acrescidas dos controles UFRGS 17 e UFRGS 930598-6. Foram utilizadas 30 sementes germinadas de cada genótipo, selecionadas com aproximadamente 2 cm de raiz e transferidas para recipientes plásticos com capacidade de 3,5 L. Cada recipiente foi dividido em cinco partes, onde foram colocadas 10 sementes por genótipo a ser testado e 5 sementes de cada genótipo controle (UFRGS 17 e UFRGS 930598-6), com a finalidade de testar material vegetal suficiente para comparação. O total foi de 55 sementes dos genótipos controle. As sementes foram dispostas sobre tela plástica e as raízes imersas em solução nutritiva com pH 4,5. O maior número de sementes dos genótipos controle se deve a presença destes em todos os potes, para maior controle do experimento.

O método utilizado para quantificar a tolerância foi a análise de recrescimento da raiz principal, conforme descrito por NAVA *et al.* (2006). Foram utilizadas duas formulações de solução nutritiva, (i) solução completa e livre de Al, cuja composição final é apresentada na Tabela 2, e (ii) solução tratamento, com presença de Al, constituída de um décimo da solução nutritiva completa, com a retirada do elemento fósforo para evitar a precipitação do  $Al^{3+}$ . A fonte de Al utilizada foi  $(Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O)$  na concentração final de  $740\mu M$ .

TABELA 2. Composição da solução nutritiva: fontes minerais usadas (nutriente) e concentração final

Nutriente	Concentração final
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	4 mM
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2 mM
$KNO_3$	4 mM
$(NH_4)_2SO_4$	0,435 mM
KCl	0,5 mM
$MnSO_4 \cdot 1H_2O$	2 $\mu M$
$CuSO_4$	0,3 $\mu M$
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,8 $\mu M$
NaCl	30 $\mu M$
$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	0,1 $\mu M$
$H_3BO_3$	10 $\mu M$
GeoFe-6	0,9 $\mu M$

Inicialmente as plântulas foram mantidas em solução nutritiva completa, por um período de 48 horas, seguido de troca para solução tratamento, onde as raízes ficaram expostas ao Al por 48 horas, então a solução tratamento foi substituída novamente pela solução completa por mais 72 horas. Nas duas soluções foram mantidas aeração e iluminação constantes e a temperatura ambiente em  $20^\circ C$ . Mediu-se então, utilizando um paquímetro eletrônico, o recrescimento da raiz principal, tomando a medida da raiz a partir da

calosidade formada na presença do Al até o ápice e o comprimento total da raiz. A concentração e atividade das diferentes formas iônicas do Al na solução foram estimadas usando o software *Visual Minteq 3.0*. (Gustafsson, 2012), software livre de modelo de equilíbrio químico para o cálculo de especiação de metais). Análises da variância e da distribuição de frequência foram realizadas e as médias dos genótipos foram comparadas entre si (Tukey  $P \leq 0,05$ ) e com a dos controles (teste-t  $P \leq 0,05$ ).

### **3.4 Malato exsudado na solução**

Para a determinação da quantidade de malato exsudado pelas plântulas de aveia, 200 sementes de cada genótipo, UFRGS 17 e UFRGS 930598-6, foram preparadas conforme já descrito. A germinação durou cinco dias a 23°C. Foram dispostas em telas, 20 plântulas de cada genótipo, em potes plásticos com 40 ml de solução nutritiva completa durante cinco dias, para crescimento e desenvolvimento do sistema radicular. Após este período, a solução foi substituída pela solução tratamento, onde o Al estava presente na concentração final de 740µM. O contato das plantas com o Al presente na solução tratamento durou 24h, sendo a solução recolhida no final deste período e armazenada a -80°C. Para a análise de malato, a solução armazenada teve seu volume reduzido em liofilizador e, através da utilização do kit L-malic acid enzymatic assay (Megazyme, Wicklow, Ireland), foi realizada a quantificação de malato exsudado pelas plantas na solução.

### **3.5 Acúmulo de alumínio nos órgãos vegetais**

As plantas que foram utilizadas no teste de exsudação de malato na solução hidropônica foram separadas em raiz e parte aérea, secas e maceradas. As amostras de tecido vegetal já maceradas, foram enviadas para análise no laboratório de Pesquisa e Análises Químicas do Instituto de Química da UFRGS, através do equipamento ICP-MS. Sendo inicialmente decompostas em uma mistura de ácido nítrico e ácido fluorídrico sob aquecimento em sistema fechado. A etapa de determinação de Al foi efetuada empregando a técnica de ICP-MS (espectrometria de massa de duplo foco com plasma indutivamente acoplado).

### **3.6 Malato presente na mucilagem**

Após tratamento de choque de Al (item 3.3) dos genótipos UFRGS 17 e UFRGS 930598-6, foi feita a lavagem manual das raízes, com água destilada, para retirar qualquer substância presente como resíduo da solução nutritiva, porém sem danificar a mucilagem e, em 50 % das plantas, com KCl, afim de remover a mucilagem (Archambault *et al.*, 1996). Estas raízes foram congeladas, e posteriormente, maceradas e analisadas para quantificação de malato (item 3.4) com presença e ausência de mucilagem.

### **3.7 Histolocalização de Al**

Foram utilizadas três repetições de 20 sementes (preparadas conforme item 3.2), dos genótipos Guapa e UFRGS 17 e colocadas em hidroponia (item 3.3). Ao final deste período, as raízes foram imersas em corante hematoxilina, por trinta minutos e lavadas com água destilada até o excesso de corante ser

removido por completo. Posteriormente, as raízes coradas foram emblocadas em parafina. Foram realizados cortes transversais com 10 $\mu$ m de espessura, utilizando-se um micrótomo. Após, foi feito o preparo de lâminas para a visualização em microscopia.



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Análise de recrescimento

A avaliação do desempenho dos genótipos controle UFRGS 17 (tolerante) e UFRGS 930598-6 (sensível) foi obtida através da utilização da metodologia de análise do recrescimento da raiz principal em solução nutritiva (FIGURA 1) e posterior medida do comprimento total da raiz (FIGURA 2).

Tanto no crescimento total da raiz quanto no recrescimento, o genótipo tolerante apresentou valores significativamente maiores que o genótipo sensível quando aplicado o test t ( $p < 0,001$ ).

O comprimento máximo de raízes apresentado pela UFRGS 17 foi de 71,15 mm, enquanto na UFRGS 930598-6 foi de 54,27 mm com médias de 49,70mm e 38,99mm, respectivamente (FIGURA 2). No recrescimento radicular após exposição ao Al, a UFRGS 17 apresentou máxima de 25,51mm, e a UFRGS 930598-6 máxima de 12,81mm, e médias de 16,45mm e 7,03mm, respectivamente (FIGURA 1).

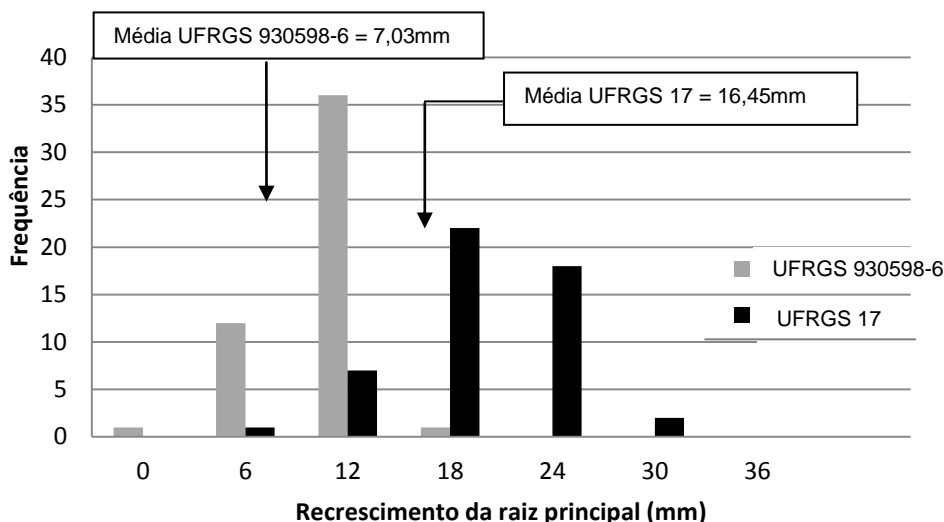


FIGURA 1. Distribuição de frequência da variável recrescimento da raiz principal dos genótipos de aveia hexaplóide UFRGS 17 (tolerante) e UFRGS 930598-6 (sensível) após choque de Al ( $740\mu\text{M}$ ).

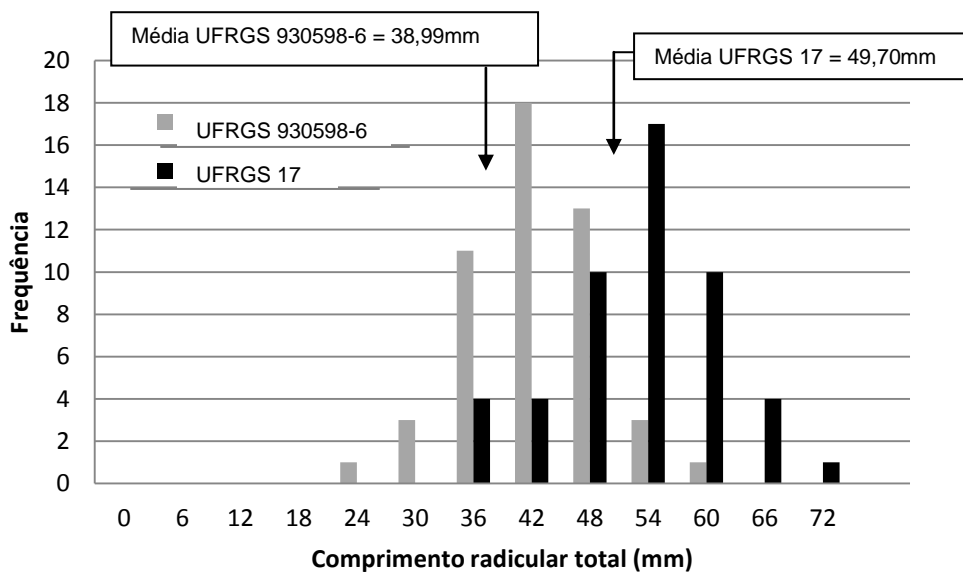


FIGURA 2. Distribuição de frequência do comprimento total da raiz principal dos genótipos de aveia hexaplóide UFRGS 17 (tolerante) e UFRGS 930598-6 (sensível) após término do experimento (sete dias). As plantas foram crescidas por três dias em solução completa, por outros dois dias na presença de Al ( $740\mu\text{M}$ ) e mais três dias em solução completa livre de Al.

A razão da redução do crescimento em resposta ao Al não é clara, embora relatado na literatura ser devido à redução da divisão celular e do alongamento celular, aproximação entre a região de diferenciação celular e a região meristemática, além do engrossamento do ápice radicular, conforme observado em outras espécies (Sivaguru *et al.*, 1999).

Foi observada a formação de um espessamento radicular após a exposição ao Al, cercado por mucilagem (FIGURA 3), condizente com as respostas à exposição ao Al citadas na literatura (Horst *et al.*, 1982; Cai *et al.*, 2013). Embora ambos os genótipos apresentassem este comportamento, visualmente foi possível verificar um espessamento maior no genótipo tolerante, quando comparado ao sensível.

Após a exposição ao Al, as raízes apresentaram uma mudança de direção no seu crescimento, condizente com a ocorrência de um rearranjo no crescimento e forma nas células do ápice radicular, possivelmente pelas alterações na parede celular (Tabuchi & Matsumoto, 2001), membrana plasmática (Wagatsuma *et al.*, 2005) e deposição de calose (Kochian *et al.*, 2005; Piršelová & Matušíková, 2013) (FIGURA 3).



FIGURA 3. Alteração de direção do crescimento da raiz de plantas de aveia e presença de mucilagem em resposta a exposição a  $740\mu\text{M}$  Al.

#### 4.2 Fenotipagem de genótipos elite de aveia hexaplóide

Utilizando o método de recrescimento, buscou-se discriminar os genótipos elite do Programa de Melhoramento Genético de aveia da UFRGS quanto aos diferentes níveis de tolerância ao Al. Para que este método seja adequado é necessário que a quantidade de Al tóxico na solução tratamento seja suficiente para discriminar os genótipos. Em decorrência da composição nutricional da solução tratamento, da temperatura e do pH utilizado, as concentrações e atividades das diferentes formas de Al podem variar, sendo necessário quantificar essas formas para determinar a real magnitude da forma tóxica. Nas condições utilizadas neste experimento, dos 740 $\mu$ M de Al adicionados, 28% encontrava-se na forma de Al<sup>+3</sup>, considerada a mais tóxica, sendo a atividade de Al<sup>+3</sup> equivalente a 54 $\mu$ M. A maior parte do Al (65%) encontrava-se na forma de AlSO<sub>4</sub><sup>+</sup>. Nessas condições, foi possível diferenciar os genótipos.

O genótipo UFRGS 17, considerado tolerante (Nava *et al.*, 2006; Castilhos *et al.*, 2011), apresentou média de recrescimento de 20mm, com mínimo de 6mm e máximo de 45mm, enquanto UFRGS 930598-6 apresentou média de 8,9mm, com mínimo de 3mm e máximo de 27mm (FIGURA 4).

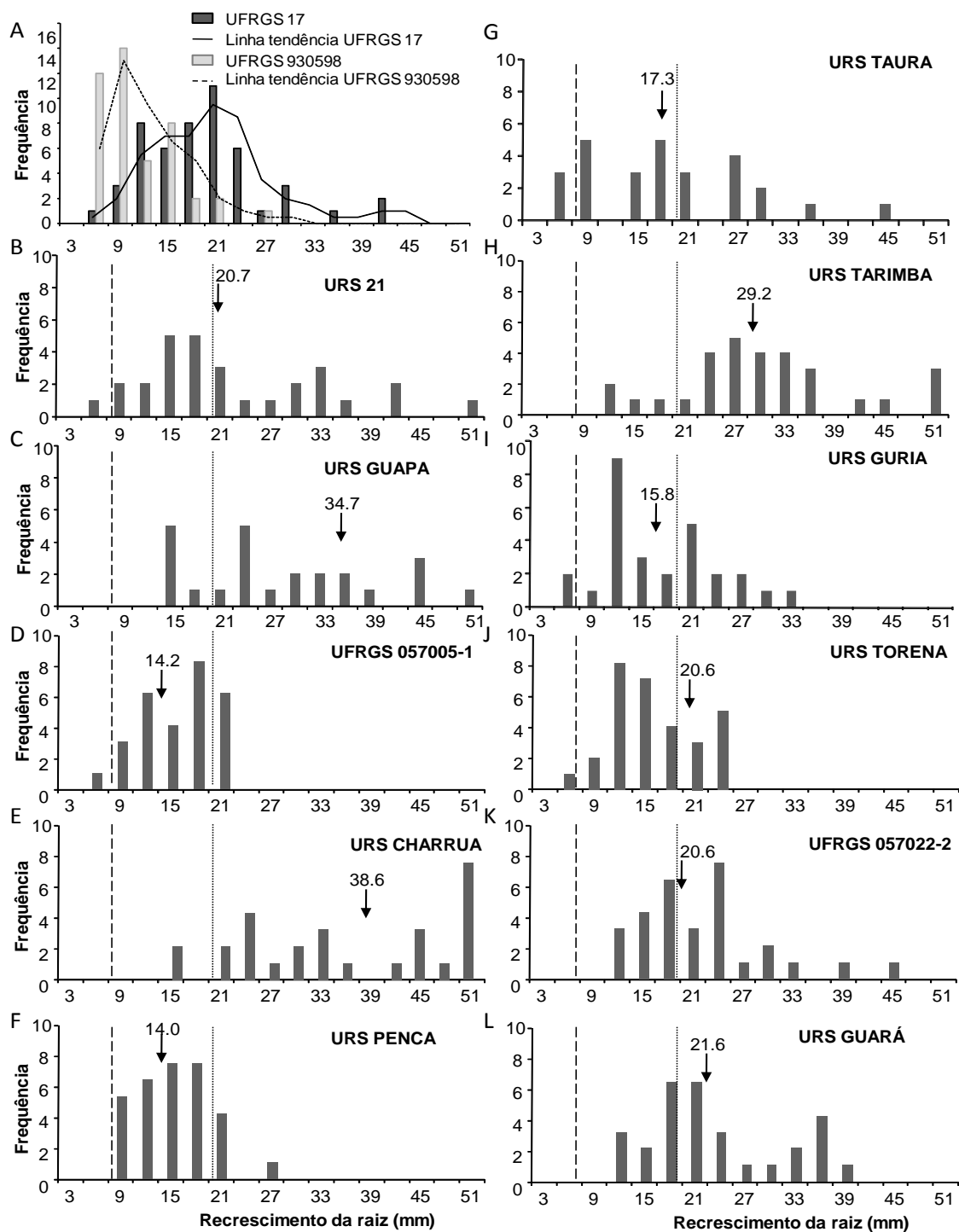


FIGURA 4. Distribuição da frequência da variável recrescimento da raiz principal de genótipos elite de aveia hexaplóide após choque de Al ( $740\mu\text{M}$ ). (A) Frequência dos genótipos controles e linhas de tendência. As setas representam a média de recrescimento de cada genótipo. As linhas verticais tracejadas indicam a média do genótipo controle sensível (UFRGS 930598-6) e as linhas verticais pontilhadas indicam a média do genótipo controle tolerante (UFRGS 17). (B-L) Frequência dos genótipos elite avaliados.

Em trabalhos anteriores, a amplitude e média de recrescimento obtida para esse genótipo havia sido menor, 2-10mm, média 6mm (Wagner *et al.*, 2001), 2-12mm, 7mm (Sanchez-Chacon *et al.*, 2000), 2-16mm, 7mm (Oliveira *et al.*, 2005), 2-4mm, 3mm (Nava *et al.*, 2006) e 3-12mm, 6mm (Castilhos *et al.*, 2011). Uma possível razão dessas diferenças é o tamanho inicial da radícula quando o experimento foi iniciado. Neste estudo, as plântulas selecionadas possuíam radícula com 2cm de comprimento, enquanto NAVA *et al.* (2006), que obtiveram as menores amplitude e média, selecionaram plântulas com 0,6cm de radícula. O tamanho da radícula, no momento em que esta entra em contato com o Al, parece afetar o nível de tolerância, de forma que plântulas com radícula menor que 1cm apresentam menor tolerância (Schneider & Delatorre, comunicação pessoal). Efeito de condições ambientais, como temperatura, durante o desenvolvimento das sementes (Lisitsyn, 2000), e durante a exposição ao Al (Camargo, 1983; Liu *et al.*, 2007), sobre o grau de tolerância, também já foi relatado.

Variação na resposta à tolerância ao Al dentro de cada genótipo foi observada (FIGURA 4). Apesar das causas dessa variação no recrescimento em todos os genótipos testados não serem conhecidas, estas já foram previamente reportadas em outros estudos (Sanchez-Chacon *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2005; Nava *et al.*, 2006; Castilhos *et al.*, 2011). Existem alguns fatores que podem explicar a variação no desempenho dos genótipos de aveia quanto à tolerância ao Al, como, por exemplo: expressividade do gene de tolerância ao Al, a qual pode ser incompleta; interações entre mecanismos fisiológicos de exclusão ou detoxificação do Al<sup>3+</sup>; e flutuações ambientais intrínsecas da própria metodologia de avaliação que ainda não foram

identificadas e, conseqüentemente, controladas. Em decorrência dessa variação, há necessidade de avaliar um grande número de indivíduos de cada genótipo, a fim de obter maior precisão na determinação do grau de tolerância ao Al.

Os genótipos UFRGS 057005-1, URS Torena e URS Penca apresentaram menores amplitudes de recrescimento, variando de 6mm a 21mm, 6mm a 24mm e 9mm a 27mm, respectivamente (FIGURAS 4D, 4F e 4J). A maior amplitude foi obtida em URS 21, onde o recrescimento variou de 6mm a 51mm (FIGURA 4B), seguida por URS Taura (6mm a 45mm) e URS Tarimba (12mm a 51mm) (FIGURAS 4G e 4H).

Através da comparação de médias do recrescimento radicular entre os diferentes genótipos, verificou-se que URS Charrua foi o mais tolerante, seguido por URS Guapa e URS Tarimba, que não diferiram estatisticamente entre si. UFRGS 057005-1, URS Torena e URS Penca apresentaram os menores níveis de tolerância, porém ainda foram superiores a UFRGS 930598-6 (FIGURA 5). URS Charrua e URS Guapa foram superiores ao controle tolerante UFRGS 17 (FIGURA 5), ambas as cultivares não apresentaram indivíduos com recrescimento inferior a 15mm (FIGURA 4C e 4E).

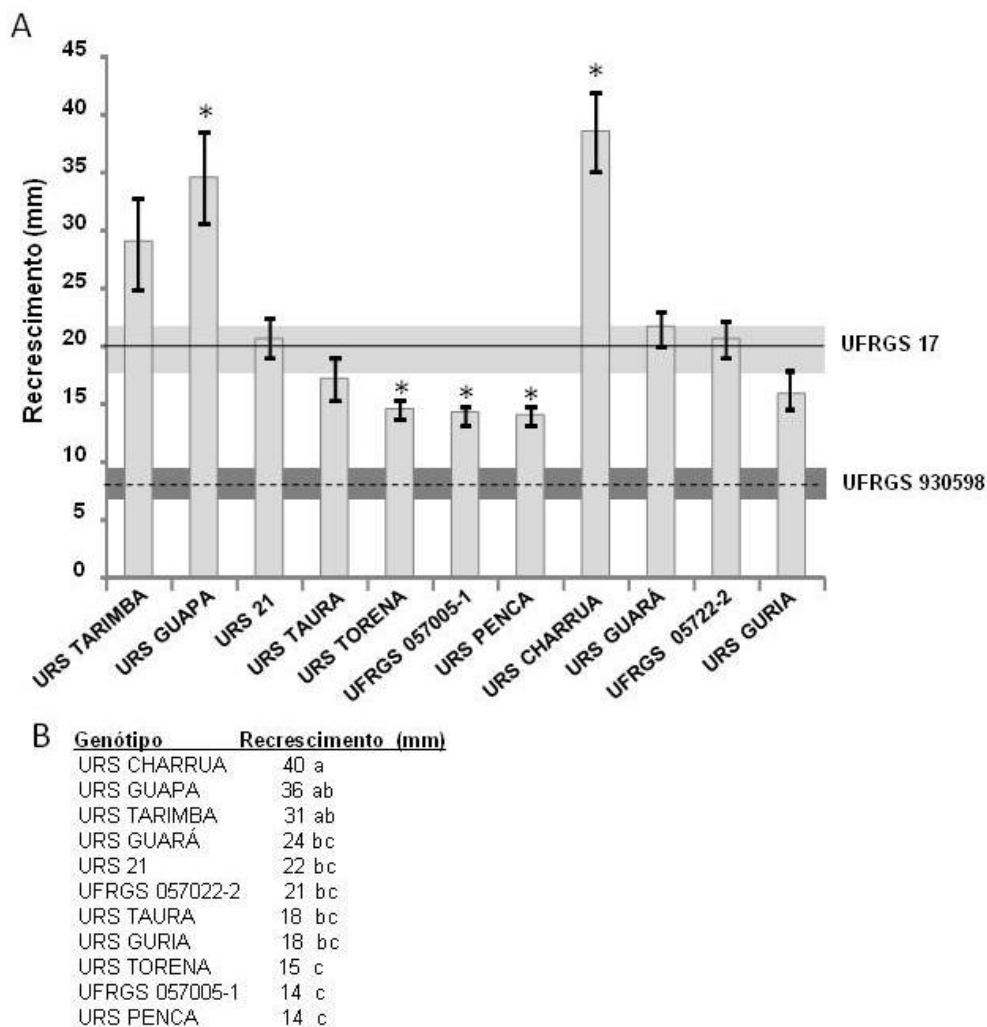


FIGURA 5. Comparação do recrescimento da raiz principal após exposição ao alumínio entre genótipos elite de aveia hexaplóide. (A) Média do recrescimento da raiz principal após exposição ao alumínio (740 $\mu$ M) em comparação com os controles tolerante (UFRGS17) e sensível (UFRGS 930598). Apresentadas médias e erro padrão. Linha contínua e hachurado cinza claro indicam, respectivamente, média e erro padrão do controle tolerante; linha tracejada e hachurado cinza escuro indicam, respectivamente, média e erro padrão do controle sensível. \*Indica diferença de UFRGS 17 pelo teste-t  $P \leq 0,05$ . (B) Comparação de médias do recrescimento da raiz dos genótipos elite de aveia pelo teste Tukey  $P \leq 0,05$ .

URS Charrua apresentou maior número de indivíduos no extremo direito da curva, indicando tolerância superior a URS Guapa. Os genótipos URS Tarimba, URS Guará, URS 21, UFRGS 057022-2, URS Taura e URS Guria



não diferiram do controle tolerante e foram, portanto, consideradas tolerantes ao Al. Apesar da média não diferir de UFRGS 17, os genótipos URS Tarimba, UFRGS 057022-2 e URS Guará não apresentaram indivíduos com recrescimento inferior a 12mm, enquanto UFRGS 17 exibiu indivíduos com apenas 6mm de recrescimento. Isso sugere que esses genótipos apresentam nível superior de tolerância ao Al, em especial, URS Tarimba, que concentrou o recrescimento radicular dos indivíduos entre 24mm e 36mm, demonstrando uma modificação na curva de frequência em direção à direita. URS Torena, UFRGS 0570005-1 e URS Penca foram inferiores ao controle tolerante e superiores ao controle sensível, sendo consideradas com tolerância intermediária. UFRGS 930598-6, o controle sensível, diferiu de todos os demais genótipos.

Se considerada a genealogia dos genótipos, observa-se que a maioria dos genótipos tolerantes tem como ancestral comum a cultivar Coronado, conhecido por sua boa adaptabilidade aos solos do Sul do Brasil.  possível que os genes de tolerância ao Al estivessem presentes em Coronado e tenham sido transferidos a esses genótipos. A tolerância ao Al foi considerada monognica para a população UFRGS 17 x UFRGS 930598-6 (Nava *et al.*, 2006). No entanto, no presente estudo, três diferentes graus de tolerância ao Al foram observados entre os genótipos tolerantes, sugerindo que estes possuam diferentes genes ou que o gene apresente penetrância incompleta ou expressividade variável.

A partir de análises com hematoxilina, tem sido sugerido que ao contrário de UFRGS 930598-6, UFRGS 17 é capaz de reduzir a quantidade de Al<sup>3+</sup> nos tecidos internos da raiz, próximo ao meristema, e limitar o estresse

oxidativo causado pelo  $Al^{3+}$  (Castilhos *et al.*, 2011). É possível que a entrada de  $Al^{3+}$  seja restringida pela secreção de ácidos orgânicos, como observado em variedades cultivadas nos Estados Unidos (Radmer *et al.*, 2012). Em trigo, acredita-se que a tolerância depende do gene *TaALMT1*, que codifica um transportador de malato, e que o grau de tolerância dos genótipos está relacionado à expressão desse gene (Delhaize *et al.*, 2012). Genes homólogos a *ALMT1* foram identificados em centeio, *Brachipodium distachyon*, *Brassica napus* e *Arabidopsis thaliana* (Hoekenga *et al.*, 2006; Ligaba *et al.*, 2006; Collins *et al.*, 2008). Já em sorgo, a tolerância é devida a um transportador de citrato, *SbMATE*, (Magalhaes *et al.*, 2007), gene similar também foi encontrado em trigo, milho, centeio, arroz, feijão e *Arabidopsis* (Liu *et al.*, 2009; Ryan *et al.*, 2009; Eticha *et al.*, 2010; Maron *et al.*, 2010; Yokosho *et al.*, 2011). Em aveia, a grande maioria desses genes ainda não foi identificada. Recentemente, foram identificadas sequências homólogas aos genes *ALMT1* e *STOP1* nos genótipos UFRGS17 e UFRGS 930598-6, sendo que análises para validação destas como genes ativos devem ser conduzidas.

Ao comparar o recrescimento obtido neste experimento com aquele do primeiro experimento que utilizou apenas os genótipos controle, observa-se um maior recrescimento neste último (FIGURA 1 e FIGURA 4). O provável motivo para o maior recrescimento neste experimento que no experimento somente com os genótipos UFRGS 17 e UFRGS 930598-6 é o pH da solução nutritiva. No primeiro experimento o pH foi mantido em 4,0 enquanto neste experimento o pH da solução foi mantido em 4,5. Em presença de pH 4,0 a disponibilidade de  $Al^{3+}$  é maior, assim como sua atividade, resultando em maior toxicidade

(Kinraide *et al.*, 1992). Nas Tabelas 3 e 4, os valores das formas de Al disponíveis na solução tratamento em pH 4 e pH 4,5 são demonstradas.

TABELA 3. Distribuição das formas de Al disponíveis na solução hidropônica em pH 4.0

Componente	Concentração %	Íon	Atividade (mol/l)
Al	28,258	$Al^{3+}$	-
	1,163	$AlOH^{+2}$	-
	0,030	$Al(OH)_2^+$	-
	0,014	$Al_2(OH)_2^{+4}$	-
	66,457	$AlSO_4^+$	-
	4,077	$Al(SO_4)_2^-$	-
$Al^{3+}$			0,000052812

TABELA 4. Distribuição das formas de Al disponíveis na solução hidropônica em pH 4.5

Componente	Concentração %	Íon	Atividade (mol/l)
Al	26,837	$Al^{3+}$	-
	3,508	$AlOH^{+2}$	-
	0,289	$Al(OH)^{2+}$	-
	0,021	$Al_3(OH)_4^{+5}$	-
	0,130	$Al_2(OH)_2^{+4}$	-
	65,120	$AlSO_4^+$	-
	4,093	$Al(SO_4)_2^-$	-
$Al^{3+}$			0,000050552

Apesar da ausência de seleção direta para o caráter tolerância ao Al, todos os genótipos elite avaliados apresentaram tolerância, inclusive com características superiores ao controle tolerante UFRGS 17. É possível que o gene que confere a tolerância ao Al esteja associado a outras características de interesse agrônomo e, portanto, tenha sido selecionado indiretamente.

### 4.3 Histolocalização do Al

Utilizando o método de coloração de Al via hematoxilina, foi observada a localização do Al em cortes transversais do tecido radicular dos genótipos UFRGS 17 e Guapa em diferentes concentrações de Al (FIGURA 6). O aumento de 500 para 1000 $\mu$ M de Al na solução tende a aumentar a entrada de Al no tecido radicular, o que pode ser observado pelo maior número de manchas roxas nos tecidos, especialmente em UFRGS 17. Comparando-se URS Guapa (FIGURA 6B) e UFRGS 17 (FIGURA 6D) em 1000 $\mu$ M percebe-se que o Al teve um efeito maior, apresentando células com menor tamanho no córtex, conduzindo a um menor diâmetro da raiz.

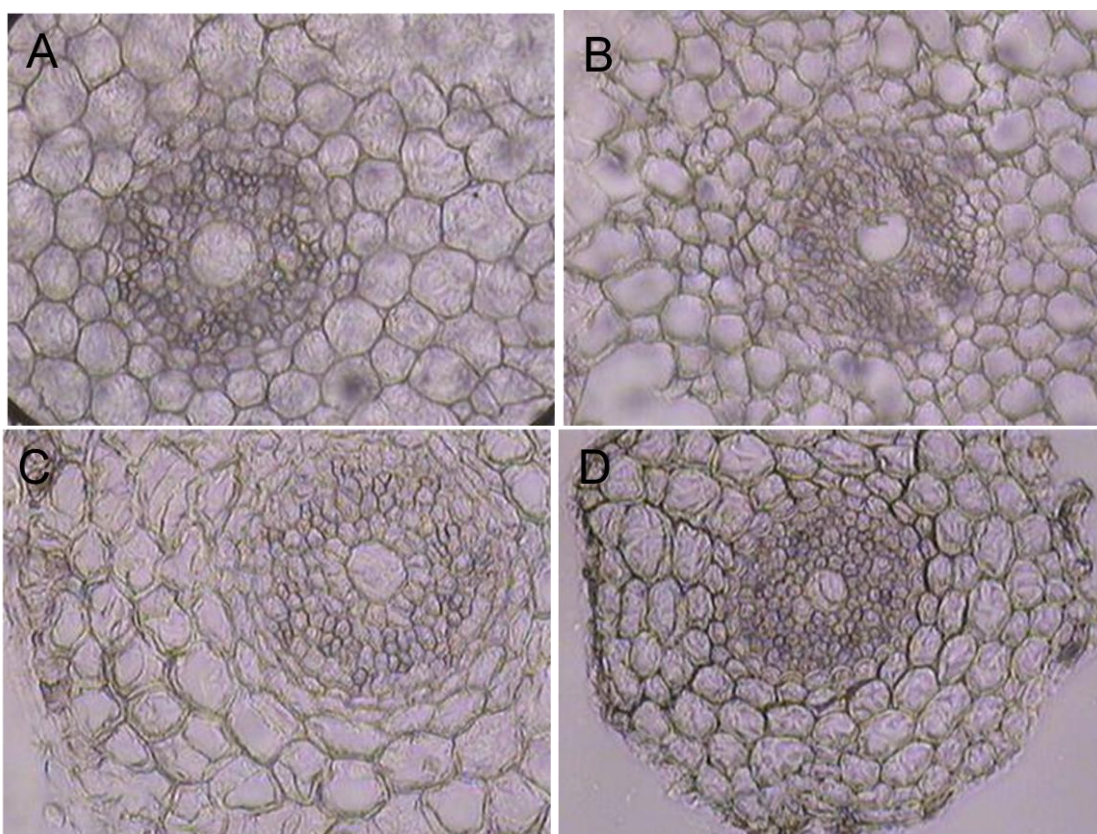


FIGURA 6. Histolocalização de Al em cortes transversais de raízes de genótipos de aveia hexaplóide, submetidas ao tratamento com Al através do método de coloração via hematoxilina. (A e B) URS Guapa, (C e D) UFRGS 17 expostos a 500 $\mu$ M e 1000 $\mu$ M de Al, re respectivamente. Cor roxa localiza Al (aumento 100x).

#### 4.4 Malato exsudado na solução

Após tratamento com Al durante 24h, plantas do genótipo UFRGS 17 exsudaram valores significativamente maiores ( $p < 0,001$ ) em comparação ao tratamento sem Al, com média de  $49,33 \text{ nmol/planta} \pm 9,45$ . Este valor é próximo ao encontrado em outro estudo, onde, embora as plantas tenham sido submetidas a condições de crescimento diferentes, o mesmo método de quantificação de malato foi utilizado e os genótipos tolerantes de aveia após 24h de exposição ao Al secretaram na solução de 52 a  $68 \text{ nmol/planta}$ , enquanto o genótipo sensível secretou  $29 \text{ nmol/planta}$  (Radmer *et al.*, 2012). No tratamento sem Al, assim como no genótipo UFRGS 930598-6 em tratamento com e sem Al, não foi possível mensurar a quantidade de malato presente na solução, possivelmente devido à sensibilidade do equipamento, não diferindo do branco. Indicando que a exposição ao Al induz a secreção de malato em genótipos de aveia tolerantes, provavelmente devido à ação de um transportador de malato como o *TaALMT1*, similar ao que ocorre em trigo (Sasaki *et al.*, 2004). Esta indução não foi observada no genótipo sensível, o que sugere que, ou a percepção do Al está afetada ou o transportador de malato neste genótipo não é funcional.

Os dados obtidos sugerem que o principal ácido orgânico exsudado em presença de Al no genótipo de aveia testado é o malato, em concordância com as linhas de pesquisa mais atuais (Radmer *et al.*, 2012), e contrastando com a afirmação de que citrato é o principal exsudado (Zheng *et al.*, 1998). Assim como em trigo, existe a possibilidade em aveia da exsudação de citrato como

um mecanismo secundário de tolerância ao Al (Ryan *et al.*, 2009) e que a quantidade de exsudado varia de acordo com o genótipo.

Devido à pequena quantidade de malato encontrada na solução e relatos da presença de Al na mucilagem em outras espécies (Archambault *et al.*, 1996; Cai *et al.*, 2013), surgiu a hipótese de que parte dos exsudados ficasse retida em torno da raiz, conforme observado em *Eriophorum angustifolium* após exposição a elementos tóxicos (Javed *et al.*, 2013), imobilizando o Al na mucilagem e assim diminuindo sua toxicidade. Essa hipótese é atrativa ao se considerar que em diversos trabalhos anteriores (Nava *et al.*, 2005; Limberger, 2006; Castilhos *et al.*, 2011), bem como no atual, genótipos sensíveis e tolerantes foram fenotipados em solução compartilhada. Se a exsudação de malato para a solução e conseqüente ligação com o Al fosse a razão principal da tolerância, esperar-se-ia que não fosse observada diferença entre genótipos contidos em mesma solução. Além disso, como discutido por Limberger (2006), quando utilizados grandes volumes (8L) de solução com elevada concentração de Al (740 $\mu$ M) e sob constante movimentação da solução, as plantas deveriam mostrar maior redução do crescimento geral, pois maiores quantidades de malato precisariam ser exsudadas para reduzir o Al em contato com a raiz. Esta maior exsudação causaria redução de esqueletos de carbono para o crescimento.

Para testar esta hipótese, foi realizado um experimento para medir o malato em raízes com remoção de mucilagem e sem sua remoção, conforme (Archambault *et al.*, 1996), buscando quantificar os teores de malato na mucilagem. Esperava-se que a manutenção de malato na mucilagem, portanto próximo as raízes, mesmo que em pequenas quantidades fosse mais eficiente

na proteção das mesmas quanto ao contato com o Al do que a liberação do malato livremente na solução. Porém, provavelmente devido as baixas concentrações de malato na mucilagem, ao pequeno volume de mucilagem e aos limites de detecção da metodologia utilizada, não foi possível mensurá-lo, não descartando esta hipótese.

#### **4.5 Acúmulo de alumínio nos órgãos vegetais**

Foi verificada a presença de Al nos tecidos de aveia mesmo no tratamento onde o Al estava ausente (TABELA 5) através do ICP-MS. Da mesma maneira, no método de espectrofotometria de absorbância atômica, utilizando os mesmos genótipos, tem sido observado Al nos tecidos de plantas crescidas em solução controle (Pereira *et al.*, 2011). Sabe-se que a quantificação exata de baixas concentrações de Al torna-se difícil, principalmente devido à contaminação, podendo ocorrer por causa dos reagentes, pó, vidraria e objetos utilizados durante o experimento (Garcia *et al.*, 1997).

A presença de 740  $\mu\text{M}$  de Al na solução causou um aumento na concentração interna de Al, tanto na raiz quanto na parte aérea das plantas de aveia (TABELA 5).

Em ambos os genótipos, no tratamento sem Al, quando aplicado o teste t, não foi observada diferença significativa entre a concentração de Al no tecido radicular e na parte aérea (TABELA 5). Quando expostos a 740  $\mu\text{M}$  de Al, o genótipo UFRGS 17 apresentou um acúmulo significativamente maior de Al no tecido radicular, apresentando média de 616,25  $\mu\text{g.g}^{-1}$ , quando em comparação a parte aérea, média de 113,00  $\mu\text{g.g}^{-1}$  ( $p < 0,05$ ). O genótipo UFRGS 930598-6,

quando exposto a mesma concentração, também demonstrou maior acúmulo na raiz, com média de  $1001,63 \mu\text{g.g}^{-1}$ , enquanto na parte aérea a média de acúmulo foi de  $209,07 \mu\text{g.g}^{-1}$  ( $p < 0,05$ ). O maior acúmulo de Al na raiz em relação à parte aérea também foi observado em outros trabalhos, nos genótipos UFRGS 17, UFRGS 930598-6 e UFRGS 280, que é um genótipo de comportamento intermediário quanto a tolerância ao Al e derivado do cruzamento entre UFRGS 17 E UFRGS 930598-6 (Pereira *et al.*, 2011). A maior concentração de Al nas raízes em comparação a parte aérea, sugere que a ação de genes como o *ALS1* e *ALS3*, expressos na raiz em arábido, relacionados com o sequestro e redistribuição de Al para partes menos sensíveis da planta (Larsen *et al.*, 2005; Larsen *et al.*, 2007), não aparenta ser uma estratégia utilizada para a tolerância ao Al em aveia, havendo pouca translocação para parte aérea.

TABELA 5. Concentração de Al nas raízes e parte aérea dos genótipos UFRGS 17 e UFRGS 930598 após 24 horas de exposição ao Al

Genótipo	Concentração Al na solução	Concentração de Al ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	
		Raiz	Parte Aérea
UFRGS 17	740 $\mu\text{M}$	616,25 $\pm$ 213,15*	113,00 $\pm$ 74,23
UFRGS 17	0 $\mu\text{M}$	100,30 $\pm$ 50,94	31,57 $\pm$ 30,01
UFRGS 930598-6	740 $\mu\text{M}$	1001,63 $\pm$ 449,35*	209,07 $\pm$ 52,55
UFRGS 930598-6	0 $\mu\text{M}$	407,65 $\pm$ 350,08	136,03 $\pm$ 98,77

Médias seguidas por \* na linha diferem entre si estatisticamente ( $p < 0,05$ )

Não foi observada diferença estatística entre a quantidade de Al encontrada no genótipo UFRGS 930598-6 em comparação a UFRGS 17, diferindo de resultados encontrados em outros estudos, onde o genótipo UFRGS 17 acumulou menos Al que os genótipos menos tolerantes (Pereira *et*



*al.*, 2011). No entanto, isto não descarta a hipótese de que UFRGS 17 apresenta um mecanismo de redução da entrada deste metal, uma detoxificação externa (Castilhos *et al.*, 2011), possivelmente através da exsudação de ácidos orgânicos como em outros genótipos de aveia (Radmer *et al.*, 2012). A não obtenção de diferença estatística entre os genótipos se deveu a grande variação encontrada entre as amostras. É necessário aumentar o número de amostras avaliadas, sendo que neste experimento apenas três repetições foram utilizadas. Há necessidade também de melhorar a metodologia de lavagem das amostras para garantir que o Al da solução não permaneça como resíduo no tecido ao se fazer o congelamento.

## 5 CONCLUSÕES

Os genótipos UFRGS 17 (tolerante) e UFRGS 930598-6 (sensível) continuam sendo genótipos muito importantes em estudos buscando elucidar e diferenciar mecanismos de tolerância ao Al presente no solo. O presente trabalho permite a inferência de que um dos mecanismos capazes de promover determinado incremento quanto a tolerância ao Al no genótipo UFRGS 17 é a exsudação de malato, ausente no UFRGS 930598-6. Em ambos os genótipos, o Al foi encontrado em maior parte, no tecido radicular, demonstrando que a translocação do Al para a parte aérea, não é uma estratégia presente em aveia.

Através do trabalho realizado, também foi possível concluir que as cultivares URS Charrua, URS Guapa e URS Tarimba apresentam maior recuperação do crescimento radicular após o estresse de Al em condição hidropônica, podendo estas serem mais adequadas para cultivo em locais onde há presença de Al tóxico no perfil do solo. Análises genéticas futuras, a partir do cruzamento dessas cultivares com UFRGS 17, permitirão confirmar se a tolerância se deve à ação do mesmo gene. A identificação de genes diferentes permitiria a piramidização destes, resultando em genótipos capazes de combinar diferentes mecanismos de tolerância ao Al e assim, permitindo incrementos nos níveis de tolerância ao Al.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARY, V. M. M.; PARINANDI, N. L.; PANDA, B. B. Aluminum induces oxidative burst, cell wall NADH peroxidase activity, and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 53, n. 7, p. 550-560, 2012.

ACHARY, V. M. M.; PARINANDI, N. L.; PANDA, B. B. Calcium channel blockers protect against aluminium-induced DNA damage and block adaptive response to genotoxic stress in plant cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 751, n. 2, p. 130-138, 2013.

ARCHAMBAULT, D. J.; ZHANG, G.; TAYLOR, G. J. Accumulation of Al in Root Mucilage of an Al-Resistant and an Al-Sensitive Cultivar of Wheat. **Plant Physiology**, Rockville, v. 112, n. 4, p. 1471-1478, 1996.

CAI, M., et al. Immobilization of aluminum with mucilage secreted by root cap and root border cells is related to aluminum resistance in *Glycine max* L. **Environ Sci Pollut Res**, Landsberg, p. 1-10, 2013. Epub ahead of print. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11356-013-1815-6>>. Acesso em: 20 jul. 2013.

CAMARGO, C. E. D. O. Efeito da temperatura da solução nutritiva na tolerância ao alumínio de cultivares de trigo. **Bragantia**, Campinas, v. 42, n. 1, p. 51-63, 1983.

CASTILHOS, G., et al. Aluminum-stress response in oat genotypes with monogenic tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 74, n. 0, p. 114-121, 2011.

CLARKE, F. W.; WASHINGTON, H. S. The composition of the earth's crust: **US Government Printing Office**, Washington, v. 127, n. 0, p. 117, 1924

COLLINS, N. C., et al. An *ALMT1* gene cluster controlling aluminum tolerance at the *Alt4* locus of rye (*Secale cereale* L.). **Genetics**, Baltimore, v. 179, n. 1, p. 669-682, 2008.

DELHAIZE, E.; MA, J. F.; RYAN, P. R. Transcriptional regulation of aluminium tolerance genes. **Trends in Plant Science**, London, v. 17, n. 6, p. 341-348, 2012.

ETICHA, D., et al. Transcriptomic analysis reveals differential gene expression in response to aluminium in common bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes. **Annals of Botany**, London, v. 105, n. 7, p. 1119-1128, 2010.

GARCIA, S. C.; GIODA, A.; NASCIMENTO, D. B. do. O problema da contaminação na determinação de traços de alumínio. **Química Nova**, São Paulo, v. 20, n. 4, p. 407, 1997.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

GRABSKI, S.; SCHINDLER, M. Aluminum induces rigor within the actin network of soybean cells. **Plant Physiology**, Rockville, v. 108, n. 3, p. 897-901, 1995.

HARTWIG, I., et al. Mecanismos associados à tolerância ao alumínio em plantas. **Semina: ciência agrária**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 219-228, 2007.

HOEKENGA, O. A., et al. AtALMT1, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Raleigh, v. 103, n. 25, p. 9738-9743, 2006.

HORST, W. J.; WAGNER, A.; MARSCHNER, H. Mucilage protects root meristems from aluminium injury. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, Stuttgart, v. 105, n. 5, p. 435-444, 1982.

IUCHI, S., et al. Zinc finger protein STOP1 is critical for proton tolerance in Arabidopsis and coregulates a key gene in aluminum tolerance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Raleigh, v. 104, n. 23, p. 9900-9905, 2007.

JAVED, M. T., et al. Changes in pH and organic acids in mucilage of *Eriophorum angustifolium* roots after exposure to elevated concentrations of toxic elements. **Environ Sci Pollut Res**, Landsberg, v. 20, n. 3, p. 1876-1880, 2013.

JULIAN, I. S., et al. Using membrane transporters to improve crops for sustainable food production. **Nature**, London, v. 497, n. 7447, p. 60-66, 2013.

KINRAIDE, T. B.; RYAN, P. R.; KOCHIAN, L. V. Interactive Effects of Al<sup>3+</sup>, H<sup>+</sup>, and Other Cations on Root Elongation Considered in Terms of Cell-Surface Electrical Potential. **Plant Physiology**, Rockville, v. 99, n. 4, p. 1461-1468, 1992.

KOCHIAN, L.; PIÑEROS, M.; HOEKENGA, O. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 274, n. 1, p. 175-195, 2005.

LARSEN, P. B., et al. Arabidopsis ALS1 encodes a root tip and stele localized half type ABC transporter required for root growth in an aluminum toxic environment. **Planta**, New York, v. 225, n. 6, p. 1447-1458, 2007.

LARSEN, P. B., et al. ALS3 encodes a phloem-localized ABC transporter-like protein that is required for aluminum tolerance in Arabidopsis. **The Plant Journal**, Oxford, v. 41, n. 3, p. 353-363, 2005.

LIGABA, A., et al. The *BnALMT1* and *BnALMT2* genes from rape encode aluminum-activated malate transporters that enhance the aluminum resistance of plant cells. **Plant Physiology**, Rockville, v. 142, n. 3, p. 1294-1303, 2006.

LIMBERGER, E. **Identificação de genes responsivos ao alumínio tóxico em aveia branca (*Avena sativa* L.)**. 2006. 85 f. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

LISITSYN, E. M. Intravarietal level of aluminum resistance in cereal crops. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 23, n. 6, p. 793 - 804, 2000.

LIU, J., et al. Aluminum-activated citrate and malate transporters from the MATE and ALMT families function independently to confer Arabidopsis aluminum tolerance. **The Plant Journal**, Oxford, v. 57, n. 3, p. 2009.

LIU, Q., et al. Differential aluminum resistance and organic acid anions secretion in triticale. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 38, n. 15-16, p. 1991-2004, 2007.

MAGALHAES, J. V., et al. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. **Nat Genet**, Cidade, v. 39, n. 9, p. 1156-1161, 2007.

MARON, L. G., et al. Two functionally distinct members of the MATE (multi-drug and toxic compound extrusion) family of transporters potentially underlie two major aluminum tolerance QTLs in maize. **The Plant Journal**, Oxford, v. 61, n. 5, p. 728-740, 2010.

MARSHALL, A., et al. Crops that feed the world 9. Oats- a cereal crop for human and livestock feed with industrial applications. **Food Sec.**, London, v. 5, n. 1, p. 13-33, 2013.

MARTINS, N., et al. Differences in Al tolerance between *Plantago algarbiensis* and *P. almogravensis* reflect their ability to respond to oxidative stress. **Biometals**, Dordrecht, v. 26, n. 3, p. 427-437, 2013.

MURPHY, J. P.; HOFFMAN, L. A.. The origin, history, and production of oat. In: MARSHALL, H. G; SORRELLS, M. E. (Ed.). **Oat Science and Technology**, . Madison: American Society of Agronomy, 1992. p. 1-28.

NAVA, I. C. **Estratégias de avaliação e herança da tolerância ao alumínio em linhagens recombinantes de aveia (*Avena sativa* L.)**. 2005. 99 f. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

NAVA, I. C., et al. Inheritance of aluminum tolerance and its effects on grain yield and grain quality in oats (*Avena sativa* L.). **Euphytica**, Dordrecht, v. 148, n. 3, p. 353-358, 2006.

NEZAMES, C. D., et al. The Arabidopsis Cell Cycle Checkpoint Regulators TANMEI/ALT2 and ATR Mediate the Active Process of Aluminum-Dependent Root Growth Inhibition. **The Plant Cell Online**, Rockville, v. 24, n. 2, p. 608-621, 2012.

OLIVEIRA, P. H., et al. Inheritance in oat (*Avena sativa* L.) of tolerance to soil aluminum toxicity. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 5, n. , p. 125-133, 2005.

Obs: colocar número da revista.

PEREIRA, L., et al. Differential responses of oat genotypes: oxidative stress provoked by aluminum. **Biometals**, Rockville, v. 24, n. 1, p. 73-83, 2011.

PEREIRA, L. B., et al. Aluminum-induced oxidative stress in cucumber. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 48, n. 8, p. 683-689, 2010.

PIRŠELOVÁ, B.; MATUŠÍKOVÁ, I. Callose: the plant cell wall polysaccharide with multiple biological functions. **Acta Physiol Plant**, Warszawa, v. 35, n. 3, p. 635-644, 2013.

RADMER, L., et al. Aluminum resistance mechanisms in oat (*Avena sativa* L.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 351, n. 1-2, p. 121-134, 2012.

RENGEL, Z.; ZHANG, W. H. Role of dynamics of intracellular calcium in aluminium-toxicity syndrome. **New Phytologist**, Oxford, v. 159, n. 2, p. 295-314, 2003.

ROUNDS, M. A.; LARSEN, P. B. Aluminum-dependent root-growth inhibition in arabidopsis results from AtATR-regulated cell-cycle Arrest. **Current Biology**, Amsterdam, v. 18, n. 19, p. 1495-1500, 2008.

RYAN, P. R., et al. A second mechanism for aluminum resistance in wheat relies on the constitutive efflux of citrate from roots. **Plant Physiology**, Rockville, v. 149, n. 1, p. 340-351, 2009.

SANCHEZ-CHACON, C. D., et al. Viabilidade genética e herança da tolerância à toxicidade do alumínio em aveia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. , p. 1797-1808, 2000.

SASAKI, T., et al. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. **The Plant Journal: for cell and molecular biology**, Oxford, v. 37, n. 5, p. 645-653, 2004.

SAWAKI, Y., et al. STOP1 regulates multiple genes that protect arabidopsis from proton and aluminum toxicities. **Plant Physiology**, Rockville, v. 150, n. 1, p. 281-294, 2009.

SCHNEIDER, A. B. **Identificação de ortólogos associados a tolerância ao alumínio em aveia hexaploide**. 2012. 87 f. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

SIVAGURU, M., et al. Impacts of aluminum on the cytoskeleton of the maize root apex. short-term effects on the distal part of the transition zone. **Plant Physiology**, Rockville, v. 119, n. 3, p. 1073-1082, 1999.

TABALDI, L. A., et al. Physiological and oxidative stress responses of four potato clones to aluminum in nutrient solution. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 19, n. , p. 211-222, 2007.  
Obs: Acrescentar número da revista.

TABUCHI, A.; MATSUMOTO, H. Changes in cell-wall properties of wheat (*Triticum aestivum*) roots during aluminum-induced growth inhibition. **Physiologia Plantarum**, Oxford, v. 112, n. 3, p. 353-358, 2001.

UEXKÜLL, H. R.; MUTERT, E. Global extent, development and economic impact of acid soils. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 171, n. 1, p. 1-15, 1995.

WAGATSUMA, T., et al. Plasma membrane lipids are the powerful components for early stage aluminum tolerance in triticale. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 51, n. 5, p. 701-704, 2005.

WAGNER, C. W.; MILACH, S. C. K.; FEDERIZZI, L. C. Genetic inheritance of aluminum tolerance in oat. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 1, n. , p. 22-26, 2001.

WU, K., et al. Changes in the activity and transcription of antioxidant enzymes in response to Al stress in black soybeans. **Plant Mol Biol Rep**, New York, v. 31, n. 1, p. 141-150, 2013.

XIA, J., et al. Plasma membrane-localized transporter for aluminum in rice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 107, n. 43, p. 18381-18385, 2010.

YAMAJI, N., et al. A zinc finger transcription factor ART1 regulates multiple genes implicated in aluminum tolerance in rice. **The Plant Cell Online**, Rockville, v. 21, n. 10, p. 3339-3349, 2009.

YOKOSHO, K.; YAMAJI, N.; MA, J. F. An Al-inducible *MATE* gene is involved in external detoxification of Al in rice. **The Plant Journal**, Oxford, v. 68, n. 6, p. 1061-1069, 2011.

ZHENG, S. J.; MA, J. F.; MATSUMOTO, H. Continuous secretion of organic acids is related to aluminium resistance during relatively long-term exposure to aluminium stress. **Physiologia Plantarum**, Oxford, v. 103, n. 2, p. 209-214, 1998.