



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCAR
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – CCA – *Campus Araras*
Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente - *PPGAA*



JULIANA GILBERT PESSOA

**PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS RADICULARES DE
CANA-DE-AÇÚCAR SUBMETIDA AO ESTRESSE POR
ALUMÍNIO**

Araras-SP

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCAR
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – CCA – *Campus Araras*
Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente - PPGAA



JULIANA GILBERT PESSOA

**PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS RADICULARES DE
CANA-DE-AÇÚCAR SUBMETIDA AO ESTRESSE POR
ALUMÍNIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente como requisito para a obtenção do título de **Mestre em Agricultura e Ambiente**.

Orientador: Prof. Dr. Marcio Roberto Soares

Araras-SP
2019

Gilbert Pessoa, Juliana

PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS RADICULARES DE
CANA-DE-AÇÚCAR SUBMETIDA AO ESTRESSE POR ALUMÍNIO
/ Juliana Gilbert Pessoa. -- 2019.

73 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado) -Universidade Federal de São Carlos,
campus Araras, Araras

Orientador: Prof. Dr. Marcio Roberto Soares

Banca examinadora: Prof. Dr. Marcio Roberto Soares, Prof. Dr. José
Carlos Casagrande, Prof. Dr. Leonardo Pires Boava

Bibliografia

1. cana-de-açúcar. 2. estresse por alumínio. 3. mecanismo de defesa e
ácidos orgânicos. I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos.
III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Maria Helena Sachi do Amaral – CRB/8 7083




UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

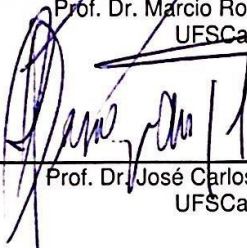
Centro de Ciências Agrárias
Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente

Folha de Aprovação

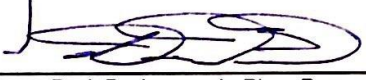
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Juliana Gilbert Pessoa, realizada em 01/03/2019:



Prof. Dr. Márcio Roberto Soares
UFSCar



Prof. Dr. José Carlos Casagrande
UFSCar



Prof. Dr. Leonardo Pires Boava
UNAR

DEDICATÓRIA

À Deus!
À minha família,
Em especial as minhas filhas
Ana Luisa e Maria Laura.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu agradeço a Deus, por sempre estar ao meu lado nessa caminhada árdua, porém compensatória. A minhas filhas tão amadas, Ana Luisa e Maria Laura, é por vocês que luto todos os dias. Amo vocês!!!!

A minha mãe Lucimar, por sempre incentivar os meus estudos, sem sua persistência não chegaria aqui, ao meu pai Cesar, pelo apoio e a minha irmã Luciana, que sempre me serviu de exemplo para trilhar o meu caminho, é para vocês que eu dedico cada vitória, por toda minha vida.

Ao meu marido Luis Mira, que demonstra diariamente que todo esforço vale a pena, principalmente quando se tem amor, obrigada. Aos meus sogros Dilma e Antônio, minha enteada Maria Eduarda, minhas cunhadas e cunhados, sobrinhas e sobrinhos, vocês fazem parte desta conquista.

A todos os professores da UFSCar, em especial ao Dr. Marcio Roberto Soares, que aceitou compartilhar comigo esse sonho e me orientou de uma maneira tão especial e acolhedora, meu muito obrigada!!! A Dra. Elma, pela dedicação e pelos conhecimentos compartilhados.

Ao professor Dr. João Bosco Pesquero, um exemplo de professor e cientista, que me ofereceu a oportunidade de vivenciar o que a ciência proporciona de melhor, “crescimento e saber”. Meu eterno agradecimento. A todos os amigos da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), obrigada.

Ao meu grande amigo Rubens Olívio, que me ensinou, me orientou, e que me ajudou a construir esse trabalho, acompanhou toda a minha luta e dividiu comigo as conquistas e as decepções, muito obrigada, sem você não conseguiria chegar ao final do projeto.

Aos amigos Ana Lucia, Julia, Tammy e Saulo que acreditaram e me ajudaram de forma direta na execução do meu projeto, registro aqui minha gratidão.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente pela oportunidade. Aos amigos da pós-graduação, Ana Lúcia, Ana Carolina, Thiago, André, Altemar, Cris, Driélle, Elisângela, Flávia e José Mauro por compartilharmos juntos dificuldades, Alegrias e aprendizado.

A todos os funcionários da UFSCar, especialmente aos técnicos, Camila Pessoto, Grabiela Strozzi e Priscila Macedo, e ao Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-

açúcar (PMGCA), ao técnico João Consonni, ao Aluno Paulo Pizzi que não mediram esforços para ajudar no que fosse necessário para a realização deste projeto.

Aos professores funcionários e estagiários do Departamento de Recurso Naturais e proteção Ambiental (DRNPA/CCA/UFSCar) pelo apoio fundamental para a realização do meu mestrado.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização desta dissertação e a todos aqueles que torceram por mim, meus sinceros agradecimentos!

Se quiser triunfar na vida, faça da perseverança a sua melhor amiga; da experiência, o seu conselheiro; da prudência, o seu irmão mais velho; e da esperança; o seu anjo da guarda.

(Joseph Addison)

RESUMO

Há perspectivas de aumentos de produtividade da cultura da cana-de-açúcar com a adequação das variedades ao zoneamento edafoclimático. Várias restrições à expressão do potencial genético das variedades são atribuídas à alta saturação por alumínio fitotóxico (Al^{3+}) no solo, que impede a expansão do sistema radicular da cana-de-açúcar. Trata-se de característica típica de solos ácidos altamente intemperizados. Um dos mecanismos de tolerância ao Al^{3+} está associado à produção de ácidos orgânicos (AOs) pelas raízes. O propósito deste trabalho foi identificar e quantificar a produção dos ácidos orgânicos cítrico, málico e oxálico por raízes de plântulas de cana-de-açúcar expostas ao estresse por Al^{3+} em solução. Minirrebolos de duas variedades de cana-de-açúcar (RB928064 e RB855156) foram pré-brotados em vermiculita, sob condições climatizadas de casa-de-vegetação. Após 25 dias, houve triagem de plântulas com maior uniformidade de brotação e com melhor padrão de vigor, seguida da lavagem do sistema radicular. Em laboratório, as plântulas foram transferidas para recipiente de 30 L para imersão do sistema radicular em solução nutritiva completa. O conjunto foi mantido sob temperatura ambiente, com fotoperíodo simulado de 12 h, intensidade luminosa de 4,5 klux e arejamento contínuo da solução. Após seis dias de aclimação, foram selecionadas 25 plântulas de cada variedade que, após a aferição do comprimento inicial das raízes (C_i), foram submetidas aos tratamentos com doses crescentes de Al^{3+} (0, 500, 1000, 1500 e 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em tubetes individualizados, com as mesmas condições ambientais da fase de aclimação. O pH da solução foi diariamente ajustado para 4,0 ($\pm 0,2$) com HCl 0,1 mol L^{-1} , para garantir o predomínio da espécie Al^{3+} . Após seis dias de exposição ao estresse por Al^{3+} , foi medido o comprimento final (C_f) das raízes. O crescimento radicular (cm) foi estimado por $\text{Cr} = C_f - C_i$. Amostras do tecido radicular fresco foram trituradas juntamente com etanol 80%, filtradas, submetidas a tratamento ultrassônico e centrifugadas. O sobrenadante foi evaporado a 55 °C, com posterior ressuspensão em água destilada e ultrafiltração. Amostras da solução foram coletadas dos tubetes para a determinação dos teores de AOs exsudados. Os extratos foram analisados em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência para identificação e quantificação dos ácidos cítrico, málico e oxálico. O experimento foi disposto em delineamento inteiramente casualizado, com esquema fatorial 2 (variedades) \times 5 (doses de Al^{3+}) e cinco réplicas. Os resultados de Cr e dos teores de AOs foram submetidos à análise de variância, ao teste de Tukey ($p < 0,05$) e análise de regressão em função das doses crescentes de Al^{3+} em solução. Ambas as variedades produziram AOs (málico > cítrico > oxálico), inclusive na ausência do Al^{3+} . A variedade RB928064 produziu maior quantidade dos ácidos cítrico, málico e oxálico. A produção de ácido cítrico no tecido radicular da RB928064 foi induzida a partir de 1500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Al^{3+} e foi ajustada por um modelo de regressão polinomial quadrático ($R^2 = 0,74$; $p < 0,01$). A produção de ácido málico e de ácido oxálico não foi induzida pelo aumento do estresse por Al^{3+} e foi considerada uma característica estritamente varietal. A maior proporção (57% a 94%) dos teores de AOs produzidos pelas variedades se manteve no tecido radicular, com exceção da variedade RB855156 que exsudou 69% do total de ácido oxálico produzido. Os teores totais (tecido radicular + exsudado) de ácido cítrico produzidos pela RB928064 em função das doses de Al^{3+} foi estimada por um modelo de regressão linear ($R^2 = 0,43$; $p < 0,01$).

O Cr da RB928064 não foi alterado pelo estresse crescente por Al^{3+} e houve diminuição do Cr da RB855156 à partir de $1500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Al^{3+} . A variedade RB928064 foi considerada mais tolerante ao estresse por Al^{3+} quando comparada a variedade RB855156. A tolerância ao Al^{3+} permite a expansão do sistema radicular da cana-de-açúcar para camadas mais profundas do solo, diminuindo a suscetibilidade ao estresse hídrico e ampliando a capacidade de exploração de nutrientes. Trata-se de característica que permite a alocação da RB928064 em ambientes de produção mais restritivos, mantendo seu potencial produtivo.

Palavras-chave: *Saccharum* sp.; Sistema radicular; Alumínio fitotóxico; Estresse abiótico; Ambientes de produção.

ABSTRACT

There are prospects of increases in the productivity of the sugarcane crop with the suitability of the varieties to the edaphoclimatic zoning. Several restrictions on the expression of the genetic potential of the varieties are attributed to the high saturation by phytotoxic aluminum (Al^{3+}) in the soil, which prevents the expansion of the sugarcane root system. This is a typical characteristic of highly weathered acid soils. One of the mechanisms of Al^{3+} tolerance is associated with the production of organic acids (OAs) by the roots. The aim of this work was to identify and quantify the production of citric, malic and oxalic acids by roots of sugarcane seedlings exposed to Al^{3+} stress in solution. Mini grinding of two sugarcane varieties (RB928064 and RB855156) were pre-sprouted in vermiculite under greenhouse climatic conditions. After 25 days, seedlings were screened for higher sprout uniformity and better vigor pattern, followed by root system washing. In the laboratory, the seedlings were transferred to 30 L containers for immersion of the root system in complete nutrient solution. The set was maintained at room temperature, with simulated photoperiod of 12 h, light intensity of 4.5 klux and continuous aeration of the solution. After six days of acclimatization, 25 seedlings of each variety were selected. These had the initial root length measurement (C_i) and they were submitted to treatments with increasing doses of Al (0, 500, 1000, 1500 and 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$) in individualized tubes, with the same environmental conditions of the acclimation phase. The pH of the solution was adjusted daily ($\text{pH} = 4.0 \pm 0.2$) with 0.1 mol L^{-1} HCl, to guarantee the predominance of the Al^{3+} species. After six days of exposure to Al stress, the final length (C_f) of the roots was measured. Root growth (cm) was estimated as $C_r = C_f - C_i$. Samples of fresh root tissue were ground in 80% ethanol, filtered, subjected to ultrasonic treatment and centrifuged. The supernatant was evaporated at 55°C and resuspended in distilled water, before ultrafiltration. Samples of the solution were collected to determine the OAs contents. The extracts were analyzed in a high performance liquid chromatography system for the identification and quantification of citric, malic and oxalic acids. The experiment was arranged in a completely randomized design with factorial scheme 2 (varieties) \times 5 (doses of Al^{3+}) and five replicates. The results of C_r and OAs contents were submitted to analysis of variance, with Tukey post-test ($p < 0.05$) and regression analysis as a function of increasing doses of Al in solution. Both varieties produced OAs (malic > citric > oxalic), even in the absence of Al^{3+} . The variety RB928064 produced higher concentrations of citric, malic and oxalic acids. The production of citric acid in the root tissue of RB928064 was induced by 1500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of Al^{3+} . It was adjusted by a quadratic polynomial regression model ($R^2 = 0.74$; $p < 0.01$). The malic acid and oxalic acid production were not induced by the Al^{3+} stress. Therefore, it was considered a strictly varietal characteristic. The highest proportion (57% to 94%) of the contents of OAs produced by the varieties was maintained in the root tissue, except for the variety RB 855156, which exuded 69% of the total oxalic acid produced. The total contents (root tissue + exudate) of citric acid produced by RB928064 as a function of Al^{3+} doses was estimated by a linear regression model ($R^2 = 0.43$; $p < 0.01$). C_r of RB928064 was not altered by increased Al^{3+} stress and C_r of RB855156 variety decreased starting at 1500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of Al. RB928064 variety was considered more tolerant to Al^{3+} stress than RB855156. Al tolerance allows the expansion of the sugarcane root system to deeper layers of the soil, reducing the susceptibility to water stress and increasing the nutrient exploitation capacity. It is a feature that allows the allocation of RB928064 in more restrictive production environments, maintaining its productive potential.

Keywords: *Saccharum* sp.; Root system; Phytotoxic aluminum; Abiotic stress; Production environments.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ácidos orgânicos dos ápices radiculares de plantas estressadas por Al^{3+} . Representação das células típicas das extremidades radiculares, exsudando os ácidos orgânicos induzidos por Al^{3+} . Adaptado de SINGH (2017)..... 25
- Figura 2.** Estruturas químicas dos ácidos cítrico, málico e oxálico..... 27
- Figura 3.** (A) Tratamento térmico padrão (água quente a 50,5 °C por 2 horas) de minirrebolos de cana-de-açúcar; (B) imersão dos minirrebolos em tanque para banho térmico; (C) imersão dos minirrebolos em balde com solução de fungicida sistêmico à base de azoxistrobina e ciproconazol 0,1% na solução..... 32
- Figura 4.** (A) Operação de selagem das extremidades dos minirrebolos de cana-de-açúcar com parafina; (B) acomodação dos minirrebolos em bandeja contendo vermiculita para brotação..... 32
- Figura 5.** (A) Etapa da brotação de minirrebolos; (B e C) desenvolvimento inicial de plântulas de cana-de-açúcar em bandejas com vermiculita mantidas em casa de vegetação climatizada..... 33
- Figura 6.** (A) Plântulas de cana-de-açúcar após o período de desenvolvimento inicial em casa de vegetação; (B) plântula de cana-de-açúcar com padrão adequado de desenvolvimento e com sistema radicular isento de partículas de vermiculita..... 34
- Figura 7.** (A) Disposição de plântulas de cana-de-açúcar durante fase de aclimação em recipiente contendo solução nutritiva completa; (B) aferição da intensidade de luz incidente sobre as plântulas de cana-de-açúcar..... 34
- Figura 8.** Plântulas de cana-de-açúcar com sistema radicular exposto a solução nutritiva acrescida de concentrações crescentes de Al^{3+} 37
- Figura 9.** (A) Sistema radicular de minirrebolo de cana-de-açúcar após a etapa de estresse por Al^{3+} ; (B) Tecido radicular excisado e triturado com pistilo em almofariz..... 39

| | | |
|-------------------|--|----|
| Figura 10. | Processo de preparação para evaporação da solução nutritiva utilizada no tratamento de exposição ao estresse por Al^{3+} | 39 |
| Figura 11. | (A) Cromatogramas do perfil das soluções padrão de ácido oxálico (1,89 min), ácido cítrico (3,95 min) e ácido málico (4,53 min.). (B, C e D) ácidos extraídos de amostra de raiz de cana-de-açúcar (RB928064), empregando fase móvel ácido ortofosfórico 0,01 mol L ⁻¹ , pH 2,00 para os ácidos cítrico e málico e 0,001 mol L ⁻¹ , pH 2,35 para o ácido oxálico..... | 44 |
| Figura 12. | Análise estatística de Bloxpot de teores médios de ácido cítrico (raíz - A e C; total - B e D), resultantes de cinco (A e B) e de três replicas (C e D) dos tratamentos com doses crescentes de Al^{3+} em solução para as variedades RB855156 (T1= 0 μ mol L ⁻¹ ; T2= 500 μ mol L ⁻¹ , T3= 1000 μ mol L ⁻¹ , T4= 1500 μ mol L ⁻¹ , T5= 2000 μ mol L ⁻¹) e RB928064 (T6= 0 μ mol L ⁻¹ ; T7= 500 μ mol L ⁻¹ , T8= 1000 μ mol L ⁻¹ , T9= 1500 μ mol L ⁻¹ , T10= 2000 μ mol L ⁻¹) de cana-de-açúcar; ° outlier..... | 46 |
| Figura 13. | Análise estatística de Bloxpot de teores médios de ácido málico (raíz - A e C; total - B e D), resultantes de cinco (A e B) e de três replicas (C e D) dos tratamentos com doses crescentes de Al^{3+} em solução para as variedades RB855156 (T1= 0 μ mol L ⁻¹ ; T2= 500 μ mol L ⁻¹ , T3= 1000 μ mol L ⁻¹ , T4= 1500 μ mol L ⁻¹ , T5= 2000 μ mol L ⁻¹) e RB928064 (T6= 0 μ mol L ⁻¹ ; T7= 500 μ mol L ⁻¹ , T8= 1000 μ mol L ⁻¹ , T9= 1500 μ mol L ⁻¹ , T10= 2000 μ mol L ⁻¹) de cana-de-açúcar; ° outlier..... | 47 |
| Figura 14. | Análise estatística de Bloxpot de teores médios de ácido oxálico (raíz - A e C; total - B e D), resultantes de cinco (A e B) e de três replicas (C e D) dos tratamentos com doses crescentes de Al^{3+} em solução para as variedades RB855156 (T1= 0 μ mol L ⁻¹ ; T2= 500 μ mol L ⁻¹ , T3= 1000 μ mol L ⁻¹ , T4= 1500 μ mol L ⁻¹ , T5= 2000 μ mol L ⁻¹) e RB928064 (T6= 0 μ mol L ⁻¹ ; T7= 500 μ mol L ⁻¹ , T8= 1000 μ mol L ⁻¹ , T9= 1500 μ mol L ⁻¹ , T10= 2000 μ mol L ⁻¹) de cana-de-açúcar; ° outlier..... | 48 |
| Figura 15. | Ajuste polinomial da produção de ácido cítrico no tecido radicular de plântulas da variedade RB928064 de cana-de-açúcar submetidas a doses crescentes de Al^{3+} em solução..... | 50 |
| Figura 16. | Ajuste linear da concentração total de ácido cítrico produzido por plântulas da variedade RB928064 de cana-de-açúcar submetidas a doses crescentes de Al^{3+} em solução..... | 52 |
| Figura 17. | Correlação entre o crescimento radicular e concentração dos ácidos orgânicos no tecido radicular e nos totais de ácidos orgânicos..... | 57 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-------------------|---|----|
| Tabela 1. | Teores foliares de macro e de micronutrientes considerados adequados para a cultura da cana-de-açúcar..... | 35 |
| Tabela 2. | Fontes e concentrações de macro e de micronutrientes utilizadas na composição da solução nutritiva para cultivo de plântulas de cana-de-açúcar..... | 36 |
| Tabela 3. | Condições operacionais do cromatógrafo líquido de alta eficiência para análise dos ácidos cítrico e málico provenientes do sistema radicular de plântulas de cana-de-açúcar submetidas ao estresse pelo Al^{3+} | 40 |
| Tabela 4. | Condições operacionais do cromatógrafo líquido de alta eficiência para análise dos ácido oxálico proveniente do sistema radicular de plântulas de cana-de-açúcar submetidas ao estresse pelo Al^{3+} | 40 |
| Tabela 5. | Curvas de calibração utilizadas para quantificação dos ácidos orgânicos de raiz e exsudados em solução nutritiva (concentração \times área do pico)..... | 41 |
| Tabela 6. | Crescimento radicular de plântulas de variedades de cana-de-açúcar submetidas a doses crescentes de Al^{3+} em solução..... | 42 |
| Tabela 7. | Análise de variância (ANOVA) e do modelo de regressão dos teores de ácidos orgânicos no tecido radicular e do crescimento de raízes de plântulas de variedades de cana-de-açúcar submetidas a doses crescentes de Al^{3+} em solução..... | 49 |
| Tabela 8. | Análise de variância (ANOVA) e do modelo de regressão dos teores ¹ totais de ácidos orgânicos produzidos por raízes de plântulas de variedades de cana-de-açúcar submetidas a doses crescentes de Al^{3+} em solução..... | 51 |
| Tabela 9. | Valores médios das concentrações dos ácidos cítrico, málico e oxálico no tecido radicular de plântulas de variedades de cana-de-açúcar submetidas a doses crescentes de Al^{3+} em solução nutritiva..... | 53 |
| Tabela 10. | Valores médios das concentrações ¹ totais dos ácidos cítrico, málico e oxálico produzidos por plântulas de variedades de cana-de-açúcar submetidas a doses crescentes de Al^{3+} em solução nutritiva..... | 55 |

LISTA DE ABREVIATURAS

Al: Alumínio

Al³⁺: Alumínio Fitotóxico

AOs: Ácidos Orgânicos

OAs: Organic Acids

Cr: Crescimento Radicular

Ci: Comprimento Inicial

Cf: Comprimento Final

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

SUMÁRIO

| | | |
|-----|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 17 |
| 1.1 | HIPÓTESE E OBJETIVOS..... | 18 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 18 |
| 2.1 | SOLOS ÁCIDOS E PRODUTIVIDADE | 18 |
| 2.2 | AMBIENTES DE PRODUÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR..... | 19 |
| 2.3 | PANORAMA DA CULTURA DE CANA-DE-AÇÚCAR NO BRASIL | 21 |
| 2.4 | SISTEMA RADICULAR DA CANA-DE-AÇÚCAR..... | 22 |
| 2.5 | EFEITOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DO ALUMÍNIO..... | 23 |
| 2.6 | MECANISMOS VEGETAIS DE TOLERÂNCIA AO Al^{3+} | 24 |
| 2.7 | ÁCIDOS ORGÂNICOS | 26 |
| 2.8 | PRODUÇÃO E SUSTENTABILIDADE | 29 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 30 |
| 3.1 | LOCAL DO ENSAIO E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL..... | 30 |
| 3.2 | OBTENÇÃO E PREPARO DOS MINIRREBOLOS DE CANA-DE-AÇÚCAR..... | 31 |
| 3.3 | BROTAÇÃO DOS MINIRREBOLOS DE CANA-DE-AÇÚCAR..... | 32 |
| 3.4 | ACLIMATAÇÃO DE PLÂNTULAS DE CANA-DE-AÇÚCAR EM SOLUÇÃO NUTRITIVA | 33 |
| 3.5 | EXPOSIÇÃO AO ESTRESSE POR Al^{3+} | 36 |
| 3.6 | AVALIAÇÕES BIOMÉTRICAS | 38 |
| 3.7 | EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE ÁCIDOS ORGÂNICOS | 38 |
| 3.8 | FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS | 41 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 42 |
| 4.1 | CRESCIMENTO RADICULAR..... | 42 |
| 4.2 | IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS..... | 43 |
| 4.3 | QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS | 45 |
| 4.4 | CRESCIMENTO RADICULAR E ÁCIDOS ORGÂNICOS | 56 |
| 5 | CONCLUSÕES | 58 |
| 6 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 59 |

1. INTRODUÇÃO

Devido à limitação da produtividade da cana-de-açúcar por fatores bióticos e abióticos vem-se buscando estudos direcionados ao melhoramento produtivo e sustentável do setor canavieiro no Brasil. A adequação de variedades mais resistentes à diversidade dos solos e ao zoneamento climático são as perspectivas mais promissoras de novos aumentos de produtividade desta cultura (REATTO; PASSOS, 2016).

A cana-de-açúcar possui uma grande importância econômica no Brasil, sendo a cultura de maior potencial na produção de açúcar e álcool (SILVA et al., 2014), ocupa a primeira posição na classificação mundial, sendo o estado de São Paulo responsável por 60% da produção nacional (KOHLHEPP, 2010). A expansão produtiva deverá ocorrer, principalmente, na região centro sul e centro oeste do país. A Companhia Nacional do Abastecimento (CONAB) estimou que a produção de cana-de-açúcar na safra 2018/19 será de 635,51 milhões de toneladas, número esse significativo para suprir a demanda crescente do mercado interno e externo por combustíveis renováveis, como o etanol (CONAB, 2018).

As regiões com potencial de produção apresentam limitações determinantes para o cultivo da cana-de-açúcar, nas quais, impedimentos físicos e químicos são as causas mais frequentes dos resultados negativos apresentados no balanço produtor. A toxidez dos solos é considerada a restrição mais relevante das regiões tropicais e subtropicais, em torno de 40 % dos solos aráveis do mundo são considerados ácidos e a toxidez por Al^{3+} é a principal barreira química (KOCHIAN et al., 2015).

A toxidez por alumínio fitotóxico (Al^{3+}) é apontada como uma das responsáveis pela inibição do crescimento radicular, bloqueando a aquisição e transporte de água e nutrientes, essenciais para o crescimento e desenvolvimento das raízes, afetando os mecanismos morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e citológicos da planta.

Um dos mecanismos que a planta dispõe em defesa aos efeitos tóxicos do Al^{3+} é a capacidade destas de produzir elevados teores de ácidos orgânicos (AOs) responsáveis pela complexação do Al^{3+} (MARIANO et al., 2005). A tolerância ao Al^{3+} pode ser dividida em dois grupos: de reparo, ocorrendo intracelular (MARIANO et al., 2005; FERNANDES, 2006) e de exclusão, liberando AOs na rizosfera (MARTINS et al., 2013) impedindo a absorção do Al^{3+} .

Selecionar variedades com referentes diferenciais à sensibilidade ao Al^{3+} , em conjunto com a eficiência dos mecanismos de defesa, demonstram a necessidade de identificar e pesquisar variedades de plantas tolerantes a determinados solos. A utilização de variedades com

características específicas para numerosos tipos de ambientes, colabora positivamente com a exploração mais eficaz do solo, e proporciona um aproveitamento maior da água disponível para a planta. Aplicando assim, de maneira sustentável, a melhor interação produtiva solo e planta, minimizando desta forma custos e elevando os números de produção da cana-de-açúcar.

1.1 HIPÓTESE E OBJETIVOS

Considerando a hipótese de que genótipos vegetais tolerantes ao Al^{3+} produzem maiores quantidades de AOs como um mecanismo de defesa ao estresse abiótico, o propósito deste trabalho foi identificar e quantificar a produção dos ácidos cítrico, málico e oxálico por raízes de plântulas de duas variedades de cana-de-açúcar submetidas a doses crescentes de Al^{3+} em solução. Os objetivos específicos foram:

- a) avaliar se a utilização da análise de cromatografia líquida de alta eficiência é adequada para a identificação e quantificação dos ácidos orgânicos;
- b) avaliar se o estresse por Al^{3+} induz a produção de AOs e altera o crescimento das raízes;
- c) identificar e quantificar os teores de AOs no tecido radicular e exsudados na solução;
- d) identificar a partir de qual nível de estresse ao Al^{3+} a produção de AOs é iniciada;
- e) verificar se as variedades diferem quanto ao tipo e quantidade dos AOs;

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SOLOS ÁCIDOS E PRODUTIVIDADE

A acidez do solo é um dos fatores que mais limitam a produtividade das culturas em várias partes do mundo, inclusive no Brasil. Os solos ácidos carregam como características principais, a deficiência e/ou toxidez nutricional, baixa capacidade de retenção de água e de atividade dos microrganismos (CARVALHO, 2011). A maioria das áreas com potencial para a expansão do cultivo da cana-de-açúcar possui limitações em termos de solo e/ou de condições climáticas. O sistema de classificação de ambientes de produção considera estas áreas com um mínimo potencial, de forma que não sejam negligenciadas para o cultivo agrícola por serem classificadas como marginais, degradadas ou improdutivas. Para incorporação desses solos ao processo produtivo, é indispensável o uso adequado de corretivos, como a calagem, que ainda

é uma das práticas menos dispendiosas e efetivas na correção da acidez do solo, possuindo o Brasil a vantagem de oferecer vastas reservas de calcário distribuídas em todo o território nacional (FAGERIA, 2001). Nestas áreas, a adoção de práticas de manejo e, principalmente, do genótipo com características favoráveis, pode resultar em produtividades, outrora consideradas improváveis.

Impedimentos físicos e químicos do solo têm sido apontados como a causa mais frequente da baixa produtividade, principalmente por limitar o crescimento radicular no subsolo (VASCONCELOS; GARCIA, 2005). Porém, os atributos químicos são os mais restritivos ao pleno desenvolvimento vegetal em solos das regiões tropicais e subtropicais. De todos os atributos químicos, a toxidez por Al^{3+} é vista como a principal barreira química oferecida ao aprofundamento do sistema radicular e à sua capacidade de absorção de água e de nutrientes, influenciando, negativamente, a emergência e o crescimento inicial das plantas (ABREU Jr. et al., 2003; MENDES et al., 2018). Como a hidrólise do alumínio produz íons de hidrogênio, a forte presença desse metal constitui um dos principais fatores de acidificação e improdutividade do solo. Em pH neutro, apresenta formas químicas insolúveis e atóxicas as plantas, mas, em solos ácidos, representa um dos fatores de impacto negativo no desenvolvimento vegetal (AZEVEDO, 2016). A toxicidade por Al^{3+} é um fator primário que reduz a produtividade das culturas em solos altamente ácidos. Em valores de pH abaixo de 5, íons Al^{3+} são dissolvidos a partir de minerais de argila e são altamente tóxicos para a raiz da planta, inibindo seu crescimento e função. Isto, por sua vez, leva a uma redução no rendimento das culturas causada por secas e deficiências. (KOCHIAN et al., 2015)

A grande quantidade de alumínio é uma característica natural da crosta terrestre. Ele é, de fato, o elemento metálico mais abundante da crosta. No Brasil, a ocorrência de solos com potencial para atividade agrícola e afetados por problemas de toxidez por Al^{3+} é da ordem de 60% (ABREU Jr. et al., 2003), e cerca de 70% das áreas cultivadas com cana-de-açúcar estão sobre solos ácidos (SALDANHA et al., 2007).

2.2 AMBIENTES DE PRODUÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Entre as grandes culturas, a cana de açúcar se destaca como a planta de maior potencial para a produção de massa seca e energia, por unidade de área, em um único corte por ano. No entanto, a canavicultura do país tem registrado quedas consecutivas em importantes indicadores agrícolas. A área de cana-de-açúcar a ser colhida no Brasil na safra 2018/19, destinada à

atividade sucroenergética, está estimada em 8,6 milhões de hectares, representando uma retração de 1,1% em relação à safra anterior, recentemente a produtividade dos canaviais brasileiros apresentou valores médios inferiores a 70 toneladas de colmo por hectare (TCH) (UNICA, 2018), considerada baixa a julgar pelo potencial genético das variedades modernas.

O aumento da produtividade agrícola da cana-de-açúcar pode ser alcançado pelo manejo adequado do solo, uso de resíduos agroindustriais, aplicação racional de adubos e corretivos, expansão da safra e, principalmente, de novas variedades (LEITE et al., 2011). Dentre os fatores que limitam a produção da cana-de-açúcar, destacam-se o desconhecimento dos padrões de crescimento de cada variedade (SILVA et al., 2014; ABREU et al., 2013), o manejo fitotécnico (MOLIN ; VEIGA, 2016; SÁ et al., 2016), o controle de plantas infestantes (MARTINELLI et al., 2011), de pragas (DINARDO-MIRANDA et al., 2013) e de doenças (FERRO et al., 2007), a correção e adubação do solo (CRUSCIOL, 2014; DALCHIAVON et al., 2017), a nutrição mineral da cultura (BENETT et al., 2016) e, sobretudo, a interação entre estes fatores.

As perspectivas mais promissoras de novos aumentos de produtividade estão baseadas na adequação das variedades de cana-de-açúcar ao zoneamento climático e, principalmente, aos diferentes tipos de solos. O solo é um dos componentes mais importantes de um conjunto complexo de fatores de produção, que se destaca pelo seu importante papel de fornecer suporte físico, água e nutrientes às plantas. Portanto, o conhecimento dos fatores edáficos é importante para se julgar o potencial de produção agrícola e alocar de maneira mais eficiente as variedades de cana-de-açúcar nos ambientes mais promissores (MAULE et al., 2001; LANDELL et al., 2003; REATTO; PASSOS, 2016).

Os principais programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar do país [Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar (PMGCA) da Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro (RIDESA) - variedades RB; Centro de Tecnologia Canavieira (CTC – antiga Copersucar) – variedades SP/CTC; Instituto Agrônomo de Campinas – variedades IAC], detém importantes informações sobre o potencial de produção de suas variedades, tais como os aspectos fitotécnicos (altura, diâmetro de colmo, brotação, perfilhamento, fechamento, florescimento, tombamento, resistência à pragas e doenças, etc.) (ABREU, 2013) e os parâmetros tecnológicos (teores de sacarose, fibras, pureza e umidade) (HOFFMAN et al., 2008; VIANA et al., 2017) mas, geralmente abordam com muita superficialidade os fatores ligados aos atributos do solo, baseando-se em frágeis aproximações para ambientes de produção, empregando os termos “ambiente favorável e

desfavorável”, “baixa/média/alta exigência em ambientes”, “baixa/média/alta exigência em fertilidade do solo”, etc..

O sistema de classificação de ambientes de produção da cana-de-açúcar sugerido por Prado (2005) destaca a textura, a disponibilidade de água e a fertilidade da camada arável e do subsolo, isto é, os aspectos físico-hídricos, químicos e morfológicos do solo. Recentemente, Prado (2016) aprimorou o sistema ao sugerir que a época de colheita da cana-de-açúcar é um fator determinante do potencial produtivo do ambiente. Com isso foi estabelecido o conceito de “ambientes de produção dinâmicos”, que trata-se do sistema mais amplamente usado para alocação de variedades e que está de acordo com diversos estudos que têm demonstrado a influência dos atributos do solo sobre a produtividade da cana-de-açúcar, com respostas distintas para a camada arável e para a camada subsuperficial. Grande proporção desses trabalhos tem ratificado que a produtividade da cana-de-açúcar tem importante dependência dos atributos de subsuperfície, o que inclui a alta saturação por Al e os baixos teores de Ca e de P, principalmente por repercutirem na expansão do sistema radicular da cultura (SOBRAL; GUIMARÃES, 1992; LANDELL et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2014).

2.3 PANORAMA DA CULTURA DE CANA-DE-AÇÚCAR NO BRASIL

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, cultura agrícola de grande importância para o agronegócio brasileiro. O aumento da demanda mundial por etanol, oriundo de fontes renováveis, aliado às grandes áreas cultiváveis e condições edafoclimáticas favoráveis à cana-de-açúcar, tornam o Brasil um país pioneiro na produção desta cultura. Em seu levantamento mais recente, a Companhia Nacional do Abastecimento (CONAB) estimou que a produção de cana-de-açúcar na safra 2018/19 será de 635,51 milhões de toneladas, ante os 633,26 milhões da safra 2017/18.

A demanda crescente dos mercados interno e externo, principalmente por combustíveis renováveis como o etanol, encontra suporte no Brasil, que detém tecnologia de produção e áreas agrícolas disponíveis para a expansão da canavicultura, já que apenas 1,5% das terras agrícolas brasileiras são ocupadas pela cana-de-açúcar. A ampla extensão territorial dá ao Brasil vantagem em relação à competitividade, uma vez que proporciona condições de cultivar a cana-de-açúcar em dois períodos distintos durante o ano. Para atender as previsões, estima-se que o Brasil ampliará a plantada para 12,2 milhões de hectares (TORQUATO, 2006). A expansão das áreas cultivadas está avançando as fronteiras agrícolas e deverá ocorrer, principalmente, nas

regiões Centro-Sul e Centro-Oeste do país, englobando o Oeste do Estado de São Paulo, o Sudoeste de Minas Gerais, e os Estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Paraná. Estas áreas são, predominantemente, cobertas por pastagens e caracterizadas por um inverno seco, com períodos de deficiência hídrica bastante pronunciada, e por solos com sérias limitações ao pleno desenvolvimento vegetal, dentre elas a acidez, a alta saturação por Al e os baixos teores de nutrientes.

2.4 SISTEMA RADICULAR DA CANA-DE-AÇÚCAR

Dada a relevância do solo nos sistemas de produção, é indiscutível a importância da disponibilidade de água e de nutrientes para as plantas, mas é necessário que haja uma eficiente estrutura de captação destes recursos, que explore o maior volume de solo possível. A cana-de-açúcar possui um sistema radicular diferente em comparação a culturas anuais, o que permite a exploração das camadas mais profundas do solo. Trata-se de uma cultura semi-perene, com ciclo de 5 a 7 anos, cujo desenvolvimento radicular em maior profundidade é fundamental para o acréscimo de produtividade em solos de baixa fertilidade e de baixa retenção de umidade (EVANS, 1964; BALL-COELHO, 1992; DEMATTÊ, 2005). No início do desenvolvimento radicular, são formadas as raízes de fixação que, por sua vez, suprirão os rebentos que brotarão das gemas (ALVAREZ et al., 2000). As raízes do minirrebolo têm alongação inicial de poucos mm d⁻¹, podendo alcançar 20 mm d⁻¹ em poucos dias após a germinação, sob condições favoráveis. Quando o sistema radicular da cana-de-açúcar fica concentrado nos primeiros 40 cm de solo, a cultura suporta um estresse hídrico de apenas 8 dias. Se a profundidade explorada for ampliada para 1,10 m, a cultura pode suportar o estresse hídrico por 22 dias (SMITH et al., 1999).

O desenvolvimento do sistema radicular tem influência direta sobre alguns fatores determinantes para a produtividade final, tais como (COSTA et al., 2007; CURY et al., 2014): resistência à seca, eficiência na absorção dos nutrientes do solo, tolerância ao ataque de pragas do solo, capacidade de germinação e/ou brotação, porte, tolerância à movimentação de máquinas, etc. além disso, o sistema radicular de cana-de-açúcar é essencial para a regeneração das soqueiras após a colheita (SAMPAIO et al., 1987; ALVAREZ et al., 2000; AQUINO, 2015). Todos os fatores que favorecem a expansão do sistema radicular são importantes para aumentar a produtividade da cana-de-açúcar, já que seu caráter semi-perene permite e exige que a planta explore maior volume de solo em maiores profundidades.

2.5 EFEITOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DO ALUMÍNIO

Há certa unanimidade em admitir que a cana-de-açúcar não seja tão sensível à acidez do solo quando comparada com outras espécies vegetais (MARINHO; ARAÚJO FILHO, 1983; VIANA et al., 1983; SOBRAL; GUIMARÃES, 1992), mas há relatos de grande variação entre os cultivares com respeito à capacidade de expansão e aprofundamento do sistema radicular, principalmente em resposta ao estresse causado pelo Al^{3+} (SMITH et al., 2005; VASCONCELOS; GARCIA, 2005).

Por ser um cátion trivalente, o Al^{3+} é fortemente adsorvido pelo solo e, assim, sua concentração na solução do solo é baixa ($\mu\text{mol L}^{-1}$) (HAYNES; MOKOLOBATE, 2001). Há dificuldade para a definição de um valor crítico para o Al^{3+} do solo que provoque toxidez às plantas, mas é conhecido que mesmo em baixas concentrações, este íon metálico é tóxico para a maioria das espécies vegetais, primariamente por lesar o funcionamento normal das raízes, inibindo drasticamente seu crescimento e bloqueando os mecanismos de aquisição e de transporte de água e de nutrientes (SOBRAL; GUIMARÃES, 1992).

Os efeitos morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e citológicos do Al^{3+} na planta têm sido abordados por vários autores (FOY, 1974; WRIGHT, 1989; KOCHIAN, 1995; DELHAIZE; RYAN, 1995; SILVA et al., 2002; ROSSIELLO; JACOB NETTO, 2006) e os mecanismos pelos quais o Al^{3+} afeta as funções celulares estão ligados às alterações na membrana das células da raiz, à inibição da síntese de DNA e divisão celular e à inibição do alongamento celular, por reduzir a plasticidade e a elasticidade da parede celular.

As áreas mais afetadas são as extremidades das raízes e, de modo geral, ocorre ausência de ramificações terminais, contribuindo para menor área superficial de exploração e de absorção de nutrientes por parte do sistema radicular (FOY, 1976; KOCHIAN et al., 2004), e diminuição do número de pêlos radiculares (ROSSIELLO; JACOB-NETTO, 2006). Há rápida inibição do processo de alongação radicular (cerca de 30-120 minutos após o contato dos genótipos mais sensíveis com o Al tóxico), em razão da paralisação da divisão celular (WRIGHT, 1989; DELHAIZE; RYAN, 1995; KOCHIAN, 1995). A exposição contínua ao Al^{3+} conduz às alterações morfológicas, como o engrossamento e encurtamento das raízes, tornando-as com aspecto quebradiço (DELHAIZE; RYAN, 1995), e o desenvolvimento de cor castanha na região apical (ROSSIELLO; JACOB NETO, 2006). Os melhores indicadores da variabilidade genotípica para a tolerância ao Al tóxico são aqueles ligados às raízes (Ferreira et

al., 2006), principalmente dos primeiros milímetros do ápice radicular (ROSSIELLO; JACOB-NETTO, 2006).

Vasconcelos et al (2002) identificaram os parâmetros morfológicos ligados a tolerância ao alumínio e o tempo de cultivo suficientes para cultivares de trigo expressarem a tolerância ao Al^{3+} . Embora os autores tenham avaliado características de área foliar e massa seca da parte aérea, foram os parâmetros radiculares que possibilitaram o reconhecimento da tolerância diferencial das cultivares de trigo, sendo 4 dias de exposição ao Al^{3+} suficientes para a detecção das diferenças de crescimento radicular.

2.6 MECANISMOS VEGETAIS DE TOLERÂNCIA AO Al^{3+}

Os mecanismos fisiológicos de defesa ou de tolerância das plantas aos efeitos tóxicos do Al^{3+} no crescimento da raiz, que são controlados por diferentes genes e por meio de diferentes rotas bioquímicas (FERREIRA et al., 2006), incluem: (a) capacidade das plantas em alterar o ambiente rizosférico, elevando o pH e reduzindo a solubilidade do Al^{3+} ; (b) capacidade das plantas de possuir baixa CTC na raiz, portanto, maior afinidade por cátions monovalentes, de modo que acumulem, assim, menor concentração de Al^{3+} em suas raízes (KENNEDY et al., 1986); (c) capacidade das plantas de secretar mucilagem em presença de Al^{3+} ; (d) capacidade das plantas de utilizar os nutrientes na presença de Al^{3+} , principalmente P e Ca (FREITAS et al., 2006; MATTIELO et al. 2008); (e) capacidade das plantas de produzir elevados teores de ácidos orgânicos responsáveis pela complexação do Al^{3+} (MARIANO et al., 2005); (f) habilidade da raiz em continuar a divisão e o alongamento celular sob estresse; (g) manutenção de áreas meristemáticas aptas a desenvolverem novos tecidos após o estresse (ROSSIELLO; JACOB-NETTO, 2006); (h) produção de enzimas antioxidantes para combater formas reativas de oxigênio derivados do estresse oxidativo (REZAEE; GHANATI; BEHMANESH, 2013); (i) inativação ou formação de complexos não tóxicos e sua armazenagem na parte aérea (ABICHEQUER et al., 2003).

Dentre eles a capacidade das plantas de produzir elevados teores de ácidos orgânicos responsáveis pela complexação do Al^{3+} (MARIANO et al., 2005) vem sendo estudados pela sociedade científica para combater o efeito tóxico do aumento do nível de Al^{3+} no ambiente. O mecanismo de tolerância ao Al^{3+} baseado na produção de ácidos orgânicos pode ser dividido em duas categorias. O mecanismo de tolerância baseado no apoplasto, que é chamado de

mecanismo de tolerância externo (exclusão ou sítio de detoxificação) e o mecanismo de tolerância interno, que ocorre através da imobilização no simplasto. Os mecanismos de exclusão são aqueles onde o Al^{3+} é impedido de atravessar a membrana plasmática e entrar no simplasto, podendo incluir imobilização na parede celular, permeabilidade seletiva da membrana plasmática, indução de barreira de pH na rizosfera pela própria planta, exsudação de quelatos ligantes, exsudação de fosfatos e efluxo de Al^{3+} (RAMPIM, 2013). Contudo, segundo Echart; Cavalli-Molina (2001) sabe-se que as plantas podem ser tolerantes, por serem capazes de suportar altos níveis de Al^{3+} no simplasto ou por se desintoxicarem do mesmo após sua entrada na célula. Desta forma, os mecanismos de tolerância interna são aqueles em que o Al^{3+} entra no simplasto e a tolerância é encontrada pela formação de quelatos no citossol, compartimentalização no vacúolo, ligação do alumínio a proteínas e atuação de enzimas tolerantes ao Al^{3+} (TAYLOR, 1991) (Figura 1).

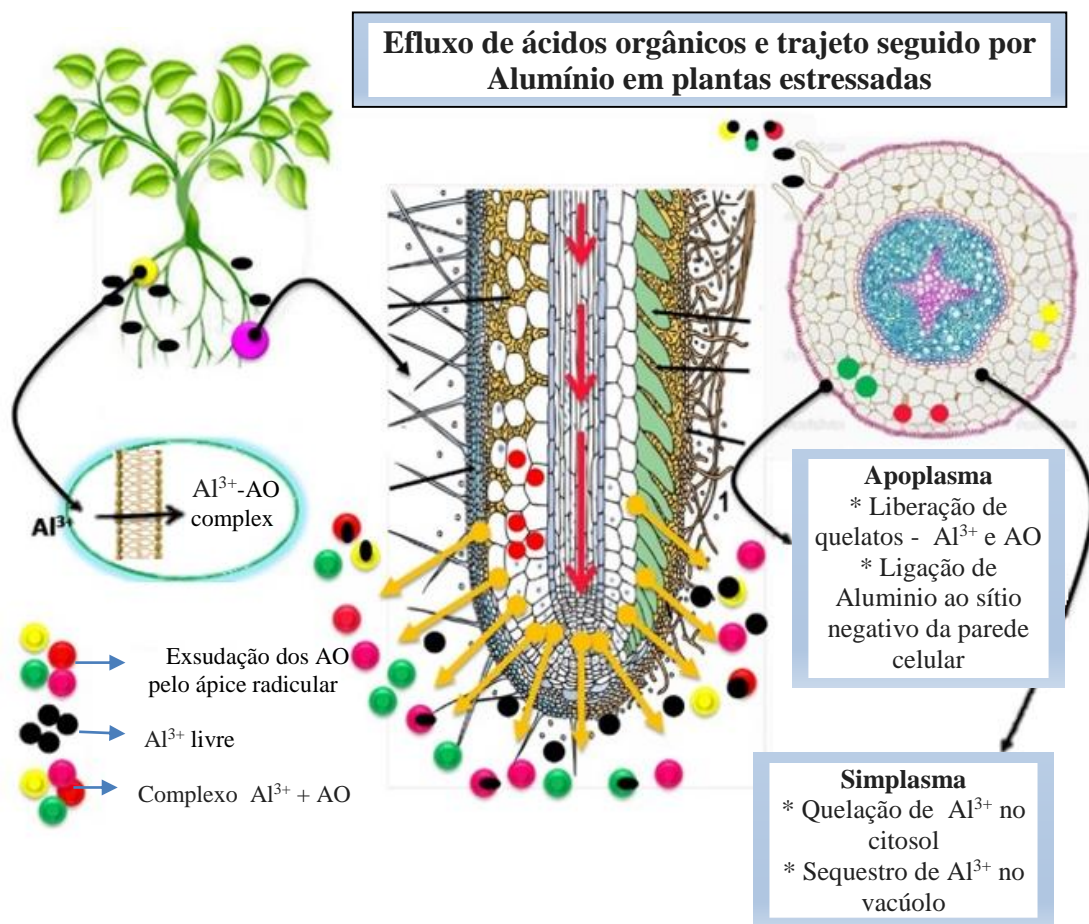


Figura 1. Ácidos orgânicos dos ápices radiculares de plantas estressadas por Al^{3+} . Representação das células típicas das extremidades radiculares, exsudando os ácidos orgânicos induzidos por Al^{3+} .

Adaptado de SINGH (2017).

As raízes das plantas liberam especificamente AOs para formação de complexos na rizosfera em resposta à toxicidade, transformando o Al^{3+} em formas não tóxicas e tornando as raízes de 5 a 20 vezes mais resistentes ao estresse (DELHAIZE et al., 1993). O aumento de exsudação de ácidos orgânicos pelas raízes normalmente é observado em plantas que apresentam maior tolerância ao Al^{3+} (DELHAIZE et al., 1993; JONES, 1998; HINSINGER, 2001), sugerindo que essa é uma estratégia efetiva empregada por plantas para se adaptarem a solos ácidos.

2.7 ÁCIDOS ORGÂNICOS

Os AOs são biomoléculas com baixo peso molecular e com propriedades dos ácidos fracos, participam em diversas rotas metabólicas de células vegetais e animais e que, fazem parte (2 a 10%), do compartimento de carbono dissolvido no solo (JONES et al., 2003; PAVINATTO e ROSOLEM, 2008). Caracterizam-se também pela presença de um a três grupos carboxílicos na sua estrutura, classificando-os em mono, di ou tricarboxílicos (GUPPY et al., 2005). A concentração típica de AOs di e tricarboxilados (oxálico, málico, succínico, tartárico e cítrico) na solução do solo varia de 0 a 5 μM , enquanto a de monocarboxílicos (fórmico, acético, propiônico, butírico e láctico) varia de 0 a 1 μM (STROBEL, 2001).

A dissociação de AOs origina ânions orgânicos, que por sua vez são capazes de complexar cátions metálicos em solução, incluindo o Al^{3+} (ADELEKE et al, 2017). Os AOs exsudados pelas raízes e identificados como participantes do mecanismo de defesa contra o efeito fitotóxico do Al^{3+} foram inicialmente descritos em estudos realizados em trigo, onde genótipos tolerantes acumularam de três a oito vezes menos Al^{3+} no ápice radicular em relação a genótipos sensíveis (RINCÓN; GONZALES, 1992; DELHAIZE; RYAN; RANDALL, 1993). Quanto a classificação da eficiência dos ácidos orgânicos como mais funcionais, descrita na literatura, para a complexação e desintoxicação do Al^{3+} , em ordem decrescente, lista-se: cítrico, oxálico e málico (DELHAIZE et al., 1993) (Figura 2).

A característica de tolerância vegetal ao Al^{3+} possui forte correlação com a liberação de AOs por numerosas espécies de plantas. A exsudação dos AOs, como cítrico, málico e oxálico, a partir dos ápices radiculares no solo é considerada uma das estratégias mais eficazes de defesa das plantas (DELHAIZE et al., 1993).

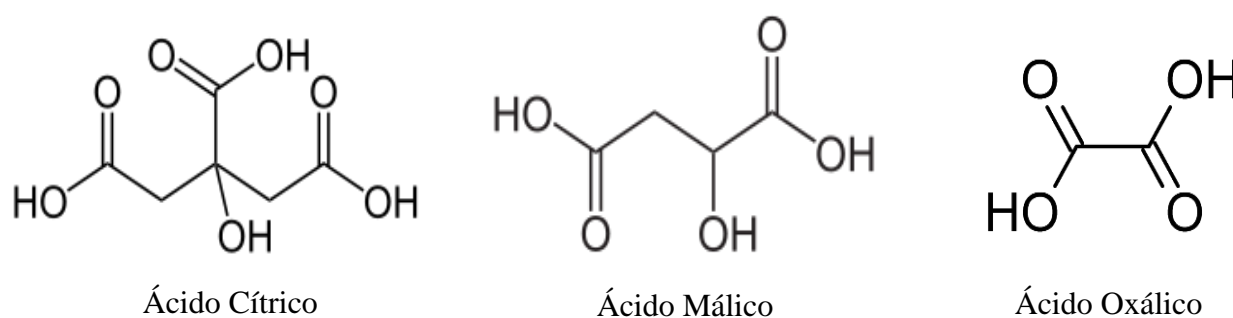


Figura 2. Estruturas químicas dos ácidos orgânicos cítrico, málico e oxálico.

Fonte: Hue et al. (2001).

A adição dos ácidos cítrico, málico e oxálico em solução diminuiu os efeitos tóxicos do Al^{3+} em raízes de variedades de *Stylosanthes* sensíveis a Al^{3+} (CASSOL, 2012). Kochian e Jones (1996) demonstraram que a formação de quelatos de Al^{3+} por AOs di e tricarbônicos bloqueou a absorção do elemento pelas raízes de trigo e inibiu o seu transporte através das membranas plasmáticas. Porém, ainda não estão completamente esclarecidas as funções e as rotas metabólicas que regulam a síntese de produção de AOs nas diferentes espécies vegetais, incluindo aquelas ativadas em resposta a saturação por Al^{3+} no solo (HARTWIG, 2007; ADELEKE et al., 2017).

O ácido cítrico ($C_6H_8O_7$) (Figura 2) é uma molécula de grande importância biológica, com destaque para suas funções no ciclo de Krebs (ANOOP, 2003). O citrato é o ânion orgânico originado da dissociação do ácido cítrico mais comum dentre os exsudados pelas plantas na presença do Al^{3+} (PAVINATO e ROSOLEM, 2008). Por ser um ânion tricarbônico, o citrato é mais efetivo na formação de quelatos com Al^{3+} , que são mais estáveis quando comparados aos quelatos formados por ânions di ou monocarbônicos. A presença do citrato influencia de forma drástica a biodisponibilidade do Al^{3+} para as plantas, seja por sua atuação na rizosfera, através dos exsudatos, ou no interior das células (NORONHA, 2007).

O ácido málico $C_4H_6O_5$ (Figura 2) é uma molécula dicarbônica com importante participação nos ciclos de Krebs e de Calvin (ANOOP, 2003). O conteúdo de ácido málico contido nos vacúolos de células vegetais pode ser liberado para atuação em importantes funções do metabolismo celular, tais como a regulação do pH e a mobilização dos ânions malato, formas dianiônicas originadas da sua dissociação que possuem reconhecida ação na defesa de células radiculares contra o Al^{3+} (ADELEKE et al., 2017).

O ácido oxálico $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (Figura 2) também é um composto intermediário do ciclo de Krebs (ANOOP, 2003). É um ácido orgânico relativamente forte, sendo 10.000 vezes mais forte quando comparado com o ácido acético. O produto da sua dissociação pode formar oxalatos metálicos, com alta eficiência na desintoxicação do Al^{3+} . Morita et al. (2008) demonstraram que o oxalato foi um composto decisivo no mecanismo de tolerância ao Al^{3+} empregado pela planta do chá, que desintoxica o Al^{3+} externamente na rizosfera. Da mesma forma, o ácido oxálico foi secretado a partir de raízes de variedades de trigo com alta tolerância ao Al^{3+} (ZHENG, 2005).

Segundo Noronha (2007), os ácidos cítrico e málico reagem com o Al^{3+} em proporções predominantemente 1:1. Happel (2007) descreveu a formação de complexos constituídos por quatro moléculas de ácido málico e por quatro íons Al^{3+} . A formação destes complexos indisponibiliza íons Al^{3+} e constitui um mecanismo vegetal de detoxificação/neutralização que pode atuar no interior das células, no apoplasto do tecido radicular e externamente na rizosfera (POSCHENRIEDER, 2008).

A ativação de produção dos AOs normalmente ocorre no ápice da raiz, apontado como local mais sensível aos efeitos da toxicidade por Al^{3+} no sistema vegetal. No entanto, ocorrem diferenças quanto ao local de produção e de exsudação dos AOs. Em plantas de trigo, a exsudação do malato ocorre no ápice radicular (0,2 a 0,3 mm), o que proporciona maior eficiência da ação contra o Al^{3+} na zona crítica da raiz, onde requer a maior proteção contra o Al^{3+} . Em plantas de milho, o efluxo do citrato ocorre até 50 mm do ápice radicular mediante a presença do Al^{3+} na solução do solo (PIÑEROS et al., 2002), enquanto em plantas de sorgo tanto o processo de exclusão do Al^{3+} quanto o de ativação do citrato ocorrem até os 30 mm do ápice radicular (MAGALHAES, 2002).

Outra função importantíssima dos AOs, sobretudo os de baixo peso molecular, diz respeito à disponibilização de fósforo (P) no solo. AOs podem ser dissociados no solo ou no interior do citoplasma das células radiculares das plantas formando ânions orgânicos capazes de competir com fósforo (P) por sítios de adsorção presentes na superfície dos colóides do solo e de formar quelatos com o Fe e o Al^{3+} , minimizando a ocorrência de compostos insolúveis de P, principalmente nas condições de pH predominantes em solos ácidos intemperizados da zona tropical (ANDRADE et al., 2003; OBUERGER, JONES, WENZEL, 2011).

Admite-se que ainda existem muitas limitações quanto à identificação e quantificação de ácidos orgânicos, associadas às baixas concentrações na solução do solo, na rizosfera e nos

tecidos vegetais, aos métodos de extração, isolamento e conservação e aos métodos instrumentais de análise (ANGELES et al., 2006; MIMMO et al., 2008; ADELEKE et al., 2017). Métodos mais avançados de determinação de ácidos orgânicos incluem as tecnologias de espectrometria de massa (MELNITCHOUCK et al., 2005; LEINWEBER et al., 2008) e de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) (XING et al., 2016), mas métodos cromatográficos tem alcançado validação na análise de pequenas moléculas em matrizes biológicas (CASSIANO et al., 2009) e do solo (BAZIRAMKENGA et al., 1995; WAITHAISONG et al., 2015). A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido usada frequentemente como método bioanalítico para determinação de agroquímicos em produtos agrícolas (CHIARADIA et al., 2008). Seu emprego, que foi bem sucedido na identificação de ácidos orgânicos produzidos pelo sistema radicular e presentes na rizosfera de plantas de feijão (MIYASAKA, 1991), café (SILVA et al., 2000), plantas daninhas (SILVA et al., 2001), soja (MENOSSO et al., 2001), milho (CAMPOS 2002), plantas leguminosas (CASSOL, 2012), tem auxiliado na compreensão dos efeitos dos ácidos orgânicos exsudados na rizosfera e nos fatores envolvidos em processos de adaptação de diversas plantas a solos ácidos (JONES, 1998; TAN, 2013; YUAN, 2015; ADELEKE et al., 2017).

2.8 PRODUÇÃO E SUSTENTABILIDADE

Existem diferenças consistentes na sensibilidade por Al^{3+} por parte de plantas de múltiplas espécies, ou mesmo, de cultivares de uma mesma espécie, quanto a intensidade dos efeitos causados à tolerância diferencial ao metal, e aos mecanismos de proteção ao estresse. Destes aspectos emerge a necessidade de estudar e de selecionar variedades tolerantes, a fim de promover melhor adaptação das culturas ao ambiente de produção. Com isso, espera-se explorar a capacidade de adequação a condições físico-químicas adversas, minimizando os problemas causados pela baixa produtividade em solos ácidos e, assim, manter níveis elevados de produtividade (MARTINS et al., 2006).

A utilização de variedades com características específicas para numerosos tipos de ambientes, colabora positivamente com a exploração mais eficaz do solo, e principalmente proporciona um aproveitamento maior da água disponível para planta. Um sistema agrícola baseado no gerenciamento das variações existentes na unidade produtiva visa também o aumento de retorno econômico, à sustentabilidade e à minimização do efeito ao ambiente.

Destaca-se ainda que a identificação de genótipos tolerantes às limitações típicas de solos ácidos pode significar a redução de corretivos e de fertilizantes, ampliando o aspecto ambiental e sustentável da exploração agrícola. Corretivos como por exemplo, o calcário, promove não somente a redução do teor de Al^{3+} , eleva o pH, cálcio e magnésio trocáveis, diminui o teor de ferro e manganês, causando ainda maior capacidade de troca catiônica (CTC). No entanto, a sua capacidade corretiva não ultrapassa as camadas superficiais, o que impossibilita o crescimento normal do sistema radicular dos vegetais, que necessitam de um maior volume de solo para explorar, principalmente em profundidade, a fim de garantir a absorção de nutrientes e água. Além disso, a redução na saturação de Al^{3+} ao longo do perfil do solo, utilizando a calagem, necessita de tempo e volume maior, devido à baixa solubilidade do calcário (CORRÊA et al., 2008).

A necessidade de corretivos e insumos é indiscutível no sistema agrícola, independentemente do tipo de solo e ou cultura, no entanto recomendações construídas com base em características específicas, e a incorporação de ações sustentáveis, basicamente, ao ser efetuado de maneira consciente resultam positivamente em elevação produtiva, diminuição de custos e preservação do ambiente. Proporciona redução de desperdício e otimiza recursos como, máquinas, operadores, uso de terra e insumos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DO ENSAIO E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O experimento foi desenvolvido na Casa de Vegetação Climatizada do Programa de Melhoramento Genético (PMGCA) e no Laboratório de Ecotoxicologia e Química Ambiental (LEQA), ambos no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos (CCA-UFSCar), *campus* de Araras-SP, no período entre Junho e Setembro de 2018. O ensaio foi disposto em delineamento inteiramente casualizado, num esquema fatorial 2×5 . Os dez tratamentos consistiram da combinação entre dois níveis do fator variedades de cana-de-açúcar (RB928064 e RB855156) e cinco níveis do fator concentração de Al^{3+} em solução fornecido na forma de cloreto de alumínio hexahidratado ($\text{Al}^{3+}\text{Cl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - Merck®) nas concentrações 0, 500, 1000, 1500 e 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com cinco réplicas, totalizando 50 unidades experimentais.

3.2 OBTENÇÃO E PREPARO DOS MINIRREBOLOS DE CANA-DE-AÇÚCAR

O material propagativo das variedades RB928064 e RB855156 de cana-de-açúcar foi fornecido pelo Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-Açúcar da Universidade Federal de São Carlos (PMGCA-UFSCar), que integra a Rede Interinstitucional de Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro (RIDESA). Dentre as características principais das variedades selecionadas estão:

RB928064: desenvolvimento médio, alta produtividade agrícola, com colheita em setembro/novembro, bom teor de sacarose, boa sanidade e excelente brotação em cana planta e em soqueiras, florescimento raro e interior excelente (RIDESA, 2015). Considerada resistente ao Al³⁺ (OLIVEIRA, 2012)

RB855156: alta precocidade e ótima capacidade de brotação em soqueiras, produtividade média, com colheitas em abril/maio, porte médio e velocidade de crescimento regular (RIDESA, 2015). Considerada sensível ao Al³⁺ (OLIVEIRA, 2012).

Os minirrebolos de cana-de-açúcar, com gema individualizada e tamanho aproximado de 4,5 cm, foram produzidos conforme o sistema de multiplicação com o uso de mudas pré-brotadas (MPB), preconizado por Landell et al. (2012). Utilizaram-se colmos produzidos em viveiros básicos, submetidos aos manejos e protocolos de qualidade, isentos de doenças, sem mistura varietal e com idade de seis a dez meses. Houve eliminação das extremidades dos colmos (ponta e pé) para minimizar a ocorrência de dominância apical e a desuniformidade de brotação das gemas. Os minirrebolos foram submetidos à tratamento térmico em água, à 50,5 °C por 2 horas (Figura 3 - A,B), para se evitar a incidência de raquitismo, uma doença sistêmica provocada pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e que causa distúrbios nos vasos condutores, prejudicando o fluxo de água e de nutrientes pelo xilema. Adicionalmente, os minirrebolos foram imersos, por 4 minutos, em solução de fungicida sistêmico à base de azoxistrobina e ciproconazol 0,1% na solução (produto comercial Priori Xtra – Syngenta®), visando a proteção contra a incidência de ferrugem alaranjada (*Puccinia kuehnii*) e podridão abacaxi (*Ceratocystis paradoxa*) (Figura 3 - C).

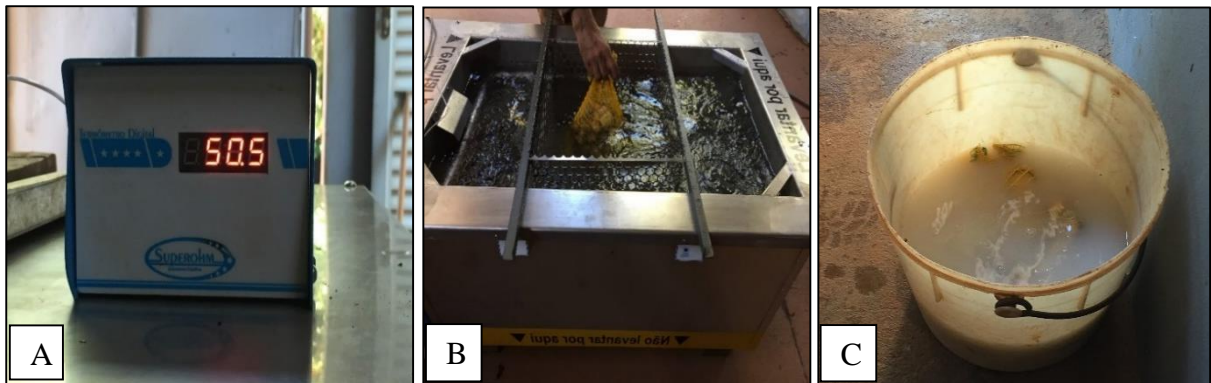


Figura 3. (A) Tratamento térmico padrão (água quente a 50,5 °C por 2 horas) de minirrebolos de cana-de-açúcar; (B) imersão dos minirrebolos em tanque para banho térmico; (C) imersão dos minirrebolos em balde com solução de fungicida sistêmico à base de azoxistrobina e ciproconazol 0,1% na solução.

3.3 BROTAÇÃO DOS MINIRREBOLOS DE CANA-DE-AÇÚCAR

Os minirrebolos de cana-de-açúcar passaram por etapa de brotação, seguindo o protocolo com adaptações de Oliveira, 2012. Para a obtenção de plântulas homogêneas e vigorosas a serem utilizadas no ensaio de estresse abiótico por Al^{3+} em solução, primeiramente, as extremidades dos minirrebolos foram seladas com parafina (Figura 4 - A), conforme sugerido por Hetherington et al. (1988) para evitar a oxidação excessiva e como medida complementar contra a incidência de fungos. Bandejas plásticas (38 × 27 × 10 cm) foram preenchidas com uma camada de aproximadamente 8 cm de vermiculita média, utilizada como substrato para brotação. O substrato foi umedecido na proporção 1:0,8 vermiculita : água (massa/volume) e os minirrebolos, após serem acomodados com a gema voltada para cima (Figura 4- B), foram cobertos com uma camada de 1 cm de vermiculita.

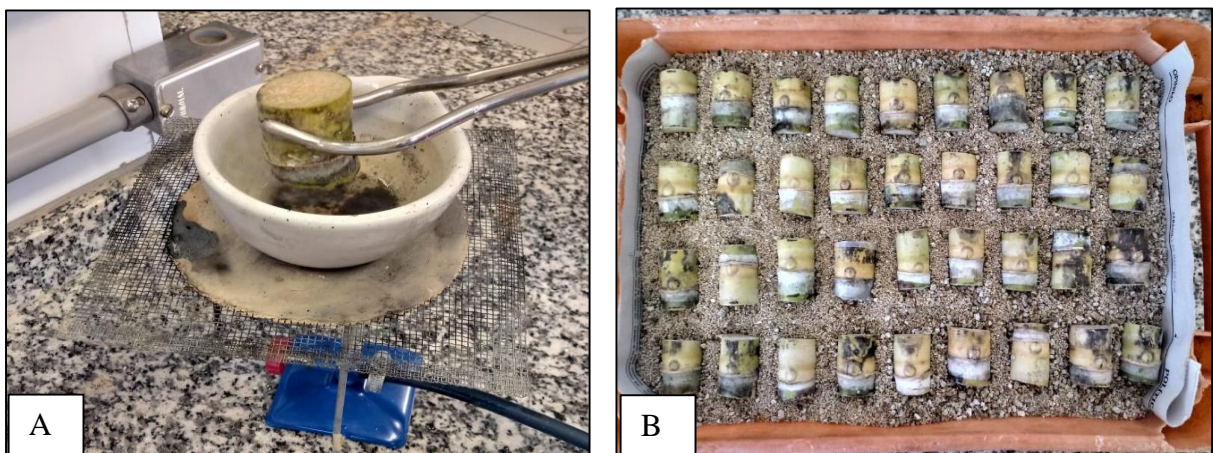


Figura 4. (A) Operação de selagem das extremidades dos minirrebolos de cana-de-açúcar com parafina; (B) Acomodação dos minirrebolos em bandeja contendo vermiculita para brotação.

As bandejas foram acondicionadas em casa de vegetação climatizada do PMGCA-UFSCar, com temperatura constante de 30 °C. Devido às baixas temperaturas normalmente predominantes nos meses em que ocorreu o experimento, a temperatura foi mantida constante por sistema de aquecimento a gás. A umidade das bandejas foi monitorada visualmente e diariamente, e a reposição de água foi conduzida com aplicação de 500 mL de água em intervalos de 48 horas. A brotação começou a ser observada após 15 dias do plantio dos minirrebolos. As plântulas permaneceram em casa de vegetação por 25 dias (Figura 5 – A, B e C).

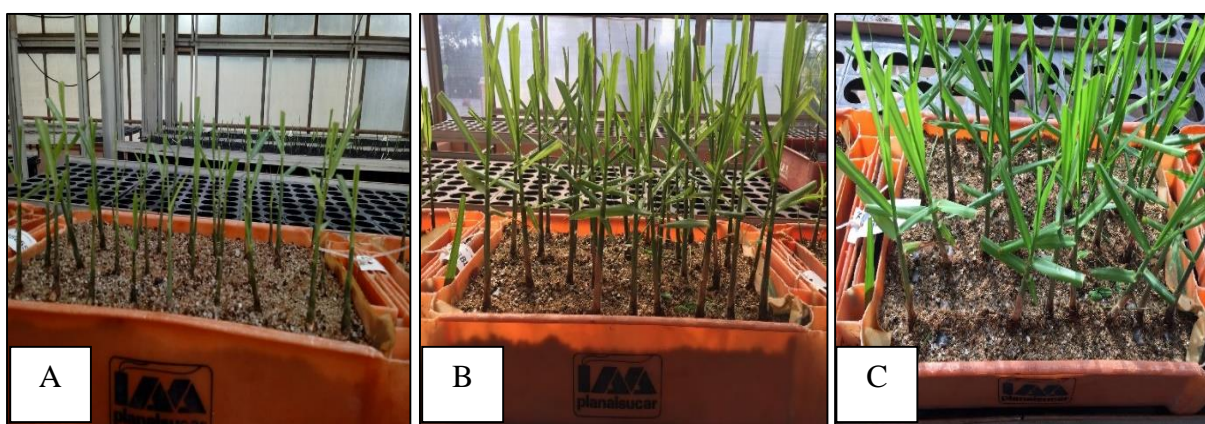


Figura 5. (A) Etapa da brotação de minirrebolos; (B e C) desenvolvimento inicial de plântulas de cana-de-açúcar em bandejas com vermiculita mantidas em casa de vegetação climatizada.

3.4 ACLIMATAÇÃO DE PLÂNTULAS DE CANA-DE-AÇÚCAR EM SOLUÇÃO NUTRITIVA

Após o período de brotação e de desenvolvimento inicial em casa de vegetação, as plântulas foram levadas ao laboratório para lavagem, em água corrente, visando a retirada da vermiculita aderida ao sistema radicular (Figura 6-A). Em seguida, foi realizada a triagem de plântulas que apresentaram maior uniformidade de brotação e maior padrão de vigor do sistema radicular e da parte aérea (Figura 6-B).

As plântulas selecionadas foram fixadas em placas de isopor, com orifícios na porção inferior dos minirrebolos com tamanho suficiente para a passagem de todo o sistema radicular. Após acomodação das plântulas, a placa de isopor foi colocada sobre bandeja plástica (50 × 37 × 19 cm) contendo 30 L de solução nutritiva completa (Tabela 2), para imersão do sistema radicular (Figura 7 - A).

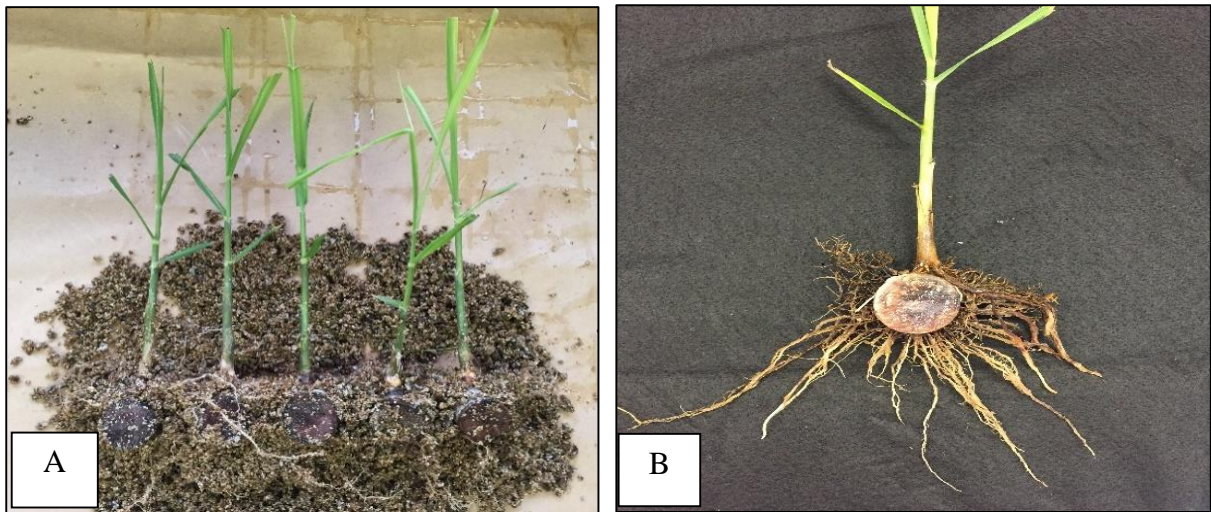


Figura 6. (A) Plântulas de cana-de-açúcar após o período de desenvolvimento inicial em casa de vegetação; (B) plântula de cana-de-açúcar com padrão adequado de desenvolvimento e com sistema radicular isento de partículas de vermiculita.

O conjunto foi mantido sob temperatura ambiente, em local sem incidência de luz natural. A uniformidade de luminosidade sobre as plântulas foi mantida por lâmpadas fluorescentes com potência de 40 W, alocadas em altura suficiente para assegurar a incidência de luz com intensidade entre 4,0 e 5,0 klux (GEORGE; SHERRINGTON, 1987; GRIBAUDO; FRONDA, 1993) (aferida por luxímetro (Figura 7 - B)), promovendo a aclimação das plântulas para realização da fotossíntese. O sistema foi programado para simular fotoperíodo de 12 horas e as plântulas permaneceram sob arejamento contínuo da solução, por borbulhamento de ar proveniente de moto-compressor (Compressor bomba de ar – Boyu Acq-001).

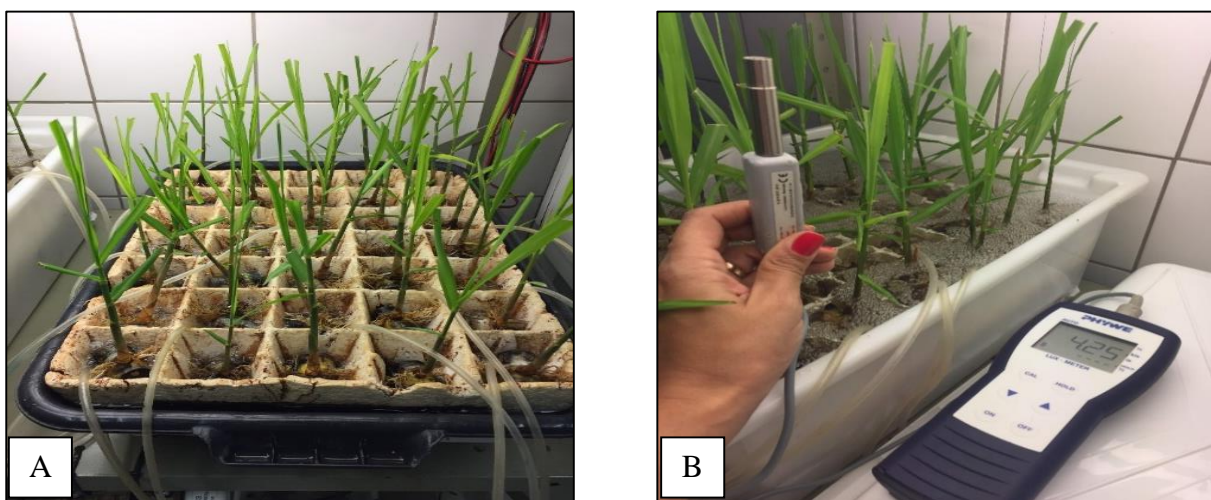


Figura 7. (A) Disposição de plântulas de cana-de-açúcar durante fase de aclimação em recipiente contendo solução nutritiva completa; (B) aferição da intensidade de luz incidente sobre as plântulas de cana-de-açúcar.

A adequada nutrição mineral das plântulas de cana-de-açúcar, antes de serem submetidas ao estresse por Al^{3+} , foi realizada por uma adaptação da solução clássica de Hoagland & Arnon (HOAGLAND & ARNON, 1938, citado por COMETTI et al., 2006), preparada com fundamento nos teores foliares de nutrientes considerados adequados para a cultura de cana-de-açúcar (Tabela 1).

A composição e a concentração da solução nutritiva de macro e de micronutrientes (Tabela 2) adequadas para a cultura da cana-de-açúcar foram calculadas conforme o método prático de Cometti et al. (2006). A solução nutritiva foi usada para garantir fornecimento balanceado de nutrientes às plântulas, de forma a evitar que o sistema radicular apresentasse limitações que não fossem decorrentes do estresse por Al^{3+} .

Tabela 1. Teores foliares de macro e micronutrientes considerados adequados para a cultura da cana-de-açúcar.

| Nutriente | Teores Foliares (g kg⁻¹) |
|-------------------------------|--|
| <u>Macronutrientes</u> | |
| Nitrogênio | 18-25 |
| Fósforo | 1,5-3,0 |
| Potássio | 10-16 |
| Cálcio | 2,0-8,0 |
| Magnésio | 1,0-3,0 |
| Enxofre | 1,5-3,0 |
| <u>Macronutrientes</u> | |
| Ferro | 40-250 |
| Mangânes | 25-250 |
| Molibdênio | 0,05-0,20 |
| Zinco | 10-50 |

Fonte: Raij et al. (1996)

Tabela 2. Fontes e concentrações de macro e de micronutrientes utilizadas na composição da solução nutritiva para cultivo de plântulas de cana-de-açúcar.

| Nutriente | Concentração do nutriente (mg L⁻¹) | Massa de reagente (mg L⁻¹) | Reagente |
|-------------------------------|--|--|---------------------|
| <u>Macronutrientes</u> | | | |
| Nitrogênio (N) | 154 | 1299 | Nitrato de cálcio |
| Potássio (K) | 199 | 515 | Nitrato de potássio |
| Fósforo (P) | 38 | 141 | Fosfato monoamônico |
| Magnésio (Mg) | 15 | 152 | Sulfato de magnésio |
| <u>Micronutrientes</u> | | | |
| Boro (B) | 0,3 | 1,72 | Ácido bórico |
| Cobre (Cu) | 0,15 | 0,589 | Sulfato de cobre |
| Mangânes (Mn) | 1,5 | 4,615 | Sulfato de manganês |
| Molibdênio (Mo) | 0,03 | 0,075 | Molibdato de sódio |
| Zinco (Zn) | 0,15 | 0,65 | Sulfato de zinco |
| Ferro (Fe) | 2,4 | 26.100 / 24.900* | Fe-EDTA |

*Fe-EDTA: Dissolver 26,1 g de EDTA dissódico em 286 ml de NaOH mol L⁻¹, misturar com 24,9 g de FeSO₄.7H₂O. Arejar por uma noite e completar a 1 litro.

3.5 EXPOSIÇÃO AO ESTRESSE POR AL³⁺

Após o período de seis dias de aclimação em solução nutritiva, foram selecionadas, para cada variedade, 25 plântulas com uniformidade radicular. As plântulas tiveram suas três maiores raízes medidas, de forma que a média resultante foi considerada como o comprimento inicial (Ci) da raiz.

As plântulas foram submetidas a cinco tratamentos com doses crescentes de Al³⁺ (0, 500, 1000, 1500 e 2000 µmol L⁻¹), fornecido na forma de cloreto de alumínio hexahidratado (Al³⁺Cl₃.6H₂O - Merck®), com cinco repetições cada. As concentrações de Al³⁺ foram

selecionadas de acordo com Hetherington et al. (1988); e Oliveira (2012). A exposição do sistema radicular das plântulas de cana-de-açúcar a condições de estresse por Al^{3+} foi feita em tubetes de PVC rígido, de 5 cm de diâmetro e 13,5 cm de altura, com fundo vedado com cola adesiva epóxi, preenchidos com 130 mL de solução nutritiva completa, acrescida de Al^{3+} . O sistema foi mantido sob arejamento contínuo da solução, por sistema adaptado para borbulhamento de ar em cada tubete, suprido por moto-compressor (Figura 8).

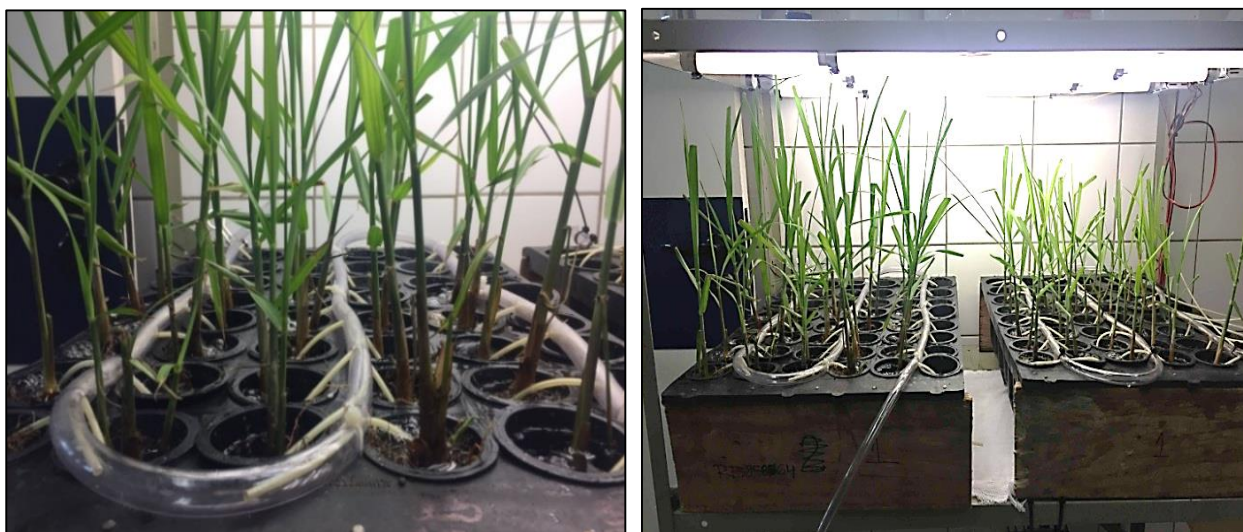


Figura 8. Plântulas de cana-de-açúcar com sistema radicular exposto à solução nutritiva acrescida de concentrações crescentes de Al^{3+} .

O pH da solução nutritiva contendo Al^{3+} foi ajustado para $4,0 (\pm 0,2)$, diariamente, com $\text{HCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para garantir o predomínio da espécie livre trivalente de $\text{Al}^{3+} [\text{Al}^{3+} (\text{H}_2\text{O})_6^{3+}]$ (ROSSIELLO; JACOB NETO, 2006). Nesta etapa, o nutriente Fe foi omitido da solução, para evitar interferência, e a concentração de P foi reduzida a $0,025 \text{ mmol L}^{-1}$, para contornar problemas de precipitação com o Al^{3+} (BRACCINI et al., 2000ab). As raízes ficaram expostas à solução contendo Al^{3+} por 6 (seis) dias. Para determinação do tempo de imersão de raízes de cana-de-açúcar, foi utilizado o protocolo de exposição ao Al^{3+} desenvolvido por Oliveira (2012). Vasconcelos et al (2002) verificaram que a exposição ao Al^{3+} pelo período de 4 dias foi suficiente para identificação de alterações no sistema radicular de cultivares de trigo. Após este período, as plântulas tiveram suas três maiores raízes medidas, de forma que a média constituiu o comprimento final (C_f).

3.6 AVALIAÇÕES BIOMÉTRICAS

Medidas biométricas dos comprimentos radiculares de todas as plântulas foram registradas, obtendo-se dois grupos de medidas de comprimento (ROSSIELLO; JACOBNETTO, 2006):

C_i : comprimento inicial (cm) das três maiores raízes, antes de exposição ao Al^{3+} ;

C_f : comprimento final (cm) das três maiores raízes, após a exposição ao Al^{3+} .

A partir dessas medidas, o crescimento radicular foi expresso de acordo com a equação 1.

Equação 1:

$$(C_r): C_r = C_f - C_i$$

Onde C_r = crescimento radicular (cm)

Os valores de C_i e C_f foram constituídos pela média do comprimento das três maiores raízes de cada plântula avaliada, na ocasião das medidas.

3.7 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE ÁCIDOS ORGÂNICOS

No protocolo analítico utilizado para extração dos ácidos orgânicos radiculares, adaptado de Menosso (2001), foi utilizada uma média entre 1,0 a 2,5 g de tecido radicular fresco de cada cultivar. A trituração de cada amostra foi feita com almofariz e pistilo de porcelana, em 10 mL de etanol 80% (v/v) (99,8%, Merck, Alemanha) (Figura 9 A ,B). A solução total foi armazenada em geladeira a 5 °C. Após 24 horas, as amostras foram submetidas a tratamento ultrassônico (Lavadora Ultrassônica – Unique[®], frequência 50/60Hz kHz) por 20 min e centrifugadas a 2268 g durante 20 min. Todo o sobrenadante foi evaporado a 55 °C, até à secura total em estufa (Estufa de secagem com circulação forçada de ar- Quimis[®]). A temperatura foi determinada após avaliação do ponto de ebulição dos ácidos cítrico (175 °C), málico (135 °C) e oxálico (160 °C) para evitar a volatilização dos ácidos. O resíduo foi ressuspenso, em 2 mL de água deionizada. Após essa etapa, os extratos foram filtrados em membrana com porosidade de 0,22 μ m (Millex[®] – Millipore) e armazenados em geladeira à 5 °C para análise cromatográfica.

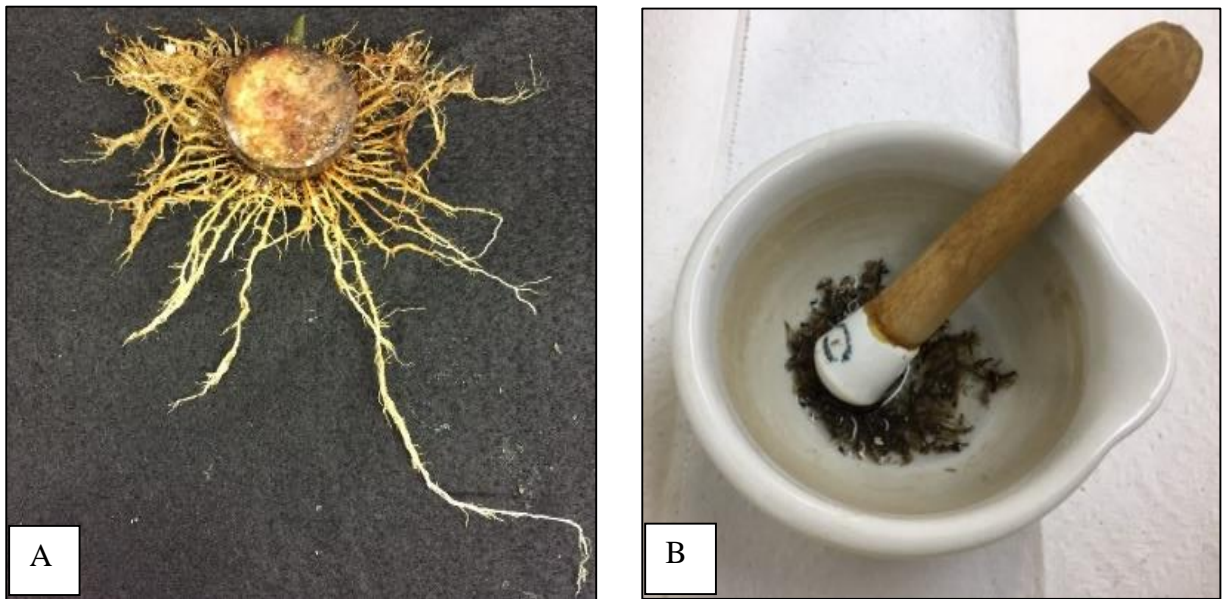


Figura 9. (A) Sistema radicular de minirrebolo de cana-de-açúcar após a etapa de estresse por Al^{3+} ; (B) Tecido radicular excisado e triturado com pistilo em almofariz.

Optou-se pela análise de ácidos orgânicos exsudados das raízes, presentes no volume total de solução, utilizadas nos tratamentos com Al^{3+} (Figura 10), afim de obter os valores totais de ácidos orgânicos produzidos pelo sistema radicular da cana-de-açúcar e exsudados na solução nutritiva. Após os seis dias de exposição ao estresse por doses crescentes de Al^{3+} , a solução foi centrifugada a 2268 g durante 20 min, e o sobrenadante coletado foi evaporado a 55 °C até *secura total* em estufa (Estufa de secagem com circulação forçada de ar- Quimis®). O resíduo foi ressuspenso em 2 mL de água deionizada. Após essa etapa, os extratos foram filtrados em membrana com porosidade de 0,22 μm (Millex® – Millipore) e armazenados em geladeira a 5 °C para análise cromatográfica.

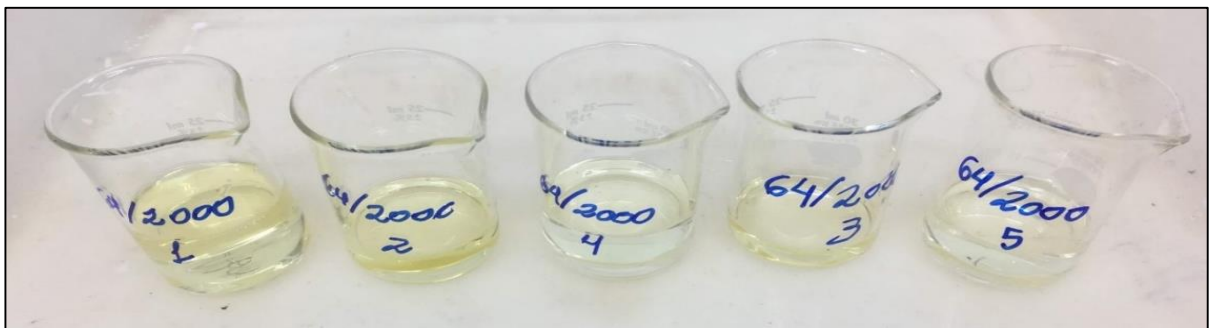


Figura 10. Processo de preparação para evaporação da solução nutritiva utilizada no tratamento de exposição ao estresse por Al^{3+} .

Os ácidos orgânicos de interesse neste estudo foram cítrico, málico e oxálico, apontados pela literatura como os de maior eficiência de complexação e de desintoxicação do Al^{3+} (MIYASAWA et al., 1992; DELHAIZE et al., 1993; MENOSSO et al., 2001; SILVA et al., 2001). Para identificação e quantificação dos ácidos orgânicos, foi realizada em cromatógrafo de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (UltiMate - 3000 - Thermo SCIENTIFIC, Estados Unidos). As condições operacionais empregadas, para a quantificação de ácidos orgânicos, de acordo com Barbosa et al.(2018) estão nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Condições operacionais do cromatógrafo líquido de alta eficiência para análise dos ácidos cítrico e málico provenientes do sistema radicular de plântulas de cana-de-açúcar submetidas ao estresse pelo Al^{3+} .

| Parâmetro | Descrição |
|------------------------------|--|
| Fase Móvel | Ácido ortofosfórico 0,01 mol L ⁻¹ , pH 2,00 |
| Coluna | Symmetry C18 5um (3,9 x 150 mm) Waters |
| Vazão da fase móvel | 0,8 mL min ⁻¹ |
| Volume de injeção da amostra | 20 µL |
| Detector | UV-VIS DAD (Arranjo de Diodos) |
| Comprimento de onda | 200 nm |
| Temperatura da coluna | 30 °C |

Tabela 4. Condições operacionais do cromatógrafo líquido de alta eficiência para análise dos ácido oxálico proveniente do sistema radicular de plântulas de cana-de-açúcar submetidas ao estresse pelo Al^{3+} .

| Parâmetro | Descrição |
|------------------------------|---|
| Fase Móvel | Ácido ortofosfórico 0,001 mol L ⁻¹ , pH 2,35 |
| Coluna | Symmetry C18 5um (3,9 x 150 mm) Waters |
| Vazão da fase móvel | 1 mL min ⁻¹ |
| Volume de injeção da amostra | 5 µL |
| Detector | UV-VIS DAD (Arranjo de Diodos) |
| Comprimento de onda | 200 nm |
| Temperatura da coluna | 30 °C |

Para a determinação do tempo de retenção de cada ácido orgânico, foram injetados padrões de alta pureza (grau HPLC - SIGMA-ALDRICH, Brasil) dos ácidos orgânicos, preparados em água ultrapura (Milli-Q[®], Millipore). As amostras foram filtradas em membranas com porosidade de 0,22 µm (Millex[®], Millipore). Para fins de caracterização quantitativa das amostras, foram construídas curvas de calibração (concentração × área do pico) para cada um

dos ácidos identificados através da comparação com o tempo de retenção dos picos padrões com intervalo de 95% de confiança. As análises foram realizadas em triplicata (Tabela 5).

Tabela 5. Curvas de calibração utilizadas para quantificação dos ácidos orgânicos de raiz e exsudados em solução nutritiva (concentração \times área do pico).

| Ácido | Equação da reta | R ² | Concentrações (mg L ⁻¹) |
|---------|-----------------------------|----------------|-------------------------------------|
| Cítrico | $y = -0,00256 + 0,00751*x$ | 0,9921 | 6, 10, 20, 40, 60, 80, 100 |
| Málico | $y = -0,033392 + 0,02237*x$ | 0,9806 | 10, 20, 40, 60, 80, 100 e 200 |
| Oxálico | $y = -0,6046 + 0,67523*x$ | 0,9988 | 10, 20, 40, 60, 100 e 200 |

3.8 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados médios da biometria de crescimento radicular e dos teores de ácidos orgânicos (interior das raízes e exsudados pelas raízes) foram submetidos à análise estatística exploratória e ao diagnóstico de influência global (COOK, 1975), que permite a detecção de valores influentes (outliers) e sua exclusão fundamentada do conjunto de dados. A técnica por box-plot (diagramas de caixas) considerou o primeiro quartil (Q1, valor inferior acima do qual estão contidos 75% do dados), o segundo quartil (Q2, que representa a mediana) e o terceiro quartil (Q3, valor superior abaixo do qual estão contidos 75% do dados), possibilitando a identificação de outliers que foram considerados não pertencentes à população.

A distribuição normal foi avaliada pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$) e, na ausência de distribuição normal, procedeu-se a transformação em raiz quadrada (\sqrt{x}) conforme metodologia proposta por Box e Cox (1964). Após atestar a normalidade, os resultados foram submetidos à análise de variância. Quando o teste F da ANOVA foi significativo ($p < 0,05$), as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Para os fatores quantitativos, foi realizada a análise de modelos de regressão em função das doses crescentes de Al^{3+} em solução. Os procedimentos estatísticos foram desempenhados no programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2018).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CRESCIMENTO RADICULAR

A rápida inibição do crescimento radicular é um dos primeiros sintomas observados em resposta ao Al^{3+} . Como se trata de resposta de fácil mensuração, torna-se um critério eficaz para a seleção de espécies/genótipos tolerantes a este elemento (FOY, 1988; POSCHENRIEDER et al., 2008). No presente trabalho, o crescimento radicular foi explicado ($p < 0,01$) pela interação entre variedades de cana-de-açúcar e doses de Al^{3+} (Tabela 6), semelhante ao relatado por Oliveira (2012) quanto à taxa de crescimento radicular de nove variedades de cana-de-açúcar submetidas a doses crescentes de Al^{3+} (0 a 4.000 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em solução.

A variedade RB855156 apresentou crescimento radicular inferior e estatisticamente diferente do da RB928064 apenas na dosagem de 1500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Tabela 10). Para a variedade RB928064, citada por Oliveira (2012) como mais resistente a toxidez por Al^{3+} , nenhuma das doses de Al^{3+} afetou negativamente seu crescimento radicular (Tabela 10).

Tabela 6. Crescimento radicular de plântulas de variedades de cana-de-açúcar submetidas a doses crescentes de Al^{3+} em solução.

| Crescimento radicular (cm) | | | |
|-----------------------------|---------------|---------------|-----------------|
| Dose de Al | RB855156 | RB928064 | Média das doses |
| 0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ | 0,77 abA | 0,28 aA | 0,53 a |
| 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ | 0,73 abA | 0,79 aA | 0,76 a |
| 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ | 1,36 aA | 1,10 aA | 1,23 a |
| 1500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ | 0,04 bB | 1,37 aA | 0,71 a |
| 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ | 0,59 abA | 0,57 aA | 0,58 a |
| Média Avaliação | 0,70 A | 0,82 A | |
| DMS DxV= 0,84 | DMS VxD= 1,18 | DMS D= 0,84 | DMS V= 0,37 |

Letra minúscula compara doses dentro de cada variedade e letra maiúscula variedades dentro de cada dose; médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna e maiúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Pimenta (2017) verificou que o crescimento radicular da variedade SP80-3280 cana-de-açúcar foi afetado pelo Al^{3+} a partir das menores concentrações ($77 \mu\text{M Al}^{3+}$) e do menor tempo de exposição (7 dias), enquanto a variedade RB835486 apresentou drástica redução no crescimento radicular somente após o contato com $643 \mu\text{M Al}^{3+}$. Oliveira (2012) observou que o valor crítico de Al^{3+} em solução que interfere no crescimento das raízes dependeu da variedade.

Menosso et al (2001) avaliaram a influência do Al no crescimento radicular de plântulas de duas cultivares de soja, consideradas sensível e tolerante, em duas concentrações de Al^{3+} (0 e $0,2 \text{ mg L}^{-1}$). Os autores observaram que as cultivares tolerantes ao Al^{3+} apresentaram maior crescimento radicular do que as cultivares sensíveis, quando havia a presença de Al^{3+} na solução. Contudo, no presente estudo, as variedades de cana-de-açúcar não diferiram quanto ao crescimento radicular, exceto quando foram expostas a dosagem de $1500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Al^{3+} , o que denota que as plantas respondem de maneira diferenciada à exposição do Al^{3+} .

4.2 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS

As condições de operação do cromatógrafo (Tabelas 3 e 4) utilizadas no presente trabalho foram consideradas adequadas para a identificação e quantificação dos ácidos cítrico, málico e oxálico alocados no interior do sistema radicular e exsudados pelas plântulas de cana-de-açúcar na solução nutritiva. Os ácidos foram identificados nos seguintes tempos de retenção: ácido cítrico (3,95 min.); ácido málico (4,53 min.); ácido oxálico (1,89 min.). Os cromatogramas apresentaram picos de boa resolução nos padrões e nas amostras analisadas (Figura 11).

Existe consenso na literatura científica sobre as dificuldades para o desenvolvimento das condições metodológicas ideais para a detecção de diferentes ácidos orgânicos produzidos por raízes e exsudados na rizosfera, incluindo os métodos cromatográficos (WAITHAISONG et al., 2015; ADELEKE et al., 2017). Dentre os fatores está a necessidade de otimização dos protocolos de extração e análises dos ácidos orgânicos, além da variabilidade genética e biológica específica da planta (JIANBO et al., 1998; 1999a, 1999b; SILVA et al., 2001; CAMPOS, 2002).

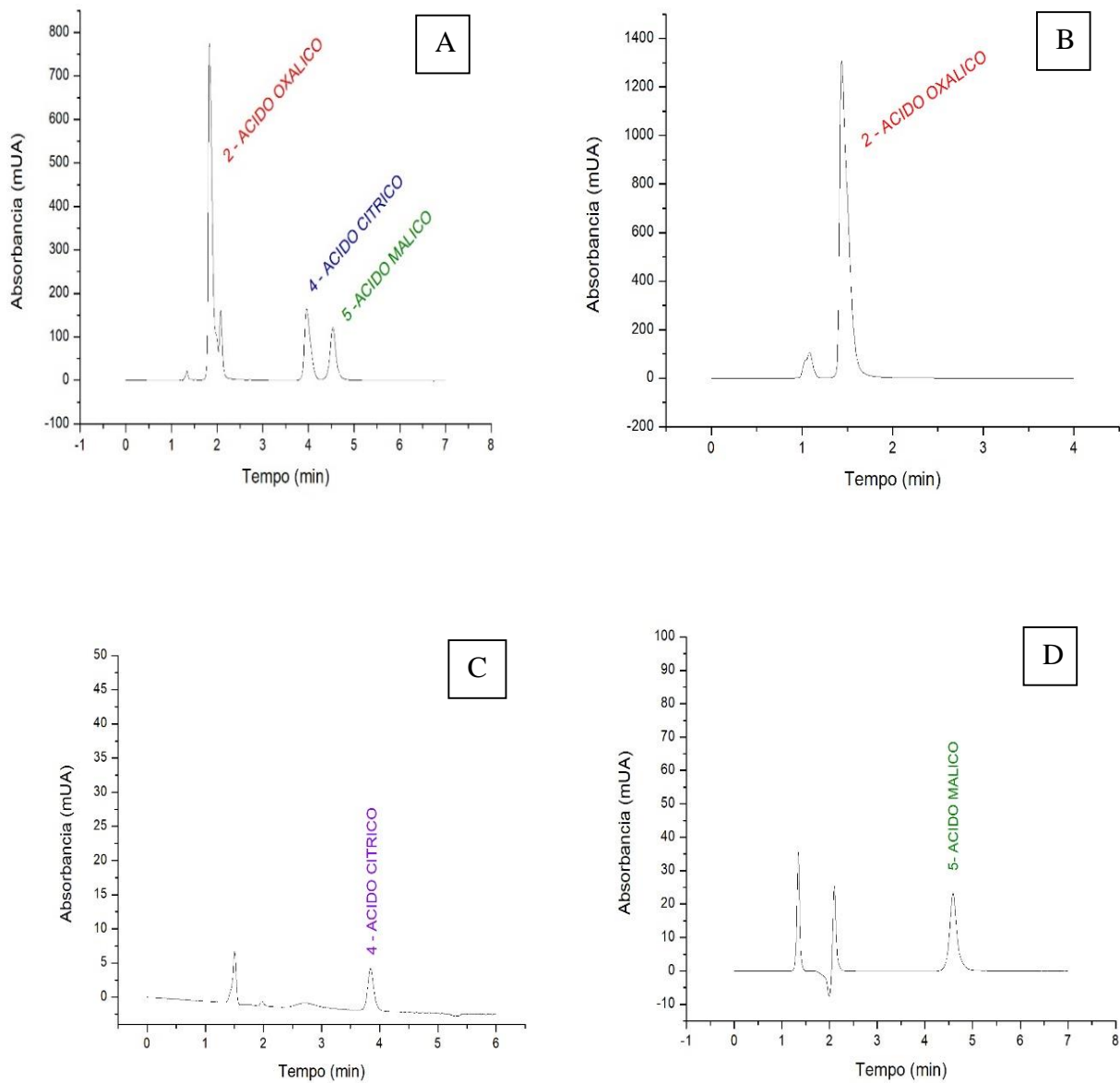


Figura 11. (A) Cromatogramas do perfil das soluções padrão de ácido oxálico (1,89 min), ácido cítrico (3,95 min) e ácido málico (4,53 min). (B, C e D) ácidos extraídos de amostra de raiz de cana-de-açúcar (RB928064), empregando fase móvel ácido ortofosfórico 0,01 mol L⁻¹, pH 2,00 para os ácidos cítrico e málico e 0,001 mol L⁻¹ e pH 2,35 para o ácido oxálico.

As respostas fenotípicas ou bioquímicas, que nem sempre são lineares, de determinadas espécies, também contribuem com a não exatidão dos resultados que são dependentes do genótipo de cada indivíduo (KOPITTKÉ et al., 2016; MA et al., 2014; FAMOSO et al., 2010). Outro ponto importante é a escassez de trabalhos referentes a identificação e quantificação dos ácidos orgânicos provenientes do sistema radicular especificamente de cana-de-açúcar.

4.3 QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS

Gráficos do tipo *boxplot* foram usados para a análise da amplitude de variação dos teores médios de ácidos orgânicos produzidos pelas variedades RB855156 e RB928064 de cana-de-açúcar submetidas aos tratamentos com doses crescentes de Al^{3+} em solução. O exame estatístico considerando cinco repetições para cada tratamento identificou valores anômalos discrepantes em relação à média adquirida, que foram interpretados como *outliers*. Após a reanálise e a retirada dos outliers, obteve-se um conjunto de dados mais próximo da distribuição normal, possibilitando a realização das análises estatísticas, resultando em três repetições para cada tratamento (Figuras 12,13 e 14). Os teores dos ácidos málico e oxálico no tecido radicular dependeram das variedades de cana-de-açúcar e as variações dos teores de ácido cítrico e do crescimento radicular foram explicadas pelo efeito da interação entre as variedades e as doses de Al^{3+} em solução (Tabela 6).

A produção de ácido cítrico pela variedade RB928064, em função das doses de Al^{3+} , foi significativamente ajustada ($p < 0,01$) (Tabela 6) por uma equação de regressão polinomial quadrática (função polinomial de segundo grau). O coeficiente de determinação indicou que 74% da variação dos teores de ácido cítrico produzidos no tecido radicular pode ser explicada pelos tratamentos (Figura 15). Para o intervalo de doses de Al^{3+} estudado (0 a $2.000 \mu mol L^{-1}$), a função apresentou comportamento crescente contínuo, indicando que, a partir do nível crítico de $138 \mu mol L^{-1}$ de Al^{3+} em solução, a variedade RB928064 apresentou incremento da produção de ácido cítrico como um mecanismo de resposta ao aumento do estresse abiótico por Al^{3+} (Figura 15).

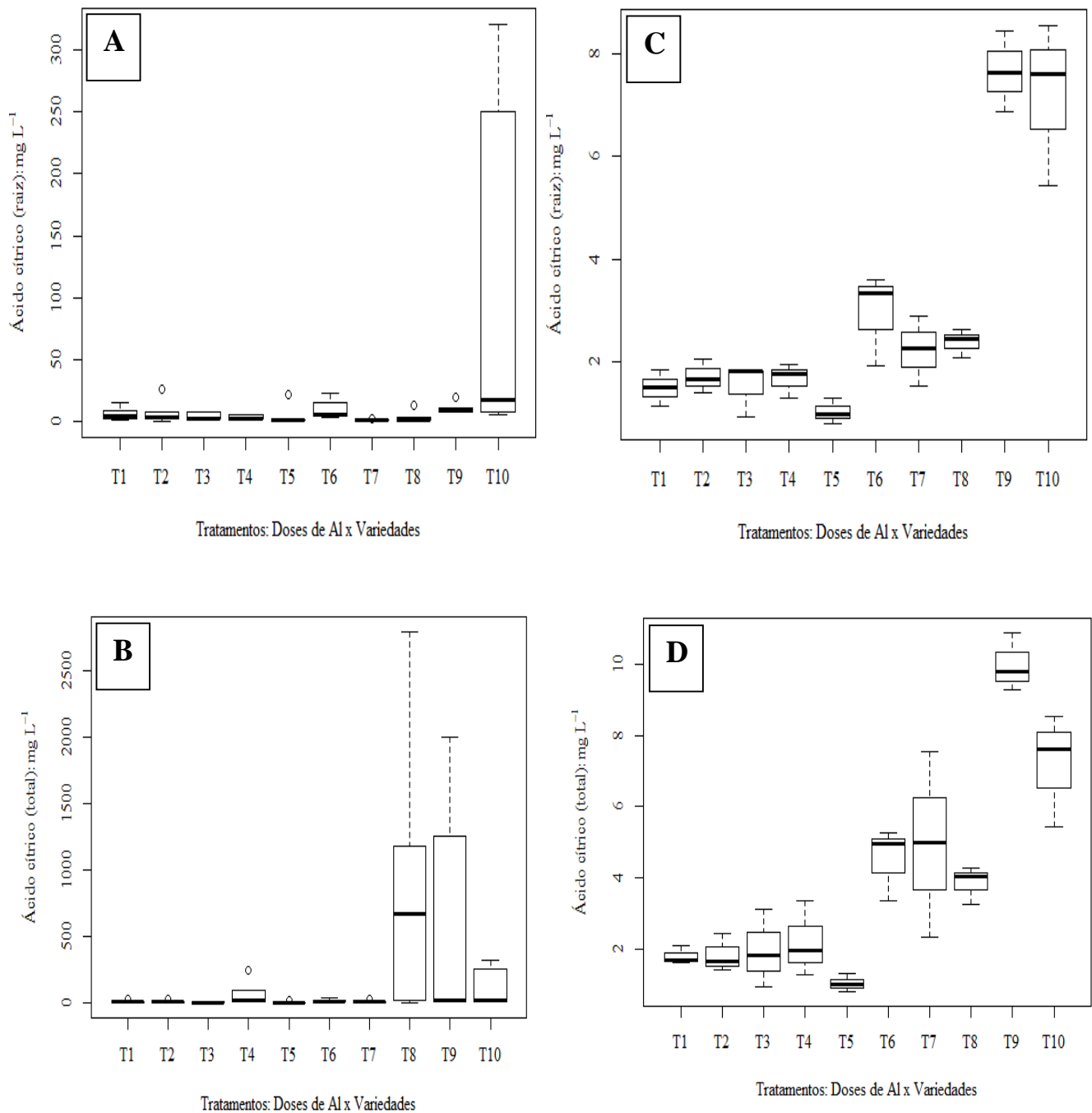


Figura 12: Análise estatística de Bloxpot de teores médios de ácido cítrico (raiz - A e C; total - B e D), resultantes de cinco (A e B) e de três replicas (C e D) dos tratamentos com doses crescentes de Al^{3+} em solução para as variedades RB855156 (T1= 0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; T2= 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$, T3= 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$, T4= 1500 $\mu\text{mol L}^{-1}$, T5= 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e RB928064 (T6= 0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; T7= 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$, T8= 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$, T9= 1500 $\mu\text{mol L}^{-1}$, T10= 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$) de cana-de-açúcar; ° outlier.

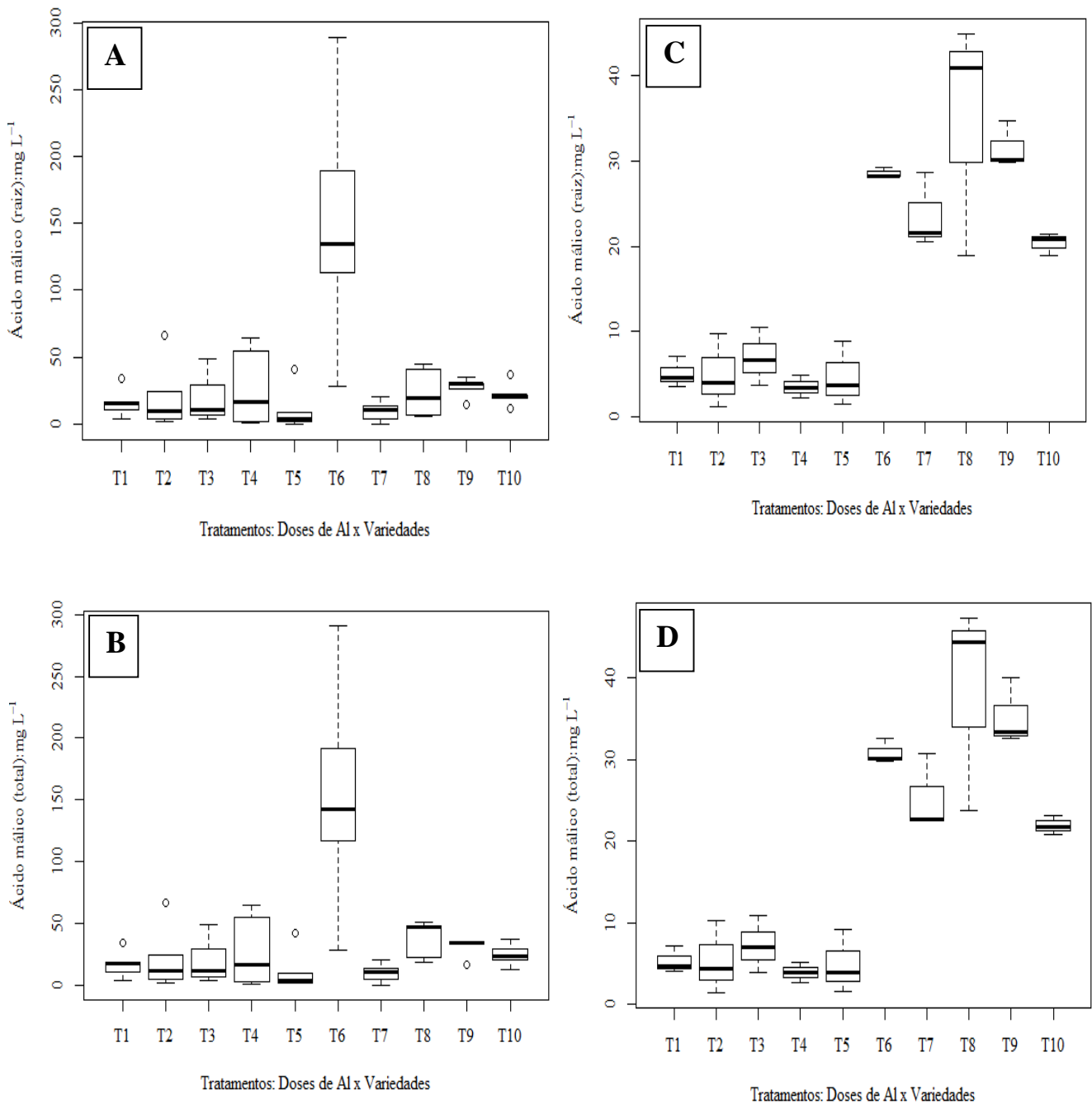


Figura 13: Análise estatística de Bloxpot de teores médios de ácido málico (raíz - A e C; total - B e D), resultantes de cinco (A e B) e de três replicas (C e D) dos tratamentos com doses crescentes de Al³⁺ em solução para as variedades RB855156 (T1= 0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; T2= 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$, T3= 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$, T4= 1500 $\mu\text{mol L}^{-1}$, T5= 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e RB928064 (T6= 0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; T7= 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$, T8= 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$, T9= 1500 $\mu\text{mol L}^{-1}$, T10= 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$) de cana-de-açúcar; ° outlier.

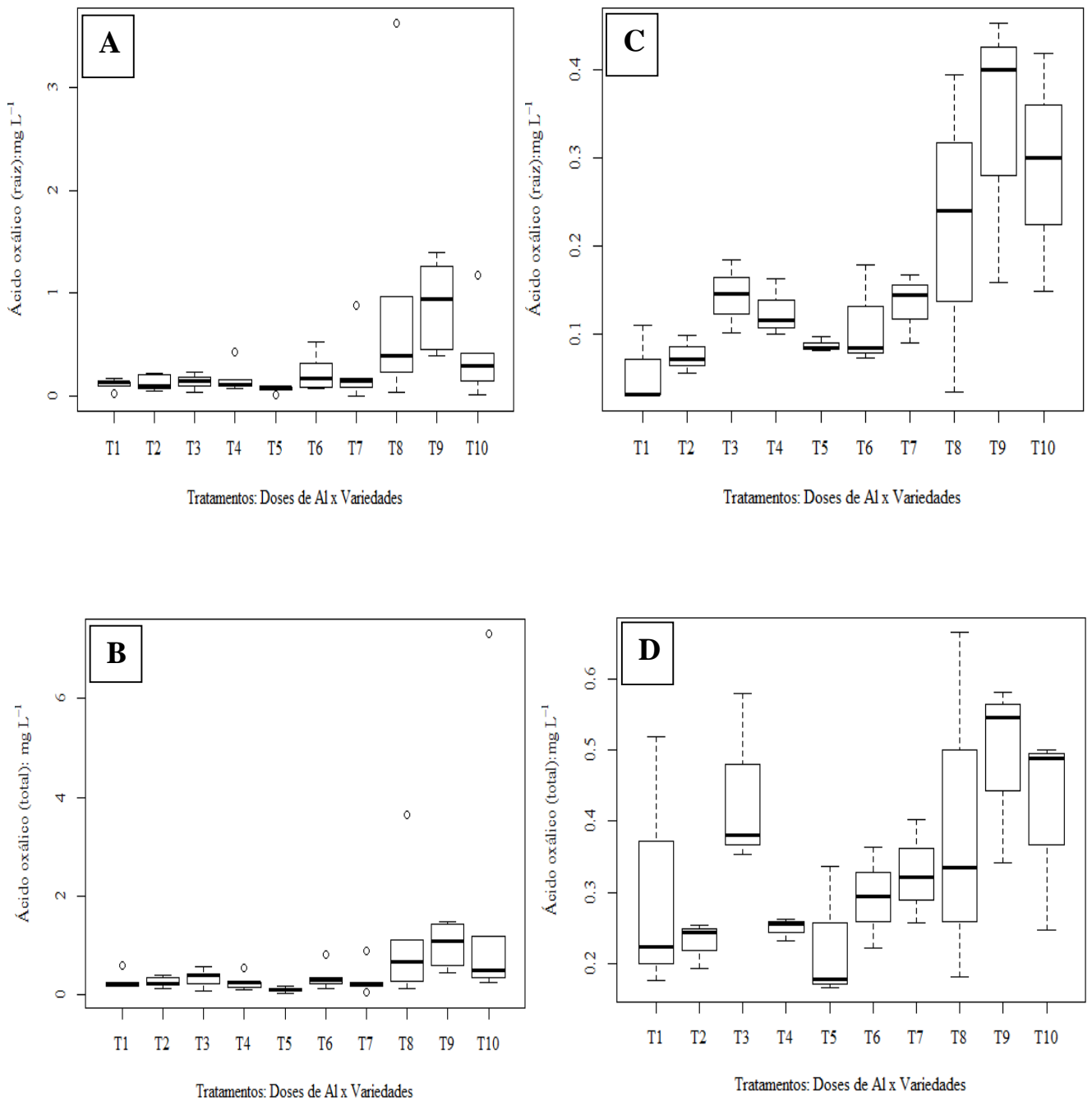


Figura 14: Análise estatística de Bloxpot de teores médios de ácido oxálico (raíz - A e C; total - B e D), resultantes de cinco (A e B) e de três replicas (C e D) dos tratamentos com doses crescentes de Al³⁺ em solução para as variedades RB855156 (T1= 0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; T2= 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$, T3= 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$, T4= 1500 $\mu\text{mol L}^{-1}$, T5= 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e RB928064 (T6= 0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; T7= 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$, T8= 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$, T9= 1500 $\mu\text{mol L}^{-1}$, T10= 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$) de cana-de-açúcar; ° outlier.

Tabela 7. Análise de variância (ANOVA) e do modelo de regressão dos teores de ácidos orgânicos no tecido radicular e do crescimento de raízes de plântulas de variedades de cana-de-açúcar submetidas a doses crescentes de Al^{3+} em solução.

| ANOVA: p-valor do teste F | | | | | |
|----------------------------------|-----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| FV | gl | ¹AC | ¹AM | ¹AO | ¹CR |
| Doses de Al (D) | 4 | <0,01** | 0,20 ^{ns} | <0,05 ^{ns} | 0,11 ^{ns} |
| Variedade (V) | 1 | <0,01** | <0,01** | <0,01** | 0,26 ^{ns} |
| D x V | 4 | <0,01** | 0,53 ^{ns} | 0,53 ^{ns} | 0,01** |
| CV% | | 24,13% | 18,08% | 28,64% | 24,45% |
| Teste de normalidade (SW) | | 0,25 | 0,33 | 0,35 | 0,06 |
| ANOVA da regressão | | | | | |
| Doses: RB855156 | 1 | ns | ns | ns | ns |
| Doses: RB928064 | 1 | Q** | ns | ns | ns |

FV: fonte de variação; gl: grau de liberdade; ns: não significativo; *significativo a 5% de probabilidade pelo teste F; ** significativo a 1% de probabilidade pelo teste F. L: ajuste de regressão linear; Q: ajuste de regressão quadrática.¹Para atender pressuposição de normalidade (p-valor $\geq 0,05$) os dados foram transformados em \sqrt{x} , conforme metodologia de Box & Cox (1964). AC: ácido cítrico; AM: ácido málico; AO: ácido oxálico.

A produção de ácido cítrico da RB855156 não respondeu significativamente as doses crescentes de Al^{3+} nas raízes, mas observou-se nítido aumento na produção deste ácido pela variedade RB928064 a partir de $1500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Al^{3+} (Tabela 8; Figura 15). Há dificuldades na definição do nível crítico que provoca resposta das plantas aos estresses bióticos ou abióticos. Segundo Gonçalves et al. (2005), a presença de $185 \mu\text{M L}^{-1}$ de Al^{3+} foi suficiente para induzir o aumento dos teores de ácidos orgânicos nas raízes de cultivares de sorgo tolerantes e sensíveis ao Al^{3+} , principalmente dos ácidos málico e trans-aconítico. Para Oliveira (2012), o valor crítico de Al^{3+} em solução que passou a diminuir a taxa de alongamento radicular da variedade RB855156 foi de $380 \mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto para a variedade RB928064 o valor foi de $3.000 \mu\text{mol L}^{-1}$.

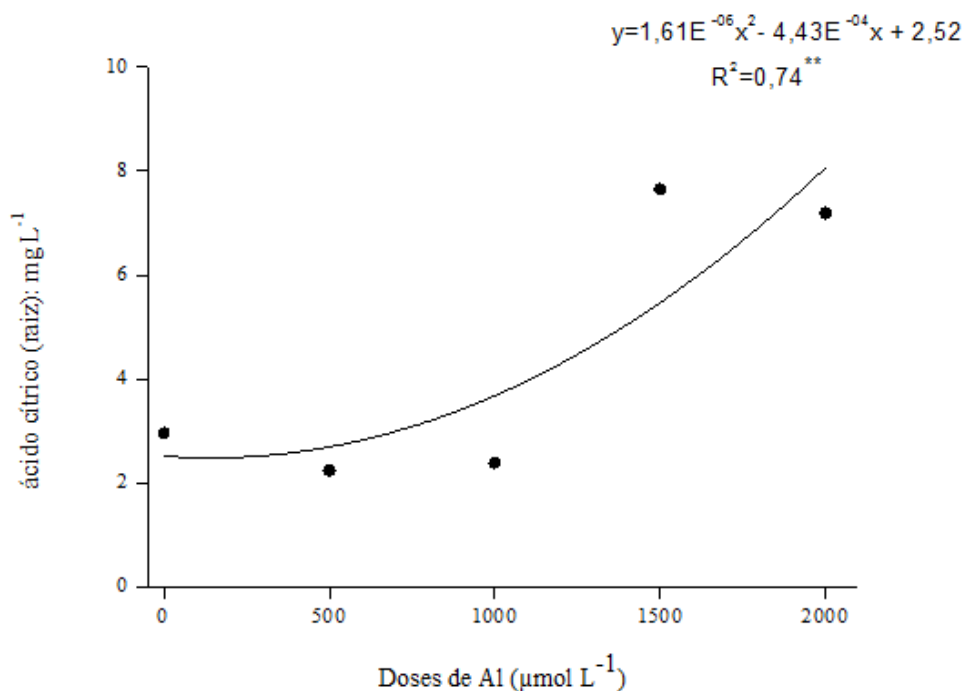


Figura 15. Ajuste polinomial da produção de ácido cítrico no tecido radicular de plântulas da variedade RB928064 de cana-de-açúcar submetidas a doses crescentes de Al^{3+} em solução.

Provavelmente, uma das razões de a RB928064 ser tolerante ao Al^{3+} é a aumento do mecanismo de produção de ácido cítrico logo a partir do nível crítico de $138 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Al^{3+} (Figura 15). De acordo com Oliveira (2012), a integridade e o crescimento manteve-se mesmo com a exposição das raízes à $3.000 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Al^{3+} , concentração a partir da qual há diminuição da taxa de alongamento radicular da variedade (OLIVEIRA, 2012).

As variações dos teores totais de ácido cítrico também dependeram da interação entre as variedades e as doses de Al^{3+} em solução. Os teores totais de ácido málico, a exemplo dos teores observados apenas no tecido radicular, também estiveram associados às variedades de cana-de-açúcar. Tanto o efeito isolado dos fatores variedades e doses de Al^{3+} , quanto o efeito da interação, não foram significativos para explicar a variação dos teores totais de ácido oxálico (Tabela 8).

Assim como observado no tecido radicular (Tabela 6), somente a produção de ácido cítrico total pela variedade RB928064, em função das doses de Al^{3+} , foi ajustada por um modelo de regressão (Tabela 7). A aderência dos resultados à equação linear foi altamente significativa ($p < 0,01$), com capacidade de explicar 43% da variação dos teores totais de ácido cítrico em função do aumento das doses de Al^{3+} em solução (Figura 16).

Tabela 8. Análise de variância (ANOVA) e do modelo de regressão dos teores ¹totais de ácidos orgânicos produzidos por raízes de plântulas de variedades de cana-de-açúcar submetidas a doses crescentes de Al³⁺ em solução.

| ANOVA: p-valor do teste F | | | | |
|----------------------------------|-----------|---------------|-----------------------|--------------------|
| FV | gl | AC | ¹AM | AO |
| Doses de Al ³⁺ (D) | 4 | <0,01** | 0,11 ^{ns} | 0,38 ^{ns} |
| Variedade (V) | 1 | <0,01** | <0,01** | 0,06 ^{ns} |
| D x V | 4 | <0,01** | 0,37 ^{ns} | 0,23 ^{ns} |
| CV% | | 30,12% | 16,51% | 38,50% |
| Teste de normalidade | | 0,49 | 0,51 | 0,83 |
| ANOVA da Regressão | | | | |
| Doses: RB855156 | 1 | ns | ns | ns |
| Dose: RB928064 | 1 | L** | ns | ns |

FV: fonte de variação; gl: grau de liberdade; ns: não significativo; *significativo a 5% de probabilidade pelo teste F; ** significativo a 1% de probabilidade pelo teste F. L: ajuste de regressão linear; Q: ajuste de regressão quadrática. ¹Para atender pressuposição de normalidade (p-valor $\geq 0,05$) os dados foram transformados em \sqrt{x} , conforme metodologia de Box & Cox (1964). AC: ácido cítrico; AM: ácido málico; AO: ácido oxálico. ¹somatório das concentrações de ácidos orgânicos no tecido radicular e exsudados em solução nutritiva.

Ao contrário de vários relatos na literatura, a produção quantitativa de ácidos orgânicos não foi influenciada pelo aumento da concentração de Al³⁺ em solução, com exceção do ácido cítrico pela variedade RB928064 (Tabelas 8 e 9). Gonçalves (1998) observou que o aumento nos níveis de produção dos ácidos succínico, cítrico, málico, fumárico e t-aconítico esteve diretamente relacionado com o aumento do estresse por Al³⁺, independentemente dos cultivares de sorgo (BR007A sensível e BR006R tolerante).

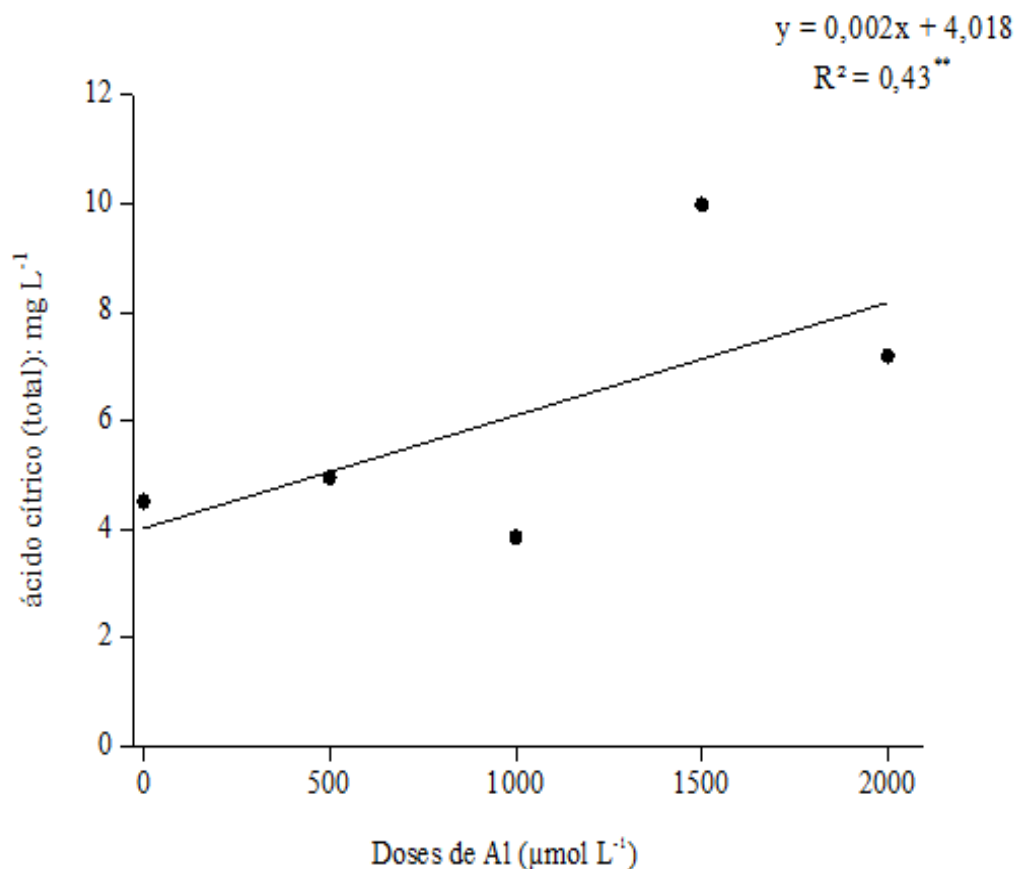


Figura 16. Ajuste linear da concentração total de ácido cítrico produzido por plântulas da variedade RB928064 de cana-de-açúcar submetidas a doses crescentes de Al^{3+} em solução.

Embora muitos trabalhos tenham esclarecido a existência de uma relação direta entre a produção e exsudação de ácidos orgânicos por raízes de plantas e a tolerância ao Al^{3+} (MENOSSO, 2001; YANG et al., 2005; CASSOL, 2012; RODRIGUES, 2015), ainda não há clara compreensão para a relação entre as concentrações de AOs no apoplasto do tecido radicular e a quantidade liberada na rizosfera (ADELEKE et al., 2017). No entanto, tem sido atribuída maior importância da determinação dos teores de AOs no apoplasma radicular do que no meio externo, principalmente em estudos de detoxificação de Al^{3+} (JONES et al., 2003). Considerando que a diferença entre os teores totais (Tabela 9) e os teores do tecido radicular (Tabela 8) representa a quantidade exsudada pelas raízes das plântulas, observou-se que a maior proporção de AOs [57% (ácido oxálico – RB928064 a 94% (ácido málico – RB855156)] se manteve no interior do tecido radicular, com exceção da variedade RB855156 que exsudou 69% do ácido oxálico produzido.

Tabela 9. Valores médios das concentrações dos ácidos cítrico, málico e oxálico no tecido radicular de plântulas de variedades de cana-de-açúcar submetidas a doses crescentes de Al em solução nutritiva.

| Ácido cítrico (mg L⁻¹) | | | |
|--|-----------------|-----------------|---------------------------|
| Dose de Al | RB855156 | RB928064 | Média (Dose de Al) |
| 0 µmol L ⁻¹ | 1,50 aB | 2,96 bA | 2,23 b |
| 500 µmol L ⁻¹ | 1,71 aA | 2,24 bA | 1,98 b |
| 1.000 µmol L ⁻¹ | 1,53 aA | 2,39 bA | 1,96 b |
| 1.500 µmol L ⁻¹ | 1,67 aB | 7,65 aA | 4,66 a |
| 2.000 µmol L ⁻¹ | 1,04 aB | 7,19 aA | 4,12 a |
| Média (variedade) | 1,49 B | 4,49 A | |
| DMS DxV = 1,23 | DMS VxD = 1,76 | DMS D = 1,25 | DMS V = 0,55 |
| Ácido málico (mg L⁻¹) | | | |
| Dose de Al | RB855156 | RB928064 | Média (Dose) |
| 0 µmol L ⁻¹ | 5,09 | 28,58 | 16,83 a |
| 500 µmol L ⁻¹ | 5,03 | 23,60 | 14,32 a |
| 1.000 µmol L ⁻¹ | 6,97 | 34,89 | 20,93 a |
| 1.500 µmol L ⁻¹ | 3,47 | 31,55 | 17,51 a |
| 2.000 µmol L ⁻¹ | 4,70 | 20,38 | 12,54 a |
| Média (variedade) | 5,05 B | 27,80 A | |
| DMS DxV = 8,93 | DMS VxD = 12,81 | DMS D = 9,06 | DMS V = 3,99 |
| Ácido oxálico (mg L⁻¹) | | | |
| Dose de Al | RB855156 | RB928064 | Média (Dose) |
| 0 µmol L ⁻¹ | 0,06 | 0,11 | 0,09 a |
| 500 µmol L ⁻¹ | 0,08 | 0,13 | 0,11 a |
| 1.000 µmol L ⁻¹ | 0,14 | 0,22 | 0,18 a |
| 1.500 µmol L ⁻¹ | 0,13 | 0,34 | 0,23 a |
| 2.000 µmol L ⁻¹ | 0,09 | 0,29 | 0,19 a |
| Média (variedade) | 0,09 B | 0,22 A | |
| DMS DxV = 0,16 | DMS VxD = 0,23 | DMS D = 0,16 | DMS V = 0,07 |

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna e maiúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. DMS: diferença mínima significativa; D: doses de Al³⁺; V: variedades; DxV: desdobramento das doses dentro de variedade; VxD: desdobramento das variedades dentro de dose.

Genótipos de diversas espécies de plantas cultivadas respondem diferenciadamente à toxicidade por Al^{3+} e quanto à intensidade de manifestação dos diferentes mecanismos contra o estresse abiótico, podem ser agrupados em tolerantes, intermediários e sensíveis (SÁNCHEZ-CHACÓN et al., 2000). A produção de ácidos orgânicos foi considerada um mecanismo de defesa vegetal ao estresse provocado pelo Al^{3+} , cuja intensidade de manifestação dependeu da variedade de cana-de-açúcar. Os ácidos cítrico, málico e oxálico foram produzidos em maior quantidade pela RB928064 (Tabelas 8 e 9), corroborando conclusões de Oliveira (2012), que classificou a variedade como tolerante, considerando a taxa de alongamento radicular de plântulas submetidas ao Al^{3+} em solução. Silva et al. (2000) identificaram a presença dos ácidos cítrico, oxálico e acético na rizosfera de plantas de café submetidas ao estresse por Al^{3+} , com destaque para a produção de ácido oxálico. Dentre os genótipos de café analisados, as variedades Icatu amarelo e Mundo Novo produziram $3,05 \text{ mg kg}^{-1}$ e $3,16 \text{ mg kg}^{-1}$ de ácido oxálico, respectivamente, sendo concentrações significativamente diferentes das do genótipo Catuaí Vermelho ($2,62 \text{ mg kg}^{-1}$). De acordo com Adeleke et al. (2017), a composição dos exsudados radiculares, incluindo AOs, depende fortemente da espécie vegetal. Enquanto para plantas de café predominou a produção de ácido oxálico (Silva et al., 2000), observou-se que, para as variedades de cana-de-açúcar estudadas, o ácido málico foi produzido em maior quantidade, com concentrações que variaram de $3,47 \text{ (RB855156; } 1.500 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \text{ de } \text{Al}^{3+})$ a $34,89 \text{ mg L}^{-1} \text{ (RB928064; } 1.000 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \text{ de } \text{Al}^{3+})$ (Tabela 8).

O predomínio da produção de ácido málico foi também observado por Alves (2001), em exsudados radiculares de plantas de milho, e por Gonçalves (1998), em cultivares de sorgo considerados mais tolerantes ao Al^{3+} . A quantidade de ácidos cítrico e oxálico produzida foi consideravelmente menor, bem como a amplitude de variação de suas concentrações [$1,04 \text{ (RB855156; } 2.000 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \text{ de Al)}$ a $7,65 \text{ mg L}^{-1} \text{ (RB928064; } 1.500 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \text{ de Al)}$ e $0,06 \text{ (RB855156; } 0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \text{ de Al)}$ a $0,34 \text{ mg L}^{-1} \text{ (RB928064; } 1.500 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \text{ de } \text{Al}^{3+})$, respectivamente] (Tabela 8). A variedade RB855156, considerada sensível ao alumínio fitotóxico, produziu, em média, $1,49 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido cítrico, quantidade distintamente menor do que a produzida pela RB928064 ($4,49 \text{ mg L}^{-1}$) (Tabela 8), considerada tolerante ao Al^{3+} (OLIVEIRA, 2012). Em cultivares de soja, Menosso (2001) verificou baixa produção do ácido oxálico em comparação ao ácido cítrico.

Tabela 10. Valores médios das concentrações ¹totais dos ácidos cítrico, málico e oxálico produzidos por plântulas de variedades de cana-de-açúcar submetidas a doses crescentes de Al³⁺ em solução nutritiva.

| Ácido cítrico (mg L⁻¹) | | | |
|--|-----------------|-----------------|---------------------|
| Dose de Al | RB855156 | RB928064 | Média (Dose) |
| 0 µmol L ⁻¹ | 1,81 aB | 4,51 bcA | 3,16 b |
| 500 µmol L ⁻¹ | 1,84 aB | 4,95 bcA | 3,39 b |
| 1.000 µmol L ⁻¹ | 1,96 aA | 3,85 cA | 2,91 b |
| 1.500 µmol L ⁻¹ | 2,20 aB | 9,98 aA | 6,09 a |
| 2.000 µmol L ⁻¹ | 1,04 aB | 7,19 abA | 4,12 ab |
| Média (variedade) | 1,77 B | 6,10 A | |
| DMS DxV = 2,02 | DMS VxD = 2,90 | DMS D = 2,05 | DMS V = 0,90 |
| Ácido málico (mg L⁻¹) | | | |
| Dose de Al | RB855156 | RB928064 | Média (Dose) |
| 0 µmol L ⁻¹ | 5,28 | 30,87 | 18,08 a |
| 500 µmol L ⁻¹ | 5,37 | 25,30 | 15,34 a |
| 1.000 µmol L ⁻¹ | 7,24 | 38,48 | 22,86 a |
| 1.500 µmol L ⁻¹ | 3,86 | 35,35 | 19,61 a |
| 2.000 µmol L ⁻¹ | 4,92 | 21,93 | 13,42 a |
| Média (variedade) | 5,33 B | 30,39 A | |
| DMS DxV = 8,68 | DMS VxD = 12,46 | DMS D = 8,81 | DMS V = 3,88 |
| Ácido oxálico (mg L⁻¹) | | | |
| Dose de Al | RB855156 | RB928064 | Média (Dose) |
| 0 µmol L ⁻¹ | 0,31 | 0,29 | 0,30 a |
| 500 µmol L ⁻¹ | 0,23 | 0,33 | 0,28 a |
| 1.000 µmol L ⁻¹ | 0,44 | 0,39 | 0,42 a |
| 1.500 µmol L ⁻¹ | 0,25 | 0,49 | 0,37 a |
| 2.000 µmol L ⁻¹ | 0,23 | 0,41 | 0,32 a |
| Média (variedade) | 0,29 A | 0,38 A | |
| DMS DxV = 0,22 | DMS VxD = 0,32 | DMS D = 0,22 | DMS V = 0,10 |

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna e maiúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. DMS: diferença mínima significativa; D: doses de Al³⁺; V: variedades; DxV: desdobramento das doses dentro de variedade; VxD: desdobramento das variedades dentro de dose.

¹somatório das concentrações de ácidos orgânicos no tecido radicular e exsudados em solução nutritiva.

A literatura também relata a ausência de padrões de produção de ácidos orgânicos por raízes de plantas submetidas ao estresse por Al. Delhaize et al. (1993) observaram que, após 2 h de incubação em 200 μmol de Al^{3+} , o conteúdo de ácido málico nos ápices radiculares de genótipos tolerantes de trigo não foi alterado, enquanto nos sensíveis houve notória diminuição. Tal comportamento também foi relatado por Cassol (2012), que observou decréscimo na produção de ácidos málico e cítrico por espécies forrageiras do gênero *Stylosanthes* (*S. capitata* e *S. guianensis*) após 24 h em contato com 200 μM de Al^{3+} , e por Andrade et al. (2011), que concluíram que houve diminuição da produção de ácido málico pelas variedades Shiroshaniyaku (tolerante) e Chikushikomugi (sensível) de trigo após 1, 3 e 6 h submetidas à 100 μM de Al. Dentre as hipóteses, admitiu-se que alguns genótipos de plantas, na presença de Al^{3+} , tiveram a biossíntese de ácidos orgânicos (ou de enzimas envolvidas no processo) comprometida e não apresentaram capacidade de sintetizá-los em quantidade compatível para exsudá-los para o meio externo, de forma que este estresse não constituiu estímulo para ativação da produção destas substâncias como mecanismo de defesa. As quantidades de ácidos orgânicos produzidas pelas variedades de cana-de-açúcar (Tabelas 8 e 9) pertencem à amplitude relatada por ADELEKE et al. (2017) em trabalhos com diversas culturas expostas ao Al^{3+} , tais como grão de bico (*Cicer arietinum* L.), soja (*Glycine max*), feijão guandu (*Cajanus cajan*), milho (*Zea mays*), trigo (*Triticum* spp.), algodão (*Gossypium hirsutum*) e tomate (*Solanum lycopersicum*).

4.4 CRESCIMENTO RADICULAR E ÁCIDOS ORGÂNICOS

A associação entre o crescimento radicular e a produção de ácidos orgânicos foi estimada através do teste de correlação de Pearson ($p < 0,05$). Os baixos coeficientes de correlação e a ausência de significância estatística indicaram a ausência de correlação entre o crescimento radicular e a concentração dos ácidos orgânicos nas raízes e dos ácidos orgânicos totais (Figura 17).

Freitas et al. (2006) avaliaram o desempenho de dezoito genótipos de arroz quanto à absorção de P, Mg, Ca e K quando submetidos ao estresse por Al^{3+} (0,10,20 e 30 mg L^{-1}) em sistema hidropônico. Os autores observaram que o crescimento radicular, característica importante para a análise da tolerância das plantas ao Al, esteve significativamente associado com os teores de nutrientes absorvidos, evidenciando que o desenvolvimento das raízes na presença do Al^{3+} em solução afetou diretamente a absorção dos nutrientes.

Gordin et al. (2013), avaliando o crescimento inicial de plântulas de pinhão-mansó na presença de cinco concentrações de alumínio (0,5,10,15 e 20 mmol L⁻¹) na água de irrigação, observaram que a massa fresca da parte aérea apresentou correlação positiva e significativa com todas as características do sistema radicular, reafirmando os efeitos intrínsecos do Al³⁺ sobre o metabolismo vegetal, onde genótipos sensíveis apresentaram menor desenvolvimento radicular e conseqüentemente baixo aproveitamento dos nutrientes no meio de cultivo, refletindo em menor acúmulo de massa na parte aérea.

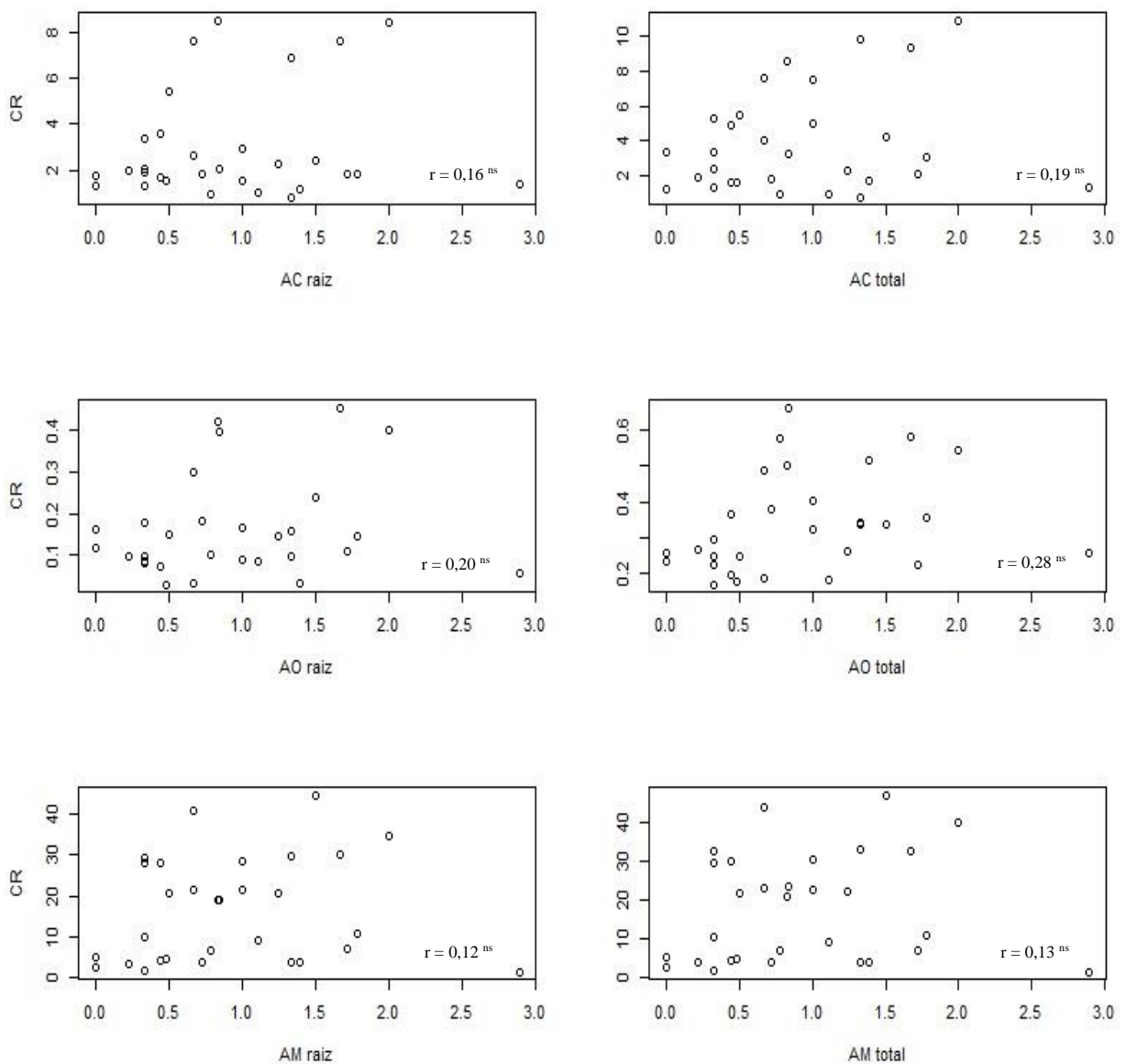


Figura 17. Correlação entre o crescimento radicular e concentração dos ácidos orgânicos no tecido radicular e nos totais de ácidos orgânicos.

5 CONCLUSÕES

- a) o método instrumental de análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi eficiente para discriminar e para quantificar os teores dos ácidos cítrico, málico e oxálico no tecido radicular e exsudados na solução;
- b) a variedade RB928064 de cana-de-açúcar produziu maior quantidade de ácidos cítrico, málico e oxálico do que a variedade RB855156 e ambas as variedades produziram AOs na ausência do Al^{3+} ; a produção de ácido cítrico pela variedade RB928064 foi induzida à partir da concentração de $1500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Al^{3+} ; a produção de ácidos málico e oxálico não foi induzida pelo aumento estresse por Al^{3+} e foi considerada uma característica estritamente varietal;
- c) a maior proporção (57% a 94%) dos teores de AOs produzidos pelas variedades de cana-de-açúcar se manteve no tecido radicular, com exceção da variedade RB 855156 que exsudou 69% do total de ácido oxálico produzido;
- d) o crescimento radicular da variedade RB928064 não foi alterado pelo estresse crescente por Al^{3+} ; houve diminuição do crescimento radicular da variedade RB855156 na concentração de $1500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Al^{3+} .

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABICHEQUER, A. D., BOHNEN, H. , ANGHINONI, I. Absorção, translocação e utilização de fósforo por variedades de trigo submetidas à toxidez de alumínio. **R. Bras. Ci. Solo**, 27:373-378, 2003.

ABREU JR., C.H.; MURAOKA, T.; LAVORANTE, A.F. Relationship between acidity and chemical properties of Brazilian soils. **Scientia Agricola**, v.60, n.2, p.337-343, 2003.

ABREU, Magno Luiz de et al. Crescimento e produtividade de cana-de-açúcar em função da disponibilidade hídrica dos Tabuleiros Costeiros de Alagoas. **Bragantia**, [s.l.], v. 72, n. 3, p.262-270, 2013.

ADELEKE, R.; NWANGBURUKA, C.; OBOIRIEN, B. Origins, roles and fate of organic acids in soils: a review. **South African Journal of Botany**. Vol. 108, Pag. 393-406, January 2017.

ADORNO, Maria Angela Tallarico; HIRASAWA, Julia S.; VARESCHE, Maria Bernadete Amâncio. Development and Validation of Two Methods to Quantify Volatile Acids (C2-C6) by GC/FID: Headspace (Automatic and Manual) and Liquid-Liquid Extraction (LLE). **American Journal Of Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 05, n. 07, p.406-414, 2014.

ALVAREZ, I.A.; CASTRO, P.R. DE C. E; NOGUEIRA, M.C.S. Crescimento de raízes de cana crua e queimada em dois ciclos. **Scientia Agricola**, v.57, n.4, p.653-659, 2000.

ANDRADE, F. V. et al . Adição de ácidos orgânicos e húmicos em Latossolos e adsorção de fosfato. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**, Viçosa , v. 27, n. 6, p. 1003-1011, Dec. 2003.

ANDRADE, L.R.M.; IKEDA, M.; AMARAL, L.I.V.; ISHIZUKA, J. Organic acid metabolism and root excretion of malate in wheat cultivars under aluminum stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, 49, 55-60, 2011.

ANGELES, O.R., JOHNSON, S.E., BURESH, R.J. Soil solution sampling for organic acids in rice paddy soils. **Soil Science Society of America Journal** 70, 48–56, 2006.

ANOOP VM, BASU U, MCCAMMON MT, MCALISTER-HENN L, TAYLOR GJ. Modulation of Citrate Metabolism Alters Aluminum Tolerance in Yeast and Transgenic Canola Overexpressing a Mitochondrial Citrate Synthase. **Plant Physiol**, 132: 2205-2217, 2003.

AQUINO, Gisele Silva de et al. Sistema radicular e produtividade de soqueiras de cana-de-açúcar sob diferentes quantidades de palhada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s.l.], v. 50, n. 12, p.1150-1159, dez. 2015.

AZEVEDO, Ricardo Antunes de. O impacto de metais tóxicos na produtividade agrícola. **Agência FAPESP**, Disponível em: <http://agencia.fapesp.br/o-impacto-de-metais-toxicos-na-produtividade-agricola-/22617/> fev. 2016.

BALL-COELHO, B.; SAMPAIO, E.V.S.B.; TIESSEN, H.; STEWART, J.W.B. Root dynamic in plant ratoon crops of sugar cane. **Plant and Soil**, v.142, p.297-305, 1992.

BARBOSA, J. A.; LABUTO, G.; CARRILHO, E. N. V. M. **Characterization and use of magnetic nanomodified Activated Carbon for Organic Acids Sorption for Aqueous Medium**. In: 12o Encontro sobre Adsorção, 2018, Gramado. Anais do 12o Encontro Sobre Adsorção. Santa Maria, 2018.

BAZIRAMAKENGA, R., SIMARD, R.R., LEROUX, G.D. Determination of organic acids in soil extracts by ion chromatography. **Soil Biology and Biochemistry** 27, 349–356, 1995

BENEDETTI, E.L.; SANTIN, D.; BARROS, N.F.; PEREIRA, G.L.; MATINEZ, H.P.; NEVES, J.C.L. Alumínio estimula o crescimento radicular de erva-mate? **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v.37, n.90, p.139-147, abr./jun. 2017.

BENETT, C. G. S. et al. Qualidade e produtividade da cana planta e cana soca em função de doses e fontes de manganês. **Bioscience Journal, Uberlândia**, v. 28, n. 2, p. 198-205, 2012

BENETT, Cleiton Gredson Sabin et al. Produtividade e teores nutrientes na cultura da cana-de-açúcar após aplicação de manganês em cortes sucessivos. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, [s.l.], v. 21, n. 1, p.1-6, 2016.

BRACCINI, M.C.L.; MARTINEZ, H.E.P.; BRACCINI, A.L. Avaliação de linhagens de cafeeiros quanto à tolerância ao alumínio pelo método do papel-solução. **Bragantia**, v.59, p.221-226, 2000a.

BRACCINI, M.C.L.; MARTINEZ, H.E.P.; SILVA, E.A.M.; BRACCINI, A.L.; SCAPIM, C.A. Crescimento da planta e coloração das raízes com hematoxilina como critérios de avaliação de genótipos de café quanto à tolerância à toxidez por alumínio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.24, p.59-68, 2000b.

CAMPOS, Leonardo José Motta et al. **Determinação de Ácidos Orgânicos em Exsudatos de Raízes de Milho Pela Técnica de HPLC**. XXIV CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, Florianópolis, set. 2002.

CARVALHO, Laércio A. de et al. Dependência espacial dos atributos físicos de três classes de solos cultivados com cana-de-açúcar sob colheita mecanizada. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, [s.l.], v. 15, n. 9, p.940-949, set. 2011.

CASSIANO, Neila Maria et al. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Quim. Nova**: Vol. 32, No. 4, 1021-1030, 2009, [], v. 32, n. 4, p.1021-1030, fev. 2009.

CASSOL, Daniela. **Produção, acúmulo e exsudação de ácidos orgânicos em *stylosanthes*, sob toxidez de alumínio**. Dissertação de Mestrado, p.51, Viçosa, 2012.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, 623-636, 2008.

COMETTI, N.N.; FURLANI, P.R.; RUIZ, H.R.; FERNANDES FILHO, E.I. Soluções nutritivas: formulações e aplicações. In: FERNANDES, M.S. (Ed.). **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa: **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, p.89-114. 2006.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar, primeiro levantamento Safra 2018/2019. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>. Acesso em: Outubro de 2018.

COOK, R. D. Detection of influential observation in linear regression. **Technometrics**, v. 19, n. 1, p. 15-18, 1975.

COSTA, M.C.G.; MAZZA, J.A.; VITTI, G.C.; JORGE, L.A. DE C. Distribuição radicular, estado nutricional e produção de colmos e de açúcar em soqueiras de dois cultivares de cana-de-açúcar em solos distintos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.31, p.1503-1514, 2007.

CRUSCIOL, Carlos Alexandre Costa et al. Effects of surface application of calcium-magnesium silicate and gypsum on soil fertility and sugarcane yield. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, [s.l.], v. 38, n. 6, p.1843-1854, dez. 2014.

CURY, Tadeu Nascimento; MARIA, Isabella Clerici de; BOLONHEZI, Denizart. Biomassa radicular da cultura de cana-de-açúcar em sistema convencional e plantio direto com e sem calcário. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, [s.l.], v. 38, n. 6, p.1929-1938, dez. 2014.

DALCHIAVON, Flávio Carlos et al. Relações da produtividade de cana-de-açúcar com atributos químicos de um Argissolo. **Revista de Ciências Agrárias**, [s.l.], v. 40, n. 4, p.756-769, dez. 2017.

DELHAIZE E, RYAN PR, RANDALL PJ. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. **Plant Physiology** 103: 695–702, 1993.

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

DEMATTE, J.L.I. Cultura da cana-de-açúcar: recuperação e manutenção da fertilidade dos solos. **Encarte Informações Agrônomicas Potafos**, n.111, p.1-24, 2005.

DINARDO-MIRANDA, Leila Luci et al. Reação de cultivares de cana-de-açúcar à broca do colmo. **Bragantia**, Campinas, v. 72, n. 1, p.29-34, fev. 2013.

ECHART, Cinara Lima; CAVALLI-MOLINA, Suzana. Fitotoxicidade do Alumínio: efeitos, mecanismo de tolerância e seu controle genético. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 31, n. 3, p.531-541, jun. 2001.

EVANS, H. The root system of sugarcane: an evaluation of its salient features. **Indian Journal of Sugarcane Research Development**, v.8, p.161–171, 1964.

FAGERIA, Nand Kumar. Efeito da calagem na produção de arroz, feijão, milho e soja em solo de cerrado. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 36, n. 11, p.1419-1424, nov. 2001.

FAMOSO, A. N. et al. Development of a Novel Aluminum Tolerance Phenotyping Platform Used for Comparisons of Cereal Aluminum Tolerance and Investigations into Rice Aluminum Tolerance Mechanisms. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 153, n. 4, p.1678-1691, 10 jun. 2010.

FERNANDES, M.S. Nutrição Mineral de Plantas. **Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, p.375-418. 2006.

FERREIRA, R. DE P.; MOREIRA, A.; RASSINI, J.B. Toxidez de alumínio em culturas anuais. São Carlos: **Embrapa Pecuária Sudeste**, Documentos 63, 35p, 2006.

FERRO, M.I.T.; BARROS, N.M. DE; DABBAS, K.M.; LAIA, M.L. DE; KUPPER, K.C; MORAES, V.A. DE; OLIVEIRA, J.C.F. DE; FERRO, J.A.; ZINGARETTI, S.M. Análise do perfil de expressão dos genes da cana-de-açúcar envolvidos na interação com *Leifsonia xyli* subsp: *xyli*. **Summa Phytopathologica**, v.33, n.2, p.157-166, 2007.

FOY, C.D. Effects of aluminum on plant growth. In: Carson, E.W. (Ed.). The plant root and its environment. **Charlottesville: University Press of Virginia**, p. 601-642, 1974.

FOY, C.D. General principles involved in screening plants for aluminum and manganese tolerance. In: WRIGHT, M., (Ed.) **Plant adaptation to mineral + stress in problem soils**. New York, Cornell University, p.65-72, 1976.

FOY, C.D. Plant adaptation to acid, aluminum - toxic soils. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v.19, n.7/12, p.959-987, 1988.

FREITAS, F.A. DE; KOOP, M.M.; SOUZA, R.O. DE; ZIMMER, P.D.; CARVALHO, F.I.F. DE; OLIVEIRA, A.C. DE Absorção de P, Mg, Ca e K e tolerância de genótipos de arroz submetidos a estresse por alumínio em sistemas hidropônicos. **Ciência Rural**, v.36, n.1, p.72-79, 2006.

GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. Plant propagation by tissue culture. **Exegetics Ltd.**, Eversley, Basingstoke, 39-71, 1984.

GONÇALVES, José Francisco de Carvalho et al. Aluminum Effect on Organic Acid Production and Accumulation in Sorghum. **Journal Of Plant Nutrition**, [s.l.], v. 28, n. 3, p.507-520, 16 mar. 2005.

GONÇALVES, José Francisco de Carvalho. **Produção de ácidos orgânicos e tolerância de sorgo à toxicidade do alumínio**. Dissertação de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Viçosa, 109p, 1998.

GORDIN, C.R.B.; MARQUES, R.F., ROSA, R.J.M.; DOS SANTOS, A.M.; SCALON, S.D.P.Q. Emergência de plântulas e crescimento inicial do pinhão manso exposto a alumínio. **Semina: Ciências Agrárias**, v.34, n.1, p.147-156, 2013.

GRIBAUDO, I.; FRONDA, A. L'ambientamento delle piante frutticole micropropagate. **Rivista di Frutticoltura**, v.1, p.75-79, 1993.

GUPPY, C.N.; MENZIES, N.W.; MOODY, P.W. & BLAMEY, F.P.C. Competitive sorption reactions between phosphorus and organic matter in soil: A review. Austr. **J. Soil Res.**, 43:189-202, 2005.

HAPPEL O, HARMS K, SEUBERT A. Synthesis and Structural Characterization of Two Aluminium Malate Complexes. **Z Anorg Allg Chem**; 633: 1952-1958, 2007.

HAYNES, R.J.; MOKOLOBATE, M.S. Amelioration of Al toxicity and P deficiency in acid soils by additions of organic residues: a critical review of the phenomenon and the mechanisms involved. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v.59, p.47-63, 2001.

HETHERINGTON, S.J.; ASHER, C.J.; BLAMEY, F.P.C. Comparative tolerance of sugarcane, navybean, soybean and maize to aluminum toxicity. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.39, p.171-176, 1988.

HINSINGER P. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. **Plant and Soil** 237: 173–195, 2001.

HOFFMAN, H.P.; SANTOS, E.G.D.; BASSINELLO, A.I.; VIEIRA, M.A.S. Variedades RB de cana-de-açúcar. 1. **Ed. Araras: CCA/UFSCar**, 30p, 2008.

HUE, N.; VEJA, S.; SILVA, J.A. Manganese Toxicity in a Hawaiian Oxisol Affected by Soil pH and Organic Amendments, **Soil Science Society of America Journal**, 65:153-160, January 2001.

JIANBO, S.; ZHANG, F.; DARU M. Determination of organic acid in root exudates by high liquid performance chromatography: development and assessment of chromatographic conditions. **Pedosphere**, v. 8, n. 2, p. 97-104, 1998.

JIANBO, S.; ZHANG, F.; DARU M. Determination of organic acid in root exudates by high liquid performance chromatography: influence of several testing conditions. **Pedosphere**, v. 9, n. 1, p. 45-52, 1999a.

JIANBO, S.; ZHANG, F.; DARU, M. Determination of organic acid in root exudates by high liquid performance chromatography: effects of interfering factors. **Pedosphere**, v. 9, n. 2, p. 97-104, 1999b.

JONES DL. Organic acids in the rhizosphere: a critical review. **Plant and Soil** 205: 25–44, 1998.

JONES, D.L.; DENNIS, P.G.; OWEN, A.G. & van HEES, P.A.W. Organic acid behavior in soils – Misconceptions and knowledge gaps. **Plant Soil**, 248:31-41, 2003.

KENNEDY, C.W.; SMITH JR., W.C.; BA, M.T. Root cation exchange capacity of cotton cultivars in relation to aluminum toxicity. **Journal of Plant Nutrition**, v.9, p.1123-1133, 1986.

KOCHIAN L, PIÑEROS MA, LIU J, MAGALHAES JV. Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum resistance. **Annual Review of Plant Biology** 66: 571–598, 2015.

KOCHIAN, L.V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.46, p.237-260, 1995.

KOCHIAN, L.V.; HOEKENGA, O.A.; PIÑEROS, M..A. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, v.55, p.459-493, 2004.

KOHLHEPP, Gerd. Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. **Estudos Avançados**, [s.l.], v. 24, n. 68, p.223-253, 2010.

KOPITTKE, Peter M. Role of phytohormones in aluminium rhizotoxicity. **Plant, Cell & Environment**, [s.l.], v. 39, n. 10, p.2319-2328, 12 ago. 2016.

LANDELL, M. G. A et al.. Sistema de multiplicação de muda de cana de açúcar com o uso de mudas pré-brotadas (MPB) oriundas de gemas individualizadas. **IAC – Instituto Agrônomo de Campinas**; Documento 109, 2012.

LANDELL, M.G. DE A.; PRADO, H.; VASCONCELOS, A.C.M.; PERECIN, D.; ROSSETTO, R.; BIDÓIA, M.A.P.; XAVIER, M.A. Oxisol subsurface chemical attributes related to sugarcane productivity. **Scientia Agricola**, v.60, p.741-745, 2003.

LEITE, Glauber Henrique Pereira. Desenvolvimento e produtividade da cana-de-açúcar após aplicação de reguladores vegetais em meio de safra. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 1, p.129-138, jan./mar. 2011.

MARIANO, E.D.; JORGE, R.A.; KELTJENS, W.G.; MENOSSE, M. Metabolism and root exudation of organic acid anions under aluminium stress. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, p. 157, 2005.

MARINHO, M.L.; ARAÚJO FILHO, J.T. Calibração do alumínio no solo para cana-de-açúcar em Alagoas. **Saccharum**, v.6, n.26, p.18-23, 1983.

MARTINELLI, C. A. et al. Interferência de plantas daninhas na cultura da cana de açúcar e algumas práticas de controle. **R. Ci. Elet. Agron.**, v. 10, n. 20, p. 1 6, 2011.

MARTINS, C. A., SOUZA SOBRINHO, F., GOMES, F. T.; CÓSER, A. C., MACHADO, V. S., FERNANDES, N. R. A., ALVES, F. C. T., ALVES, D. B., ALMEIDA, M. Resposta da *Brachiaria brizantha* a diferentes concentrações de alumínio e valores de pH em solução nutritiva. In: **FERTBIO**, 27., Bonito, 2006.

MARTINS, N., ALVES. S. G., ANDRADE, P. B., VALENTÃO, P., ROMANA, A. Changes on organic acid secretion and accumulation in *Plantago Almogravensis* Franco and *Plantago algarbiensis* Samp. under Aluminum stress. **Plant Science**, 198, p. 1– 6, 2013.

MATTIELLO, E.M.; PEREIRA, M.G.; ZONTA, E.; MAURI, J.; MATIELLO, J.D; MEIRELES, P.G.; SILVA, I.R. DA Produção de matéria seca, crescimento radicular e absorção de cálcio, fósforo e alumínio por *Coffea canephora* e *Coffea arábica* sob influência da atividade do alumínio em solução. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, p.425-434, 2008.

MAULE, R.F.; MAZZA, J.A.; MARTHA JR., G.B. Produtividade agrícola de cultivares de cana-de-açúcar em diferentes solos e épocas de colheita. **Scientia Agricola**, v.58, p.295-301, 2001.

MELNITCHOUCK, A., LEINWEBE, P., ECKHARDT, K.U., BEESE, R. Qualitative differences between day- and night-time rhizodeposition in maize (*Zea mays* L.) as investigated by pyrolysis-field ionization mass spectrometry. **Soil Biology and Biochemistry** 37,155–162, 2005.

MENDES, T. P. et al. Aluminum toxicity effect on the initial growth of yacon plantlets. **Revista Ceres**, [s.l.], v. 65, n. 2, p.120-126, mar. 2018.

MENOSSO, Orival Gastão et al. Crescimento radicular e produção de ácidos orgânicos em cultivares de soja com diferentes tolerâncias ao alumínio. **Pesq. Agropec. Bras.:** Pesq. agropec. bras., Brasília, v. 36, n. 11, p. 1339-1345, nov. 2001, Brasília, v. 36, n. 11, p.1339-1345, nov. 2001.

MIYASAKA, S. C. et al. Mechanism of Aluminum Tolerance in Snapbeans: Root Exudation of Citric Acid. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 96, n. 3, p.737-743, 1 jul. 1991.

MOLIN, José Paulo; VEIGA, João Paulo Soto. Spatial variability of sugarcane row gaps: measurement and mapping. **Ciência e Agrotecnologia**, [s.l.], v. 40, n. 3, p.347-355, jun. 2016.

NOLLA, A.; SCHLINDWEIN, J.A.; ANGHINONI, I. Crescimento, morfologia e liberação de compostos orgânicos por plântulas de soja em função da atividade de alumínio na solução do solo de campo natural. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.1, p.97-101, jan./fev.2007.

NORONHA ALO, GUIMARÃES L, DUARTE HA. Structural and Thermodynamic Analysis of the First Mononuclear Aqueous Aluminum Citrate Complex Using DFT Calculations. **J Chem Theory Comput**, 3: 930-937, 2007.

OLIVEIRA, Ana P. P. de et al. Sistemas de colheita da cana-de-açúcar: Conhecimento atual sobre modificações em atributos de solos de tabuleiro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**: v.18, n.9, p.939-947, 2014, Campina Grande, v. 18, n. 9, p.939-947, abr. 2014.

OLIVEIRA, M. DE S. **Tolerância de variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum sp.*) à toxidez por alumínio em solução**. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-graduação em Agricultura e Ambiente, UFSCar, 109p, 2012.

PIMENTA, Lucas Smith. **Estresse por alumínio em cultivares de cana-de-açúcar: crescimento radicular e atividade de enzimas antioxidantes**. Dissertação de Mestrado,

Programa de pós-graduação em produção vegetal e bioprocessos associados, UFSCar, 77p, 2017.

POSCHENRIEDER C, GUNSE B, CORRALES I, BARCELÓ J. A glance into aluminum toxicity and resistance in plants. **Sci Total Environ**; 400: 356-368, 2008.

POSCHENRIEDER, Charlotte et al. A glance into Aluminum toxicity and resistance in plants. **Science Of The Total Environment**, [s.l.], v. 400, n. 1-3, p.356-368, ago. 2008.

PRADO, H. do Ambientes de produção de cana-de-açúcar na região centro-sul do Brasil. **Encarte Informações Agrônomicas Potafos**, n.110, p.12-17, 2005.

PRADO, H. Pedologia fácil: aplicações em solos tropicais. Piracicaba: **O Autor**, 5. ed. 271 p. 2016.

RAIJ, B. van.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo. 2. ed. Campinas: **Instituto Agrônomico/Fundação IAC**, 285p., (Boletim Técnico, 100), 1996.

RAMPIM, Leandro; LANA, Maria do Carmo. MECANISMO DE TOLERÂNCIA INTERNA DAS PLANTAS AO ALUMÍNIO. **Colloquium Agrariae**, [s.l.], v. 9, n. 2, p.72-89, Associação Prudentina de Educação e Cultura (APEC). 21 dez. 2013.

REATTO, Adriana; PASSOS, Renato Ferreira. Soil as an integrating factor between environmental components and agricultural production. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s.l.], v. 51, n. 9, p.11-19, set. 2016.

REZAEI, F.; GHANATI, F.; BEHMANESH, M.. Antioxidant activity and expression of catalase gene of (*Eustoma grandiflorum* L) in response to boron and aluminum. **South African Journal Of Botany**, [s.l.], v. 84, p.13-18, jan. 2013.

RIDESIA – Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro. **Catálogo nacional de variedades “RB” de cana-de-açúcar**. Curitiba, 2015.

RINCÓN, M.; GONZALES, R. G. Aluminum partitioning intact roots of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. **Plant Physiology**, Rockville, v.99, n.3, p.1021-1028, 1992.

RODRIGUES, Marta. **Contributo da exsudação de ácidos orgânicos para a tolerância ao alumínio em duas variedades de trigo da madeira**. Dissertação de Mestrado - Universidade da Madeira, 2015.

ROSSIELLO, R.O.P.; JACOB NETTO, J. Toxidez de alumínio em plantas: novos enfoques para um velho problema. In: Fernandes, M.S. (Ed.). **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.375-418, 2006.

SÁ, MARCOS AURÉLIO CAROLINO DE ET AL. Qualidade física do solo e produtividade da cana-de-açúcar com uso da escarificação entre linhas de plantio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s.l.], v. 51, n. 9, p.1610-1622, set. 2016.

SALDANHA, E.C.M.; ROCHA, A.T. DA; OLIVEIRA, E.C.A. DE; NASCIMENTO, C.W.A. DO; FREIRE, F.J. Uso do gesso mineral em Latossolo cultivado com cana-de-açúcar. **Caatinga**, v.20, n.1, 2007.

SAMPAIO, E.V.S.B.; SALCEDO, J.H.; CAVALCANTI, F.J.A. Dinâmica de nutrientes em cana-de-açúcar: III. Conteúdo de nutrientes e distribuição do sistema radicular no solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.22, p.425-431, 1987.

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

SILVA, F. A . M.; NOGUEIRA, F. D.; RIBEIRO, L. L.; GODINHO, A.; GUIMARÃES, P. T. G. Exsudação de ácidos orgânicos em rizosfera de plantas daninhas. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 19, n. 2, p. 193-196, 2001.

SILVA, F.A.M.; NOGUEIRA, F.D.; RIBEIRO, L.L.; GUIMARÃES, P.T.G.; GODINHO, A. Determinação de ácidos orgânicos na rizosfera de cafeeiro por Cromatografia Líquida De Alta

Eficiência (HPLC). In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 2000, Poços de Caldas. **Resumos expandidos**, Poços de Caldas, 2000.

SILVA, Francisca Alcivania de Melo et al. DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS NA RIZOSFERA DE CAFEIEIRO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC). **Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, [], p.1396-1399. 2000.

SILVA, I.R.; SMYTH, T.J.; BARROS, N.F.; NOVAIS, R.F. Physiological aspects of aluminum toxicity and tolerance in plants. In: Alvarez V., V.H.; Schaefer, C.E.G.R.; Barros, N.F. de; Mello, J.W.V de; Costa, L.M. da. Tópicos em Ciência do Solo, v.II, p.277-335, 2002.

SILVA, Marcelo de A. et al. Potencial produtivo da cana-de-açúcar sob irrigação por gotejamento em função de variedades e ciclos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, [s.l.], v. 18, n. 3, p.241-249, mar. 2014.

SILVA, V.A. **Potássio em solos de regiões cafeeiras de Minas Gerais: Formas e cinética de liberação por ácidos orgânicos**. Lavras: UFLA, 1999. 104p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, 1999.

SINGH, Shweta et al. Toxicity of aluminium on various levels of plant cells and organism: A review. **Environmental And Experimental Botany**, [s.l.], v. 137, p.177-193, maio 2017.

SMITH, D.M., INMAN-BAMBER, N.G.; THORBURN, P.J. Growth and function of the sugarcane root system. **Field Crops Research**, v.92, p.169–183, 2005.

STROBEL, B.W. Influence of vegetation on low-molecular-weight carboxylic acids in soil solution—a review. **Geoderma** 99, 169–198, 2001.

SOBRAL, A.F. DE; GUIMARÃES, V.O.DA S. Relação entre a toxidez do alumínio e a produção de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.27, n.2, p.287-292, 1992.

TAN, Shiyong et al. The effect of organic acids from tomato root exudates on rhizosphere colonization of *Bacillus amyloliquefaciens* T-5. **Applied Soil Ecology**, [s.l.], v. 64, p.15-22, fev. 2013.

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

TORQUATO, S.A. Cana-de-açúcar para indústria: o quanto vai precisar crescer. **Análise e Indicadores do Agronegócio**, v.1, n.10, 2006.

UNICA – **União da Indústria de Cana-de-açúcar**. Disponível em: www.unicadata.com.br. Acesso em: 18/11/2018.

VASCONCELOS, A.C.M.; GARCIA, J.C. Desenvolvimento radicular da cana-de-açúcar. **Encarte Informações Agronômicas Potafos**, n.110, p.1-5, 2005.

VASCONCELOS, S.S.; ROSSIELLO, R.O.P.; JACOB-NETO, J. Parâmetros morfológicos para estabelecer tolerância diferencial à toxicidade de alumínio em cultivares de arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.3, p.357-363, 2002.

VIANA, A.R.; ANDRADE, L.A.B.; JUNQUEIRA NETO, A. Efeito da calagem e tolerância a acidez em cem cultivares de cana-de-açúcar: Estudo preliminar. **Ciência e Prática**, v.7, n.2, p.205-215, 1983.

VIANA, Ronaldo da Silva et al. Parâmetros tecnológicos e produtivos da cana-de-açúcar quando submetida à aplicação de maturadores químicos no início de safra. **Revista Brasileira de Herbicidas**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.67-75, 10 mar. 2017.

WATHAISONG, K.; ROBIN, A.; MARTIN, A.; CLAIROTTE, M.; VILLENEUVE, M.; PASSARD, C. Quantification of organic P and low-molecular-weight organic acids in ferralsol soil extracts by ion chromatography. **Geoderma**, v. 257-258, p. 94-101. 2015.

WRIGHT, R.J. Soil aluminum toxicity and plant growth. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.20, p.1479-1497, 1989.

XING, ZHE; DU, CHANGWEN; TIAN, KANG; TALANTA ET AL. Application of FTIR-PAS and Raman spectroscopies for the determination of organic matter in farmland soils. **Talanta**, Volume: 158, Páginas: 262-269, Publicado: SEP 1 2016.

YANG, J. L.; ZHENG, S. J.; HE, Y. F.; MATSUMOTO, H. Aluminum resistance requires resistance to acid stress: a case study with spinach that exudes oxalato rapidly when exposed to Al stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 414, p. 1197-1203, 2005.

YUAN, Jun et al. Organic acids from root exudates of banana help root colonization of PGPR strain *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.1-8, 24 ago. 2015.