

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA
E BIOLOGIA MOLECULAR

MARIANE DE SOUZA OLIVEIRA

**ESTUDOS FISIOLÓGICOS, NUTRICIONAIS E MOLECULARES DE
VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* spp.) SOB
ESTRESSE POR ALUMÍNIO**

São Carlos

2018.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA
E BIOLOGIA MOLECULAR

MARIANE DE SOUZA OLIVEIRA

**ESTUDOS FISIOLÓGICOS, NUTRICIONAIS E MOLECULARES DE
VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* spp.) SOB
ESTRESSE POR ALUMÍNIO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientador: Profa. Dra. Andrea Soares da Costa Fuentes - DGE/CCBS/UFSCar

Co-orientador: Prof. Dr. Marcio Roberto Soares – DRNPA/CCA/UFSCar

São Carlos

2018.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação


Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Mariane de Souza Oliveira, realizada em 21/09/2018:



Prof. Dra. Andrea Soares da Costa Fuentes
UFSCar



Prof. Dr. Marcio Roberto Soares
UFSCar



Prof. Dr. José Carlos Casagrande
UFSCar



Prof. Dr. Roberto Giacomini Chapola
UFSCar



Prof. Dra. Helaine Carrer
USP



Prof. Dra. Sônia Marli Zingaretti
UNAERP

*Aos meus amados e carinhosos pais,
Roberto e Helena, por todo amor e apoio sem fim,
DEDICO*

*À Sofia, luz da minha vida,
OFEREÇO*

“...Vá para onde as águas são mais profundas...”

Lucas 5:1-11

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar presente na minha vida em todos os momentos, por me dar força, coragem e saúde para concluir essa importante fase da minha vida.

Agradeço imensamente aos meus amados pais, Roberto e Helena. Não tenho palavras para descrever minha gratidão e o enorme amor que sinto por vocês. Sem dúvida nenhuma esse trabalho não teria se concluído sem todo o apoio e ajuda que me deram, cuidando de mim, da minha filha, da minha casa e da minha vida, sempre me passando muita calma e amor, me dando a certeza que tudo ia dar certo.

Ao meu querido esposo Eder, por todo o amor, paciência, compreensão e carinho. Por cuidar da nossa família com tanto amor e dedicação.

À minha amada filha Sofia, meu bem mais precioso, que me mostrou que eu nada sabia sobre estar exausta, mas que me fez entender o verdadeiro significado de amar outro ser, da compreensão, da paciência e da fé. Obrigada por chegar na minha vida e enche-la de luz e amor. Tudo sempre será por você.

À minha filhinha de quatro patas Pink, por tornar os estudos mais agradáveis com seu corpinho quente ao meu lado, sempre me alegrando com lambeijos.

À Profa. Dra. Andréa Soares da Costa Fuentes, por me aceitar como aluna e pela atenciosa orientação ao longo desses anos. Obrigada pela compreensão, pela amizade e principalmente pela paciência. Você tornou essa jornada tão turbulenta mais fácil de seguir.

Ao meu co-orientador e amigo Prof. Dr. Márcio Roberto Soares pela orientação, pela amizade sempre presente e acolhedora, conselhos nos momentos difíceis, críticas sempre construtivas e por compartilhar todo seu conhecimento. Desde a graduação sendo para mim um exemplo de profissionalismo, conduta e caráter. Agradeço também ao Grupo de Estudos e Pesquisa em Fertilidade do Solo (GEFERT), dirigido por ele, formado por pessoas sempre dispostas a ajudar. Muito obrigada por toda a colaboração com o solo e ao longo do experimento em casa de vegetação.

Ao programa de pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da UFSCar por todo o apoio e compreensão, e a secretária Ivanildes, sempre atenciosa e prestativa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – processo 2013/06318-2) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva, por tão gentilmente ceder seu laboratório durante todo o experimento.

Ao Prof. Dr. José Carlos Casagrande, por disponibilizar o laboratório para as muitas análises de solo e de tecidos vegetais. Obrigada aos queridos funcionários do Laboratório de Fertilidade de Solos (CCA/UFSCar), especialmente ao João Consonni por toda a ajuda com as análises, e a queridíssima Larissa Pastorello, pelas conversas e risadas na hora do almoço, se tornando uma grande amiga.

À Profa. Dra. Monalisa Sampaio Carneiro, por disponibilizar seu laboratório para o armazenamento das amostras e pelo equipamento de Analisador de Gás por Infravermelho para a realização das análises de trocas gasosas. Muito obrigada também à sua técnica de laboratório, Isabella Valadão, pela disponibilidade em ensinar o manuseio do IRGA.

Ao Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar, pelo fornecimento das variedades RB utilizadas no experimento. Obrigada especialmente aos técnicos Luiz Fernando e Sandro Ferrarez, e a todos os funcionários da área agrícola pela disponibilidade e prontidão no fornecimento do material vegetal.

À minha amada amiga gaúcha Vanessa Schneider, pela importante ajuda com as análises moleculares, não sei o que eu faria sem você. Obrigada por todo o apoio emocional, pelas conversas, por dividir as alegrias, angústias e tristezas. Desejo a você todo o sucesso do mundo e um caminho cheio de luz.

À querida técnica e amiga de laboratório, Daniela, por toda a orientação e ajuda.

À Juliana Gilbert Pessoa, pela animação em fazer as análises de ácidos orgânicos, sempre disposta a ajudar em cada etapa. Apesar de não ter dado certo, não foi por falta de tentativas.

À Profa. Dra. Elma Carrilho, por disponibilizar seu laboratório e equipamentos, e à sua aluna Rafaela, pelo auxílio na realização das análises de ácidos orgânicos.

Muitas pessoas passaram pela minha vida durante essa trajetória, e cada uma deixou uma centelha de alegria, me dando coragem, força ou mesmo um ombro amigo.

A todos que estiveram presente durante a realização desse trabalho, seja na vida acadêmica ou pessoal, meu muitíssimo obrigada!

ESTUDOS DE EXPRESSÃO GÊNICA UTILIZANDO VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum spp.*) TOLERANTES AO ALUMÍNIO

Resumo

A cana-de-açúcar é uma cultura de importância global e vem se expandindo para áreas com solos de alto teor de alumínio (Al) trocável, fator limitante para o desenvolvimento das culturas em solos ácidos. O estudo do comportamento fisiológico e nutricional da cana-de-açúcar, em conjunto com padrões de expressão gênica em resposta ao estresse pelo Al, pode fornecer uma base para estratégias eficazes em aumentar a produtividade da cultura em solos ácidos. Variedades de cana-de-açúcar foram submetidas à avaliação de parâmetros fisiológicos, especificamente teor de nutrientes, Al em folhas e raízes e também foram avaliadas em relação a expressão dos genes MDH, SDH, ambos relacionados à produção de ácidos orgânicos, e o gene SOD, relacionado ao estresse oxidativo. O Al afetou o comportamento das variedades em relação aos parâmetros estudados. A RB928064 apresentou o maior decréscimo no teor nutricional quando submetida ao estresse por Al, maior teor do metal nas folhas e diminuição na taxa de transpiração e condutância estomática. A variedade RB867515 foi a mais resiliente em relação ao teor de nutrientes, com pouca variação entre os tratamentos. Apresentou maior teor de Al nas raízes, e juntamente com a RB935744, não sofreu variação na condutância estomática e transpiração. Para os genes estudados, na RB928034 ocorreu maior expressão do MDH nas folhas e SOD nas folhas e raízes. Na RB935744, SDH foi mais expresso nas folhas e MDH e SOD nas raízes, enquanto que para a RB867515 todos os genes foram mais expressos nas raízes. A ocorrência de repostas distintas ao Al entre as variedades pode fornecer estratégias de manejo diferenciadas, procurando alocar as variedades menos suscetíveis nos locais mais propensos à toxidez por Al. Os resultados colaboram para o desenvolvimento de variedades de cana-de-açúcar tolerantes ao Al, visando a expressão de todo seu potencial genético com a menor demanda de insumos.

Abstract

Sugarcane is a crop of global importance and has been expanding to areas with soils containing high levels of exchangeable aluminum (Al), which is a limiting factor for crop development in acidic soils. The study of the sugarcane physiological and nutritional behavior, together with patterns of gene expression in response to Al stress, may provide a basis for effective strategies to increase crop productivity in acid soils. Sugarcane varieties were evaluated for physiological parameters, nutrient and Al content in leaves and roots and gene expression by qPCR, with the genes MDH, SDH, both related to the production of organic acids, and SOD, related to the oxidative stress. Al affected the varieties behavior in relation to the studied parameters. The RB928064 showed the highest decrease in nutritional content when submitted to Al stress, higher leaf metal content and decreased transpiration rate and stomatal conductance. The variety RB867515 was the most resilient in relation to nutrient content, with little variation between treatments. It presented higher Al content in the roots, and like the RB935744, did not suffer variation in stomatal conductance and transpiration. For the studied genes, in RB928034 occurred greater MDH expression in leaves and SOD in leaves and roots. In RB935744, SDH was more expressed in leaves and MDH and SOD in roots, whereas for RB867515 all genes were more expressed in the roots. The occurrence of distinct Al responses among the varieties may provide different management strategies, seeking to allocate the less susceptible varieties in the places with Al toxicity. The results contribute to the development of Al tolerant sugarcane varieties, aiming the expression of all its genetic potential with the lower demand of inputs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição relativa das espécies de Al na solução do solo em função do pH.....	24
Figura 2. Distribuição do sistema radicular de variedades de cana-de-açúcar aos 16,5 meses de idade, no ciclo de cana-planta, em um LATOSSOLO VERMELHO com caráter álico.....	32
Figura 3. Ápices radiculares de variedades de cana-de-açúcar.....	33
Figura 4. Experimento em casa-de-vegetação.....	45
Figura 5. Esquema experimental com a disposição de colunas preenchidas com Latossolo com alta saturação por alumínio onde foram cultivadas três variedades de cana-de-açúcar.....	46
Figura 6. Toletes pré-germinados.....	47
Figura 7. Crescimento das variedades de cana-de-açúcar em casa-de-vegetação durante o experimento.....	49
Figura 8. Experimento em solução nutritiva.....	51
Figura 9. Acúmulo de nitrogênio, fósforo e potássio em cana-de-açúcar cultivada em LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO Distrófico, em tratamento controle e com estresse por Al.....	66
Figura 10. Acúmulo de magnésio, cálcio e enxofre em cana-de-açúcar cultivada em LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO Distrófico, em tratamento controle e com estresse pelo Al.....	67
Figura 11. Média do acúmulo de Al em variedades de cana-de-açúcar em LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO distrófico.....	70
Figura 12. Plantas de cana-de-açúcar após a coleta para as análises finais. Comparação dos tratamentos com (+ Al) e sem (-Al) a presença de alumínio.....	73
Figura 13. Danos causados pelo Al às raízes de cana-de-açúcar.....	74
Figura 14. Parâmetros fisiológicos analisados em folhas de variedades de cana-de-açúcar em LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO distrófico em tratamento controle e com estresse por Al.....	76
Figura 15. Teores de clorofilas em variedades de cana-de-açúcar em LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO distrófico em tratamento testemunha e com estresse por Al.....	78

Figura 16. Expressão de genes de variedades de cana-de-açúcar em solução nutritiva com Al.....80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados preliminares da análise química e física de LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO Distrófico, coletado na Usina Santa Lúcia em Araras/SP...	42
Tabela 2. Análise Química de LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO Distrófico após incubação com calcário.....	43
Tabela 3. Análise Química de LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO Distrófico após incubação com cloreto de alumínio.....	44
Tabela 4. Genes selecionados para o estudo de expressão gênica em variedades de cana-de-açúcar.....	55
Tabela 5. Quadro de análise de variância de três variedades de cana-de-açúcar cultivadas em LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO Distrófico, no tratamento controle e com adição de cloreto de alumínio, em relação ao teor nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre nas raízes.....	61
Tabela 6. Médias dos teores de N, P, K, Mg e S nas raízes de variedades de cana-de-açúcar cultivadas em LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO Distrófico, em relação aos fatores tratamento (controle e Al) e variedades.....	62
Tabela 7. Médias dos teores de Ca nas raízes de variedades de cana-de-açúcar cultivadas em LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO Distrófico, em relação ao fator tratamento (controle e Al) e fator variedades isoladamente.....	63
Tabela 8. Quadro de análise de variância de três variedades de cana-de-açúcar cultivadas em LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO Distrófico, no tratamento controle e com adição de cloreto de alumínio, em relação ao teor nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre nas folhas.....	64
Tabela 9. Médias dos teores de N, P, K, Mg e S nas folhas de variedades de cana-de-açúcar cultivadas em LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO Distrófico, em relação aos fatores tratamento (controle e Al) e variedades.....	64
Tabela 10. Médias dos teores de Ca, Mg e S nas folhas de variedades de cana-de-açúcar cultivadas em LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO Distrófico, em relação ao fator tratamento (controle e Al) e fator variedades isoladamente.....	65
Tabela 11. Quadro de análise de variância de três variedades de cana-de-açúcar cultivadas em LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO Distrófico, no tratamento controle e com adição de cloreto de alumínio, em relação ao teor de Al nas raízes e folhas.....	69

Tabela 12. Médias dos teores de Al em raízes e folhas de variedades de cana-de-açúcar cultivadas em LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO Distrófico, em relação ao fator tratamento (controle e Al) e fator variedades isoladamente.....	69
Tabela 13. Quadro de análise de variância de três variedades de cana-de-açúcar submetidas à presença e ausência de alumínio em solução nutritiva.....	71
Tabela 14. Médias dos teores de alumínio nas raízes de cana-de-açúcar cultivadas em solução nutritiva, no tratamento controle e com adição de cloreto de alumínio.....	71
Tabela 15. Quadro de análise de variância de trocas gasosas em três variedades de cana-de-açúcar cultivadas em LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO Distrófico, no tratamento controle e com adição de cloreto de alumínio.....	75
Tabela 16. Médias de trocas gasosas nas folhas de cana-de-açúcar cultivadas em LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO Distrófico.....	75
Tabela 17. Médias da taxa fotossintética nas folhas de variedades de cana-de-açúcar cultivadas em LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO Distrófico, em relação ao fator variedades.....	75
Tabela 18. Quadro de análise de variância de três variedades de cana-de-açúcar cultivadas em LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO Distrófico, no tratamento controle e com adição de cloreto de alumínio, em relação aos teores de clorofila em $\mu\text{g g}^{-1}$ de massa fresca (MF).....	77
Tabela 19. Médias dos teores de clorofilas nas folhas de cana-de-açúcar cultivadas em LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO Distrófico, no tratamento controle e com adição de cloreto de alumínio.....	77
Tabela 20. Faixa adequada de nutrientes em folhas diagnósticas de cana-de-açúcar.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg: micrograma

µmol: micromoles

ALMT: transportadores de malato ativados pelo Al

ATP: adenosina trifosfato

cDNA: DNA complementar

Ct: ciclo threshold

CTC: capacidade de troca de cátions

DEPC: dietil pirocarbonato

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTPs: desoxirribonucleotídeos Fosfatados

dTTP: desoxitimidina trifosfatada

dUTP: desoxiuridina trifosfatada

EDTA: ácido etileno diâmina tetra acético

EROs: espécies reativas de oxigênio

ESTs: do inglês Expressed Sequence Tag

GC: guanina - citosina

ha: hectare

IRGA: Analisador de gás-por Infra vermelho (infra-red gas analyzer)

m%: saturação por alumínio no solo

MATE: extrusão de multidroga e compostos tóxicos

MDH: malato desidrogenase

mM: milimolar

mmol: milimol

MO: matéria orgânica

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

ng: nanograma

nm: nanômetro

PCR: polimerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)

pmol: picomol

RNA: ácido ribonucleico

qPCR: PCR quantitativo

SB: soma de bases no solo

SDH: succinato desidrogenase

SOD: superóxido dismutase

SUCEST: sugarcane expressed sequence tag

t: tonelada

TAE: tampão Tris-Acetato-EDTA

T_m: temperatura de melting

UDG: uracil-N-glicosidase

UV: ultravioleta

UV-VIS: ultravioleta visível

V: volts

V%: saturação por bases do solo

Sumário

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
1.1 Cultura da cana-de-açúcar.....	18
1.2. Solos ácidos e a absorção de nutrientes	21
1.3 Fitotoxidez por alumínio (Al) do solo	24
1.4 Mecanismos vegetais de tolerância ao Al fitotóxico	29
1.5 Análise da expressão de genes associados à tolerância ao Al	35
2. OBJETIVOS.....	39
2.1. Objetivos específicos:	40
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1 Variedades de cana-de-açúcar	40
3.2 Pré-germinação	41
3.3 Instalação do experimento em casa-de-vegetação	42
3.3.1 Preparo do solo.....	42
3.3.2 Montagem e disposição das colunas de solo.....	45
3.3.3 Plantio de mini-toletes de cana-de-açúcar.....	47
3.3.4 Análise dos parâmetros fisiológicos.....	49
3.3.5 Coleta do experimento em casa-de-vegetação	49
3.4 Experimento em solução nutritiva	51
3.5 Teor de alumínio e nutrientes na planta.....	53
3.6 Quantificação de clorofila.....	54
3.7 Oligonucleotídeos para a análise de expressão gênica por qRT-PCR.....	55
3.8 Extração do RNA total de folhas e raízes	56
3.9 Síntese de cDNA por transcriptase reversa.....	57
3.10 Padronização e eficiência dos primers para a reação de qPCR	58
3.11 Análise de expressão gênica relativa por qPCR para os genes selecionados, em variedades de cana-de-açúcar submetidas ao tratamento com alumínio em solução nutritiva.....	58
3.12 Normalização dos dados e cálculo da expressão relativa	60
4. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS	61
5. RESULTADOS	62
5.1 Teor de nutrientes nas raízes e folhas	62
5.2 Teores de alumínio nas raízes e folhas	69
5.3 Teores de alumínio nas raízes do experimento em solução nutritiva	71

5.4 Análises fisiológicas de trocas gasosas.....	75
5.5 Teores de clorofilas.....	77
5.6 Análises de Expressão Gênica por qPCR	79
6. DISCUSSÃO	82
6.1 Incubação do solo com calcário e Al	82
6.2 Teores de nutrientes e de Al em raízes e folhas.....	82
6.3 Raízes laterais	86
6.4 Trocas gasosas e teores de clorofilas	88
6.5 Análises da Expressão Gênica	91
7. CONCLUSÕES	97
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Cultura da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma cultura de importância econômica mundial, com 26,9 milhões de hectares de área plantada, produção de 1,9 bilhões de toneladas e produtividade de 70,9 toneladas por hectare. O Brasil é o maior produtor, seguido por Índia, China, Tailândia, Paquistão, México, Colômbia, Indonésia, Filipinas, Estados Unidos e Austrália (FAOSTAT, 2015). A demanda crescente por combustíveis renováveis como o etanol encontra suporte no Brasil, que detém tecnologia de produção de bioetanol e possui áreas agrícolas disponíveis para a expansão da cultura da cana-de-açúcar.

A produção da safra brasileira de 2017/2018 foi de 633,26 milhões de toneladas, 3,6% menor que a safra anterior. A queda na produção também é reflexo da diminuição da área colhida, correspondente à 8,73 milhões de hectares, 3,5% menor que a safra anterior. A produção de etanol se manteve estável com 27,76 bilhões de litros e o açúcar apresentou queda de 2,1% em relação à safra anterior, com produção de 37,87 milhões de toneladas. Isso ocorreu devido à menor quantidade de cana disponível e o direcionamento para a produção de etanol, visto que os preços no mercado internacional caíram (CONAB, 2018).

A cana-de-açúcar é uma planta C4 e está entre as culturas mais eficientes em converter energia solar em energia química e biomassa (FURTADO et al., 2014). Agrega-se a isso seu potencial de cultivo em terrenos agrícolas não favoráveis para outras culturas, evitando a competição com áreas utilizadas para produção de alimento (WACLAWOVSKY et al., 2010), ou de preservação ambiental, podendo substituir até 13,7% do petróleo consumido mundialmente e reduzir as emissões globais de dióxido de carbono (CO₂) em até 5,6% em 2045 (JAISWAL et al., 2017).

O avanço da cana-de-açúcar no Brasil tem ocorrido principalmente em direção às áreas de Cerrado, cujos solos têm boas propriedades físicas, apresentando boa drenagem em 79% da superfície regional e relevo plano a suave-ondulado em 70%, o que torna a topografia favorável à mecanização. Entretanto, apresentam 89% da área com solos distróficos e com propriedades químicas inadequadas como elevada acidez, altos teores de Al trocável e deficiência generalizada de nutrientes, principalmente de fósforo (P), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) (RIBEIRO et al., 2017). Solos ácidos são encontrados em regiões tropicais e subtropicais, sendo aproximadamente 30% da área do planeta e 50% das terras cultivadas (KOCHIAN et al., 2015; SADE et al., 2016) e mais de 70% do solo com potencial de cultivo (MORENO-ALVARADO et al., 2017).

O desenvolvimento e a produtividade da cana-de-açúcar são limitados por fatores bióticos e abióticos e, sobretudo, pela 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. Marin et al. (2008) estimaram a produtividade atingível da cana-de-açúcar no Estado de São Paulo e, ainda que os autores tenham observado que a radiação solar, a deficiência hídrica, a quantidade de chuva e a temperatura máxima foram variáveis climáticas que afetaram a eficiência da produção agrícola, houve forte relação entre produtividade e aptidão agrícola do solo.

O solo é um dos componentes mais importantes de um conjunto complexo de fatores que influenciam na produção. Este se destaca pelo importante papel de fornecer suporte físico, água e nutrientes às plantas. Portanto, o conhecimento dos fatores edáficos é importante para investigar o potencial de produção agrícola e para alocar de maneira mais eficiente as variedades de cana-de-açúcar nos ambientes mais promissores.

Os principais Programas de Melhoramento Genético de Cana-de-açúcar do país [Programas 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 Agronômico 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.) e os parâmetros tecnológicos (teores de sacarose e de fibras) (HOFFMAN et al., 2008), mas geralmente abordam com muita superficialidade os fatores ligados aos atributos do solo, baseando-se em frágeis aproximações para ambientes de produção, empregando termos pouco precisos tais como “ambiente favorável e desfavorável”, “baixa-média-alta exigência em ambientes” ou “baixa-média-alta exigência em fertilidade do solo”.

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 alta produção de biomassa da cana-de-açúcar requer alta demanda hídrica e seu cultivo de forma eficiente no Cerrado só é possível utilizando tecnologias que permitam desenvolvimento adequado do sistema radicular no perfil do solo. Por se tratar de uma cultura semi-perene, o crescimento do sistema radicular da cana-de-açúcar permite a exploração das camadas mais profundas do solo. Seu ciclo varia de 5 a 7 anos, dependendo do manejo, e o seu desenvolvimento radicular em maior profundidade é fundamental para o acréscimo de produtividade em solos de baixa fertilidade e de baixa retenção de umidade (BALL-COELHO, 1992; DEMATTÊ, 2005).

A cana-de-açúcar é uma planta de alto consumo de água, necessitando de 116 toneladas de água para produzir uma tonelada de massa seca (BUSO, 2006). 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 (BUSO, 2006).

1.2. Solos ácidos e a absorção de nutrientes

O desenvolvimento do sistema radicular tem influência direta sobre alguns fatores determinantes para a produtividade final, tais como: 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. (VASCONCELOS et al., 2003; COSTA et al., 2007). Além disso, o sistema radicular de cana-de-açúcar é essencial para a regeneração das soqueiras após a colheita (ALVAREZ et al., 2000). 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.

Impedimentos físicos e químicos do solo têm sido as causas mais frequentes do reduzido crescimento radicular no subsolo (VASCONCELOS e GARCIA, 2005). Porém, os atributos químicos são os mais restritivos ao pleno desenvolvimento vegetal em solos das regiões tropicais e subtropicais. Predominantemente trata-se de solos ácidos, pertencentes, em sua maioria, às Ordens dos LATOSSOLOS, ARGISSOLOS e NEOSSOLOS. Possuem severas limitações em termos de fertilidade e um conjunto de atributos químicos restritivos ao desenvolvimento vegetal, que compreendem a alta

saturação por Al (m%), a toxidez por Al, hidrogênio (H) e manganês (Mn), a baixa reserva de nutrientes, devido à reduzida saturação por bases (V%) e baixa capacidade de troca de cátions (CTC), com destacada deficiência de cálcio e magnésio, e baixa disponibilidade de fósforo devido a adsorção do fosfato por oxi-hidróxidos de ferro e de Al. Além disso, teores de nitrogênio e de potássio em solos ácidos tendem a ser deficientes devido, respectivamente, aos baixos conteúdos de matéria orgânica e ao alto grau de intemperismo (SOBRAL e GUIMARÃES, 1992; ABREU JR. et al., 2003; LANDELL et al., 2003).

Solos ácidos ocupam cerca de 3 bilhões de hectares da superfície terrestre. Na região tropical da América do Sul, esses solos cobrem 85% da área total e aproximadamente 850 milhões de hectares são subutilizados para a produção agrícola. Desse total, 75% possuem pH abaixo de 5,3 no subsolo e 44% têm saturação por Al maior do que 70%. Aproximadamente 70% do território brasileiro são cobertos por solos ácidos e, em 40%, a produtividade das culturas é reduzida à metade (MORENO-ALVARADO et al. 2017; SADE et al. 2016). O estudo de Abreu Jr. et al. (2003) mostrou que 75% dos valores de pH da camada superficial de solos de 26 regiões brasileiras estiveram entre 3,78 e 5,52 e que o Al^{3+} foi o cátion trocável predominante em mais de 30% dos solos com pH inferior a 5,6.

Em solos das regiões tropicais e subtropicais úmidas, a alta acidez e os altos teores de Al trocável, associados com a baixa fertilidade, são os principais fatores que restringem a produção agrícola. No Brasil, a ocorrência de solos com potencial para atividade agrícola e afetados por problemas de toxidez por Al é da ordem de 60% (ABREU JR. et al., 2003). Cerca de 70% das áreas cultivadas com cana-de-açúcar estão sobre solos ácidos (SALDANHA et al., 2007).

Em grande parte das terras não utilizadas na agricultura ocorrem deficiências em relação aos seus atributos físicos, químicos ou biológicos (PEREIRA et al., 2010). A toxidez por Al é o fator limitante ao desenvolvimento das culturas em solos ácidos, juntamente com a baixa disponibilidade de nitrogênio (N) e P (GUPTA et al., 2013; BOSE et al., 2013). Em solos ácidos, com pH abaixo de 5, o hidrogênio (H^+) atua sobre os minerais de argila ocasionando sua decomposição e liberando íons alumínio (Al^{3+}), que ficam predominantemente retidos pelas cargas negativas das partículas de argila do solo, em equilíbrio com o Al^{3+} em solução. (SIMÕES et al., 2012). O efeito do Al no sistema metabólico da planta ocorre em minutos e, posteriormente é acompanhado por efeitos secundários.

De todos os atributos químicos, a toxidez por Al é uma das principais barreiras químicas ao aprofundamento do sistema radicular e à sua capacidade de absorção de água e de nutrientes, sendo muitas vezes a causa da baixa produtividade de muitos solos (SOBRAL e GUIMARÃES, 1992; ABREU JR. et al., 2003). Este impedimento químico é mais severo em solos com baixa saturação por bases, pobres em Ca e Mg (VITORELLO et al., 2005). Por ser um cátion trivalente, o Al^{3+} é fortemente adsorvido pelo solo e, assim, sua concentração na solução do solo é baixa ($\mu mol L^{-1}$) (HAYNES e MOKOLOBATE, 2001). Há dificuldade para a definição de um valor crítico para o Al que provoca toxidez às plantas, mas é conhecido que mesmo baixas concentrações de Al na solução do solo são tóxicas 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 e GUIMARÃES, 1992).

Existem dois enfoques para contornar o problema da toxidez por Al: a adaptação do solo à planta e a adaptação da planta ao solo. A primeira estratégia consiste em

neutralizar a acidez pelo uso de corretivos e de condicionadores do solo, enquanto a segunda explora a tolerância de espécies e de variedades às condições de acidez e de toxidez por Al (SOBRAL e GUIMARÃES, 1992).

Práticas rotineiras de manejo da cultura da cana-de-açúcar, tais como a aplicação de calcário, de gesso agrícola e de vinhaça, além de prática mais recente da colheita mecanizada, podem provocar alterações significativas no comportamento do Al no solo. Esses fatores, associados a mecanismos intrínsecos que conferem tolerância aos genótipos quanto ao efeito prejudicial do Al, podem determinar outro potencial produtivo de variedades em solos ácidos.

Além da calagem, magnésio, boro e silício tem sido reportados como eficientes para diminuir a toxidez por Al (HAMMOND et al., 1995; YU et al., 2009; BOSE et al., 2011). Existem também estruturas externas das plantas que conferem resistência à entrada do Al, como parede celular, membrana celular, exsudados químicos como ácidos orgânicos (MA et al., 2001), compostos fenólicos (TOLRA et al., 2009) e fosfatos (PELLET et al., 1996).

1.3 Fitotoxidez por alumínio (Al) do solo

Parte da dificuldade em estudar os processos que ocorrem nas plantas, e que são decorrentes da ação do Al, pode ser atribuída ao complexo comportamento químico desse elemento. A identificação das formas de Al na solução do solo e de sua associação com a fase sólida do solo permite compreender a dinâmica de mobilidade e de disponibilidade do Al, que por sua vez governam grande parte do seu potencial fitotóxico.

O Al se hidrolisa em solução, de tal modo que a espécie mais tóxica, a trivalente livre Al^{3+} , predomina em condições ácidas ($pH < 5,0$), enquanto as espécies $Al(OH)_2^+$ e

AlOH^{2+} são formadas quando o pH aumenta. Em valores de pH próximos da neutralidade, ocorre a fase sólida $\text{Al}(\text{OH})_3$ e o $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ predomina em condições alcalinas (DELHAIZE e RYAN, 1995) (Figura 1). Uma vez que o pH é um importante atributo do solo que governa a espécie química do Al em solução, a prática da calagem em solos ácidos tem sido empregada na agricultura tropical como forma de elevar o pH do solo e promover a detoxificação do Al mediante sua precipitação química na forma de hidróxido.

Os efeitos do Al nas plantas podem ser classificados como morfológicos, relacionados aos sintomas em diferentes partes estruturais da planta, e fisiológicos, referindo-se à interação do Al^{3+} em múltiplos locais da célula, com efeitos tóxicos e interferindo nos processos da planta (ROUT e SAMANTARAY, 2001).

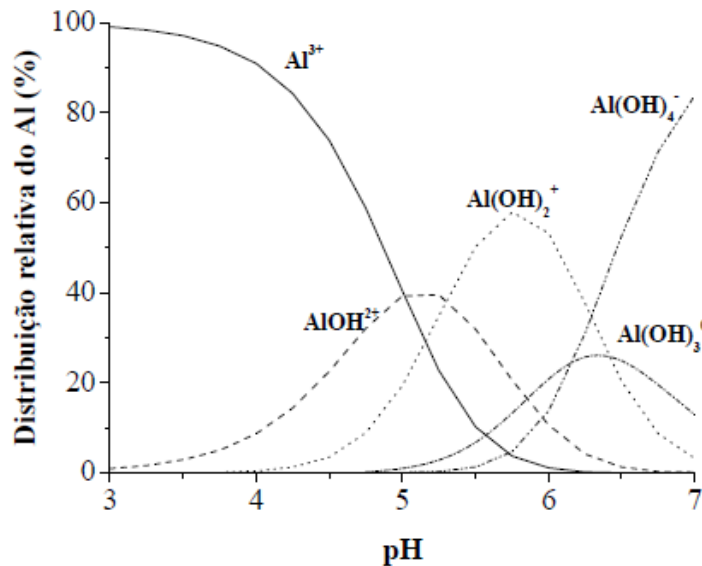


Figura 1. Distribuição relativa das espécies de Al na solução do solo em função do pH (BERTSCH e PARKER, 1995).

A região mais sensível ao Al é o ápice radicular. O Al^{3+} se liga na parede celular, particularmente na matriz de pectina, que está carregada negativamente com grupos

carboxílicos, e na face apoplástica da membrana plasmática, prejudicando suas funções (HORST et al., 2010). Ocasionalmente há ausência de ramificações finais e diminuição da área superficial do sistema radicular devido à rápida inibição do processo de alongamento radicular (cerca de 1-2 h após o contato com o Al tóxico), em razão da paralisação da divisão celular. O crescimento é afetado principalmente devido à redução da replicação de DNA pelo aumento da rigidez da fita dupla hélice. Além disso, fixa o fósforo em formas menos disponíveis para a planta, altera enzimas, acúmulo de polissacarídeos, respiração celular e modifica a estrutura e função da membrana plasmática, afetando a absorção de água e nutrientes (HORST et al., 2010). A exposição contínua ao Al conduz à alterações morfológicas, como o engrossamento e encurtamento das raízes, com aspecto quebradiço (DELHAIZE e RYAN, 1995), o desenvolvimento de cor castanha na região apical e alterações na arquitetura do sistema radicular, reprimindo o crescimento das laterais e conduzindo à formação de sistemas radiculares com menor área e volume (ROSSIELLO e JACOB NETO, 2006).

O crescimento e iniciação de raízes laterais secundárias e terciárias são estimulados por metais pesados como o Al. A inibição do crescimento da raiz principal é percebida pela planta e a formação de novas raízes laterais é promovida através de uma mudança no padrão das células na zona de alongamento periférico (POSCHENRIEDER et al., 2008).

O Al também causa modificações na absorção, no metabolismo e no transporte de alguns nutrientes para parte aérea das plantas (LINDON et al., 1999; AKAYA e TAKENAKA, 2001). A absorção de Al pelas plantas leva a um desbalanço nutricional, com redução de absorção de Ca^{2+} (69%), Mg^{2+} (29%), K^+ (13%) e NH_4^+ (40%), e aumento de nitrato (44%) e fosfato (17%) (SADE et al., 2016). Isso ocorre devido à redução de água e solutos através do apoplasto (ETICHA et al., 2005).

Os sintomas de toxidez por Al podem ser facilmente vistos nas raízes, mas nas folhas a relação com o Al é mais difícil de ser percebida. Devido aos danos radiculares e a menor absorção de nutrientes, as folhas podem apresentar um sintoma de deficiência nutricional, principalmente de P. Somente o simples aporte de nutrientes pode não ser suficiente se o problema principal da presença de Al tóxico não for solucionado.

Os efeitos do Al sobre o crescimento da parte aérea podem ocorrer como consequência secundária. A redução do crescimento da planta pode ser resultante da diminuição da atividade fotossintética. O Al pode causar injúrias na formação e função do cloroplasto (MOUSTAKAS et al., 1996), resultando em queda na condutância estomática e nas reações bioquímicas de fixação de CO₂ (CARLIN et al. 2012; PEIXOTO et al., 2002).

Durante a fotossíntese, a água é essencial para a geração de energia química, requerida posteriormente para a fixação de CO₂. Sendo assim, variações na disponibilidade hídrica geram uma menor eficiência do fotossistema, formando menos ATP e NADPH e conseqüentemente menos CO₂ é fixado (LU e ZHANG, 1999; SOUZA et al., 2004). Apesar de haver grande falta de informação sobre como a exposição ao Al afeta direta ou indiretamente a fotossíntese, a biomassa da planta pode ser reduzida devido às alterações ocasionadas pelo Al nesse sistema. Além disso, a exposição ao Al pode interferir no fotossistema II (ZHANG et al., 2007; REYES-DIAZ et al., 2010), alterar a estrutura dos cloroplastos (MOUSTAKAS et al., 1997), diminuir a eficiência quântica (MOUSTAKAS et al., 1996; CHEN et al., 2005), causar alterações nos pigmentos responsáveis por captar a luz (ZHANG et al., 2007; AZMAT e HASAN, 2008) e na cadeia de transporte de elétrons (CHEN et al., 2005).

Alguns resultados indicaram diferenças no desempenho de plantas tolerantes e sensíveis ao Al quanto a concentração de pigmentos (PEIXOTO et al., 2002). Em

variedades que apresentam maior tolerância ao Al, a fotossíntese é menos afetada, podendo ainda apresentar mecanismos de adaptação do aparelho fotossintético em função do tempo de duração do estresse (PEIXOTO et al., 2002; MIHAILOVIC et al., 2008).

O uso de parâmetros fisiológicos como indicadores de estresse é muito frequente nas pesquisas (MARIN e SANTOS, 2008; CARLIN e SANTOS, 2009). As alterações no processo fotossintético e, conseqüentemente, nos teores de clorofila têm sido apontadas como possíveis indicadores da toxidez por Al (MIHAILOVIC et al., 2008). Carlin et al. (2012), em trabalho com cana-de-açúcar, concluíram que os teores de clorofilas podem ser usados como indicadores do efeito isolado do estresse por toxidez do Al no solo.

As clorofilas são os pigmentos naturais mais abundantes presentes nas plantas e ocorrem nos cloroplastos das folhas e em outros tecidos vegetais. São moléculas formadas por complexos derivados da porfirina, tendo como átomo central o Mg (VON ELBE, 2000). Os pigmentos fotossintéticos presentes e a sua abundância variam de acordo com a espécie. A *clorofila a* está presente em todos os organismos que realizam fotossíntese oxigênica, sendo o pigmento utilizado para realizar o primeiro estágio do processo fotossintético. Os carotenoides, *clorofila b* e as ficobilinas constituem os chamados pigmentos acessórios (STREIT et al., 2005), e auxiliam na absorção de luz e na transferência da energia radiante para os centros de reação (TAIZ e ZIEGER, 2004).

Em cana-de-açúcar foi observada diminuição na concentração das clorofilas *a*, *b* e total (*a+b*), na presença de Al tóxico (CARLIN et al., 2012). Outras plantas com metabolismo C₄, tais como o milho (LIDON et al., 1999) e o sorgo (PEIXOTO et al., 2002), também apresentaram redução nos teores dos pigmentos fotossintéticos. Em girassol, o estresse por Al causou redução nos teores de clorofila *a*, *b* e de carotenóides

na variedades sensível, enquanto na variedades tolerante os teores não foram alterados (JESUS, 2012).

A redução dos teores de clorofilas pode estar relacionada com o fato de o Al competir com o Mg, constituinte importante das moléculas de clorofila, e com o Ca por sítios na parede celular e, principalmente, na membrana plasmática (MILIVOJEVIC e STOJANOVIC, 2003; CARLIN et al., 2012). Além disso, a toxidez por Al confere à planta menor capacidade de absorver diferentes formas de nitrogênio, que está diretamente relacionado com a síntese de pigmento fotossintético, devido à redução da atividade do sistema de transporte do NO_3^- (CAMBRAIA et al., 1989; PURCINO et al., 2003; CARLIN et al., 2012).

1.4 Mecanismos vegetais de tolerância ao Al fitotóxico

A diferença nas respostas das plantas referente à capacidade de mobilizar o Al, taxa de absorção, manutenção do equilíbrio de cargas para a absorção de nutrientes em solos ácidos, deficiência de nutrientes e resistência ao Al, podem variar entre espécies e até mesmo entre variedades da mesma espécie (POSCHENRIEDER et al., 2008). A literatura disponível indica que há muitos fatores que devem ser levados em conta para determinar o nível tóxico e susceptibilidade da planta ao Al, como por exemplo, o pH do substrato e sua estabilidade, o tempo de exposição, força iônica do meio de cultura, tipo de solo, disponibilidade de nutrientes, idade da planta, cultivar ou variedade.

De acordo com Khu et al. (2012), apesar de a toxicidade ao Al estar estritamente relacionada com solos ácidos, as plantas diferem geneticamente na tolerância à acidez do solo e/ou à toxicidade ao Al, podendo ser tolerantes à acidez e ao Al, sensíveis à acidez e ao Al ou tolerante à acidez e sensível ao Al. Os mesmos autores desenvolveram em campo e em meio de cultura, experimentos com rápido escaneamento de plantas

tolerantes/sensíveis ao Al. Contudo, somente em meio de cultura foi possível detalhar repostas à acidez e ao Al separadamente.

Os mecanismos fisiológicos de tolerância das plantas aos efeitos tóxicos do Al no crescimento da raiz são controlados por diferentes genes e por meio de diferentes rotas bioquímicas, incluindo: (a) capacidade das plantas em alterar o ambiente rizosférico, elevando o pH e reduzindo a solubilidade do Al (FERREIRA et al., 2006); (b) possuir baixa CTC na raiz e, portanto, maior afinidade por cátions monovalentes, de modo que acumulem, assim, menor concentração de Al em suas raízes (FERREIRA et al., 2006); (c) secreção de mucilagem em presença de Al (FERREIRA et al., 2006); (d) utilização de nutrientes na presença de Al, principalmente fósforo e cálcio (FREITAS et al., 2006; MATTIELLO et al. 2008); (e) produção de elevados teores de ácidos orgânicos responsáveis pela complexação do Al (MARIANO et al., 2005); (f) habilidade da raiz em continuar a divisão e o alongamento celular sob estresse (ROSSIELLO e JACOB-NETTO, 2006); (g) manutenção de áreas meristemáticas aptas a desenvolverem novos tecidos após o estresse (ROSSIELLO e JACOB-NETTO, 2006).

De maneira geral a tolerância vegetal ao Al atende a dois grupos de mecanismos: os de reparo, ou tolerância, e os de exclusão, ou resistência. A tolerância ao Al permite sua absorção pelas raízes da planta, tendo sua ação fitotóxica neutralizada através da formação de compostos não-tóxicos do Al^{3+} com ácidos orgânicos no citosol ou ainda sua compartimentalização no vacúolo. (VALLENTUZI et al., 2016). Nos mecanismos de exclusão, o Al é impedido de chegar aos seus sítios de toxidez nas plantas, uma vez que elas liberam, por suas raízes, ácidos orgânicos como o malato, citrato e oxalato que o complexam estavelmente através da formação de quelatos (MARTINS et al., 2013).

Este processo impede sua absorção, evitando a interação com componentes celulares ou até a penetração no simplasto radicular. (CHEN et al., 2015).

A exsudação de ácidos orgânicos é talvez o mecanismo mais investigado associado à tolerância dos vegetais ao estresse por Al. Apesar deste mecanismo não estar completamente elucidado, sabe-se que durante o estresse as plantas são estimuladas a sintetizar novas proteínas que atuarão na síntese e transporte dos ácidos orgânicos pelas células das raízes (KOCHIAN et al., 2005; DELHAIZE et al., 2007).

Ácidos orgânicos de baixo peso molecular, além de grande importância na atenuação do efeito tóxico do Al, atuam também em outros estresses ambientais, tais como deficiências de P e de Fe (KOCHIAN et al., 2004). Estes ácidos são compostos carbônicos que apresentam no mínimo um grupo carboxílico (-COOH) e que desempenham papéis fundamentais no metabolismo celular. Alguns destes ácidos estão envolvidos na produção de energia como intermediários no ciclo do ácido tricarbóxico (como o citrato e malato), enquanto outros podem estar envolvidos direta ou indiretamente em demais processos metabólicos, incluindo a assimilação de carbono e nitrogênio, a regulação do pH celular e seu potencial osmótico e o fornecimento de energia para bactérias simbióticas (TAIZ e ZEIGER, 2002).

O Al também provoca o estresse oxidativo, este ocorre quando a homeostase redox celular sofre um desbalanço por alguma interferência biótica ou abiótica, gerando excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs tem a capacidade de oxidar os componentes celulares tais como os lipídios, proteínas, enzimas e ácidos nucleicos levando à morte celular. A exposição ao Al leva ao estresse oxidativo através da formação de pontes eletrostáticas preferencialmente com ligantes doadores de oxigênio, como por exemplo, grupos carboxilato ou fosfato, a pectina da parede celular e a parte externa da membrana plasmática são os principais alvos do Al (YANG et al., 2008). As

células vegetais são equipadas com um mecanismo defensivo composto de antioxidantes enzimáticos, tais como catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GPOX), superóxido dismutase (SOD), redutase do monodesidroascorbato (MDHAR), redutase de desidroascorbato (DHAR), glutaciona-S-transferase (GST), e glutaciona redutase (GR) e antioxidantes não enzimáticos, como ascorbato (AsA), glutaciona (GSH), tocoferol e carotenóides que ajudam na extinção das EROs.

O fracionamento de Al em frações simplática e apoplástica em *Populus* indicou que diferenças na sensibilidade entre os genótipos estão associadas com o acúmulo de Al no simplasto. Diferentemente dos Al-tolerantes, os genótipos Al-sensíveis apresentaram altos níveis de Al no simplasto, o que sugere que a exclusão do Al do simplasto está associada à resistência ao Al (SMITH et al., 2011). Yu et al. (2011) observaram que o cultivar Al-sensível de soja, ao contrário do Al-tolerante, apresentou uma grande permeabilidade da membrana plasmática. Fato semelhante foi relatado por Silva et al. (2010), que observaram diferenças na diferenciação da endoderme entre genótipos de trigo tolerante e sensível após o período de exposição ao Al. O genótipo tolerante apresentou, após 24 h de exposição ao Al, 100% das células da endoderme espessadas na zona pilífera, enquanto no controle o valor foi de apenas 27%. As diferenças encontradas para o genótipo sensível refletiram apenas que as raízes pararam de crescer. Essa melhor diferenciação das células da endoderme pode envolver mecanismos de controle de acumulação de Al no genótipo tolerante.

Os mecanismos fisiológicos responsáveis pela tolerância à toxidez de Al ainda não foram esclarecidos, e podem variar entre espécies e variedades. Obviamente, plantas tolerantes devem ser capazes de prevenir a absorção de Al, ou de complexá-lo

após sua absorção (PARENTONI et al., 2001). Dentre os cereais, a espécie mais tolerante é o centeio, seguido pela aveia, trigo e cevada (GALLEGO e BENITO, 1997).

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 e ARAÚJO FILHO, 1983; VIANA et al., 1983; SOBRAL e GUIMARÃES, 1992), mas há relatos de grande variação entre os variedades com respeito à capacidade de expansão e aprofundamento do sistema radicular, principalmente em resposta ao estresse causado pelo Al (Figura 2) (SMITH et al., 2005; VASCONCELOS e GARCIA, 2005).

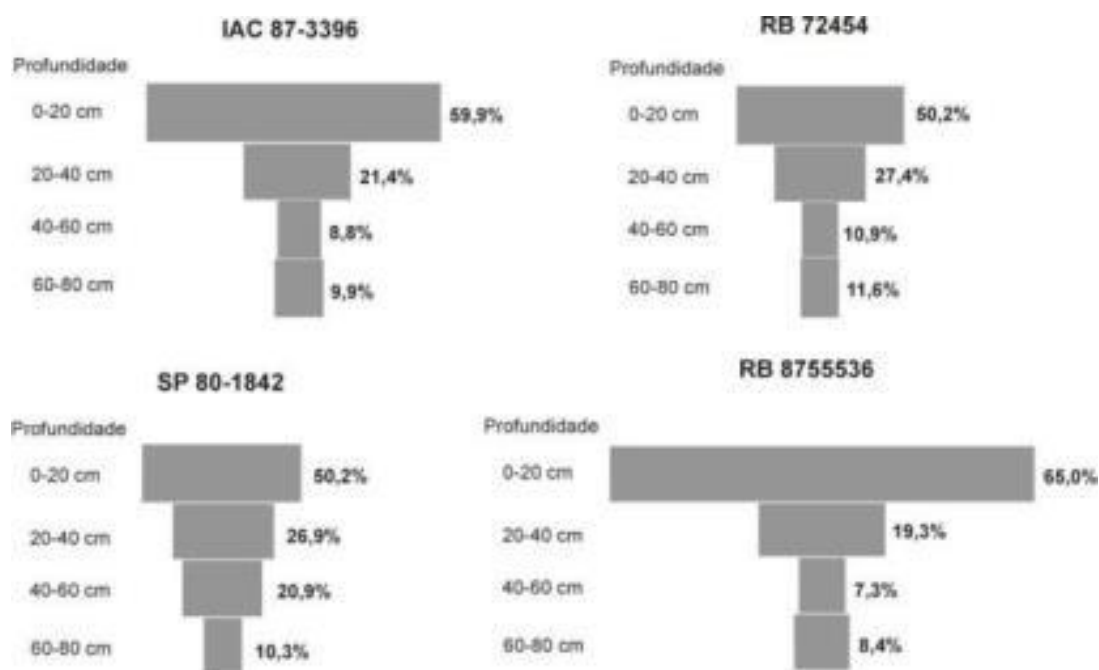


Figura 2. Distribuição do sistema radicular de variedades de cana-de-açúcar aos 16,5 meses de idade, no ciclo de cana-plantada, em um LATOSSOLO VERMELHO com caráter álico (VASCONCELOS; GARCIA, 2005).

Em um trabalho iniciado pelo nosso grupo de pesquisa colaborador (processo FAPESP n° 2010/13945-5) foi observada uma variação entre variedades de cana-de-açúcar em relação à taxa de alongamento radicular e penetração de alumínio nos tecidos radiculares. As variedades RB928064, RB935744 e RB867515 apresentaram diferenças em relação ao dano causado na coifa e na penetração do Al nos tecidos radiculares, evidenciado pela cor púrpura após reação com corante indicador (hematoxilina) (Figura 3) (OLIVEIRA, 2012). Estas variedades podem apresentar variação na expressão de alguns genes quando submetidas ao estresse por alumínio.

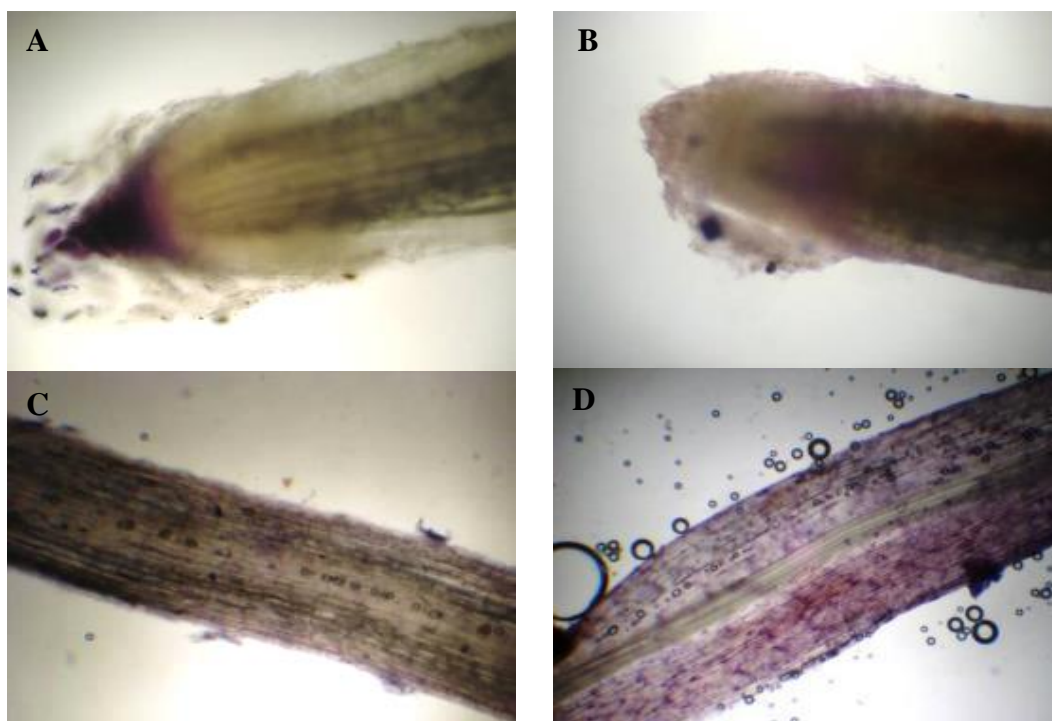


Figura 3. Ápices radiculares de variedades de cana-de-açúcar. (A e C) Variedade RB935744; (B e D) Variedade RB928064; (A e B) Ápices radiculares em microscópio óptico (aumento de 100x) após exposição por seis dias, não corados com hematoxilina; (C e D) Parte do ápice radicular exposto a $3000 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Al por seis dias, posteriormente coloridos com hematoxilina e observados ao microscópio óptico em aumento de 40x (OLIVEIRA, 2012).

1.5 Análise da expressão de genes associados à tolerância ao Al

Abordagens biotecnológicas e moleculares tem proporcionado avanços no entendimento do mecanismo de ação do Al na planta, juntamente com a função e interação de genes de resistência (KOCHIAN et al., 2015). Esses genes pertencem principalmente à duas famílias. Os MATE (extrusão de multidroga e compostos tóxicos) são uma família de genes que codificam transportadores que excretam uma grande diversidade de metabólitos e xenobióticos em eucariotos e procariotos (WESTON et al., 2012). A família ALMT (transportadores de malato ativado pelo Al) possui genes responsáveis pelo transporte de malato pelo vacúolo (KOVERMANN et al., 2007).

O Al induz a expressão de genes diferentes, a exclusão do Al envolve um dos mecanismos de defesa da planta, e entre outros, compreende a exsudação de ácidos orgânicos pelo ápice radicular. A identificação do gene TaALMT1, da família ALMT, em células das raízes de *Triticum aestivum* foi um importante passo na elucidação desse mecanismo de resistência a nível molecular (INOSTROZA-BLANCHETEAU et al., 2012). Esse gene de tolerância foi o primeiro a ser clonado em plantas e codifica uma proteína envolvida no transporte e exsudação do malato de ápices radiculares e é responsável pela tolerância ao Al em trigo (SASAKI et al., 2004).

Dentre outros genes estão o AtMATE, um transportador de citrato ativado por Al em *Arabidopsis* (LIU et al., 2009); SbMATE, um transportador de citrato ativado por Al em sorgo (MAGALHÃES et al., 2007); HvAACT1 em cevada, que secreta citrato para a rizosfera (FUJII et al., 2012).; e ScFRDL2, envolvido na secreção de citrato ativado por Al em centeio (YOKOSHO et al., 2010).

Outros genes também têm sido associados à tolerância ao Al além daqueles envolvidos na produção e secreção de ácidos orgânicos. Os genes ALS3 e ALS1, que codificam transportadores ABC, foram associados com tolerância ao Al em *Arabidopsis*. Tem sido proposto que esses genes atuam na redistribuição intracelular de Al, mantendo-o longe de tecidos sensíveis (LARSEN et al., 2005, 2007). Em *Oryza sativa*, os genes STAR1 e STAR2 são principalmente expressos em raízes e especificamente induzidos pela exposição ao Al (HUANG et al., 2009). Existem vários mecanismos de tolerância ao Al envolvidos em diferentes rotas bioquímicas, com um ou mais genes, que diferem entre espécies e até entre variedades da mesma espécie. Isso ocorre porque as plantas podem diferir na capacidade de mobilização de Al, na taxa de absorção, nas exigências nutricionais, na resistência ao Al e na manutenção do equilíbrio de nutrientes em solos ácidos (POSCHENRIEDER, et al., 2008).

Estudos mostraram que não somente a presença do gene, mas outros aspectos podem influenciar a resposta da planta ao Al. Como por exemplo, a variação alélica verificada no gene TaALMT1 em trigo (SASAKI et al., 2006), o número de repetições dos genes HvAACT1 e ZmMATE1 em cevada (FUJII et al., 2012) e milho (MARON et al., 2013) respectivamente. Genes que codificam transportadores de membrana e fatores de transcrição, assim como elementos cis-atuantes que aumentam a expressão do gene, estão envolvidos na tolerância ao Al em plantas. Com a integração dessas informações é possível um amplo entendimento da tolerância ao Al em diferentes espécies vegetais, contribuindo para o desenvolvimento de variedades tolerantes ao Al e facilitando a produção agrícola em solos ácidos (SIMÕES et al., 2012). Apesar do avanço em identificação de novos genes em plantas, o conhecimento da sua regulação funcional ainda não está esclarecido (BIAN et al., 2013).

Estudos para obtenção de variedades tolerantes a altas concentrações de Al no solo foram realizados para aumentar a produtividade de diversas culturas com menor demanda de insumos. Tais variedades também possibilitam plantar em áreas antes consideradas inviáveis para a produção agrícola, devido à acidez do solo e à toxicidade do Al. Abordagens biotecnológicas têm sido usadas para entender o mecanismo de tolerância ao Al em plantas. A técnica molecular quantitativa de qPCR tem sido amplamente utilizada para análise de expressão gênica em estudos de tolerância ao Al. No milho, a expressão gênica de Zm.16676.1.A1 (proteína da superfamília do citocromo P450) relacionou-se com o controle da biossíntese e da inativação da giberelina, Zm.3634.1.A1 (proteína induzida por jasmonato), envolvida na biossíntese de jasmonatos, Zm.6272.1.A1 (UDP-glicosiltransferase) envolvida na biossíntese de hormônios, metabolismo de metabólitos secundários, e respostas ao estresse e xenobióticos, e Zm.1228.2.A1 (proteína PHG1A) envolvida na adesão celular em eucariotos superiores, foram analisados em resposta a Al (MATTIELO et al., 2014). Análises transcriptômicas de todo o genoma do trigo-sarraceno (*Fagopyrum tataricum*) foram utilizadas para identificar mecanismos de tolerância ao Al (ZHU et al. 2015). Estudos também analisaram os genes ASR1 e ASR5 no arroz, bem como fatores complementares de transcrição que regulam a expressão gênica em resposta a Al (ARENHART et al, 2016).

Vários genes demonstraram ser diferencialmente regulados pelo estresse Al em diferentes espécies de plantas. Na cana-de-açúcar, a histona diacetilase (P56521), a serina / treonina quinase (AP002482) e a proteína RGP1 relacionada ao RAS (P25766) foram descritas como tendo padrão de expressão diferenciado na presença de Al (WATT, 2003).

Análises moleculares e bioquímicas são necessárias para compreender os mecanismos de toxicidade ao Al, especificamente em cana-de-açúcar. Assim, um banco de dados com marcadores de sequência genética de cana-de-açúcar, ou ESTs, do inglês Expressed Sequence Tag (SUCEST) tem sido utilizado para estudos em gramíneas tais como cevada, milho e sorgo devido ao nível de conservação do genoma (VETTORE et al., 2001).

Estratégias que buscam analisar a expressão de genes que possam estar associados à tolerância a alumínio em variedades de cana-de-açúcar, oferecem uma oportunidade única para se estudar algumas características destas variedades que as tornam tolerantes. Essas estratégias de aumento da expressão de genes associados a tolerância a alumínio tem sido aplicadas com sucesso para se estudar a função dos genes e também para caracterizar uma variedade tolerante. Drummond et al. (2001) em trabalho de revisão expuseram a primeira iniciativa de entender os mecanismos da cana-de-açúcar em lidar com o Al tóxico. Os autores identificaram que genes relacionados com a resposta à toxidez por Al em outras espécies, possuem alta similaridade com genes encontrados em cana-de-açúcar. Entre eles, genes relacionados com a resposta a infestação por patógenos (1,3 β -glucanase, reticulina oxi redutase e fenilalanina amônia liase), que codificam enzimas que combatem o estresse oxidativo (Superóxido dismutase Cu-Zn, Hidroperóxido fosfolipídico glutaciona peroxidase – like), responsáveis pela exudação de ácidos orgânicos (Succinato-CoA – cadeia beta e Malato desidrogenase) e sinalização (MAP-kinase, gene *SLT2*, *SLK1* e *NtGDII*). Esses genes foram relacionados ao SAS 43.141 (Sugarcane Assembled Sequences) em cana-de-açúcar, que estão disponíveis no SUCEST.

O genótipo da cana-de-açúcar é um dos genomas vegetais mais complexos, apresentando um nível de poliploidia variando de 5 a 16 (HOANG et al. 2015). A

resposta desta cultura à toxicidade do Al ainda é pouco compreendida, com trabalhos pioneiros feitos por Hetherington et al. (1988), que compararam a tolerância ao Al de três variedades de cana-de-açúcar australianas, Q77, Q113 e Q117 com uma cultivar de feijão (*Phaseolus vulgaris*), soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*) em um experimento em solução nutritiva a curto prazo. Estudos sobre genes relacionados à tolerância ao Al são escassos (HETHERINGTON et al. 1988; WATT 2003). Os padrões de expressão gênica são determinantes de processos fisiológicos que podem modificar as propriedades celulares das plantas associadas ao estresse. Determinar os padrões de expressão gênica em resposta ao estresse Al pode melhorar nossa compreensão de suas funções e fornecer uma base para estratégias eficazes para melhorar as condições de estresse.

Este trabalho apresenta uma avaliação fisiológica, nutricional e molecular de 3 variedades de cana-de-açúcar, submetidas ao estresse por Al. Foi avaliado o teor de nutrientes e Al nas raízes e folhas, parâmetros fisiológicos como taxa de transpiração, fotossíntese, condutância estomática e teores de clorofila. Além disso, foi realizada uma análise de expressão gênica de succinato desidrogenase (SDH), malato desidrogenase (MDH) e superóxido dismutase (SOD). Esses genes foram escolhidos por estarem relacionados à tolerância ao Al, foram descritos na literatura para outras culturas e apresentam alta similaridade com a cana-de-açúcar.

2. OBJETIVOS

Os objetivos gerais desse trabalho foram estudar comportamento de três variedades de cana-de-açúcar submetidas ao estresse por alumínio, em relação ao perfil de expressão de alguns genes associados à tolerância ao alumínio, assim como parâmetros fisiológicos e nutricionais relacionados.

2.1. Objetivos específicos:

- Seleção de genes relacionados com o estresse oxidativo causado pelo Al.
- Seleção de genes relacionados com a produção de ácidos orgânicos.
- Quantificação da expressão dos genes selecionados por PCR quantitativo em plantas cultivadas em solução nutritiva com alto teor de Al
- Análises fisiológicas de trocas gasosas, taxa de fotossíntese e teor de clorofila em plantas cultivadas em casa-de-vegetação
- Análises de teores de nutrientes e de alumínio em tecidos de folhas e raízes em plantas cultivadas em casa-de-vegetação

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Variedades de cana-de-açúcar

Os experimentos foram conduzidos no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos (CCA/UFSCar). Três variedades de cana-de-açúcar foram selecionadas: RB928064, RB935744 e RB867515.

Segundo RIDESA (2010), as variedades possuem as seguintes características fitotécnicas:

- a) RB928064: ciclo médio tardio, com colheita em setembro-novembro. Plantar em ambientes de médio para alto potencial, para colheita final de safra. No final de safra bom teor de sacarose e alta produtividade agrícola, boa sanidade e excelente brotação em cana-planta e em soqueiras, florescimento raro.
- b) RB935744: ciclo tardio, com colheita em setembro-novembro. Material rústico, excelente sanidade e muito produtivo. Recomenda-se plantar em ambientes de médio à bom potencial; colher no final de safra.

c) RB867515: ciclo médio, com colheita em julho-setembro. Tolerante a seca e boa brotação de soqueira, mesmo colhida crua; alto teor de sacarose, crescimento rápido com alta produtividade. Não deve ser plantada em ambientes favoráveis devido à incidência de estrias vermelhas. Nos ambientes de alto potencial de produção há possibilidades, devido à alta produtividade agrícola, de tombamento e atraso de maturação.

As variedades de cana-de-açúcar foram fornecidas pelo Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar da Universidade Federal de São Carlos (PMGCA/UFSCar), o qual faz parte da Rede Inter-Universitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (RIDESA).

3.2 Pré-germinação

Mini-toletes de cana-de-açúcar com gema única foram germinados em bandejas de plástico, utilizando vermiculita de textura média como substrato. As extremidades dos toletes foram seladas com parafina para evitar a oxidação excessiva e a proliferação de fungos. A vermiculita foi umedecida na proporção de 1:0.8 (vermiculita:água), espalhada uniformemente nas bandejas, e os mini-toletes foram colocados com a gema para cima e cobertos com uma fina camada de vermiculita. As bandejas foram acondicionadas em câmara Fitotron, com temperatura constante de 30°C e fotoperíodo com luz intermitente. A média do período de pré-germinação foi de 15 dias, com alguma variação dependendo da variedade. A umidade do substrato foi controlada diariamente, com reposição de água a cada 48 horas. Essa etapa foi conduzida para os experimentos em solução nutritiva e em casa-de-germinação.

3.3 Instalação do experimento em casa-de-vegetação

3.3.1 Preparo do solo

A coleta do solo foi feita em área de reforma de canavial cedida pela Usina Santa Lúcia em Araras/SP, com a camada superficial do solo descartada (em torno de 10 cm), devido à grande quantidade de palhada e outros resíduos. O solo não apresentava um teor elevado de alumínio (Tabela 1), mas por possuir baixo pH foi possível a adição de cloreto de alumínio para que fosse atingido um valor de saturação por alumínio maior que 50%. Essa prática de adição de uma fonte externa de alumínio, já foi utilizada por vários autores (LIMA et al., 2007; CARLIN et al., 2012; ECCO et al., 2014) e devido ao fato do pH ser baixo, o alumínio é mantido na CTC do solo em sua forma de Al^{3+} livre.

O solo coletado foi transportado até a UFSCar em Araras/SP, no Centro de Ciências Agrárias e acomodado em casa-de-vegetação onde foi seco ao ar e, após a secagem, foi passado em peneira de abertura de malha 2 mm. Em seguida, subamostras foram retiradas para caracterização química (análise de rotina para fins de fertilidade) e física (análise granulométrica, densidade e capacidade de campo) (Tabela 1), conforme métodos de Camargo et al. (2009).

Tabela 1. Resultados preliminares da análise química e física de LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO Distrófico, coletado na Usina Santa Lúcia em Araras/SP.

Amostra	P _{Resina}	MO	pH	K	Ca	Mg	H+Al	Al	SB	CTC	V
Profundidade (cm)	mg/dm³	g/dm³	CaCl₂	-----mmol _c /dm ³ -----							%
20-40	4	7	4,2	0,2	7	3	24	4,1	10	34	29,4
Amostra	m%	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn	Argila	Areia	Silte	CC
Profundidade (cm)	%	-----mg/dm ³ -----					-----g/dm ³ -----		m³ m⁻³		
20-40	29,1	57	0,01	0,3	14	1,7	0,6	160	790	50	0,30

Teores de P, K, Ca, e Mg: extraídos por resina trocadora de íons; MO: matéria orgânica determinada pelo método Walkley-Black; pH_{CaCl2}: determinado em solução de CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹ (relação solo:solução 1:2,5); H+Al: acidez potencial determinada por solução de acetato de cálcio 0,5 mol L⁻¹ em pH 7,0; teor de Al trocável: extraído por solução de KCl 1 mol L⁻¹; SB = soma de bases = Ca+Mg+K; CTC = capacidade de troca de cátions total = Ca+Mg+K+(H+Al); V% = saturação por bases = (SB/CTC)x100; m% = saturação por Al = (Al/SB+Al)x100; Teor de S: extraído por solução de CaH₂PO₄ 0,01 mol L⁻¹; B = extraído por água quente; Teores Cu, Fe, Mn, e Zn: extraídos por DTPA-TEA (ácido dietilenotriaminopentacético 0,005 mol L⁻¹ + trietanolamina 0,1 mol L⁻¹ + 0,01 mol L⁻¹ CaCl₂) à pH 7,3; teores de argila, silte e areia determinados pelo método da pipeta; CC: umidade na capacidade de campo para solos argilosos (tensões de 6, 10, e 33 kPa).

O solo foi separado em dois tratamentos: o tratamento controle com adição de calcário e o tratamento de Al com adição de cloreto de Al. O calcário foi adicionado a uma dosagem equivalente a 1,3 t ha⁻¹ para a elevação da saturação por bases à 60% proporcionando o adequado cultivo da cana-de-açúcar, segundo critério de recomendação do Boletim Técnico IAC nº 100 (RAIJ et al., 1996). Esse solo foi utilizado para compor as colunas controle e também o primeiro anel superior das colunas que receberam o tratamento com Al, visando dar condições para um bom desenvolvimento inicial dos toletes de cana-de-açúcar.

À outra parte do solo que vai compor o tratamento com Al, foi adicionado cloreto de alumínio hexahidratado ((AlCl₃ .6H₂O) –Synth®) para a elevação da saturação por alumínio (m%) acima de 50% e causar o estresse por Al na planta. O solo que recebeu calcário, assim como o solo que recebeu alumínio, foram peneirados novamente após o período de incubação, que foi de 50 dias para o tratamento com calcário e de 15 dias para o tratamento com Al.

A incubação do solo com calcário durante 50 dias foi suficiente para atingir os parâmetros químicos considerados adequados para o cultivo da cana-de-açúcar. A Tabela 2 indica o resultado da análise química de solo após a incubação com calcário.

Tabela 2. Análise Química de LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO Distrófico após incubação com calcário.

P _{Resina}	MO	pH	K	Ca	Mg	H+Al	Al	SB	CTC	V
mg/dm³	g/dm³	CaCl₂	-----mmol_e/dm³-----							%
31	4	4,9	0,7	16	6	20	1	22,7	42,7	53
m%	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn				
%	-----mg/dm³-----									
4,22	47	0,22	0,20	19	2,6	0,4				

O cloreto de alumínio foi adicionado à outra parte do solo, o que aumentou o teor de Al para atingir um m% maior que 50%, suficiente para criar condições de estresse para a planta (Tabela 3).

Tabela 3. Análise Química de LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO Distrófico após incubação com cloreto de alumínio.

P Resina	MO	pH	K	Ca	Mg	H+Al	Al	SB	CTC	V
mg/dm³	g/dm³	CaCl₂		-----mmol_c/dm³-----						%
40	12	3,7	1,5	11	4	58	21	16	74	22

m%	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn
%	-----mg/dm³-----					
56,76	33	0,23	0,20	28	11,2	0,8

3.3.2 Montagem e disposição das colunas de solo

Cada coluna foi constituída pela sobreposição de 6 anéis de PVC rígido, de 20 cm de diâmetro e 20 cm de altura, unidos externamente por fita adesiva e cola (Figura 4).

As colunas foram preenchidas com solo peneirado em malha de 2 mm e seco ao ar, até 1,5 cm da borda superior, formando uma coluna de 118,5 cm de altura e volume de 37,8 dm³ de solo. As colunas controle receberam o solo corrigido com calcário e as colunas com o tratamento de alumínio receberam o solo onde foi adicionado cloreto de alumínio nos 5 anéis inferiores, enquanto o anel superior foi preenchido com solo corrigido com calcário, simulando a camada arável (0 – 20 cm) e garantindo um desenvolvimento inicial satisfatório (Figura 5).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado usando cinco repetições para cada tratamento e para cada variedade, totalizando 30 colunas com uma planta cada.

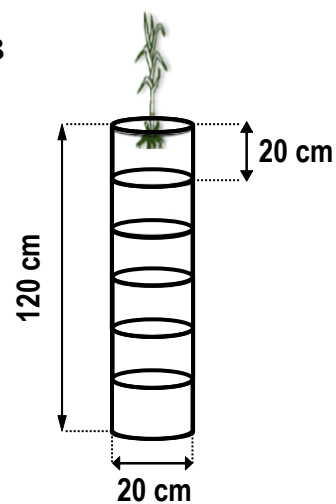
A**B****C**

Figura 4. Experimento em casa-de-vegetação. A. Coluna de PVC montada; B. dimensões e número de anéis usados na construção das colunas de solo. C. Casa-de-vegetação onde o experimento foi instalado, localizada na Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Agrárias, Araras/SP.



Figura 5. Esquema experimental com a disposição de colunas preenchidas com Latossolo com alta saturação por alumínio onde foram cultivadas três variedades de cana-de-açúcar.

3.3.3 Plantio de mini-toletes de cana-de-açúcar

Após o período de pré-germinação em vermiculita, dois mini-toletes foram transplantados em cada coluna, e, ao final de uma semana, o tolete que apresentou menor desenvolvimento foi removido (Figura 6). Cada coluna recebeu inicialmente pulsos de água, para manter a umidade e garantir o estabelecimento dos perfilhos. Passado o período de estabelecimento, a umidade do solo foi mantida à 70% da capacidade de campo, através de monitoramento por pesagens.

Cada coluna recebeu adubação de plantio com 1,3g de cloreto de potássio (58% de K_2O), 2,35g de fosfato (17% de P_2O_5) e 0,24g de sulfato de amônio (21% de N), com base na análise química (Tabela 1) do solo e na recomendação do Boletim Técnico 100 IAC (RAIJ et al., 1996).

Na ocasião da adubação de cobertura foi aplicada a mesma quantia de cloreto de potássio e sulfato de amônio. Os cálculos foram realizados levando-se em conta os resultados da análise química e o volume de terra nos primeiros 20 cm das colunas, simulando a adubação da camada arável.

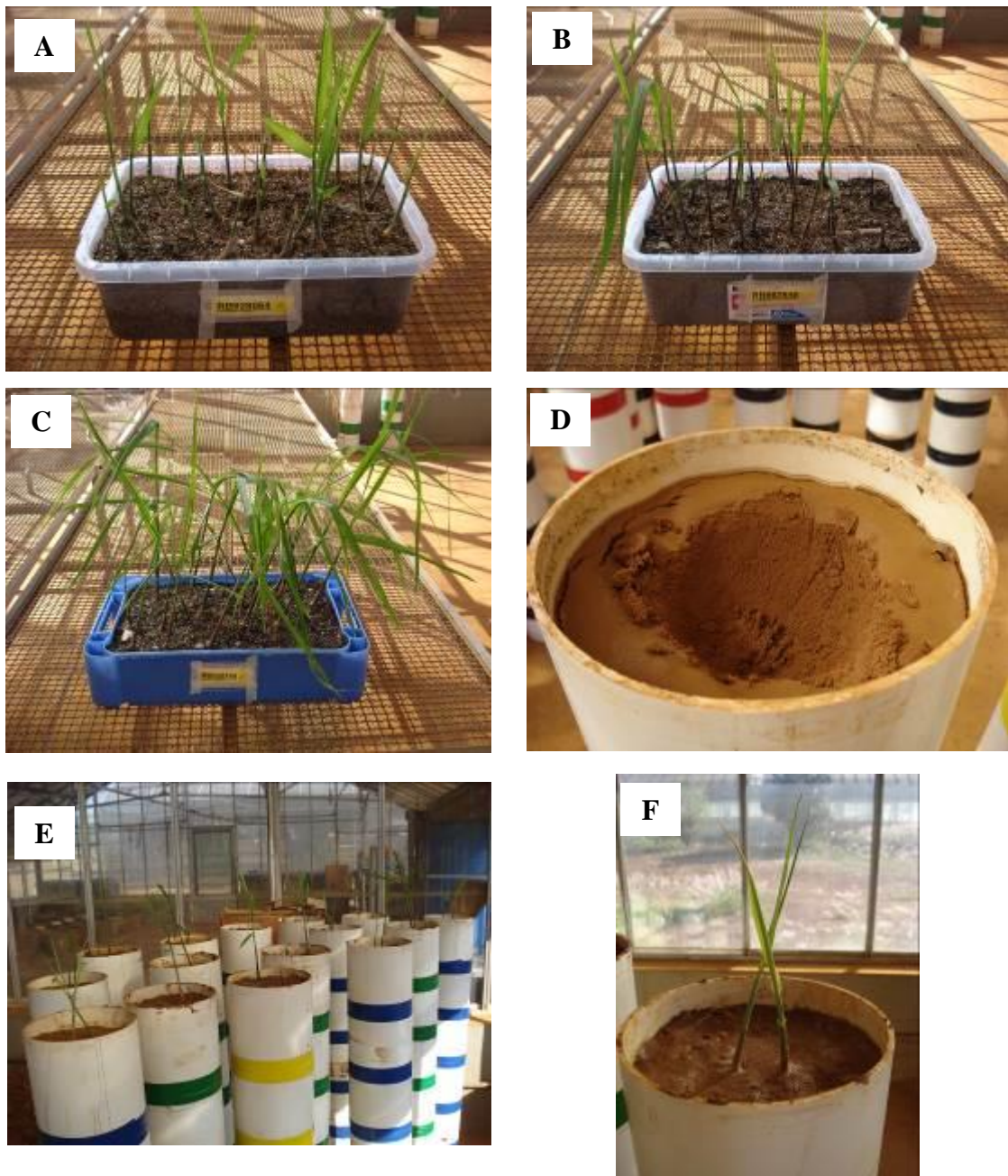


Figura 6. Toletes pré-germinados. A. Variedade RB928064; B. Variedade RB867515; C. Variedade RB935744; D. Preparação para o plantio dos toletes; E. Vista geral dos toletes plantados; F. Detalhe dos toletes plantados na coluna.

3.3.4 Análise dos parâmetros fisiológicos

O experimento foi conduzido por 6 meses, a partir da data do transplântio para as colunas. No último mês, foram feitas análises dos parâmetros fisiológicos utilizando um analisador de gás infravermelho (IRGA) com fluxo de ar de 300 mL min^{-1} e uma fonte de luz acoplada de $995 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (ADC, modelo LCI, Hoddesdon, UK). A medição foi realizada na 3ª folha totalmente expandida (MCCORMICK et al., 2006) no período da manhã (entre 8:00 e 10:00 h), em todas as plantas do experimento e nas controle (total de 30 plantas). Os parâmetros fisiológicos analisados foram taxa de transpiração ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), taxa fotossintética ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e condutância estomática ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

3.3.5 Coleta do experimento em casa-de-vegetação

Os mini-toletes de cana-de-açúcar, do experimento conduzido em casa-de-vegetação, foram plantados em 07 de agosto de 2015 e coletados em 26 de fevereiro de 2016, sendo conduzido por 203 dias ou 6 meses e 18 dias (Figura 7).

Ao final do experimento, foram coletadas amostras de tecido vegetal para análise de nutrientes, teores de alumínio nas folhas e raízes e para a extração de clorofila. O último anel inferior (de cima para baixo) de cada coluna de solo foi cortado e lavado para remover completamente o solo que aderiu ao sistema radicular. Todo o volume de raiz deste anel foi separado para análise posterior. As amostras de folhas foram coletadas de acordo com a descrição morfológica da cultura e o sistema de descrição de folhas Kuijper (DILLEWIJN, 1952). Amostras de folhas representativas de cada tratamento foram formadas pelo terço central das folhas +1 e +2 sem a nervura, para todas as repetições. A Folha +1 é a primeira folha expandida a partir da parte superior da planta. A Folha +2 é a folha imediatamente abaixo da folha +1.

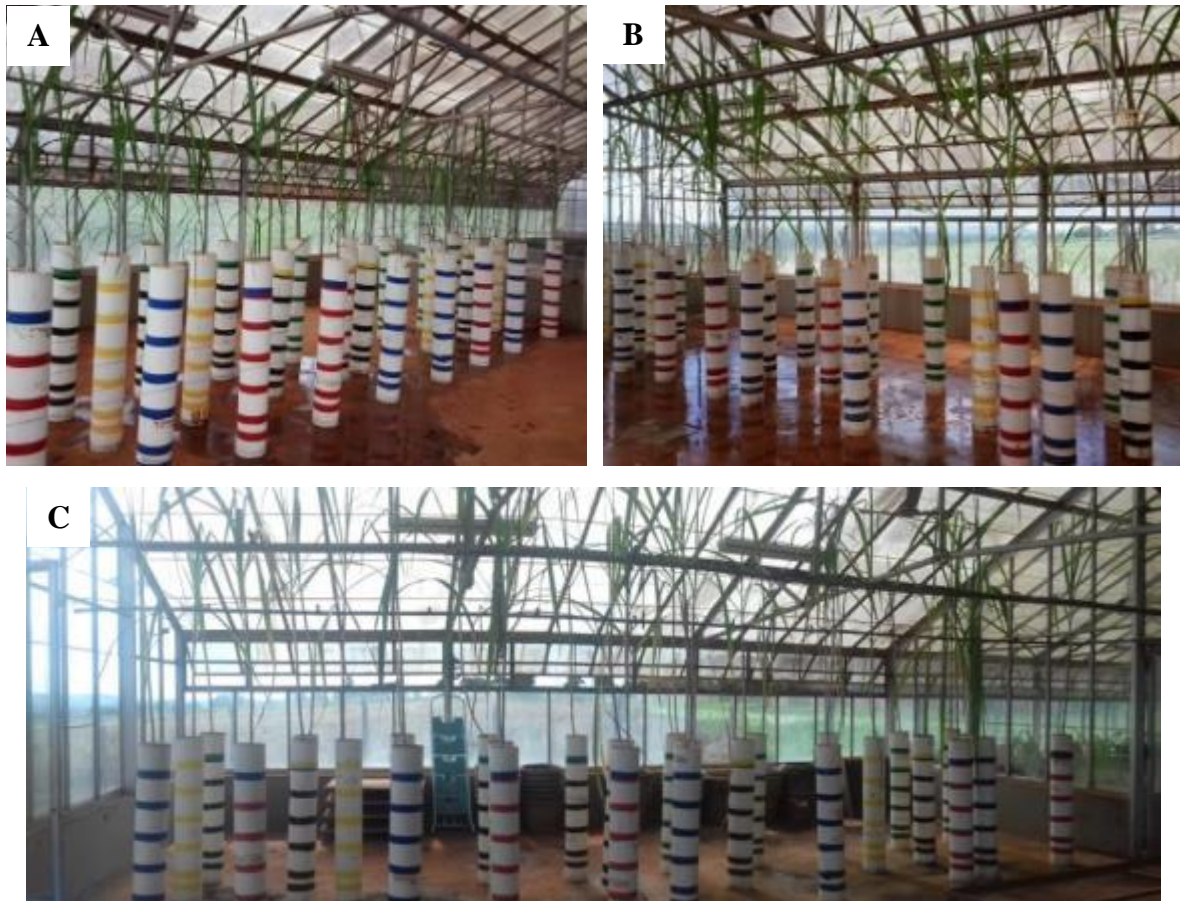


Figura 7. Crescimento das variedades de cana-de-açúcar em casa-de-vegetação durante o experimento. A. 3 meses após o plantio; B. 5 meses após o plantio; C. 6 meses após o plantio, dia da coleta.

Para a extração de RNA, amostras de raiz e folha foram armazenadas em tubos tipo Falcon de 50 ml e imediatamente acondicionadas em nitrogênio líquido. Os tecidos separados para a análise de ácidos orgânicos foram armazenados em sacos plásticos e congelados, enquanto que para a análise de teor de alumínio e nutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S), foram colocadas em sacos de papel pardo e levadas para estufa de circulação forçada à 65°C até peso constante. Após a secagem foram moídas em moinhos tipo Willey com facas, uma câmara de aço inoxidável e peneiras de 1 mm de diâmetro para assegurar a homogeneização da amostra.

3.4 Experimento em solução nutritiva

Após o período de pré-germinação, os mini-toletes foram retirados da bandeja com vermiculita, lavados cuidadosamente para retirada de todo o material e transferidos para solução nutritiva calculada conforme o método prático de Cometti et al. (2006), onde permaneceram por 7 dias (Figura 7E). Posteriormente os mini-toletes foram transferidos para uma solução contendo duas concentrações diferentes de Al, 0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (controle) e 3000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Al fornecido na forma de cloreto de alumínio hexahidratado ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – Merck®), onde permaneceram por 10 dias (Figura 7F). O pH da solução nutritiva contendo Al foi mantido em 4,0 ($\pm 0,2$) para garantir o predomínio da espécie livre trivalente de Al [$\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$] (ROSSIELLO e JACOB NETO, 2006). Nesta etapa, o Fe foi omitido da solução, para evitar a interferência em análises futuras assegurando a complexação exclusiva do Al, e a concentração de P foi reduzida para 0,0025 mmol L^{-1} , para contornar problemas de precipitação com o Al (BRACCINI et al., 2000). Ao final do experimento, amostras de tecidos das raízes e folhas foram coletados e devidamente identificados. O material para análise de RT-qPCR foi colocado em tubos tipo Falcon de 50 mL, transportado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer a -80°C . Em seguida esse material foi macerado em gral com nitrogênio líquido, armazenado em tubos tipo Eppendorfs e transportados em isopor com nitrogênio líquido até o Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Departamento de Genética e Evolução, na UFSCar campus São Carlos.

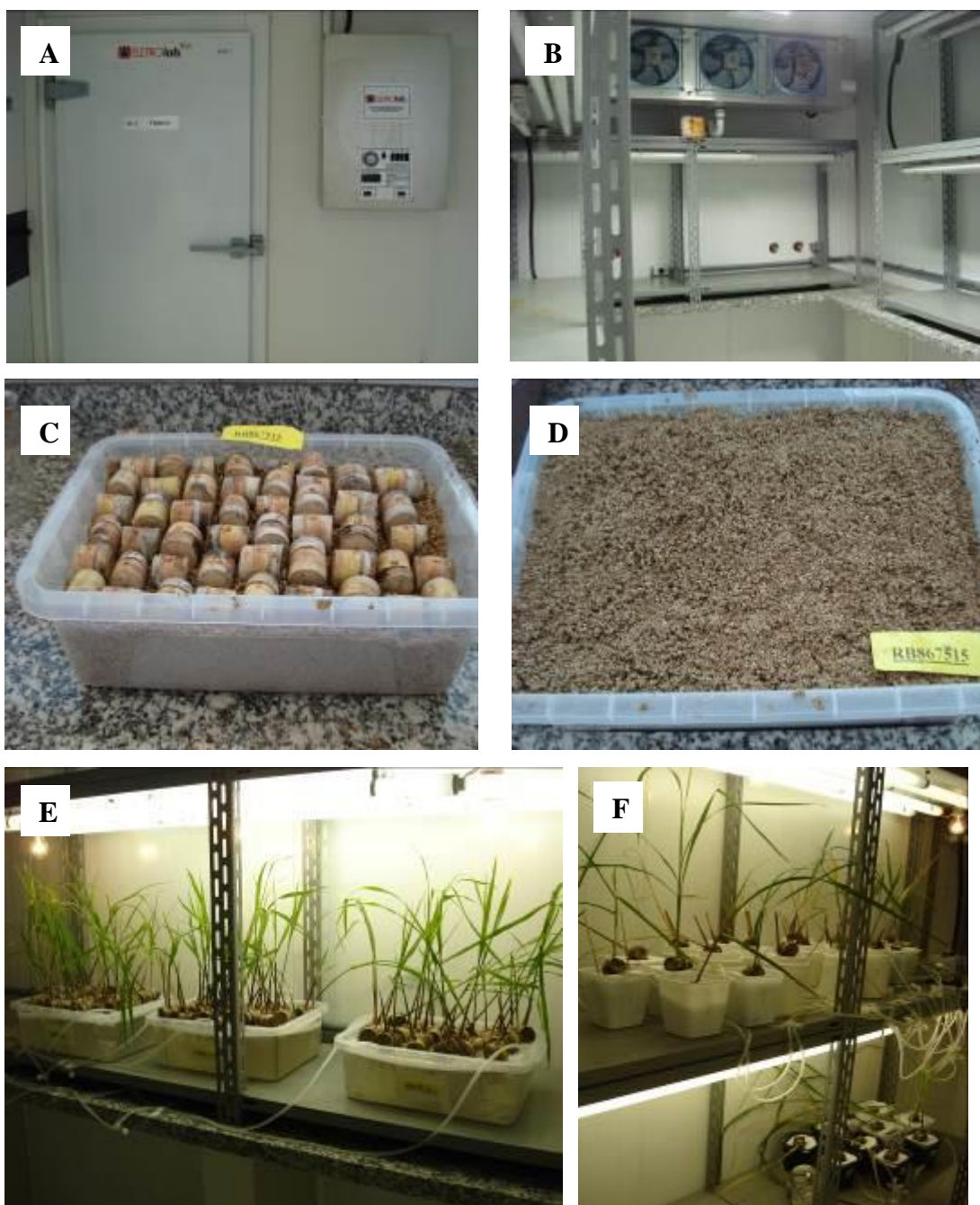


Figura 8. Experimento em solução nutritiva. A. Vista externa do Fitotron; B. Vista interna do Fitotron; C. Toletes selados com parafina sobre vermiculita; D. Toletes cobertos com vermiculita e prontos para serem levados à câmara de germinação; E. Toletes em solução nutritiva; F. Toletes expostos aos tratamentos controle (solução nutritiva) e estresse por alumínio (solução nutritiva com alumínio).

3.5 Teor de alumínio e nutrientes na planta

Inicialmente foi proposta a determinação do teor de alumínio em raízes e folhas. Contudo, para o experimento conduzido em solução nutritiva, não houve material suficiente para a realização da análise das folhas no tratamento exposto ao estresse por alumínio. Assim, as análises foram realizadas apenas nas raízes. Para o experimento conduzido em casa-de-vegetação, o teor de alumínio foi determinado para raízes e folhas. A análise foi feita de acordo com Brauner et al. (1966), através de oxidação da matéria seca, por incineração do material vegetal. Foi adicionado ácido clorídrico ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) ao material queimado, e o extrato formado foi tratado com aluminon (0,10%) (sal de triamônio do ácido aurintricarboxílico). O aluminon interage com o Al para formar um complexo e a intensidade da cor desenvolvida é medida usando um espectrofotômetro a 520 nm com referência a uma curva padrão com concentrações predeterminadas de Al.

O nutrientes N, P, K, Ca, Mg e S foram analisados nas plantas por digestões nítrico-perclórica e sulfúrica, de acordo com método de Raij et al. (2001). Partes de amostras de raízes e folhas foram submetidas a solubilização com ácido sulfúrico concentrado para oxidar a matéria orgânica e transformar nitrogênio orgânico em uma forma mineral (sulfato de amônio). O conteúdo de N foi determinado pelo método semi-micro Kjeldahl, destilação a vapor e titulação para quantificação de NH_4 . H_2SO_4 e catalisadores quentes transformam a proteína e os aminoácidos do tecido vegetal em N-NH_4^+ , que é destilado, complexado com ácido bórico, misturado com um indicador e titulado com uma solução padrão de H_2SO_4 diluído.

Para determinar os teores de P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe, Mn e Zn, as amostras foram primeiro solubilizadas com ácido nítrico (65%) e perclórico (70%). O teor de fósforo foi determinado por espectrometria de vanádio amarelo. O ânion H_2PO_4 reage

com molibdato (MoO_4^{2-}) e vanadato (VO_3^{2-}) num meio ácido para formar um complexo amarelo que absorve a luz na região de 420 nm, que é detectável com um espectrômetro UV-VIS. O teor de K foi determinado por espectrometria de chamas de emissão em comprimentos de onda entre 766 e 767 nm. Os teores de Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn foram determinados por espectrometria de absorção atômica com lâmpadas específicas de cátodo oco para cada elemento. Para evitar a interferência de íons nas determinações de Ca e Mg, foram adicionadas soluções de lantânio e estrôncio.

O teor de enxofre foi medido por turbidimetria, que se baseia na turbidez causada pela precipitação de íons sulfato por cloreto de bário na forma de sulfato de bário (BaSO_4). Esta turbidez foi quantificada usando um espectrômetro UV-VIS. O resto das amostras foram incineradas em um forno elétrico de mufla a uma temperatura entre 500 e 550°C. A cinza resultante foi dissolvida numa solução diluída ácida de ácido nítrico ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). O extrato resultante foi utilizado para a determinação de B, que se baseia na formação de um complexo de coloração amarelo, resultante da reação do ácido bórico com o reagente de azometina-H e foi determinado por espectrometria.

3.6 Quantificação de clorofila

A quantificação dos teores de clorofila *a*, *b* e total (*a+b*) será feita por extração em amostras de fragmentos foliares do terço médio da folha diagnóstico +1, que corresponde a primeira folha mais nova da planta que esteja completamente expandida e com a aurícula visível. A análise será de acordo com a metodologia de Carlin et al., (2012) em que 0,5 g de tecido vegetal será macerado com 5 mL de acetona 80%, e após será filtrado a vácuo com o volume final completado até 50 mL com acetona. Os extratos passaram por espectrofotômetro para leitura de absorbância nos comprimentos de onda de 663 nm (clorofila *a*), 645 nm (clorofila *b*) e 652 nm (clorofila total). Os

teores de clorofila foram expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$ de massa fresca de acordo com as equações (Eq. 1-3) a seguir:

$$\text{Clorofila } a = ((12,7 \times (A_{663}) - 2,69 \times (A_{645})) \times \frac{V}{1000 \times W}) \times 1000 \quad (1)$$

$$\text{Clorofila } b = ((22,9 \times (A_{645}) - 4,68 \times (A_{663})) \times \frac{V}{1000 \times W}) \times 1000 \quad (2)$$

$$\text{Clorofila total } (a + b) = \left(\frac{((A_{652}) \times 1000)}{34,5} \times \frac{V}{1000 \times W} \right) \times 1000 \quad (3)$$

Onde: A= absorvância (nm); V= volume final do extrato (acetona 80% + clorofila); W= massa fresca das amostras (g).

3.7 Oligonucleotídeos para a análise de expressão gênica por qRT-PCR

Para as análises de qPCR foram selecionados 3 genes, previamente descritos na literatura (CASU et al., 2004; VETTORE et al., 2001). Para todos os genes são relatados mecanismos relacionados com a tolerância ao Al, seja pela via de estresse oxidativo ou pela produção de ácidos orgânicos (Tabela 4).

Oligonucleotídeos específicos para o controle endógeno e para os genes estudados foram desenhados utilizando o programa Primer 3 versão 4.0 (www.frodo.wi.mit.edu/primer3), com parâmetros específicos para qPCR: conteúdo de GC de 45 a 55%, Tm variando de 55 a 61 °C, não complementariedade entre os primers e temperatura de hibridização próxima para o par de primers para a amplificação de um fragmento de aproximadamente 100 pb (GIULIETTI et al., 2001).

Tabela 4. Genes selecionados para o estudo de expressão gênica em variedades de cana-de-açúcar

Gene	Organismo	Gene Bank	Descrição	Grupo	Referência	Sequência 5' - 3'
SDH	<i>Saccharum</i> hybrid cultivar Q117	CF576911.1	Succinato desidrogenase	Ácidos orgânicos	Casu et al.(2004)	(F) TGCATCACCAAGCTCTTTC
						(R) CCACCTCCAATCATCTTCAC
MDH	<i>Saccharum</i> hybrid cultivar SP803280	CA119663.1	Malato desidrogenase	Ácidos orgânicos	Vettore et al.(2001)	(F) CTTGATGTAATGAGGGCAAATAC
						(R) AGGAGTGGGAGTAATCGTAAG
SOD	<i>Saccharum</i> hybrid cultivar SP803280	CA148508.1	Superóxido dismutase/Cu- Zn	Estresse oxidativo	Vettore et al.(2001)	(F) AACCCCGATGGTAAAACACA (R) AAGGTGGCAGTTCCATCATC
POLI	_____	_____	Poliubiquitina	Gene de referência	PAPINI- TERZI et al. (2005)	(F) CCCTCTGGTGTACCTCCATTG (R) CCGGTCTTTAAACCAACTCAGT

F: Forward; R: Reward

3.8 Extração do RNA total de folhas e raízes

A extração de RNA total foi realizada a partir dos tecidos de folhas e raízes das variedades de cana-de-açúcar cultivadas em solução nutritiva. A análise de expressão gênica foi realizada em tecidos de folhas e de raízes, pois de acordo com a literatura, alguns genes podem ser expressos em ambos os lugares (LARSEN et al., 2005; LARSEN et al., 2007) ou exclusivamente nas raízes (HUANG et al., 2009; MAGALHAES et al., 2007; REZAEI et al., 2013), onde ocorrem as injúrias causadas pelo Al.

Para todas estas extrações foi utilizado o reagente Trizol[®] (Invitrogen[®]), baseando-se na metodologia descrita por Chomczyn e Sacchi (1987). A integridade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (1%) em tampão TAE (tampão Tris-Acetato-EDTA), contendo brometo de etídeo (1µg/mL), em 90V por 20 minutos e visualizados em luz UV. Após, foi realizada uma quantificação por espectrofotometria em NanoDrop 1000 *Spectrophotometer* (Thermo scientific), em comprimento de onda

de 260 nm, e a pureza do RNA foi confirmada através da razão das leituras a 260 e 280 nm.

3.9 Síntese de cDNA por transcriptase reversa

Para garantir que não tenha contaminação por DNA, antes da síntese de cDNA 3 µg de todas as amostras de RNA total foram tratadas com DNase I *amplification grade* (Invitrogen), em um volume de reação de 30 µL. Em cada tubo foram adicionados 3 µL de DNase I (1U/µL) e 3 µL do tampão de reação 10x. Os tubos foram incubados 15 min a temperatura ambiente e a enzima foi posteriormente inativada pela adição de 3 µL de EDTA 25 mM e incubação a 65°C por 10 min. A integridade do RNA foi analisada em gel de agarose 1% e a quantificação do mesmo foi feita através da leitura em espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific) em comprimento de onda de 260 nm. A pureza do RNA foi confirmada através da razão das leituras a 260 e 280 nm.

Para a síntese de cDNA foi utilizado o RNA total de raiz da variedade RB935744, submetida ao tratamento com alumínio em solução nutritiva, que possui média tolerância ao alumínio e que pode expressar os genes responsáveis por essa característica. A reação de síntese foi feita utilizando o Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), que utiliza oligonucleotídeos randômicos para iniciar a síntese do cDNA. Na reação de síntese de cDNA foram utilizados 5 µg de RNA total, tampão da enzima transcriptase reversa 1X, dNTPs 2,5 mM, oligonucleotídeo randômico 1X, transcriptase reversa MultiScribe™ 2,5 U/µL e inibidor de RNase 1 U/µL em um volume final de 20 µL. A reação foi realizada em termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf) com o seguinte programa: 65°C por 5 min, 25°C por 10 min, 37°C por 120 min, 85°C por 5 min e 4°C ∞.

3.10 Padronização e eficiência dos primers para a reação de qPCR

O cDNA sintetizado foi usado para a padronização dos primers, e a eficiência foi testada partindo-se de um pool de amostras de folha do tratamento controle da variedade RB928064, em uma concentração de 50 ng. A partir dessa concentração de cDNA foram realizadas diluições seriadas em 0,5x, 0,25x, 0,125x e 0,625, correspondendo a um total de 5 pontos.

Uma curva padrão de Ct (ciclo threshold) x quantidade de cDNA foi feita para testar a melhor concentração de cDNA a ser usada, a especificidade dos oligonucleotídeos e a eficiência da reação. A curva padrão é um passo importante na qPCR por determinar a melhor concentração a ser usada por cada par de primers de forma que a amplificação A fórmula para eficiência (E), $E = [10^{(-1/IR)}] - 1$, é usada para o cálculo de eficiência, sendo que para E = 100% é necessário um IR de 3,3, com variação aceita de $\pm 0,3$, sendo a curva linear com um $R^2 \geq 0,99$ (PFAFFL, 2006), significando que o número de moléculas molde dobra a cada ciclo da qPCR. Neste trabalho, os parâmetros foram ajustados para uma eficiência entre 95 e 105%, $R^2 > 0,95$.

3.11 Análise de expressão gênica relativa por qPCR para os genes selecionados, em variedades de cana-de-açúcar submetidas ao tratamento com alumínio em solução nutritiva.

O kit *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen) foi utilizado para as reações. O fluoróforo *SYBR Green I*, emite fluorescência ao se ligar ao DNA dupla fita, a enzima uracil-N-glicosidase (UDG) e dUTP em substituição ao dTTP. A enzima UDG remove resíduos de uracila presentes em moléculas de DNA fita simples ou dupla, evitando que DNA contendo uracila, resultante de ampliações prévias, sirva como molde na reação. Após o passo de descontaminação, a UDG é inativada por altas

temperaturas durante os passos da qPCR, permitindo amplificação de sequências genuínas. A qPCR foi realizada em volume de 10 μ L contendo 2 μ L de cDNA, 5 μ L de *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG 1X*, a concentração de cada oligonucleotídeo foi específica de acordo com a eficiência de cada um, e o volume final foi completado com água DEPC. As análises de expressão gênica foram feitas utilizando a Poliubiquitina como gene endógeno em todas as reações e os primers SDH (succinato desidrogenase) e MDH (malato desidrogenase) que atuam nas vias de produção de ácidos orgânicos; e SOD (superóxido dismutase/Cu-Zn) que está relacionado com o estresse oxidativo em plantas. As concentrações usadas dos primers foram 300 mM, 100 mM, 450mM e 450mM para Poliubiquitina, SDH e MDH respectivamente.

A reação de amplificação foi realizada no aparelho Eco Real-Time System (Illumina) nas seguintes condições: incubação da UDG durante 2 min a 50°C, ativação da polimerase por 2 min a 95°C, seguida de 40 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 55°C e 40 s a 72°C. A especificidade das amplificações foi confirmada por meio da análise da curva de dissociação (*melting*) em ciclo recomendado pelo fabricante do equipamento de 15 s a 95°C, 15 s a 55°C e 15 s a 95°C.

A análise da curva de dissociação obtida no aparelho Eco Real-Time System (Illumina) permitiu determinar se o produto de PCR desejado estava livre de produtos de amplificação inespecíficos como dímeros de primers. Os produtos de PCR podem ser analisados pela curva de dissociação, pois cada molécula de DNA dupla fita tem uma temperatura de dissociação característica (T_m), na qual 50% das moléculas de DNA estão como dupla fita e 50% está dissociada em fita simples. Durante o processo, a mistura de reação é lentamente aquecida até 95°C e a fluorescência monitorada durante todo o processo. À medida que os produtos amplificados começam a desnaturar, o *SYBR*

Green é liberado do DNA dupla fita, o que resulta na diminuição da fluorescência. Uma forte diminuição na fluorescência do SYBR é observada quando a temperatura alcança a T_m do produto de PCR presente na reação. A curva de dissociação de cada produto depende do conteúdo de GC, tamanho e sequência, permitindo a distinção de produtos de amplificação específicos dos não específicos, como contaminação ou dímeros de primers.

A análise de expressão gênica é feita pela fase exponencial da reação, devido à alta especificidade e precisão. Em determinado tempo após o início da amplificação, o produto formado pela PCR é suficientemente forte para produzir um sinal acima do limite arbitrário de detecção, chamado *threshold*, diferenciando a fluorescência resultante da amplificação amostral, da gerada pela fluorescência basal. É denominado *Ct* (*cycle threshold*) quando esse limite é atingido, sendo que quando a eficiência da reação é de 100%, a quantidade de produto dobra de maneira uniforme a cada ciclo. Quanto maior for a expressão do gene alvo, maior o número de cópias e menor o valor de *Ct*. Dessa forma, é importante a calibração da quantidade de cDNA utilizada na reação para que a expressão não seja subestimada.

3.12 Normalização dos dados e cálculo da expressão relativa

As análises foram realizadas em triplicatas técnicas de duas amostras biológicas independentes. Para todas as reações foram adicionados controles negativos e um gene de referência que é utilizado como gene calibrador da reação.

As análises de qPCR quantitativo para avaliar a expressão diferencial foram realizadas pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$, como descrito por Livak e Schmittgen (2001).

Após a obtenção dos valores médios de Ct, a expressão relativa é realizada pela comparação da expressão de um gene de interesse, ou gene alvo, com um gene de referência que é o controle endógeno, sendo $\Delta Ct = Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ gene endógeno}$.

Após a normalização do gene alvo pelo gene endógeno, é realizada a normalização dos valores de Ct da expressão gênica de determinada condição com a condição que se quer comparar. Nesse estudo foram comparadas as plantas de cana-de-açúcar cultivadas em solução nutritiva com Al com as plantas controle, cultivadas sem a presença de Al. Sendo $\Delta Ct = Ct \text{ plantas tratadas} - Ct \text{ plantas não tratadas}$. Os valores obtidos correspondem à expressão $2^{-\Delta\Delta Ct}$, que indica quantas vezes os genes em estudo foram mais ou menos expressos nas plantas tratadas quando comparados com a expressão nas plantas não-tratadas (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

4. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados das análises de teor de alumínio e de nutrientes e das medições realizadas pelo IRGA foram submetidos à análise de variância pelo programa STATSOFT STATISTICA 7.0 e, havendo significância pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

Os resultados referentes à expressão relativa foram submetidos ao Teste t e foi considerado significativo ao nível de 5%, ou seja, $p \leq 0,05$, em um intervalo de 95% de confiança.

5. RESULTADOS

5.1 Teor de nutrientes nas raízes e folhas

O efeito dos fatores “Al” e “variedades” foram significativos para o teor dos nutrientes N, P, K, Mg e S nas raízes de cana-de-açúcar cultivadas em casa-de-vegetação (Tabela 5). As variedades RB928064 e RB935744 apresentaram maior teor de nutrientes nas raízes em comparação com a RB867515. Contudo, no tratamento com Al, os teores de N, P e K observados na RB867515 foram maiores do os do tratamento controle (Tabela 6).

Tabela 5. Quadro de análise de variância de três variedades de cana-de-açúcar cultivadas em LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO Distrófico, no tratamento controle e com adição de cloreto de alumínio, em relação ao teor nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre nas raízes.

Fator de Variação	GL	Teste F					
		Nutrientes nas raízes					
		<i>Nitrogênio</i>	<i>Fósforo</i>	<i>Potássio</i>	<i>Cálcio</i>	<i>Magnésio</i>	<i>Enxofre</i>
Tratamentos	1	38.45**	18.23**	1725.92**	189.41**	3968.17**	61.09**
Variedades	2	148.36**	111.84**	2240.62**	228.17**	491.04**	30.54**
Cul. x Trat.	2	57.62**	12.17**	1372.21**	3.12 ns	255.68**	11.07**
Resíduo	24						
Total	29						
CV%		7.81	11.74	2.44	6.94	4.96	25.96

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$)

ns: não significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p \geq 0.05$)

Tabela 6. Médias dos teores de N, P, K, Mg e S nas raízes de variedades de cana-de-açúcar cultivadas em LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO Distrófico, em relação aos fatores tratamento (controle e Al) e variedades.

Tratamento	Média do teor de nutrientes nas raízes (g/kg)					
	Nitrogênio			Fósforo		
	RB928064	RB935744	RB867515	RB928064	RB935744	RB867515
Controle	13.50 aA	10.00 aB	5.75 bC	0.82 aA	0.56 aB	0.29 aC
Alumínio	10.50 bA	6.00 Bc	8.00 aB	0.61 bA	0.44 bB	0.34 aC
	Potássio			Magnésio		
	RB928064	RB935744	RB867515	RB928064	RB935744	RB867515
Controle	24.46 aA	17.08 aB	6.99 bC	3.90 aA	3.51 aB	1.76 aC
Alumínio	11.26 bB	12.81 bA	9.32 aC	1.18 bA	0.67 bB	0.66 bB
	Enxofre					
	RB928064		RB935744		RB867515	
Controle	5.59 aA		3.09 aB		1.92 aC	
Alumínio	2.11 bA		1.59 bA		1.17 aA	

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna e maiúsculas iguais na linha, não diferem pelo Teste de Tukey a 5%.

A análise estatística para o teor de Ca nas raízes mostrou-se significativa para os fatores tratamentos (controle e Al) e variedades isoladamente (Tabela 5). O tratamento com Al prejudicou o teor desse nutriente, sendo o valor observado menor em comparação com o tratamento controle. (Tabela 7). Independentemente do tratamento, a variedade RB928064 apresentou maior teor de Ca nas raízes, seguida pela RB935744 e RB867515 (Tabela 7).

Tabela 7. Médias dos teores de Ca nas raízes de variedades de cana-de-açúcar cultivadas em LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO Distrófico, em relação ao fator tratamento (controle e Al) e fator variedades isoladamente.

Tratamento	Média do teor de cálcio nas raízes (g/kg)
Controle	3.12 a
Alumínio	2.19 b
Variedade	
RB928064	3.58 a
RB935744	2.54 b
RB867515	1.83 c

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna não diferem pelo Teste de Tukey a 5%.

Para os teores de N, P e K nas folhas, ocorreu interação estatística entre os fatores variedades e tratamento (Tabela 8). A influência da interação entre a variedade de cana-de-açúcar e Al ocasionou um padrão nutricional nas raízes diferente do observado nas folhas. A variedade RB935744 apresentou maiores teores de P e de N, enquanto a RB928064 apresentou maior de teor de K. O tratamento com Al não afetou os teores de N e de P, para a variedade RB867515, e os teores de K, para a RB928064 (Tabela 9). Os teores de Ca, Mg e S nas folhas foram significativos apenas para os fatores variedades e tratamento isoladamente (Tabela 8). O tratamento com Al ocasionou menores teores de Ca e Mg nas folhas, independentemente da variedade. A variedade RB928064 apresentou maiores teores de Ca, Mg e S, seguido pela RB935744, que diferiu apenas para S, onde o maior teor foi observado na variedade RB867515 (Tabela 10).

Tabela 8. Quadro de análise de variância de três variedades de cana-de-açúcar cultivadas em LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO Distrófico, no tratamento controle e com adição de cloreto de alumínio, em relação ao teor nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre nas folhas.

Fator de Variação	GL	Teste F					
		Nutrientes nas folhas					
		<i>Nitrogênio</i>	<i>Fósforo</i>	<i>Potássio</i>	<i>Cálcio</i>	<i>Magnésio</i>	<i>Enxofre</i>
Tratamentos	1	11.31**	0.99 ns	14.50**	30.18**	17.11**	1.97ns
Variedades	2	43.18**	39.47**	33.71**	34.22**	19.08**	21.45**
Cul. x Trat.	2	3.98**	13.71**	3.83*	2.63 ns	0.67 ns	0.91 ns
Resíduo	24						
Total	29						
CV%		6.55	7.63	10.55	11.13	13.97	17.29

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0.05$)

ns: não significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p \geq 0.05$)

Tabela 9. Médias dos teores de N, P, K, Mg e S nas folhas de variedades de cana-de-açúcar cultivadas em LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO Distrófico, em relação aos fatores tratamento (controle e Al) e variedades.

Tratamento	Média do teor de nutrientes nas folhas (g/kg)					
	Nitrogênio			Fósforo		
	RB928064	RB935744	RB867515	RB928064	RB935744	RB867515
Controle	16,20 aB	18,91 aA	13,93 aC	0.90 aB	1.01 bAB	1.07 aA
Alumínio	13,82 bB	17,33 bA	14,10 aB	0.77 bC	1.24 aA	1.06 aB
	Potássio					
	RB928064		RB935744		RB867515	
Controle	13.05 aA		8.15 aB		11.46 aA	
Alumínio	11.10 bA		8.15 aB		8.94 bB	

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna e maiúsculas iguais na linha, não diferem pelo Teste de Tukey a 5%.

Tabela 10. Médias dos teores de Ca, Mg e S nas folhas de variedades de cana-de-açúcar cultivadas em LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO Distrófico, em relação ao fator tratamento (controle e Al) e fator variedades isoladamente.

Tratamento	Média do teor de nutrientes nas folhas (g/kg)	
	Ca	Mg
Controle	4.75 a	2.34 a
Alumínio	3.79 b	1.89 b

Variedade	Ca	Mg	S
RB928064	5.05 a	2.22 a	1.94 a
RB935744	4.43 b	2.46 a	1.16 c
RB867515	3.32 c	1.66 b	1.52 b

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna não diferem pelo Teste de Tukey a 5%.

As Figuras 9 e 10 indicam os teores dos nutrientes somados de raízes e folhas para as variedades estudadas, em cada tratamento. Para N, P e K, a variedade RB928064 apresentou os maiores valores para os dois tratamentos, com exceção do P, onde o maior teor foi no tratamento com Al na variedade RB935744. Os menores teores de nutrientes foram observados na RB867515. Contudo, essa variedade apresentou a menor alteração de teores nutricionais entre os tratamentos “controle” e “Al”, quando comparadas com os outros genótipos. (Figura 9).

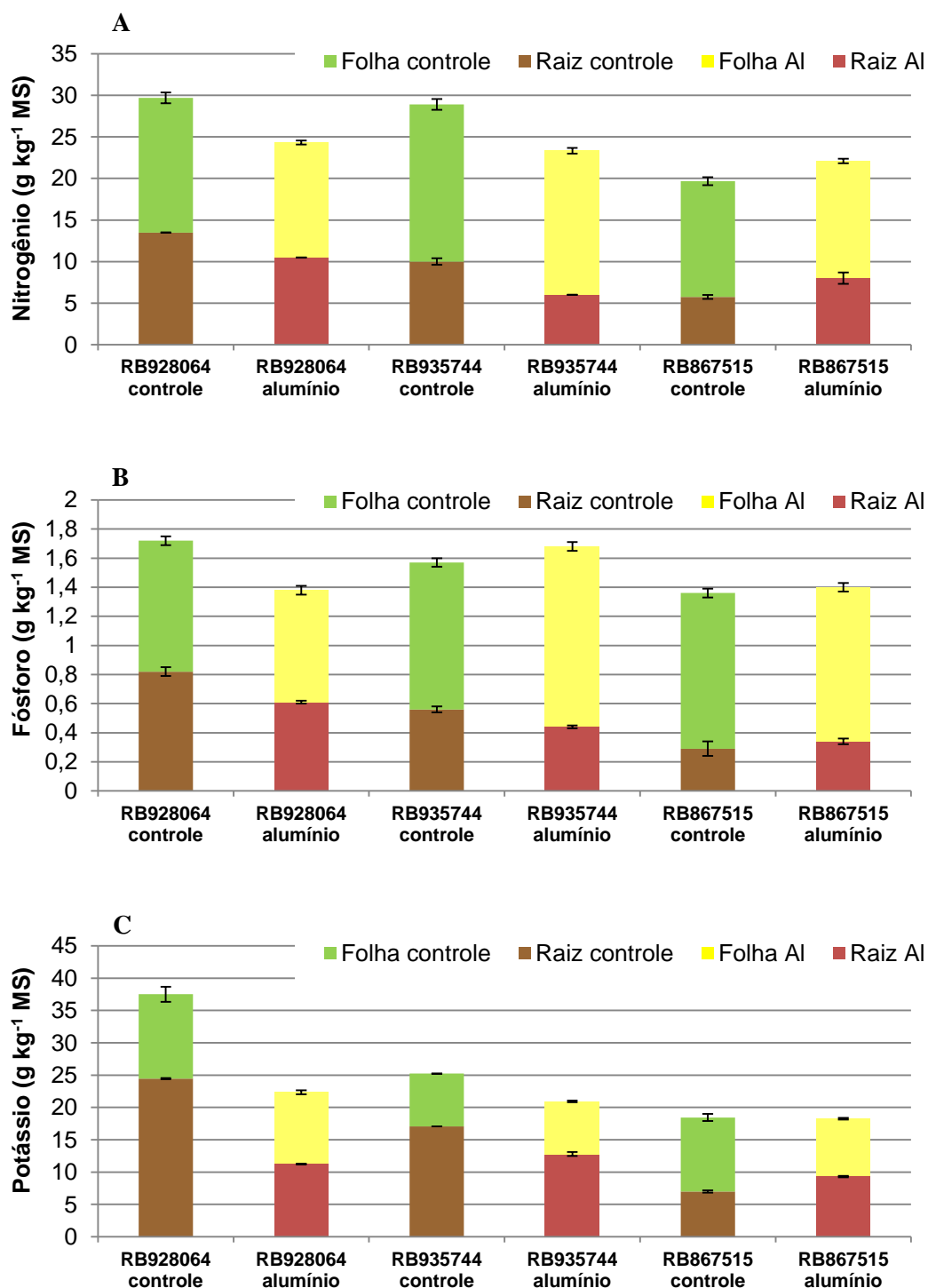


Figura 9. Acúmulo de nitrogênio, fósforo e potássio em cana-de-açúcar cultivada em LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO Distrófico, em tratamento controle e com estresse pelo Al. (A) Nitrogênio em raízes e folhas em tratamento controle e com Al. (B) Fósforo em raízes e folhas em tratamento controle e com Al. (C) Potássio em raízes e folhas em tratamento controle e com Al. Média de 5 repetições. MS: Massa seca. Barras representam erro padrão.

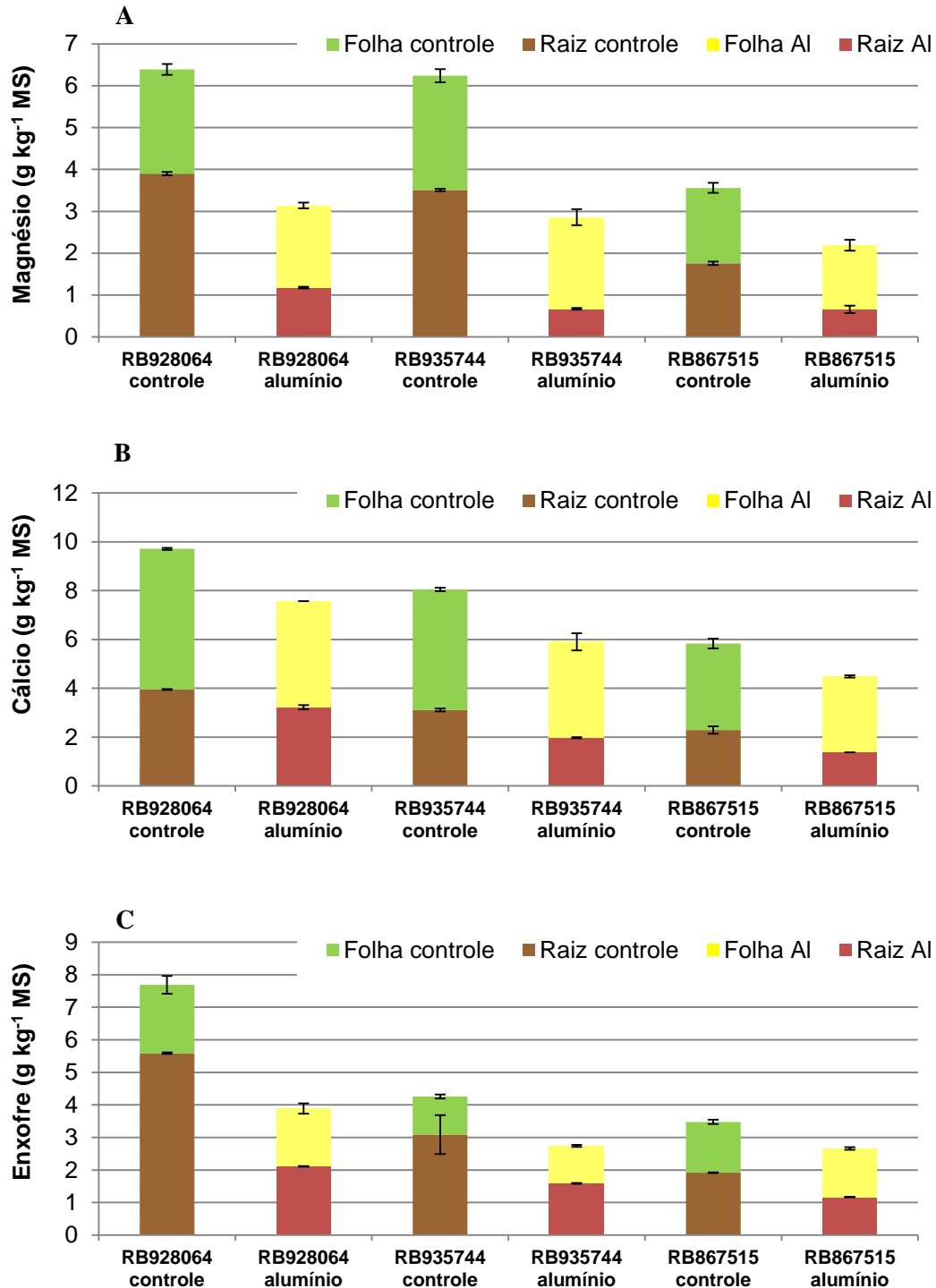


Figura 10. Acúmulo de magnésio, cálcio e enxofre em cana-de-açúcar cultivada em LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO Distrófico, em tratamento controle e com estresse pelo Al. (A) Magnésio em raízes e folhas no tratamento controle e com Al. (B) Cálcio em raízes e folhas no tratamento controle e com Al. (C) Enxofre em raízes e folhas em tratamento controle e com Al. Média de 5 repetições. MS: Massa seca. Barras representam erro padrão.

Para Mg, Ca e S, a variedade RB928064 apresentou os maiores valores para os dois tratamentos e também a maior alteração entre eles, sendo o teor dos nutrientes nos tecidos prejudicado pelo tratamento com Al. Exceção para o Ca, onde a diferença entre os tratamentos foi semelhante entre as variedades. Os menores teores de Mg, Ca e S foram observados para a RB867515, assim como a menor variação para Mg e S no tratamento com Al (Figura 10). O perfil dos teores nutricionais observados entre os genótipos indica a variedade RB928060 como a mais exigente em nutrientes, a RB935744 como intermediária e a RB867515, sendo a mais rústica, apresentou menor exigência nutricional.

5.2 Teores de alumínio nas raízes e folhas

A análise estatística para o teor de alumínio nas folhas foi significativa apenas para variedades (Tabela 11). O maior teor nas folhas foi observado para a variedade RB928064, enquanto para a RB935744 e RB867515 esse valor correspondeu quase a metade (Tabela 12).

Para o teor de Al nas raízes, houve significância estatística para os fatores variedades e tratamento, separadamente (Tabela 11).

Para o fator tratamento, considerando o controle e o com adição de Al, este último favoreceu o aumento do teor de Al nas raízes das variedades estudadas (491,65 mg kg⁻¹ de Al) (Tabela 12; Figura 11).

Para o fator variedades, a RB928064 apresentou menor teor de Al nas raízes, independentemente do tratamento, seguido da RB935744 e RB867515 (Tabela 12- Figura 11).

Tabela 11. Quadro de análise de variância de três variedades de cana-de-açúcar cultivadas em LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO Distrófico, no tratamento controle e com adição de cloreto de alumínio, em relação ao teor de Al nas raízes e folhas.

Fator de Variação	GL	Teste F	
		Teor de Al	
		<i>Raízes</i>	<i>Folhas</i>
Tratamentos	1	12.4843 **	0.0047 ns
Variedades	2	14.1262 **	16.7415 **
Var. x Trat.	2	2.3761 ns	0.2925 ns
Resíduo	12		
Total	17		
CV%		6.11	23.99

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$)

ns: não significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p \geq 0.05$)

Tabela 12. Médias dos teores de Al em raízes e folhas de variedades de cana-de-açúcar cultivadas em LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO Distrófico, em relação ao fator tratamento (controle e Al) e fator variedades isoladamente.

Tratamento	Média do teor de Al (mg/kg)	
	Raízes	
Controle	444.02 b	
Alumínio	491.65 a	
Variedade	Folhas	Raízes
RB928064	50.74a	423.85 b
RB935744	28.70b	468.05 a
RB867515	24.93b	511.60 a

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna não diferem pelo Teste de Tukey a 5%.

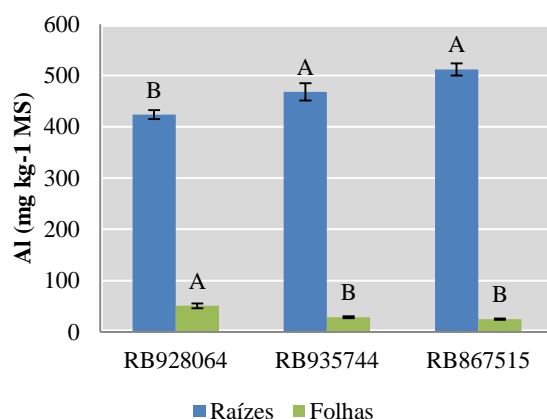


Figura 11. Média do acúmulo de Al em variedades de cana-de-açúcar em LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO distrófico. Teste de Tukey a 5% de significância. Letras maiúsculas comparam o acúmulo de Al entre variedades para o mesmo tecido (raiz ou folhas). MS: massa seca. Média de 5 repetições.

5.3 Teores de alumínio nas raízes do experimento em solução nutritiva

Para os mini-toletes de cana-de-açúcar cultivados em solução nutritiva em câmara de Fitotron, foi realizada a análise de variância dos dados referentes aos teores de alumínio nas raízes para a interação entre as variedades de cana-de-açúcar e os tratamentos (controle e alumínio). O teste mostrou alta significância estatística para os dois fatores e para a interação entre eles (Tabela 13), sendo aplicado o teste de Tukey para a interação (Tabela 14). Esse resultado aponta que os teores de alumínio nas raízes, em cada variedade, são dependentes não somente do teor de cloreto de alumínio adicionado, mas também da variedade de cana-de-açúcar.

Tabela 13. Quadro de análise de variância de três variedades de cana-de-açúcar submetidas à presença e ausência de alumínio em solução nutritiva.

Fator de Variação	GL	SQ	QM	F
Variedade	2	134523349.93	67261674.97	0.0054**
Tratamento	1	242389923.61	242389923.61	0.0196**
Cul. x Trat.	2	111341657.99	55670828.99	0.0045**
Tratamento	5	488254931.53	97650986.31	0.0079**
Resíduo	12	14.84	1.24	
Total	17	488254946.37		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

Assim como o resultado observado para o teor de Al analisado nas variedades de cana-de-açúcar cultivadas em casa-de-vegetação, a RB928064, apresentou estatisticamente o menor teor de alumínio nas raízes em comparação com as outras variedades utilizadas no experimento (Tabela 14).

Tabela 14. Médias dos teores de alumínio nas raízes de cana-de-açúcar cultivadas em solução nutritiva, no tratamento controle e com adição de cloreto de alumínio.

Variedade	Média teor de Alumínio (mg/kg)	
	Controle	Alumínio
RB928064	4740.79 bB	5050.167 cA
RB935744	6053.31 aB	17130.26 aA
RB867515	2906.05 cB	13537.45 bA
CV% = 0.01	DMS colunas = 2.42	DMS linhas = 1.98

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna e maiúsculas iguais na linha, não diferem pelo Teste de Tukey a 5%.

Um ponto que chamou a atenção foi o alto teor de alumínio no tratamento controle do experimento em solução nutritiva (Tabela 14). Com isso, foi realizada uma análise, com a mesma metodologia empregada para as raízes, do teor de alumínio no substrato utilizado para a germinação dos toletes de cana-de-açúcar, a vermiculita. Após a germinação, os toletes foram lavados e limpos para a retirada da vermiculita, contudo, por ser de tamanho pequeno ela adere fortemente às raízes e não é possível a retirada total do material para não ocorrer danos à raiz por abrasão. A análise mostrou que a

vermiculita apresenta um alto teor de alumínio (2065 mg/kg). Contudo, esse alumínio não interfere no desenvolvimento radicular, pois não está em sua forma disponível. O Al só foi mensurado devido à amostra ter sido incinerada à 550°C por três horas para a realização da análise.

Após a coleta do experimento em solução nutritiva, foi feita a comparação por meio de registro fotográfico do tratamento controle com o tratamento que recebeu cloreto de alumínio (Figura 12 e 13). Para todas as variedades, o tratamento controle (sem a adição de alumínio) apresentou maior quantidade de raízes, maior comprimento e coloração mais clara, em comparação com o tratamento que recebeu alumínio. A cor amarronzada apresentada pelo tratamento com alumínio é uma característica do dano causado pelo metal à célula podendo leva-la a morte e prejudicando o desenvolvimento radicular.

O Al possui alta reatividade química e biológica, aumentando a potencialidade de sua toxicidade. Esta inclui a interação com os carboidratos e proteínas da parede celular, interação e alteração da membrana plasmática da raiz, deslocando o Ca^{2+} da bicamada lipídica e bloqueando o transporte de íons. Dentro do citoplasma pode causar mudanças no citoesqueleto e danos ao DNA (KOCHIAN, 1995; KOCHIAN et al., 2004). Essas mudanças estruturais na raiz também podem envolver modificações na endoderme, rompendo de membranas celulares que irão interferir na seletividade iônica, alterando a absorção e a translocação de nutrientes das raízes para a parte aérea.

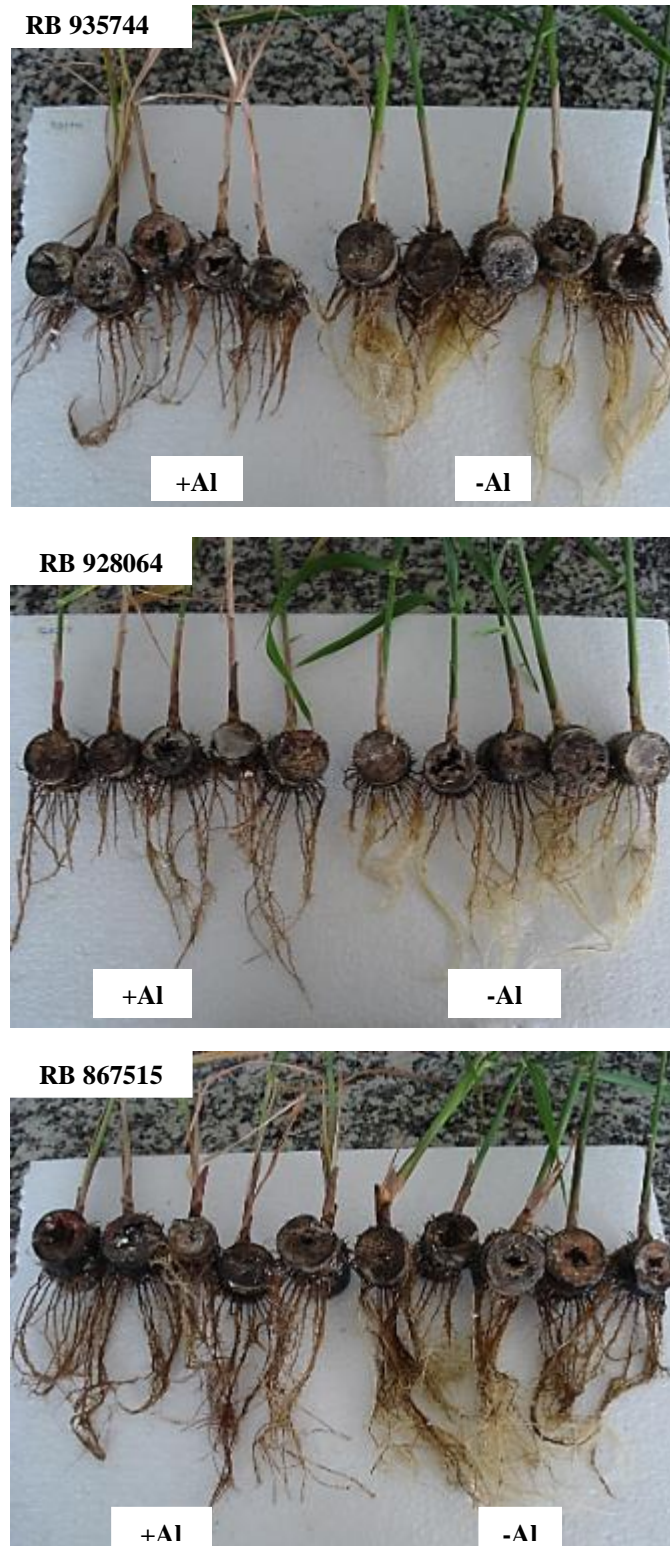


Figura 12. Plantas de cana-de-açúcar após a coleta para as análises finais. Comparação dos tratamentos com (+ Al) e sem (-Al) a presença de alumínio.

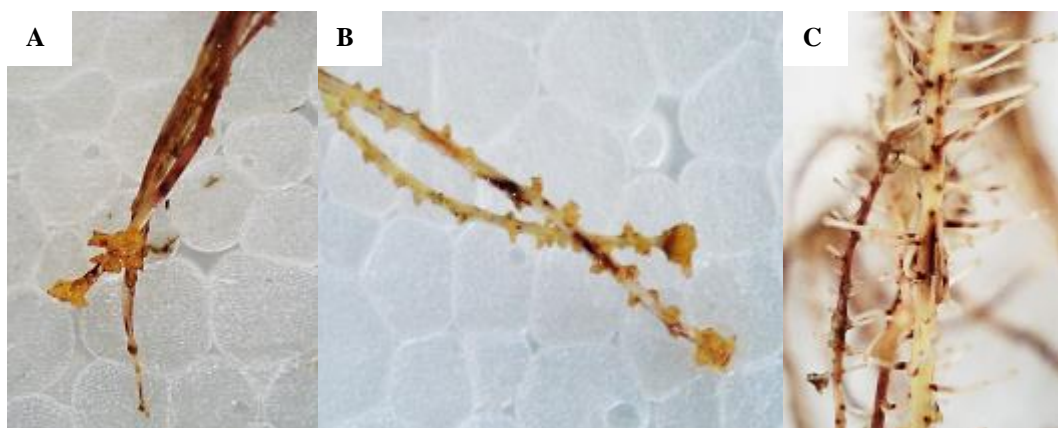


Figura 13. Danos causados pelo Al às raízes de cana-de-açúcar. A e B. paralisação do crescimento radicular, intumescimento do ápice radicular e coloração marrom; C. excesso de raízes adventícias.

5.4 Análises fisiológicas de trocas gasosas

Houve significância estatística para a interação entre tratamentos e variedades para os parâmetros: taxa de transpiração e condutância estomática (Tabela 15). A variedade RB928064 apresentou os maiores valores no tratamento controle, e sofreu decréscimo no tratamento com Al. As variedades RB867515 e RB935744 não apresentaram diferença significativa no tratamento com Al em relação ao controle (Tabela 16 – Figura 14).

Os resultados para a taxa de fotossíntese foram significativos somente para o fator variedades (Tabela 15). A RB928064 e RB867515 apresentaram quase o dobro de eficiência de acúmulo de CO₂ em comparação com a RB935744, independentemente do tratamento (Tabela 17).

Tabela 15. Quadro de análise de variância de trocas gasosas em três variedades de cana-de-açúcar cultivadas em LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO Distrófico, no tratamento controle e com adição de cloreto de alumínio.

Fator de Variação	GL	Teste F		
		Transpiração ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	condutância estomática ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	taxa fotossintética ($\mu\text{mol CO}_2\text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$)
Tratamentos	1	19.3277 **	19.000 **	2.7403 ns
Variedades	2	4.6426 *	2.7368 ns	10.3118 **
Cul. x Trat.	2	6.0530 *	5.2632 *	0.7765 ns
Resíduo	12			
Total	17			
CV%		22.29	24.02	20.50

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0.05$)

ns: não significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p \geq 0.05$)

Tabela 16. Médias de trocas gasosas nas folhas de cana-de-açúcar cultivadas em LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO Distrófico.

Tratamento	Transpiração ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$)			Condutância estomática ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$)		
	RB928064	RB935744	RB867515	RB928064	RB935744	RB867515
Controle	1.4133 aA	0.7533 aB	0.9067 aB	0.0700 aA	0.0400 aB	0.0500 aAB
Alumínio	0.6000 bA	0.6133 aA	0.7067 aA	0.0267 bA	0.0300 aA	0.0400 aA

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna e maiúsculas iguais na linha, não diferem pelo Teste de Tukey a 5%; ns: não significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p \geq 0.05$)

Tabela 17. Médias da taxa fotossintética nas folhas de variedades de cana-de-açúcar cultivadas em LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO Distrófico, em relação ao fator variedades.

Variedade	Taxa fotossintética ($\mu\text{mol CO}_2\text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$)
RB928064	8.75 a
RB935744	4.54 b
RB867515	8.65 a

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna não diferem pelo Teste de Tukey a 5%.

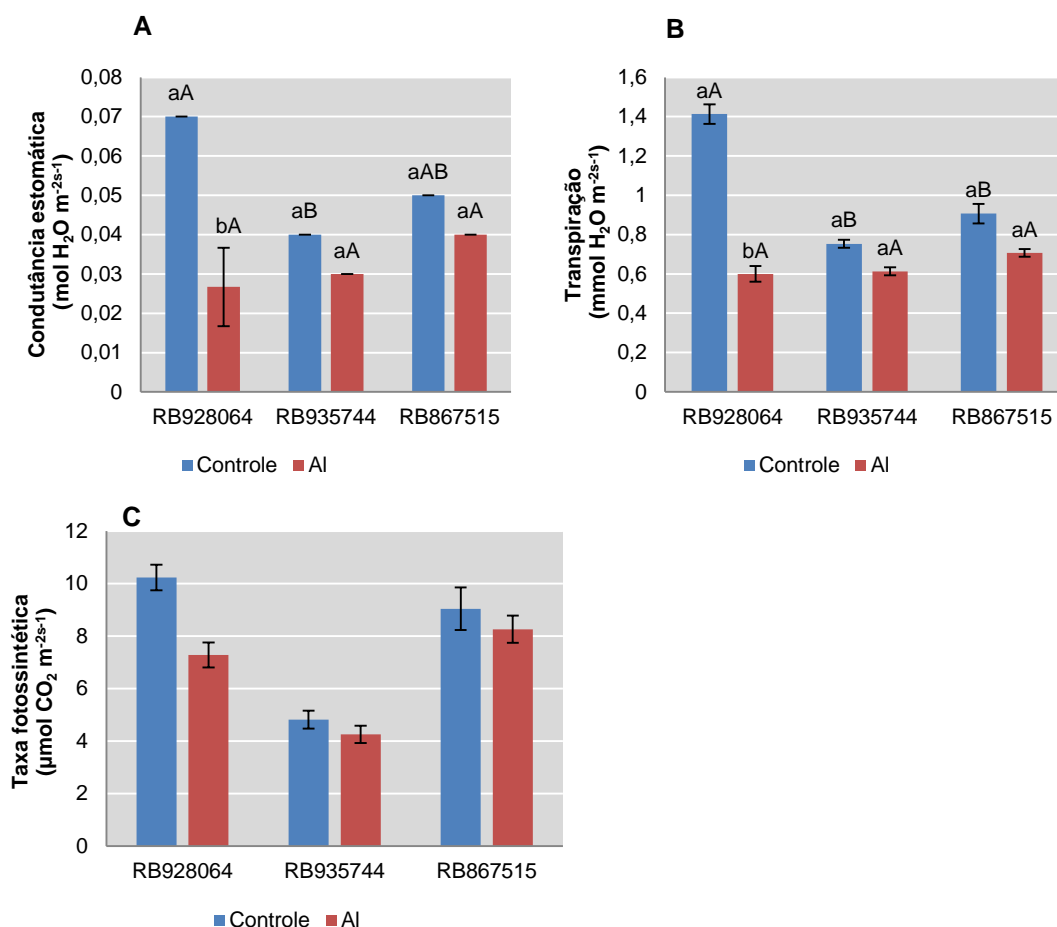


Figura 14. Parâmetros fisiológicos analisados em folhas de variedades de cana-de-açúcar em LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO distrófico em tratamento controle e com estresse por Al. A. condutância estomática; B. transpiração; C. taxa fotossintética. Minúsculas comparam os tratamentos dentro de cada variedade, maiúsculas, comparam as variedades dentro de cada tratamento. Média de 5 repetições.

5.5 Teores de clorofilas

O teste F para os teores de clorofila *a*, *b* e total (*a+b*), está apresentado na Tabela 18. Houve significância estatística para a interação entre os fatores variedades de cana-de-açúcar e o tratamento (controle e Al) para todas as análises.

A variedade RB928064 apresentou os maiores teores de clorofilas no tratamento com Al. O Al ocasionou decréscimo de quase 50% no teor de clorofila *a* para a RB867515 (48,21%), e clorofila *b* para a RB935744 (49,35%) (Tabela 19; Figura 15).

Para teores de clorofila *b* e total (*a+b*), a variedade RB928064 apresentou valores estatisticamente superiores no tratamento com Al em relação ao controle (Tabela 19).

Tabela 18. Quadro de análise de variância de três variedades de cana-de-açúcar cultivadas em LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO Distrófico, no tratamento controle e com adição de cloreto de alumínio, em relação aos teores de clorofila em $\mu\text{g g}^{-1}$ de massa fresca (MF).

Fator de Variação	GL	Teste F		
		Teores de clorofilas ($\mu\text{g g}^{-1}$ MF)		
		<i>Clorofila a</i>	<i>Clorofila b</i>	<i>Total (a+b)</i>
Tratamentos	1	11.1432 **	1.9870 ns	2.2608 ns
Variedades	2	3.7706 ns	1.6617 ns	3.4555 ns
Cul. x Trat.	2	6.2519 *	24.2020 **	9.4492 **
Resíduo	12			
Total	17			
CV%		21.07	25.27	25.36

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0.05$); ns: não significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p \geq 0.05$)

Tabela 19. Médias dos teores de clorofilas nas folhas de cana-de-açúcar cultivadas em LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO Distrófico, no tratamento controle e com adição de cloreto de alumínio.

Tratamento	Teores de clorofilas ($\mu\text{g g}^{-1}$ MF)		
	<i>Clorofila a</i>		
	RB928064	RB935744	RB867515
Controle	2.82 aB	3.14 aB	4.75 aA
Alumínio	3.17 aA	2.03 aA	2.46 bA
	<i>Clorofila b</i>		
	RB928064	RB935744	RB867515
Controle	1.10 bB	4.64 aA	4.90 aA
Alumínio	6.21 aA	2.35 bB	4.02 aB
	<i>Total (a+b)</i>		
	RB928064	RB935744	RB867515
Controle	4.36 bB	8.86 aA	10.30 aA
Alumínio	8.26 aA	4.10 bB	7.29 aAB

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna e maiúsculas iguais na linha, não diferem pelo Teste de Tukey a 5%.

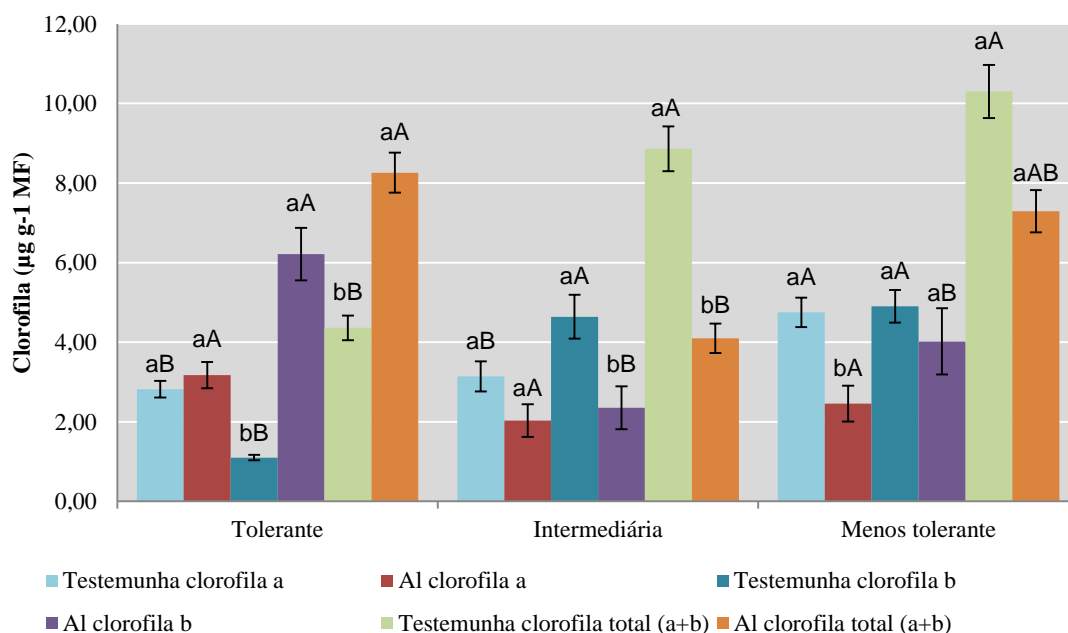


Figura 15. Teores de clorofilas em variedades de cana-de-açúcar em LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO distrófico em tratamento controle e com estresse por Al. Minúsculas comparam os tratamentos dentro de cada variedade para cada tipo de clorofila e letras maiúsculas comparam variedade dentro de cada tratamento para cada tipo de clorofila. MS: massa fresca. Média de 5 repetições.

5.6 Análises de Expressão Gênica por qPCR

Os genes SDH, MDH e SOD foram analisados em 3 variedades de cana-de-açúcar em relação a sua expressão relativa, quando estas foram submetidas ao estresse por Al em solução nutritiva.

As variedades tratadas com Al apresentaram maior expressão dose genes em comparação ao controle (Figura 16). A variedade RB928064 apresentou maior expressão do gene MDH e SOD, relacionados com a produção de ácidos orgânicos e estresse oxidativo respectivamente, nas folhas (2,66 e 1,21 vezes, respectivamente) em

comparação com as folhas controle, e aumentou a expressão do gene SOD nas raízes (1,31 vezes) em comparação com as raízes controle (Figura 16A).

A variedade RB935744 apresentou aumento na expressão gênica de MDH e SOD em folhas (2,18 e 2,74 vezes, respectivamente) em comparação às folhas controle e maior expressão do gene SDH em raízes (2,14 vezes), relacionado à produção de ácidos orgânicos, em comparação com raízes controle (Figura 16B).

A variedade RB867515, apresentou expressão aumentada dos três genes analisados nas raízes (2,02 vezes, 3,35 vezes e 2,36 vezes para SDH, MDH e SOD, respectivamente) em comparação com as raízes controle (Figura 16C).

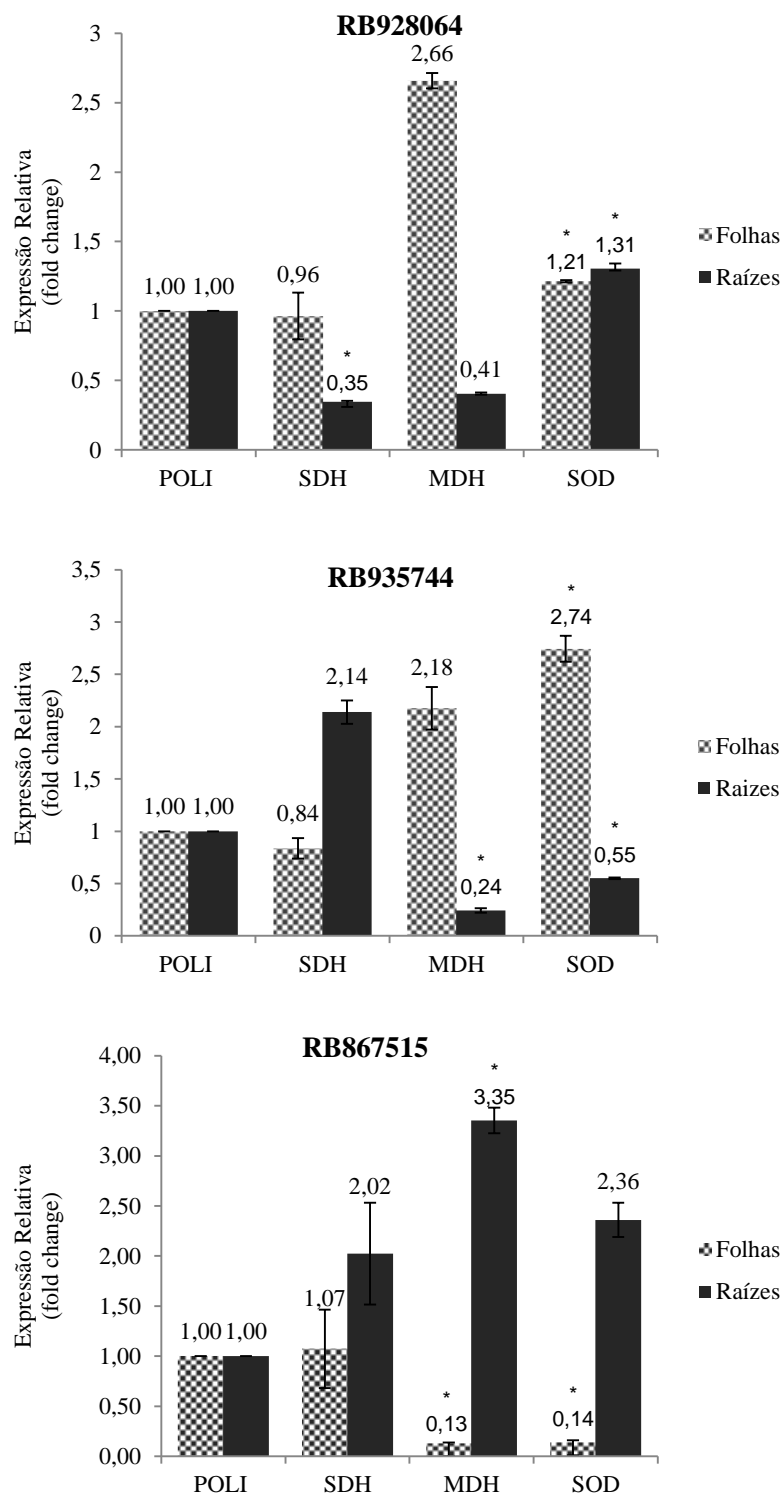


Figura 16. Expressão de genes de variedades de cana-de-açúcar em solução nutritiva com Al. A. Variedade RB928064; B. Variedade RB935744 C. Variedade RB867515. Genes: SDH (Succinato desidrogenase); MDH (Malato desidrogenase); SOD (Superóxido dismutase Cu-Zn) O gene da POLI (poliubiquitina) foi utilizado como controle endógeno. Cada ponto de dados representa a média de seis réplicas (duplicata biológica e triplicata da reação qPCR). As barras de erro foram calculadas de acordo com Livak e Schmittgen (2001). Asteriscos indicam valores significativos.

6. DISCUSSÃO

6.1 Incubação do solo com calcário e Al

Em solo adequado para nutrição de plantas, a maior parte da capacidade total de troca de cátions (CTC) deve ser ocupada por cátions essenciais, como Ca^{2+} , Mg^{2+} e K^+ , que caracterizam um solo eutrófico com V% maior que 50%. Se uma parte importante da CTC for ocupada por H^+ e Al^{3+} (ou seja, V% inferior a 50%), o solo será distrófico e terá limitações para garantir um desenvolvimento satisfatório à planta. Embora a CTC do solo incubado com Al se apresente maior que o solo com calcário, os íons H^+ e Al^{3+} predominaram nos sítios de adsorção. Solos com grandes problemas de fertilidade possuem alto teor de Al trocável (maior que $3 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$), bem como saturação de Al (m%) maior que 50%. Os valores m% (56,76%) e Al trocável ($21 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$) foram altos o suficiente para garantir um nível satisfatório de estresse para as variedades de cana-de-açúcar expressarem seu comportamento em resposta a altos níveis de Al em solos de baixa fertilidade.

6.2 Teores de nutrientes e de Al em raízes e folhas

As variedades seguiram o mesmo padrão de teores de nutrientes e de Al nas raízes. A RB928064 e a RB935744 apresentaram maiores teores de nutrientes e o menor de Al nas raízes. A RB867515 apresentou maior teor de Al nas raízes e menores teores nutrientes nesse tecido. A Tabela 20 apresenta a faixa adequada de nutrientes para a folha diagnóstica de cana-de-açúcar, de acordo com Rajj et al. (1996).

Tabela 20. Faixa adequada de nutrientes em folhas diagnósticas de cana-de-açúcar.

N	P	K	Ca	Mg	S
g kg^{-1}					
18-25	1,5-3,0	10-16	2,0-8,0	1,0-3,0	1,5-3,0

Todas as variedades apresentaram teores de Ca e Mg considerados adequados. Mesmo com as adubações de plantio e de cobertura feitas corretamente de acordo com a análise de solo, nenhuma variedade atingiu valor adequado de P nas folhas. Para N, somente a RB935744 ficou dentro do teor aceitável. Para K, as variedades RB928064 e RB867515 atingiram valores dentro da faixa e para S a RB935744 não apresentou teor adequado. No entanto, durante o experimento, as plantas não apresentaram sintomas visuais de deficiência nutricional.

A maior absorção de nutrientes em condições de estresse por Al contribui para menor ocorrência de danos às células e ao desenvolvimento da planta como um todo. Basso et al. (2003) verificaram menor proporção de Ca, P, K e Mg em eucalipto com o aumento das doses de Al. Em arroz, os elementos minerais nas raízes e folhas decresceram com o aumento do teor de Al (MENDONÇA et al., 2003).

Com a permeabilidade alterada, a água e os nutrientes não entram na célula, e a planta se torna mais suscetível à seca e ao estresse nutricional. Isso foi observado em células de raízes de milho submetidas ao Al, onde mudanças na integridade celular do ápice radicular resultaram em menor absorção de Ca, Mg e K (WANG et al., 2015).

Também em plantas de milho, Anjum et al. (2016), em estudo de toxidez por Al, verificaram redução na produtividade e aumento na absorção do metal em diferentes partes da planta. Mesmo com o experimento feito em pH 6,47, foi observado danos ao crescimento da planta, o que os autores atribuíram ao estresse oxidativo, aos efeitos

negativos à divisão celular e à competição por absorção de íons similares ao Al, que são requeridos para o desenvolvimento da planta.

A variedade RB867515, apesar de apresentar o maior teor de Al e os menores teores de nutrientes nos tecidos, mostrou maior resiliência nos teores de nutrientes quando submetida ao estresse por Al. O fato de ela ser considerada uma variedade rústica pelo seu programa de melhoramento, pode contribuir para seu desenvolvimento em solos menos férteis.

Moustaka et al. (2016) verificaram que em variedades de trigo, a Al-resistente apresentou maior teor de Ca^{2+} e Mg^{2+} nas folhas, menor absorção de Al e estresse oxidativo, em comparação com a variedades Al-sensível. Os íons de Ca e Al competem pelo mesmo sítio do carregador ativo no processo de absorção, causando uma inibição competitiva (MALAVOLTA et al., 1997) e, conseqüentemente, uma menor concentração de Ca nos tecidos.

O Al possui afinidade 500 vezes maior que os outros cátions pela fosfatidilcolina, o principal lipídeo da membrana celular, (AKESON et al., 1989; AKESON e MUNNS, 1989). Assim, ele é capaz de deslocar cátions como o Ca^{2+} , causando danos estruturais às células, além de elevar a produção de espécies reativas de oxigênio danificando os ácidos graxos poli-insaturados das membranas (MOSSOR-PIETRASZEWSKA, 2001). A ligação do Al^{3+} à membrana plasmática altera sua superfície negativa. Isso induz a despolarização, especialmente no ápice radicular, que é a zona mais sensível ao Al e também a mais ativa. Essas alterações nas propriedades da membrana plasmática afetam o transporte de íons (HORST et al., 2010).

A análise de um conjunto de respostas da planta ao estresse por Al pode servir como orientação para aloca-la nos ambientes de produção mais viáveis para seu desenvolvimento. Contudo, é preciso considerar sempre as condições edáficas. De

acordo com Khu et al. (2012), a planta pode apresentar tolerância à acidez do solo e se desenvolver satisfatoriamente em solos com menor oferta de nutrientes. Contudo, pode ser sensível ao Al, problema que atinge grande parte dos solos ácidos brasileiros.

O primeiro contato do Al com a planta ocorre na parede celular, momento em que é absorvido por fluxo de massa e se acumula principalmente no apoplasto (VAZQUEZ et al., 1999). Nessa área da estrutura radicular, ocorrem os primeiros efeitos tóxicos do Al, para posteriormente ser translocado em maior ou menor proporção, para diferentes partes da planta. A raiz é o primeiro órgão que tem contato com o Al e pode ser onde se encontra os maiores teores do metal (BIDAR et al., 2007). De acordo com Mallick et al. (2010), a imobilização do Al dentro das células corticais da raiz, pode ser um mecanismo da planta para evitar um efeito fitotóxico, evitando o acúmulo em outros tecidos. O teor de Al nas folhas não seguiu a mesma tendência que o observado nas raízes. Contrariamente, a RB928064 apresentou maior teor de Al nas folhas em comparação com as outras variedades, onde os maiores teores foram observados na raiz.

O acúmulo de Al é um mecanismo de desintoxicação onde um quelato é formado entre o Al e um ácido orgânico. Com esta estrutura, o Al pode ser armazenado no vacúolo ou no citosol das células da raiz e também translocado para as folhas. (VONDRÁČKOVÁ et al., 2015; WANG et al., 2015). Uma vez ligado a um ácido orgânico e compartimentado em uma estrutura celular, não tem efeito fitotóxico na planta. A diferença nos valores de Al apresentados pelas variedades de cana-de-açúcar estudadas sugere diferentes comportamentos frente à toxidez por Al, utilizando-se de diferentes mecanismos para lidar com o metal. O maior teor de Al nas folhas da variedade RB928064, juntamente com sua maior capacidade de absorver nutrientes, pode ser atribuído à atividade de transportadores que atuam na membrana plasmática,

que removem o Al dos sítios negativos do apoplasto radicular, transportando-o através do simplasto e o armazenam nos vacúolos, com o objetivo diminuir o nível de Al tóxico que causaria a ruptura celular e prejudicaria o crescimento das raízes (KLUG e HORST, 2010).

Apesar de as variedades apresentarem a mesma tendência de teores de Al, quando cultivadas em solução nutritiva, esse valor é significativamente maior pelo fato do Al estar mais disponível, além de a vermiculita poder ter colaborado com o aumento desses valores. No solo, o Al pode estar ligado a outros compostos como o fósforo, ácidos orgânicos e matéria orgânica, tornando-o indisponível para a planta.

Nesse trabalho, o teor de Al em folhas e raízes foi quantificado por espectrofotometria, mas o teor de Al^{3+} que causa danos às raízes pode ser menor do que o quantificado por esse método. Isso porque são detectadas todas as formas de Al, inclusive as ligadas com outros componentes, formando compostos estáveis como Al-fosfato, Al-citrato, Al-malato, etc. Além disso, o Al também pode estar inativo por algum componente da planta, como a parede ou membrana celulares, ou por ligantes encontrados no citoplasma ou vacúolos (DARKÓ et al., 2004).

6.3 Raízes laterais

Nos registros fotográficos realizados no experimento conduzido em solução nutritiva, foi possível visualizar a diferença das raízes no tratamento controle e quando expostas ao Al. Independentemente da variedade, o estresse causado pelo Al danificou o ápice radicular formando calose e estimulando a formação de raízes laterais.

As variedades RB935744 e RB928064 apresentaram uma quantidade semelhante de raízes, enquanto para a RB867515 o volume e o comprimento das raízes foram maiores para os dois tratamentos. Essa característica apresenta uma vantagem no

tratamento com Al, permitindo a planta explorar maiores áreas de solo e em maior profundidade quando submetida ao estresse. Como o ápice radicular é lesionado pelo Al, impedindo seu crescimento e o aporte de água e de nutrientes, a planta usa como estratégia a emissão de maior quantidade de raízes adventícias para tentar suprir esse dano.

O Al em contato com a raiz pode interferir em poucos minutos não só no alongamento da célula, mas também na inibição da divisão celular. Esse efeito pode não ser exclusivo somente pela sua toxicidade às células, mas também pelo fato de inibir o transporte de auxina (KOLLMEIER et al., 2000). Os danos causados pelo Al podem levar à queda de produtividade devido a limitação das raízes na obtenção de água e nutrientes (KOCHIAN et al., 2004).

A formação de raízes laterais é um sistema de defesa da planta quando a raiz principal começa a perder sua função de captar água e nutrientes. Esse sintoma é melhor visualizado em experimentos com solução nutritiva do que quando conduzidos em solo como substrato. Isso ocorre porque em solução nutritiva as raízes não são danificadas no momento da coleta e há alta atividade de Al em solução. Além das raízes laterais, é possível visualizar a formação de axes ao longo da raiz principal, onde o crescimento das raízes laterais é rapidamente inibido e somente essas pontas podem ser distinguidas, indicando que houve uma tentativa de suprir a deficiência da raiz principal. Para condições de campo, as raízes laterais estão expostas a uma menor atividade do Al e essa resposta adaptativa pode evitar a morte da planta pela toxicidade ao Al. Contudo, quanto mais raízes laterais a planta emitir, mais sensível ela seria aos danos causados pelo Al (BARCELÓ e POSCHENRIEDER, 1990).

Estudando raízes de plantas de faia (*Fagus sylvatica*) e de abeto (*Picea abies*), Rost-Siebert (1984) descreveu 3 estágios de alterações causadas pelo Al. No estágio 1,

as raízes primárias da coifa podem estar alteradas ou mortas, mas as plantas ainda são capazes de desenvolver novas raízes a partir de regiões com tecidos ainda intactos. Nessa fase, o surgimento de raízes laterais é impedido, uma vez que ainda há dominância apical. No estágio 2, as raízes da coifa apresentam-se inchadas e necróticas. Ocorre a desintegração da epiderme e o córtex se desprende do cilindro central, podendo surgir um grande número de raízes laterais. No estágio 3, as raízes já estão mortas, necróticas e com coloração parda, e nenhuma raiz lateral surge.

6.4 Trocas gasosas e teores de clorofilas

Em relação aos parâmetros fisiológicos de troca gasosa, as variedades mostraram-se não responsivas ao aumento do teor de Al no solo. Um efeito indireto do Al é o estresse devido à falta de água resultante de danos no sistema radicular. Isso prejudica a absorção de água pela raiz. Mesmo o estresse moderado devido à falta de água causa uma diminuição na condutância estomática (g_s), na taxa de transpiração (E), na concentração interna de CO_2 (C_i) e na taxa de fotossíntese (FERREIRA et al., 2017).

Para as análises de transpiração e condutância estomática, a variedade RB928064 apresentou os maiores valores em relação ao tratamento controle e foi a única para a qual esses parâmetros diminuíram com o aumento do teor de Al no solo. A transpiração (E) é medida como a diferença de concentração do vapor de água entre a entrada e saída do ar da câmara do IRGA, multiplicado pela taxa de fluxo através da câmara, sendo o resultado dividido pela área foliar. Com a transpiração e a concentração do vapor de água é possível calcular a condutância foliar de vapor de água (g_s). A condutância foliar é proporcional ao tamanho e número de estômato e de sua abertura, sendo dependente de fatores ambientais como radiação solar, potencial hídrico, umidade do solo, fatores inerentes à espécie entre outros (NIELSEN e ORCUTT, 1996). Os

estômatos são estruturas epidérmicas, formados por duas células estomáticas que delimitam uma fenda, duas ou mais células anexas adjacentes e uma câmara subestomática. Podem ser encontrados em flores, frutos e caules jovens, mas principalmente nas folhas. É através dos estômatos que ocorre uma comunicação direta do interior da planta com o ambiente (TAIZ e ZEIGER, 2013). Os estômatos são utilizados para o equilíbrio de vapor d'água e balanço de energia entre a planta e o meio ambiente. Assim, uma redução na condutância estomática afeta toda a interação planta-ambiente, interferindo diretamente no balanço de calor sensível da planta, na absorção de CO₂ e na taxa de fotossíntese (BASNAYAKE et al., 2015). A diminuição da taxa de transpiração e a condutância estomática da variedade RB928064 refletem uma resposta à presença de Al. Quando a estrutura e função da raiz são alteradas pela presença do Al, a absorção de água e nutrientes muda. A redução da perda de água através da redução da transpiração e condutância estomática pode fazer a planta ser capaz de resistir a danos por um período mais longo. A fotossíntese é estimada como sendo a taxa de assimilação de CO₂, medida pela diferença do fluxo de concentração de CO₂ do ar que entra na câmara do IRGA e o ar que fica na folha, sendo a taxa resultante dividida pela área foliar. As variedades RB928064 e RB867515 apresentaram as maiores taxa de fotossíntese em comparação com a RB935744, não sofrendo interferência quando no aumento da dose de Al no solo. Não é possível afirmar que ao longo do tempo não ocorra uma redução na taxa fotossintética, uma vez a cana-de-açúcar pode permanecer até 18 meses no campo. Com o aumento do estresse sofrido pela planta, a parte fotoquímica da reação de fotossíntese pode começar a ser prejudicada. Ecco et al. (2014), estudando duas variedades de cana-de-açúcar em relação aos efeitos do Al e déficit hídrico, concluíram que a RB867515 não apresentou diferenças significativas em relação aos tratamentos em comparação com a RB855536.

Para os pigmentos analisados, clorofila *a*, *b* e total (*a+b*), a variedade RB928064, não apresentou decréscimos quando no tratamento com Al. Ao contrário, houve aumento nos teores de clorofila *b* e total, quando exposta a maiores doses de Al. Houve decréscimo significativo em clorofila *b* e total para a variedade RB935744, e somente de clorofila *a* para a variedade RB867515. As moléculas de clorofila possuem como átomo central o Mg, e o N está diretamente ligado à síntese de pigmentos fotossintéticos. A RB867515 apresentou baixo teor de Ca, Mg e N nas folhas e mesmo não acumulando altos valores de Al nesse tecido, sua eficiência em manter atividades fisiológicas em condições de estresse por Al não foi suficiente para manter altos teores de pigmentos fotossintéticos. A clorofila *a* é utilizada na realização do primeiro estágio da fotossíntese, a fotoquímica, enquanto que a clorofila *b* é um pigmento acessório que auxilia na absorção de luz e na transferência da energia radiante para os centros de reação (TAIZ e ZIEGER, 2004). Carlin et al. (2012), estudaram variação nos teores de clorofilas em cana-de-açúcar em condições de deficiência hídrica e de toxicidade por Al. Apesar de ter ocorrido decréscimo nos teores fotossintéticos, esse parâmetro se mostrou mais sensível em relação ao estresse hídrico do que ao estresse por Al.

A diminuição na taxa fotossintética, trocas gasosas, taxa de transpiração e nos pigmentos de clorofila *a* e *b*, devido à toxicidade pelo Al, já foram relatadas em outras culturas como o milho (LIDON et al., 1999), trigo (MOUSTAKAS et al., 1996), citrus (CHEN et al., 2005; JIANG et al., 2008), pinus (OLEKSYN et al., 1996) e soja (ZHANG et al., 2007). Em centeio, as variedades 'D. Zlote' e 'Riodeva', consideradas tolerante e sensível ao Al, respectivamente, também apresentaram queda na taxa fotossintética, de transpiração e de condutância estomática. Apesar de 'D. Zlote' apresentar menores valores para esses parâmetros, a variedade 'Riodeva' teve um decréscimo acentuado já na segunda semana de exposição ao Al (SILVA et al., 2012).

Em todos esses trabalhos é salientada a importância do tempo de condução do experimento para o entendimento dos efeitos do Al nas folhas. O Al absorvido pelas raízes demanda um tempo de exposição para sua translocação até as folhas, e só assim estas começam a apresentar sintomas de problemas no processo fotossintético e refletir a diminuição das raízes na capacidade de absorver água e nutrientes. A medição de alterações na parte aérea das plantas pelo Al deve ser baseada em tempo de exposição suficiente para que não ocorra falsa interpretação dos resultados.

6.5 Análises da Expressão Gênica

Este estudo combinou a análise da expressão gênica com parâmetros nutricionais e fisiológicos para um estudo mais completo dos efeitos do Al na cana-de-açúcar. A avaliação ao Al no campo é trabalhosa e requer muito tempo para obter resultados. Além disso, existem outras variáveis que não estão presentes em condições de laboratório. Assim, é importante usar um conjunto de métodos estabelecidos para avaliar a resposta das plantas ao Al.

Os resultados referentes à análise da expressão dos genes SDH e MDH, relacionados com a produção de ácidos orgânicos, e do gene SOD, relacionado com o estresse oxidativo, apresentou diferenças entre as variedades de cana-de-açúcar. As variedades RB928064 e RB935744 apresentaram um padrão de aumento de expressão gênica nas folhas, enquanto a variedade RB867515 esse aumento de expressão ocorreu exclusivamente nas raízes.

As variedades RB928064 e a RB935744 apresentaram maior expressão do gene MDH em folhas tratadas com Al em comparação com folhas do grupo controle. Este gene é responsável pela redução reversível do oxaloacetato em malato. Nas plantas, o malato atua na respiração, absorção de nutrientes, movimento estomático, assimilação

de nitrogênio, fotossíntese do metabolismo ácido e oxidação de ácidos graxos (MILLER et al., 1998; VANCE e HEICHER, 1991).

Alguns estudos discutem a relação entre a produção de ácidos orgânicos e a expressão do gene MDH em folhas. Na alfafa submetida ao estresse por Al, a aplicação foliar de ácidos orgânicos (ácido succínico, ácido cítrico, ácido málico e ácido oxálico) diminuiu os efeitos tóxicos do Al e promoveu maior expressão do gene MDH. Os autores sugerem que os ácidos oxálico e málico contribuem para a resistência exógena da alfafa ao Al, enquanto o ácido succínico aplicado na folha pode estar associado ao aumento da concentração endógena de ácidos orgânicos nas raízes, contribuindo para a desintoxicação interna do Al na alfafa. (AN et al., 2014). Em *Citrus grandis*, a resposta ao cultivo com Al resultou em diferença no metabolismo de ácidos orgânicos entre raízes e folhas, com maior produção pelas folhas de malato e citrato (CHEN et al., 2009). Yang et al. (2001), observaram que em soja, a tolerância ao Al é induzida pelo aumento do acúmulo de ácidos orgânicos nas folhas e exudação de citrato pelas raízes. Em plantas de tabaco transgênico, com o gene MDH superexpresso nas folhas, ocorreu um aumento na exudação de ácido málico pelas folhas, aumentando a tolerância ao Al (WANG et al., 2010).

Esaki et al. (2013) verificaram que em *Andropogon virginicus* L, o Al absorvido pelas raízes após longo período de exposição, foi transportado pela planta e acumulado em saliências na região foliar. Além disso, com a coloração específica do Al com morin, esse foi observado nos ápices dos tricomas e posteriormente secretado como uma seiva viscosa. Mesmo mecanismo de compartimentação do Al foi observado anteriormente também em *Andropogon virginus* (ESAKI et al., 2008) e em *Arabidopsis halleri* para Cd e Zn (KUPPER et al., 2000). A cana-de-açúcar tem um grande número de tricomas, e estudos posteriores poderiam analisar seu papel na tolerância ao Al nessa planta.

Em *Fagopyrum tartaricum* (trigo sarraceno), as duas formas de tolerância ao Al são descritas. A espécie secreta oxalato na rizosfera para a complexação do Al, tornando-o não tóxico, como também é capaz de acumular 15 mg g⁻¹ (peso seco), de Al nas suas folhas, complexado no vacúolo com ácidos orgânicos (MA et al., 2001).

O referencial teórico sobre a expressão gênica em cana-de-açúcar em relação à toxidez ao Al é escasso (DRUMMOND et al., 2001; WATT, 2003), principalmente em relação à expressão em folhas. A maioria dos estudos em outras culturas propõe a análise somente no sistema radicular. Contudo, Mattiello et al. (2014), relataram pela primeira vez uma expressão diferencial em folhas de milho de plantas submetidas ao estresse por Al. Em análise do transcriptoma foram encontrados 668 genes diferencialmente expressos em folhas, sendo um número significativamente maior que o reportado em raízes de milho (MATTIELO et al., 2010). Genes que participam do Ciclo de Krebs e estão relacionados com a produção de ácidos orgânicos foram relatados, entre eles o Malato Desidrogenase (MDH). Apesar desses genes terem maior expressão nas folhas em comparação às raízes, para o milho não ocorreu o maior acúmulo de Al nas folhas, indicando que algum outro mecanismo está relacionado com a ativação desses genes.

A absorção de Al e a capacidade de transportar e acumulá-lo nas folhas é uma forma eficiente de mecanismo de defesa, tentando manter as raízes com um nível de Al que não cause danos ao desenvolvimento da planta. Esse acúmulo pode ocorrer em determinados compartimentos celulares, como o vacúolo ou tricomas, de forma que o Al esteja complexado em formas não tóxica, podendo variar entre as espécies.

Mesmo absorvendo Al, essas variedades tentaram eliminar o esse metal no tecido que sofre o maior dano, a raiz, translocando-o para as folhas. Podendo isso ter colaborado para o resultado na expressão diferencial dos genes nesse tecido para as

variedades RB928064 e RB935744, em detrimento das raízes. Para a variedade RB867515 ocorreu um aumento da expressão de todos os genes nas raízes. Os genes SOD e SDH também apresentaram um aumento de expressão nas raízes nas variedades RB928064 e RB935744 respectivamente.

A raiz é o principal e mais importante local de exudação de ácidos orgânicos. Sendo o primeiro local de contato, esperava-se que a maior expressão dos genes relacionados à tolerância/resistência ao Al ocorresse nas raízes, como em muitas espécies. Contudo, é possível esse ser um mecanismo de defesa ainda pouco estudado, onde os ácidos orgânicos sejam produzidos nas folhas e exsudados pelas raízes. Esse mecanismo pode ocorrer principalmente nas espécies com maior capacidade de tolerância ao Al, gerando uma resposta sistêmica na planta ao estresse.

O gene SDH é responsável pela produção de succinato desidrogenase e este tem um papel central no metabolismo mitocondrial, atuando no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e na cadeia respiratória aeróbica. Catalisa a oxidação do succinato em fumarato e a redução da ubiquinona em ubiquinol (FIGUEROA et al., 2001). As variedades RB867515 e RB935744 também apresentaram maior acúmulo de Al no tecido radicular, o que pode ter desencadeado uma maior expressão desses genes relacionados ao ácido succínico e málico nas raízes. A ação desses compostos pode ocorrer após a absorção do Al pela raiz. No arroz, a resistência a Al deve-se principalmente a mecanismos que permitem o acúmulo de Al no simplasma e em complexos não-tóxicos nas paredes celulares da raiz (FAMOSO et al., 2010). Assim, esses genes podem estar atuando externamente, aumentando a secreção de ácidos orgânicos pelas raízes e impedindo a absorção do Al, assim como internamente, complexando o Al após sua absorção.

O mecanismo de exudação de ácidos orgânicos na rizosfera forma complexos com o Al na solução do solo, de forma que este não cause danos à planta, é de longe o

mais estudado e entendido de todos. Com trabalhos pioneiros realizados por Delhaize et al. (1993ab). Primeiramente verificando diferenças na absorção do Al por variedades de trigo com alta semelhança genética, mas que diferiam em relação à tolerância ao Al, concluíram que a variedades mais resistente apresentava algum mecanismo de exclusão do Al, impedindo sua absorção pelas raízes. Essa hipótese foi confirmada em seguida, com a alta correlação entre alta exudação de ácido málico pelas raízes, observada na variedades de trigo tolerante, quando cultivada em solução com Al.

Dentre os mecanismos de tolerância das plantas ao Al, a secreção de ácidos orgânicos, como o malato, oxalato, citrato e succinato pelas raízes, é considerada uma das estratégias mais efetivas (DELHAIZE et al., 1993ab). Em *Andropogon virginicus* L., o Al aumentou a concentração de exudação de citrato, porém, apesar de estimular a exudação de malato, não houve alteração na sua concentração nas raízes (ESAKI et al., 2013).

Ácidos orgânicos podem estar relacionados com a tolerância ao Al, mas isso não significa necessariamente um aumento de sua concentração na solução do solo. A atuação desses compostos pode acontecer após a absorção do Al pela raiz. O arroz é considerado o cereal mais resistente e com um conjunto mais complexo relacionado ao Al, pois sua tolerância não depende significativamente da exudação de ácidos orgânicos pelas raízes. Famoso et al (2010), mostraram que o principal fator que confere resistência ao Al nesse cereal é devido a mecanismos que permitem que ocorra o acúmulo de Al no simplasma e nas paredes celulares da raízes, complexado de forma não tóxica.

O Al é altamente reativo e altera as funções da membrana plasmática e interage com a camada fosfolipídica, causando peroxidação e um aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) (PANDA, et al., 2009). O estresse oxidativo pode ser considerado

um efeito secundário importante causado pelo Al^{+3} . É uma condição biológica gerada pelo desequilíbrio entre a produção de EROs e a desintoxicação do organismo. A família das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) é a mais eficaz na prevenção de danos celulares em plantas causada por estresse oxidativo, e está presente em todas as células de todas as plantas (WANG et al., 2016).

A variedade RB928064 apresentou aumento da expressão gênica da SOD nas raízes e folhas. Para a RB935744, houve aumento na expressão foliar e diminuição na expressão da SOD nas raízes. E houve diminuição da expressão nas folhas e aumento nas raízes para a variedade RB867515. O efeito da expressão gênica relacionada à SOD é governado por sítios subcelulares encontrados em células teciduais onde o estresse oxidativo é gerado. As enzimas SOD pertencem a quatro grupos de acordo com o metal de ligação: Cu / Zn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD e Ni-SOD. De acordo com o tipo de tecido onde o estresse ocorre, um grupo de enzimas é ativado e o aumento da expressão de um tipo de SOD pode levar à inibição de outros grupos em outros tecidos (WANG et al., 2016).

No arroz, a cultivar Vandana, tolerante ao Al, apresentou menor produção de EROs nas raízes e nas folhas, bem como maior expressão gênica relacionada à SOD nesses tecidos em resposta ao tratamento com Al, em comparação com a cultivar sensível HUR-105 (BHOOMIKA et al., 2013). No centeio, maior acumulação de Al, EROs e morte celular ocorreram na cultivar sensível Riodeva em comparação com a Petkus tolerante, juntamente com uma menor expressão do gene da SOD nas raízes. Petkus, no entanto, apresentou maior expressão nas raízes do que nas folhas (SÁNCHEZ-PARRA et al., 2015), e comportamento semelhante também foi observado no azevém (CARTES et al., 2012). Esses resultados corroboram com os observados para a variedade RB867515. Também no presente estudo, a variação na expressão da

SOD em tecidos dentro da mesma espécie pode ocorrer de acordo com a tolerância ao Al inerente a cada variedade. Este é outro mecanismo de tolerância a ser explorado, juntamente com os relacionados aos ácidos orgânicos para o melhoramento genético da cana-de-açúcar em relação à tolerância ao Al.

A variedade RB928064 apresentou maior expressão de MDH nas folhas, o que está relacionado à produção de malato. Também apresentou maior teor de nutrientes e maior teor de Al nas folhas e menor nas raízes. O gene SOD, que está relacionado ao estresse oxidativo, também foi altamente expresso nas folhas e raízes da variedade RB928064 e nas folhas da RB935744. A variedade RB867515 apresentou maior expressão de todos os genes nas raízes, menor teor de nutrientes, mas também as menores alterações entre os dois tratamentos (controle e Al) menor teor de Al nas folhas e maior nas raízes.

Na RB928064, a taxa de transpiração e a condutância estomática diminuíram com o tratamento com maior teor de Al. Para a RB935744 e, o teor de clorofila diminuiu no tratamento com Al, enquanto que na RB867515 ocorreu diminuição da clorofila *a*, mantendo os teores de clorofila *b* e total A RB928064 e a RB867515 mostraram maior taxa de fotossíntese, mas não houve alteração neste parâmetro com o tratamento com Al em nenhuma variedade de cana-de-açúcar.

7. CONCLUSÕES

As variedades de cana-de-açúcar mostraram-se responsivas ao tratamento com Al em relação aos parâmetros estudados, e apresentaram diferença na resposta ao estresse.

Decréscimos nos teores nutricionais ocorreram nas variedades RB928064 e RB935744, enquanto a variedade RB867515 não apresentou alterações significativas, que provavelmente está associado à sua típica rusticidade e menor demanda nutricional.

Os genes selecionados na literatura e no banco de dados do SUCEST foram eficientes em demonstrar a diferença na variação de expressão entre os tratamentos testemunha e com Al, assim como diferenças inerentes à cada variedade de cana-de-açúcar.

O maior teor de Al nas raízes ou folhas pode ter contribuído para a maior expressão dos genes estudados em cada tecido.

Dentre os parâmetros fisiológicos estudados, a condutância estomática e transpiração foram os mais afetados pelo estresse por Al. O padrão de aumento da expressão nas folhas dos genes relacionados à produção de ácidos orgânicos foi confirmado pela análise conjunta de parâmetros relacionados à eficiência de absorção de nutrientes e acúmulo de Al. Estes resultados apontam para um mecanismo diferenciado de resistência entre variedades, onde a planta responde como um todo ao estresse por Al. Além disso, abre caminho para novos estudos que buscam elucidar os efeitos do Al na cana-de-açúcar, para suprir a área de melhoramento de plantas para o desenvolvimento de novas variedades adaptadas a solos ácidos.

Desenvolver protocolos para a planta como um todo e não apenas para as raízes é extremamente importante para elucidar o comportamento de cada espécie sob a acidez do solo e a toxidez do Al. Todo o processo de melhoria da cana-de-açúcar leva em média 12 anos, desde a realização dos cruzamentos até a sua liberação. Assim, a rápida seleção de plantas com resultados específicos é de grande interesse para programas de melhoramento genético como forma de desenvolver variedades adaptadas a ambientes restritivos com menor uso de insumos. O uso de variedades de cana-de-açúcar capazes

de expressar seu potencial genético, mesmo em solos ácidos com alto teor de Al trocável, permitiria um cultivo mais sustentável da cultura usando terras não apropriadas para a produção de alimentos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AKAYA, M.; TAKENAKA, C. Effects of aluminum stress on photosynthesis of *Quercus glauca* Thunb. **Plant and Soil**, v.237, p.137-146, 2001.

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

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

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

ANJUM, S.A.; ASHRAF, U.; KHAN, I.; TANYEER, MOHSIN; SALEEM, M.F.; WANG, L. Aluminum and chromium toxicity in maize: implications for agronomic attributes, net photosynthesis, physio-biochemical oscillations, and metal accumulation in different plant parts. **Water Air Soil Pollution**, p. 227: 326, 2016.

AN, Y.; ZHOU, P.; XIAO, Q.; SHI, D. Effects of foliar application of organic acids on alleviation of aluminum toxicity in alfalfa. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 177, p.421-430, 2014.

ARENHART, R.A.; SCHUNEMANN, M.; BUCKER NETO, L.; MARGIS, R.; WANG, Z.Y.; MARGIS-PINHEIRO, M. Rice ASR1 and ASR5 are complementary transcription factors regulating aluminium responsive genes. **Plant Cell Environment**, v.39, p.645-651, 2016.

AZMAT, R.; HASAN, S. Photochemistry of light harvesting pigments and some biochemical changes under aluminium stress. **Pakistan Journal of Botany**, v.40, p.779-784, 2008.

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.

BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. **Journal of Plant Nutrition**, v.13, p.1-37, 1990.

BASNAYAKE, J.; JACKSON, P.A.N.; INMAN-BAMBER, N.G.; LAKSHMANAN, P. Sugarcane for water-limited environments. Variation in stomatal conductance and its genetic correlation with crop productivity. **Journal of Experimental Botany**, v.66, p.3945-3958, 2015.

BASSO, L.H.M.; GOLÇALVES, A.N.; SILVEIRA, L.V.A.; LIMA, G.P.P. Efeito do alumínio no crescimento de brotações de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivadas in vitro. **Scientia Forestalis**, v.63, p.167-177, 2003.

BERTSCH, P. M.; PARKER, D. R. Aqueous polynuclear aluminum species. In: SPOSITO, G. (Coord.). **The environmental chemistry of aluminum**. Boca Raton: CRC Press, 1995. p.117-168.

BHOOMIKA, K.; PYNGROPE, S.; DUBEY, R.S. Differential responses of antioxidant enzymes to aluminum toxicity in two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars with marked presence and elevated activity of Fe SOD and enhanced activities of Mn SOD and catalase in aluminum tolerant cultivar. **Plant Growth Regulation**, v.71, p.235-252. 2013.

BIAN, M.; ZHOU, M.; SUN, D.; LI, C. Molecular approaches unravel the mechanism of acid soil tolerance in plants. **The Crop Journal**, v.1, p.91-104, 2013.

BIDAR, G.; GARCON, G.; PRUVOT, C.; DEWAELE, D.; CAZIER, F.; DOUAY, F.; SHIRALI, P. Behavior of *Trifolium repens* and *Lolium perenne* growing in a heavy metal contaminated field: Plant metal concentration and phytotoxicity. **Environmental Pollution**, v.147, p.546–553, 2007.

BOSE, J.; BABOURINA, O.; RENGEL, Z. Role of magnesium in alleviation of aluminium toxicity in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.62, p.2251-2264, 2011.

BOSE, J.; BABOURINA, O.; SHABALA, S.; RENGEL, Z. Low-pH and aluminum resistance in *Arabidopsis* correlates with high cytosolic magnesium content and increased magnesium uptake by plant roots. **Plant and Cell Physiology**, v.54, p.1093-1104, 2013.

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, 2000.

BRAUNER, J.L.; CATANI, R.A.; BITTENCOURT, W.C. Extração e determinação do alumínio trocável do solo. VOL XXIII. Piracicaba: **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz De Queiroz**; 1966.

BUSO, P.H.M. Estudo do sistema radicial de cana-de-açúcar no plantio em gema e tolete. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006. 73f.

CAMARGO, O.A.; MONIZ, A.C.; JORGE, J.A.; VALADARES, J.M.A.S. Métodos de análise química, mineralógica e física de solos do Instituto Agronômico de Campinas. 1ª ed. Campinas: **Instituto Agronômico**; 2009.

CAMBRAIA, J.; PIMENTA, J.A., ESTEVÃO, M.M.; SANT'ANNA, R. Aluminum effects on nitrate uptake and reduction in sorghum. **Journal of Plant Nutrition**, v.12, p.1435-1445, 1989.

CARLIN, S. D.; SANTOS, D. M. M. Indicadores fisiológicos da interação entre déficit hídrico e acidez do solo em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.1106-1113, 2009.

CARLIN, S.D.; RHEIN, A.F.L.; SANTOS, D.M.M. Efeito simultâneo da deficiência hídrica e do alumínio tóxico no solo na cultivar IAC91-5155 de cana-de-açúcar. **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, p.553-564, 2012.

CARTES, P.; MCMANUS, M.; WULFF-ZOTTELE, C.; LEUNG, S.; GUTIÉRREZ-MORAGA, A.; MORA, M.L. Differential superoxide dismutase expression in ryegrass cultivars in response to short term aluminum stress. **Plant and Soil**, v.350, p.353-363, 2012.

CASU, R.E.; DIMMOCK, C.M.; CHAPMAN, S.C.; GROF, C.P.L.; MCINTYRE, C.L.; BONNETT, G.D.; MANNERS, J.M. Identification of differentially expressed transcripts from maturing stem of sugarcane by in silico analysis of stem expressed sequence tags and gene expression profiling. **Plant Molecular Biology**, v.54, p.503-517, 2004.

CHEN, L.S.; QI, Y.P.; LIU, X.H. Effects of aluminum on light energy utilization and photoprotective systems in citrus leaves. **Annals of Botany**, v.96, p.35-41, 2005.

CHEN, L.S., TANG, N., JIANG, H.X., YANG, L.T., LI, Q., SMITH, B.R. Changes in organic acid metabolism differ between roots and leaves of *Citrus grandis* in response to phosphorus and aluminum interactions. **Journal of Plant Physiology**, v.166, p.1023-1034, 2009.

CHEN, H.; LU, C.; JIANG, H.; PENG, J. Global transcriptome analysis reveals distinct aluminum-tolerance pathways in the Al-accumulating species *Hydrangea macrophylla* and marker identification. **Plos One**, v.10, p.1-20, 2015.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, v.162, p.162-159, 1987.

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 de cana-de-açúcar, v.4, Safra 2017/18, n. 4 - Quarto levantamento, Brasília, p. 1-73, abril 2018. Disponível em : <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>>. Acesso em 02/08/2018.

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.

DARKÓ, E.; AMBRUS, H.; STEFANOVITS-BÁNYAI, E.; FODOR, J.; BAKOS, F.; BARNABÁS, B. Aluminium toxicity, Al tolerance and oxidative stress in an Al-sensitive wheat genotype and in Al-tolerant lines developed by in vitro microspore selection. **Plant Science**, v.166, p.583-591, 2004.

DELHAIZE, E.; CRAIG, S.; BEATON, C.D.; BENNET, R.J.; JAGADISH, V.C.; RANDALL, P.J. Aluminum tolerance in wheat. *Triticum aestivum* L.I. Uptake and distribution of aluminum in root apices. **Plant Physiology**, v.103, p. 685–693, 1993a.

DELHAIZE, E.; RYAN, P.R.; RANDALL, P.J. Aluminum tolerance in wheat. *Triticum aestivum* L. II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. **Plant Physiology**, v.103, p.695–702, 1993b.

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

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

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

DILLEWIJN, C. van. Botany of sugarcane. Waltham: **Chronica Botanica**, 1952. 371p.

DRUMMOND, R.D.; GUIMARÃES, C.T.; FELIX, J.; NINAMANGO-CÁRDENAS, F.E.; CARNEIRO, N.P.; PAIVA, E.; MENOSSI, M. Prospecting sugarcane genes involved in aluminum tolerance. **Genetics and Molecular Biology**, v.24, p.221-230, 2001.

ECCO, M.; SANTIAGO, E.F.; LIMA, P.R. Respostas biométricas em plantas jovens de cana-de-açúcar submetidas ao estresse hídrico e ao alumínio. **Comunicata Scientiae**, v.5, p.59-67, 2014.

EZAKI, B.; JAYARAM, K.; HIGASHI, A.; TAKAHASHI, K. A combination of five mechanisms confers a high tolerance for aluminum to a wild species of Poaceae, *Andropogon virginicus* L. **Environmental and Experimental Botany**, v.93, p.35– 44, 2013.

EZAKI, B.; NAGAO, E.; YAMAMOTO, Y.; NAKASHIMA, S.; ENOMOTO, T. Wild plants, *Andropogon virginicus* L. and *Miscanthus sinensis* Anders, are tolerant to multiple stresses including aluminum, heavy metal stresses and oxidative stresses. **Plant Cell Reports**, v.27, p.951–961, 2008.

ETICHA, D.; THE, C.; WELCKER, C.; NARRO, L.; STAß, A.; HORST, W.J. Aluminum-induced callose formation in root apices: inheritance and selection trait for adaptation of tropical maize to acid soils. **Field Crops Research**, v.93, p.252–263, 2005.

FAMOSO, A.N., CLARK, R.T., SHAFF, J.E., CRAFT, E., MCCOUCH, S.R.; KOCHIAN, L.V. Development of a novel aluminum tolerance phenotyping platform used for comparisons of cereal aluminum tolerance and investigations into rice aluminum tolerance mechanisms. **Plant Physiology**, v.153, p.1678–1691, 2010.

FAOSTAT. Food and agriculture organization of the United Nations. Statistical pocketbook: world food and agriculture. 2015. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i4691e.pdf>>. Acesso em 01/07/2018.

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

FERREIRA, T.H.S.; TSUNADA, M.S.; BASSI, D.; ARAÚJO, P.; MATTIELLO, L.; GUIDELLI, G.V.; RIGHETTO, G.L.; GONÇALVES, V.R.; LAKSHMANAN, P.; MENOSSI, M. Sugarcane water stress tolerance mechanisms and its implications on developing biotechnology solutions. **Frontiers Plant Science**, v.8, 2017.

FIGUEROA, P.; LEÓN, G.; ELORZA, A.; HOLUIGUE, L.; JORDANA, X. Three different genes encode the iron-sulfur subunit of succinate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, v.46, 241-50, 2001.

FREITAS, F.A.; KOPP, M.M.; SOUSA, R.O.; ZIMMER, P.D.; CARVALHO, F.I.F.; OLIVEIRA, A.C. 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, p.72–79, 2006.

FUJII, M.; YOKOSHO, K.; YAMAJI, N.; SAISHO, D.; YAMANE, M.; TAKAHASHI, H.; SATO, K.; NAKAZONO, M.; MA, J.F. Acquisition of aluminium tolerance by modification of a single gene in barley. **Nature Communication**, 3:713, 2012.

FURTADO, A.; LUPOI, J.S.; HOANG, N.V.; HEALEY, A.; SINGH, S.; SIMMONS, B.A., et al. Modifying plants for biofuel and biomaterial production. **Plant Biotechnology Journal**, v.12, p.1246–1258, 2014.

GALLEGO, F.J., BENITO, C. Genetic control of aluminium tolerance in rye (*Secale cereale* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.92, p.688-695, 1997.

GIULIETTI, A.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; DECALLONNE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, v.25, p.386-401, 2001.

GUPTA, N.; GAURAV, S.S.; KUMAR, A. Molecular basis of aluminum toxicity in plants: a review. **American Journal of Plant Sciences**, v.4, p.21-37, 2013.

HAMMOND, K.E.; EVANS, D.E.; HODSON, M.J. Aluminium/silicon interactions in barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. **Plant and Soil**, v.173, p.89-95, 1995.

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.

HOANG, N.V.; FURTADO, A.; BOTHA, F.C.; SIMMONS, B.A.; HENRY, R.J. Potential for genetic improvement of sugarcane as a source of biomass for biofuels. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v.3, 2015.

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, 2008. 30p.

HORST, W.J.; WANG, Y.; ETICHA, D. The role of the root apoplast in aluminium-induced inhibition of root elongation and in aluminium resistance of plants: a review. **Annals of Botany**, v.106, p.185-197, 2010.

HUANG, C.F.; YAMAJI, N.; MITANI, N.; YANO, M.; NAGAMURA, Y.; MA, J.F. A bacterial-type ABC transporter is involved in aluminum tolerance in rice. **Plant Cell**, v.21, p.655-667, 2009.

INOSTROZA-BLANCHETEAU, C.; RENGEL, Z.; ALBERDI, M.; MORA, M.L.; AQUEA, F.; ARCE-JOHNSON, P.; REYES-DIAZ, M. Molecular and physiological strategies to increase aluminum resistance in plants. **Molecular Biology Reports**, v.39, p.2069-2079, 2012.

JAISWAL, D.; SOUZA, A.P.; LARSEN, S.; LEBAUER, D.S.; MIQUEZ, E.; SPAROVEK, G.; BOLLERO, G.; BUCKERIDGE, M.S.; LONG, S.P. Brazilian sugarcane ethanol as an expandable green alternative to crude oil use. **Nature Climate Change**, v.7, p.798-792, 2017.

JESUS, D.S. Aspectos fisiológicos e bioquímicos de genótipos de girassol sob estresse por alumínio. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia Cruz das Almas, 2012. 62f.

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

KHU, D.M.; REYNO, R.; BRUMMER, E.C.; MONTEROS, M.J. Screening Methods for Aluminum Tolerance in Alfalfa. **Crop Science**, v.52, p.161-167, 2012.

KLUG, B.; HORST, W.J. Spatial characteristics of aluminium uptake and translocation in roots of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). **Physiologia Plantarum**, v.139, p.181-191, 2010.

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.

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

KOCHIAN, L.V.; PIÑEROS, M.A.; LIU, J.; MAGALHÃES, J.V. Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum resistance. **Annual Review of Plant Biology**, v.66, p.571-598, 2015.

KOLLMEIER, M.; FELLE, H.H.; HORST, W.J. Genotypical differences in Al resistance of *Zea mays* (L.) are expressed in the distal part of the transition zone. Is reduced basipetal auxin flow involved in inhibition of root elongation by Al? **Plant Physiology**, v.122, p.945-956, 2000.

KOVERMANN, P.; MEYER, S.; HOERTENSTEINER, S.; PICCO, C.; SCHOLZ-STARKE, J.; RAVERA, S.; LEE, Y.; MARTINOIA, E. The *Arabidopsis* vacuolar malate channel is a member of the ALMT family. **Plant Journal**, v.52, p.1169–1180, 2007.

KUPPER, H.; LOMBI, E.; ZHAO, F.J.; MCGRATH, S.P. Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. **Planta**, v.212, 75–84, 2000.

LANDELL, M.G.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.

LARSEN, P.B.; CANCEL, J.; ROUNDS, M.; OCHOA, V. *Arabidopsis ALS1* encodes a root tip and stele localized half type ABC transporter required for root growth in an aluminum toxic environment. **Planta**, v.225, p.1447-1458, 2007.

LARSEN, P.B.; GEISLER, M.J.; JONES, C.A.; WILLIAMS, K.M.; CANCEL, J.D. ALS3 encodes a phloem-localized ABC transporter-like protein that is required for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. **Plant Journal**, v.41, p.353-363, 2005.

LIDON, F.C; BARREIRO, M.G.; RAMALHO, J.C.; LAURIANO, J.A. Effects of aluminum toxicity on nutrient accumulation in maize shoots: implications on photosynthesis. **Journal of Plant Nutrition**, v.22, p.397-416, 1999.

LIMA, R.L.S.; SEVERINO, L.S.; FERREIRA, G.B.; SILVA, M.I.L.; ALBUQUERQUE, R.C.; BELTRÃO, N.E.M. Crescimento da mamoeira em solo com alto teor de alumínio na presença e ausência de matéria orgânica. **Revista brasileira de oleaginosas e fibrosas**, v.11, p. 15-21, 2007.

LIU, J.; MAGALHÃES, J.V.; SHAFF, J.; KOCHIAN, L.V. Aluminum-activated citrate and malate transports from the MATE and ALMT families function independently to confer Arabidopsis aluminum tolerance. **The Plant Journal**, v.57, p.389-399.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.

LU, D.; ZHANG, J. Effects of water stress on photosystem II photochemistry and its thermostability in wheat plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 50, p.1199-1206, 1999.

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

MAGALHAES, J.V.; LIU, J.; GUIMARÃES, C.T.; LANA, U.G.; ALVES, V.M.; WANG, Y.H.; SCHAFFERT, R.E.; HOEKENGA, O.A.; PIÑEROS, M.A.; SHAFF, J.E.; KLEIN, P.E.; CARNEIRO, N.P.; COELHO, C.M.; TRICK, H.N.; KOCHIAN, L.V. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. **Nature Genetics**, v.39, p.1156-1161, 2007.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2.ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319p.

MALLICK, S.; SINAM, G.; KUMAR-MISHRA, R.; SINHA, S. Interactive effects of Cr and Fe treatments on plants growth, nutrition and oxidative status in *Zea mays* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.73, p.987-995, 2010.

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

MARIN, A.; SANTOS, D. M. M. Interação da deficiência hídrica e da toxicidade do alumínio em guandu cultivado em hidroponia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.1267-1275, 2008.

MARIN, F.R.; LOPES-ASSAD, M.L.R.; ASSAD, E.D.; VIAN, C.E.; SANTOS, M.C. Eficiência da produção de cana-de-açúcar em duas safras no Estado de São Paulo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, 2008.

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

MARON, L.G.; GUIMARÃES, C.T.; KIRST, M.; ALBERT, P.S.; BIRCHLER, J.A.; BRADBURY, P.J.; BUCKLER, E.S.; COLUCCIO, A.E.; DANILOVA, T.V.; KUDRNA, D.; MAGALHAES, J.V.; PIÑEROS, M.A.; SCHATZ, M.C.; WING, R.A.; KOCHIAN, L.V. Aluminum tolerance in maize is associated with higher MATE1 gene copy number. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.110, p.5241–5246, 2013.

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**, v.198, p.1-6, 2013.

MATTIELLO, E.M.; PEREIRA, M.G.; ZONTA, E.; MAURI, J.; MATIELLO, J.D.; MEIRELES, P.G.; I.R. SILVA. 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 Solo**, v.32, p.425-434, 2008.

MATTIELO, L.; BEGCY, K.; SILVA, F.R.; JORGE, R.A.; MENOSSI, M. Transcriptome analysis highlights changes in the leaves of maize plants cultivated in acidic soil containing toxic levels of Al³⁺. **Molecular Biology Reports**, v.41, p.8107-8116, 2014.

MCCORMICK A.J.; CRAMER M.D.; WATT D.A. Sink strength regulates photosynthesis in sugarcane. **New Phytologist**, v.171, p.759-770, 2006.

MENDONÇA, R.J.; CAMBRAIA, J.; OLIVEIRA, J.A.; OLIVA, M.A. Efeito do alumínio na absorção e na utilização de macronutrientes em duas cultivares de arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, p.843-848, 2003.

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

MILIVOJEVIC, D. B.; STOJANOVIC, D. D. Role of calcium in aluminum toxicity on content of pigments and pigment-protein complexes of soybean. **Journal of Plant Nutrition**, v.26, p.341-350, 2003.

MILLER, S.S.; DRISCOLL, B.T.; GREGERSON, R.G.; GANTT, J.S.; VANCE, C.P. Alfalfa malate dehydrogenase (MDH): molecular cloning and characterization of five different forms reveals a unique nodule-enhanced MDH. **Plant Journal**, v.15, p.173-184, 1998.

MORENO-ALVARADO, M.; GARCÍA-MORALES, S.; TREJO-TÉLLEZ, L.I.; HIDALGO-CONTRERAS, J.V.; GÓMEZ-MERINO, F.C. Aluminum enhances growth and sugar concentration, alters macronutrient status and regulates the expression of NAC transcription factors in rice. **Frontiers in Plant Science**, v.8, p.1-16, 2017,

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

MOUSTAKA, J.; OUZOUNIDOU, G.; BAYÇU, G.; MOUSTAKAS, M. Aluminum resistance in wheat involves maintenance of leaf Ca^{2+} and Mg^{2+} content, decreased lipid peroxidation and Al accumulation, and low photosystem II excitation pressure. **Biometals**, v.29, p. (2016) 29: 611-623.

MOUSTAKAS, M.; OUZOUNIDOU, G.; ELEFThERIOU, E.P.; LANNOYE, R. Indirect effects of aluminium stress on the function of the photosynthetic apparatus. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.34, p.553-560, 1996.

MOUSTAKAS, M.; ELEFThERIOU, E.P.; OUZOUNIDOU, G. Short-term effects of aluminium at alkaline pH on the structure and function of the photosynthetic apparatus. **Photosynthetica**, v.34, p.169-177, 1997.

NIELSEN, E.; ORCUTT, D. The physiology of plants under stress. New York: **John Wiley & Sons**, 1996. p.704.

OLEKSYN, J.; KAROLEWSKI, P.; GIERTYCH, M.J.; WERNER, A.; TJOELKER, M.G.; REICH, P.B. Altered root growth and plant chemistry of *Pinus sylvestris* seedlings subjected to aluminum in nutrient solution. **Trees**, v.10, p.135-144, 1996.

OLIVEIRA, M. S. Tolerância de variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) à toxidez por alumínio em solução. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2012. 101f.

PANDA, S.K.; BALUSKA, F.; MATSUMOTO, H. Aluminum stress signaling in plants **Plant Signaling & Behavior**, v.7, p.592-597, 2009.

PARENTONI, S.N.; ALVES, V.M.C.; MILACH, S.K.; CANÇADO, G.M.A.; BAHIA FILHO, A. F.C.B. Melhoramento para tolerância ao alumínio como fator de adaptação a solos ácidos. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C., (eds). **Recursos genéticos & melhoramento**. Rondonópolis, Fundação Mato Grosso, 2001. p.783-851.

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

PELLET, D.M.; PAPERNIK, L.A.; KOCHIAN, L.V. Multiple aluminum-resistance mechanisms in wheat — roles of root apical phosphate and malate exudation. **Plant Physiology**, v.112, p.591–597, 1996.

PEREIRA, W.E.; SIQUEIRA, D.L.; MARTINEZ, C.A.; PUIATTI, M. Gas exchange and chlorophyll fluorescence in four citrus rootstocks under aluminium stress. **Journal of Plant Physiology**, v.157, p.513-520, 2000.

PFÄFFL, M.W. Relative quantification. In: DORAK, M.T. (Ed.). **Real-time PCR**. New York: Taylor and Francis, 2006. p.63-82.

POSCHENRIEDER, C.; GUNSÉ, B.; CORRALES, I.; BARCELÓ, J. A glance into aluminum toxicity and resistance in plants. **Science of the Total Environment**, v.400, p.356-368, 2008.

PURCINO, A.A.C.; ALVES, V.M.C.; PARENTONI, S.N.; BELELE, C.L.; LOGUERCIO, L.L. Aluminum effects on nitrogen uptake and nitrogen assimilating enzymes in maize genotypes with contrasting tolerance to aluminum toxicity. **Journal of Plant Nutrition**, v.26, p.31-61, 2003.

RAIJ, B. V.; ANDRADE, J. C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A. Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais. Campinas: **Instituto Agrônomo de Campinas**, 2001. 285p.

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

REYES-DIAZ, M.; INOSTROZA-BLANCHETEAU, C.; MILLALEO, R.; CRUCES, E.; WULFF-ZOTTELE, C.; ALBERDI, M.; MORA, M.D. Long-term aluminum exposure effects on physiological and biochemical features of Highbush Blueberry cultivars. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.135, p.212-222, 2010.

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**, v.84, p.13-18, 2013.

RIBEIRO, A.P.; DE SOUZA, W.R.; MARTINS, P.K.; VINECKY, F.; DUARTE, K.E.; BASSO, M.F.; CUNHA, B.A.D.B.; CAMPANHA, R.B.; OLIVEIRA, P.A.; CENTENO, D.C.; CANÇADO, G.M.A.; MAGALHÃES, J.V.; SOUSA, C.A.F.; ANDRADE, A.C.; KOBAYASHI, A.K.; MOLINARI, H.B.C. Overexpression of BdMATE gene improves aluminum tolerance in *Setaria viridis*. **Frontiers in Plant Science**, v.8, p.1-12, 2017.

RIDESA – Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro. **Catálogo nacional de variedades “RB” de cana-de-açúcar**. Curitiba, 2010. 136p.

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, 2006. p.375-418.

ROST-SIEBERT, K. **Aluminium toxicity in seedlings of norway spruce (*Picea abies*, Karst.) and beech (*Fagus sylvatica*, L.)**. Uppsala, 1984. 13p. Workshop on Aluminium Toxicity to Trees, Uppsala, 1984.

ROUT, G.R.; SAMANRARAY, S.; DAS, P. Aluminium toxicity in plants: a review. **Agronomie**, v.21, p.3-21, 2001.

SADE, H.; MERIGA, B.; SURAPU, V.; GADI, J.; SUNITA, M.S.L.; SURAVAJHALA, P.; KISHOR, P.B.K. Toxicity and tolerance of aluminum in plants: tailoring plants to suit to acid soils. **Biomaterials**, v.29, p.187-210, 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, 2007.

SÁNCHEZ-PARRA, B.; FIGUEIRAS, A.M.; ABD EL-MONEIM, D.; CONTRERAS, R.; ROUCO, R.; GALLEGO, F.J.; BENITO, C. The role of two Superoxide dismutase mRNAs in rye aluminium tolerance. **Plant Biology Journal**, v.17, p.694-702, 2015.

SASAKI, T.; RYAN, P.R.; DELHAIZE, E.; HEBB, D.M.; OGIHARA, Y.; KAWAURA, K.; NODA, K.; KOJIMA, T.; TOYODA, A.; MATSUMOTO, H.; YAMAMOTO, Y. Sequence upstream of the wheat (*Triticum aestivum* L.) ALMT1 gene and its relationship to aluminum resistance. **Plant Cell Physiology**, v.47, p.1343–1354, 2006.

SASAKI, T.; YAMAMOTO, Y.; EZAKI, B.; KASUARA, M.; JU AHN, S.; RYAN, P.; DELHAIZE, E.; MATSUMOTO, H. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. **Plant Journal**, v.37, p.645-653, 2004.

SILVA, S.; PINTO, G.; DIAS, M.C.; CORREIA, C.M.; MOUTINHO-PEREIRA, J.; PINTO-CARNIDE, O.; SANTOS, C. Aluminium long-term stress differently affects photosynthesis in rye genotypes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.54, p.105-112, 2012.

SILVA, S.; PINTO-CARNIDE, O.; MARTINS-LOPES, P.; MATOS, M.; GUEDES-PINTO, H.; SANTOS, C. Differential aluminium changes on nutrient accumulation and

root differentiation in an Al sensitive vs. tolerant wheat. **Environmental and Experimental Botany**, v.68, p.91–98, 2010.

SIMÕES, C.C.; MELO, J.O.; MAGALHAES, J.V.; GUIMARÃES, C.T. Genetic and molecular mechanisms of aluminum tolerance in plants. **Genetics and Molecular Research**, v.11, p.1949-1957, 2012.

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.

SMITH, E.; NAIK, D.; CUMMING, J.R. Genotypic variation in aluminum resistance, cellular aluminum fractions, callose and pectin formation and organic acid accumulation in roots of *Populus* hybrids. **Environmental and Experimental Botany**, v.72, p.182-193, 2011.

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

SOUZA, R. P.; MACHADO, E. C.; SILVA, J. A. B.; LAGÔA, A. M. M. A.; SILVEIRA, J. A. G. Photosynthetic gas exchange in cowpea (*Vigna unguiculata*) during water stress and recovery. **Environmental and Experimental Botany**, v.51, p.45-56, 2004.

STREIT, N.M.; CANTERLE, L.P.; CANTO, M.W.; HECKTHEUER, L.H.H. As Clorofilas. **Ciência Rural**, v.35, p.748-755, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013, 526 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 3.ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002. p.423-460.

TOLRA, R.; BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Constitutive and aluminium-induced patterns of phenolic compounds in two maize varieties differing in aluminium tolerance. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.103, p.1486–1490, 2009.

VALENTINUZZI, F.; CESCO, S.; TOMASI, N.; MIMMO, T. Effect of aluminium exposure on the release of organic acids and genistein from the roots of *Lupinus albus* L. plants. **Rhizosphere**, v.1, p.29-32, 2016.

VANCE, C.P.; HEICHER, G.H. Carbon in N₂ fixation: limitation or exquisite adaptation. **Annual Review of Plant Biology**, v.42, p.373-390, 1991.

VASCONCELOS, A.C.M.; CASAGRANDE, A.A.; PERECIN, D.; JORGE, L.A.C.; LANDELL, M.G.A. Avaliação do sistema radicular da cana-de-açúcar por diferentes métodos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.27, p.849-858, 2003.

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

VÁZQUEZ, M.D; POSCHENRIEDER, C.; CORRALES, I.; BARCELÓ, J. Change in apoplastic aluminum during the initial growth response to aluminum by roots of a tolerant maize variety. **Plant Physiology**, v.119, p.435-444, 1999.

VETTORE, A.L.; SILVA, F.R.; KEMPER, E.L.; ARRUDA, P.. The libraries that made SUCEST. **Genetics and Molecular Biology**, v.24, p.1-7, 2001.

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, p.205-215, 1983.

VITORELLO, V.A.; CAPALDI, F.R.; STEFANUTO, V.A. Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v.17, p.129-143, 2005.

VON ELBE J.H. Colorantes. In: FENNEMA, O.W. **Química de los alimentos**. 2.ed. Zaragoza : Wisconsin - Madison, 2000. Cap.10, p.782-799.

VONDRÁČKOVÁ, S.; SZÁKOVÁ, J.; DRÁBEK, O.; TEJNECKÝ, V.; HEJCMAN, M.; MÜLLEROVÁ, V.; TLUSTOŠ, P. Aluminium uptake and translocation in al hyperaccumulator *Rumex obtusifolius* is affected by low-molecular-weight organic. **Plos One**, v. 10, p.1-18, 2015.

WACLAWOVSKY, A.J.; SATO, M.P.; LEMBKE, C.G.; MOORE, P.H. SOUZA, G.M. Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. **Plant Biotechnology Journal**, v.8, p.263-276, 2010.

WANG, G.; FIERS, M.; ELLENDORFF, U.; WANG, Z.; WIT, P.J.G.M.; ANGENENT, G.C.; THOMMA, B.P.H.J. The diverse roles of extracellular leucine-rich repeat-containing receptor-like proteins in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.29, p.285–299, 2010.

WANG, L.; FAN, X.W.; PAN, J.L.; HUANG, Z.B.; LI, Y.Z. Physiological characterization of maize tolerance to low dose of aluminum, highlighted by promoted leaf growth. **Planta**, v.242, p.1391-1403, 2015.

- WANG, W.; XIA, M.X.; CHEN, J.; YUAN, R.; DENG, F.N.; SHEN, F.F. Gene expression characteristics and regulation mechanisms of superoxide dismutase and its physiological roles in plants under stress. **Biochemistry (Moscow)**, v.81, p.465-480, 2016.
- WATT, D.A. Aluminum-responsive genes in sugarcane: identification and analysis of expression under oxidative stress. **Journal of Experimental Botany**, v.54, p.1163-1174, 2003.
- WESTON, L.A.; RYAN, P.R.; WATT, M. Mechanisms for cellular transport and release of allelochemicals from plant roots into the rhizosphere, **Journal of Experimental Botany**, v.63, p.3445–3454, 2012.
- YANG, M.Z.; NIAN, H.; SIVAGURU, M.; TANAKANMURA, S.; MATSUMOTO, H. Characterization of aluminum-induced citrate secretion in aluminum-tolerant soybean (*Glycine max*) plants. **Physiologia Plantarum**, v.113, p.64–71, 2001.
- YANG, J.L.; LI, Y.Y.; ZHANG, Y.J.; WU, Y.R.; WU, P.; ZHENG, S.J. Cell wall polysaccharides are specifically involved in the exclusion of aluminum from the rice root apex. **Plant Physiology**, v.146, p.602–611, 2008.
- YOKOSHO, K.; YAMAJI, N.; MA, J.F. Isolation and characterization of two MATE genes in rye. **Functional Plant Biology**, v.37, p.296-303, 2010.
- YU, H.N.; LIU, P.; WANG, Z.Y.; CHEN, W.R.; XU, G.D. The effect of aluminum treatments on the root growth and cell ultrastructure of two soybean genotypes. **Crop Protection**, v.30, p.323-328. 2011.
- YU, M.; SHEN, R.; XIAO, H.; XU, M.; WANG, H.; WANG, H.; ZENG, Q.; BIAN, J. Boron alleviates aluminum toxicity in pea (*Pisum sativum*). **Plant and Soil**, v.314, p.87-98, 2009.
- ZHANG, X.B.; LIU, P.; YANG, Y.S.; XU, G.D. Effect of Al in soil on photosynthesis and related morphological and physiological characteristics of two soybean genotypes. **Botanical Studies**, v.48, p.435–444, 2007.
- ZHU, H.; WANG, H.; ZHU, Y.; ZOU, J.; ZHAO, F.J.; HUANG, C.F. Genome-wide transcriptomic and phylogenetic analyses reveal distinct aluminum-tolerance mechanisms in the aluminum-accumulating species buckwheat (*Fagopyrum tataricum*). **BMC Plant Biology**, v.15, 2015.