



Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Agrárias
Engenharia Agrônoma



DANIEL LUIZ SANS DE LIMA

**SENSIBILIDADE DE VARIEDADES DE MILHO (*Zea Mays*)
AO ALUMÍNIO EM SOLUÇÃO**

ARARAS – 2011

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Agrárias
Departamento de Recursos Naturais e Proteção Ambiental

DANIEL LUIZ SANS DE LIMA

**Sensibilidade de variedades de milho (*Zea mays*)
ao alumínio em solução**

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia
Agrônômica – CCA – UFSCar para a obtenção do
título de Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. Marcio Roberto Soares

**Araras-SP
2011**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

A Deus, por ter me oferecido a oportunidade de viver, evoluir a cada dia e conhecer todas as pessoas que citarei abaixo. Aos meus pais, irmão e a minha namorada pelo apoio e carinho oferecidos em todo momento de minha vida e, principalmente, neste.

AGRADECIMENTOS

Agradeço o Professor Doutor Marcio Roberto Soares, todos os professores desta Universidade, que ajudaram a construir o conhecimento que permitiu elaborar esse trabalho e ainda as colegas: Marina Gomes da Silva, Jacqueline Malvestiti e Mariane Oliveira que colaboraram para a realização desse trabalho.

“O engenheiro agrônomo o principal profissional responsável pelo elemento essencial à vida dos seres vivos: o alimento. Em todo o mundo, mesmo em pleno século XXI, de acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), há mais de 800 milhões de pessoas que se alimentam com quantidades inferiores às necessárias para sua sobrevivência. Acrescente-se ainda que a população mundial, segundo estimativas, será de 9 a 10 bilhões de habitantes, ou seja, mais de 4 bilhões de pessoas deverão ser alimentadas. Precisaremos dobrar a produção de certos produtos agrícolas e isto só será possível através do engenheiro agrônomo. O atendimento à procura mundial de alimentos está ligado diretamente à formação, capacitação e atuação desses profissionais”.

Engº Marcos Roberto Furlan

RESUMO

A influência da toxidez por Al sobre o desenvolvimento do sistema radicular e na interferência da absorção de nutrientes, típica de solos ácidos, tem sido apresentada como uma das principais causas da baixa produtividade de muitas culturas de interesse econômico. Os objetivos deste estudo foram: avaliar o desenvolvimento radicular das variedades de milho Dow 2B655, AG 8061 pro, Al. Bandeirante e DKB 747 de milho em solução nutritiva com diferentes condições de estresse por Al (0, 55, 111, 222, 444 e 666 $\mu\text{mol L}^{-1}$); examinar alterações morfológicas nas raízes de plântulas de milho através de microscopia óptica; verificar a penetração do Al no tecido radicular com o uso do corante hematoxilina. O experimento foi conduzido em condições de laboratório, em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os resultados de taxa de crescimento radicular (cm dia^{-1}) foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância. Parâmetros morfológicos do Al nos tecidos radiculares, indicados pela coloração, foram explorados na forma de imagens por registro fotográfico das observações ao microscópio óptico. O aumento da concentração de Al em solução causou diminuição da taxa de alongamento radicular de todas as variedades. A concentração crítica de Al em solução, e que iniciou os processos de deterioração do ápice radicular, foi de 111 $\mu\text{mol Al L}^{-1}$. As principais alterações morfológicas das raízes, ou seja, a produção de calose e o colapso e a deformação da coifa, iniciaram a partir da concentração crítica de 111 $\mu\text{mol Al L}^{-1}$ somente na variedade AG 8061. Para as variedades Al. Bandeirante, DKB 747 e Dow 2B655, injúrias fisiológicas nos ápices radiculares foram causadas por concentrações de Al em solução superiores a 444 $\mu\text{mol Al L}^{-1}$. O corante hematoxilina auxiliou na indicação do acúmulo e localização de Al no tecido radicular. A biometria de raízes indicou que as variedades Al. Bandeirante e Ag. 8061 foram mais tolerantes ao Al em solução, enquanto as variedades Dow 2B655 e DKB 747 foram as mais sensíveis. Porém, o exame visual pelo método da hematoxilina e por meio de microscopia óptica indicou a seguinte sequência de tolerância ao Al em solução: Al Bandeirante > Dow 255 = DKB 747 > Ag 806.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Evolução do sistema radicular do milho em função da fase vegetativa	16
Figura 2 - Aspectos morfológicos de raízes de plântulas de trigo afetadas pelo alumínio do solo	17
Figura 3 - Parte aérea e sistema radicular de plantas de milho cultivado em solução nutritiva com e sem alumínio (Al).....	19
Figura 4 - Sistema radicular de onze plantas de milho cultivado em solução nutritiva contendo diferentes concentrações de alumínio (Al)	19
Figura 5 - Sementes de milho no interior da câmara germinadora disposta em cartuchos de papel germinador.....	27
Figura 6 - Tanque de imersão contendo solução nutritiva e sementes identificadas sobre EVA.....	29
Figura 7 – Sistema radicular antes da exposição a soluções de alumínio...	30
Figura 8 – Recipientes contendo diferentes concentrações de alumínio Plântulas recém instaladas.....	30
Figura 9 – Recipientes contendo diferentes concentrações de alumínio Plântulas após 5 dias em solução.....	31
Figura 10 – Escala de avaliação do acúmulo de alumínio em raízes de plantas por meio do teste de coloração pela hematoxilina.....	32
Figura 11 – Hamatoxilina suficiente para cobrir as raízes	32
Figura 12 – Coleta das raízes após lavagem.....	33
Figura 13 - Observações da extremidade radicular relacionada a doses crescentes de alumínio (variedade AG 8061).....	37
Figura 14 - Observações da extremidade radicular relacionada a doses crescentes de alumínio (variedade DOW 2B655).....	38
Figura 15 - Observações da extremidade radicular relacionada a doses crescentes de alumínio (variedade DKB 747).....	38
Figura 16 - Observações da extremidade radicular relacionada a doses crescentes de alumínio (variedade Al Bandeirante).....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Teores foliares de macro e de micronutrientes	28
Tabela 2 - Micronutrientes utilizados na composição da solução nutritiva	28
Tabela 3 - Macronutrientes utilizados na composição da solução nutritiva	29
Tabela 4 - Classificação visual das raízes de milho com reagente.....	36
Tabela 5- Resumo Estatístico (Anova)	41
Tabela 6 - Análise estatística dos valores absolutos de alongamento radicular	41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 Milho classificação taxonômica	12
2.2 Milho no Brasil e no Mundo	12
2.3 Fatores que interferem na produtividade do milho.....	13
2.4 Efeitos do alumínio no sistema radicular.....	15
2.5 - Mecanismos bioquímicos de tolerância ao alumínio.....	20
3. OBJETIVOS	26
4. MATERIAL E MÉTODO	27
4.1 Pré-germinação das sementes	27
4.2 Natureza da solução nutritiva e tempo de cultivo.....	27
4.2.1 Composição da solução nutritiva	28
4.3 Faixa de concentração de Alumínio em solução nutritiva	30
4.4 Tempo de exposição das raízes à solução contendo Alumínio.....	31
4.5 Parâmetros estudados	31
4.5.1 Teste de coloração das raízes com indicadores.....	31
4.5.2. Estimativas das taxas de alongamento radicular.....	33
4.6 – Avaliação dos resultados	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 Teste de coloração das raízes com corantes indicadores	35
5.1.1 Avaliação do ápice radicular submetido a hematoxilina na AG8061	35
5.1.2: Avaliação do ápice radicular submetido a hematoxilina na Dow 2B655	35
5.1.3: Avaliação do ápice radicular submetido a hematoxilina na DKB 747	35
5.1.4: Avaliação do ápice radicular submetido a hematoxilina na Al.Band.	36
5.2 Testes de coloração das raízes com corantes indicadores.....	36
5.2.1 Método da Hematoxilina	36
5.3 Avaliação dos Ápices radiculares em microscópio	37
5.3.1 Avaliação dos ápices radiculares da variedade AG 8061	37
5.3.2 Avaliação dos ápices radiculares da variedade DOW 2B655	38
5.3.3 Avaliação dos ápices radiculares da variedade DKB 747	38
5.3.4 Avaliação dos ápices radiculares da variedade Al Bandeirante	38
5.4 Análise Estatística	41

6. CONCLUSÕES	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho (*Zea mays*), ficando atrás dos Estados Unidos, com produtividade média duas vezes maior (9.369 kg/ha), e da China (USDA, 2006). No Brasil, a produção é destinada para alimentação humana e animal. Já os Estados Unidos usam o milho para produção de álcool, que atingiu 21 bilhões de litros no ano de 2006 e tem perspectivas de alcançar 36 bilhões de litros até 2012 (USDA, 2006).

A área cultivada com milho, resultante da soma das duas safras 2010/2011, deve alcançar 13.288,9 mil hectares, com crescimento de 2,3% em relação à safra anterior. A produtividade média prevista para a primeira safra é 4.354 kg/ha, 1,3% menor que a safra 2009/2010. Para o milho de segunda safra é esperada uma produtividade de 3.946 kg/ha. Ponderando as produtividades da primeira e da segunda safra, a média da produtividade nacional deve ficar em 4.185 kg/ha, 2,9 % menor que a safra anterior. A produção brasileira de milho esperada é de 55,61 milhões de toneladas (CONAB, 2011). A inserção de novas tecnologias para o cultivo de milho, o que inclui o melhoramento genético, mecanização, tratamentos culturais, irrigação, entre outros, tem contribuído para o aumento crescente da produção nacional, mas a expressão do potencial genético de muitas variedades pode ser otimizado com a adequação das variedades ao zoneamento edafoclimático.

Uma das principais limitações dos cultivos agrícolas nos trópicos e, por consequência, do incremento da produção de alimentos nesta região, está relacionada à ocorrência de solos ácidos, que 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% (FAGERIA et al., 1999). Aproximadamente 70% do território brasileiro são cobertos por solos ácidos e, em 40%, a produtividade das culturas está reduzida à metade (QUAGGIO 2000). 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 Al³⁺ foi o cátion trocável predominante em mais de 30% dos solos com pH inferior a 5,6. No Brasil, a ocorrência de solos com potencial para atividade agrícola afetados por problemas de toxidez por Al é da ordem de 60% (ABREU Jr. et al., 2003). A acidez do solo, e principalmente a efeito tóxico do Al, é reconhecida como uma das principais causas das limitações da cultura do milho em regiões tradicionais na produção de grãos e, com mais notoriedade, em regiões que representam as novas fronteiras agrícolas do país, como o Cerrado, que ocupam cerca de 20% do território nacional (BORGONOVÍ et al., 1987).

Duas maneiras são propostas para contornar o problema de excesso de Al no solo. Uma delas consiste em neutralizar a acidez do solo (QUAGGIO, 2000). A incorporação superficial do calcário é uma prática empregada na agricultura tropical como forma de elevar o pH do solo e a saturação por bases, além de promover a detoxificação do Al, mediante a sua precipitação química na forma de hidróxido. Quaggio (2000) estimou que o consumo médio de calcário no Brasil é de $0,3 \text{ t ha}^{-1}$, bem abaixo do que seria recomendado consumir (1 t ha^{-1}) para as principais culturas. A dificuldade da neutralização da acidez subsuperficial tem sido atribuída à lenta solubilidade do calcário, confinando o sistema radicular no horizonte superficial, o que traz conseqüências restritivas para o crescimento da parte aérea. Essa limitação adquire maior relevância durante períodos de deficiência hídrica, quando a aquisição de água e de nutrientes das camadas mais profundas pode ser decisiva para a sobrevivência das plantas (FIDALSKI & TORMENA, 2005). Ainda que existam práticas alternativas, como a incorporação profunda do calcário, ou o uso de sais mais solúveis, como o gesso agrícola, tais opções sofrem restrições de ordem técnica ou econômica, que podem inviabilizar sua utilização.

Neste contexto, a busca de variedades produtivas, tolerantes à acidez do solo e com capacidade para emitir raízes em subsolos com Al em níveis tóxicos, surge como alternativa importante dentro das estratégias de manejo dos solos ácidos (FOY, 1997; DELHAIZE & RYAN, 1995; BRACCINI et al., 2000ab; SILVA et al., 2002). Há dificuldade para a definição de um valor crítico para o Al do solo que provoca toxidez às plantas, pois não existe consistência entre os resultados experimentais, em razão das diferenças genéticas entre as espécies testadas, os solos e as condições experimentais (QUAGGIO, 2000). A identificação de variedades tolerantes ou sensíveis pode contribuir para sistemas sustentáveis de produção, já que a seleção de genótipos tolerantes à condições restritivas de fertilidade do solo, com ênfase aos atributos de subsuperfície limitantes à expansão do sistema radicular, pode maximizar a eficiência de utilização dos insumos e minimizar o risco imposto pela combinação de diversas características restritivas do ambiente que impedem a máxima expressão genética das variedades.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FATORES EDÁFICOS QUE INTERFEREM NA PRODUTIVIDADE DO MILHO

O solo é um dos componentes mais importantes de um conjunto complexo de fatores de produção, que se destaca pelo seu importante papel de fornecer às plantas suporte físico, água e nutrientes. 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. Portanto, o conhecimento dos fatores edáficos é importante para julgar o potencial de produção agrícola e para alocar de maneira mais eficiente as variedades de cana-de-açúcar nos ambientes mais promissores (MAULE et al., 2001; LANDELL et al., 2003).

A dificuldade de expansão do volume radicular incide diretamente no menor volume de solo explorado pelo sistema radicular e na menor produtividade. Kofler (1986) comparou a profundidade do sistema radicular de diversas culturas e observou que, no Brasil, a profundidade do sistema radicular do milho atinge 20 cm, enquanto em outros importantes países produtores as raízes podem alcançar 100-170 cm em seus estádios fenológicos mais avançados (Figura 1).

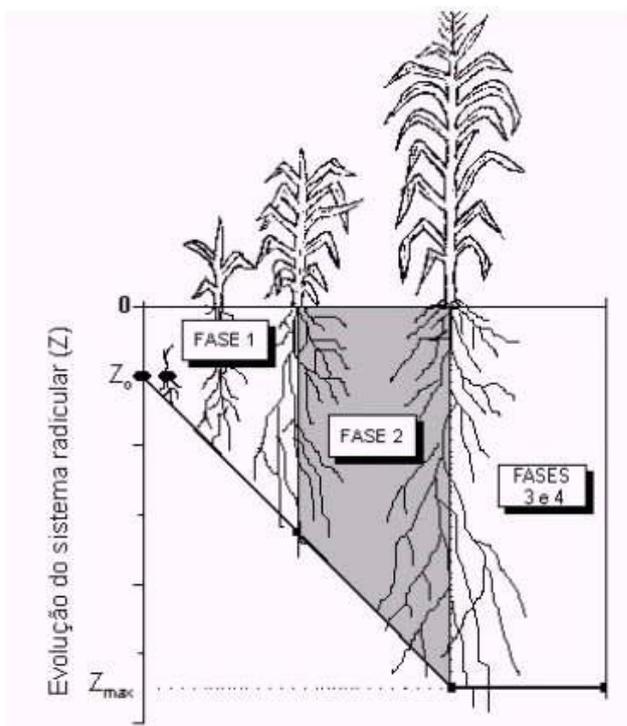


Figura 1. Evolução do sistema radicular do milho em função da fase vegetativa (EMBRAPA, 2006).

Impedimentos físicos e químicos do solo têm sido as causas mais freqüentes do reduzido crescimento radicular no subsolo (VASCONCELOS & GARCIA, 2005). Dentre os atributos físicos do solo que são limitantes ao aprofundamento radicular, destacam-se a textura, a disponibilidade de água, a porosidade, a aeração e a resistência à penetração (compactação) (QUEIROZ-VOLTAN et al., 1998).

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: alta saturação por Al (m%); toxidez iônica por Al, H e Mn; baixas capacidade de troca de cátions (CTC) e saturação por bases (V%); disponibilidade restrita de nutrientes, com destaque para Ca, Mg, Mo e, sobretudo, para P, devido a fixação química do fosfato por oxi-hidróxidos de Fe e de Al. Além disso, teores de N e de K em solos ácidos tendem a ser deficientes devido, respectivamente, aos baixos conteúdos de matéria orgânica e ao alto grau de intemperismo (SOBRAL et al., 1992; ABREU Jr. et al., 2003; LANDELL et al., 2003).

De todos os atributos químicos, a toxidez por Al é considerada a principal barreira química oferecida ao aprofundamento do sistema radicular. A densidade e a distribuição de raízes são indicativos da qualidade do solo para o crescimento das plantas (OUSSIBLE et al., 1992; EGHBALL & MARANVILLE, 1993). Assim, a baixa produtividade de muitos solos está associada ao conjunto de atributos determinantes dos processos de absorção de água e de nutrientes, que normalmente incidem sobre a estrutura de captação destes recursos, as raízes (SOBRAL & GUIMARÃES, 1992; ABREU Jr. et al., 2003).

2.2 EFEITOS DO Al SOBRE O SISTEMA RADICULAR

Os efeitos citológicos, morfológicos, fisiológicos e bioquímicos do Al na planta têm sido abordados por vários autores (FOY, 1974; WRIGHT, 1989; KOCHIAN, 1995; DELHAIZE & RYAN, 1995; SILVA et al., 2002; ROSSIELLO & JACOB NETTO, 2006). A raiz é o órgão mais sensível dos vegetais ao excesso de Al. Os mecanismos pelos quais o Al afeta as funções celulares estão ligados à alterações na membrana das células da raiz, à inibição da síntese de DNA e da divisão celular e à inibição do alongamento celular por reduzir a plasticidade e a elasticidade da parede celular e a atividade mitótica (ROY et al., 1988). Morfologicamente, as raízes tornam-se curtas, grossas, frágeis, com ápices espessos e coloração marrom (Figura 2) (FOY, 1974; DELHAIZE & RYAN, 1995).

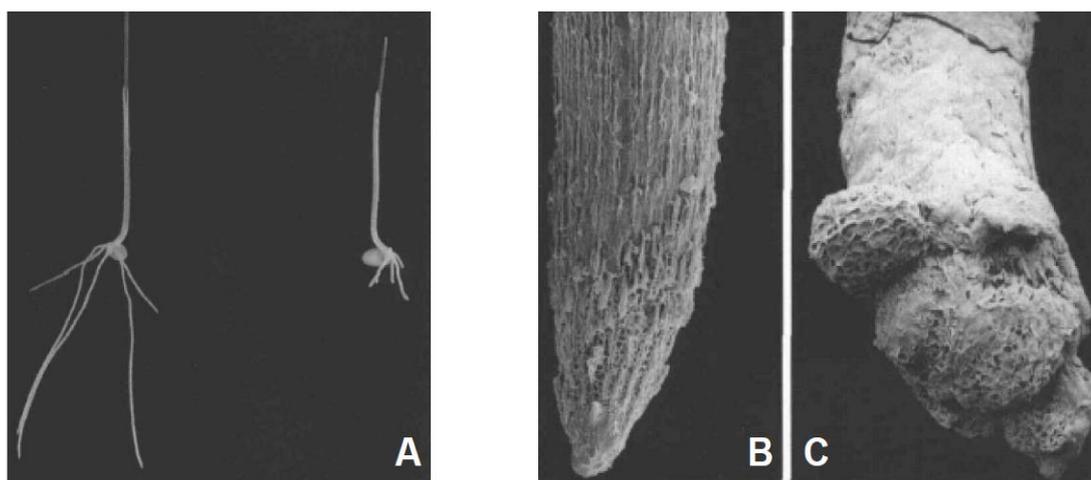


Figura 2. Aspectos morfológicos de raízes de plântulas de trigo afetadas pelo alumínio do solo: (A) efeito do Al no crescimento das raízes; (B) microscopia eletrônica de varredura (MEV) do ápice radicular de variedades tolerante (B) e sensível (direita) ao alumínio do solo (C) (DELHAIZE & RYAN, 1995).

O Al induz também alterações na arquitetura do sistema radicular, reprimindo o crescimento das raízes laterais e inibindo a área e o volume dos pêlos radiculares (ROSSIELLO & JACOB-NETTO, 2006). Há a rápida inibição do processo de alongação radicular (cerca de 30-120 min após o contato dos genótipos mais sensíveis com o Al tóxico), em razão da paralisação da divisão celular (WRIGHT, 1989; DELHAIZE & RYAN, 1995; KOCHIAN, 1995). A produção de biomassa radicular é normalmente mais sensível à toxicidade do Al que a produção de biomassa da parte aérea (MACHADO & PEREIRA, 1990). No entanto, Techio (2009) observou uma importante redução da biomassa da parte aérea de plantas do híbrido 30F53 de milho submetidas à 1,5 mmol de Al L⁻¹ (Figura 3, além da diminuição do sistema radicular (Figura 4).

Por ser um cátion trivalente, o Al é fortemente adsorvido pelo solo e, assim, sua concentração na solução do solo é baixa ($\mu\text{mol L}^{-1}$) (HAYNES & MOKOLOBATE, 2001). Há dificuldade para a definição de um valor crítico para o Al do solo que provoca toxidez às plantas, mas é conhecido que mesmo essas baixas concentrações de Al em solução já 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 & GUIMARÃES, 1992).



Figura 3. Parte aérea e sistema radicular de plantas de milho (Híbrido 30F53) cultivadas em solução nutritiva com e sem alumínio (Al) (TECHIO, 2009).



Figura 4. Sistema radicular de onze plantas de milho (Híbrido 30F53) cultivadas em solução nutritiva contendo diferentes concentrações de alumínio (Al) (TECHIO, 2009).

Os mecanismos fisiológicos de defesa ou de tolerância das plantas aos efeitos tóxicos do Al no crescimento da raiz são controlados por diferentes genes e rotas bioquímicas e incluem (FERREIRA et al., 2006): a) capacidade das plantas em alterar o ambiente rizosférico, elevando o pH e reduzindo a solubilidade do Al; b) capacidade das plantas de possuir baixa CTC na raiz, portanto, maior afinidade por cátions monovalentes, de modo que acumulem, assim, menor concentração de Al em suas raízes (KENNEDY et al., 1986); c) capacidade das plantas de secretar mucilagem em presença de Al; d) capacidade das plantas de utilizar os nutrientes na presença de Al, principalmente P e Ca (FREITAS et al., 2006; MATTIELO et al. 2008); e) capacidade das plantas de produzir elevados teores de ácidos orgânicos responsáveis pela complexação do Al (MARIANO et al., 2005); f) habilidade da raiz em continuar a divisão e o alongamento celular sob estresse; g) manutenção de áreas meristemáticas aptas a desenvolverem novos tecidos após o estresse (ROSSIELLO & JACOB-NETTO, 2006).

2.3 AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA DAS PLANTAS AO Al EM SOLUÇÃO

A grande maioria das culturas anuais, de interesse econômico, não possui habilidade de acúmulo de Al na parte aérea e, portanto, é improvável que atributos como peso ou área foliar, número de ramos, perfilhos ou altura, sejam afetados diretamente pela presença do Al nos tecidos (ROSSIELLO & JACOB NETTO, 2006). Logo, os melhores indicadores da variabilidade genotípica para a tolerância ao Al tóxico são aqueles ligados às raízes (Ferreira et al., 2006), principalmente dos primeiros milímetros do ápice radicular (Figura 3) (ROSSIELLO & JACOB-NETTO, 2006).

Vários estudos avaliaram a sensibilidade de cultivares, linhagens e híbridos de gramíneas cultivadas (BRENES & PEARSON, 1973) ao Al no solo ou em solução, principalmente milho (*Zea mays* L.) (FURLANI et al., 1986; PINTO et al., 1995), arroz (*Oryza sativa* L.) (VASCONCELOS et al., 2002; KIKUI et al., 2005) e trigo (*Triticum aestivum* L.) (CAMARGO et al., 1987; CARVER & OWNBY, 1995; SOUZA, 1998; VOSS et al., 2006). Mascarenhas et al. (1984), Menosso et al. (2000) e Silva et al. (2005) avaliaram a tolerância de plantas de soja [*Glycine max* (L.) Merr.], enquanto Braccini et al. (2000ab) e Mattiello et al. (2008) estudaram plantas de café (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*) sob estresse por Al. No entanto, não existe consenso entre os pesquisadores na proposição de condições e de critérios experimentais para avaliar a sensibilidade de espécies ou de variedades à toxidez por Al. A seleção de plantas tolerantes ao Al diretamente no campo, no seu ambiente de crescimento, seria talvez a aproximação mais confiável, principalmente do

ponto de vista agrônomo. Do ponto de vista prático, a concentração de Al no substrato de crescimento pode não ser uniforme e ocorrer interações com outros fatores do ambiente, mascarando a expressão genética da tolerância. Há grande dificuldade de isolar os efeitos do Al, já que sempre se manifesta modificado por fatores como o pH, a composição iônica da solução, o nível de disponibilidade de bases trocáveis e o teor de matéria orgânica. Uma alternativa para contornar o problema de alterações simultâneas e não controladas das propriedades químicas que ocorrem nos solos com a modificação de seu nível de acidez é a realização de estudos em condições de solução nutritiva. O meio hidropônico oferece vantagens como o pronto acesso ao sistema radicular e a possibilidade de monitoramento e controle do pH e das concentrações de Al e de outros íons relevantes à expressão das reações de sensibilidade e tolerância (ROSSIELO & JACOB-NETTO, 2006). Logo, além das avaliações sob condições de campo ou casa-de-vegetação, existem opções de métodos empregados em experimentos de curta duração conduzidos em laboratório.

O uso de corantes químicos é um método eficiente e de baixo custo para localizar o Al no apoplasma, por meio de testes de coloração que avaliam o acúmulo de Al na extremidade das raízes e que se baseiam na oxidação de corantes em presença de íons metálicos (Cr, Fe ou Al), tais como quinalizarina, azul de metileno, azul de molibdênio, hematoxilina, violeta de pyrocatechol, nitrato de prata, papel-solução (BRACCINI et al., 2000ab), aluminon (MATSUMOTO & MORIMURA, 1980) e (ETICHA et al., 2005). Embora haja ampla variedade de corantes, hematoxilina é a mais utilizada em estudos de Al em gramíneas (POLLE et al., 1978), com aplicação bem-sucedida na visualização do Al na superfície de raízes (BRACCINI et al., 2000b; ROSSIELLO & JACOB-NETTO, 2006);

A existência de variabilidade genética no milho para tolerância ao alumínio foi constatada por Lutz et al. (1971); Rhue & Grogan (1977); Galvão & Silva (1978); Bahia Filho et al. (1978); Garcia Júnior et al. (1979); Magnavaca (1982), e Furlani et al. (1986). A herança dessa característica foi estudada por diversos autores, empregando diferentes técnicas de avaliação e germoplasmas, com resultados divergentes. Segundo Rhue et al. (1978) e Garcia Júnior & Silva (1979), a tolerância ao Al é condicionada por um par de genes dominantes, mas Miranda et al. (1984a) relataram que a tolerância é condicionada por dois pares de genes dominantes complementares. Quanto ao tipo de ação gênica envolvida, Magnavaca (1982) relatam que, em cruzamentos de linhagens tolerantes com suscetíveis, a maior parte da variação genética foi aditiva.

3 OBJETIVOS

O objetivo geral do estudo foi estudar a sensibilidade das variedades Dow 2B655, Al. Bandeirante, Ag 8061 e DKB 747 de milho ao Al em solução.

Os objetivos específicos foram:

- a) avaliar o desenvolvimento radicular das variedades de milho em solução nutritiva com diferentes condições de estresse por Al;
- b) examinar alterações morfológicas nas raízes de milho através de microscopia óptica;
- c) verificar a penetração do Al no tecido radicular com o uso da hematoxilina, corante indicador e complexante de Al;
- d) elaborar uma escala numérica para a tolerância das variedades de milho ao estresse por Al.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos (CCA-UFSCar), no município de Araras-SP, no período de janeiro a junho de 2011, em condições de laboratório.

4.1 PRÉ-GERMINAÇÃO DAS SEMENTES

Foram utilizadas quatro variedades de milho: Dow 2B655, AG 8061 pro, Al. Bandeirante e DKB 747. A pré-germinação das sementes (40 de cada variedade) foi feita em cartuchos de papel germiteste, colocados na posição vertical em recipientes de vidro, com a base imersa em solução de CaCl $0,001 \text{ mol L}^{-1}$. Os cartuchos foram mantidos em câmara de germinação, à temperatura de 30°C e fotoperíodo ininterrupto, até que as raízes atingissem 5-10 cm de comprimento (Figura 5).



Figura 5. Sementes de variedades de milho envolvidas por papel germiteste, em fase de pré-germinação no interior da câmara de germinação.

4.2 SOLUÇÃO NUTRITIVA E TEMPO DE CULTIVO DAS PLÂNTULAS DE MILHO

A adequada nutrição mineral das plântulas de milho, antes de serem submetidas ao estresse por Al, foi feita por uma adaptação da clássica solução de Hoagland & Arnon, preparada com fundamento nos teores foliares de nutrientes considerados adequado para a cultura do milho (Tabela 1).

A composição e a concentração da solução nutritiva de macro (Tabela 2) e de micronutrientes (Tabela 3) adequadas para a cultura do milho foram calculadas conforme o método prático de Cometti et al. (2006). A solução nutritiva foi usada para garantir às plântulas e, principalmente, às suas raízes, plenas condições de fornecimento balanceado de nutrientes, de forma a evitar que o sistema radicular apresentasse limitações que não fossem decorrentes do estresse pelo Al.

Tabela 1. Teores foliares de macro e de micronutrientes considerados adequados para a cultura do milho.

Nutriente	Teores foliares
Macronutrientes (g kg⁻¹)	
N	27-35
P	2,0-4,0
K	17-35
Ca	2,5-8,0
Mg	1,5-5,0
S	1,5-3,0
Micronutrientes (mg kg⁻¹)	
B	10-25
Cu	6-20
Fe	30-250
Mn	20-200
Mo	0,10-0,20
Zn	15-100

Fonte: Raji et al. (1996)

Tabela 2. Fontes e concentrações de macronutrientes utilizadas na composição da solução nutritiva para cultivo de plântulas de milho.

Nutriente	Sal/Fertilizante	Concentração adotada mg L ⁻¹
B	Ácido bórico	0,30
Cu	Sulfato de cobre	0,22
Fe	Fe-EDTA	2,33
Mn	Sulfato de manganês	1,83
Mo	Molibdato de sódio	0,03
Zn	Sulfato de zinco	1,00

Tabela 3. Fontes e concentrações de micronutrientes utilizadas na composição da solução nutritiva para cultivo de plântulas de milho.

Nutriente	Sal/Fertilizante	Concentração adotada g/1000 L
N	Nitrato de cálcio	274,5
K	Nitrato de potássio	469,0
P	Fosfato monoamônico (MAP)	139,0
Mg	Sulfato de magnésio	120,0

As plântulas de milho foram retiradas do papel germiteste, fixadas em placa de EVA devidamente identificada e transferidas para tanque de 25 L de solução nutritiva (Figura 6).



Figura 6. A - Plântulas de milho fixadas e identificadas em placa de EVA; B – plântulas de milho em fase de aclimação com sistema radicular imerso em tanque contendo solução nutritiva, sistema de arejamento e iluminação artificial.

O sistema foi mantido sob arejamento contínuo da solução, por borbulhamento de ar suprido por moto-compressor, e sob iluminação fluorescente artificial permanente de 5000 lux (Figura 6). Em dois dias, as raízes alcançaram vigor, comprimento e uniformidade adequados para imersão em solução nutritiva adicionada de concentrações crescentes de Al, ocasião em tiveram seu comprimento inicial medido (Figura 7).



Figura 7. Aspecto do sistema radicular de plântulas de milho após período de aclimação em solução nutritiva.

4.3 FAIXA DE CONCENTRAÇÃO DE ALUMÍNIO EM SOLUÇÃO NUTRITIVA

Após o período de dois dias de imersão em solução nutritiva (Figuras 6 e 7), foram selecionadas, para cada variedade, 30 plântulas com uniformidade radicular, as quais foram submetidas a 6 tratamentos com Al, com 5 réplicas cada (Figura 8A). O experimento de exposição do sistema radicular das plântulas de milho a condições de estresse por Al foi desenvolvido em recipientes de PVC rígido, de 10 cm de diâmetro, 20 cm de altura e capacidade de 1,6 L (Figura 8)

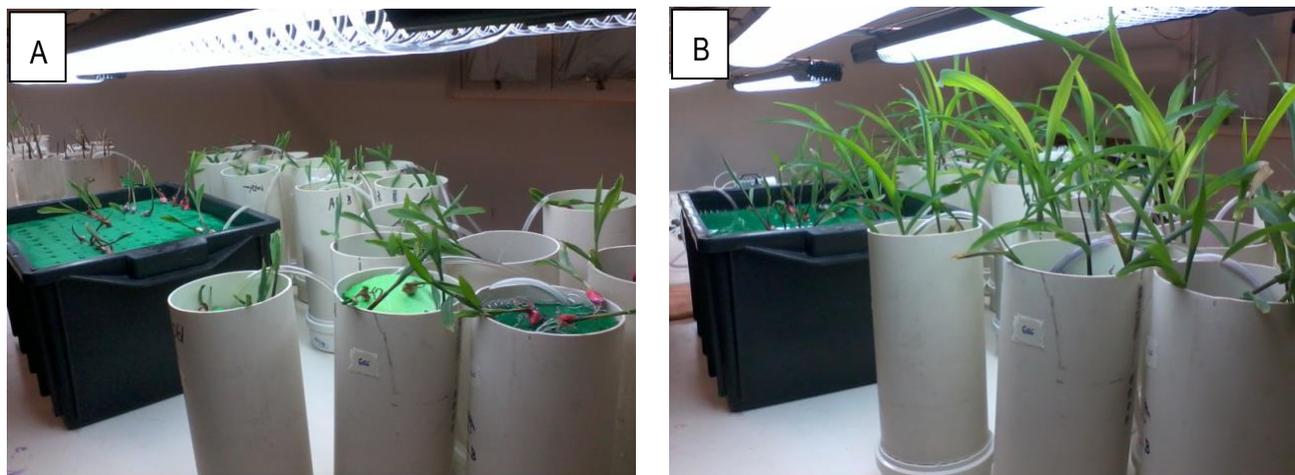


Figura 8. Plântulas de milho (A – recém instaladas; B – após cinco dias) com sistema radicular imerso em recipientes de PVC, contendo solução nutritiva adicionada de concentrações crescentes de Al (0, 55, 111, 222, 444 e 666 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

As plântulas foram transferidas para os recipientes contendo solução nutritiva e doses crescentes de Al, fornecido na forma de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ nas concentrações de 0, 55, 111, 222, 444 e 666 $\mu\text{mol L}^{-1}$, escolhidas conforme Alves et al. (2002), para constituírem os tratamentos T1 (testemunha), T2, T3, T4, T5 e T6, respectivamente. O pH da solução nutritiva contendo Al foi ajustado para 4,0 diariamente com HCl 0,05 mol L^{-1} para garantir o predomínio da espécie livre trivalente de Al [$\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$] (ROSSIELLO & JACOB NETO, 2006). Nesta etapa, Fe foi omitido da solução, para evitar a interferência e assegurar a atuação dos corantes pela complexação exclusiva do Al, e a concentração de P foi reduzida para 0,0025 mmol L^{-1} , para contornar problemas de precipitação com Al (BRACCINI et al., 2000ab).

4.4 TEMPO DE EXPOSIÇÃO DAS RAÍZES À SOLUÇÃO CONTENDO ALUMÍNIO

Como não há indicação consolidada em referências bibliográficas sobre o tempo necessário de imersão de raízes de milho em soluções contendo Al, foram considerados os trabalhos de Alvez et al. (2004), que identificaram diferenças na tolerância ao Al entre várias cultivares de milho em cinco dias de exposição a uma solução contendo $222 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Al, e o de Mazzocato et al. (2002), que avaliaram as raízes de milho após um período de três dias em solução nutritiva com Al.

As raízes ficaram expostas à solução contendo Al por cinco dias. Após este período, as plântulas tiveram suas raízes medidas e transferidas para bandejas que continham água destilada, para que os procedimentos de coloração pudessem ser realizados.

4.5 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES RADICULARES CAUSADAS PELA EXPOSIÇÃO AO Al EM SOLUÇÃO

4.5.1 TESTE DE COLORAÇÃO DAS RAÍZES COM HEMATOXILINA E ALOCAÇÃO DO Al NOS TECIDOS RADICULARES

O acúmulo de Al nos ápices radiculares das plântulas de milho foi avaliado pela coloração com hematoxilina, corante que produz coloração violeta quando complexado com o Al (Figura 10). Foi pioneiramente usado por Polle et al. (1978), teve o emprego bem-sucedido por Braccini et al. (2000ab) e é recomendado por Rossiello & Jacob-Neto (2006) para gramíneas. A solução foi preparada pela dissolução de 1 g de hematoxilina, 0,1 g de NaIO_3 e uma gota de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em um litro de água destilada.

Após o período de exposição ao Al, as plântulas foram transferidas para bandejas que continham água destilada e mantidas sob arejamento constante, por 30 minutos. Em seguida, as raízes foram separadas da parte aérea e submetidas à solução de hematoxilina por 10 minutos em placas de Petri, com quantidade suficiente para cobrir as raízes (Figura 9A). Após o período de atuação do corante, as raízes foram lavadas em água corrente por cerca de um minuto e, novamente, mantidas em água destilada por 40 minutos para remoção do excesso de corante (Figura 9B).

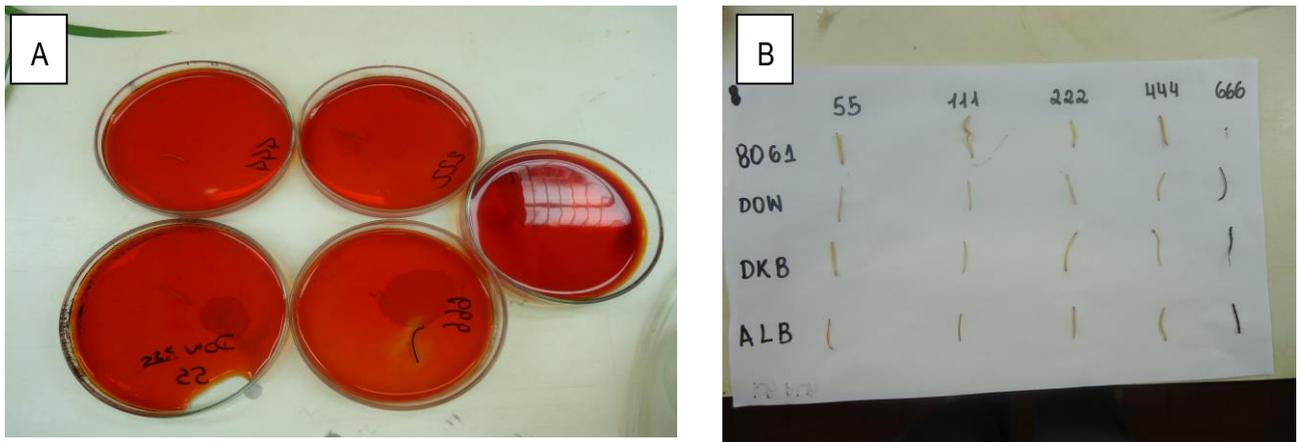


Figura 9. A - Placas de Petri contendo solução do corante hematoxilina; B – raízes coletadas após a lavagem para retirada do excesso de hematoxilina.

Após o período de coloração, as raízes foram submetidas à cortes de 1,5 cm, a fim de avaliar o ápice radicular por meio da escala de coloração (Figura 10) elaborada por Braccini et al (2000a) para raízes de plântulas de cafeeiro e que foi, neste estudo, adaptada para milho, conforme a intensidade e localização da região colorida.

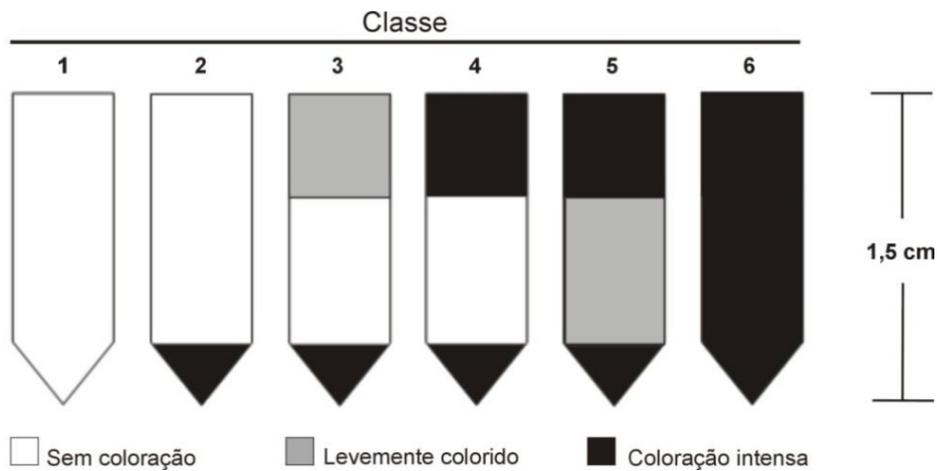


Figura 10. Escala de avaliação do acúmulo de Al em raízes de plantas por meio do teste de coloração pela hematoxilina [(extraído de Braccini et al. (2000a)].

Os níveis 3 e 4 são zonas de exclusão em razão do acúmulo de Al na região basal dos genótipos mais tolerantes, enquanto os genótipos sensíveis devem apresentar acúmulo na região meristemática.

4.5.2 ESTIMATIVAS DAS TAXAS DE ALONGAMENTO RADICULAR (ROSSIELO & JACOB NETO, 2006)

Medidas biométricas dos comprimentos radiculares de todas as plântulas foram registradas de forma a obter dois grupos de medidas do comprimento inicial (Ci):

- a) Ci (Al₀): comprimento inicial (mm) da raiz seminal, antes da exposição à solução sem Al;
- b) Ci (Al_x): comprimento inicial (mm) da raiz seminal, antes da exposição à solução com concentração “x” de Al.

Após o período de 5 dias de exposição ao estresse por Al, as plântulas foram transferidas para solução nutritiva livre de Al, e o seu comprimento radicular foi medido novamente, obtendo-se:

- a) Cf (Al₀): comprimento final (mm) da raiz seminal, após a exposição à solução sem Al;
- c) Cf (Al_x): comprimento final (mm) da raiz seminal, após a exposição à solução com concentração “x” de Al.

Com as medidas iniciais e finais de comprimento radicular, foram calculadas as taxas de alongamento (TA):

$$TA_{Al_0} = \frac{Cf_{Al_0} - Ci_{Al_0}}{Tf - T_0} \qquad TA_{Al_x} = \frac{Cf_{Al_x} - Ci_{Al_x}}{Tf - T_0}$$

em que a TA é a taxa de alongamento expressa em cm dia⁻¹; T_f-T₀ representa o intervalo de tempo desde o início dos tratamentos com Al. Os valores absolutos das taxas de alongação dos controles foram comparados diretamente com os do tratamento.

4.6 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Devido as condições controladas em laboratório, o experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com esquema fatorial 6x4 (6 concentrações de Al em solução e 4 variedades de milho), com cinco réplicas. As variedades de milho mais tolerantes ao Al em solução foram avaliadas pelos seguintes critérios:

- a) resultados da taxa de alongamento radicular foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de *Tukey*, ao nível de 5% de significância, para a identificação de diferenças significativas entre os tratamentos e variedades;
- b) parâmetros morfológicos do Al nos tecidos radiculares, indicados pela coloração, foram explorados na forma de imagens por registro fotográfico das observações ao microscópio óptico e comparados por meio de escala de acúmulo de Al sugerida por Braccini et al. (2000a), adaptada para milho.

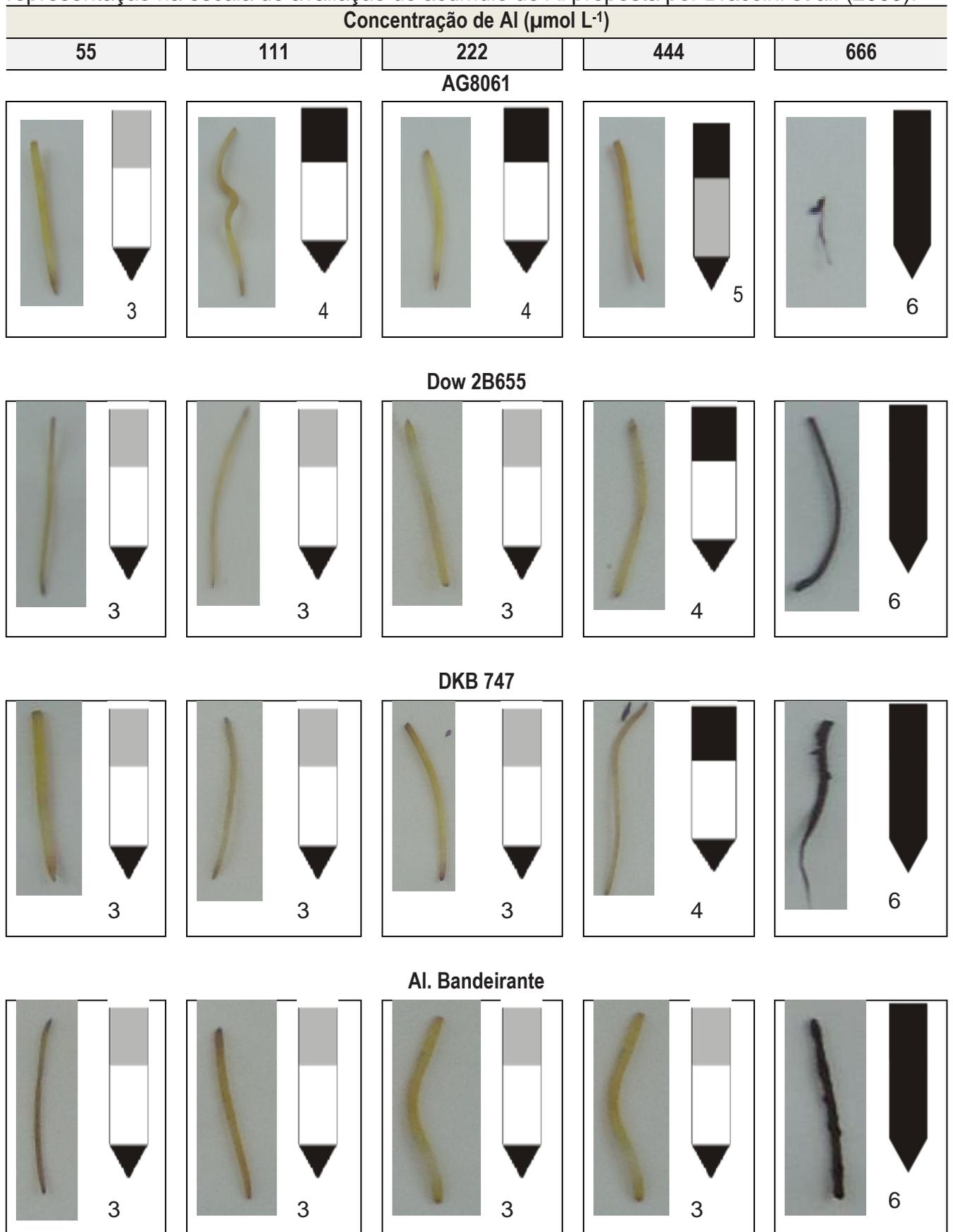
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De modo geral, o exame dos ápices radiculares revelou a aparência engrossada e escurecida (amarronzada), além de outras injúrias típicas, tais como o aspecto retorcido, deformado e quebradiço observado por Lagos et al. (1991) e por Dornelles et al. (1996) em seus estudos sobre os efeitos do Al em raízes vegetais.

5.1 TESTE DE COLORAÇÃO DAS RAÍZES COM HEMATOXILINA

Os ápices radiculares (1,5 cm) das variedades de milho foram submetidos ao corante hematoxilina, após crescimento em solução com 0, 55, 111, 222, 444 e 666 μM de Al L^{-1} , a pH 4,0, por 5 dias, e foram avaliados por meio da escala de coloração extraída de Braccini et al. (2000a) (Figura 10). Rossiello & Jacob Neto (2006) citaram a hematoxilina como um dos métodos mais eficientes e baratos de localizar o Al no apoplasma de raízes crescidas em meio hidropônico. O princípio desse método de avaliação baseia-se na oxidação da hematoxilina para hemateína (por NaIO_3 , ou outros agentes oxidantes), que, em presença de íons metálicos (Cr, Fe ou Al), tem a propriedade de corar ácidos nucléicos (GILL et al., 1974). A coloração das radículas será mais intensa nos genótipos susceptíveis, pois maior quantidade de Al estará no interior das células (MARTINES, 1977). O uso do corante hematoxilina na coloração dos ápices radiculares das variedades de milho possibilitou diferenciar a influência de doses crescentes de Al em solução, tanto por meio da observação dos danos às raízes, quanto pela indicação da penetração do Al no tecido radicular, representada pelo aumento da intensidade de coloração que acompanhou o aumento da concentração de Al em solução (Figura 11).

Figura 11. Ápices radiculares de plântulas de variedades de milho, submetidos a concentrações crescentes de Al em solução e ao corante indicador hematoxilina, e sua representação na escala de avaliação do acúmulo de Al proposta por Braccini et al. (2000).



Como esperado, as raízes submetidas às maiores concentrações de Al receberam as maiores notas, já que a coloração das raízes tornou-se mais intensa nas plântulas crescidas nas doses de 444 e 666 $\mu\text{M L}^{-1}$, nas quatro variedades estudadas (Figura 11 e Tabela 4).

Tabela 4. Indicação do corante hematoxilina conforme a escala de avaliação do acúmulo de Al em ápices radiculares sugerida por Braccini et al. (2000a).

Variedades	Concentração de Al ($\mu\text{mol L}^{-1}$)				
	55	111	222	444	666
AG 8061	3	4	4	5	6
Dow 255	3	3	3	4	6
DKB 747	3	3	3	4	6
Al. Bandeirante	3	3	3	3	6

Números em negrito indicam tolerância ao Al em solução, conforme a escala da Figura 10 (Braccini et al., 2000)

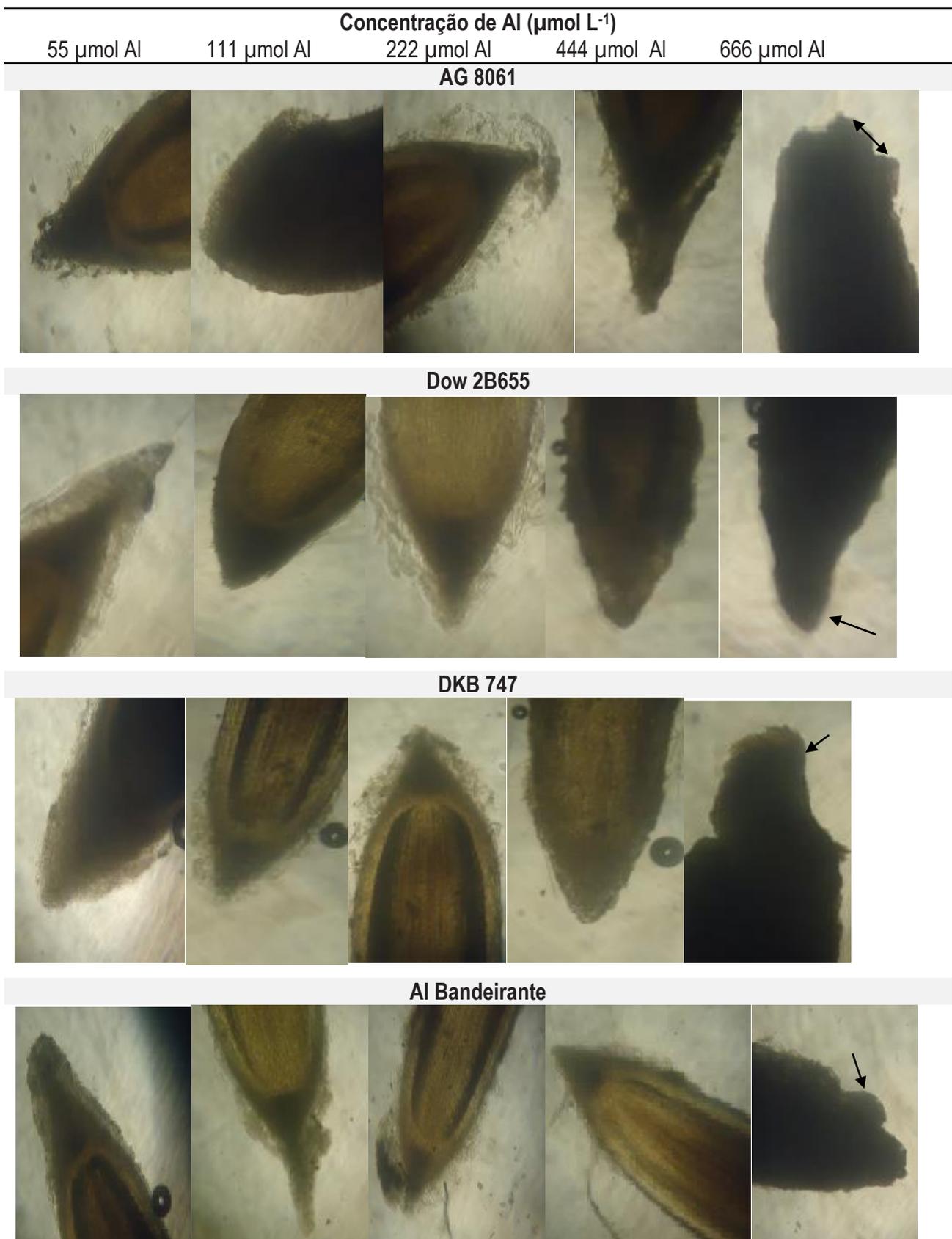
As notas, dentro da escala numérica que representou a intensidade de coloração e a localização do Al no ápice radicular, foram semelhantes para as variedades Dow 2B655, Al. Bandeirante e DKB 747, as quais puderam receber notas 3 e 4 até a penúltima concentração de Al (444 $\mu\text{M L}^{-1}$). A AG 8061 mostrou-se mais sensível ao Al, recebendo notas 4, 5 e 6 a partir da concentração 111 $\mu\text{M L}^{-1}$. Ressalta-se que, para Braccini et al. (2000a), notas até 4 correspondem à manifestação de mecanismos de exclusão de Al, já que a região de maior intensidade dos processos de divisão celular ainda permanecem descoloridos.

Uma correlação direta entre a tolerância ao Al^{3+} e a coloração das raízes com hematoxilina férrica é relatada em diversos trabalhos da literatura (Polle et al., 1978; Wagatsuma et al., 1995; Delhaize et al., 1993). Entretanto, Ryan et al. (1993) & Braccini et al (1996) ressaltam que o teste com hematoxilina férrica não deve ser aplicado, isoladamente, para discriminação entre genótipos tolerantes ou sensíveis.

5.2 MICROSCOPIA ÓPTICA DE ÁPICES RADICULARES DE PLÂNTULAS DE MILHO SUBMETIDOS AO ESTRESSE POR Al

Para ilustração dos efeitos do Al^{3+} sobre a morfologia externa dos ápices radiculares, amostras das variedades de milho foram removidas, após 5 dias de permanência em solução contendo doses crescentes de Al (0, 55, 111, 222, 444 e 666 $\mu\text{mol de Al L}^{-1}$), lavadas em água destilada, cortadas e, logo em seguida, observadas em microscópio óptico (Figura 12).

Figura 12. Ápices radiculares de variedades de milho sob microscópio óptico (ampliação 10 x) após exposição a concentrações crescentes de Al em solução.



Setas indicam deterioração da coifa radicular e posterior acúmulo de calose

A coifa das raízes das variedades AG 8061 e Dow 2B655 começou a ser afetada nas concentrações de 111 e 444 $\mu\text{mol de Al L}^{-1}$, respectivamente. As variedades DKB 747 e Al Bandeirante tiveram deformações na coifa somente quando expostas à concentração mais elevada de Al em solução (666 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Como a coifa tem a função de proteger o meristema apical de lesões mecânicas (TAIZ & ZEIGER, 2004), sobretudo pela excreção de mucilagens, sua deterioração prejudica o meristema apical das raízes. Kochian (1995) & Sivaguru & Horst (1998), constataram que após a exposição á doses mais elevadas de Al, ocorrem rapidamente atrofia e injúrias no meristema radicular, especificamente na parte distal da zona de transição no ápice das raízes, onde as células estão entrando em fase de alongamento, que é o sitio da ação tóxica do alumínio. Utilizando microscopia eletrônica, Eleftheriou et al. (1993) também observaram que os efeitos mais intensos da toxicidade causada pelo Al^{3+} no sistema radicular ocorrem nas paredes celulares da epiderme e nas células da coifa.

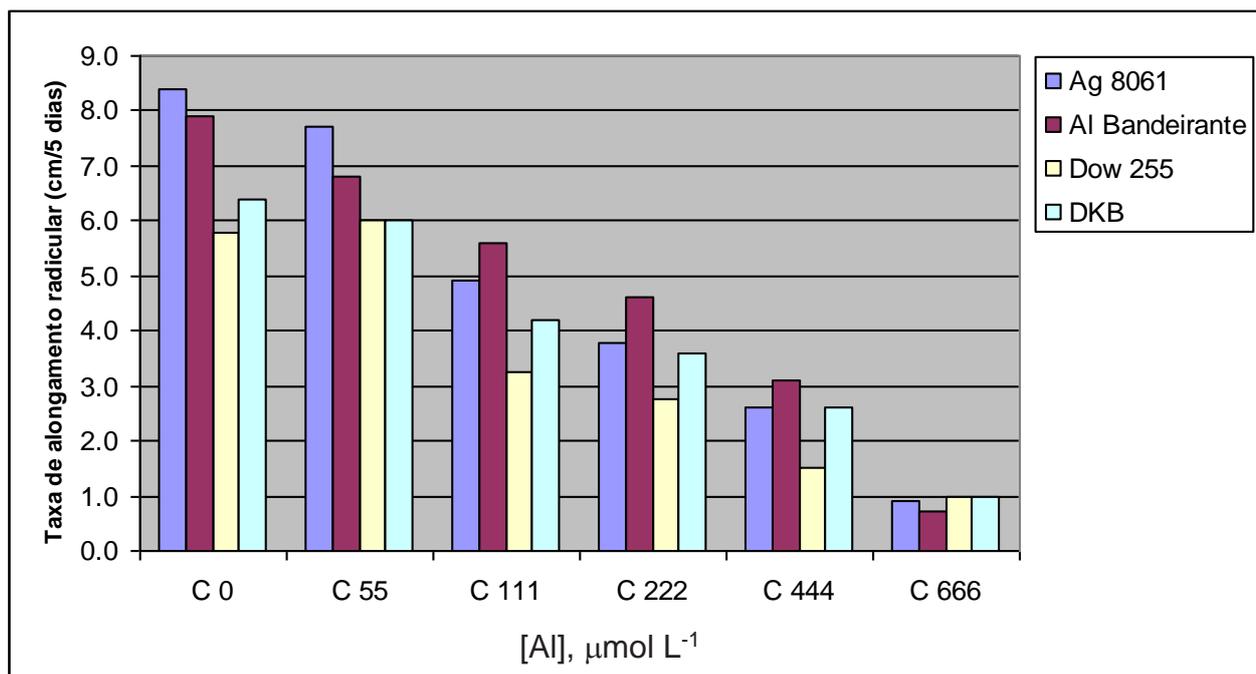
Houve formação de calose na extremidade das raízes, principalmente após a exposição à 666 $\mu\text{mol de Al L}^{-1}$ (Figura 12). Calose é um acúmulo de poliglicosídeo na parede celular em resposta das plantas a diversos tipos de estresses (TAIZ & ZEIGER, 2004). A formação induzida de calose pelo Al, particularmente em ápices radiculares, foi considerado por Eticha et al. (2005) a injúria fisiológica mais sensível à presença do Al, atuando ainda como indicador de diferenças genótípicas de sensibilidade ao Al por plantas de milho. Logo, a calose é um indicador particular de sensibilidade à toxidez causada pelo Al que pode ser prontamente observada através de microscopia óptica (Figura 12). Kauss (1989) associou a rizodeposição de calose à injúrias da membrana plasmática, já que Wagatsuma et al. (1988) relataram que o Al é conhecido por danificar estas estruturas. A deposição de calose foi correlacionada com a presença de Al nas raízes de *Glycine max* (Wissemeier et al., 1992) e de *Picea abies* (Jorns et al., 1991). De acordo com Kauss (1990), policátions, poliaminas e Al^{3+} são promotores potenciais da síntese de calose.

Além da produção de calose, as raízes afetadas pelo Al apresentaram mudanças estruturais na coifa, bem como mudanças na curvatura da raiz (Figura 12), ou seja, um conjunto de sintomas muito semelhante ao observado por Eleftherios et al (1993). Constatou-se também que, após exposição das plantas ao Al^{3+} por cinco dias, houve atrofiamento e desintegração de tecidos da epiderme nos ápices das raízes das quatro variedades, na concentração de 666 $\mu\text{mol L}^{-1}$

5.3 TAXAS DE ALONGAMENTO RADICULAR

As variedades Ag 8061, Al Bandeirante, Dow 255 e DKB de milho apresentaram decréscimo na taxa de alongamento radicular quando submetidas a concentrações crescentes de Al em solução. As variedades Al Bandeirante e Ag 8061 destacaram-se quanto à tolerância ao Al em solução, enquanto as variedades Dow 255 e DKB foram mais sensíveis (Figura 13).

Figura 13. Comparação das taxas de alongamento radicular de plântulas de variedades de milho submetidas a concentrações crescentes de Al em solução.



Os resultados da taxa de alongamento radicular foram submetidos à análise de variância (Tabela 5) para atestar a consistência das constatações feitas a partir da Figura 13.

Tabela 5. Resumo da análise de variância (ANOVA) de taxa de alongamento radicular de plântulas de variedades de milho submetidas à concentrações crescentes de Al em solução.

Causas de variação	GL	Valor F
Variedade	3	18.99726 **
Concentração de Al	5	92.29274 **
Variedade x Al	15	1.434697 ns
Resíduo	225	
Total	248	

Significância: ** 1%; ns: não significativo.

Houve alta significância estatística para a influência isolada dos fatores testados. Portanto, o teste de comparação de médias (Tukey a 5%) foi aplicado somente para variedades (Tabela 6) e para concentração de Al em solução (Tabela 7). Não foi aplicado o teste de comparação de médias para a interação dos fatores, já que, pelo teste F, não houve significância estatística (Tabela 5).

Tabela 6. Média geral da taxa de alongamento radicular de plântulas de cada variedade de milho, submetidas ao Al em solução.

Variedades	Média da TA radicular (cm / 5 dias)
Ag 8061	4,7167 a
Al. Bandeirante	4,7833 a
Dow 2B655	3,4801 b
DKB 747	3,9667 b

As variedades Al Bandeirante e Ag 8061 apresentaram taxa de crescimento radicular estatisticamente superior às variedades Dow 655 e DKB 747, implicando em maior tolerância das primeiras e maior sensibilidade das demais ao Al em solução. Os resultados biométricos, sobretudo da variedade Ag 8061, não estiveram correlacionados com os resultados das análises visuais pela hematoxilina e por microscopia óptica.

Tabela 7. Médias de taxa de alongamento radicular de plântulas de variedades de milho em resposta à cada concentração de Al em solução.

Concentração de Al ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Taxa de alongamento radicular (cm / 5 dias)
0	7,125 a
55	6,658 a
111	4,553 b
222	3,737 b
444	2,500 c
666	0,895 d

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

Decréscimos significativos na taxa de alongamento radicular das plântulas de milho foram observados a partir da concentração de 111 $\mu\text{mol Al L}^{-1}$ (Figura 13 e Tabela 7), considerado, neste estudo, valor crítico a partir do qual tem início a influência do Al sobre o

desenvolvimento radicular inicial de plântulas de milho. Essa concentração crítica aponta para a provável suscetibilidade das variedades de milho estudadas às concentrações iônicas de Al típicas na solução de solos ácidos, que normalmente estão entre 150 e 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (ROSSIELLO & JACOB NETTO, 2006). Mazzocato et al. (2002) constataram que a concentração crítica de Al em solução foi de 222 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e sugeriram uma concentração de 162 $\mu\text{mol de Al L}^{-1}$ como a mais adequada para caracterização de tolerância em híbridos de milho.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, foram testados três métodos para estimar a sensibilidade de primórdios radiculares de variedades de milho a concentrações crescentes de Al em solução. A escala numérica de avaliação do acúmulo de Al em raízes preconizada por Braccini et al. (2000a), e que teve sua aplicação bem-sucedida no estudo com plantas de cafeeiro, auxiliou na interpretação do comportamento de variedades de milho expostas ao Al em solução. No entanto, várias inconsistências foram observadas no ajuste da escala para milho, principalmente porque sua construção dependeu do potencial da hematoxilina em indicar o acúmulo e a localização do Al nos ápices radiculares. Tanto Ryan et al. (1993) quanto Braccini et al. (1996) ressaltaram que o teste com hematoxilina não deve ser aplicado isoladamente para discriminação entre genótipos tolerantes ou sensíveis ao Al em solução. De fato, a observação dos ápices radiculares ao microscópio óptico revelou aspectos adicionais da alteração radicular na presença do Al, sobretudo da coifa, o que incluiu a formação da calose, considerado neste estudo um importante indicador visual da sensibilidade das raízes ao Al. A interação entre os aspectos visuais obtidos da microscopia e da coloração com indicadores constituiu um artifício complementar importante na interpretação dos efeitos do Al sobre as raízes. A biometria das raízes foi o parâmetro mais consistente para avaliar o efeito de concentrações crescentes de Al em solução sobre o sistema radicular. A interpretação dos resultados de taxa de alongação radicular indicou que danos significativos aos primórdios radiculares de plântulas de milho se iniciaram a partir da concentração 111 $\mu\text{mol Al L}^{-1}$, comum em solos tropicais ácidos.

Embora os experimentos de laboratório contribuam na elucidação do comportamento vegetal perante à situações diversas de estresse, é preciso reconhecer a dificuldade de sua aplicação direta na forma de recomendação para o setor produtivo. Assim, este estudo também aponta para a necessidade de continuidade de experimentos com milho em condições de casa-de-vegetação e, principalmente, em condições de campo.

O referencial teórico e experimental sobre a tolerância de variedades de milho a condições adversas de acidez extrema e, principalmente, a alta saturação por Al, ainda é inconclusivo. É indiscutível o valor econômico, social e ambiental de uma planta tolerante à qualquer situação de estresse, já que isso pode significar a redução dos custos e dos impactos do uso exagerado dos fatores de produção. Estas espécies, resguardado seu potencial produtivo, devem se comportar de forma eficiente, precisando apresentar alguma tolerância ao Al. Neste sentido, a identificação dos genótipos mais tolerantes à estas condições de estresse contribui para a síntese de variedades por processos biotecnológicos em programas de melhoramento genético, para a devida alocação das variedades no campo e para a condução de sistemas sustentáveis de produção.

6 CONCLUSÕES

Para as variedades de milho Dow 2B655, AG 8061, Al. Bandeirante e DKB 747, nas condições experimentais em que este estudo foi conduzido, concluiu-se que:

- o aumento da concentração de Al em solução causou diminuição da taxa de alongamento radicular (cm dia^{-1});
- a concentração crítica de Al em solução para a taxa de alongamento radicular foi de $111 \mu\text{mol Al L}^{-1}$;
- as principais alterações morfológicas das raízes, ou seja, a produção de calose e o colapso e a deformação da coifa, iniciaram a partir da concentração crítica de $111 \mu\text{mol Al L}^{-1}$ somente na variedade AG 8061. Para as variedades Al. Bandeirante, DKB 747 e Dow 2B655, injúrias fisiológicas nos ápices radiculares foram causadas por concentrações de Al em solução superiores a $444 \mu\text{mol Al L}^{-1}$;
- o corante hematoxilina auxiliou na indicação do acúmulo e localização de Al no tecido radicular, mas não permitiu a elaboração de uma escala numérica para sua interpretação;
- a seqüência de tolerância das variedades de milho ao Al em solução foi diferente para os métodos biométrico e visual;

- a biometria de raízes indicou que as variedades Al. Bandeirante e Ag. 8061 foram mais tolerantes ao Al em solução, enquanto as variedades Dow 2B655 e DKB 747 foram as mais sensíveis;
- o exame visual pelo método da hematoxilina e por meio de microscopia óptica indicou a seguinte seqüência de tolerância ao Al em solução: Al Bandeirante > Dow 255 = DKB 747 > Ag 8061

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU Jr., C.H.; MURAOKA, T.; LAVORANTE, A.F. Relationship between acidity and chemical properties of Brazilian soils. *Scientia Agricola*, v.60, n.2, p.337-343, 2003.
- ABU-ZEID, M.O. Root cation exchange capacity of sugarcane: an evaluation of methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.26, n.7, p.915-922, 1975.
- ALVEZ, V.M.C.; PITTA, G.V.E.; PARENTONI, S.N.; SCHAFFERT, R.E.; COELHO, A.M.; MAGALHÃES, J.V. Toxidez por alumínio e hidrogênio no crescimento de raízes de milho, *Revista Brasileira de Milho e Sorgo, Sete Lagoas (MG)*, v.3, n.2, p.311-318, 2004.
- BAHIA FILHO, A.F.C.; FRANÇA, G.E.; PITTA, G.V.E.; MAGNAVACA, R.; MENDES, J.F.; BAHIA F.G.T.C. & PEREIRA, P. Avaliação de linhagens e populações de milho em condições de elevada acidez. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE MILHO E SORGO, 11, Piracicaba, editado por E. Paterniani. Anais. Piracicaba, ESALQ, Departamento de Genética, 1978. p.51-58.
- BORGONNOVI, R.A.; SCHAFFERT, R.E.; PITTA, G.V.E.; MAGNAVACA, R.; ALVES, V.M.C. Aluminum tolerance in sorghum. In: GABELMAN, H.W.;
- BRACCINI, A.L. et al. Germinação e vigor de sementes de soja sob estresse hídrico induzido por soluções de cloreto de sódio, manitol e polietilenoglicol. *Revista Brasileira de Sementes, Brasília*, v.18, n.1, p.10-16, 1996a.
- BRACCINI, M.C.L.; MARTINEZ, H.E.P.; BRACCINI, A.L. Avaliação de linhagens de cafeeiros quanto à tolerância ao alumínio pelo método do papel-solução. *Bragantia*, v.59, n.2, p.221-226, 2000a.
- BRACCINI, M.C.L.; Martinez, H.E.P.; SILVA, E.A.M.; BRACCINI, A.L.; Scapim, C.A. Crescimento da planta e coloração das raízes com hematoxilina como critérios de avaliação de genótipos de café quanto à tolerância à toxidez por alumínio. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 24, p.59-68, 2000b.
- BRENES, E. & PEARSON, R. W. Root responses of three gramineae species to soil acidity in an oxisol and an ultisol. *Soil Sci.* 116: 295-302, 1973.
- CAMARGO, C.E. de O.; FELÍCIO, J.C.; ROCHA JÚNIOR, L.S. Trigo: tolerância ao alumínio em solução nutritiva. *Bragantia*, v.46, n.2, p.183-190, 1987.
- CAMBRAIA, J.; SILVA, M.A.; CANO, M.A.O.; SANT'ANNA, R. Método simples para a avaliação de cultivares de sorgo quanto a tolerância ao alumínio. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.3, p.87-95, 1991.

- CAVER, B.F.; OWNBY, J.D. Acid soil tolerance in wheat. *Advances in Agronomy*, v. 54, p. 117-173, 1995.
- COMPANHIA NACIONAL de ABASTECIMENTO – CONAB – sétimo levantamento safra 2010/2011 brasileira de grãos ;acessado em: maio/2011 disponível em: Http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_04_07_11_02_42_boletim_abril-2011..pdf
- CROOKE, W.M. The measurement of the cation exchange capacity of plant roots. *Plant and Soil*, v.21, n.1., p.43-49, 1964.
- DAL BÓ, M.A.; RIBEIRO, A.C.; COSTA, L.M.; THIÉBAULT, J.T.L.; NOVAIS, R.F. Efeito da adição de diferentes fontes de cálcio em colunas de solo cultivadas com cana-de-açúcar. II. Respostas da planta. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.10, p.231-234, 1986b.
- 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*, Rockville, v. 103, p. 695-702, 1993.
- DELHAIZE, E.; RYAN, P.R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiology*, v.107, p.315-321, 1995.
- DORNELLES, A.L.C., CARVALHO, F.I.F., FEDERIZZI, L.C., et al. Avaliação de genótipos de trigo hexaplóide quanto a tolerância ao alumínio. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.26,p.19-22, 1996.
- ELEFTHERIOU, P.E.; MOUSTAKAS, M.; GRAGISKOS, N. Aluminate-induced changes in morphology and ultrastructure of *Thinopyrum* roots. *Journal of Experimental and Botany*, London, v. 44, n. 2, p. 427-436, 1993.
- ETICHA, D.; Stab, A.; HORST, W.J. Localization of aluminium in the maize root apex: can morin detect cell wall-bound aluminium. *Journal of Experimental Botany*, v. 56, n. 415, p. 1351–1357, 2005.
- ETICHA, D; THE, C.; WELCKER, C.; NARRO, L.; STA, A.; HORST, W.J. Aluminium-induced callose formation in root apices: inheritance and selection trait for adaptation of tropical maize to acid soil. *Field Crops Research*, v.93, p.252–263, 2005.
- EVANS, E.E; KRAMPRATH, E.J. Lime response as relates to percent Al saturation, solution Al and organic matter content. *Soil Science of America Proceedings*, Madison, v.34, p.893-896, 1970
- FAGERIA, N.K.; STONE, L.F.; SANTOS, A.B. dos. Maximização da eficiência de produção das culturas. Brasília: Embrapa-SCT/Embrapa-CNPAP, 1999. 294 p.

- FERREIRA, R. de P.; MOREIRA, A.; RASSINI, J.B. Toxidez de alumínio em culturas anuais. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, Documentos 63, 2006. 35p.
- FIDALSKI, J.; TORMENA, C.A. Dinâmica da calagem superficial em um Latossolo Vermelho Distrófico. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.29, p.235-247, 2005.
- FOY, C. D.; CHANEY, R. L.; WHITE, M. C. The physiology of metal toxicity in plants. *Annual Review of Plant Biology*, Palo Alto, Review Biology v. 29, p. 511-566, 1978.
- FOY, C.D. Effects of aluminum on plant growth. In: Carson, E.W. (Ed.). *The plant root and its environment*. Charlottesville: University Press of Virginia, 1974. p. 601-642.
- FOY, C.D. Effects of aluminum on plant growth. In: Carson, E.W. (Ed.). *The plant root and its environment*. Charlottesville: University Press of Virginia, 1997. p. 601-642.
- FREITAS, F.A. de; KOOP, M.M.; SOUZA, R.O. de; ZIMMER, P.D.; CARVALHO, F.I.F. de; OLIVEIRA, A.C. de Absorção de P, Mg, Ca e K e tolerância de genótipos de arroz submetidos a estresse por alumínio em sistemas hidropônicos. *Ciência Rural*, v.36, n.1, p.72-79, 2006.
- FRITZ, E. Measurement of cation exchange capacity (CEC) of plant cell walls by X-ray microanalysis (EDX) in the transmission electron microscope. *Microscopy and Microanalysis*, v.13, p.233-244, 2007.
- FURLANI, P.R.; LIMA, M.; MIRANDA L.T.; Miranda, L.E.C.; SAWASAKI, E.; MAGNAVACA, R. Avaliação de linhagens, materiais comerciais e duas populações de milho para tolerância a alumínio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.21, p.655-660, 1986.
- GALLEGO, F.J., BENITO, C. Genetic control of aluminium tolerance in rye (*Secale cereale* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v.92, p.688-695, 1997.
- GALVÃO, J.D. & SILVA, J.C. Herança da tolerância ao alumínio na variedade de milho Piranão. *Revista Ceres*, Viçosa, **25**(137):71-78, 1978.
- GARCIA JÚNIOR, O. & SILVA, WJ. Análise genética da tolerância ao alumínio em milho. *Ciência e Cultura*, São Paulo, **31**:585, 1979. (Resumo)
- HATLITLIGIL, M.B.; OLSON, R.A.; COMPTON, W.A. Yield, water use, and nutrient uptake of corn hybrids under varied irrigation and nitrogen regimes. *Fertilizers Research*, The Hague, v.5, n.3, p.321-333, 1984.
- 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.
- KAUSS, H. Some aspects of calcium-dependent regulation in plant metabolism. *Annual Review of Plant Physiology*, Bethesda, v.38. p.47-72, 1987..

- KAUSS, H. Role of the plasma membrane in host-pathogen interaction. In: Larsson, C., Moller, I.M. (eds.) The plant plasma membrane, structure, function and molecular biology. Berlin : Springer-Verlag, 1990. p.320-350.
- KENNEDY, C.W.; SMITH Jr., W.C.; Ba, M.T. Root cation exchange capacity of cotton cultivars in relation to aluminum toxicity. *Journal of Plant Nutrition*, v.9, p.1123-1133, 1986.
- KESER, M; NEUBAUER, B. F.; HUTCHINSON, F. E.; VERRIL, D.B. Differential aluminum tolerance of sugarbeet cultivars, as evidenced by anatomical structure. *Agronomy Journal*, v. 69,p. 347-350, 1977
- KOCHIAN, L. V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, Palo Alto, v.46, n.1, p.237-260, 1995.
- KOCHIAN, L.V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Ann. Rev. Plant Physiology*, v.46, p.237-260, 1995.
- KÖPKE, U. Methods for studying root growth. In: RUSSEL, R.S.; IGUE, K. & MEHTA, Y.R., eds. The soil /root system in relation to brazilian agriculture. Fundação Instituto Agronômico do Paraná, p.303-318, 1981.
- KUMAR, P.B.A.N.; DUSHENKOV, V.; MOTTO, H. Phytoextraction: The use of plants to remove heavy metals from soils. *Environmental Science Technology*, v.29, p.1232-1238, 1995.
- LAGOS, M.B., FERNANDES, M.I.M., CAMARGO, C.E.O., et al. Genetics and monosomic analysis of aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, v.14, p.1011-1020, 1991.
- LOUGNMAN, B.C. (Eds.). *Genetics aspects of plant mineral nutrition*. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. p.213-221.
- LUTZ, J.A.; HAWKIN, G.W. & GENTER, C.F. Differential response of corn inbreds and single crosses to certain properties of an acid soil. *Agronomy Journal*, 63:803-805,1971.
- MACHADO, E.C.; PEREIRA, A.R. Eficiência de conversão e coeficiente de manutenção da planta inteira, das raízes e da parte aérea em milho e arroz submetidos ao estresse de alumínio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.25, p.845-855, 1990.
- MAGNAVACA, R. Genetic variability and the inheritance of aluminum tolerance in maize (*Zea mays* L.). Lincoln, University of Nebraska, 1982. 135p. Tese (Ph.D.
- 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.
- MASCARENHAS, H. A. A.; CAMARGO, C. E. O. & FALIVENSE, S. M. P. Efeito do alumínio sobre o crescimento de raízes de diferentes cultivares de soja. *Bragantia*, v.43, 191-200, 1984.
- MATSUMOTO, H; MORIMURA, S. Repressed template activity of chromatin of pea roots treated by aluminium. *Plant Cell Physiology*, 21: 951-959, 1980.
- MATTIELLO, E.M.; PEREIRA, M.G.; ZONTA, E.; MAURI, J.; MATIELLO, J.D; MEIRELES, P.G.; SILVA, I.R. da Produção de matéria seca, crescimento radicular e absorção de cálcio, fósforo e alumínio por *Coffea canephora* e *Coffea arábica* sob influência da atividade do alumínio em solução. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.32, p.425-434, 2008.
- MAZZOCATO, A.C.; ROCHA, P.S.G.; SERENO, M.J.C.M.; BOHNEN, H.; GRONGO, V.; NETO, J.F.B. Tolerância ao alumínio em plântulas de milho. *Ciência Rural*, v.32, n.1, p.19- 24, 2002.
- MENGEL, R. & KIRKBY, EA. Principles of plant nutrition. 4th.Edition.Internacional Potash Institute. 1987. p.66-93.
- MENOSSO, O.G.; Costa, J.A.; ANGHINONI, I., BOHNEN, H. Tolerância de genótipos de soja ao alumínio em solução. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 35, n.11, p.2157-2166, 2000.
- MESQUITA FILHO, M.V. & SOUZA, A.F. Resposta do tomateiro à aplicação da calagem e da adubação fosfatada. In:CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 26.,Salvador, 1986. Resumos; *Hortic. Bras.*, 4:61-66, 1986
- MIRANDA, L.T. de; FURLANI, P.R.; MIRANDA, L.E.C. de & SAWAZAKI, E. Genetics of environmental resistance and super genes: latente aluminum tolerance. *Maize Genetics Cooperation News Letter*, Columbia, 58:46-48, 1984a.
- OUSSIBLE, M.; CROOKSTON, R.K. & LARSON, W.E. Subsurface compaction reduces the root and shoot growth and grain yield of wheat. *Agron. J.*, 84:34-38, 1992.
- PAVAN, M.A.; BINGHAM, F.T.; PRATT, P.F. Redistribution of exchangeable calcium, magnesium and aluminium following lime or gypsum application to a Brazilian oxisol. *Soil Science Society of America Journal*, v.48, p.33-38,1982.
- PINTRO, J.; BARLOY, J.; FALLAVIER, P. Uptake of aluminum by the root tips of an Al-sensitive and Al-tolerant cultivar of *Zea mays*. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.36, n.6, p.463-467, 1995.

- POLLE, E.; KONZAK, C.F.; KITTRICK, J. A. Visual detection of aluminum tolerance levels in wheat by hematoxylin staining of seedling roots. *Crop Science*, v. 18, p. 823-827, 1978.
- PRIOLI, A.J. Análise genética da tolerância a toxidez do alumínio em milho (*Zea mays* L.). Campinas – SP. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Estadual de Campinas, 1987.
- QUAGGIO, J.A. Acidez e calagem em solos tropicais. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas, 2000. 111p.
- QUEIROZ-VOLTAN, R.B.; NOGUEIRA, S.S.S.; MIRANDA, M.A.C. Aspectos da estrutura da raiz e do desenvolvimento de plantas de soja em solos compactados. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.35, 2000. p. 929-938
- RAIJ, B. van.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo. 2. ed. Campinas, Instituto Agronômico/Fundação IAC, 1996. (Boletim Técnico, 100).
- RESCK, D. V. S.; FERREIRA, E. A. B.; SANTOS JUNIOR, J. D. G. S.; SÁ, M. A. C.; FIGUEIREDO, C. C. Manejo do Solo sob um Enfoque Sistêmico. In: FALEIRO, F. G.; FARIAS NETO, A. L. de. *Savanas: desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais*, p. 417-473, Embrapa Cerrados, 2008. p. 359-418.
- RHUE, R.D. & GROGAN, CO. Screening *corn* for aluminum tolerance using different Ca and Mg concentration. *Agronomy Journal*, **69**:755-760, 1977.
- RHUE, R.D., GROGAN, C.D., STOCKMEYER, E.W., et al. Genetic control of aluminum tolerance in corn. *Crop Science*, Madison, v.18, p.1063-1067, 1978.
- 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.
- 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.
- ROY, K.A.; SHARMA, A. & TALUKDER, G. Some aspects of aluminum toxicity in plants. *The Bot. Rev.*, 54:145-178, 1988.
- RYAN, P.R.; DITOMASO, J.M.; KOCHIAN, L.V. Aluminium toxicity in roots: an investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. *Journal Experimental Botany*, London, v. 44, n. 259, p. 437-446, 1993.
- SAAD, A.M. Uso do tensiômetro no controle da irrigação por pivô central. Piracicaba,

- ESALQ/USP, 1991. 141 p. (Dissertação de Mestrado em Irrigação e Drenagem), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, 1991.
- SILVA, I.R. da; FERRUFINO, A.; SANZONOWICZ, C.; SMYTH, T.J.; ISRAEL, D.W.; CARTER JÚNIOR, T.E. Interactions between magnesium, calcium, and aluminum on soybean root elongation. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.29, p.747-754, 2005.
- SILVA, I.R.; SMYTH, T.J.; BARROS, N.F.; NOVAIS, R.F. Physiological aspects of aluminum toxicity and tolerance in plants. In: Alvarez V., V.H.; Schaefer, C.E.G.R.; Barros, N.F. de; Mello, J.W.V de; Costa, L.M. da. *Tópicos em Ciência do Solo*, v.II, p.277-335, 2002.
- SIVAGURU, M. and WJ Horst. The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize. *Plant Physiol.* 116:155–163, 1998.
- SOBRAL, A.F. de; GUIMARÃES, V.O.da S. Relação entre a toxidez do alumínio e a produção de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*). *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.27, n.2, p.287-292, 1992.
- SOBRAL, A.F. de; GUIMARÃES, V.O.da S. Relação entre a toxidez do alumínio e a produção de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*). *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.27, n.2, p.287-292, 1992.
- SUBBAIAH, R.; RAO, K.A. Root growth simulation model under specified environment. *Journal of Irrigation and Drainage Engineering*, Aragon, v. 119, n. 5, p. 898-905, 1993.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. Porto Alegre: Artmed, 2004. P.449-484.
- UNITED STATES DEPARTEMENT OF AGRICULTURE – USDA – acessado em: maio/2011; disponível em: <http://seekingalpha.com/article/274326-usda-lowers-corn-production-estimates>.
- VASCONCELOS, S.S.; ROSSIELLO, R.O.P.; JACOB-NETO, J. Parâmetros morfológicos para estabelecer tolerância diferencial à toxicidade de alumínio em cultivares de arroz. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.37, n.3, p. 357-363, 2002.
- VON UEXKÜLL, H. R.; MUTERT, E. Global extend, development and economic – impact of acid soils. *Plant and Soil*, Dordrecht, v.171, n.1, p.5-19, 1995.
- WAGATSUMA, T.; ISHIKAWA, S.; OBATA, H.; TAWARAYA, K.; KATOHDA, S. Plasma membrane of younger and outer cells is the primary specific site for aluminium toxicity in roots. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 171, n. 1, p. 105-112, 1995.
- WRIGHT, R.J. Soil aluminum toxicity and plant growth. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, v.20, p.1479-1497, 1989.