

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**MARIANE DE SOUZA OLIVEIRA**

**TOLERÂNCIA DE VARIEDADES DE  
CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* spp.) À TOXIDEZ POR ALUMÍNIO  
EM SOLUÇÃO**

**Araras  
2012**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**MARIANE DE SOUZA OLIVEIRA**

**TOLERÂNCIA DE VARIEDADES DE  
CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum spp.*) À TOXIDEZ POR ALUMÍNIO  
EM SOLUÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Agricultura e Ambiente (PPGAA) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Agricultura e Ambiente**.

***ORIENTADOR: Prof. Dr. MARCIO ROBERTO SOARES***

**Araras  
2012**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

O48tv

Oliveira, Mariane de Souza.

Tolerância de variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) à toxidez por alumínio em solução / Mariane de Souza Oliveira. -- São Carlos : UFSCar, 2012.  
109 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Cana-de-açúcar. 2. Hematoxilina. 3. Solos ácidos. 4. Sistema radicular. I. Título.

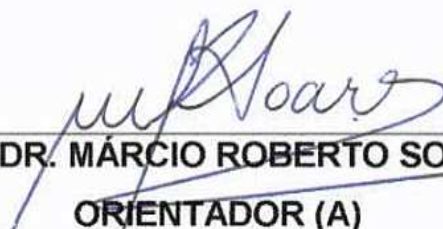
CDD: 633.61 (20ª)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
DE

**MARIANE DE SOUZA OLIVEIRA**

APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA  
E AMBIENTE, DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, **EM 24 DE  
FEVEREIRO DE 2012.**

BANCA EXAMINADORA:

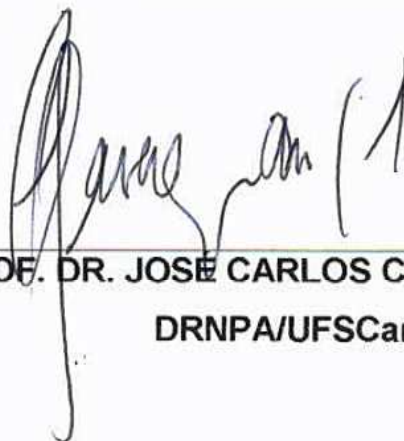


---

**PROF.DR. MÁRCIO ROBERTO SOARES**

**ORIENTADOR (A)**

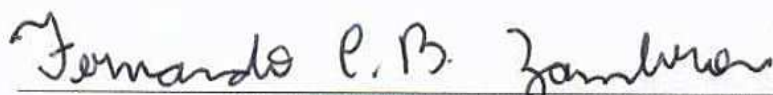
**DRNPA/UFSCar**



---

**PROF. DR. JOSÉ CARLOS CASAGRANDE**

**DRNPA/UFSCar**



---

**DR. FERNANDO CÉSAR B. ZAMBROSI**

**IAC/CAMPINAS**

*Aos meus queridos pais, Roberto e Helena,  
por todo o incentivo, dedicação e amor*

*DEDICO*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela saúde, paciência, auxílio e por me ajudar a não desistir nos momentos difíceis;

Aos meus pais, por todos os valores que me ensinaram, por todo o amor, dedicação e incansável incentivo e apoio, não há palavras para expressar minha gratidão;

Ao Eder por toda a paciência, amizade e companheirismo;

Ao Prof. Dr. Marcio Roberto Soares, pela orientação, apoio, amizade e incentivo durante esses anos de convivência;

À Prof. Dr<sup>a</sup>. Kayna Agostini, pela imprescindível ajuda na metodologia de coloração e de cortes radiculares;

Aos professores Dr. José Carlos Casagrande e Dr. Eduardo Dal Ava Mariano pelo auxílio e sugestões;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa de estudo concedida;

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente pela oportunidade oferecida;

Ao Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-açúcar (UFSCar), pelo fornecimento do material vegetal, e em especial os técnicos Fernando e Sandro pela eficiência e disponibilidade;

Ao pessoal do Laboratório de Fertilidade do Solo, Cidinha, Larissa, Roberto, Campanha e em especial ao João;

Aos companheiros do programa de pós-graduação e aos amigos Monica, Denise, Lucas e Marina pelas conversas, risadas e apoio;

À Jacqueline Malvestiti, pelo constante incentivo, companheirismo, por compartilharmos alegrias, dúvidas e erros e pela grande amiga que se tornou;

A todos que estiveram presente e contribuíram de alguma forma para o desfecho desse trabalho.

# TOLERÂNCIA DE VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum spp.*) À TOXIDEX POR ALUMÍNIO EM SOLUÇÃO

## RESUMO

A influência da toxidez por alumínio (Al) sobre o desenvolvimento do sistema radicular e a absorção de água e de nutrientes tem sido apontada como uma das principais causas da baixa produtividade de muitos solos. O referencial teórico e experimental sobre a tolerância de variedades de cana-de-açúcar a condições adversas de acidez extrema e, principalmente, à alta saturação por Al, ainda é inconclusivo. Os objetivos deste estudo foram: desenvolver e sugerir um protocolo experimental para o estudo da tolerância de variedades de cana-de-açúcar ao Al em solução; estudar a sensibilidade de 9 variedades de cana-de-açúcar (RB928064, RB966928, RB937570, RB855156, RB855453, RB935744, RB867515, RB925345 e SP813250) ao estresse por Al em solução através de um conjunto de análises: (a) exame da alocação do Al na extremidade das raízes; (b) observação do ápice radicular e (c) crescimento radicular; identificar as principais alterações na raiz; identificar a dose crítica de Al ao crescimento radicular e identificar o método mais eficiente para a classificação das variedades quanto ao Al em solução. O experimento foi conduzido em condições de laboratório em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Após o período de germinação, os mini-toletes de cana-de-açúcar foram aclimatados em tanques com solução nutritiva. Após seis dias, os mini-toletes foram transferidos para recipientes com solução nutritiva e doses crescentes de Al (0, 130, 380, 500, 800, 1000, 1400, 2000, 3000 e 4000  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), onde permaneceram por seis dias e posteriormente foram retirados para análises. O desenvolvimento do protocolo experimental foi eficiente para a avaliação da tolerância e seus principais fatores foram método de germinação, seleção da faixa de concentração de Al em solução e os métodos de avaliação da tolerância. As variedades apresentaram diferenças quanto à tolerância ao Al de acordo com as análises realizadas. As principais alterações dos ápices radiculares foram a produção de mucilagem, perda de células epidérmicas da coifa, desintegração da coifa e coloração parda. A taxa de alongamento radicular (TAR) dependeu da interação entre variedade e concentração de Al, sendo que, para as variedades estudadas, o valor crítico variou de 130 a 3000  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . O método de TAR foi considerado o mais eficiente para a avaliação da tolerância de variedades de cana-de-açúcar ao Al em solução e



de acordo com esse método as variedades foram classificadas quanto a tolerância na seguinte ordem: RB928064 > RB935744 > RB855453 = RB966928 > RB925345 = RB867515 > SP813250 > RB855156 > RB937570.

**Palavras-Chave:** Hematoxilina. Solos ácidos. Sistema radicular. Ambiente de produção

# **TOLERANCE OF SUGARCANE (*Saccharum spp.*) VARIETIES TO ALUMINUM TOXICITY IN SOLUTION**

## **ABSTRACT**

The influence of toxic aluminum (Al) on root development and absorption of water and nutrients has been identified as a major cause of low productivity of many soils. The theoretical and experimental study on the tolerance of varieties of sugarcane to adverse conditions of extreme acidity and, especially, high Al saturation, is still inconclusive. The objectives of this study were: to develop and propose an experimental protocol for the study tolerance of varieties of sugarcane to Al in solution and to study the sensitivity of nine varieties of sugarcane (RB928064, RB966928, RB937570, RB855156, RB855453, RB935744, RB867515, RB925345, SP813250) to Al stress solution through a series of analyzes: (a) review the allocation of the Al at the tip roots, (b) observation of the root apices and (c) root growth; identify the main changes in the root; identify the critical dose to the Al root growth and identify the most efficient method for the classification of varieties on the Al in solution. The experiment was conducted in laboratory conditions in a completely randomized design with three replications. After the germination period, the mini-stalks of sugarcane were acclimated in tanks with nutrient solution. After six days, the mini-cuttings were transferred to containers with nutrient solution and increasing doses of Al (0, 130, 380, 500, 800, 1000, 1400, 2000, 3000 and 4000  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), where they remained for six days and subsequently were removed for analyzes. The development of the experimental protocol was efficient for the evaluation of tolerance and its main factors were germination method, selecting the range of Al concentration in solution and the methods of tolerance assessment. The varieties differed in Al tolerance according to the analyzes. The main changes of the tip root were mucilage production, loss of epidermal cells of the root cap and its disintegration, and brown staining of root tips. The root elongation rate (TAR) depended on the interaction between variety and concentration of Al, and, for the varieties studied, the critical value ranged from 130 to 3000  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . The TAR method was considered more efficient to evaluate the tolerance of varieties of sugarcane to Al in solution and in accordance with this method the varieties were classified as tolerance in the following order: RB928064 >

RB935744 > RB855453 = RB966928 > RB925345 = RB867515 > SP813250 > RB855156 >  
RB937570.

**Keywords:** Hematoxylin. Acid soils. Root system. Production environments.

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b>	Teores foliares de macro e de micronutrientes considerados adequados para a cultura da cana-de-açúcar.....	42
<b>TABELA 2.</b>	Fontes e concentrações de macronutrientes utilizadas na composição da solução nutritiva para cultivo de mini-toletes de cana-de-açúcar....	43
<b>TABELA 3.</b>	Fontes e concentrações de micronutrientes utilizadas na composição da solução nutritiva para cultivo de mini-toletes de cana-de-açúcar....	43
<b>TABELA 4.</b>	Condições de estresse por Al em solução empregadas na avaliação de variedades de cana-de-açúcar.....	44
<b>TABELA 5.</b>	Concentrações de Al em solução utilizadas em experimentos de avaliação de tolerância de espécies vegetais cultivadas ao efeito tóxico do Al.....	45
<b>TABELA 6.</b>	Análise de variância (ANOVA) da taxa de alongamento radicular (TAR) de variedades de cana-de-açúcar submetidas a doses crescentes de Al.....	54
<b>TABELA 7.</b>	Teste de comparação de médias da taxa de alongamento radicular (TAR) ( $\text{mm dia}^{-1}$ ) da interação “Variedades x Al”.....	55
<b>TABELA 8.</b>	Concentração crítica de Al limitante ao desenvolvimento radicular inicial de variedades de cana-de-açúcar.....	56
<b>TABELA 9.</b>	Alterações em ápices radiculares de variedades de cana submetidas a concentrações crescentes de Al em solução.....	90
<b>TABELA 10.</b>	Classificação das variedades de cana-de-açúcar quanto a tolerância ao Al nos diferentes métodos utilizados.....	94

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b>	Queda de fertilidade expressa pela saturação por bases (V%) ao longo dos cortes de cana-de-açúcar em Latossolo Vermelho-Amarelo textura média-arenosa (Morelli et al., 1987).....	18
<b>FIGURA 2.</b>	Ambientes de produção de cana-de-açúcar na região Centro-Sul do Brasil (PRADO, 2005).....	24
<b>FIGURA 3.</b>	(A) Sistema radicular de uma planta jovem de cana-de-açúcar, mostrando raízes crescendo a partir dos toletes e raízes emergindo da base dos brotos novos; (B) Sistema radicular de uma touceira de cana-de-açúcar bem estabelecida, indicando três tipos de raízes funcionais (superficiais, sustentação e aprofundamento), e a profundidade de penetração e distribuição no solo (adaptado de SMITH et al., 1999).....	25
<b>FIGURA 4.</b>	Aspectos morfológicos de raízes de plântulas de trigo afetadas pelo alumínio em solução: (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).....	29
<b>FIGURA 5.</b>	(A). Redução no sistema radicular da cana-de-açúcar causada pela presença de Al associada à deficiência de Ca; (B). Espessamento do ápice radicular das raízes de cana-de-açúcar sob condições de estresse por Al do solo (ANDERSON; BOWEN, 1990).....	29
<b>FIGURA 6.</b>	Distribuição do sistema radicular de algumas variedades de cana-de-açúcar aos 16,5 meses de idade, no ciclo de cana-planta, em um Latossolo Vermelho com caráter álico (VASCONCELOS; GARCIA, 2005).....	32
<b>FIGURA 7.</b>	(A). Mini-tolete com as extremidades seladas com parafina; (B). Mini-toletes colocados para germinar em casa-de-vegetação.....	39
<b>FIGURA 8.</b>	Mini-toletes de cana-de-açúcar enrolados em papel germiteste embebido em solução de CaCl 0,001 mol L <sup>-1</sup> . (A). Germinação na posição horizontal; (B). Germinação na posição vertical.....	40
<b>FIGURA 9.</b>	Mini-toletes de cana-de-açúcar colocados para germinar em bandeja com vermiculita no interior da câmara de germinação.....	40
<b>FIGURA 10.</b>	Mini-toletes de cana-de-açúcar em recipiente com solução nutritiva..	41
<b>FIGURA 11.</b>	Lâmpadas fluorescentes adaptadas em estruturas de alumínio móveis para regulagem da intensidade de luz acima da bancada.....	42
<b>FIGURA 12.</b>	Mini-toletes de cana-de-açúcar em recipientes de PVC contendo doses crescentes de Al em recipientes com doses crescentes de Al.....	44

<b>FIGURA 13.</b>	(A). Ápices radiculares sendo corados em solução de hematoxilina; (B). Ápices radiculares após coloração e prontos para serem analisados.....	46
<b>FIGURA 14.</b>	Escala de avaliação do acúmulo de Al em raízes de plantas por meio do teste de coloração pela hematoxilina (BRACCINI et al., 2000b).....	46
<b>FIGURA 15.</b>	Ajuste polinomial/linear do crescimento radicular das variedades SP813250, RB867515, RB935744, RB925345, submetidas a doses crescentes de Al em solução.....	58
<b>FIGURA 16.</b>	Ajuste polinomial/linear do crescimento radicular das variedades RB855156, RB855453, RB966928, RB928064, RB937570, submetidas a doses crescentes de Al em solução.....	59
<b>FIGURA 17.</b>	Classes de acúmulo de Al em raízes, adaptadas para cana-de-açúcar, por meio do teste de coloração pela hematoxilina. (A). Coifa; (B). Meristema apical (região de divisão celular) e região de alongamento celular; (C). Região de maturação (região basal).....	60
<b>FIGURA 18.</b>	Ápices radiculares da variedade RB928064, submetidos a concentrações crescentes de Al em solução e ao corante indicador hematoxilina, e sua representação na escala de avaliação do acúmulo de Al adaptada de Braccini et al. (2000b).....	61
<b>FIGURA 19.</b>	Ápices radiculares da variedade RB966928, submetidos a concentrações crescentes de Al em solução e ao corante indicador hematoxilina, e sua representação na escala de avaliação do acúmulo de Al adaptada de Braccini et al. (2000b).....	62
<b>FIGURA 20.</b>	Ápices radiculares da variedade RB937570, submetidos a concentrações crescentes de Al em solução e ao corante indicador hematoxilina, e sua representação na escala de avaliação do acúmulo de Al adaptada de Braccini et al. (2000b).....	62
<b>FIGURA 21.</b>	Ápices radiculares da variedade RB855156, submetidos a concentrações crescentes de Al em solução e ao corante indicador hematoxilina, e sua representação na escala de avaliação do acúmulo de Al adaptada de Braccini et al. (2000b).....	63
<b>FIGURA 22.</b>	Ápices radiculares da variedade RB867515, submetidos a concentrações crescentes de Al em solução e ao corante indicador hematoxilina, e sua representação na escala de avaliação do acúmulo de Al adaptada de Braccini et al. (2000b).....	64
<b>FIGURA 23.</b>	Ápices radiculares da variedade RB935744, submetidos a concentrações crescentes de Al em solução e ao corante indicador hematoxilina, e sua representação na escala de avaliação do acúmulo de Al adaptada de Braccini et al. (2000b).....	64

<b>FIGURA 24.</b>	Ápices radiculares da variedade RB925345, submetidos a concentrações crescentes de Al em solução e ao corante indicador hematoxilina, e sua representação na escala de avaliação do acúmulo de Al adaptada de Braccini et al. (2000b).....	65
<b>FIGURA 25.</b>	Ápices radiculares da variedade RB855453, submetidos a concentrações crescentes de Al em solução e ao corante indicador hematoxilina, e sua representação na escala de avaliação do acúmulo de Al adaptada de Braccini et al. (2000b).....	66
<b>FIGURA 26.</b>	Ápices radiculares da variedade SP813250, submetidos a concentrações crescentes de Al em solução e ao corante indicador hematoxilina, e sua representação na escala de avaliação do acúmulo de Al adaptada de Braccini et al. (2000b).....	66
<b>FIGURA 27.</b>	Parte do ápice radicular da variedade RB935744 exposto a doses crescentes de Al por seis dias, posteriormente coloridos com hematoxilina e observados ao microscópio óptico em aumento de 40x. (A). Vasos condutores; (B). Início da emissão de raízes laterais.	69
<b>FIGURA 28.</b>	Parte do ápice radicular da variedade RB937570 exposto a doses crescentes de Al por seis dias, posteriormente coloridos com hematoxilina e observados ao microscópio óptico em aumento de 40x. (A). Vasos condutores; (B). Início da emissão de raízes laterais.	70
<b>FIGURA 29.</b>	Parte do ápice radicular da variedade SP813250 exposto a doses crescentes de Al por seis dias, posteriormente coloridos com hematoxilina e observados ao microscópio óptico em aumento de 40x. (A). Vasos condutores; (B). Início da emissão de raízes laterais.	71
<b>FIGURA 30.</b>	Parte do ápice radicular da variedade RB855453 exposto a doses crescentes de Al por seis dias, posteriormente coloridos com hematoxilina e observados ao microscópio óptico em aumento de 40x. (A). Vasos condutores; (B). Início da emissão de raízes laterais.	72
<b>FIGURA 31.</b>	Parte do ápice radicular da variedade RB966928 exposto a doses crescentes de Al por seis dias, posteriormente coloridos com hematoxilina e observados ao microscópio óptico em aumento de 40x. (A). Vasos condutores; (B). Início da emissão de raízes laterais.	73
<b>FIGURA 32.</b>	Parte do ápice radicular da variedade RB867515 exposto a doses crescentes de Al por seis dias, posteriormente coloridos com hematoxilina e observados ao microscópio óptico em aumento de 40x. (A). Vasos condutores; (B). Início da emissão de raízes laterais.	74
<b>FIGURA 33.</b>	Parte do ápice radicular da variedade RB925345 exposto a doses crescentes de Al por seis dias, posteriormente coloridos com hematoxilina e observados ao microscópio óptico em aumento de 40x. (A). Vasos condutores; (B). Início da emissão de raízes laterais.	75

<b>FIGURA 34.</b>	Parte do ápice radicular da variedade RB855156 exposto a doses crescentes de Al por seis dias, posteriormente coloridos com hematoxilina e observados ao microscópio óptico em aumento de 40x. (A). Vasos condutores; (B). Início da emissão de raízes laterais.	76
<b>FIGURA 35.</b>	Parte do ápice radicular da variedade RB928064 exposto a doses crescentes de Al por seis dias, posteriormente coloridos com hematoxilina e observados ao microscópio óptico em aumento de 40x. (A). Vasos condutores; (B). Início da emissão de raízes laterais.	77
<b>FIGURA 36.</b>	Ápices radiculares da variedade RB935744 em microscópio óptico (aumento de 100x) após exposição a doses crescentes de Al por seis dias, não corados com hematoxilina. (A). Perda de células epidérmicas da coifa para o meio; (B). Mucilagem.....	81
<b>FIGURA 37.</b>	Ápices radiculares da variedade RB928064 em microscópio óptico (aumento de 100x) após exposição a doses crescentes de Al por seis dias, não corados com hematoxilina. (A). Perda de células epidérmicas da coifa para o meio; (B). Mucilagem; (C). Desintegração da coifa.....	82
<b>FIGURA 38.</b>	Ápices radiculares da variedade RB867515 em microscópio óptico (aumento de 100x) após exposição a doses crescentes de Al por seis dias, não corados com hematoxilina. (A). Perda de células epidérmicas da coifa para o meio; (B). Mucilagem; (C). Desintegração da coifa.....	83
<b>FIGURA 39.</b>	Ápices radiculares da variedade RB937570 em microscópio óptico (aumento de 100x) após exposição a doses crescentes de Al por seis dias, não corados com hematoxilina. (A). Perda de células epidérmicas da coifa para o meio; (B). Mucilagem; (C). Desintegração da coifa.....	84
<b>FIGURA 40.</b>	Ápices radiculares da variedade RB855156 em microscópio óptico (aumento de 100x) após exposição a doses crescentes de Al por seis dias, não corados com hematoxilina. (A). Perda de células epidérmicas da coifa para o meio; (B). Mucilagem; (C). Desintegração da coifa.....	85
<b>FIGURA 41.</b>	Ápices radiculares da variedade RB966928 em microscópio óptico (aumento de 100x) após exposição a doses crescentes de Al por seis dias, não corados com hematoxilina. (A). Perda de células epidérmicas da coifa para o meio; (B). Mucilagem; (C). Desintegração da coifa.....	86
<b>FIGURA 42.</b>	Ápices radiculares da variedade SP813250 em microscópio óptico (aumento de 100x) após exposição a doses crescentes de Al por seis dias, não corados com hematoxilina. (A). Perda de células epidérmicas da coifa para o meio; (B). Mucilagem; (C). Desintegração da coifa.....	87



- FIGURA 43.** Ápices radiculares da variedade RB925345 em microscópio óptico (aumento de 100x) após exposição a doses crescentes de Al por seis dias, não corados com hematoxilina. (A). Perda de células epidérmicas da coifa para o meio; (B). Mucilagem; (C). Desintegração da coifa..... 88
- FIGURA 44.** Ápices radiculares da variedade RB855453 em microscópio óptico (aumento de 100x) após exposição a doses crescentes de Al por seis dias, não corados com hematoxilina. (A). Perda de células epidérmicas da coifa para o meio; (B). Mucilagem; (C). Desintegração da coifa..... 89

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Objetivos.....	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	21
2.1 A cultura da cana-de-açúcar .....	21
2.2 Ambientes de produção .....	22
2.3 O sistema radicular da cana-de-açúcar .....	25
2.4 O alumínio (Al) no solo.....	27
2.5 Efeito do Al sobre o desenvolvimento vegetal.....	28
2.6 Mecanismos bioquímicos de resistência ao Al.....	30
2.7 Critérios de avaliação da tolerância à toxicidade por Al.....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1 Genótipos de cana-de-açúcar.....	36
3.2 Descrição das variedades de cana-de-açúcar utilizadas .....	37
3.3 Ensaio para definição de metodologia .....	38
3.3.1 Germinação.....	38
3.3.1.1 Casa-de-vegetação .....	38
3.3.1.2 Câmara de germinação .....	39
3.3.2 Crescimento em solução nutritiva .....	41
3.3.3 Exposição ao Al em solução.....	43
3.3.4 Teste de coloração das raízes e alocação do Al nos tecidos radiculares .....	45
3.3.5 Estimativas das taxas de alongamento radicular .....	47
3.3.6 Forma de análise dos resultados .....	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	48
4.1 Protocolo experimental.....	48
4.1.1 Discussão das metodologias utilizadas para o desenvolvimento do protocolo experimental .....	48
4.1.2 Proposta de protocolo de avaliação da tolerância de variedades de cana-de-açúcar ao Al em solução. ....	51
4.2 Taxas de alongamento radicular (TAR) .....	53
4.3 Teste de coloração das raízes e alocação do Al nos tecidos radiculares .....	60
4.3.1. Distinção da sensibilidade em classes de acúmulo de Al nos ápices radiculares... ..	60

4.3.2. Identificação do acúmulo do Al nas células radiculares dos mini-toletes de cana-de-açúcar.....	68
4.4 Microscopia óptica dos danos causados pelo Al nos ápices radiculares .....	81
4.5. Tolerância de variedades de cana-de-açúcar ao Al em solução: avaliação e comparação de métodos.....	92
5 CONCLUSÕES .....	95
6 REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	96

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a área plantada com lavouras é de 62 milhões de hectares e estima-se que passará a 68 milhões em 2021. A cana-de-açúcar deverá contribuir com cerca de 2 milhões de hectares pela incorporação de novas áreas e também pela substituição de outras lavouras (MAPA, 2011).

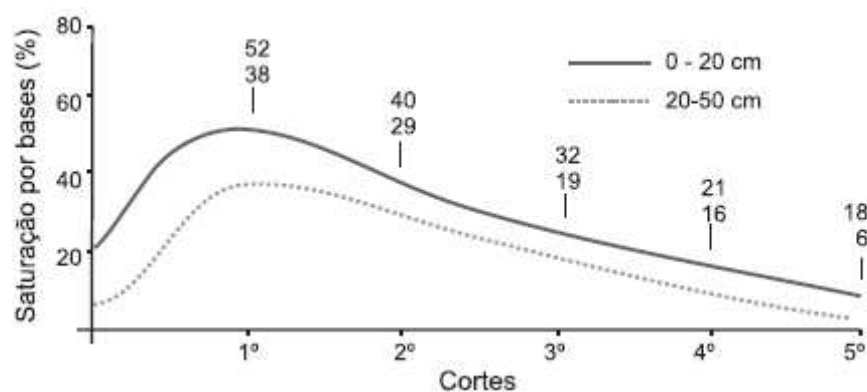
A demanda crescente dos mercados interno e externo, principalmente por combustíveis renováveis como o etanol, encontra suporte no Brasil, que detém tecnologia de produção e áreas agrícolas disponíveis para a expansão da canavicultura (TORQUATO, 2006). O açúcar está entre os produtos que indicam maior potencial de crescimento da produção e das exportações nos próximos anos. Para a safra de 2020/2021, a cana-de-açúcar tem uma previsão de produção de 934,59 milhões de toneladas, 24,59% a mais que a safra 2010/2011. As projeções nacionais indicam que o estado de Goiás deve apresentar o maior aumento de produção e de área, embora ainda seja um estado de produção pequena. Como maior produtor nacional, São Paulo também projeta expansões elevadas, tanto de área como de produto (MAPA, 2011).

O avanço da agricultura 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 e suave-ondulado em 70%, o que torna a topografia favorável à mecanização. Entretanto, apresentam 89% da área com solos distróficos e propriedades químicas inadequadas, como elevada acidez, altos teores de Al trocável e deficiência generalizada de nutrientes, principalmente de P, Ca e Mg (LOPES, 1984; SOUZA et al., 2007).

Somente no Brasil, existem mais de 500 milhões de hectares cobertos com solos ácidos, compreendendo dois terços de seu território total. Trata-se da maior área de solos ácidos encontrada dentro de um único país (VITORELLO et al., 2005), da qual 40% tem produtividade das culturas reduzida à metade (QUAGGIO, 2000). Nesse cenário, o grande representante desses solos é o Cerrado, que cobre uma área de aproximadamente 2 milhões de km<sup>2</sup> (200 milhões de hectares) (IBGE, 2004).

A toxicidade por Al está entre os fatores mais limitantes ao crescimento das plantas em solos ácidos e ocorre em solos com pH abaixo de 5 (FOY, 1984), sendo mais severa em solos com baixa saturação por bases, pobres em Ca e Mg (VITORELLO et al., 2005).

Em solos ácidos, os problemas de toxidez por Al e baixos teores de cátions básicos podem ser solucionados pela adoção de técnicas de melhoramento vegetal e/ou de manejo do solo (LOPES, 1984). A calagem é a prática mais utilizada, pois promove o aumento do pH e da saturação por bases, torna os nutrientes mais disponíveis, promove a precipitação do Al e fornece Ca e Mg (QUAGGIO, 2000). 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. No caso da cana-de-açúcar, a melhor oportunidade para a incorporação do calcário é na ocasião do plantio, o que ocorre a cada 5 ou 6 anos (ROSSETTO; DIAS, 2005). Um problema da utilização desses insumos é a sua aplicação uma vez que a cultura já está implantada. Com o decorrer dos cortes da cana-de-açúcar, há queda acentuada da saturação por bases (V%) (Figura 1), que é acompanhada pela diminuição do pH do solo e da disponibilidade da maioria dos nutrientes (Morelli et al., 1987). Por outro lado, a seleção de plantas tolerantes ao Al tem sido considerada uma alternativa para aumentar a produção agrícola em solos ácidos com altas concentrações de Al (ECHART; MOLINA, 2001). Em vista dessa situação, 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 (DELHAIZE; RYAN, 1995; BRACCINI et al., 2000ab; SILVA et al., 2002). Estudos para a obtenção de variedades/cultivares tolerantes à altas concentrações de Al no solo vem sendo alvo de pesquisa de muitos pesquisadores e instituições, visando aumentar a produtividade de diversas culturas com menor demanda de insumos, além da opção da alocação de culturas em áreas que antes eram consideradas inviáveis para a produção devido a acidez do solo e toxidade do Al.



**Figura 1.** Queda de fertilidade expressa pela saturação por bases (V%) ao longo dos cortes de cana-de-açúcar em Latossolo Vermelho-Amarelo textura média-arenosa (MORELLI et al., 1987).

Uma vez a planta em contato com o Al, este se acumula preferencialmente no sistema radicular, interferindo na divisão celular das raízes e retardando seu crescimento e desenvolvimento. Com isso as raízes tornam-se pouco eficientes na absorção de água e de nutrientes do subsolo (FOY, 1976; KOCHIAN, 1995). Assim, os sintomas podem se manifestar na forma de deficiência de nutrientes essenciais, como Ca, Mg, Fe, Zn ou Mo (SCHÖLL et al., 2005; GUO et al., 2007). Entretanto, pode haver variações de sintomas entre espécies (FURLANI, 1989).

Os mecanismos de tolerância ao Al podem ser classificados em duas categorias. A primeira envolve mecanismos de tolerância a altas concentrações de Al no simplasto da raiz e pode estar relacionada a diferentes mecanismos como quelação do Al no citosol, compartimentalização do Al nos vacúolos, ligações alumínio-proteínas e evolução de enzimas tolerantes ao Al (TAYLOR, 1988). A segunda categoria está relacionada com a habilidade de excluir o Al do ápice da raiz, e pode envolver diferentes tipos de mecanismos como imobilização do Al nas paredes celulares, permeabilidade seletiva do Al na membrana plasmática, formação de uma barreira de pH induzida pela planta na rizosfera ou no apoplasto da raiz e a eliminação de ligantes quelados (TAYLOR, 1988).

Os programas de melhoramento genético da cana-de-açúcar dispõem de importantes informações sobre a cultura e seu manejo. Porém abordam com muita superficialidade os fatores ligados ao ambiente edáfico de produção. Dentro da classificação de ambientes de produção para cana-de-açúcar sugerido por Prado (2005), a saturação por bases, juntamente com a saturação por Al, possuem importante influência na distinção de ambientes mais favoráveis ou não para a produção dessa cultura.

Dentro do tópico de agricultura sustentável, um ponto que deverá se tornar cada vez mais importante é a seleção de genótipos capazes de maximizar a eficiência de utilização dos insumos e de minimizar o risco imposto pela combinação de diversas características restritivas do ambiente (FERREIRA et al., 2006).

Como ocorre com muitas outras culturas, para a cana-de-açúcar ainda não há distinção entre as variedades quanto à tolerância ao Al, ou ainda uma metodologia de seleção adaptada para a cultura.

Nesse contexto, se torna significativa a importância da identificação de plantas promissoras a resistência ao Al, de modo que se torne possível uma posterior prospecção dos genes responsáveis, visando o melhoramento genético. Com isso, procura-se tornar possível a menor demanda por fatores de produção, o que leva a prática da agricultura a ser feita em

sistemas mais sustentáveis. Contudo, essas variedades devem ser condizentes com as condições das novas fronteiras agrícolas e, principalmente, adaptadas a áreas já degradadas.

### **1.1 Objetivos**

Os objetivos deste estudo foram: desenvolver e sugerir um protocolo experimental para o estudo da tolerância de variedades de cana-de-açúcar ao Al em solução; estudar a sensibilidade de 9 variedades de cana-de-açúcar (SP813250, RB867515, RB935744, RB925345, RB855156, RB855453, RB966928, RB928064 e RB937570) ao estresse por Al em solução através de um conjunto de análises: (a) exame da alocação do Al na extremidade das raízes; (b) observação do ápice radicular e (c) crescimento radicular; identificar as principais alterações na raiz; identificar a dose crítica de Al ao crescimento radicular; e identificar o método mais eficiente para a classificação das variedades quanto ao Al em solução.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A cultura da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta com metabolismo C4, apresentando produção crescente com o aumento da radiação. É extremamente eficiente na fixação de CO<sub>2</sub> e no uso da água e de nutrientes, sendo indicada para regiões tropicais. No Brasil encontra condições favoráveis para se desenvolver em quase todo o território, porém apresenta restrições no Rio Grande do Sul e Santa Catarina devido ao risco de geadas (VIEIRA JÚNIOR et al., 2008).

A cana-de-açúcar foi introduzida no Brasil em 1553, estabelecendo-se de forma definitiva nas regiões Centro-Sul e Nordeste (PROCÓPIO et al., 2003). O país é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), matéria-prima para a produção de açúcar e etanol. De acordo com o levantamento da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2011), a lavoura de cana-de-açúcar continua em expansão no Brasil. Segundo o último levantamento, a área de cana-de-açúcar colhida destinada à atividade sucroalcooleira teve aumento de 8,40% em relação à safra anterior. O aumento da área pode ser explicado a partir do crescimento natural das áreas das usinas recentemente instaladas, das áreas de renovação e do aumento de moagem em determinadas unidades produtivas. A produtividade média brasileira foi estimada em 77,8 t/ha. O rendimento foi 4,6% menor em comparação com a safra 2009/10. A redução da produtividade foi consequência das chuvas abaixo da média histórica na região centro-sul. A previsão do total de cana-de-açúcar que será moída na safra 2010/11 é de 624.991 mil toneladas, com incremento de 3,40% em relação à safra 2009/10, o que significa que haverá 20.477 mil toneladas a mais para moagem nesta safra. Do total de cana esmagada, 46,2% serão destinadas à produção de açúcar e 53,8% à produção de etanol, representando um aumento de 16,93% e 7,52% respectivamente, em relação à safra anterior (CONAB, 2011).

Apesar de poder ser produzida em diversos tipos de solo (MARIN, 2007), para responder com alta produtividade a cana-de-açúcar requer solos corrigidos e equilibrados (VIEIRA JÚNIOR et al., 2008), apresentando queda no rendimento à medida que as características do solo vão se afastando das ideais (MARIN, 2007). Algumas medidas importantes voltadas para a recuperação da fertilidade de solos, sobretudo em lavouras de cana-de-açúcar com baixo rendimento, incluem a elevação e manutenção do nível da saturação por bases (V%) na faixa de 40-65% na superfície do solo e, pelo menos, 40% até os



0,6 m de profundidade, fazendo uso de calcário e gesso agrícola, eliminando práticas que acarretem o empobrecimento de solos férteis, realizando operações periódicas de correção do solo e o enriquecendo a superfície do solo com fósforo, nitrogênio, potássio e micronutrientes, usando fertilizantes minerais e/ou orgânicos (DEMATTÊ, 2005). Porém, por ser uma cultura semiperene seu sistema radicular permite a exploração de camadas mais profundas do solo passando a ter uma estreita relação com o pH, saturação por bases (V%) e por Al (m%) e teores de cálcio nas camadas mais profundas do solo. A produtividade alcançada está diretamente correlacionada a esses fatores, principalmente em solos de baixa fertilidade e menor capacidade de retenção de água (MARIN, 2007).

## **2.2 Ambientes de produção**

O desenvolvimento e a produtividade da cana-de-açúcar são limitados por fatores bióticos e abióticos, que incluem a variedade (LANDELL et al., 2005), o manejo fitotécnico, como o espaçamento (GALVANI et al., 1997), controle de plantas infestantes (KUVA et al., 2003), pragas (DINARDO-MIRANDA et al., 2008) e doenças (FERRO et al., 2007), correção e adubação do solo (BITTENCOURT et al., 1990; BENEDINI; KORNDÖFER, 1992; MORELLI et al., 1992; DEMATTÊ, 2005; SALDANHA et al., 2007), nutrição mineral da cultura (VITTI; MAZZA, 2002; ROSSETTO; DIAS, 2005) e, sobretudo, a interação entre estes fatores. As perspectivas mais promissoras de novos aumentos de produtividade estão baseadas na adequação das variedades de cana-de-açúcar ao zoneamento climático e, principalmente, aos diferentes tipos de solos. 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.

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 Agrônomo de Campinas – variedades IAC; CanaVialis – variedades CV] 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 os termos “ambiente favorável e desfavorável”, “baixa-média-alta exigência em ambientes”, “baixa-média-alta exigência em fertilidade do solo”, etc.. O sistema de classificação de ambientes de produção da cana-de-açúcar sugerido por Prado (2005) destaca a textura, a disponibilidade de água e a fertilidade da camada arável e do subsolo, isto é, os aspectos físico-hídricos, químicos e morfológicos do solo. Os critérios para enquadramento nos ambientes A, B, C, D e E envolvem a água disponível (AD), a saturação por bases [eutrófico ( $V\% > 50$ ) e distrófico ( $V\% < 50$ )], a capacidade de troca de cátions (CTC), a saturação por alumínio (álco  $m\% > 50$ ) e as perspectivas de produtividade (t/ha) (Figura 2). Trata-se, até o momento, do sistema mais amplamente usado para alocação de variedades e que está de acordo com diversos estudos que têm demonstrado a influência dos atributos do solo sobre a produtividade da cana-de-açúcar, com respostas distintas para a camada arável e para a camada subsuperficial, sendo que muitos deles têm ratificado que a produtividade depende dos atributos de subsuperfície (SOBRAL; GUIMARÃES, 1992; LANDELL et al., 2003).

O solo é um dos componentes mais importantes de um conjunto complexo de fatores de produção, que se destaca pelo seu importante papel de fornecer suporte físico, água e nutrientes às plantas. Portanto, o conhecimento dos fatores edáficos é importante para 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).

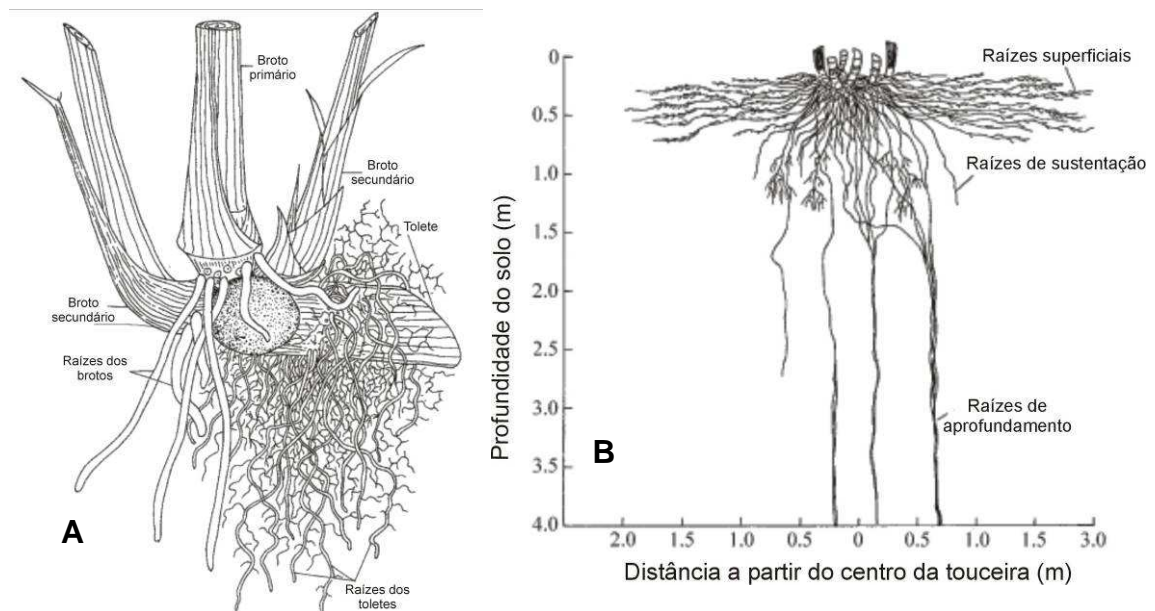
AMBIENTES DE PRODUÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR NA REGIÃO CENTRO-SUL DO BRASIL			
2ª Aproximação			
Ambientes	Produtividades TCH <sub>s</sub>	Atributos dos solos	Símbolos dos solos EMBRAPA (1999), PRADO (2004)
A1	> 100	{ ADA, e, ef, m, CTC média/alta	PVAe <sup>(2)</sup> , PVe <sup>(2)</sup> , LVef, LVe, LV Ae, CXe, NVe, MT*, MX*, GMe, GXe, GMm, GXm
A2	96 - 100	{ ADM, e, ef, CTC média/alta	PVAe <sup>(2)</sup> , PVe <sup>(2)</sup> , PAe <sup>(2)</sup> , LVef, LVe, LV Ae, CXe, NVe, NVe
B1	92 - 96	{ ADA, m, mf, CTC média/alta ADM, mf, m, ma, CTC média/alta ADB, ef, e, CTC média/alta	PVAm <sup>(2)</sup> , PVm <sup>(2)</sup> , PAm <sup>(2)</sup> , LVmf, LVm, LVAm, LAm, CXm, NVmf, NVm, PVAm* LVef, LVe, LV Ae, LAe, NVe, NVe, PVAe <sup>(3)</sup> , PVe <sup>(3)</sup> , PAe <sup>(3)</sup> , CXe
B2	88 - 92	{ ADM, m, mf, CTC média/baixa ADA, ma, CTC média/alta	PVAm <sup>(2)</sup> , PVm <sup>(2)</sup> , PAm <sup>(2)</sup> , LVmf, LVm, LVAm, LAm, CXm GMma, GXma
C1	84 - 88	{ ADM, d, CTC média/alta ADM, ma, CTC média/alta ADB, d, df, CTC média/alta	PVAd <sup>(2)</sup> , PVd <sup>(2)</sup> , PAd <sup>(2)</sup> LVAm*, LAm* LVd, LVdf, LVAd, LAd
C2	80 - 84	{ ADB, e, CTC média/baixa ADMB, ef, CTC média/alta	LVe, LV Ae, LAe LVef
D1	76 - 80	{ ADB, w, wf, CTC média/alta ADM, a, CTC média/alta	LVwf, LVw, LV Aw, LAw PVAa <sup>(2)*</sup> , PVA <sup>(2)*</sup> , PAA <sup>(2)*</sup>
D2	72 - 76	{ ADB, ma, CTC média/alta ADB, e, CTC alta, A chernozêmico	LVma, LV Ama, LAma RLe
E1	68 - 72	{ ADB, a, CTC média/baixa ADMB, ma, CTC média/baixa	PVAa <sup>(3)</sup> , PVA <sup>(3)</sup> , PAA <sup>(3)</sup> PVAm <sup>(4)</sup> , PVm <sup>(4)</sup> , PAm <sup>(4)</sup>
E2	< 68	{ ADMB, wf, w, a, CTC média/alta ADMB, a, d, CTC média/baixa ADMB, e, m, d, ma, a	LVwf, LVw, LV Aw, LAw, LVa, LV Aa, LAa PVAa <sup>(4)</sup> , PVA <sup>(4)</sup> , PVAa <sup>(4)</sup> , PAA <sup>(4)</sup> , RQa, RQd RLe, RLm, RLd, RLma, RLa, PVAe <sup>(4)</sup>

ADA: água disponível alta, ADM: água disponível média, ADB: água disponível baixa, ADMB: água disponível muito baixa.  
 LV: Latossolo Vermelho, LVA: Latossolo Vermelho-Amarelo, LA: Latossolo Amarelo, PVA: Argissolo Vermelho-Amarelo, PV: Argissolo Vermelho, PA: Argissolo Amarelo, NV: Nitossolo Vermelho, MT: Chernossolo Argilúvico, MX: Chernossolo Háplico, CX: Cambissolo Háplico, RQ: Neossolo Quartzarênico, RL: Neossolo Litólico, GX: Gleissolo Háplico, GM: Gleissolo Melânico.  
 ef: eutroférico, e: eutrófico, mf: mesotroférico, m: mesotrófico, df: distroférico, d: distrófico, wf: acríferico, w: ácrico, ma: mesoálico, a: álico.  
<sup>(1)</sup> horizonte B ocorrendo na profundidade de até 20 cm iniciais desde a superfície; <sup>(2)</sup> horizonte B ocorrendo na profundidade de 20 a 60 cm desde a superfície; <sup>(3)</sup> horizonte B ocorrendo na profundidade de 60-100 cm desde a superfície; <sup>(4)</sup> horizonte B ocorrendo na profundidade maior que 100 cm desde a superfície; <sup>(\*)</sup> mosqueamento ou variegado no horizonte B.

Figura 2. Ambientes de produção de cana-de-açúcar na região Centro-Sul do Brasil (PRADO, 2005).

### 2.3 O sistema radicular da cana-de-açúcar

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. 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 (Figura 3). 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 (EVANS, 1964; BALL-COELHO, 1992; DEMATTÊ, 2005).



**Figura 3.** (A) Sistema radicular de uma planta jovem de cana-de-açúcar, mostrando raízes crescendo a partir dos toletes e raízes emergindo da base dos brotos novos; (B) Sistema radicular de uma touceira de cana-de-açúcar bem estabelecida, indicando três tipos de raízes funcionais (superficiais, sustentação e aprofundamento), e a profundidade de penetração e distribuição no solo (adaptado de SMITH et al., 1999).

No início do desenvolvimento radicular, são formadas as raízes de fixação que suprirão os rebentos que brotarão das gemas (ALVAREZ et al., 2000). As raízes do tolete têm alongação inicial de poucos milímetros por dia ( $\text{mm d}^{-1}$ ), podendo alcançar  $20 \text{ mm d}^{-1}$  em poucos dias após a germinação, sob condições favoráveis. Raízes dos brotos crescem mais rapidamente, com taxas máximas de alongação de  $80 \text{ mm d}^{-1}$ , mas em curtos períodos. As taxas de crescimento médio para raízes dos brotos após 10 dias são de  $40 \text{ mm d}^{-1}$ , em solos arenosos, e de  $28 \text{ mm d}^{-1}$  em solos argilosos (SMITH et al., 1999). A taxa média de

penetração, isto é, a taxa de crescimento descendente do sistema radicular pode chegar a 20-30 mm d<sup>-1</sup> (EVANS, 1964; SMITH et al., 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).

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. (KOFFLER, 1986; PEARSON, 1996; 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 (SAMPAIO et al., 1987; 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. Em um LATOSSOLO VERMELHO com caráter álico, isto é, com saturação por Al maior do que 50% (m% > 50), Alvarez et al. (2000) encontraram 90% da biomassa radicular da cana-de-açúcar nos primeiros 30 cm, aos 10,6 meses do plantio. Em um caso raro, Vasconcelos e Garcia (2005) observaram a ocorrência de raízes abaixo de dois metros de profundidade em uma lavoura de oitavo corte.

Impedimentos físicos e químicos do solo têm sido as causas mais frequentes 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, tratam-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, H e Mn, a baixa reserva de nutrientes, devida a reduzida saturação por bases (V%) e baixa capacidade de troca de cátions (CTC), com destacada deficiência de Ca, Mg e Mo e baixa disponibilidade de P devido a adsorção 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).

## 2.4 O alumínio (Al) no solo

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% (FAGERIA et al., 1999). Aproximadamente 70% do território brasileiro são cobertos por solos ácidos e, em 40%, a produtividade das culturas é 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  $\text{Al}^{3+}$  foi o cátion trocável predominante em mais de 30% dos solos com pH inferior a 5,6.

O alumínio (Al) é um constituinte natural do solo, sendo que a maior parte está presente na fase sólida, na forma de minerais como aluminossilicatos ou óxidos e hidróxidos (SPOSITO, 1996). Ele fica retido predominantemente pelas cargas negativas das partículas de argila do solo, em equilíbrio com o  $\text{Al}^{3+}$  em solução.

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; 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)

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) e cerca de 70% das áreas cultivadas com cana-de-açúcar estão sobre solos ácidos (SALDANHA et al., 2007).

Parte da dificuldade em estudar os processos que ocorrem nas plantas, decorrentes da ação deste metal, pode ser atribuída à sua complexidade química. Em pH abaixo de 5 o hidrogênio ( $\text{H}^+$ ) atua sobre os minerais de argila ocasionando a hidrólise do hidróxido de Al, de íons silicato da superfície dos argilominerais e do Al complexado com a matéria orgânica do solo (MALAVOLTA, 1985; ASHMAN; PURI, 2002) o que provoca

liberação do Al para a solução do solo. O Al se hidrolisa em solução, de tal modo que a espécie de Al trivalente,  $\text{Al}^{3+}$ , predomina em condições ácidas ( $\text{pH} < 5,0$ ), enquanto que as espécies  $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$  e  $\text{Al}(\text{OH})_2^+$  são formadas quando o pH aumenta. Em valores de pH próximos da neutralidade, há predomínio das espécies  $\text{Al}(\text{OH})_3$  e  $\text{Al}(\text{OH})_4^-$  (DELHAIZE; RYAN, 1995).

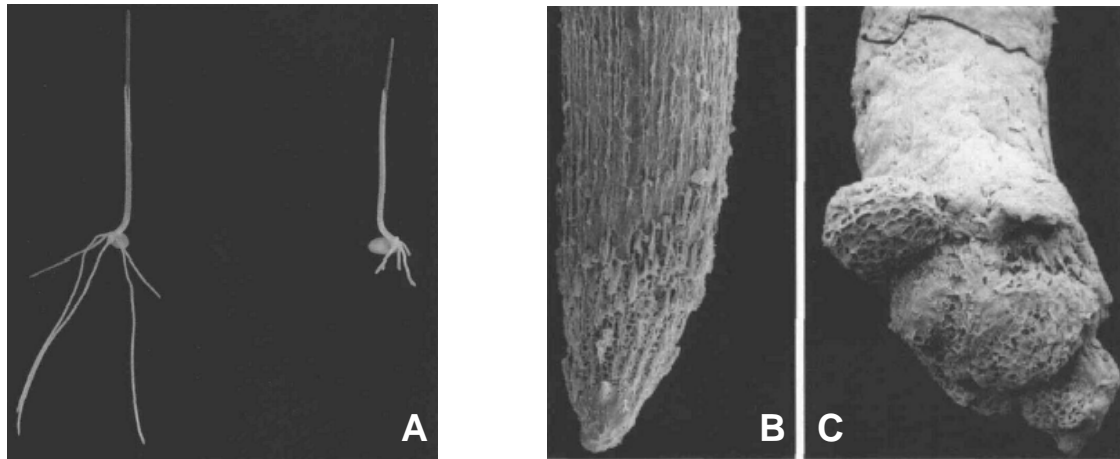
## 2.5 Efeito do Al sobre o desenvolvimento vegetal

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 na solução do solo 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).

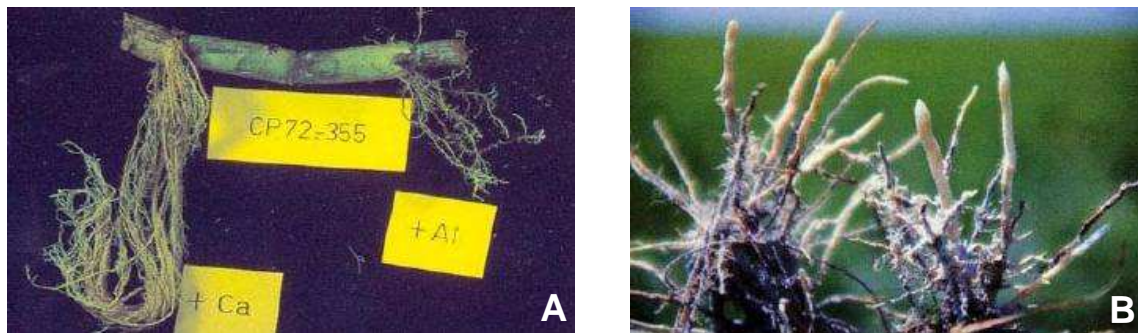
Os efeitos citológicos, morfológicos, fisiológicos e bioquímicos do Al na planta têm sido abordados por vários autores (FOY, 1974; WRIGHT, 1989; KOCHIAN, 1995; DELHAIZE; RYAN, 1995; SILVA et al., 2002; ROSSIELLO; JACOB NETTO, 2006) e os mecanismos pelos quais o Al afeta as funções celulares estão ligados 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. A área mais afetada são as extremidades das raízes, e, de um modo geral, ocorre ausência de ramificações terminais (Figura 4), contribuindo para menor área superficial de exploração de água e nutrientes por parte do sistema radicular (FOY, 1976; KOCHIAN et al., 2004).

O Al induz também alterações na arquitetura do sistema radicular, reprimindo o crescimento das 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 exposição contínua ao Al conduz à alterações morfológicas, como o engrossamento e encurtamento das raízes, com aspecto quebradiço (DELHAIZE; 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 (Figura 5) (ROSSIELLO; JACOB NETO, 2006).



**Figura 4.** Aspectos morfológicos de raízes de plântulas de trigo afetadas pelo alumínio em solução: (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).



**Figura 5.** (A). Redução no sistema radicular da cana-de-açúcar causada pela presença de Al associada à deficiência de Ca; (B). Espessamento do ápice radicular das raízes de cana-de-açúcar sob condições de estresse por Al do solo (ANDERSON; BOWEN, 1990).

A toxicidade do alumínio às plantas decresce na seguinte ordem: polímeros de  $Al_{13}$  (exceto para fosfatos e silicatos),  $Al^{3+}$ ,  $Al(OH)^{2+}$ ,  $Al(OH)_2^+$ ,  $Al(OH)_4^-$  e  $AlSO_4$ , contudo, a toxicidade desta última espécie não é sempre aceita. Vale considerar que  $Al_{13}$ , apesar de ser a espécie mais tóxica, não está comumente presente nos solos (DRABECK et al., 2005). Assim, a forma livre  $Al^{3+}$  é a mais tóxica para as raízes das plantas (ZAMBROSI et al., 2008).



## 2.6 Mecanismos bioquímicos de resistência ao Al

Espécies de plantas diferem significativamente na tolerância ao excesso de Al disponível em solos ácidos ou em soluções nutritivas. Entre os cereais, a espécie mais tolerante é o centeio, seguido pela aveia, trigo e cevada (GALLEGO; BENITO, 1997).

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 por meio de diferentes rotas bioquímicas, incluindo (FERREIRA et al., 2006): (a) capacidade das plantas em alterar o ambiente rizosférico, elevando o pH e reduzindo a solubilidade do Al; (b) possuir baixa CTC na raiz, portanto, maior afinidade por cátions monovalentes, de modo que acumulem, assim, menor concentração de Al em suas raízes; (c) secreção mucilagem em presença de Al; (d) utilização de nutrientes na presença de Al, principalmente P e Ca (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; (g) manutenção de áreas meristemáticas aptas a desenvolverem novos tecidos após o estresse (ROSSIELLO; JACOBNETTO, 2006).

Os mecanismos fisiológicos responsáveis pela tolerância à toxidez de Al ainda não foram esclarecidos, e podem variar entre espécies e cultivares. Obviamente, plantas tolerantes devem ser capazes de prevenir a absorção de Al, ou de complexá-lo após sua absorção (PARENTONI et al., 2001).

A herança e a genética da resistência ao Al têm sido estudadas em várias espécies. Em trigo e centeio a resistência ao Al demonstrou ser determinada por um ou poucos genes (BERZONSKY, 1992), enquanto que em arroz e milho essa característica é multigênica e quantitativa (KOCHIAN et al., 2004).

A tolerância está relacionada à capacidade de continuidade da divisão e alongação celular sob condições de estresse, à modificação do ambiente radicular reduzindo a concentração de Al disponível e à possibilidade de manter áreas meristemáticas viáveis para formação de novos tecidos (FOY et al, 1984).

Mendonça et al. (2005), em experimento com duas cultivares de arroz, Fernandes (tolerante) e Maravilha (sensível), observaram que a cultivar tolerante foi capaz de ajustar seu balanço de prótons e modificar seu pH para valores que favoreçam menor absorção e maior tolerância ao Al.

Abichequer et al. (2003), observaram que a presença de Al aumentou a diferença entre as variedades de trigo Toropi e CNT 8, consideradas tolerante e suscetível, respectivamente, quanto à eficiência de absorção, translocação e utilização de P, com vantagem para a variedade tolerante ao Al.

Outras barreiras que o Al pode enfrentar para atingir as regiões sensíveis do meristema radicular são a mucilagem (ARCHAMBAULT et al., 1996) e a deposição de calose (ZHANG et al., 1995), substâncias formadas por polissacarídeos e que revestem a superfície radicular, protegendo as regiões de crescimento da raiz, retendo o Al presente no apoplasto.

Cançado et al. (1999) destacaram a importância da inativação do Al pela exsudação de moléculas quelantes que complexam este íon metálico. Tais quelantes são liberados no apoplasto e/ou na rizosfera, impedindo que o Al alcance seus sítios de toxidez. Uma vez complexado com a molécula exsudada pela raiz, o Al perde seu efeito fitotóxico. Ácidos orgânicos são uma importante classe destes quelantes. Segundo Suhayda e Haug (1986) e Delhaize et al. (1993), os genótipos tolerantes ao Al secretam altos níveis de ácidos orgânicos.

Tem havido considerável especulação sobre o número de diferentes mecanismos de tolerância ao Al e sobre como esses múltiplos mecanismos são empregados por diferentes espécies de plantas. No entanto, a maioria das evidências experimentais tem-se centrado na exclusão do Al da raiz, a partir da exudação de ácidos orgânicos do ápice radicular. Pode ocorrer ainda um segundo mecanismo de tolerância, baseado na desintoxicação interna do Al presente no simplasto, via complexação com ligantes, principalmente ácidos orgânicos (KOCHIAN et al., 2004).

Várias plantas acumulam Al na parte aérea sem demonstrar sintomas de toxidez. As plantas desenvolveram um sofisticado mecanismo de acumular Al, absorvendo e transportando para as folhas através de ligantes orgânicos que diferem de planta para planta (MARIANO et al., 2005). Citrato, oxalato e malato são alguns ânions de ácidos orgânicos mais comumente utilizados que podem formar complexos suficientemente fortes com  $Al^{3+}$  para proteger as raízes das plantas (MA et al., 2001).

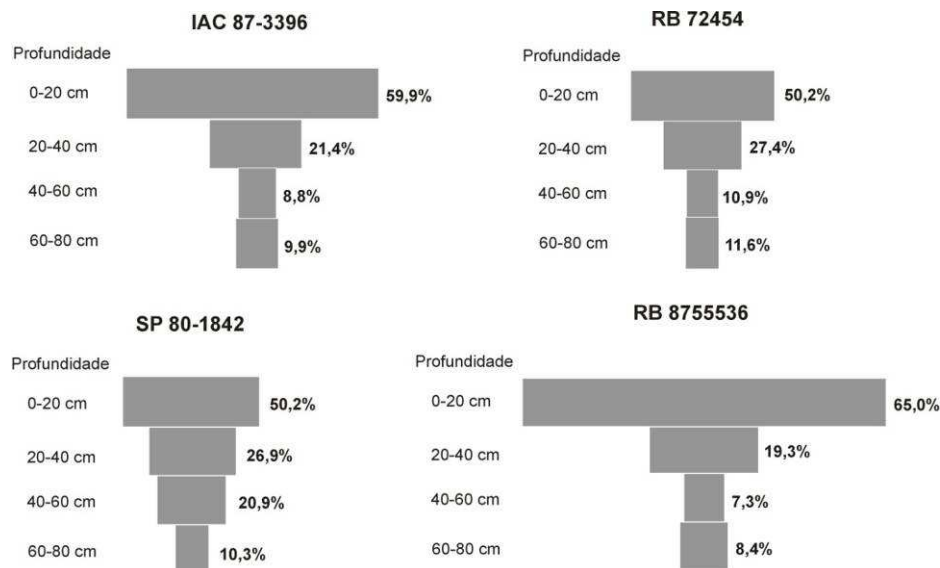
Ma et al. (2001) exemplificaram o papel dos ácidos orgânicos na detoxificação de Al no simplasto em plantas de trigo-sarraceno, em que ocorrem mudanças químicas no Al durante a absorção, translocação e absorção. O Al absorvido pelas raízes na forma de  $Al^{3+}$  é quelatado internamente nas células da raiz pelo oxalato formando o complexo 1:3 (Al:oxalato). Esse complexo é carregado para o xilema, onde ocorre uma reação de troca

formando o complexo Al:citrato. Ao chegar às células das folhas através do xilema, outra reação de troca acontece reformando o complexo Al:oxalato, que é então armazenado no vacúolo sem ocasionar danos ao desenvolvimento da planta.

Contudo, como salientado por Kochian, et al (2004), uma questão para futuras pesquisas é a forma como diferentes espécies de plantas regulam a especificidade da sua resposta em relação a exudação de ácidos orgânicos.

Para Rengel (1996), a baixa capacidade de troca catiônica (CTC) da parede celular da raiz tem sido considerada como um mecanismo externo de tolerância ao Al, sugerindo que plantas com menor CTC apresentariam menor capacidade de absorver este íon tóxico para o interior da célula.

Há certa unanimidade em admitir que a cana-de-açúcar não é tão sensível à acidez do solo quando comparada com outras espécies vegetais (MARINHO; ARAÚJO FILHO, 1983; VIANA et al., 1983; SOBRAL; GUIMARÃES, 1992), mas há relatos de grande variação entre os cultivares com respeito à capacidade de expansão e aprofundamento do sistema radicular (Figura 6), principalmente em resposta ao estresse causado pelo Al (SMITH et al., 2005; VASCONCELOS; GARCIA, 2005).



**Figura 6.** Distribuição do sistema radicular de algumas variedades de cana-de-açúcar aos 16,5 meses de idade, no ciclo de cana-planta, em um LATOSSOLO VERMELHO com caráter álico (VASCONCELOS; GARCIA, 2005).

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; PINTRO 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), 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. Dentre os poucos trabalhos que estudaram a sensibilidade da cultura da cana-de-açúcar ao Al estão os de Hetherington et al. (1988) e de Sobral e Guimarães (1992). A maioria dos estudos com esta cultura dedicou-se ao prospecto direto dos genes responsáveis pela tolerância ao estresse causado pelo Al (DRUMMOND et al., 2001; WATT, 2003).

## 2.7 Critérios de avaliação da tolerância à toxicidade por Al

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, mas os procedimentos mais utilizados podem ser classificados em 5 categorias (FERREIRA et al., 2006):

- a) *Avaliação sob condições de campo*: é recomendado o uso de dois níveis de saturação por Al, sendo 60% ou 80%, nível alto, e 15%, nível não-tóxico para a maioria das culturas;
- b) *Avaliação em casa-de-vegetação, com solo como substrato*: permite avaliar o grau de tolerância ou de susceptibilidade de genótipos vegetais ao Al por experimentos com vasos ou colunas de solo, em que é promovida a variação das condições químicas, principalmente a saturação por Al (m%), com posterior exame da distribuição e do aprofundamento do sistema radicular (DAL BÓ et al., 1986ab);
- c) *Avaliação em casa-de-vegetação ou laboratório, com solução nutritiva como substrato*: permitem a visualização diária do desenvolvimento radicular de plântulas que crescem coletivamente em recipientes com solução nutritiva (normalmente diluições da solução clássica de *Hoagland & Arnon*) na ausência de Al e submetidas à soluções contendo doses crescentes de Al, com manutenção do pH do meio em 4,0 (CAMBRAIA et al., 1991);
- d) *Avaliação em laboratório*:
  - d1) *método de avaliação por corantes indicadores*: o uso de corantes químicos é um método eficiente e de baixo custo para localizar o Al no apoplasto, 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 morin (ETICHA et al., 2005a). 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);

d2) medida da capacidade de troca de cátions (CTC) das raízes: por métodos mais simples e tradicionais (CROOKE, 1964; ABU-ZEID, 1975; 1979) ou mais sofisticados, como o uso de microanálise por energia dispersiva (EDX) em microscopia eletrônica de transmissão (FRITZ, 2007).

Braccini et al. (2000ab) propuseram combinações de duas variáveis ou mais, especialmente aquelas envolvendo parte aérea e raízes, como os critérios que apresentam resultados mais consistentes. Sintomas da toxidez de Al na parte aérea das plantas nem sempre são facilmente identificáveis e, normalmente, assemelham-se com os de deficiência de P (folhas com crescimento anormal e coloração púrpura nos colmos, nas folhas e nas nervuras) e de Ca (enrolamento das folhas jovens e colapso do ápice da planta e dos pecíolos) (VITTI; MAZZA, 2002). Entretanto, Rossiello e Jacob Netto (2006) relataram que 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. 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 (ROSSIELLO; JACOB-NETTO, 2006).

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, levando a interações com outros fatores do ambiente e mascarando a expressão genética da tolerância. Há grande dificuldade de isolar os efeitos do Al, já que podem ser modificados por fatores como o pH, a composição iônica da solução, a 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.

Existem várias formas de identificação de genótipos padrões quanto à tolerância e quanto à suscetibilidade ao Al. A resposta de cultivares de uma mesma espécie de planta à toxidez por Al tem sido avaliada no campo, em vasos em casa de vegetação e em experimentos com solução nutritiva. A identificação de genótipos em solução nutritiva permite avaliar a capacidade de tolerância ao Al em um grande número de plantas de maneira rápida, simples e econômica, permitindo ainda um melhor domínio de fatores que na maioria das vezes são de difícil controle e mensuração no solo e que podem interferir tanto no comportamento das plantas, quanto na ação tóxica do Al (MAGNAVACA, 1982). No entanto, a solução nutritiva deve ser empregada para discriminar os genótipos mais tolerantes e sensíveis em um estágio preliminar do programa de melhoramento. Essa prática reduz o número de genótipos que posteriormente deverão ser avaliados em solos ácidos, permitindo significativa redução no uso de área e no custo das avaliações (MAGNAVACA; BAHIA-FILHO, 1991).

O meio hidropônico oferece outras 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). A fitotoxicidade do Al é atenuada em soluções com elevada força iônica, principalmente pelas interações físico-químicas que se estabelecem entre o Al e os outros íons. Com isso, a indução de sintomas de toxidez de Al requer um aumento na concentração do Al e no tempo de exposição. O reconhecimento dessa situação conduziu à formulação de soluções salinas quimicamente mais simples, formadas pela dissolução de cloretos de Ca e de Al em meio ácido, as quais minimizam os problemas relacionados com a precipitação do Al, devido à ausência de outros ligantes que não o OH. Uma vantagem adicional é que estas soluções simulam as concentrações iônicas características de soluções de solos ácidos, em que os teores de Al extraíveis raramente excedem  $150-200 \mu\text{mol L}^{-1}$ . O Al possui alta afinidade por oxi-ânions orgânicos e inorgânicos e pode formar complexos solúveis com sulfato, fosfato, silicato e borato, além de humatos, fulvatos e ácidos orgânicos simples. A presença de ânions fosfato na solução é crítica para a interação com Al. A redução da força iônica do meio, a pH constante, tende a diminuir a atividade da espécie livre. Pavan et al. (1982) estudaram o efeito da concentração de uma solução de Hoagland & Arnon sobre a atividade de Al em meio hidropônico e constataram que a diluição reduz a concentração efetiva dos contra-íons responsáveis pela formação dos pares iônicos com o Al. De acordo com o comportamento das espécies iônicas mononucleares de Al em solução, espera-se que o poder fitotóxico de uma solução contendo Al seja maximizado a valores de pH 4,0 ou

inferiores. A maioria das plantas cultivadas não tolera níveis tão altos de acidez, de forma que suas respostas ao Al devem ser testadas com valores de pH maiores do que 4,0, em que o Al, mesmo com a sua atividade mais reduzida, pode ainda causar sérias lesões nos genótipos mais sensíveis.

O referencial teórico e experimental sobre a tolerância de variedades de cana-de-açúcar a condições adversas de acidez extrema e, principalmente, de 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. A identificação destas variedades 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 oferecer garantias do sucesso da expansão das fronteiras agrícolas da cultura, assim como maximizar a eficiência de utilização dos insumos, sobretudo irrigação e fertilização, e minimizar o risco imposto pela combinação de diversas características restritivas do ambiente que impedem a máxima expressão genética das variedades. A identificação dos genótipos mais tolerantes à estas condições de estresse contribui para a síntese de variedades por processos biotecnológicos, para a devida alocação das variedades no campo e para a condução de sistemas sustentáveis de produção.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Genótipos de cana-de-açúcar**

Para os experimentos, foram selecionadas as seguintes variedades: SP813250, RB867515, RB935744, RB925345, RB855156, RB855453, RB966928, RB928064 e RB937570. A seleção foi feita de acordo com a área plantada e disponibilidade das variedades. Com esses genótipos, avaliou-se diferenças entre as variedades do mesmo programa de melhoramento (RIDESA) e de programas diferentes, e entre os ciclos tardio, precoce e semi-precoce. Os mini-toletes foram fornecidos pelo Programa de Melhoramento

Genético de Cana-de-Açúcar do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal de São Carlos (PMGCA – UFSCar), *campus* de Araras-SP.

### **3.2 Descrição das variedades de cana-de-açúcar utilizadas**

No experimento foram utilizadas variedades provenientes dos principais programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar do país: Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-Açúcar (PMGCA) da Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro (RIDESA) – variedades RB e Centro de Tecnologia Canavieira (CTC – antiga Copersucar) variedades SP/CTC.

SP 81-3250: Média, com colheita em julho-setembro. Rica e produtiva. Recomenda-se plantar em ambientes de médio a bom potencial (CARACTERÍSTICAS..., 2011)

RB867515: Semi-precoce 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 (RIDESA, 2010).

RB935744: Tardia, com colheita em setembro-novembro. Material rústico, excelente sanidade e muito produtivo. Recomenda-se plantar em ambientes de médio a bom potencial; colher no final de safra (RIDESA, 2010).

RB925345: Precoce com colheita de maio-julho. Possui alto teor de sacarose, alta produtividade e alto teor de fibra no início de safra. Recomenda-se plantar em ambientes favoráveis, devido ao seu comportamento em relação ao carvão; colher no início de safra (RIDESA, 2010).

RB855156: Alta precocidade com colheita em abril-maio. Possui alta capacidade de brotação de soqueiras. Recomenda-se não plantar como cana-de-ano e efetuar plantio em solos bem preparados (RIDESA, 2010).

RB855453: Precoce com colheita em maio-julho. É a variedade precoce mais plantada e cultivada no Centro-Sul. Possui riqueza, ótima soqueira e canas eretas de excelente colheitabilidade. Recomenda-se não plantar como cana-de-ano e alocá-la em ambientes favoráveis (RIDESA, 2010).

RB966928: Precoce à média, com colheita em abril-maio. Possui alta produtividade e capacidade de perfilhamento. Recomenda-se plantar em ambientes de médio a alto potencial e



colher no início a meio de safra. É variedade tolerante ao carvão, ferrugem marron, escaldadura e mosaico (RIDESA, 2010).

RB928064: Média com colheita em julho-setembro. Possui uniformidade de colmos, perfil ideal para colheita mecanizada, ótima brotação de soqueira, excelente vigor e ausência de florescimento. Deve ser manejada em ambientes intermediário e favoráveis, com alta fertilidade (RIDESA, 2010).

RB937570: Precoce à média, com colheita de maio a agosto. Possui média produtividade agrícola e necessita de ambientes com bom potencial. Tem boa sanidade, alto teor de sacarose e bom desempenho no corte mecanizado (RIDESA, 2010).

### **3.3 Ensaio para definição de metodologia**

Em razão da escassez de trabalhos que avaliaram a tolerância de variedades de cana-de-açúcar sob condições de solução nutritiva em laboratório ou casa-de-vegetação, realizaram-se ensaios para a definição de algumas condições experimentais, no intento de sugerir um protocolo experimental adaptado para a cana-de-açúcar.

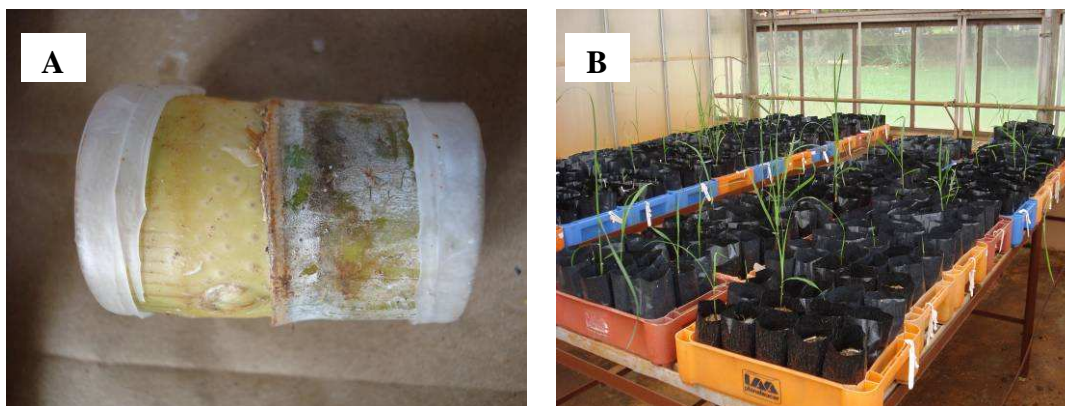
#### **3.3.1 Germinação**

Algumas condições experimentais foram testadas a fim de determinar o método mais eficiente para a germinação dos toletes de cana-de-açúcar.

##### **3.3.1.1 Casa-de-vegetação**

Mini toletes com gema única foram transferidos logo após o corte para saquinhos plásticos individuais preenchidos com vermiculita umedecida na proporção de 1:0,8 (vermiculita:água). Foram germinados toletes sem e com as extremidades seladas com parafina, para evitar a oxidação excessiva e a contaminação por fungos (Figura 7A), conforme protocolo experimental sugerido por Hetherington et al. (1988). Os toletes foram cobertos com uma fina camada de vermiculita e os saquinhos foram transferidos para a casa-de-vegetação. A umidade foi verificada diariamente, havendo necessidade de reposição de água por irrigação todos os dias. Devido a baixa temperatura predominante nos meses em que

ocorreu o experimento, a temperatura no período noturno foi mantida por aquecimento a gás. O crescimento começou a ser medido após 17 dias a partir da data de plantio, ocorrendo medições a cada 5 dias. Os toletes permaneceram em casa-de-vegetação por 62 dias (Figura 7B).

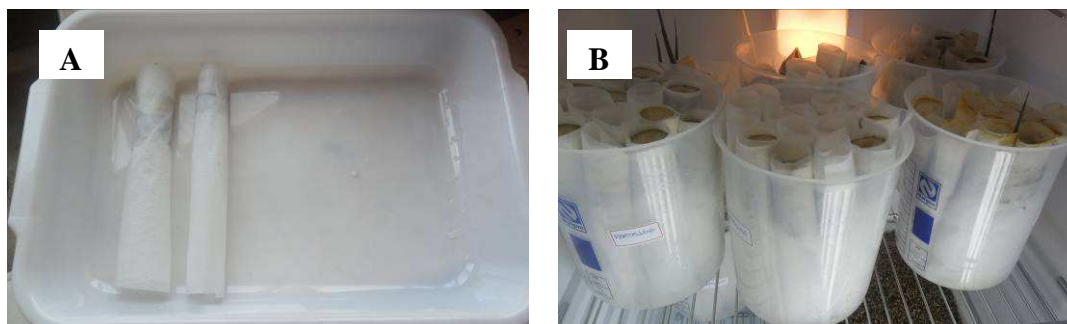


**Figura 7:** (A). Mini-tolete com as extremidades seladas com parafina; (B). Mini-toletes colocados para germinar em casa-de-vegetação

### 3.3.1.2 Câmara de germinação

#### I. Papel germitest

Mini toletes de cana-de-açúcar com gema única foram enrolados em papel especial tipo germitest embebidos com solução de  $\text{CaCl}$   $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ , para estimular o crescimento radicular. Os cartuchos foram acomodados em bandejas na posição horizontal (Figura 8A) e também em Becker de 2 L na posição vertical (Figura 8B). Em ambos, foi adicionada lâmina de água para a manutenção da umidade. Os recipientes foram acondicionados em câmara de germinação com temperatura de  $30^\circ\text{C}$  e fotoperíodo com luz intermitente. A umidade foi verificada diariamente, havendo necessidade de reposição por borrifamento da solução de  $\text{CaCl}$  no papel e reposição da lâmina de água a cada 48 h. O período de germinação variou de 15-20, dependendo da variedade.



**Figura 8.** Mini-toletes de cana-de-açúcar enrolados em papel germiteste embebido em solução de  $\text{CaCl}$   $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ . (A). Germinação na posição horizontal; (B). Germinação na posição vertical.

## II. Vermiculita

Mini toletes de cana-de-açúcar com gema única foram germinados em bandejas plásticas tendo a vermiculita como substrato. As laterais dos toletes foram seladas com parafina para evitar a oxidação excessiva e a contaminação por fungos. A vermiculita foi umedecida numa relação 1:0,8 (vermiculita:água) e os toletes foram dispostos com a gema para cima, cobertos com uma fina camada de vermiculita. As bandejas foram acondicionadas em câmara de germinação com temperatura constante de  $30^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo com luz intermitente (Figura 9), com intensidade de 3850 lux. O período de germinação variou para cada variedade. A umidade das bandejas foi monitorada visualmente e diariamente, havendo necessidade de reposição de água a cada 48 horas.

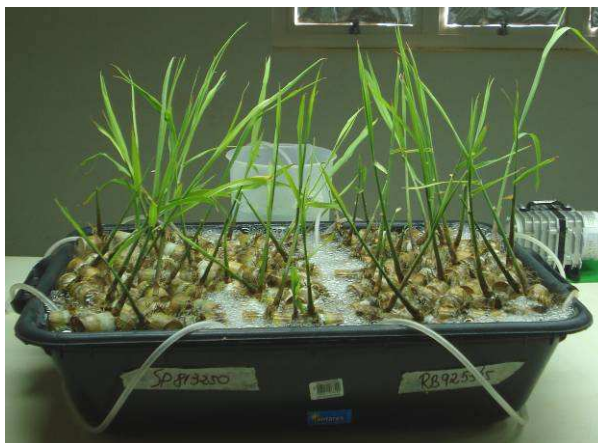


**Figura 9.** Mini-toletes de cana-de-açúcar colocados para germinar em bandeja com vermiculita no interior da câmara de germinação.

### 3.3.2 Crescimento em solução nutritiva

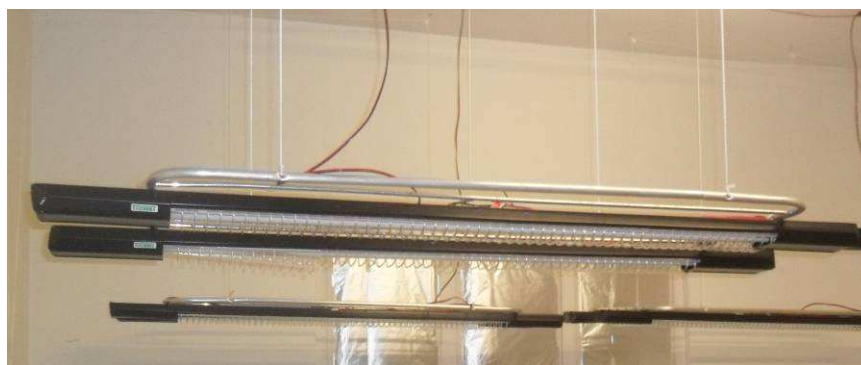
O método de germinação adotado como padrão para a condução do experimento foi aquele realizado em bandejas com vermiculita, na câmara de germinação. Após período de germinação os toletes foram lavados em água corrente para a retirada de toda a vermiculita. Foi realizada uma triagem e os mini toletes que apresentaram maior uniformidade de germinação foram selecionados para serem transferidos para a solução nutritiva.

Os mini-toletes selecionados das bandejas foram transferidos para recipiente (34x53x13cm) na cor preta para evitar a passagem de luz, com 17 litros de solução nutritiva, identificados e fixados em placa de isopor para imersão do sistema radicular (Figura 10). O sistema foi mantido sob arejamento contínuo da solução, por borbulhamento de ar suprido por moto-compressor. Após seis dias, os toletes foram retirados da solução nutritiva e preparados para a exposição ao Al.



**Figura 10.** Mini-toletes de cana-de-açúcar em recipiente com solução nutritiva.

Para garantir uniformidade na incidência de iluminação, todas as janelas do local do experimento foram vedadas com papel alumínio para evitar a entrada de luz externa. A única fonte de luz recebida pelos mini toletes provinha de lâmpadas fluorescentes, com potência de 40 W, adaptadas em estruturas de alumínio móveis para a regulagem da altura e dispostas acima da bancada (Figura 11). A altura da luz foi regulada de modo que a incidência recebida pelos mini-toletes foi de 5000 lux, medida por luxímetro, com fotoperíodo de luz intermitente.



**Figura 11.** Lâmpadas fluorescentes adaptadas em estruturas de alumínio móveis para regulagem da intensidade de luz acima da bancada.

A adequada nutrição mineral dos mini-toletes de cana-de-açúcar, antes de serem submetidos ao estresse por Al, foi feita por uma adaptação da clássica solução de Hoagland & Arnon, preparada com fundamento nos teores foliares de nutrientes considerados adequados para a cultura de cana-de-açúcar (Tabela 1).

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

Nutriente	Teores foliares
Macronutrientes (g kg <sup>-1</sup> )	
N	18-25
P	1,5-3,0
K	10-16
Ca	2,0-8,0
Mg	1,0-3,0
S	1,5-3,0
Micronutrientes (mg kg <sup>-1</sup> )	
B	10-30
Cu	6-15
Fe	40-250
Mn	25-250
Mo	0,05-0,20
Zn	10-50

*Fonte:* Raij et al. (1996)

A composição e a concentração da solução nutritiva de macro (Tabela 2) e de micronutrientes (Tabela 3) adequadas para a cultura da cana-de-açúcar foram calculadas conforme o método prático de Cometti et al. (2006). A solução nutritiva foi usada para garantir aos toletes 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 2.** Fontes e concentrações de macronutrientes utilizadas na composição da solução nutritiva para cultivo de mini-toletes de cana-de-açúcar.

Nutriente	Concentração adotada do nutriente (mg/L)	Sal/Fertilizante utilizado
N	154	Nitrato de cálcio
K	199	Nitrato de potássio
P	38	Fosfato monoamônico (MAP)
Mg	15	Sulfato de magnésio

**Tabela 3.** Fontes e concentrações de micronutrientes utilizadas na composição da solução nutritiva para cultivo de mini-toletes de cana-de-açúcar.

Nutriente	Concentração adotada do nutriente mg / L	Sal/Fertilizante utilizado
B	0,30	Ácido bórico
Cu	0,15	Sulfato de cobre
Fe	2,40	Fe-EDTA
Mn	1,50	Sulfato de manganês
Mo	0,03	Molibdato de sódio
Zn	0,15	Sulfato de zinco

### 3.3.3 Exposição ao Al em solução

Após o período de seis dias de cultivo em solução nutritiva, foram selecionados, para cada variedade, 30 mini toletes com uniformidade radicular. Cada tolete teve suas três maiores raízes medidas, de forma que a média resultante foi considerada o comprimento inicial (Ci) da raiz antes de ser submetida ao estresse por Al. Os toletes foram submetidos a dez tratamentos com doses crescentes de Al com três repetições cada (Tabela 4).

**Tabela 4.** Condições de estresse por Al em solução empregadas na avaliação de variedades de cana-de-açúcar.

Dose de Al $\mu\text{mol L}^{-1}$	Atividade do Al em solução* $\mu\text{mol L}^{-1}$	Concentração equivalente do Al na solução do solo $\text{mmol}_c \text{L}^{-1}$
0 (Testemunha)	0	0
130	14,022	0,39
380	54,172	1,14
500	73,444	1,50
800	121,624	2,40
1000	153,744	3,00
1400	217,984	4,20
2000	314,344	6,00
3000	474,944	9,00
4000	635,544	12,00

\*Atividade do Al estimada por extrapolação da equação  $[\text{Al}] = [\text{a}(\text{Al}) + 6,856]/0,1606$  ( $r = 0,98$ ) (MATTIELLO et al., 2008)

A exposição do sistema radicular de mini-toletes de cana-de-açúcar a condições de estresse por Al foi feita em recipientes de PVC rígido, de 10 cm de diâmetro e 20 cm de altura, preenchidos com 2,7 L de solução nutritiva com Al. O fundo de cada recipiente foi fechado com caps, vedado com cola especial para PVC e silicone para evitar vazamento (Figura 12). Em cada recipiente foram acondicionados três toletes.

Os mini toletes foram acondicionados em orifícios feitos em prancha de isopor e transferidos para os recipientes contendo solução nutritiva e doses crescentes de Al, fornecido na forma de cloreto de alumínio hexahidratado ( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – Merck®). As concentrações de Al adotadas (Tabela 4) foram escolhidas após consulta em referências bibliográficas (Tabela 5) e testes preliminares.



**Figura 12.** Mini-toletes de cana-de-açúcar em recipientes de PVC contendo doses crescentes de Al.



O pH da solução nutritiva contendo Al foi ajustado para  $4,0 (\pm 0,2)$  diariamente com HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  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, o Fe foi omitido da solução, para evitar a interferência e assegurar a atuação do corante hematoxilina pela complexação exclusiva do Al, e a concentração de P foi reduzida para  $0,0025 \text{ mmol L}^{-1}$ , para contornar problemas de precipitação com o Al (BRACCINI et al., 2000ab).

As raízes ficaram expostas à solução contendo Al por seis dias. Após este período, as plântulas tiveram suas três maiores raízes medidas, de forma que a média constituiu o comprimento final ( $C_f$ ), e transferidas para bandejas que continham água destilada para que os procedimentos de coloração pudessem ser realizados.

Como não há indicação consolidada em referências bibliográficas sobre o tempo necessário de imersão de raízes de cana-de-açúcar em soluções contendo Al, foram considerados trabalhos semelhantes realizados com outras espécies vegetais (Tabela 5).

**Tabela 5.** Concentrações de Al em solução utilizadas em experimentos de avaliação de tolerância de espécies vegetais cultivadas ao efeito tóxico do Al.

Cultura	Concentração de Al	Exposição ao Al (dias)	Referência bibliográfica
Arroz	0, 10, 20 e $30 \mu\text{mol L}^{-1}$		Freitas et al. (2006)
	$20 \text{ mg L}^{-1}$		Ferreira et al. (2006)
	$50 \mu\text{mol L}^{-1}$		Kikui et al. (2005)
	0, 80, 160 e $320 \mu\text{mol L}^{-1}$		Vasconcelos et al. (2002)
Milho	$30 \mu\text{mol L}^{-1}$		Pintro et al. (1998)
Trigo	0, 2, 4, 6, 8 e $10 \text{ mg L}^{-1}$		Camargo et al. (1987)
Soja	$15 \mu\text{mol L}^{-1}$		Silva et al. (2005)
Café	0, 500, 1000 e $2000 \mu\text{mol L}^{-1}$		Mattiello et al. (2008)
	$296 \mu\text{mol L}^{-1}$		Braccini et al. (2000b)
*Cana-de-açúcar	0, 70, 130, 380 e $1400 \mu\text{mol L}^{-1}$		Hetherington et al. (1988)

Concentração estimada por extrapolação da equação  $[\text{Al}] = [\text{a}(\text{Al}) + 6,856]/0,1606$  ( $r = 0,98$ ) obtida dos resultados de Mattiello et al. (2008) para a relação entre atividade (aAl) e concentração de Al a pH 4,0, estimada pelo programa de especiação química GEOCHEM; Hetherington et al. (1988) utilizaram atividades de Al de 0, 4, 14, 54, e  $222 \mu\text{mol L}^{-1}$  para experimentação com cana-de-açúcar.

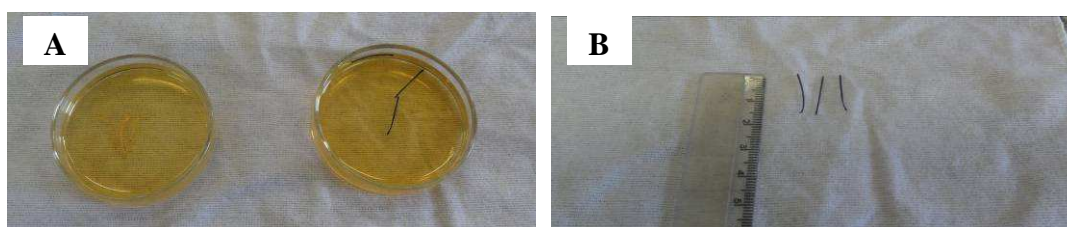
### 3.3.4 Teste de coloração das raízes e alocação do Al nos tecidos radiculares

O acúmulo de Al nas pontas das raízes foi avaliado por dois corantes: hematoxilina e violeta de pirocatecol. A coloração com hematoxilina, corante que produz coloração violeta quando complexado com o Al. Foi pioneiramente usado por Polle et al. (1978), teve o emprego bem-sucedido por Braccini et al. (2000b) e é recomendado por

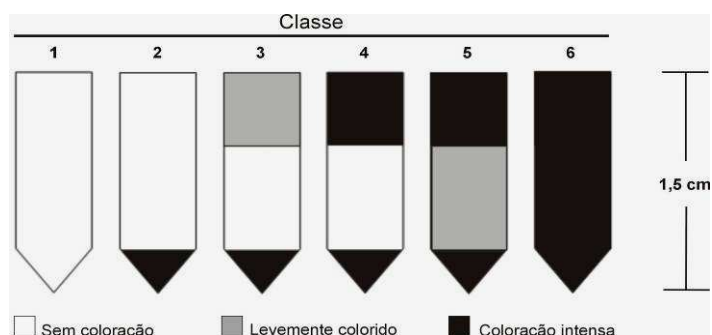


Rossiello e Jacob-Netto (2006) para gramíneas. O princípio desse método de avaliação baseia-se na oxidação da hematoxilina para hemateína (por  $\text{NaIO}_3$ , ou outros agentes oxidantes), que em presença de íons metálicos (Cr, Fe ou Al), tem a propriedade de corar ácidos nucleicos (GILL et al., 1974). Assim, a coloração dos ápices radiculares tende a ser mais intensa nos genótipos que acumulem mais Al. A solução foi preparada pela dissolução de 1 g de hematoxilina, 0,1 g de  $\text{NaIO}_3$  e uma gota de  $\text{NaOH}$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em um litro de água destilada. O violeta de pirocatecol forma um complexo quelatado com o Al produzindo coloração azul. Foi preparada um solução estoque em concentração de  $1,1 \text{ mM L}^{-1}$ , com diluição de 1 ml em 24 ml de água destilada no momento da utilização (JACOB-NETO, 1993).

Após o período de exposição ao Al, as plantas foram transferidas para lavagem em água destilada por 15 minutos, submetidas à solução de hematoxilina e também à de violeta de pirocatecol em quantidade suficiente para cobrir as raízes (Figura 13A) por 15 minutos, e novamente lavadas por 5 minutos para remoção do excesso de corante. O ápice radicular (1,5 cm) (Figura 13B) foi avaliado por meio de uma escala de notas que variou 1 (menor acúmulo de Al) a 6 (maior acúmulo de Al) (Figura 14), conforme a intensidade e localização da região colorida (BRACCINI et al., 2000b). Após a avaliação da coloração das raízes, foi feita uma escala de coloração adaptada para a cana-de-açúcar.



**Figura 13.** (A). Ápices radiculares sendo corados em solução de hematoxilina; (B). Ápices radiculares após coloração e prontos para serem analisados.



**Figura 14.** Escala de avaliação do acúmulo de Al em raízes de plantas por meio do teste de coloração pela hematoxilina (BRACCINI et al., 2000b).

Para avaliar a alocação do Al nos tecidos radiculares, o ápice radicular (1,5 cm), foi submetido a coloração com hematoxilina pelo mesmo método empregado para definir a escala de coloração. Em seguida, foram examinados em microscópio ótico Bioval modelo L2000C e, posteriormente, fotografados.

Para observação da estrutura da coifa das raízes, os ápices radiculares foram examinados ao microscópio e fotografados, porém sem serem submetidos aos corantes hematoxilina ou violeta de pirocatecol

### 3.3.5 Estimativas das taxas de alongamento radicular

Medidas biométricas dos comprimentos radiculares de todas as plantas foram registradas, obtendo-se dois grupos de medidas do comprimento inicial (ROSSIELLO; JACOB-NETTO, 2006):

$C_i$ : comprimento inicial (mm) das três maiores raízes, antes da exposição ao Al solução teste

Após seis dias de exposição ao Al, os mini toletes tiveram suas raízes medidas novamente obtendo-se:

$C_f$ : comprimento final (mm) da raiz, após a exposição ao Al

A partir dessas medidas, o alongamento radicular foi expresso de várias formas:

**(a)** Crescimento radicular ( $C_r$ ):

$$C_r = C_f - C_i$$

**(b)** Taxa de alongamento radicular (TAR): análise das taxas de crescimento radicular

$$TA = \frac{C_f - C_i}{T_f - T_0}$$

em que  $T_f - T_0$  representa o intervalo de tempo desde o início dos tratamentos com Al; a TA é expressa em  $\text{mm dia}^{-1}$ .

Os valores de  $C_i$  e  $C_f$  foram constituídos pela média do comprimento das três maiores raízes de cada mini-tolete avaliado, na ocasião das medidas.

### **3.3.6 Forma de análise dos resultados**

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado. Para a análise estatística, os resultados dos parâmetros biométricos de comprimento radicular foram submetidos à análise de variância. Uma vez que o teste F significativo, os resultados foram desdobrados e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, para identificar e comparar a diferença entre os tratamentos. O programa utilizado foi o Assistat 7.6 Beta. Os resultados das taxas de alongamento radicular foram ajustados à modelos de regressão polinomial.

Parâmetros morfológicos das raízes e o acúmulo de corante nas células radiculares foram explorados na forma de imagens por registro fotográfico das lâminas examinadas ao microscópio. Adicionalmente, a coloração dos ápices radiculares foi examinada para a elaboração de uma escala de acúmulo de Al.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Protocolo experimental**

#### **4.1.1 Discussão das metodologias utilizadas para o desenvolvimento do protocolo experimental**

Com o intuito de fornecer a padronização de um protocolo experimental para a seleção de variedades de cana-de-açúcar quanto à sensibilidade ao Al, foram testados diferentes métodos de germinação, coloração de raízes, doses de Al e condução do experimento. Os testes tiveram como base principalmente o trabalho de Hetherington et al. (1998), que trabalharam com variedades australianas de cana-de-açúcar, e também outros protocolos experimentais, referenciados na Tabela 5 e sugeridos para outras culturas.

Em relação aos testes para a germinação dos mini toletes de cana-de-açúcar, o método do plantio em bandejas com vermiculita média expandida umedecida com água (1:0,8 vermiculita:água) mostrou-se o mais eficiente, rápido e prático. O tempo de germinação das variedades foi em média de 14 dias, apresentando um crescimento radicular satisfatório. Esse

fato foi devido a possibilidade da manutenção de temperatura constante, uma vez que os toletes foram colocados em câmara de germinação a 30°C, e à facilidade da reposição de água, já que as bandejas necessitavam de rega somente a cada 2 dias. Diante de todos esses benefícios, a germinação em câmara de vegetação foi o método padrão utilizado para a condução de todo o experimento.

A germinação de mini toletes envoltos por papel germitest na câmara de germinação apresentou a desvantagem de as raízes crescerem paralelamente ao tolete e não em sentido descendente. Isso dificultou a alocação dos toletes nos orifícios feitos na placa de isopor para a passagem para a solução nutritiva, em que, muitas vezes, as raízes sofriam pequenas lesões na tentativa de posicioná-las corretamente. Apesar de as condições de luminosidade e de temperatura terem sido iguais para o teste realizado em vermiculita, observou-se que a emissão de raízes foi menos abundante, para o mesmo período de germinação, a quantidade de toletes que não emitiu raízes foi maior que no teste anterior.

A germinação em casa-de-vegetação apresentou grandes desvantagens: a temperatura durante o dia foi muito alta, o que exigiu irrigação diária; devido a baixa temperatura predominante nos meses em que ocorreu o experimento, a condição térmica noturna adequada no interior da casa-de-vegetação necessitou aquecimento a gás, com alto custo; o tempo necessário para as raízes atingirem um tamanho adequado foi muito longo (65 dias).

A coloração dos ápices radiculares com hematoxilina e violeta de pirocatecol revelou que o uso da hematoxilina é mais adequado para a análise de acúmulo de Al na raiz. Apesar de o princípio de coloração dos corantes serem semelhantes, o violeta de pirocatecol apresentou pouca ou nenhuma diferença de coloração em relação ao ápice radicular cultivado no tratamento testemunha. Contrariamente, a coloração com hematoxilina permitiu a interpretação de resultados de acordo com Braccini et al. (2000b), uma vez que a intensidade e a região colorida variou entre as variedades de cana-de-açúcar e as doses de Al utilizadas no tratamento.

Na maioria dos trabalhos que objetivaram a seleção de genótipos sensíveis ao Al, foi observado que já existia o conhecimento prévio de quais eram tolerantes ou sensíveis (DARKÓ et al., 2004; ETICHA et al., 2005b; CAI et al., 2011; GARZÓN et al., 2011; GIANNAKOULA et al., 2010). Nesses trabalhos, o objetivo foi testar a resposta de vários genótipos em comparação com a variedade conhecidamente tolerante, a fim de avaliar a diferença na sensibilidade entre eles. Além disso, ou se trabalhavam com poucas doses de Al, ou com apenas dois tratamentos: com e sem a presença de Al (Tabela 5).

Para cana-de-açúcar, não há subsídio científico para a distinção antecipada entre as variedades sobre tolerância ou sensibilidade, e nem a orientação sobre em quais concentrações de Al começam a ocorrer injúrias ao sistema radicular. Dessa forma, foi necessário trabalhar com um número elevado de concentrações de Al, para que fosse possível fazer uma varredura do comportamento das variedades perante a doses crescentes.

Apesar de ser uma gramínea, a medição do sistema radicular da cana-de-açúcar não pode ser feito como o realizado em milho, trigo ou arroz, que emitem uma raiz seminal bem diferenciada no início da germinação e que pode ser medida facilmente. Em cana-de-açúcar, a região de emissão das raízes é distribuída em toda a circunferência do tolete, não sendo possível distinguir somente uma raiz seminal. Assim, para que fosse possível obter dados consistentes sobre o crescimento radicular, foi adotada como metodologia a medição das três maiores raízes, sendo que a média representou o crescimento radicular de cada tolete.

A realização do experimento utilizando dez concentrações crescentes de Al permitiu visualizar o comportamento das variedades e também tornou evidente a diferença na resposta do crescimento das raízes de cana-de-açúcar em comparação com as outras gramíneas como arroz, milho e trigo, que normalmente apresentam um decréscimo muito nítido no crescimento radicular com o aumento da concentração de Al. Para a cana-de-açúcar, a queda no crescimento foi menos sensível, mesmo utilizando a ampla faixa de concentrações de Al, diferentemente da maioria dos trabalhos com outras gramíneas que trabalharam com poucas doses.

O desenvolvimento do protocolo experimental foi eficiente para a avaliação da tolerância de variedades de cana-de-açúcar ao Al em solução. Os fatores determinantes para a elaboração do protocolo experimental foram o método de germinação dos mini-toletes, seleção da faixa de concentração de Al em solução e os métodos de avaliação do comportamento das variedades perante o estresse por Al em solução.

A metodologia sugerida no protocolo experimental representa uma primeira aproximação para os estudos realizados com tolerância da cana-de-açúcar ao Al em solução. Novos testes podem ser feitos para a melhoria e aprimoramento da metodologia, estudando outras condições experimentais de vários fatores, tais como a luz, tempo de exposição ao Al, concentração da Al e medição radicular. Contudo, a metodologia da maneira como está permitiu fazer uma avaliação das variedades de cana-de-açúcar à tolerância ao Al em solução.

#### **4.1.2 Proposta de protocolo de avaliação da tolerância de variedades de cana-de-açúcar ao Al em solução.**

##### **I. GERMINAÇÃO**

Utilizar mini-toletes com gema única, em torno de 7 cm de comprimento.

Selar com parafina as extremidades dos mini-toletes com gema única. Recomenda-se germinar os mini-toletes no mesmo dia em que foram coletados, para garantir o poder germinativo.

Preencher bandejas com 8 cm de vermiculita média umedecida, na relação vermiculita:água (1:0,8).

Os toletes devem ser dispostos em bandejas (38 x 27 x 10 cm) com furos na parte inferior e forradas com jornal. As gemas ficam viradas para cima e os toletes cobertos por uma fina camada de vermiculita, e em seguida levados para a câmara de germinação em temperatura constante de 30°C com fotoperíodo de luz intermitente e intensidade de 3850 lx.

Como a germinação dos mini-toletes é desigual, recomenda-se germinar o dobro da quantidade que vai ser utilizada, para haver a possibilidade de seleção dos mais uniformes.

A reposição de água da bandeja deve ser feita a cada 48 horas, adicionando cerca de 0,5 litro de água destilada, feita com o auxílio de um regador.

Manter a bandeja na câmara de germinação por um período de 15 a 20 dias. O período de germinação pode variar para cada variedade.

##### **II. SOLUÇÃO NUTRITIVA**

Selecionar os mini-toletes com maior uniformidade de germinação e lavar em água corrente para a retirada de toda a vermiculita do sistema radicular.

Fixar os mini-toletes em orifícios feitos em placa de isopor e transferir todos os mini-toletes para um único recipiente de cor preta com dimensões (34x53x13cm) e capacidade para 23,5 litros preenchido com 17 litros de solução nutritiva composta por macro (mg L<sup>-1</sup>) (nitrogênio, 154; potássio, 199; fósforo, 38; magnésio, 15; enxofre, 20) e micronutrientes (mg L<sup>-1</sup>) (boro, 0,30; cobre 0,15; ferro, 2,40; manganês, 1,50; molibdênio, 0,03; zinco, 0,15).

A solução deve receber arejamento contínuo, por borbulhamento de ar suprido por moto-compressor. A fonte de luz recebida pelos mini-toletes deve provir de lâmpadas

fluorescentes acopladas em estruturas de alumínio que permitam a regulagem de altura, de forma que incidência recebida pelos mini-toletes seja de 5000 lux.

Os mini-toletes permanecem em solução nutritiva por seis dias e então são retirados para serem transferidos para recipientes com solução contendo Al.

### III. EXPOSIÇÃO AO AL EM SOLUÇÃO

Após o período de 6 dias de imersão do sistema radicular em solução nutritiva, são selecionados os toletes que serão expostos em solução com Al. Cada mini-tolete selecionado tem suas três maiores raízes medidas, de forma que a média resultante é considerada o comprimento inicial ( $C_0$ ) da raiz antes de ser submetida ao estresse por Al.

Após a medida, os mini-toletes são transferidos para recipientes de PVC de 10 cm de diâmetro e 20 cm de altura, com capacidade para 3 litros, contendo 2,7 litros de nova solução nutritiva descrita no item II, adicionada de doses crescentes de Al: 0 (Testemunha), 130, 380, 500, 800, 1000, 1400, 2000, 3000 e 4000  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , fornecido na forma de cloreto de alumínio hexahidratado ( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  - Merck®). Cada dose corresponde a um tratamento, sendo que cada recipiente receberá três mini-toletes que constituirão as repetições. Cada dose deve ser alocada em um recipiente individual com os mini-toletes identificados e fixados em orifícios feitos em placa de isopor circular.

O pH da solução nutritiva contendo Al deve ajustado para 4,0 ( $\pm 0,2$ ) diariamente com HCl 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  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, o Fe é omitido da solução, para evitar a interferência e assegurar a atuação do corante hematoxilina pela complexação exclusiva do Al. A concentração de P é reduzida para 0,0025  $\text{mmol L}^{-1}$ , para contornar problemas de precipitação com o Al (BRACCINI et al., 2000b).

Após o período de 6 dias de exposição das raízes ao Al, as plântulas tiveram suas 3 maiores raízes medidas, de forma que a média constituiu o comprimento final ( $C_f$ ).

### IV. ANÁLISE DO SISTEMA RADICULAR

Após o período de exposição ao Al, as plantas são transferidas para lavagem em água destilada por 15 minutos. São cortados os ápices radiculares (1,5 cm) das raízes e estes são submetidos à solução de hematoxilina, em quantidade suficiente para cobrir as raízes por 15 minutos, e novamente lavados por 5 minutos para remoção do excesso de corante.

A solução de hematoxilina é composta pela dissolução de 1 g de hematoxilina, 0,1 g de  $\text{NaIO}_3$  e uma gota de NaOH 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  em um litro de água destilada (BRACCINI

et al., 2000b). A hematoxilina, ao reagir com o Al, produz uma cor violácea e é utilizada para verificar a alocação do Al nos tecidos radiculares.

O ápice radicular (1,5 cm) é avaliado por meio de uma escala de notas, que varia de 1 (menor acúmulo de Al) a 7 (maior acúmulo de Al), conforme a intensidade e localização da região colorida (Figura 17).

Para avaliar a alocação do Al nos tecidos radiculares, os ápices radiculares (1,5 cm) são submetidos à coloração com hematoxilina pelo mesmo método empregado para definir a escala de coloração. Em seguida, são dispostos em uma lâmina com uma gota de água sobreposta por lamínula, a qual é pressionada para o achatamento do ápice e melhor visualização do cilindro vascular. Posteriormente as lâminas são examinadas em microscópio óptico (aumento de 40x) e fotografadas.

Para observação da estrutura da coifa das raízes, os ápices radiculares são examinados ao microscópio óptico (aumento 100x) e fotografados, porém sem serem submetidos ao corante hematoxilina e a pressão da lamínula.

## **V. ESTIMATIVAS DAS TAXAS DE ALONGAMENTO RADICULAR**

O crescimento radicular é obtido subtraindo-se o comprimento final ( $C_f$ ), após o período de exposição ao Al, do comprimento inicial ( $C_0$ ), antes da exposição ao Al. Os valores de crescimento foram constituídos pela média do comprimento das três maiores raízes de cada mini-tolete avaliado na ocasião das medidas. A taxa de alongamento radicular é calculada conforme o item 3.3.5.

### **4.2 Taxas de alongamento radicular (TAR)**

A TAR é comumente usada como método padrão para discriminar o comportamento de plantas frente ao Al em solução. Muitos autores (BRACCINI et al., 2000b; CORRALES et al., 2008; CAI et al., 2011; GARZÓN et al., 2001; HEIDARABADI et al., 2011) utilizaram a TAR juntamente com métodos complementares para a verificação de algum comportamento mais específico.

A análise de variância mostrou existir alta significância estatística para interação “variedades x doses de Al” sobre o parâmetro crescimento radicular ( $\text{mm dia}^{-1}$ ) (Tabela 6).



**Tabela 6.** Análise de variância (ANOVA) da taxa de alongamento radicular (TAR) de variedades de cana-de-açúcar submetidas a doses crescentes de Al.

Fonte de variação	GL	Valor <i>F</i>
Variedades	8	188,9018 **
Doses de Al	9	108,0995 **
Variedades x Al	72	15,4345 **
Resíduo	180	
Total	269	

\*\*significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ).

A variedade SP813250 (Tabela 7) apresentou um crescimento inferior e estatisticamente diferente das demais variedades na maioria das doses. Porém, não apresentou diferença estatística em seu crescimento de acordo com o aumento das doses de Al. A partir da dose  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ , a SP813250 diferiu estatisticamente pelo menor crescimento radicular. De acordo com o teste de comparação de médias da interação “variedades x doses de Al” (Tabela 7), as doses críticas, ou seja, as doses a partir das quais a taxa de alongamento diferiu significativamente da testemunha, estão apresentadas na tabela 8.

**Tabela 7.** Teste de comparação de médias da taxa de alongamento radicular (TAR) (mm dia<sup>-1</sup>) da interação “Variedades x Al”.

Variedade	Doses de Al (µmol L <sup>-1</sup> )										MÉDIA
	0	130	380	500	800	1000	1400	2000	3000	4000	
SP813250	0,83 cA <sup>±0,24</sup>	0,70 cA <sup>±0,47</sup>	0,78 cdA <sup>±0,16</sup>	0,51 cA <sup>±0,32</sup>	0,41 dA <sup>±0,31</sup>	0,44 cA <sup>±0,39</sup>	0,37 bcA <sup>±0,23</sup>	0,15 cA <sup>±0,50</sup>	0,12 aA <sup>±0,29</sup>	0,22 bcA <sup>±0,19</sup>	0,45 e
RB867515	3,04 bA <sup>±0,14</sup>	2,64 abAB <sup>±0,24</sup>	3,12 abA <sup>±0,20</sup>	2,32 bABC <sup>±0,33</sup>	2,00 bcBCD <sup>±0,38</sup>	1,76 bCD <sup>±0,36</sup>	1,68 aCD <sup>±0,25</sup>	0,26 cF <sup>±0,29</sup>	0,67 aEF <sup>±0,05</sup>	1,20 aDE <sup>±0,46</sup>	1,87 bc
RB935744	2,56 bBC <sup>±0,48</sup>	2,16 bC <sup>±0,43</sup>	3,68 aA <sup>±0,24</sup>	3,76 aA <sup>±0,33</sup>	2,72 abBC <sup>±0,31</sup>	3,36 aAB <sup>±0,24</sup>	1,28 aD <sup>±0,37</sup>	2,56 aBC <sup>±0,39</sup>	0,32 aE <sup>±0,44</sup>	0,88 abcDE <sup>±0,21</sup>	2,33 a
RB925345	2,80 bAB <sup>±0,38</sup>	3,28 aA <sup>±0,36</sup>	2,72 bAB <sup>±0,37</sup>	2,48 bAB <sup>±0,37</sup>	1,44 cCD <sup>±0,14</sup>	2,16 bBC <sup>±0,24</sup>	1,20 abDE <sup>±0,40</sup>	0,48 cE <sup>±0,48</sup>	0,72 aDE <sup>±0,50</sup>	0,64 abcDE <sup>±0,51</sup>	1,79 c
RB855156	1,50 cA <sup>±0,33</sup>	1,13 cAB <sup>±0,39</sup>	0,59 cdBC <sup>±0,22</sup>	0,61 cBC <sup>±0,39</sup>	0,49 dBC <sup>±0,34</sup>	0,14 cC <sup>±0,13</sup>	0,39 bcBC <sup>±0,10</sup>	0,08 cC <sup>±0,08</sup>	0,13 aC <sup>±0,08</sup>	0,11 bcC <sup>±0,23</sup>	0,52 e
RB855453	1,04 cA <sup>±0,08</sup>	0,42 cAB <sup>±0,50</sup>	0,33 dAB <sup>±0,42</sup>	0,25 cAB <sup>±0,59</sup>	0,24 dAB <sup>±0,38</sup>	0,17 cB <sup>±0,25</sup>	0,11 cB <sup>±0,06</sup>	0,08 cB <sup>±0,07</sup>	0,12 aB <sup>±0,04</sup>	0,07 bcB <sup>±0,50</sup>	0,28 e
RB966928	1,06 cA <sup>±0,55</sup>	0,33 cAB <sup>±0,29</sup>	0,28 dAB <sup>±0,19</sup>	0,30 cAB <sup>±0,19</sup>	0,26 dAB <sup>±0,55</sup>	0,17 cB <sup>±0,41</sup>	0,20 cAB <sup>±0,03</sup>	0,08 cB <sup>±0,43</sup>	0,06 aB <sup>±0,40</sup>	0,03 cB <sup>±0,07</sup>	0,28 e
RB928064	1,14 cBC <sup>±0,03</sup>	1,14 cBC <sup>±0,40</sup>	1,38 cBC <sup>±0,36</sup>	2,67 bA <sup>±0,00</sup>	2,92 aA <sup>±0,24</sup>	1,56 bB <sup>±0,38</sup>	0,91 abcBCD <sup>±0,14</sup>	0,63 cCDE <sup>±0,23</sup>	0,01 aE <sup>±0,10</sup>	0,05 bcDE <sup>±0,29</sup>	1,24 d
RB937570	6,93 aA <sup>±0,13</sup>	2,88 abB <sup>±0,52</sup>	2,41 bBC <sup>±0,44</sup>	1,84 bcD <sup>±0,51</sup>	1,48 cD <sup>±0,32</sup>	1,99 bCD <sup>±0,14</sup>	1,68 aCD <sup>±0,30</sup>	1,5 bD <sup>±0,40</sup>	0,00 aE <sup>±0,35</sup>	0,00 cE <sup>±0,29</sup>	2,07 ab
MÉDIA	2,32 A	1,63 B	1,70 B	1,64 B	1,33 C	1,31 C	0,87 D	0,65 D	0,24 E	0,36 E	

DMS Variedades = 0,87\*\* DMS Doses de Al = 0,85\*\* CV% = 27,55

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna e maiúsculas na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%. \*\*significativo ao nível de 1% de probabilidade (p<0,01); numeração sobrescrita indica desvio padrão.

**Tabela 8.** Concentração crítica de Al limitante ao desenvolvimento radicular inicial de variedades de cana-de-açúcar.

Variedade	Dose crítica de Al ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )
SP813250	500
RB867515	800
RB935744	1400
RB925345	800
RB855156	380
RB855453	1000
RB966928	1000
RB928064	3000
RB 937570	130

O teste de comparação de médias para a interação permitiu observar que o crescimento radicular não apresentou queda no crescimento nas primeiras doses, fato que ficou evidente pela observação de que a testemunha não apresentou o maior crescimento. Porém, nas maiores doses já é possível visualizar o efeito do Al na redução do crescimento radicular (Tabela 7). Morita et al. (2008) também observaram que em chá (*Camelia sinensis*), o crescimento das raízes jovens foi maior em 0,4 e 1 mM de Al do que em 0 e 0,1 mM, enquanto que em 4 mM foram inferiores, contudo ainda maiores que nas doses 0 e 0,1 mM de Al.

O primeiro sintoma da toxicidade por Al é a inibição de crescimento radicular (KOCHIAN, 1995). Porém, em vários trabalhos, a tendência de inibição do alongamento radicular não acompanhou necessariamente o incremento da concentração de Al em solução, como relatado para chá (MORITA et al., 2008), milho (COMIN et al., 1999), maçã (STOLF et al., 2008) e também para cana-de-açúcar (HETHERINGTON et al., 1988).

O alongamento da raiz ocorre na zona de alongamento, e não ao longo de toda sua extensão. Somente 2-3 mm da zona de alongamento precisa ser exposto ao Al para que ocorra a inibição do crescimento (DELHAIZE; RYAN, 1995). Em termos fisiológicos, o Al pode ser observado em ápices da raiz, especialmente na zona de alongamento, que é altamente sensível à toxicidade por Al, interferindo diretamente no crescimento radicular (BLAIR et al., 2009).

A inibição do alongamento radicular é o primeiro sintoma visível da toxicidade por Al, embora a resposta das raízes possa diferir entre as espécies de plantas e até mesmo

entre cultivares (MATSUMOTO; MOTODA, 2011). Exemplo disso foi observado por MATSUMOTO (2002), onde a alongação da raiz em cultivar de trigo Al-sensível foi inibido por um tratamento de 3 horas com 5  $\mu\text{mol}$  de Al, enquanto o cultivar tolerante foi inibido por uma concentração 10 vezes maior.

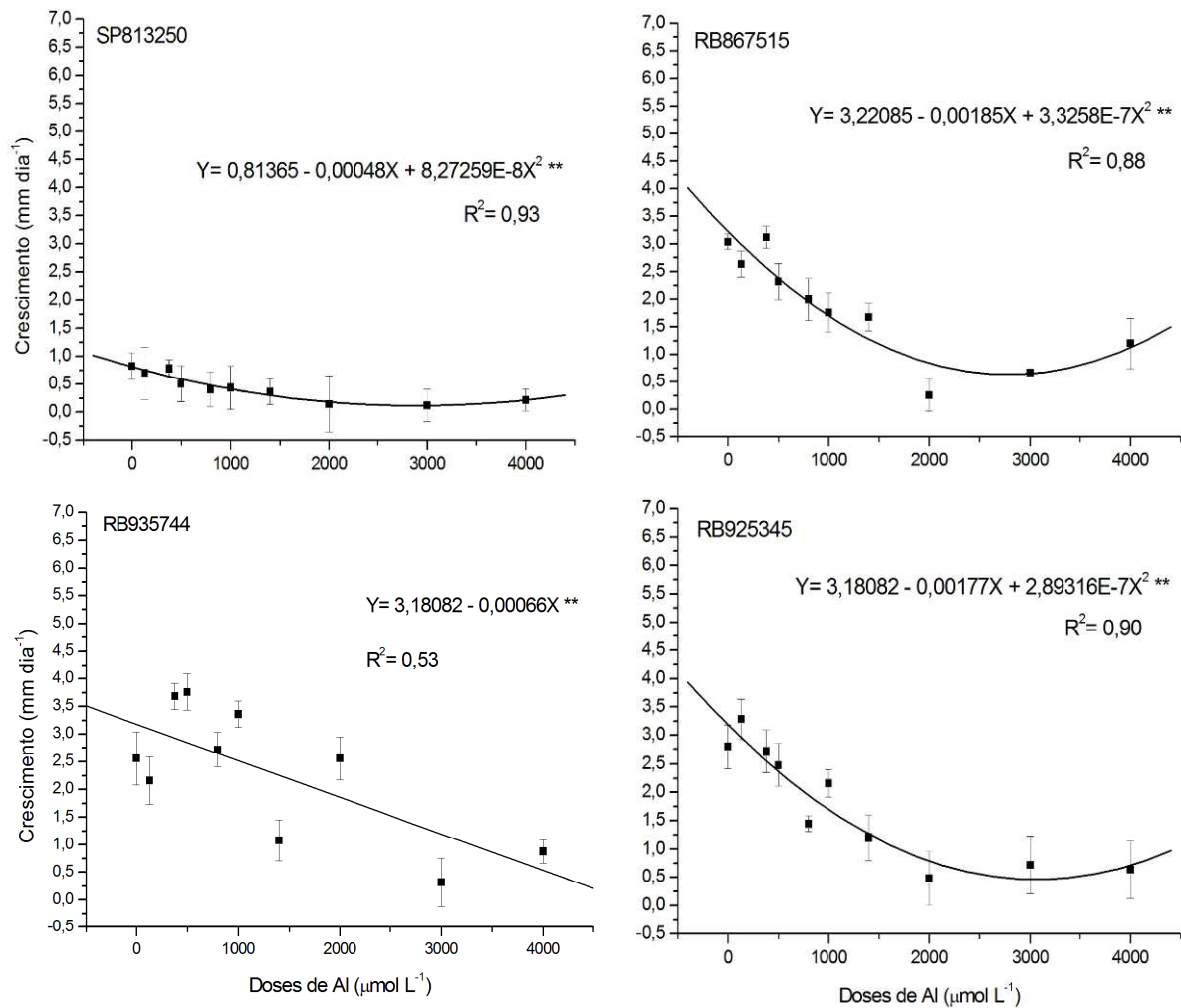
Apesar de a variedade RB937570 ter apresentado como crítica a primeira dose de Al (130  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), ela apresentou um alto crescimento radicular, juntamente com a variedade RB935744, cuja dose crítica foi de 1400  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Isso evidencia que, apesar de apresentar sensibilidade ao Al, sua TAR foi satisfatória principalmente quando comparada a de outras variedades que apresentaram doses críticas maiores. Dessa forma, apesar de a menor dose de Al ter prejudicado sua TAR, essa variedade apresenta a vantagem de possuir um sistema radicular eficiente, com capacidade de crescimento superior às outras, mesmo em presença do Al.

O comportamento das variedades de cana-de-açúcar perante a toxicidade por Al também foi avaliado com a aplicação de modelos de regressão (Figuras 15 e 16), os quais ratificaram que houve diminuição da taxa de crescimento com o aumento das doses de Al. Para as variedades RB935744, RB966828 e RB928064 o melhor ajuste correspondeu ao modelo linear, enquanto para as outras variedades o melhor ajuste foi o polinomial. As equações de regressão apresentaram coeficientes de determinação ( $R^2$ ) que variaram de 0,45 a 0,93, com significância estatística a 1 e 5%.

A inibição do alongamento radicular induzido pelo Al está associada com a deterioração da parede celular (MATSUMOTO; MOTODA, 2011). Como observado pela visualização dos ápices radiculares ao microscópio óptico, a inibição do crescimento radicular foi acompanhada por alterações morfológicas no ápice da raiz. Segundo Sasaki et al. (1996), essas alterações podem repercutir na diminuição no comprimento radicular juntamente com o aumento no diâmetro das células do córtex, resultando no encurtamento da zona de alongamento, além de rupturas da epiderme. Em alguns casos, a rizoderme pode aparentar ter se soltado do tecido interno (KOPITTKKE et al., 2008). Em raízes de soja, o tratamento com Al promoveu a alteração do crescimento radicular, da atividade e aparência dos ápices radiculares e da zona pilosa (YU et al., 2011).

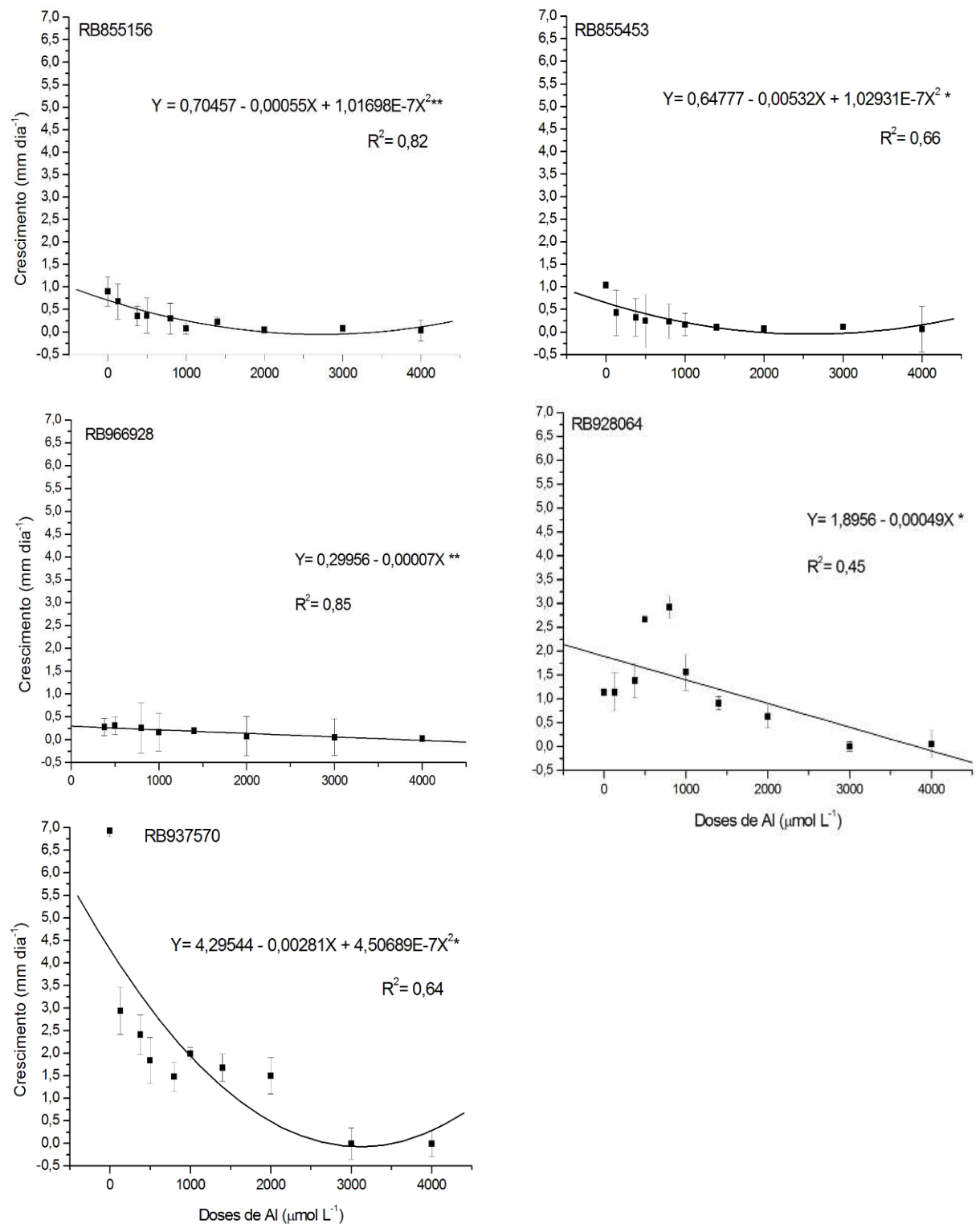
Hetherington et al. (1988) estudaram a toxicidade do Al em três variedades australianas de cana-de-açúcar, Q77, Q113 e Q117, amplamente cultivadas em solos ácidos da Austrália. Enquanto a variedade Q113 teve seu alongamento radicular reduzido a partir da concentração 80  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , as variedades Q77 e Q117 mostraram-se mais tolerantes, uma vez que essa redução aconteceu a partir da dose 320  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Al. Nesse contexto, as

variedades brasileiras, com exceção da RB937570, foram mais tolerantes ao Al em solução quando comparadas às variedades australianas, estudadas sob condições experimentais similares por Hetherington et al. (1988).



**Figura 15.** Ajuste polinomial/linear do crescimento radicular das variedades SP813250, RB867515, RB935744, RB925345, submetidas a doses crescentes de Al em solução.

\*\* significativo a 1% de probabilidade.



**Figura 16.** Ajuste polinomial/linear do crescimento radicular das variedades RB855156, RB855453, RB966928, RB928064, RB937570, submetidas a doses crescentes de Al em solução.

\*\* significativo a 1% de probabilidade; \* significativo a 5% de probabilidade.

Os resultados para a taxa de alongamento radicular das variedades estudadas, quando expostas a doses crescentes de Al, permitiram classificá-las quanto à tolerância da

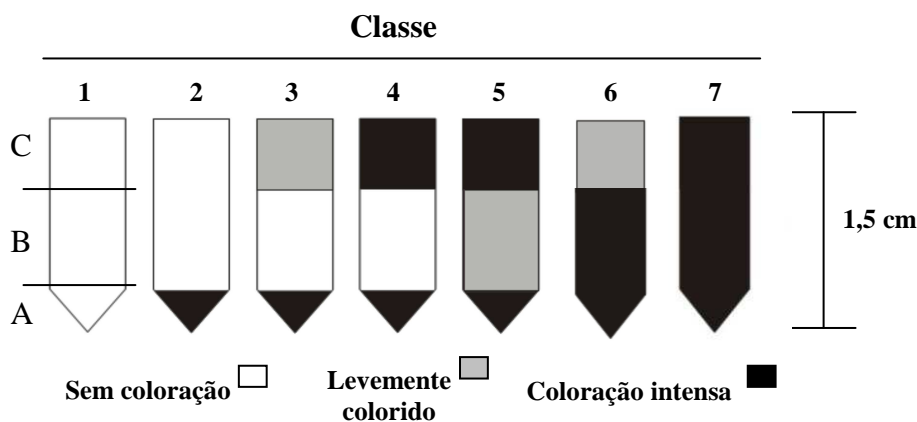
seguinte forma: RB928064 > RB935744 > RB855453 = RB966928 > RB925345 = RB867515 > SP813250 > RB855156 > RB937570.

### 4.3 Teste de coloração das raízes e alocação do Al nos tecidos radiculares

#### 4.3.1. Distinção da sensibilidade em classes de acúmulo de Al nos ápices radiculares

A escala usada por Braccini et al. (2000b) para plantas de cafeeiro (Figura 14), foi adaptada para a avaliação dos ápices radiculares de cana-de-açúcar. Após a observação dos resultados, foi necessária a inclusão de mais uma classe na avaliação da coloração (Figura 17).

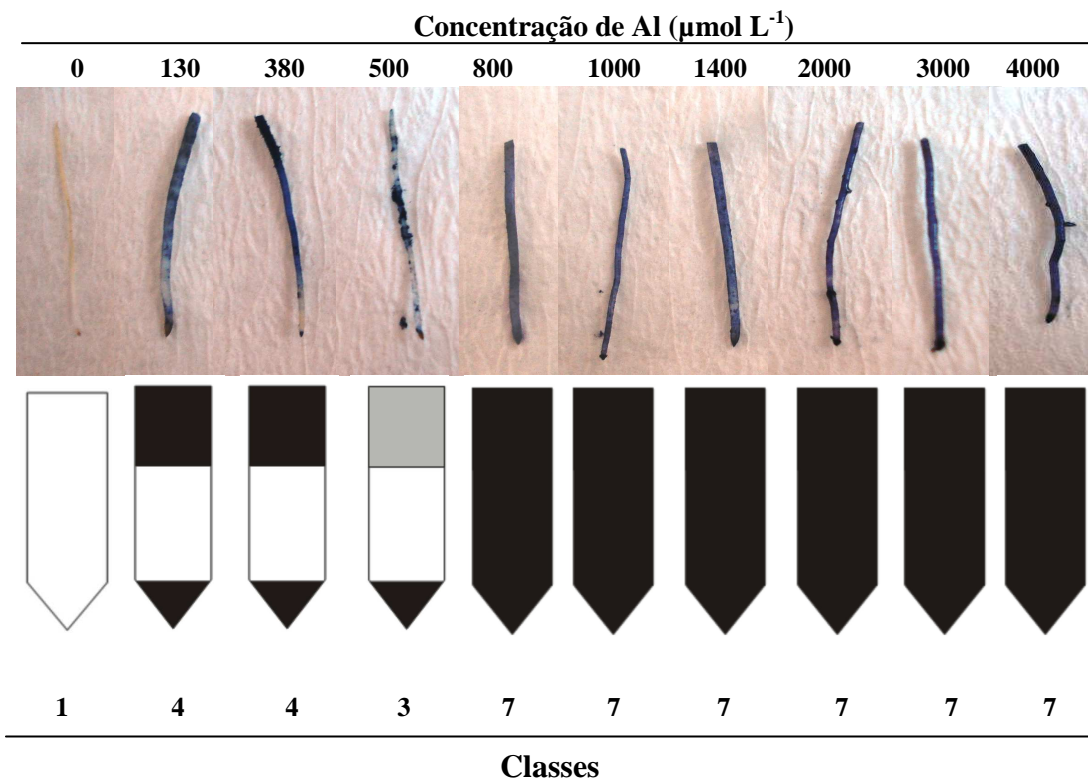
A Figura 17 demonstra as regiões utilizadas para interpretação da coloração pela hematoxilina. A região meristemática, localizada acima da coifa (Figura 17, região A), possui células em intensa divisão, sendo comumente denominada região de divisão celular (Figura 17, região B). Após a região de divisão celular, mas não muito bem delimitada desta, está a região de alongamento, que tem, em geral apenas poucos milímetros de comprimento (Figura 17, região B). Acima dessa região a raiz não cresce mais em comprimento. A região de alongamento é seguida pela região de maturação ou de diferenciação (Figura 17, região C), onde a maioria das células dos tecidos primários completa a sua maturação. É importante ressaltar que a transição de uma região da raiz para outra ocorre de maneira gradual (RAVEN et al., 2007).



**Figura 17.** Classes de acúmulo de Al em raízes, adaptadas para cana-de-açúcar, por meio do teste de coloração pela hematoxilina. (A). Coifa; (B). Meristema apical (região de divisão celular) e região de alongamento celular; (C). Região de maturação (região basal).

A partir da classe 5, a planta não apresenta mais o mecanismo de exclusão do Al, representado pelas zonas de exclusão possibilitadas pelo acúmulo de Al na região basal, como observado nas classes 3 e 4. Esse mecanismo está presente nas variedades mais tolerantes. Nas classes 5 até a 7, ocorre maior acúmulo de Al na região meristemática, sendo característica das variedades mais sensíveis, devido ao fato que o ápice radicular, onde se encontram as células meristemáticas, acumula mais Al e sofre maior dano físico que os tecidos maduros da raiz (RYAN et al., 1995).

A variedade RB928064 (Figura 18) excluiu o Al da sua região meristemática até a dose 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , mas, a partir da dose 800  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , apresentou acúmulo de Al em todo o ápice radicular, sendo classificada na classe 7.

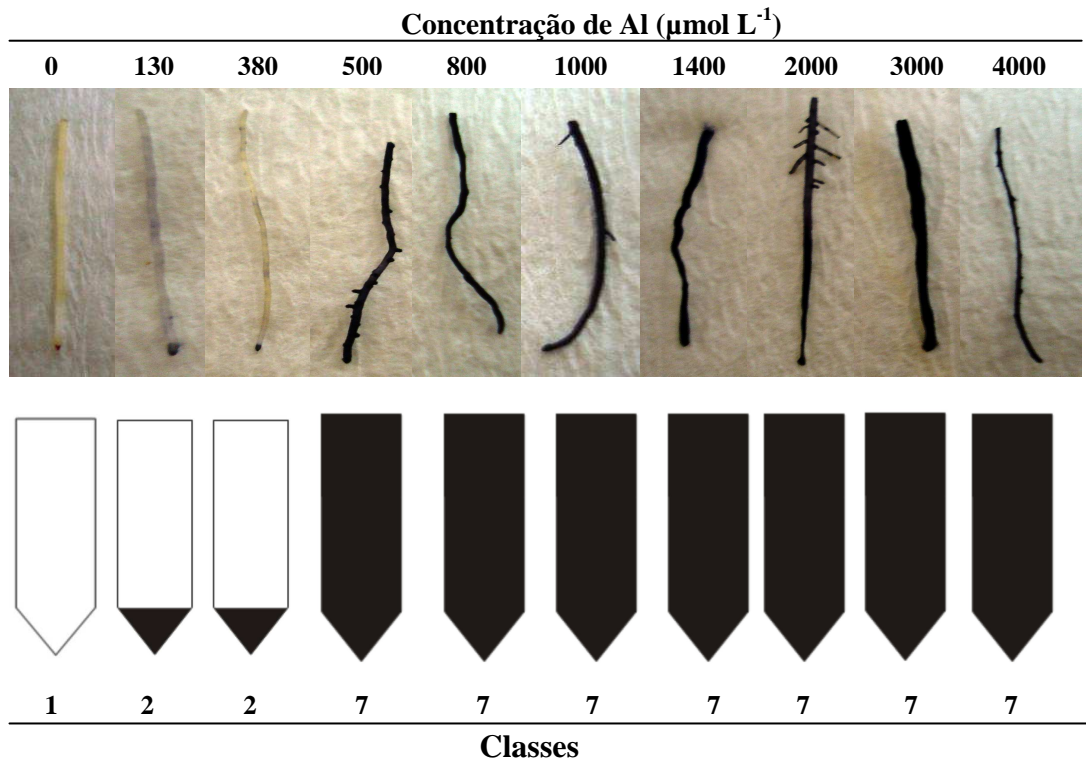


**Figura 18.** Ápices radiculares da variedade RB928064, submetidos a concentrações crescentes de Al em solução e ao corante indicador hematoxilina, e sua representação na escala de avaliação do acúmulo de Al adaptada de Braccini et al. (2000b).

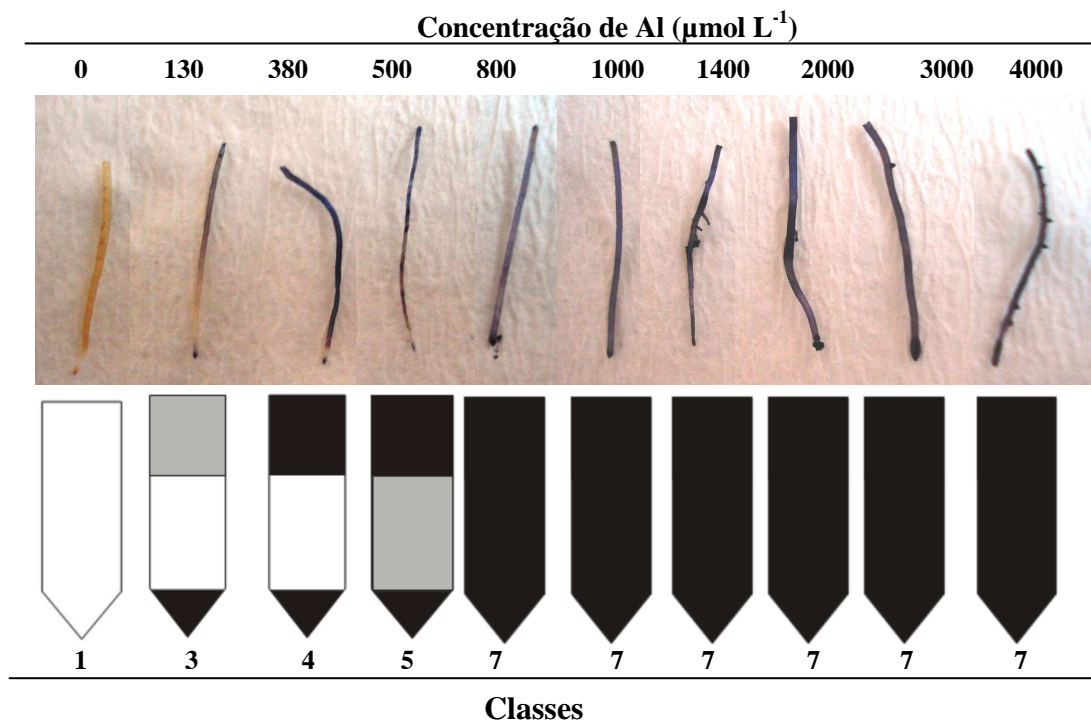
As variedades RB966928 (Figura 19), RB937570 (Figura 20) e RB855156 (Figura 21) excluíram o Al da região meristemática até a dose 380  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Embora a RB937570 tenha apresentado uma zona de exclusão muito pequena, ainda assim se encaixou na classe 4. Na dose 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , seu comportamento foi melhor representado pela classe 5, que, apesar de já ser indício de acúmulo de Al na região meristemática, esse ocorre em menor



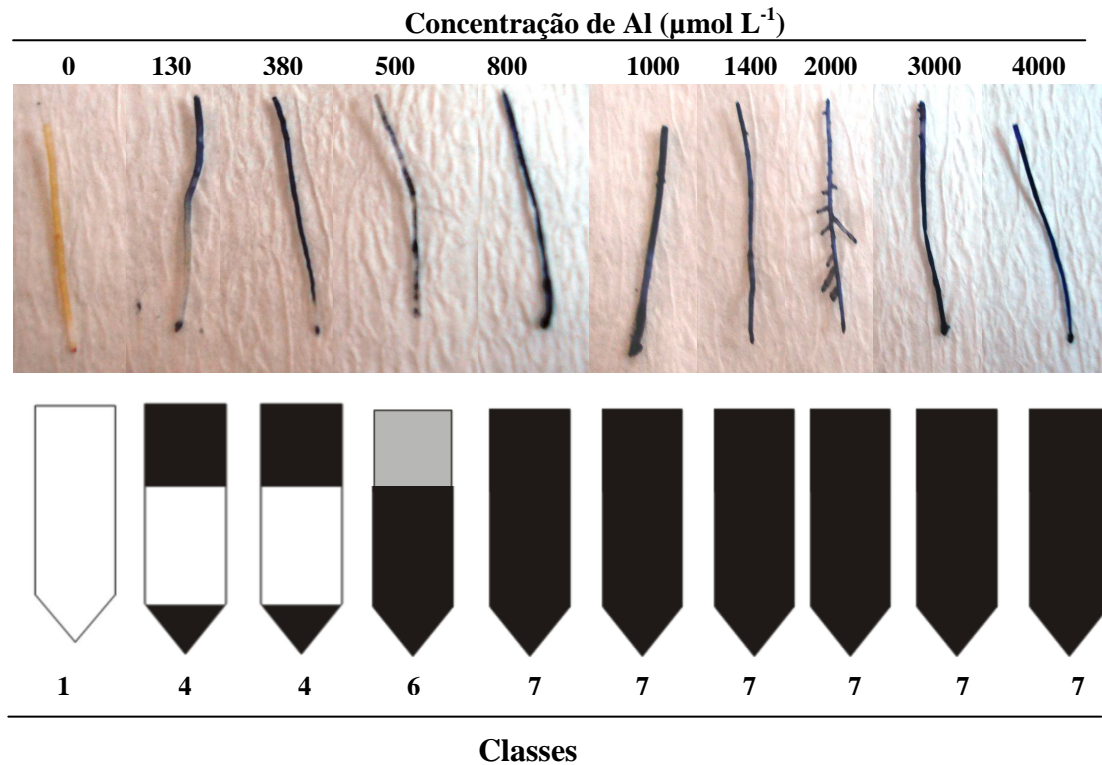
intensidade. A variedade RB966928 (Figura 19) apresentou comportamento classe 7 a partir da dose 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , o que representa um intenso acúmulo de Al em todo o ápice radicular.



**Figura 19.** Ápices radiculares da variedade RB966928, submetidos a concentrações crescentes de Al em solução e ao corante indicador hematoxilina, e sua representação na escala de avaliação do acúmulo de Al adaptada de Braccini et al. (2000b).



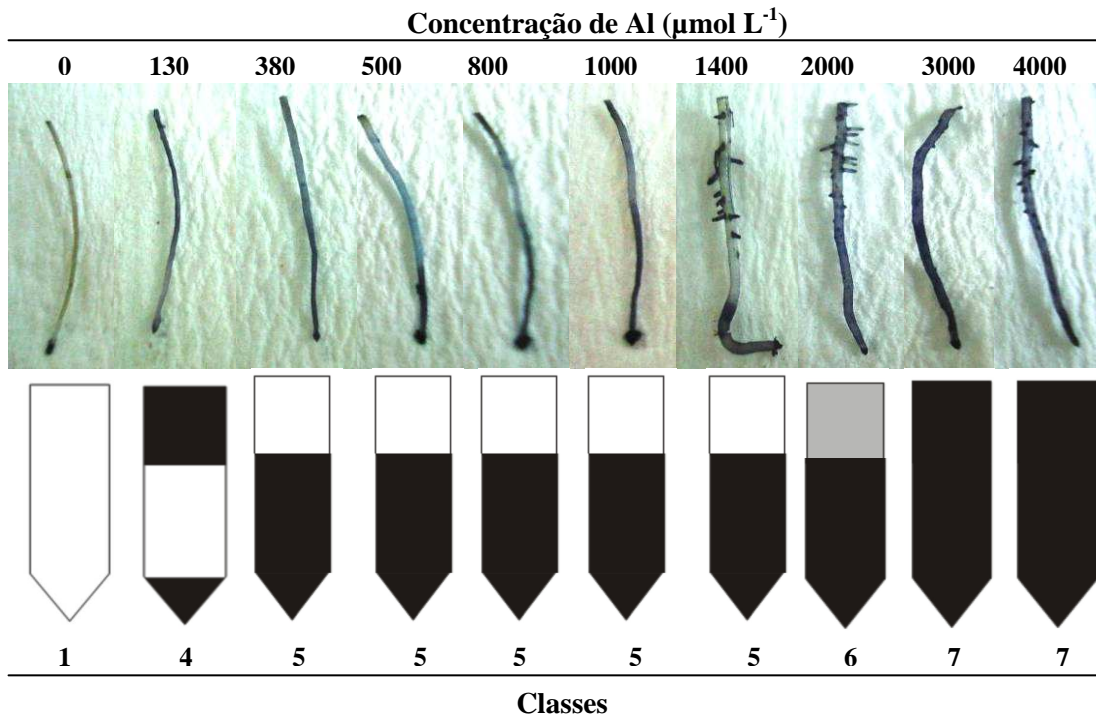
**Figura 20.** Ápices radiculares da variedade RB937570, submetidos a concentrações crescentes de Al em solução e ao corante indicador hematoxilina, e sua representação na escala de avaliação do acúmulo de Al adaptada de Braccini et al. (2000b).



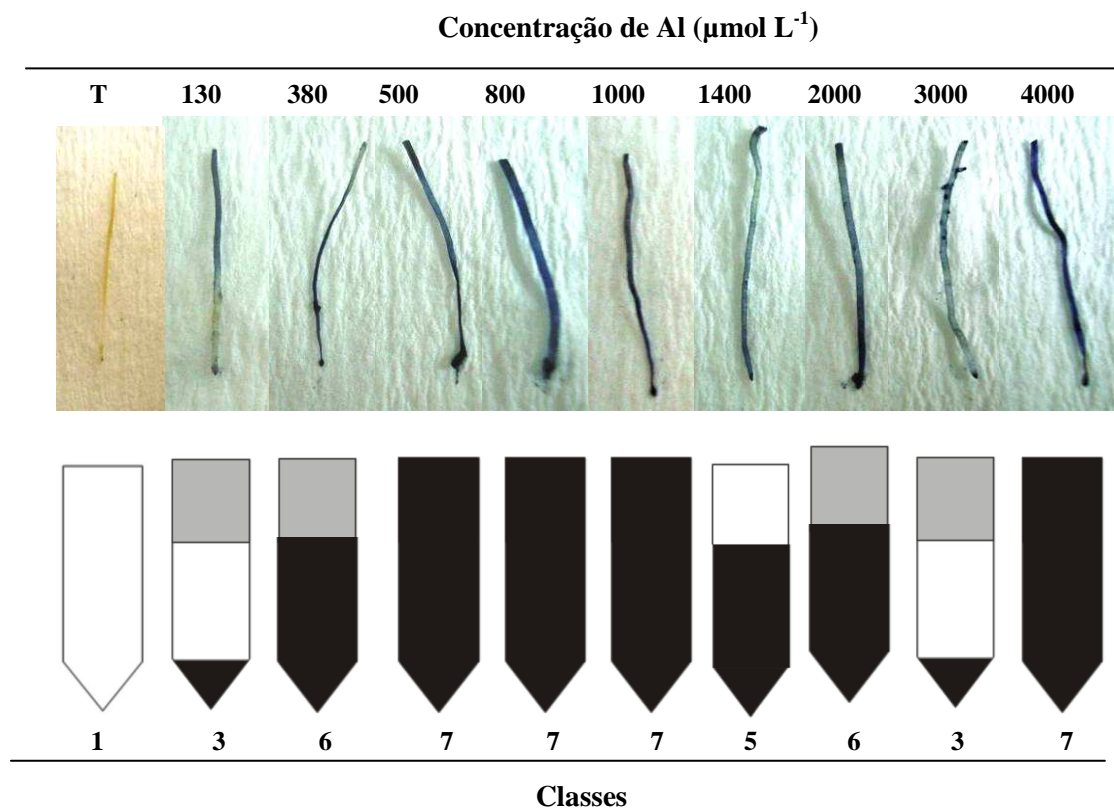
**Figura 21.** Ápices radiculares da variedade RB855156, submetidos a concentrações crescentes de Al em solução e ao corante indicador hematoxilina, e sua representação na escala de avaliação do acúmulo de Al adaptada de Braccini et al. (2000b).

A variedade RB867515 (Figura 22) apresentou-se sensível ao Al a partir da dose  $380 \mu\text{mol L}^{-1}$ , ocorrendo um maior acúmulo de Al na região meristemática. Na dose  $2000 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Al, ocorreu o acúmulo de Al em todo o ápice radicular, fato que se acentuou ainda mais nas doses subsequentes.

A variedade RB935744 (Figura 23) não apresentou um padrão crescente de intensidade da coloração. Notou-se que, na dose  $380 \mu\text{mol L}^{-1}$ , o Al já atingiu a região meristemática. Porém, na dose de  $3000 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Al, a planta foi capaz de impedir o Al de penetrar nessa região (classe 3). Essa falta de padrão dificulta a determinação de uma dose a partir da qual a variedade apresentou sensibilidade ao Al.



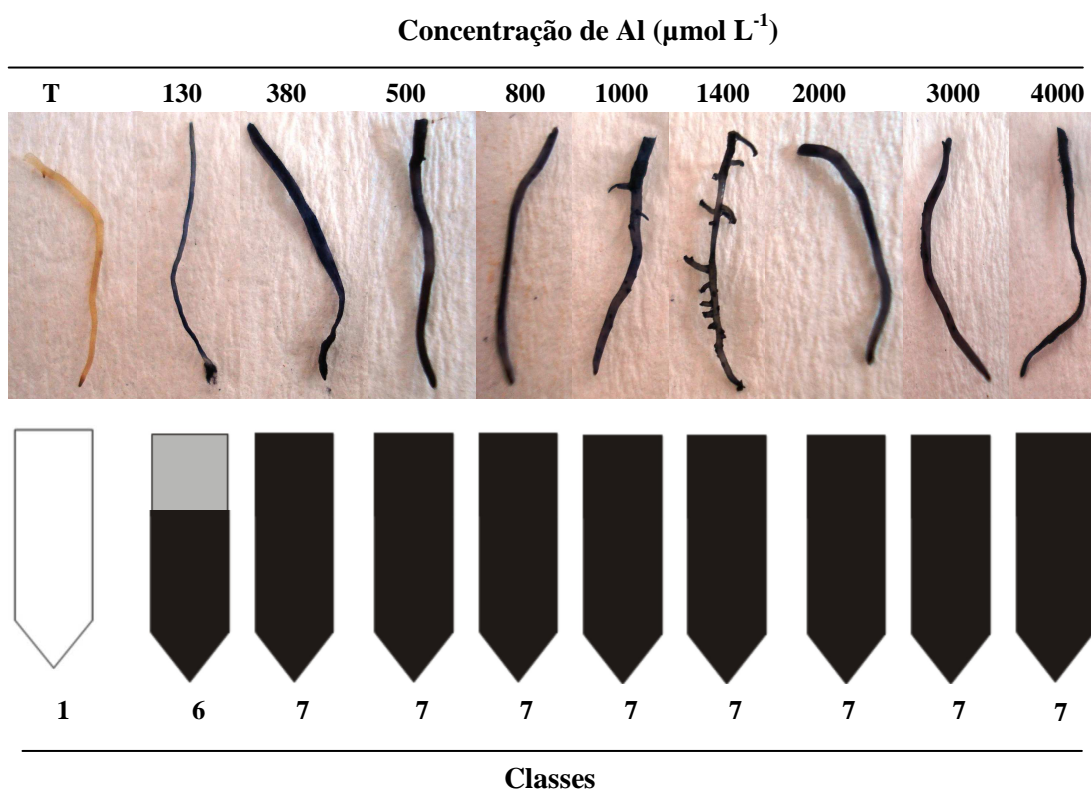
**Figura 22.** Ápices radiculares da variedade RB867515, submetidos a concentrações crescentes de Al em solução e ao corante indicador hematoxilina, e sua representação na escala de avaliação do acúmulo de Al adaptada de Braccini et al. (2000b).



**Figura 23.** Ápices radiculares da variedade RB935744, submetidos a concentrações crescentes de Al em solução e ao corante indicador hematoxilina, e sua representação na escala de avaliação do acúmulo de Al adaptada de Braccini et al. (2000b).

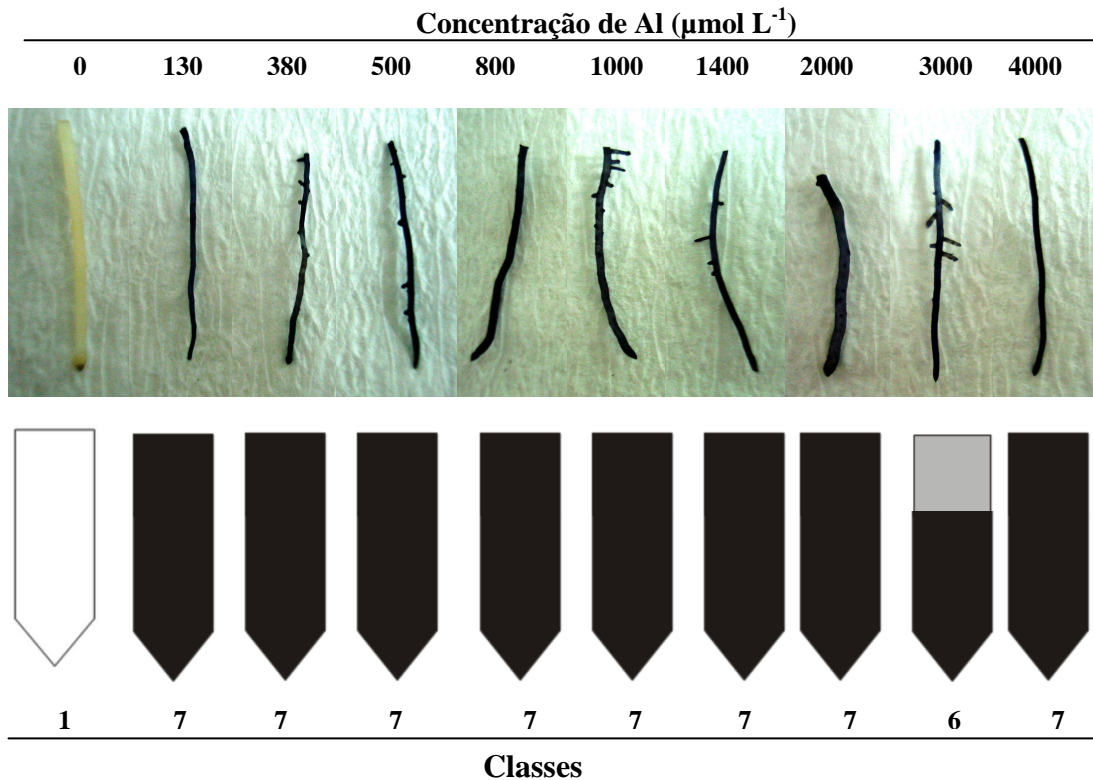
As variedades RB925345 (Figura 24), RB855453 (Figura 25) e SP813250 (Figura 26) apresentaram alta sensibilidade ao Al, pois ocorreu maior acúmulo de Al na região meristemática em comparação com as variedades anteriores, além de não apresentarem mecanismo de exclusão em nenhuma concentração de Al. Enquanto a RB925345 foi classificada com a nota 7 a partir da dose 380  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em diante, a RB855453 e SP813250 se enquadraram nessa classe já partir da dose 130  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

Após 72 horas de exposição ao Al, Giannakoula et al. (2010), em trabalho com genótipos de milho, observaram que as raízes do Al-sensível acumularam 1,5-3,2 vezes mais Al do que o Al-tolerante. Contudo, há uma grande variação genética na resistência das plantas ao Al, tanto dentro como entre espécies, sugerindo que as plantas, cultivares ou espécies Al-tolerantes possuem vários mecanismos para desintoxicar Al. Os mesmos autores discutiram que parece existir um mecanismo de exclusão de alguns genótipos de milho, devido a diferença de Al acumulado entre os genótipos sensível e tolerante. Porém, a exclusão não pode ser considerada o principal mecanismo de resistência que opera em raízes de milho, uma vez que o acúmulo de Al no Al-tolerante foi quase 90 vezes maior do que no controle.

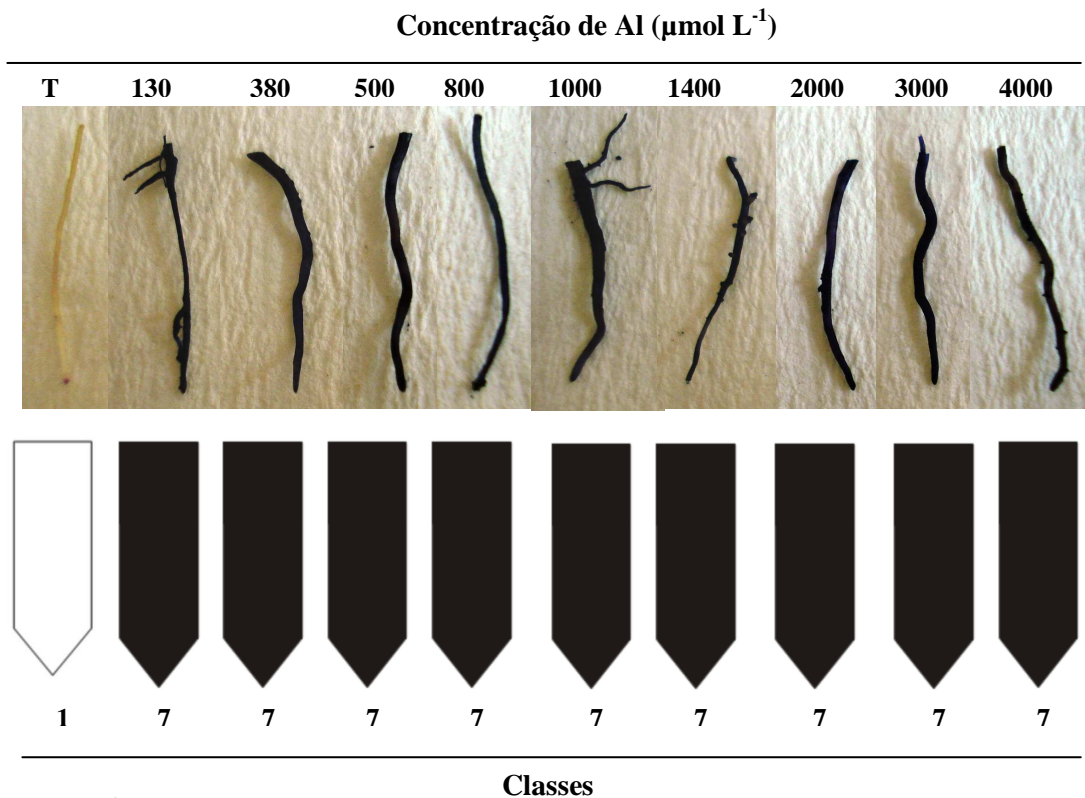


**Figura 24.** Ápices radiculares da variedade RB925345, submetidos a concentrações crescentes de Al em solução e ao corante indicador hematoxilina, e sua representação na escala de avaliação do acúmulo de Al adaptada de Braccini et al. (2000b).





**Figura 25.** Ápices radiculares da variedade RB855453, submetidos a concentrações crescentes de Al em solução e ao corante indicador hematoxilina, e sua representação na escala de avaliação do acúmulo de Al adaptada de Braccini et al. (2000b).



**Figura 26.** Ápices radiculares da variedade SP813250, submetidos a concentrações crescentes de Al em solução e ao corante indicador hematoxilina, e sua representação na escala de avaliação do acúmulo de Al adaptada de Braccini et al. (2000b).

Braccini et al. (2000b) salientaram que a análise isolada da coloração com hematoxilina não deve ser considerada adequada para seleção de genótipos de café tolerantes ao Al, porque o resultado depende dos mecanismos de tolerância envolvidos. Uma falha do método pode ocorrer quando um genótipo apresente um mecanismo de tolerância relacionado com a detoxificação. Esse mecanismo permite que o Al penetre nos tecidos radiculares, porém, internamente ocorre a detoxificação do Al, ou seja, ele perde sua ação tóxica. Dessa forma, um genótipo tolerante pode acumular muito Al no ápice radicular, o que resultaria em uma coloração intensa pela hematoxilina, e com isso ele seria classificado como sensível pelo teste. Nesse mecanismo de tolerância, mesmo que a planta absorva altas concentrações de Al e este seja transportado pelos vasos condutores, a planta não sofrerá injúrias devido a prováveis mecanismos de detoxificação do Al, tais como a quelatação por ácidos orgânicos ou compartimentalização no vacúolo.

Dessa forma, a separação dos genótipos em sensíveis ou tolerantes através da classificação em classes após a coloração com hematoxilina, só será eficiente se a planta apresentar a exclusão do Al como único mecanismo de tolerância. Esse mecanismo interrompe o fluxo de Al na endoderme, restringe sua presença apenas no córtex e impede sua chegada aos vasos condutores para ser transportado pela planta. Yang et al. (2008) salientaram que, apesar dos progressos obtidos, os mecanismos de exclusão das espécies mais resistentes ao Al ainda estão longe de serem bem entendidos. Contudo, a exclusão de Al do ápice radicular é uma característica importante e diferencial de resistência ao Al (GARZON et al., 2011).

Em plântulas de trigo, quanto maior a intensidade da coloração dos ápices radiculares, menor o grau de tolerância dos genótipos ao Al (POLLE et al., 1978). Outros trabalhos utilizando gramíneas (GIAVENO; MIRANDA-FILHO, 2000; CANÇADO et al., 2002) descreveram que o uso de classes de sensibilidade para classificação dos genótipos quanto à tolerância ao Al foi eficiente para experimentos com e sem Al. Em raízes de milho, o genótipo sensível apresentou maior coloração por hematoxilina nas pontas das raízes do que as variedades tolerantes (POSCHENRIEDER et al., 2005).

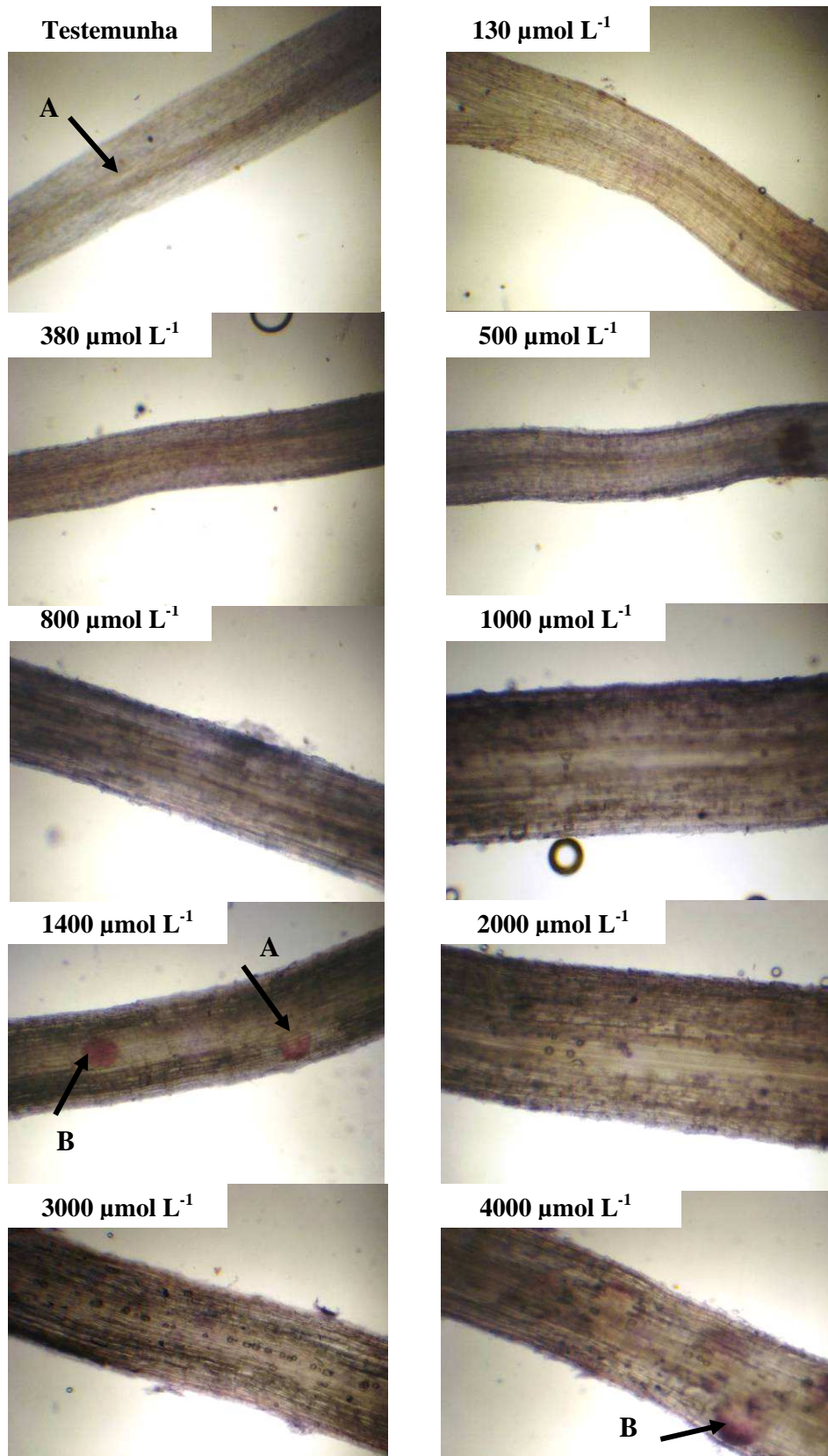
O uso do método da hematoxilina possibilitou visualizar diferenças de comportamento entre as variedades estudadas. Utilizando as notas atribuídas à coloração por hematoxilina a classificação das variedades quanto a tolerância ao Al foi a seguinte: RB928064 > RB966928 > RB937570 > RB855156 > RB867515 > RB935744 > RB925345 > RB855453 = SP813250. Contudo, concordando com Braccini et al. (2000), a classificação das variedades será feita utilizando-se um conjunto mais amplo de critérios de avaliação.

### 4.3.2. Identificação do acúmulo do Al nas células radiculares dos mini-toletes de cana-de-açúcar

Em raízes de cana-de-açúcar expostas por seis dias em doses crescentes de Al, observou-se que, em todas as variedades estudadas, quando submetidas ao corante hematoxilina, o Al localizou-se preferencialmente nas células epidérmicas e em várias camadas de células do córtex, em maior ou menor intensidade. Apesar de em algumas visualizações não ser possível observar com clareza se há coloração arroxeadada no interior do câmbio vascular, na maioria das fotos ficou claro que não há a indicação da hematoxilina reagindo com o Al no interior dos vasos condutores.

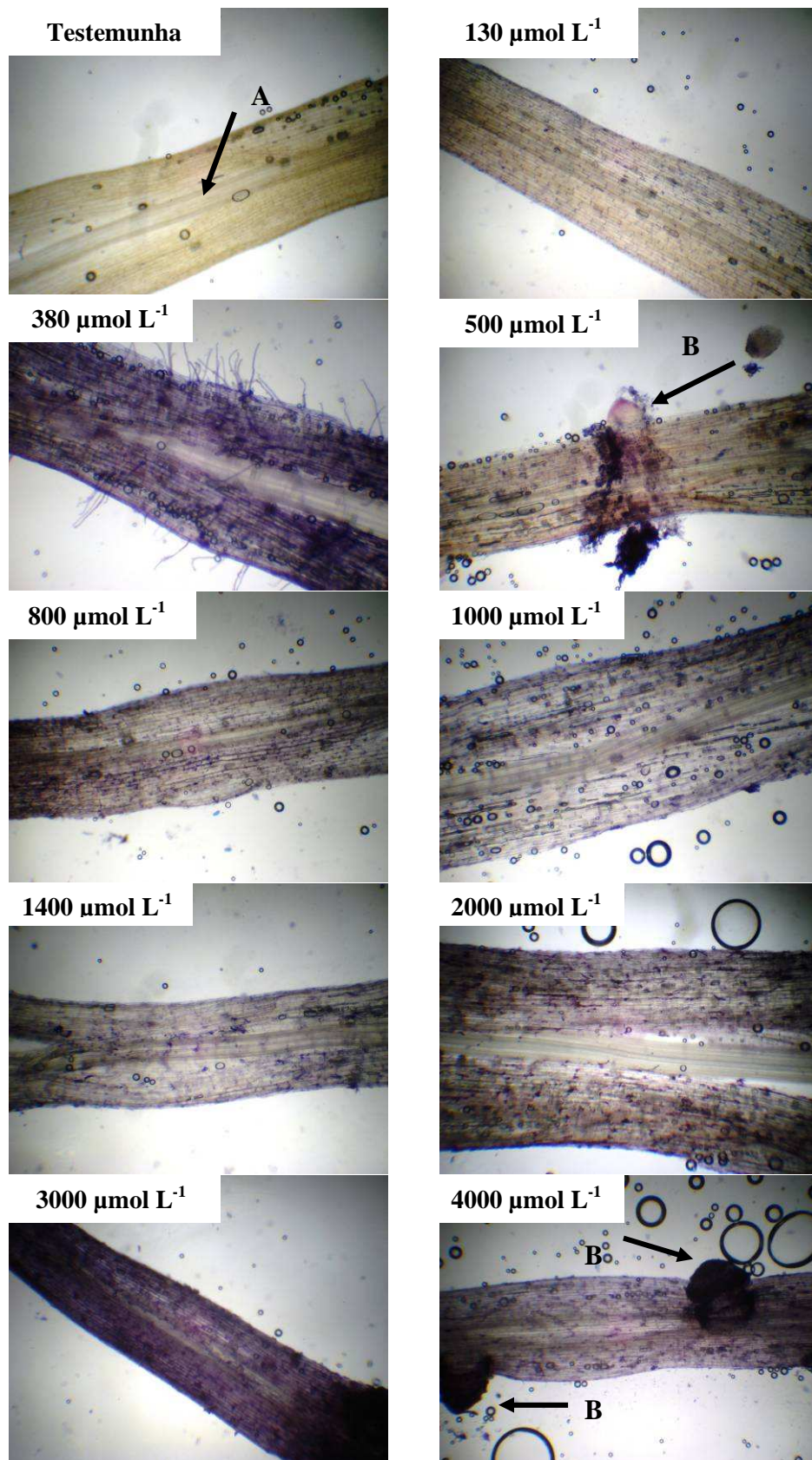
Na variedade RB935744 (Figura 27), o Al localizou-se preferencialmente nas células epidérmicas, sendo sua presença observada em pequena quantidade nas células do córtex. A variedade RB937570 (Figura 28) apresentou a mesma tendência, mas a partir da dose 2000  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ocorreu a presença do Al em maior quantidade nas células do córtex. Para a variedade SP813250 (Figura 29), e RB855453 (Figura 30) o Al se acumulou em maior quantidade tanto nas células epidérmicas, quanto nas células do córtex, fato que ficou evidenciado pela forte coloração presente já a partir da dose 130  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . A variedade RB966928 (Figura 31) mostrou coloração intermediária na dose 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , a qual se intensificou a partir da dose 2000  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . As variedades RB867515 (Figura 32), RB925345 (Figura 33), RB855156 (Figura 34) e RB928064 (Figura 35) apresentaram uma coloração intermediária, apesar de na dose 130  $\mu\text{mol L}^{-1}$  já ocorrer a presença do Al nas células do córtex.

Em raízes de cafeeiro, o Al se localizou apenas nas células epidérmicas em genótipo tolerante, enquanto que em genótipo com tolerância intermediária, o Al foi observado também em várias camadas de células do córtex (BRACCINI et al., 2000b). Fato semelhante foi observado em raízes de plantas de aveia, ou seja, no genótipo tolerante a maior parte do Al ficou retida na epiderme das células da raiz, enquanto no genótipo sensível o Al foi encontrado também nas células do córtex e do sistema vascular (CASTILHOS, 2010). Em genótipos quase isogênicos de trigo (muito semelhantes geneticamente), mas que diferem em tolerância ao Al, ápices dos Al-sensíveis apresentaram coloração por hematoxilina mais intensa que os Al-tolerantes (RYAN et al., 1993).

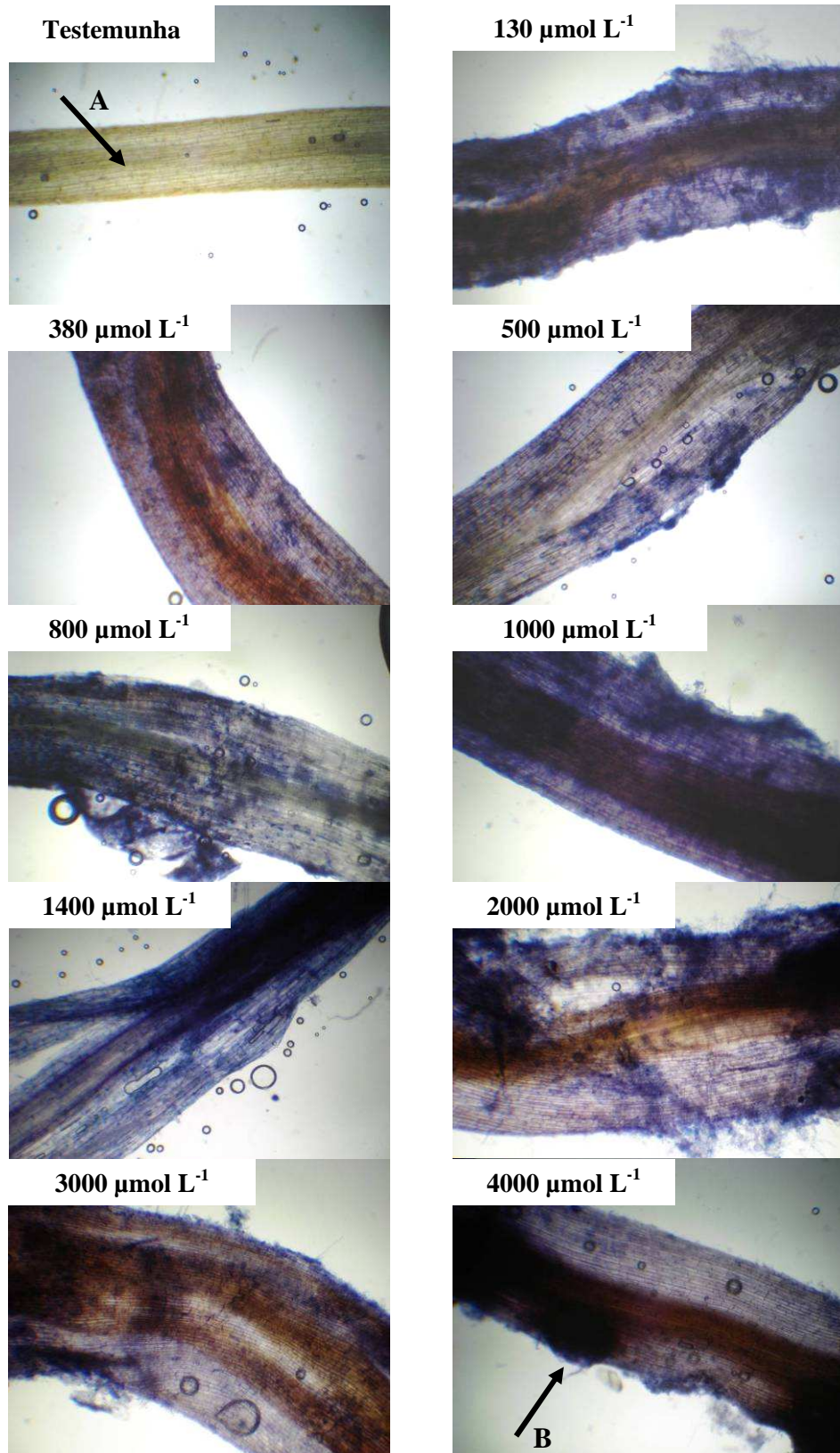


**Figura 27.** Parte do ápice radicular da variedade RB935744 exposto a doses crescentes de Al por seis dias, posteriormente coloridos com hematoxilina e observados ao microscópio óptico em aumento de 40x. (A). Vasos condutores; (B). Início da emissão de raízes laterais.



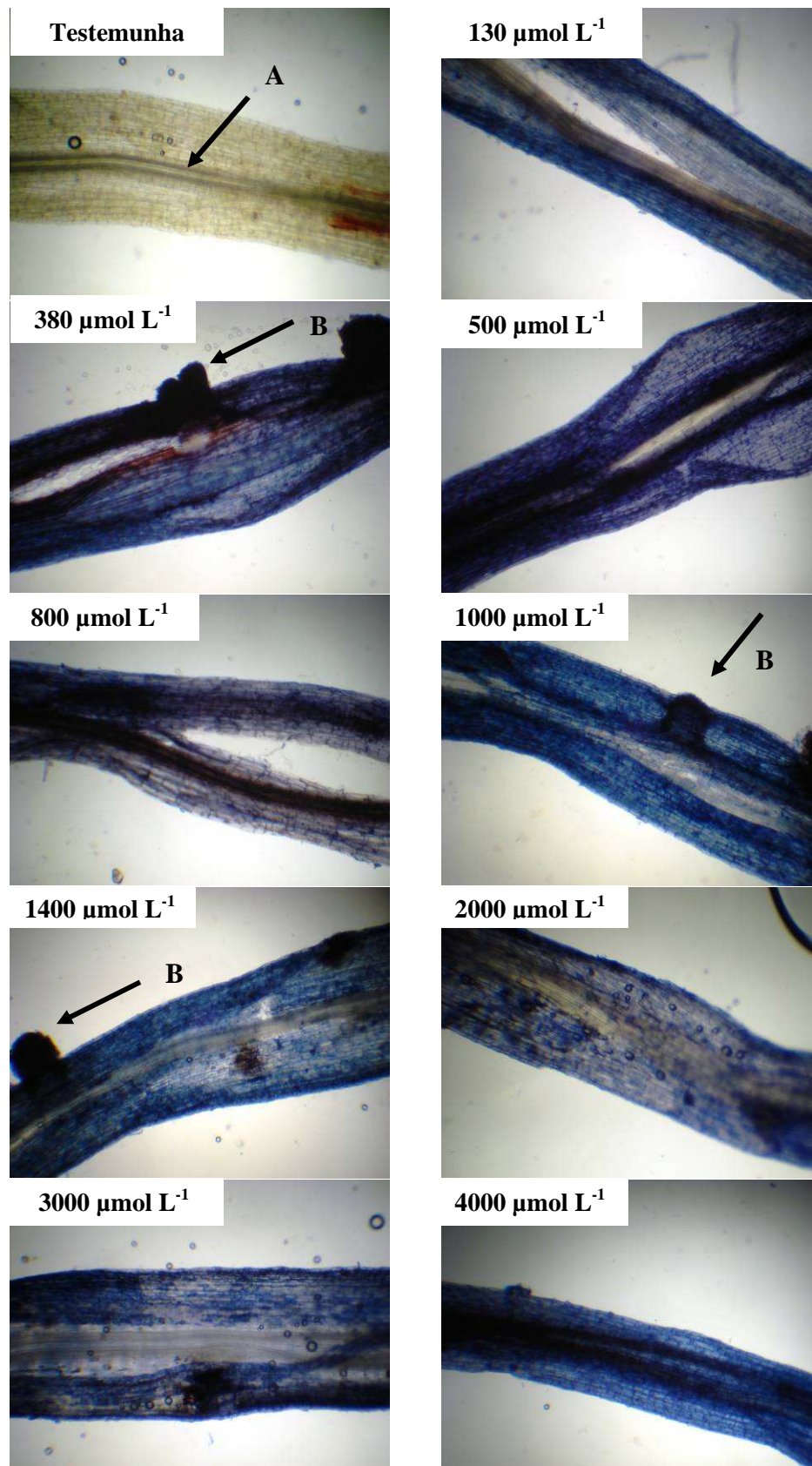


**Figura 28.** Parte do ápice radicular da variedade RB937570 exposto a doses crescentes de Al por seis dias, posteriormente coloridos com hematoxilina e observados ao microscópio óptico em aumento de 40x. (A). Vasos condutores; (B). Início da emissão de raízes laterais.

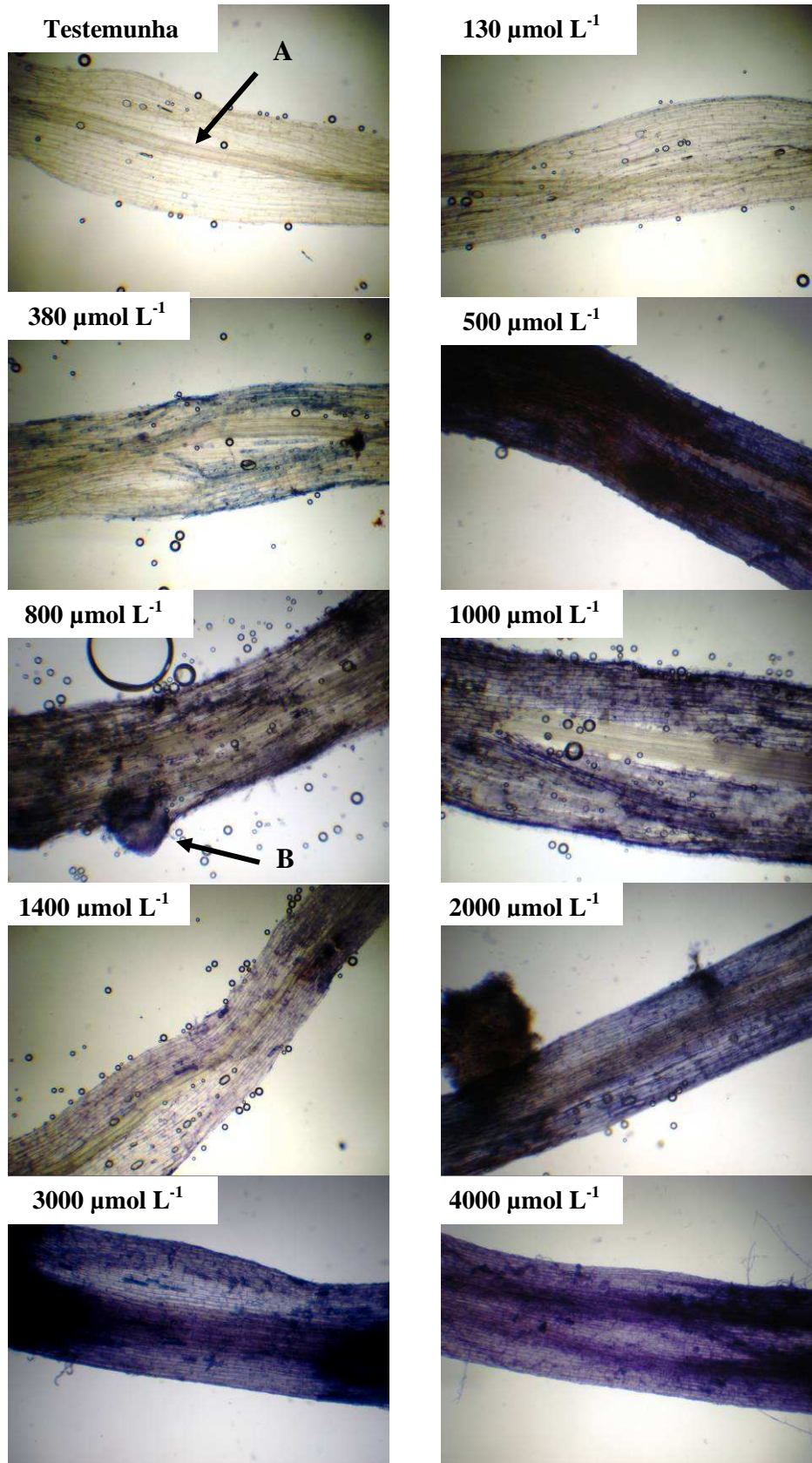


**Figura 29.** Parte do ápice radicular da variedade SP813250 exposto a doses crescentes de Al por seis dias, posteriormente coloridos com hematoxilina e observados ao microscópio óptico em aumento de 40x. (A). Vasos condutores; (B). Início da emissão de raízes laterais.



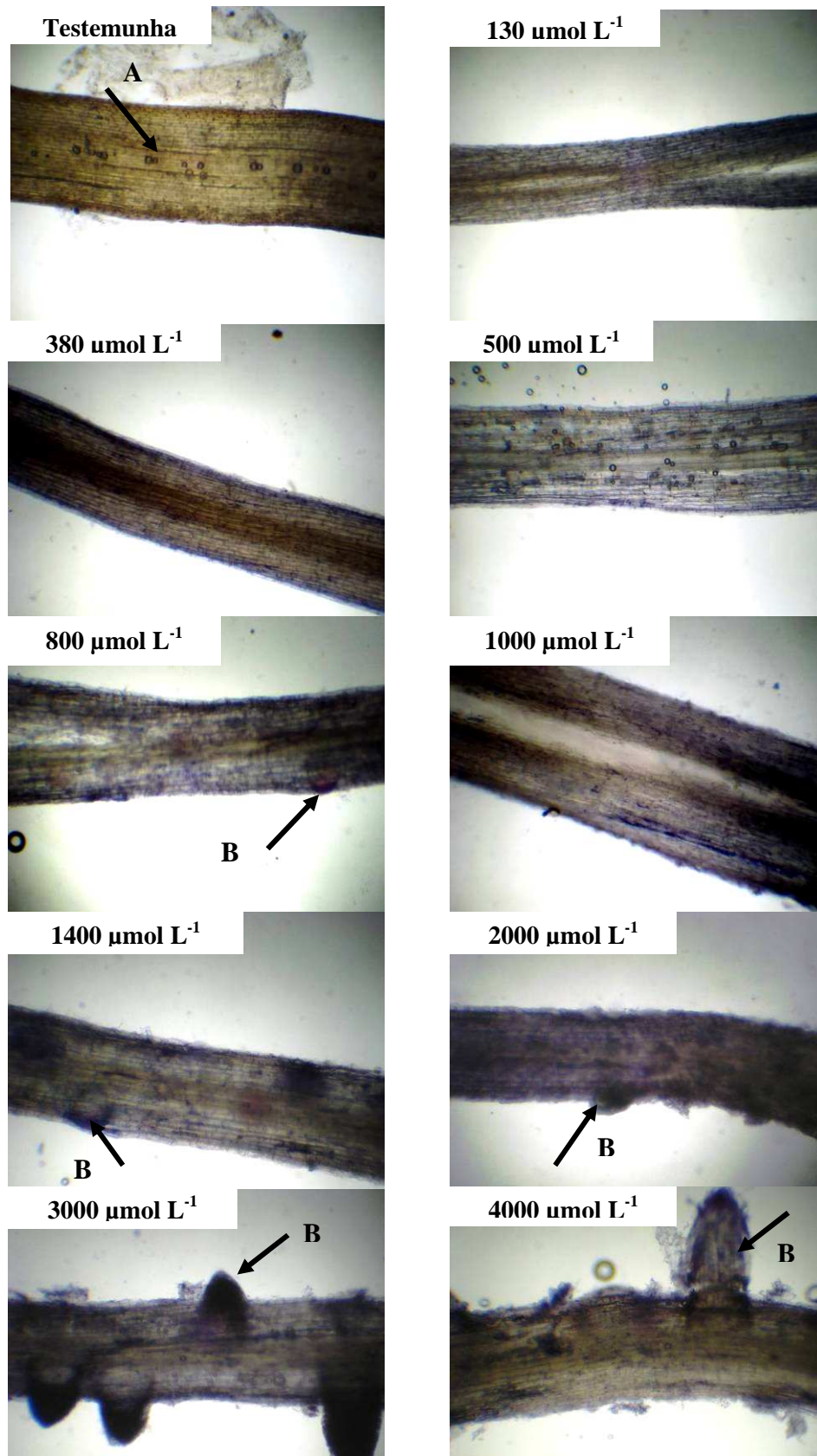


**Figura 30.** Parte do ápice radicular da variedade RB855453 exposto a doses crescentes de Al por seis dias, posteriormente coloridos com hematoxilina e observados ao microscópio óptico em aumento de 40x. (A). Vasos condutores; (B). Início da emissão de raízes laterais.

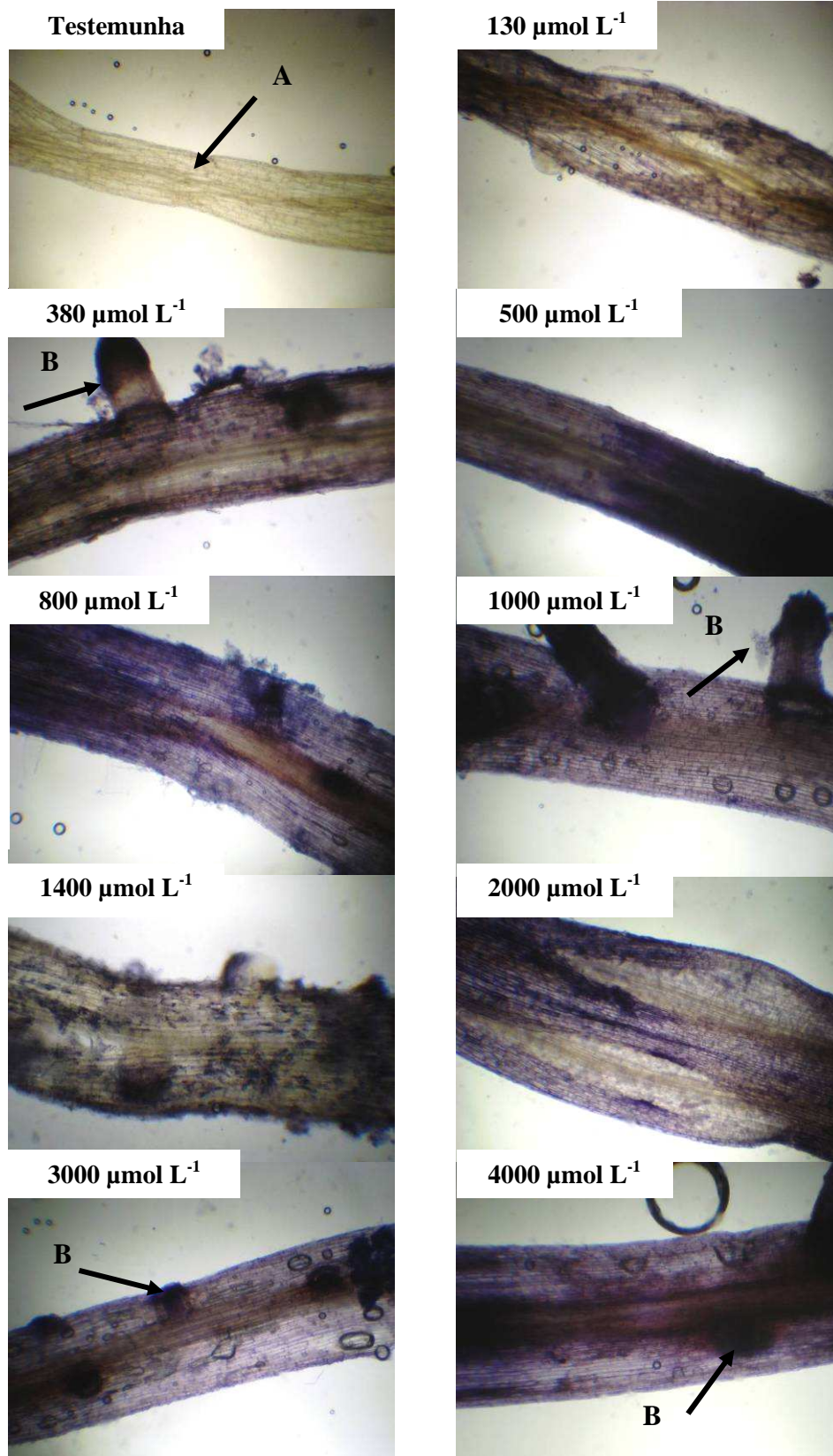


**Figura 31.** Parte do ápice radicular da variedade RB966928 exposto a doses crescentes de Al por seis dias, posteriormente coloridos com hematoxilina e observados ao microscópio óptico em aumento de 40x. (A). Vasos condutores; (B). Início da emissão de raízes laterais.



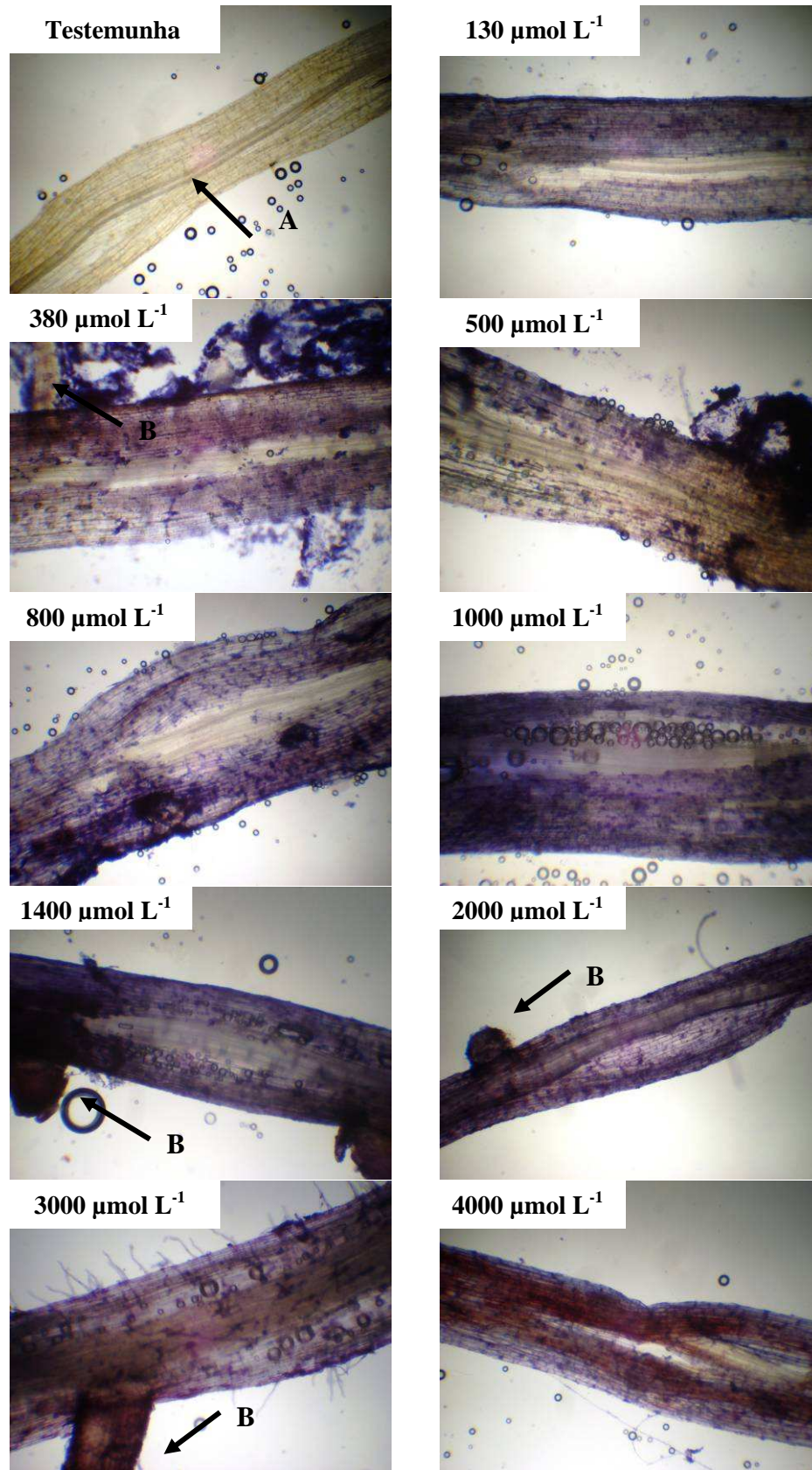


**Figura 32.** Parte do ápice radicular da variedade RB867515 exposto a doses crescentes de Al por seis dias, posteriormente coloridos com hematoxilina e observados ao microscópio óptico em aumento de 40x. (A). Vasos condutores; (B). Início da emissão de raízes laterais.

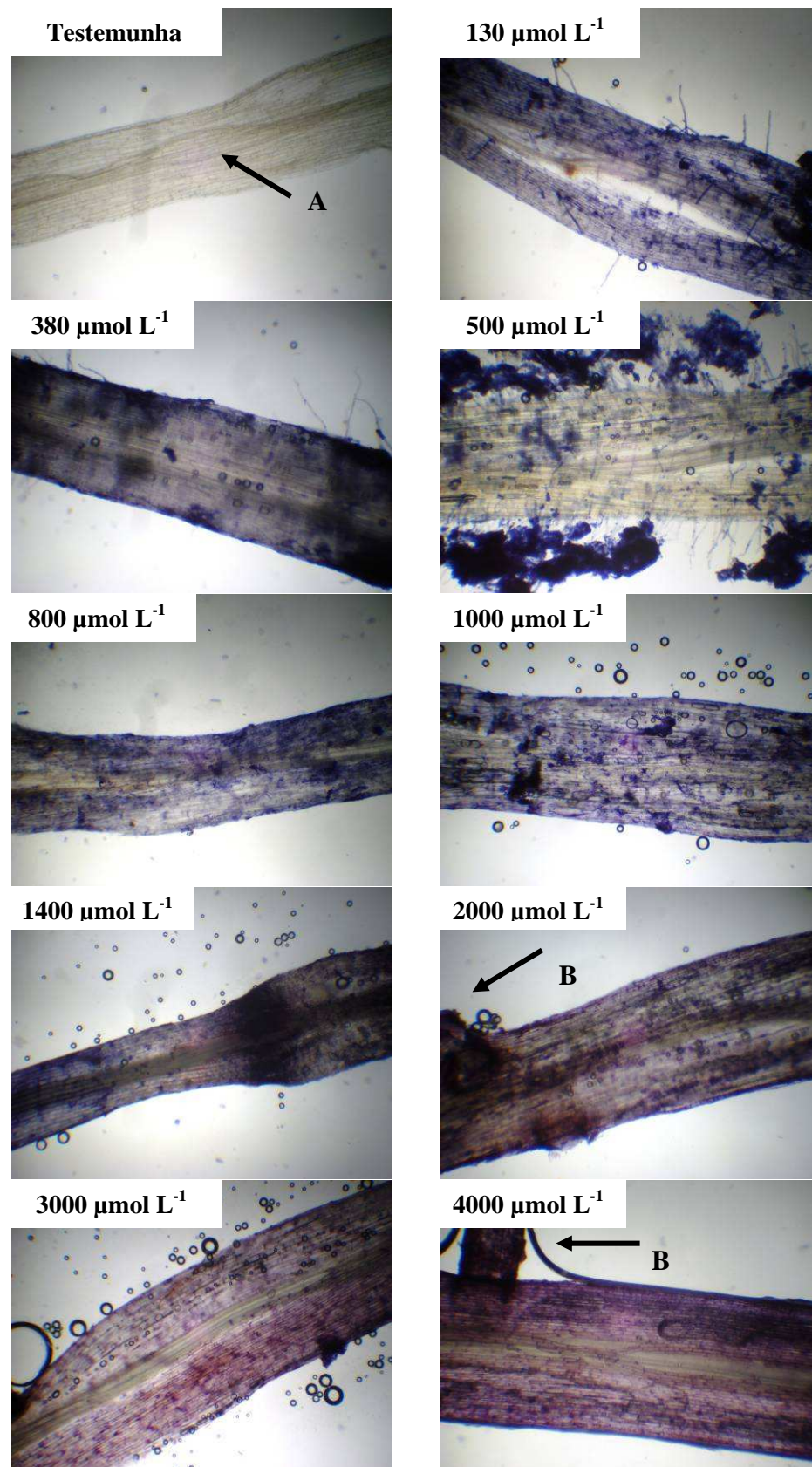


**Figura 33.** Parte do ápice radicular da variedade RB925345 exposto a doses crescentes de Al por seis dias, posteriormente coloridos com hematoxilina e observados ao microscópio óptico em aumento de 40x. (A). Vasos condutores; (B). Início da emissão de raízes laterais.





**Figura 34.** Parte do ápice radicular da variedade RB855156 exposto a doses crescentes de Al por seis dias, posteriormente coloridos com hematoxilina e observados ao microscópio óptico em aumento de 40x. (A). Vasos condutores; (B). Início da emissão de raízes laterais.



**Figura 35.** Parte do ápice radicular da variedade RB928064 exposto a doses crescentes de Al por seis dias, posteriormente coloridos com hematoxilina e observados ao microscópio óptico em aumento de 40x. (A). Vasos condutores; (B). Início da emissão de raízes laterais.



O primeiro contato do Al com a planta se dá 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, como a crescente rigidez (MOHANTY et al., 2004), a redução da extensibilidade (MA et al., 2004) e a alteração da composição de polissacarídeos da parede celular (YANG et al., 2008). Segundo Zhao et al. (1987), o  $Al^{3+}$  pode alterar as propriedades das membranas plasmática e vacuolar resultando numa diminuição da permeabilidade para a água. Com isso o Al não só impede o crescimento das raízes existentes e o surgimento de novas, como também afeta a permeabilidade das células das raízes já existentes. Se a água, e conseqüentemente os nutrientes, não entram na célula, a planta fica mais suscetível ao estresse hídrico e utiliza de maneira pouco eficiente a disponibilidade de nutrientes. Outros sintomas da ação tóxica do Al são a perda de camadas celulares periféricas e degeneração do citoplasma (McQUATTIE; SCHIER, 1990).

Quando o Al penetra nas células, os danos ocorrem também no simplasto (BARCELÓ; POSCHENRIEDER, 2002; KOCHIAN et al., 2002; DONCHEVA et al., 2005). O movimento via simplasto permite a entrada de solutos no interior das células de modo ativo ou passivo, dependendo do elemento. Dentro do citoplasma, os solutos são levados juntamente com a água para o feixe vascular central, onde sairão do interior das células para os vasos do xilema. Contudo, para atingir os vasos condutores, o Al precisa passar pela endoderme. Esta camada mais interna do córtex apresenta um poderoso reforço de suberina e/ou lignina, que dificulta as trocas metabólicas entre o córtex e o cilindro central. Ela atua como uma barreira que determina o transporte ativo dos solutos para dentro das células. Algumas células, contudo, não apresentam tais reforços, sendo denominadas de células de passagem, permitindo a permuta de substâncias nutritivas (RAVEN et al., 2007). Para atingir os vasos condutores, o Al precisa ser transportado de modo ativo, uma vez que dificilmente o Al penetra no espaço livre das células das raízes devido ao diâmetro dos poros serem muito estreitos para sua passagem (MACHADO, 1997).

No entanto, métodos mais avançados de detecção de Al dentro das células mostraram que o Al pode entrar na via simplástica dentro de alguns minutos (VÁZQUEZ et al., 1999; TAYLOR et al., 2000; BRAUER, 2001). Silva et al. (2000), detectaram Al em núcleos de células meristemáticas da raiz de plantas de soja sensíveis ao Al, depois de apenas 30 minutos de exposição, mesmo em baixa atividade de  $Al^{3+}$ . Entretanto, ainda não há

conhecimento sobre os mecanismos e as espécies químicas pelo qual o Al pode atravessar a membrana plasmática (POSCHENRIEDER et al., 2008).

Na maioria das observações dos ápices radiculares das variedades de cana-de-açúcar corados com hematoxilina, ficou claro que o interior dos vasos condutores não estão corados com hematoxilina. Isso indicou que não houve a atuação desse mecanismo de transporte ativo do Al para dentro do cilindro central. Mesmo podendo estar presente na via simplástica, o Al foi interceptado pela endoderme, que o impediu de penetrar nos vasos condutores e ser distribuído para a planta.

O fracionamento de Al em frações simplástica 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 a 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 de endoderme pode envolver mecanismos de controle de acumulação de Al no genótipo tolerante.

As variedades RB935744 (Figura 27) e RB937570 (Figura 28) apresentaram menor intensidade de coloração, indicando menor interação da hematoxilina com o Al. A mesma observação foi feita por Braccini et al. (2000b), em que o genótipo de cafeeiro tolerante apresentou menor formação do complexo Al-hematoxilina. Segundo Massot et al. (1991) e Kochian (1995), o menor grau de reação da hematoxilina com o Al pode estar relacionada com mudanças químicas que ocorreram no ápice radicular, como por exemplo as alterações no pH próximo às raízes ou a síntese de quelatos que podem interferir na formação do complexo Al-hematoxilina.

As plantas respondem a toxidez e a deficiências minerais tanto com mudanças morfológicas quanto fisiológicas e bioquímicas. Expostas a doses crescentes de Al, as variedades apresentaram emissão de raízes laterais, considerado um sintoma típico de toxidez. 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). Nas variedades de cana-de-açúcar estudadas, o início desse sintoma variou, sendo que na RB935744 (Figura 27) foi observado raízes laterais a partir da dose 1400  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e em pouca intensidade. Nas variedades RB925345 (Figura 33), RB855453 (Figura 30) e RB855156 (Figura 34) essa emissão teve início na dose 380  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , seguida pela RB937570 (Figura 28) na dose 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , pela RB966928 (Figura 31) e RB867515 (Figura 32) em 800  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e pela RB928064 (Figura 35) na dose 2000  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Para a SP813250 (Figura 29), foi observado a emissão de raízes laterais somente na dose 4000  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

Segundo Machado (1997), o Al pode induzir a formação de raízes imediatamente antes da coifa, o que indica a interrupção da dominância apical. A formação de raízes laterais é um recurso da planta para compensar a inibição do acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  no apoplasto induzida pelo Al. Com isso, há mais sítios de adsorção de  $\text{Ca}^{2+}$  com conseqüente transporte radial para a parte aérea. Entretanto, em um determinado estágio, a planta se torna incapaz de desenvolver raízes laterais (MACHADO, 1997).

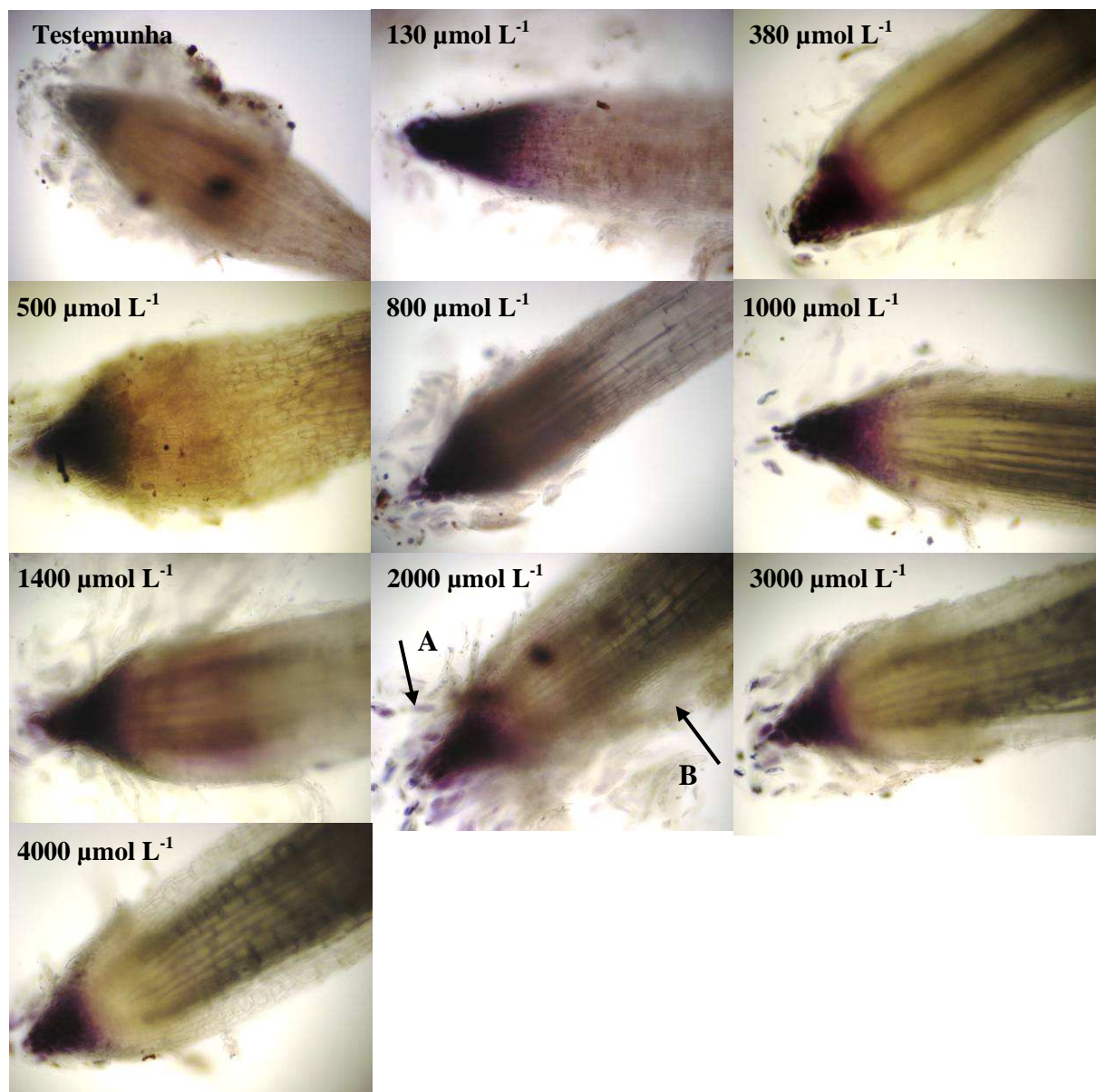
Estudando raízes de plantas de faia (*Fagus sylvatica*) e de abeto (*Picea abies*), Rost-Siebert (1984) descreveu 3 estágios de alterações causadas pelo Al. No estágio 1, as raízes primárias da coifa podem estar alteradas ou mortas, mas as plantas ainda são capazes de desenvolver novas raízes a partir 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.

Por meio da visualização dos ápices radiculares ao microscópio óptico, tomando como critério a intensidade da coloração em cada dose de Al, a classificação das variedades quanto a tolerância ao Al foi a seguinte: RB935744 > RB937570 > RB867515 = RB925345 = RB855156 = RB928064 > RB966928 > RB855453 = SP813250.

#### 4.4 Microscopia óptica dos danos causados pelo Al nos ápices radiculares

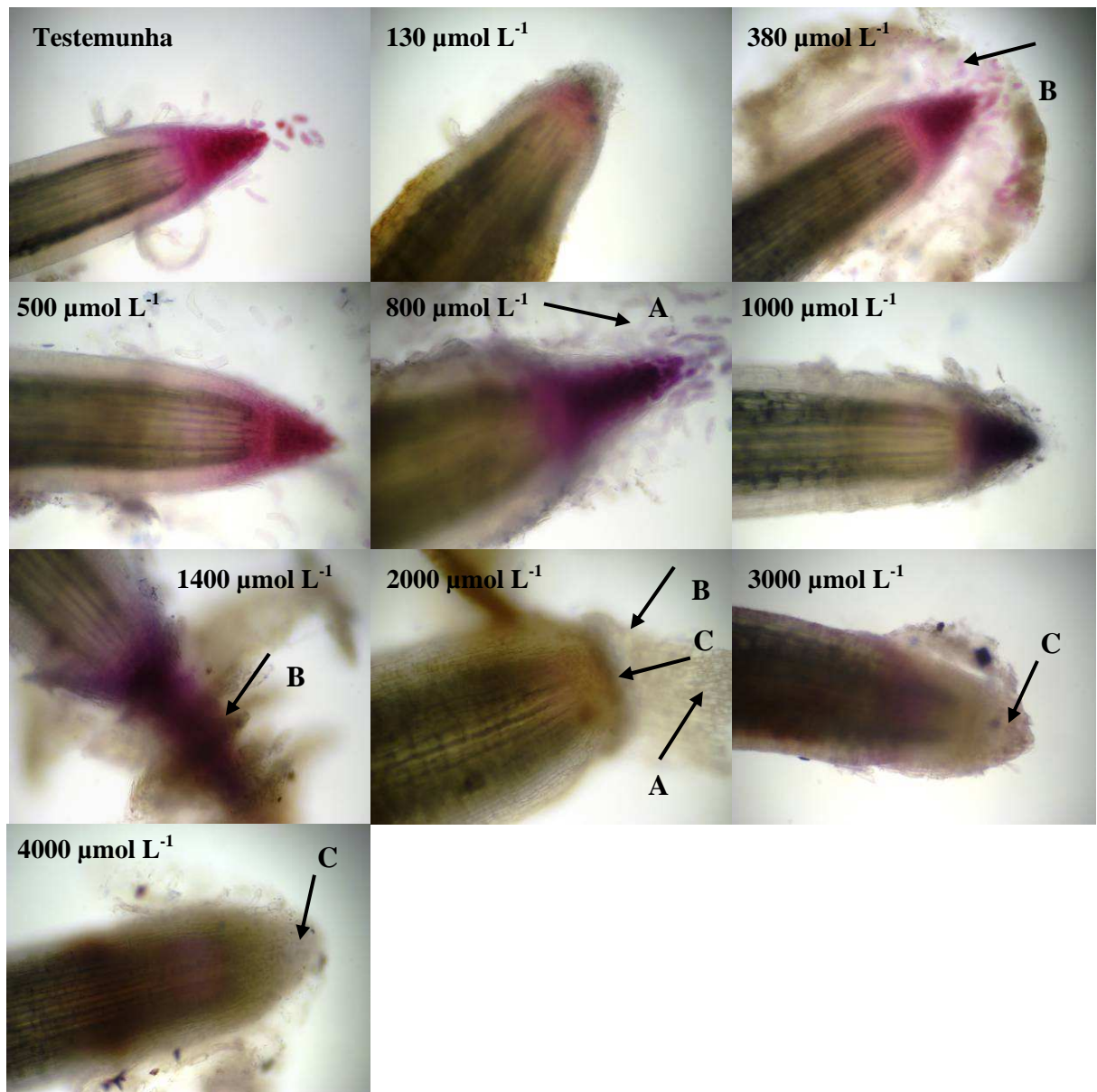
Após seis dias expostos a doses crescentes de Al, os ápices radiculares das variedades estudadas foram seccionados e observados ao microscópio óptico. Nessa etapa as raízes não foram coradas com hematoxilina.

A variedade RB935744 (Figura 36) manteve sua coifa preservada em todas as doses de Al, com presença de mucilagem principalmente nas doses 800 e 2000  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , apresentando tênue perda das células da coifa para o meio.



**Figura 36.** Ápices radiculares da variedade RB935744 em microscópio óptico (aumento de 100x) após exposição a doses crescentes de Al por seis dias, não coradas com hematoxilina. (A). Perda de células epidérmicas da coifa para o meio; (B). Mucilagem.

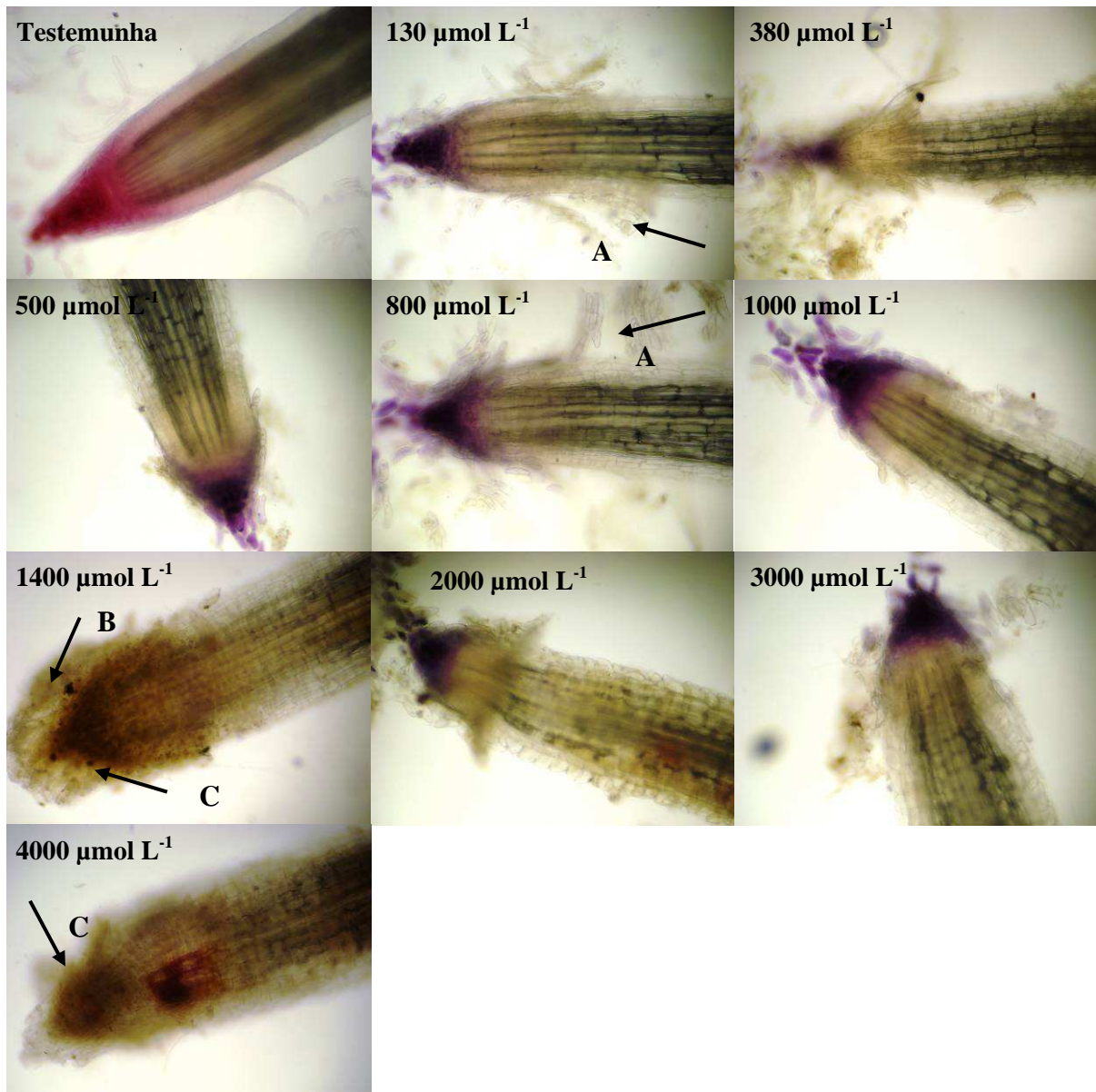
A RB928064 (Figura 37) apresentou uma densa camada de mucilagem na dose  $380 \mu\text{mol L}^{-1}$  e uma suave perda de células em  $800 \mu\text{mol L}^{-1}$ , se intensificando em  $2000 \mu\text{mol L}^{-1}$ . A partir dessa dose, a coifa já sofreu desintegração e passou a apresentar coloração parda.



**Figura 37.** Ápices radiculares da variedade RB928064 em microscópio óptico (aumento de 100x) após exposição a doses crescentes de Al por seis dias, não corados com hematoxilina. (A). Perda de células epidérmicas da coifa para o meio; (B). Mucilagem; (C). Desintegração da coifa.

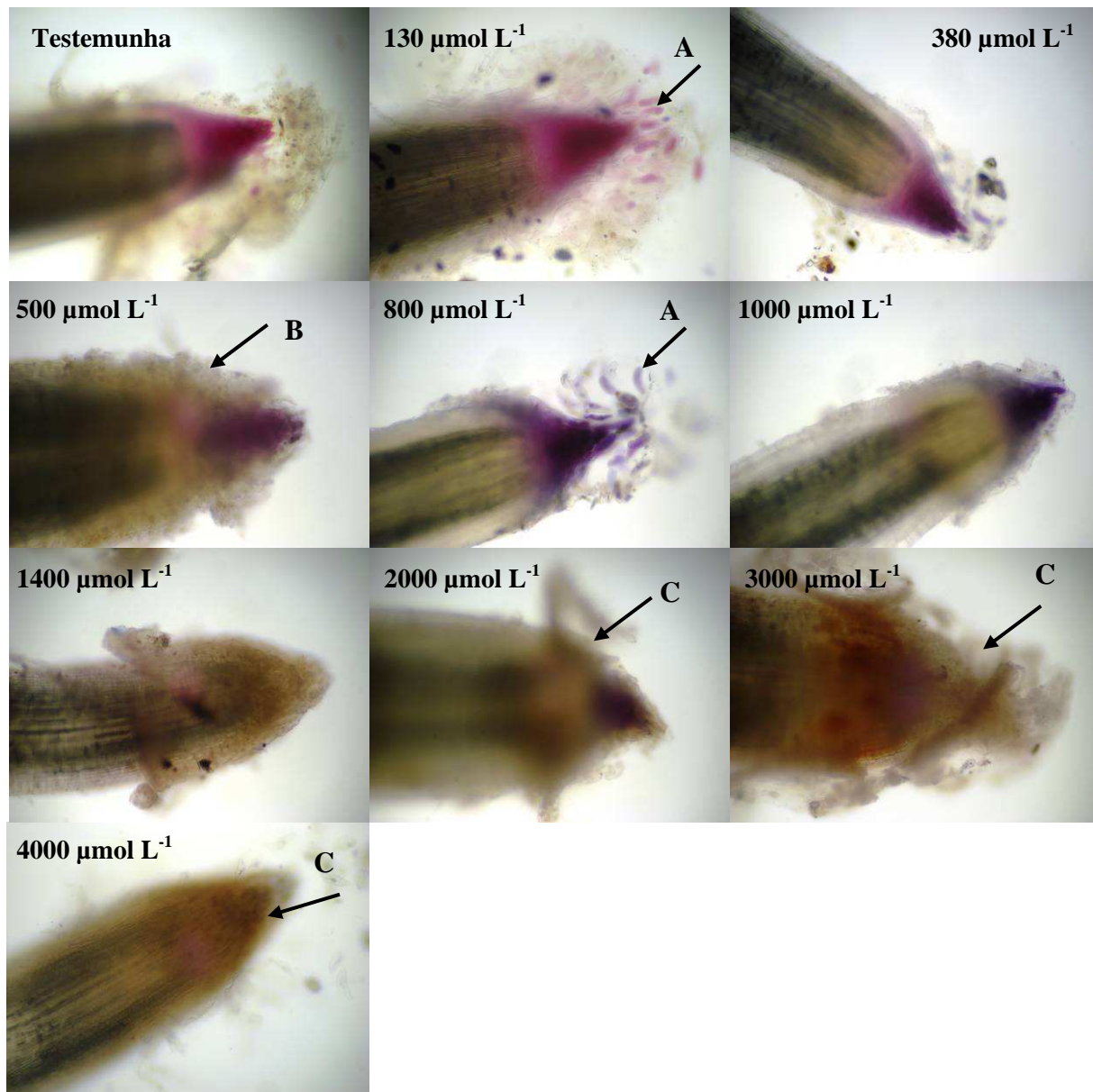
A variedade RB867515 (Figura 38) apresentou danos mais acentuados que os observados na variedade anterior. A perda das células da coifa para o meio foi observada a partir da dose  $130 \mu\text{mol L}^{-1}$  e se intensificou nas doses subsequentes. A coifa sofreu deformação nas doses  $1400$  e  $4000 \mu\text{mol L}^{-1}$ , apresentando-se com coloração parda.





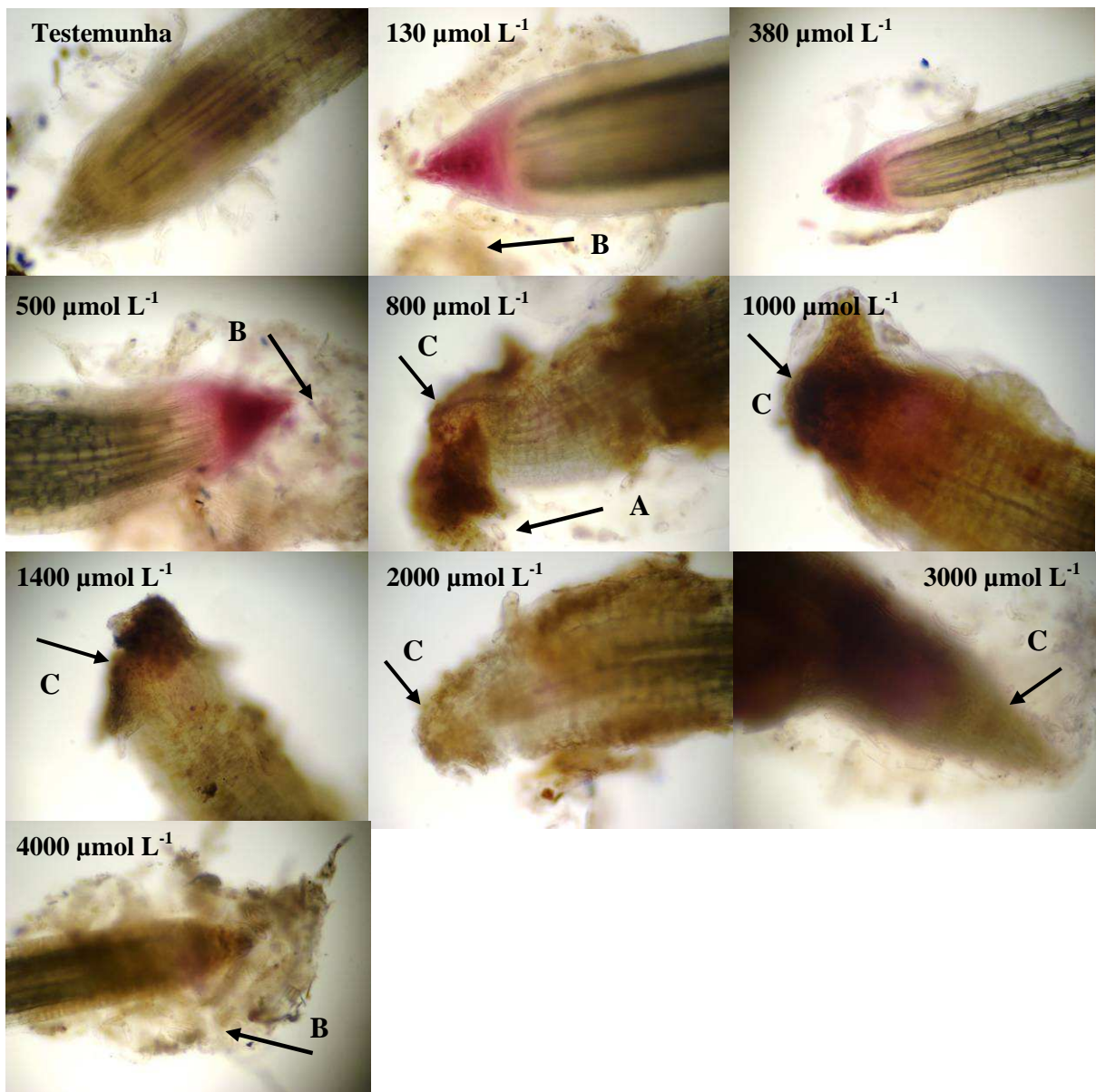
**Figura 38.** Ápices radiculares da variedade RB867515 em microscópio óptico (aumento de 100x) após exposição a doses crescentes de Al por seis dias, não corados com hematoxilina. (A). Perda de células epidérmicas da coifa para o meio; (B). Mucilagem; (C). Desintegração da coifa.

A RB937570 (Figura 39) sofreu uma suave perda de células na dose 130 µmol L<sup>-1</sup>. Essa variedade apresentou pouca produção de mucilagem. Injúrias na coifa foram observadas a partir de 1400 µmol L<sup>-1</sup> se intensificando nas doses subseqüentes, com desintegração parcial do ápice, adquirindo coloração parda.



**Figura 39.** Ápices radiculares da variedade RB937570 em microscópio óptico (aumento de 100x) após exposição a doses crescentes de Al por seis dias, não corados com hematoxilina. (A). Perda de células epidérmicas da coifa para o meio; (B). Mucilagem; (C). Desintegração da coifa.

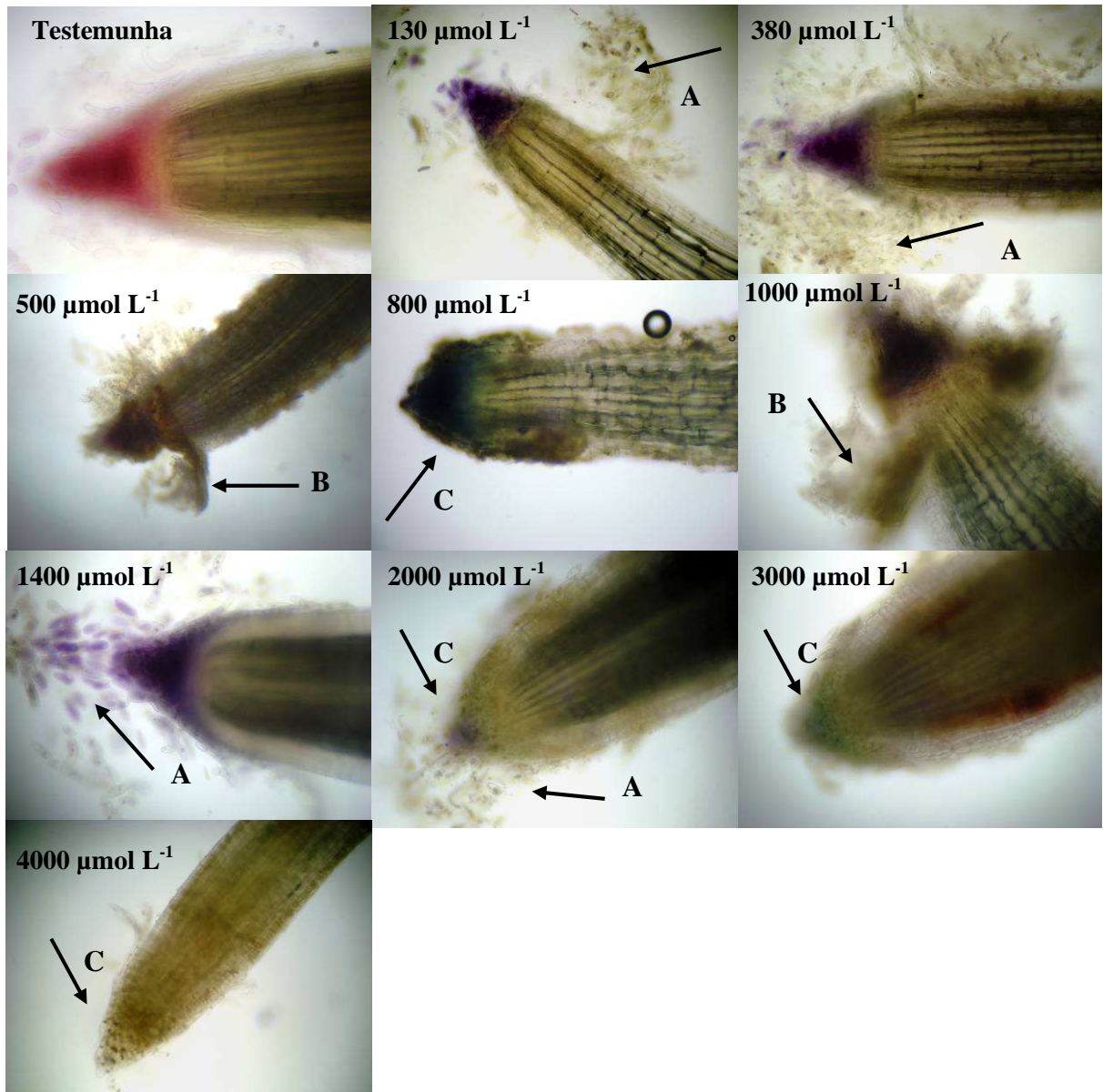
A RB855156 (Figura 40) apresentou produção de mucilagem na dose 130  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , enquanto na dose 800  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ocorreu a desintegração da coifa, cujo processo se agravou nas doses subsequentes. As raízes adquiriram coloração parda, mas ainda com presença de mucilagem.



**Figura 40.** Ápices radiculares da variedade RB855156 em microscópio óptico (aumento de 100x) após exposição a doses crescentes de Al por seis dias, não corados com hematoxilina. (A). Perda de células epidérmicas da coifa para o meio; (B). Mucilagem; (C). Desintegração da coifa.

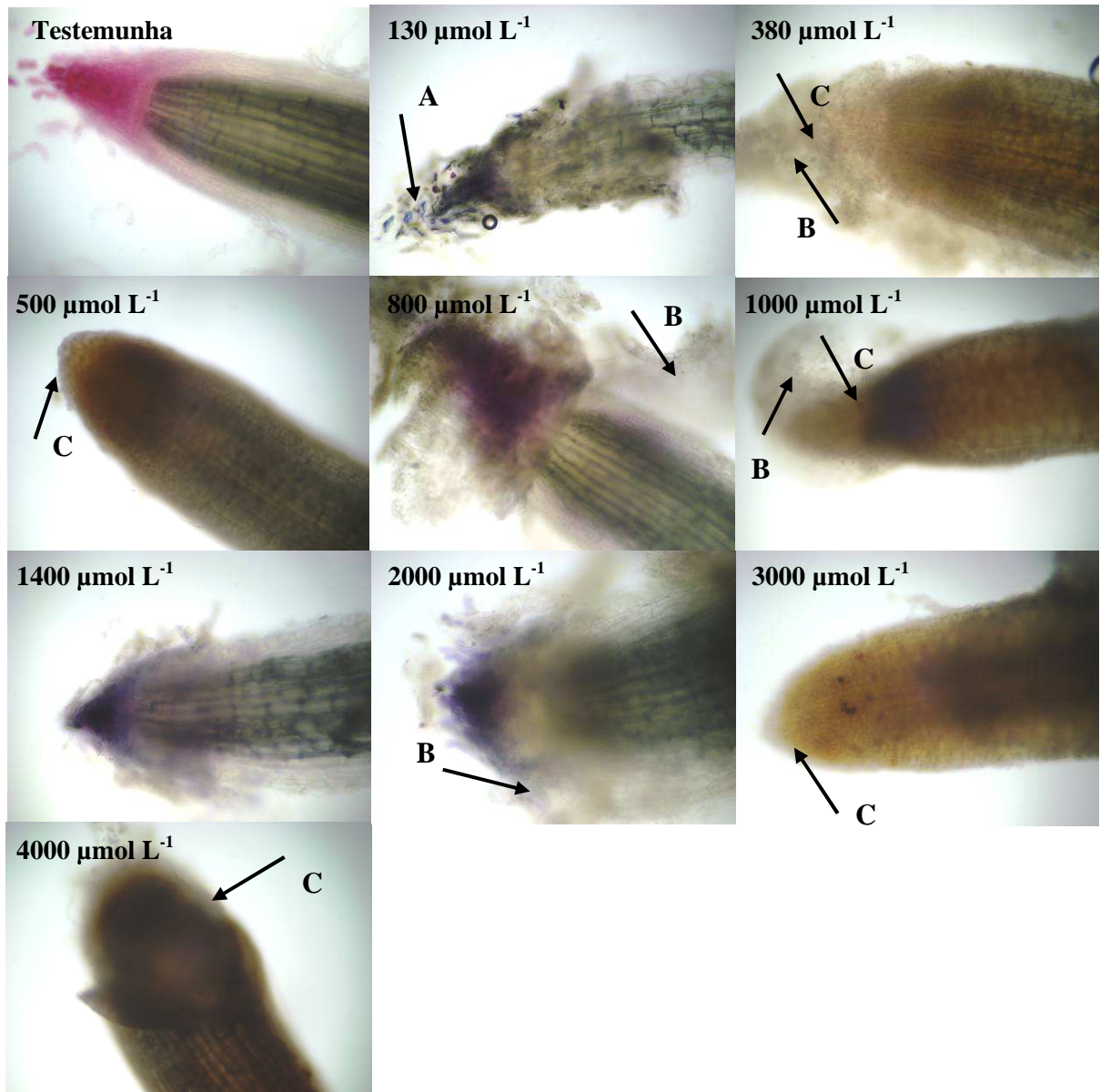
A variedade RB966928 (Figura 41) apresentou perda de células a partir da dose  $130 \mu\text{mol L}^{-1}$  e presença de mucilagem em  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ , porém em pequena quantidade. A partir de  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ , teve início a desintegração da coifa, sem perda total da estrutura.





**Figura 41.** Ápices radiculares da variedade RB966928 em microscópio óptico (aumento de 100x) após exposição a doses crescentes de Al por seis dias, não corados com hematoxilina. (A). Perda de células epidérmicas da coifa para o meio; (B). Mucilagem; (C). Desintegração da coifa.

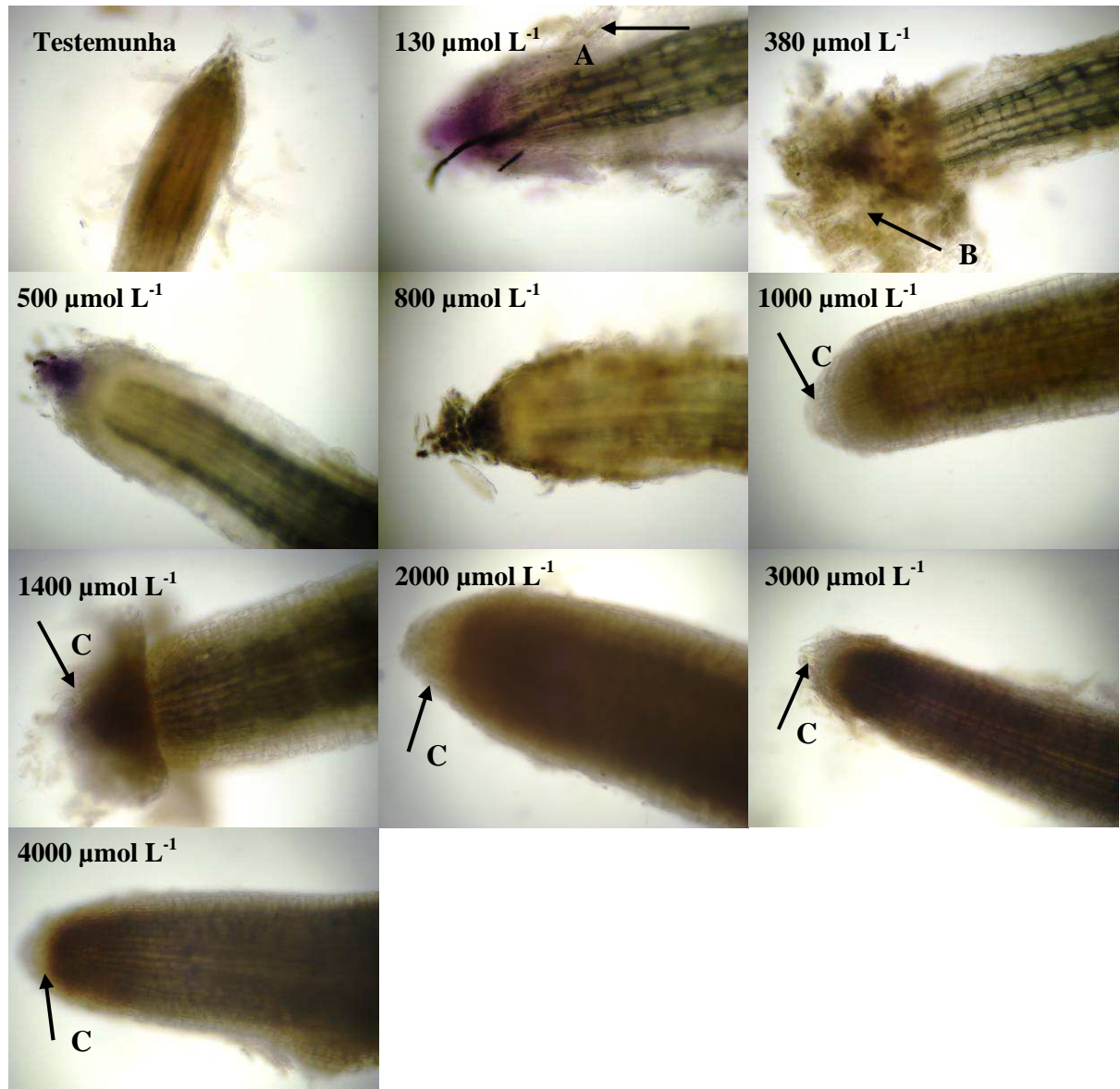
As variedades SP813250 (Figura 42), RB925345 (Figura 43) e RB855453 (Figura 44) apresentaram injúrias no ápice radicular já nas doses mais baixas, indicando forte sensibilidade ao Al.



**Figura 42.** Ápices radiculares da variedade SP813250 em microscópio óptico (aumento de 100x) após exposição a doses crescentes de Al por seis dias, não corados com hematoxilina. (A). Perda de células epidérmicas da coifa para o meio; (B). Mucilagem; (C). Desintegração da coifa.

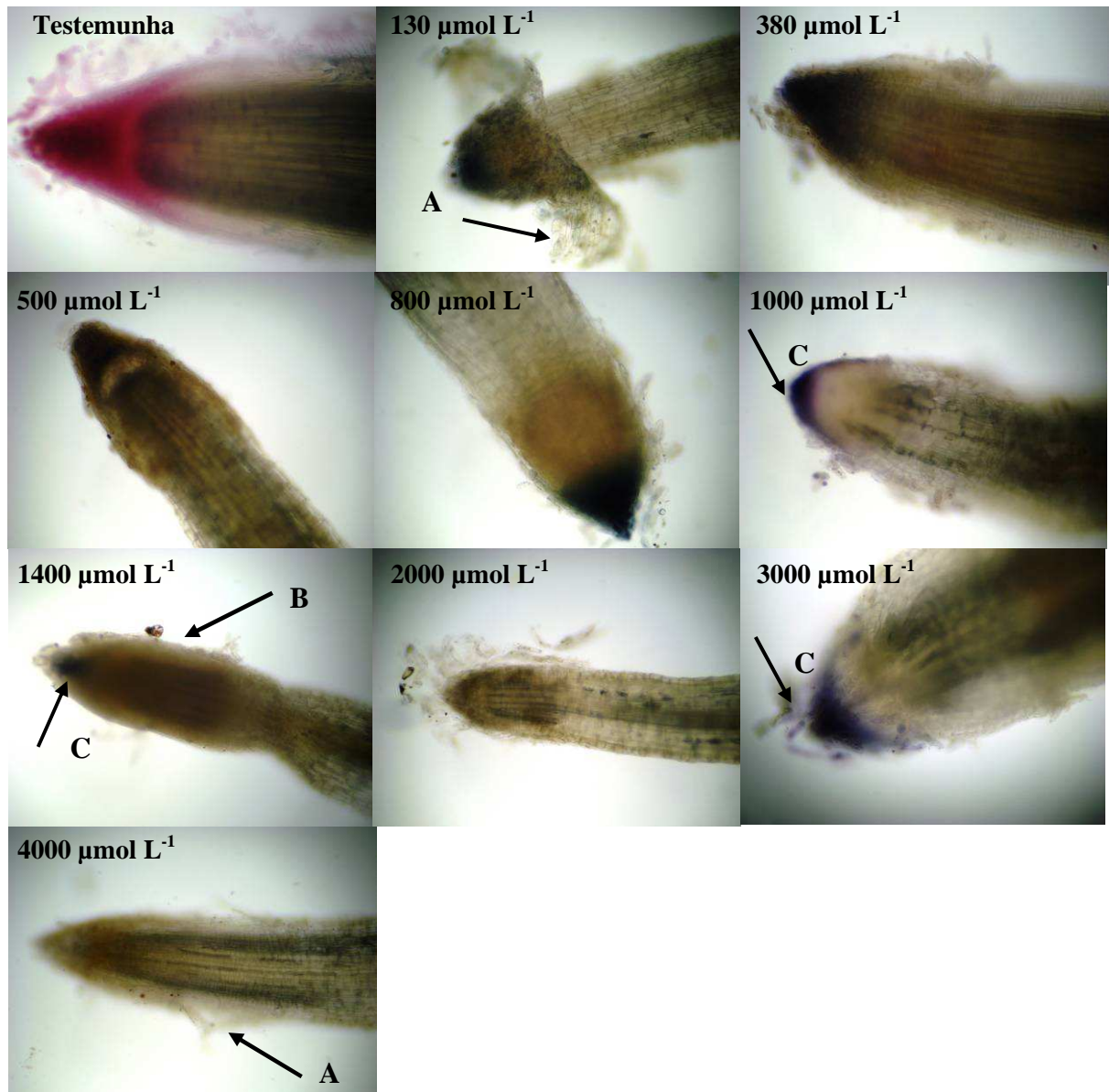
Para a SP813250 (Figura 42), foi observada a perda das células da coifa para o meio na dose  $130 \mu\text{mol L}^{-1}$ , com alterações no ápice já na dose  $380 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Ocorreu a produção e secreção de mucilagem até a dose  $2000 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Nas doses subsequentes, ocorreu perda total da coifa. A variedade RB925345 (Figura 43) apresentou perda das células na dose  $130 \mu\text{mol L}^{-1}$  e alterações na coifa a partir da dose  $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$ , onde as células já apresentaram a coloração parda. Foi observada a presença de mucilagem até a dose  $380 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Na dose  $4000 \mu\text{mol L}^{-1}$  ocorreu a perda quase total da coifa.

Para a RB855453 (Figura 44), houve intensa perda de células e em  $380 \mu\text{mol L}^{-1}$  iniciaram-se as injúrias à coifa que se intensificaram nas doses subseqüentes. Essa variedade apresentou pouca produção de mucilagem em comparação com as outras.



**Figura 43.** Ápices radiculares da variedade RB925345 em microscópio óptico (aumento de 100x) após exposição a doses crescentes de Al por seis dias, não corados com hematoxilina. (A). Perda de células epidérmicas da coifa para o meio; (B). Mucilagem; (C). Desintegração da coifa.





**Figura 44.** Ápices radiculares da variedade RB855453 em microscópio óptico (aumento de 100x) após exposição a doses crescentes de Al por seis dias, não corados com hematoxilina. (A). Perda de células epidérmicas da coifa para o meio; (B). Mucilagem; (C). Desintegração da coifa.

A coifa recobre o ápice da raiz, onde estão os tecidos meristemáticos que possuem a capacidade de divisão e multiplicação, sendo responsáveis pela adição de novas células ao corpo vegetal. Além disso, a coifa é coberta por uma bainha viscosa ou mucilagem, que lubrifica a raiz durante sua penetração no solo (RAVEN et al., 2007).

Com exceção da RB935744, todas as outras variedades apresentaram desintegração da coifa em maior ou menor grau e também a coloração parda dos ápices.

A tabela 9 apresenta uma síntese das alterações aos ápices radiculares de cada variedade de cana-de-açúcar submetida a doses crescentes de Al em solução.

**Tabela 9.** Alterações em ápices radiculares de variedades de cana submetidas a concentrações crescentes de Al em solução

[Al]	RB935744	RB928064	RB867515	RB937570	RB855156	RB966928	SP813250	RB925345	RB855453																											
$\mu\text{mol L}^{-1}$	sintomas																																			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4				
0																																				
130																																				
380																																				
500																																				
800																																				
1000																																				
1400																																				
2000																																				
3000																																				
4000																																				

1. Produção de mucilagem
2. Perda de células epidérmicas da coifa para o meio
3. Desintegração da coifa
4. Coloração parda

De acordo com Rost-Siebert (1984), que descreveu três estágios de alterações causadas pelo Al, o último estágio é caracterizado pela coloração parda das raízes, o que o autor considera um indicativo de morte celular. Com a morte das células há perda de suas funções, o que inclui a produção de mucilagem. Em *Picea abies* (L.) Karst, a morte celular foi precedida por mudanças no espessamento da parede celular, no grau de vacuolização, pela degeneração das mitocôndrias, corpos de Golgi, retículo endoplasmático e núcleo celular (PRABAGAR et al., 2011).

Apesar de todas as variedades terem chegado ao último estágio das alterações causadas pelo Al, com exceção da RB935744, as mais sensíveis foram a SP813250, RB925345 e RB855453, pois os sintomas de toxicidade ficaram evidentes já nas menores doses. A variedade RB935744 não atingiu o último estágio de alterações causadas pelo Al, chegando até o estágio 2, onde, segundo Rost-Siebert (1984), ocorre a desintegração da epiderme e a remoção do córtex do cilindro central.

Com exceção da RB935744, a deformação, e até a perda total da coifa nas outras variedades, fazem com que ela não seja capaz de proteger o meristema apical de lesões mecânicas, sobretudo pela excreção de mucilagem, afetando diretamente o crescimento radicular. Sob condições normais de crescimento, as células que recobrem o ápice radicular sintetizam e liberam proteínas de baixo peso molecular, protegendo o ápice da toxidez por Al (ZHU et al., 2003). Quando expostas a tais condições, essas células aumentam a produção de mucilagem na tentativa de prevenir danos celulares (CAI et al., 2011).

Cai et al. (2011) constataram que em arroz, a cultivar tolerante apresentou uma camada mais espessa de mucilagem e, com isso, menor redução do crescimento radicular em comparação com a cultivar sensível. Os autores concluíram que manter vivas as células responsáveis pela produção e excreção de mucilagem é um importante fator para excluir e aliviar a toxicidade do Al no ápice radicular.

A oferta seletiva de Al em diferentes partes do sistema radicular mostrou claramente que os ápices radiculares são os sítios primários de lesão causada pelo Al (RYAN et al., 1993), especialmente na zona de transição, encontrando-se 1 a 2 mm da ponta da raiz. Esta área, conhecida como zona de alongamento, é altamente sensível à toxicidade ocorrendo rapidamente atrofia e injúrias no meristema radicular (RYAN et al., 1993; KOLLMEIER et al., 2000).

Em plantas de pepino consideradas sensíveis, o Al, juntamente com a baixa concentração de boro (B), causou danos substanciais nas células da epiderme e nas células do córtex pouco acima do centro meristemático (CORRALES et al., 2008).

O ápice radicular (coifa, meristema e zona de alongamento) é o local de maior acúmulo de Al, desempenhando um papel importante na percepção do elemento. Utilizando microscopia eletrônica, Eleftheriou et al. (1993) também observaram que os efeitos mais intensos da toxicidade causada pelo Al<sup>+3</sup> no sistema radicular ocorreram nas paredes celulares da epiderme e nas células da coifa. Isso ocorreu porque as paredes celulares e espaços intercelulares são os primeiros compartimentos da raiz a entrar em contato com o Al (DARKÓ et al., 2004).

De forma geral, a variedade RB935744 apresentou-se mais tolerante, uma vez que não apresentou injúrias graves causadas pelo Al. Nas outras variedades, a coifa e a região meristemática foram deformadas, causando até a perda de função e morte das células. Sintomas semelhantes aos observados para cana-de-açúcar foram relatados em leucena (ANDRADE et al., 2003) e beterraba açucareira (KESER et al., 1977), ou seja, células apresentaram desintegração na região da coifa e do córtex, tornando a região apical indistinguível.

A análise ao microscópio óptico dos danos ao ápice radicular, causados devido a toxicidade por Al, permitiu classificar as variedades quanto a tolerância da seguinte forma: RB935744 > RB928064 > RB867515 = RB937570 > RB855156 > RB966928 > RB925345 = SP813250 > RB855453.

#### **4.5. Tolerância de variedades de cana-de-açúcar ao Al em solução: avaliação e comparação de métodos**

A classificação das variedades de cana-de-açúcar quanto a tolerância ao Al diferiu entres os métodos. A classificação de acordo com cada análise realizada está apresentada na tabela 10, em comparação com a classificação feita a partir da média de todas as análises.

A média da classificação das variedades foi feita através de notas, que variaram de 1 a 9 (número de variedades). A nota foi dada a partir da média da soma das posições da variedade em cada método. Por exemplo, para a RB928064 foram somados: 1 (método da escala de classes) + 6 (método da microscopia com corante) + 2 (método da microscopia sem corante) + 1 (método comprimento de raiz) = 10. A média correspondeu à:

$$\frac{10 \text{ (nota)}}{4 \text{ (número de métodos)}} = 2,50$$

A média final possibilitou a ordenação das variedades de acordo com a ordem crescente de notas, sendo que a escala de tolerância variou da mais tolerante (menor nota) até a menos tolerante ao Al (maior nota).

A tabela 10 também permite a comparação de cada variedade em relação aos métodos utilizados. As variedades RB935744 e RB928064 apresentaram bom crescimento na presença do Al, com efeito inibitório na TAR a partir da dose 3000 e 1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$  respectivamente. Apesar de o Al atingir a região meristemática já nas doses iniciais para a RB935744, ela apresentou baixa intensidade de coloração, indicando pouco acúmulo de Al no ápice, o que pode ter favorecido o pouco dano ao ápice radicular, assim como observado para a RB928064, justificando a capacidade de crescimento em altas doses de Al.

A variedade RB855453 apresentou acúmulo de Al na região meristemática na dose 130  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , enquanto a RB966928 esse acúmulo ocorreu em 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Porém, ambas apresentaram inibição do crescimento na dose 1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Al. A intensa coloração pela hematoxilina observada nessas variedades pode ser a causa dos danos intensos à coifa, uma vez que quanto mais intensa a coloração maior a quantidade de Al presente na raiz.

A RB855345 apresentou queda na TAR em 800  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , indicando boa capacidade de crescimento em Al, apesar de o Al atingir a região meristemática já na primeira dose e apresentar alta intensidade de coloração. Os danos à coifa só foram observados na dose 1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .


A RB867515 também apresentou em 800  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Al queda no crescimento radicular. Danos à coifa foram observados apenas em 1400  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Al, enquanto coloração intermediária do ápice radicular e acúmulo de Al na região meristemática já nas doses iniciais.

A SP813250 não apresentou um bom crescimento na presença do Al, tendo a dose 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$  como crítica. O conjunto de acúmulo de Al na região meristemática na dose inicial e intensa coloração no ápice radicular favoreceram os danos ao ápice observados já na dose 380  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

Os danos à coifa para as variedades RB855156 e a RB937570 só foram observados em 800 e 1400  $\mu\text{mol L}^{-1}$  respectivamente. Essas variedades acumularam pouco Al no ápice radicular e sua presença na região meristemática só foi observada na dose 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Apesar desse conjunto satisfatório de resultados, o Al afetou seu crescimento nas primeiras doses, 380 e 130  $\mu\text{mol L}^{-1}$  respectivamente.



**Tabela 10.** Classificação das variedades de cana-de-açúcar quanto a tolerância ao AI em solução avaliada por diferentes métodos.

Métodos	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>Escala de classes</b>	RB928064	RB966928	RB937570	RB855156	RB867515	RB935744	RB925345	RB855453	SP813250
<b>Microscopia com corante</b>	RB935744	RB937570	RB867515	RB925345	RB855156	RB928064	RB966928	RB855453	SP813250
<b>Microscopia sem corante</b>	RB935744	RB928064	RB867515	RB937570	RB855156	RB966928	RB925345	SP813250	RB855453
<b>Comprimento de raiz</b>	RB928064	RB935744	RB855453	RB966928	RB925345	RB867515	SP813250	RB855156	RB937570
<b>MÉDIA</b>	RB928064	RB935744	RB867517	RB937570	RB966928	RB855156	RB925345	RB855453	SP813250
<b>NOTA</b>	2,50	2,50	4,25	4,50	4,75	5,25	5,75	7,00	8,25
<b>Tolerância</b>	Mais tolerante								Menos tolerante

As variedades apresentaram comportamento distinto em resposta ao Al em solução e aos métodos pelos quais foram avaliadas. Neste estudo, foi adotado como método padrão a medida da taxa de alongamento radicular (TAR). Por se tratar de um método biométrico, gera parâmetros numéricos que são passíveis de serem tratados estatisticamente, fornecendo uma base sólida para a avaliação dos resultados. Os demais métodos foram úteis na identificação e visualização dos danos radiculares, mas, pelo seu caráter subjetivo não devem ser adotados como métodos principais e sim como complementares.

A subjetividade nos métodos complementares permite a ocorrência de diferentes interpretações. As percepções de intensidade de cores e de danos às raízes podem variar de acordo com o avaliador interferindo na avaliação dos resultados. Contudo, esses métodos são úteis para a realização de uma observação mais pontual, sendo possível a visualização de detalhes que complementam os resultados da TAR.

Assim, a classificação das variedades de cana-de-açúcar quanto à tolerância ao Al em solução foi definida conforme a TAR, resultando a sequência: RB928064 > RB935744 > RB855453 = RB966928 > RB925345 = RB867515 > SP813250 > RB855156 > RB937570.

## 5 CONCLUSÕES

A análise conjunta da coloração dos ápices radiculares com hematoxilina, da observação ao microscópio óptico, juntamente com a visualização da morfologia das pontas das raízes, e da análise de crescimento radicular após a exposição ao Al, foi eficiente para a diferenciação de comportamento entre as variedades estudadas. O protocolo experimental sugerido possibilitou classificar as variedades em relação ao grau de sensibilidade ao Al.

As variedades estudadas apresentaram diferenças quanto a tolerância ao Al, demonstradas pela coloração por hematoxilina, pelas alterações na morfologia do ápice radicular e pela taxa de alongamento radicular.

As principais alterações dos ápices radiculares submetidos a concentrações crescentes do Al em solução foram a produção de mucilagem, perda de células epidérmicas da coifa, desintegração da coifa e coloração parda.

A diminuição da taxa de alongamento radicular ( $\text{mm dia}^{-1}$ ) depende da interação entre variedade e concentração de Al em solução, o que impede a definição de um valor crítico de Al em solução. Para as variedades estudadas, esse valor crítico variou de 130 a  $3000 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

O método da TAR foi considerado o mais eficiente para avaliar a tolerância de variedades de cana ao Al em solução. Os métodos da coloração por hematoxilina e da visualização ao microscópio óptico foram considerados complementares ao método da TAR.

De acordo com o método da TAR as variedades de cana-de-açúcar foram classificadas quanto a tolerância ao Al, da seguinte forma: RB928064 > RB935744 > RB855453 = RB966928 > RB925345 = RB867515 > SP813250 > RB855156 > RB937570.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABICHEQUER, A.D.; BOHNEN, H.; ANGHINONI, I. Absorção, translocação e utilização de fósforo por variedades de trigo submetidas à toxidez de alumínio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.27, p.373-378, 2003.

ABREU JR., C.H.; MURAOKA, T.; LAVORANTE, A.F. Relationship between acidity and chemical properties of Brazilian soils. **Scientia Agricola**, v.60, 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, p.915-922, 1975.

ABU-ZEID, M.O. Root properties of sugarcane in relation to nutrient uptake. **Soil Science Society of America Journal**, v.43, p.736-740, 1979.

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.

ANDERSON, D.L.; BOWEN, J.E. **Sugarcane Nutrition**. Atlanta, G.A.: Potash and Phosphate Institute, 1990. 53p.

ANDRADE, L.R.M de; CAVALCANTE, D.P.; KARIA, C.T; RAMOS, A.K.B; CARVALHO, M.A. de. **Uso do Método de Coloração de Raízes com Hematoxilina para Classificação de Genótipos de Leucena quanto à Tolerância ao Alumínio**. EMBRAPA CERRADOS: Poster Edição 27, 2003.

ARCHAMBAULT, D.J.; ZHANG, G.; TAYLOR, G.J. Accumulation of Al in root mucilage of Al-resistant and Al-sensitive cultivar of wheat. **Plant Physiology**, v.112, p.1471-1478, 1996.

ASHMAN, M.R.; PURI, G. **Essential Soil Science**. Oxford : Blackwell Science, 2002.

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.

BENEDINI, M.S.; KORNDÖRFER, G.H. Avaliação de critérios para recomendação de calcário em cana-de-açúcar. **Revista STAB – Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.10, p.20-25, 1992.

BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. **Environmental and Experimental Botany**, v.48, p.75-92, 2002.

BERZONSKY, W.A. The genomic inheritance of aluminum tolerance in Atlas-66 wheat. **Genome**, v.35, p.689-693, 1992.

BITTENCOURT, V.C.; CARMELLO, Q.A.C.; BEAUCLAIR, E.G.F.; JOÇO, J.; CLEMENTE, J.L. Produtividade da cana-de-açúcar e suas relações com a fertilidade dos solos e o manejo da cultura. **Revista STAB – Açúcar, Álcool & Subprodutos**, v.8, p.10-14, 1990.

BLAIR, M.W.; LÓPEZ-MARÍN, H.D. RAO, I.M. Identification of aluminum resistant Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.21, p.291-300, 2009.

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

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

BRAUER, D. Rapid inhibition of root growth in wheat associated with aluminum uptake as followed by changes in morin fluorescence. **Journal of Plant Nutrition**, v.24, p.1243-1253. 2001.

BRENES, E.; PEARSON, R.W. Root responses of three gramineae species to soil acidity in an oxisol and an ultisol. **Soil Science**, v.116, p.295-302, 1973.

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. 73p.

CAI, M.; ZHANG, S.; XING, C.; WANG, F.; WANG, N.; ZHU, L. Developmental characteristics and aluminum resistance of root border cells in rice seedlings. **Plant Science**, n.180, p.702-708, 2011.

CAMARGO, C.E. DE O.; FELÍCIO, J.C.; ROCHA JÚNIOR, L.S. Trigo: tolerância ao alumínio em solução nutritiva. **Bragantia**, v.46, 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.

CANÇADO, G.M.A.; LOGUERCIO, L.L.; MARTINS, P.R.; PARENTONI, S.N.; BORÉM, A.; PAIVA, E.; LOPES, M.A. Hematoxylin staining as a phenotypic index for aluminum tolerance selection in tropical maize (*Zea mays* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 99, p.747-754, 1999.

CANÇADO, G.M.A.; PARENTONI, S.N.; BORÉM A.; LOPES, M.A. Avaliação de nove linhagens de milho em cruzamentos dialélicos quanto à tolerância ao alumínio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p.471-478, 2002.

CARACTERÍSTICAS agronômicas mais marcantes das principais variedades de cana da região centro-sul. Disponível em: <<http://www.udop.com.br/index.php?item=características>>. Acesso em: 30 outubro 2011.

CARVER, B.F.; OWNBY, J.D. Acid soil tolerance in wheat. **Advances in Agronomy**, v.54, p.117-173, 1995.

CASTILHOS, G. **Estresse oxidativo em resposta ao alumínio em aveia branca**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2010. 94p.

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

COMIN, J.J.; BARLOY, J.; BOURRIE, G.; TROLARD F. Differential effects of monomeric and polymeric aluminium on the root growth and on the biomass production of root and shoot of corn in solution culture. **European Journal of Agronomy**, v.11, p.115-122, 1999.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira** : cana-de-açúcar, terceiro levantamento, janeiro/2001; Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília : Conab, 2011.

CORRALES, I.; POSCHENRIEDER, C.; BARCELÓ, J. Boron-induced amelioration of aluminium toxicity in a monocot and dicot species. **Journal of Plant Physiology**, v.165, p.504-513, 2008.

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.

CROOKE, W.M. The measurement of the cation exchange capacity of plant roots. **Plant and Soil**, v.21, 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. I. Movimentação de bases no solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.10, p.195-198, 1986a.

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.

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

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, 1993.

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

DINARDO-MIRANDA, L.L.; PIVETTA, J.P.; FRACASSO, J.V. Economic injury level for sugarcane caused by the spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera:Cercopidae). **Scientia Agricola**, v.65, p.16-24, 2008.

DONCHEVA, S.; AMENOS, M.; POSCHENRIEDER, C.; BARCELO, J. Root cell patterning: a primary target for aluminium toxicity in maize. **Journal of Experimental Botany** v.56, p.1213-1220, 2005.

DRABECK, O.; MLADKOVA, L.; BORUVKA, L.; SZAKOVA, J.; NIKODEM, A.; NEMECEK, K. Comparison of water-soluble and exchangeable forms of Al in acid forest soils. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.99, p.1788-1795, 2005.

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.

ECHART, C.L.; MOLINA S.C. Fitotoxicidade do alumínio: efeitos, mecanismo de tolerância e seu controle genéticos. **Ciência Rural**, v.31, n.531-541, 2001.

ELEFThERIOU, P.E.; MOUSTAKAS, M.; GRAGISKOS, N. Aluminate-induced changes in morphology and ultrastructure of *Thinopyrum* roots. **Journal of Experimental and Botany**, v.44, 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, p.1351-1357, 2005a.

ETICHA, D.; THÉ, C.; WELCKER, C.; NARRO, L.; STAß, A.; HORST, W.J. Aluminium-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, 2005b.

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

FAGERIA, N.K.; STONE, L.F.; SANTOS, A.B. Manejo de solos ácidos. In: Maximização da eficiência de produção das culturas. Brasília, **Embrapa Comunicação para a Transferência de Tecnologia**, 1999. p.200-232.

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

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

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

FOY, C.D. Physiological effects of hydrogen, aluminium, and manganese toxicities in acid soil. In: ADAMS, F. (Ed.). **Soil acidity and liming**. 2.ed. Madison, American Society of Agronomy, 1984, p. 57-97, 1984.

FREITAS, F.A.; KOOP, M.M.; SOUZA, R.O. DE; ZIMMER, P.D.; CARVALHO, F.I.F.; 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, 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. Efeitos fisiológicos do alumínio em plantas. In: SIMPÓSIO AVANÇADO DE SOLOS E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 2., Piracicaba, 1989. **Anais**. Campinas, Fundação Cargill, 1989. p.73-87.

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**, v.92, p.688-695, 1997.

GALVANI, E.; BARBIERI, V.; PEREIRA, A.B.; VILLA NOVA, N.A. Efeitos de diferentes espaçamentos entre sulcos na produtividade agrícola da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). **Scientia Agrícola**, v.54, p., 1997.

GARZON, T.; GUNSE, B.; MORENO, A.R.; TOMOS, D.; BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Aluminium-induced alteration of ion homeostasis in root tip vacuoles of two maize varieties differing in Al tolerance. **Plant Science**, v.180, p.709-715, 2011.

GIANNAKOULA, A.; MOUSTAKAS, M.; SYROS, T.; YUPSANIS, T. Aluminum stress induces up-regulation of an efficient antioxidant system in the Al-tolerant maize line but not in the Al-sensitive line. **Environmental and Experimental Botany**, v.67, p.487-494, 2010.

GIAVENO, C.D.; MIRANDA-FILHO, J.B. Rapid screening for aluminum tolerance in maize (*Zea mays* L.). **Genetics and Molecular Biology**, v.23, p.847-850, 2000.

GILL, G.W.; FROST, J.K.; MILLER, K.A. A new formula for half-oxidized hematoxylin solution that neither overstain nor requires differentiation. **Acta Cytologica**, v.18, p.300-311, 1974.

GUO, T.R.; ZHANG, G.P.; ZHANG, Y.H. Physiological changes in barley plants under combined toxicity of aluminum, copper and cadmium. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.57, p.182-188, 2007.

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

HEIDARABADI, M.D.; GHANATI, F.; FUJIWARA, T. Interaction between boron and aluminum and their effects on phenolic metabolism of *Linum usitatissimum* L. roots. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.49, p.1377-1383, 2011.

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.

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.

IBGE. Mapas de biomas e de vegetação, 2004. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_visualiza.php?id\\_noticia=169](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=169)>. Acesso em: 19 abr. 2011.

JACOB-NETO, J. **The interactions of H<sup>+</sup>/OH<sup>-</sup> exchanges between roots and rhizosphere with plant nutrition and aluminium effects**. Tese (Ph.D.) - University of Dundee, Dundee. 1993. 281f.

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.



KIKUI, S.; SASAKI, T.; MAEKAWA, M.; MIYAO, A.H.; HIROCHIDA, H.; MATSUMOTO, H.; YAMAMOTO, Y. Physiological and genetic analyses of aluminium tolerance in rice, focusing on root growth during germination. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.9, p.1837-1844, 2005.

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.; PENCE, N.S.; LETHAM, D.L.D.; PINEROS, M.A.; MAGALHAES, J.V.; HOEKENGA, O.A.; GARVIN, D.F. Mechanisms of metal resistance in plants: aluminum and heavy metals. **Plant and Soil**, v.247, p.109-119, 2002.

KOFFLER, N.F. A profundidade do sistema radicular e o suprimento de água às plantas no Cerrado. **Informações Agronômicas Potafos**, n.33, p.1-5, 1986.

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

KOPITTKE, P.M.; BLAMEY, F.P.C.; MENZIES, N.W. Toxicities of soluble Al, Cu and La include rupture on rhizodermal and root critical cells of cowpea. **Plant Soil**, v.303, p.217-227, 2008.

KUVA, M. A. Períodos de interferência das plantas daninhas na cultura da cana de açúcar. III - Capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) e capim-colonião (*Panicum maximum*). **Planta Daninha**, v.21, p.37-44, 2003.

LANDELL, M.G.A.; PINTO, L.R.; CRESTE, S.; XAVIER, I.A.; VASCONCELOS, A.C.M.; BIDÓIA, M.A.P.; SILVA, D.N.; SILVA, M.A. Seleção de novas variedades de cana-de-açúcar e seu manejo de produção. **Encarte Informações Agronômicas Potafos**, n.110, p.18-24, 2005.

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.

LOPES, A.S. **Solos sob “cerrado”, características propriedades e manejo**. Piracicaba, Associação para a pesquisa do potássio e do fosfato, 1984. 162p.

MACHADO, P.L.O.A. **Considerações gerais sobre a toxicidade do alumínio nas plantas** – Rio de Janeiro : EMBRAPA-CNPS, 1997. 22p. (Documentos 2).

MAGNAVACA, R. **Genetic variability and the inheritance of aluminum tolerance in maize (*Zea mays* L.)**. Tese (Ph.D.) - University of Nebraska, Lincoln. 1982. 135 f.

MAGNAVACA, R.; BAHIA FILHO, A.F.C. **Seleção de milho para tolerância ao alumínio. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 1991. 30 p.**

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

MA, J.F.; SHEN, R.F.; NAGAO, S.; TANIMOTO, E. Aluminum targets elongating cells by reducing cell wall extensibility in wheat roots. **Plant Cell Physiology**, v.45, p.583-589, 2004.

MALAVOLTA, E. Reação do solo e crescimento das plantas. In: \_\_\_\_\_. **Seminário sobre corretivos agrícolas**. Campinas : Fundação Cargill, 1985, p.3-64.

MAPA. Brasil: projeções do agronegócio 2010/2011 a 2020/2021. Ministério da Agricultura, pecuária e abastecimento: Brasília, 2011.

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, F.R. Cana-de-açúcar: solo. **Agência de Informação Embrapa**. Ministério da Agricultura, pecuária e abastecimento, 2007. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01\\_18\\_3112006152934.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_18_3112006152934.html)> . Acesso em: 04 fev. 2012.

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.

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, p.191-200, 1984.

MASSOT, N.; POSCHENRIEDER, C.; BARCELÓ, J. Aluminum tolerance assessment in bush bean cultivars by root growth analysis and hematoxylin staining. **Suelo Planta**, v.1, p.25-32, 1991.

MATSUMOTO, H; MORIMURA, S. Repressed template activity of chromatin of pea roots treated by aluminium. **Plant Cell Physiology**, v.21, p.951-959, 1980.

MATSUMOTO, H.; MOTODA, H. Aluminum toxicity recovery processes in root apices. Possible association with oxidative stress. **Plant Science**, doi:10.1016/j.plantsci.2011.07.019. (2011). In press.

MATSUMOTO, H. Plant roots under aluminum stress: toxicity and tolerance. In: WEISEL, Y.; ESHEL, A.; KAFKAFI, U. (Eds.), **Plant Roots: The Hidden Half**, 3.ed., Marcel Dekker Inc., New York, Basel, 2002, pp. 821–838.

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 arabica* sob influência da atividade do alumínio em solução. **Revista Brasileira de Ciência Solo**, v.32, p.425-434, 2008.

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

McQUATTIE, C.J.; SCHIER, G.A. Response of red spruce seedlings to aluminum toxicity in nutrient solution: alterations in root anatomy. **Canadian Journal of Forest Research**, v.20, p.1001-1011, 1990.

MENDONÇA, R.J.; CAMBRAIA, J.; OLIVA, M.A.; OLIVEIRA, J.A. Capacidade de cultivares de arroz de modificar o pH de soluções nutritivas na presença de alumínio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, p.447-452, 2005.

MENOSSO, O.G.; COSTA, J.A.; ANGHINONI, I.; BOHNEN, H. Tolerância de genótipos de soja ao alumínio em solução. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.2157-2166, 2000.

MOHANTY, S.; DAS, A.B.; DAS, P.; MOHANTY, P. Effect of a low dose of aluminum on mitotic and meiotic activity, 4c DNA content, and pollen sterility in rice, *Oryza sativa* Cv. Lalat. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.59, p.70-75, 2004.

MORELLI, J.; DALBEN, A.E.; ALMEIDA, J.O.C.; DEMATTÊ, J.L.I. Calcário e gesso na produtividade de cana-de-açúcar e nas características químicas de um latossolo de textura média, álico. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.16, p.187-194, 1992.

MORELLI, J.; NELLI, E.; DEMATTÊ, J. L. I.; DALBEN, A.E. Efeito do gesso e do calcário nas propriedades químicas de solos arenosos álicos e na produção de cana-de-açúcar. **Revista STAB – Açúcar, Alcool e Subprodutos**, v.6, p.24-31, 1987.

MORITA, A.; YANAGISAWA, O.; TAKATSU, S.; MAEDA, S.; HIRADATE, S. Mechanism for the detoxification of aluminum in roots of tea plant (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze). **Phytochemistry**, v.69, p.147-153, 2008.

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.

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.

PEARSON, R.W. Soil environment and root development. In: PIERRE, W. H.; KIRKHAM, D.; SHAW, R. J. **Plant environment and efficient water use**. American Society of Agronomy, p. 95-126, 1996.

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, 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.

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.

POSCHENRIEDER, C.; TOLRA, R.P.; BARCELO, J. Role for cyclic hydroxamates in aluminium resistance in maize? **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.99, p.1830-1836, 2005.

PRABAGAR, S.; HODSON, M. J.; EVANS D. E. Silicon amelioration of aluminium toxicity and cell death in suspension cultures of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). **Environmental and Experimental Botany**, v.70, p.266-276, 2011.

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

PROCÓPIO, S.O.; SILVA, A.A.; VARGAS, L.; FERREIRA, F.A. **Manejo de plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar**. Universidade Estadual de Viçosa, 2003. 150p.

QUAGGIO, J.A. **Acidez e calagem em solos tropicais**. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas, 2000. 111p.

QUEIROZ-VOLTAN, R.B.; PRADO, H. DO; MORETTI, F.C. Aspectos estruturais de raízes de cana-de-açúcar sob o efeito da compactação do solo. **Bragantia**, v.57, 1998.

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, 285p.,1996. (Boletim Técnico, 100).

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. *Biologia vegetal*. 7. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 830p.

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

RENGEL, Z. Uptake of aluminium by plant cells. **New Phytologist**, v.116, p.389-406, 1996.

ROSSETTO, R.; DIAS, F.L.F. Nutrição e Adubação da cana-de-açúcar: indagações e reflexões. **Encarte Informações Agronômicas Potafos**, n.110, p. 6-11, 2005.

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.

RYAN, P.R.; DELHAIZE, E.; RANDALL, P.J. Characterization of Al-stimulated efflux of malate from the apices of Al-tolerant wheat roots. **Planta**, v.196, p.103-110, 1995.

RYAN, P.R.; DITOMASO, J.M.; KOCHIAN, L.V. Aluminum toxicity in roots: an investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. **Journal of Experimental Botany**. v.44, p.437-446, 1993.

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.

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

SASAKI, M.; YAMAMOTO, Y.; MATSUMOTO, H. Lignin deposition induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum*) roots. **Physiologia Plantarum**, v.96, p.193-198, 1996.

SCHÖLL, L. et al. Effects of ectomycorrhizal colonization on the uptake of Ca, Mg and Al by *Pinus sylvestris* under aluminum toxicity. **Forest Ecology and Management**, v.215, p.352-360, 2005.

SILVA, I.R.; 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.; MELLO, J.W.V; COSTA, L.M. da. **Tópicos em Ciência do Solo**, v.II, p.277-335, 2002.

SILVA, I.R.; SMYTH, T.J.; MOXLEY, D.F.; CARTER, T.E.; ALLEN, N.S.; RUFTY, T.W. Aluminum accumulation at nuclei of cells in the root tip. Fluorescence detection using lumogallion and confocal laser scanning microscopy. **Plant Physiology**, v.123, p.543-552, 2000.

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.

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.

SMITH, J.P., LAWN, R.J., NABLE, R.O. Investigations into the root:shoot relationship of sugarcane, and some implications for crop productivity in the presence of sub-optimal soil conditions. **Proceedings of Australian Society of Sugar Cane Technologists**, v.21, p.108-113, 1999.

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, p.287-292, 1992.

SOUZA, C.N.A. Classification of Brazilian wheat cultivars for aluminium toxicity in acid soils. **Plant Breeding**, v.117, p. 217-221, 1998.

SOUZA, D.M.G.; MIRANDA, L.N., OLIVEIRA, S.A. Acidez do solo e sua correção. In: NOVAIS, F.R.; ALVAREZ, V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J.C.L., ed. **Fertilidade do Solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007, p. 205-274.

SPOSITO, G. **The Environmental Chemistry of Aluminum**, 2.ed., Boca Raton : Lewis Publishers, 1996.

STOLF, E. C.; DANTAS, A. C. M.; BONETI, J. I.; COMIN, J. J.; NODARI, R. O. Estabelecimento de critérios para selecionar porta-enxertos de macieira tolerantes ao alumínio em solução nutritiva. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, p.476-481, 2008.

SUHAYDA, C.G. & HAUG, A. Organic acids reduce aluminum toxicity in maize root membranes. **Physiologia Plantarum**, v.68, p189-195, 1986.

TAYLOR, G.J., McDONALD-STEPHENS, J.L., HUNTER, D.B., BERTSCH, P.M., ELMORE, D., RENGEL, Z., REID, R.J. Direct measurement of aluminum uptake and distribution in single cells of *Chara corallina*. **Plant Physiology**, v.123, p.987-996, 2000.

TAYLOR, G.J. The physiology of aluminum tolerance in higher plants. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**, v.19, p.1179-1194, 1988.

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

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.

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, p. 357-363, 2002.

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.

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.

VIEIRA-JUNIOR, P.A.; VIEIRA, A.C.P.; BUAINAIN, A.M.; LIMA, F.; SILVEIRA, J.M.F.J. Produção brasileira de cana-de-açúcar e deslocamento da fronteira agrícola no estado do Mato Grosso. **Informações Econômicas**, v.38, p.58-77, 2008.

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.

VITTI, G.C.; MAZZA, J.A. Planejamento, estratégias de manejo e nutrição da cultura de cana-de-açúcar. **Encarte Informações Agrônomicas Potafos**, v.97, p.1-16, 2002.

VOSS, M.; SOUZA, C.N.A. DE; BAIER, A.C.; NASCIMENTO JÚNIOR, A.; BOFF, T. **Método de avaliação de tolerância à toxidez de alumínio em trigo, em condições de hidroponia, na Embrapa Trigo**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2006. 16 p.

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.

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

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.

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.

ZAMBROSI, F.C.B. et al. Liming and ionic speciation of an oxisol under no-till system. **Scientia Agricola**, v.65, p.190-203, 2008.

ZHANG, G., ARCHAMBAULT, D. J.; SLASKI, J. J.; TAYLOR, G. J. Effects of protein synthesis inhibitors on uptake of aluminum in aluminum-resistant and aluminum-sensitive cultivars of wheat. **Journal of Plant Physiology**, v.147, p.457-462, 1995.

ZHAO, X.J.; SUCOFF, E.; STADELMANN, E.J.  $\text{Al}^{3+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  alteration of membrane permeability of *Quercus rubra* root cortex cells. **Plant Physiology**, v.83, p.159-162, 1987.

ZHU, M.Y.; AHN, S.; MATSUMOTO, H. Inhibition of growth and development of root border cells in wheat by Al, **Physiologia Plantarum**, v.117, p.359-367, 2003.