

# ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E ACÚMULO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM PLANTAS DE SORGO SOB ESTRESSE DE ALUMÍNIO <sup>(1)</sup>

PAULO HENRIQUE PEREIRA PEIXOTO <sup>(2\*)</sup>; DANIEL SALES PIMENTA <sup>(2)</sup>; JOSÉ CAMBRAIA <sup>(3)</sup>

## RESUMO

Os efeitos do alumínio ( $Al^{+3}$ ) sobre a morfologia e o acúmulo de compostos fenólicos foram avaliados em duas cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) com tolerância diferencial ao  $Al^{+3}$ . As plantas foram mantidas em solução nutritiva durante dez dias, na presença (185 mM) ou na ausência de  $Al^{+3}$ . Os ápices radiculares foram coloridos com hematoxilina férrica, sendo a intensidade da coloração observada na presença do  $Al^{+3}$  muito próxima entre as cultivares, o que inviabiliza a aplicação desse teste, isoladamente, para discriminação entre o genótipo sensível e o tolerante ao  $Al^{+3}$ . As análises da morfologia externa e interna dos ápices radiculares de plantas tratadas com  $Al^{+3}$  também foram muito similares entre as duas cultivares, não permitindo a utilização dessas características para seleção entre a cultivar sensível e a tolerante. O maior acúmulo de lignina e, principalmente, a menor produção de compostos fenólicos, observados na presença do  $Al^{+3}$  nas raízes das plantas da cultivar tolerante (BR006R), são parâmetros que possibilitam a discriminação das cultivares quanto à tolerância ao  $Al^{+3}$ .

**Palavras-Chave:** alumínio, morfologia, fenólicos, sorgo, *Sorghum bicolor*.

## ABSTRACT

### CHANGES IN MORFOLOGY AND PHENOLICS ACCUMULATION IN SORGHUM (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) PLANTS UNDER ALUMINUM STRESS

The  $Al^{+3}$  effects on the morphology and on the phenolics accumulation were evaluated in two sorghum cultivars exhibiting differential tolerance to  $Al^{+3}$ . The plants were kept in nutrient solution, for ten days, in the presence (185 mM) or  $Al^{+3}$  absence. The root apices were colored with ferric hematoxylin, and because the intensity of color development is very similar among evaluated cultivars, the use of this method as a selection parameter for  $Al^{+3}$ -tolerance is not indicated. Analyses of superficial and internal morphology from tissues treated with  $Al^{+3}$  also expressed very similar alterations among the two cultivars, not allowing its use for selection between sensitive and  $Al^{+3}$ -tolerant genotype. The higher lignin accumulation and, mainly, the lower phenolics production in roots of the BR006R cultivar in  $Al^{+3}$ 's presence, demonstrated the existence of differential tolerance among cultivars.

**Key words:** aluminum, morphology, phenolics, sorghum, *Sorghum bicolor*.

---

<sup>(1)</sup> Parte da Tese de Doutorado em Fisiologia vegetal, apresentada pelo primeiro autor à Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG. Projeto financiado pelo CNPq e pela FAPEMIG. Recebido para publicação em 14 de fevereiro de 2006 e aceito em 3 de outubro de 2006.

<sup>(2)</sup> Departamento de Botânica, ICB, UFJF, 36036-900 Juiz de Fora (MG). E-mail: paulo.peixoto@ufjf.edu.br \*Autor correspondente; dsp@icb.ufjf.br

<sup>(3)</sup> Departamento de Biologia Geral, CCBS, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000 Viçosa (MG). Pesquisador do CNPq. E-mail: cambraia@ufv.br

## 1. INTRODUÇÃO

O alumínio ( $\text{Al}^{+3}$ ) é um dos mais abundantes metais e o terceiro elemento mais comum na crosta terrestre. Em decorrência de vários processos de acidificação, formas fitotóxicas de  $\text{Al}^{+3}$  são liberadas para a solução do solo em níveis que afetam o crescimento das plantas (KOCHIAN, 1995). Embora a toxicidade causada pelo  $\text{Al}^{+3}$  em solos ácidos tenha sido identificada como um problema há mais de 70 anos, nossos conhecimentos em relação ao sítio primário da toxicidade provocada por esse elemento ainda permanecem especulativos (DELHAIZE e RYAN, 1995).

O acúmulo de  $\text{Al}^{+3}$  em plantas sensíveis é mais intenso nas raízes. Lesões radiculares provocadas pela toxicidade desse elemento podem causar desorganização das estruturas e das funções das membranas, paralisação da síntese de DNA e das mitoses, enrijecimento das paredes celulares, redução no alongamento celular e distúrbios na assimilação e no metabolismo mineral nos ápices das raízes (TICE et al., 1992; ELEFTHERIOU et al., 1993; DELHAIZE e RYAN, 1995).

Os efeitos primários da toxicidade causada pelo  $\text{Al}^{+3}$  estão, aparentemente, relacionados à sua concentração intracelular, visto que os mecanismos de tolerância decorrem de limitações à entrada desse elemento no simplasto (LAZOF et al., 1994). A coloração das raízes das plantas com hematoxilina férrica tem sido utilizada para a detecção das regiões de acúmulo de  $\text{Al}^{+3}$  nos ápices radiculares bem como para a seleção de genótipos tolerantes (POLLE et al., 1978). Utilizando microscopia eletrônica, ELEFTHERIOU et al. (1993) observaram que os efeitos mais intensos da toxicidade causada pelo  $\text{Al}^{+3}$  no sistema radicular ocorrem nas paredes celulares da epiderme e nas células da coifa.

Efeitos sobre as células meristemáticas como, por exemplo, as reduções no crescimento das raízes, tornam-se evidentes apenas após exposição mais prolongada ao  $\text{Al}^{+3}$  (DE LIMA e COPELAND, 1994). As alterações simultâneas no alongamento e na espessura celular sugerem que os efeitos do  $\text{Al}^{+3}$ , direta ou indiretamente, afetam diversos processos relacionados à expansão celular (NICHOL et al., 1993).

LENOBLE et al. (1996) relataram que os danos causados pelo  $\text{Al}^{+3}$  podem ser prevenidos pelo boro, micronutriente relacionado à biossíntese de compostos fenólicos. O acúmulo de compostos fenólicos e o aumento na atividade da polifenol-oxidase (PPO) resultam na produção de intermediários reativos que, indiretamente, podem intensificar a produção de radicais livres (SAKIHAMA e YAMASAKI, 2002). Após tratamentos prolongados com  $\text{Al}^{+3}$ , as

raízes das plantas tornam-se escuras, o que, em parte, é decorrente da oxidação de compostos fenólicos (CAKMAK e HORST, 1991).

Em contraste, BARCELÓ et al. (2002) observaram que alguns compostos fenólicos podem formar complexos estáveis com o  $\text{Al}^{+3}$ , contribuindo para a sua desintoxicação nos tecidos. A lignina, por exemplo, contribui para a redução dos danos causados pelo  $\text{Al}^{+3}$ , o que possivelmente ocorre devido ao consumo de compostos fenólicos e de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante a sua deposição na parede celular (SASAKI et al., 1996). SAKIHAMA e YAMASAKI (2002), por sua vez, ressaltaram que, sob condições de estresse, compostos fenólicos podem atuar como antioxidantes e, em contraste, também, como moléculas pró-oxidantes, num dualismo de ação já observado para outras substâncias.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos do  $\text{Al}^{+3}$  sobre a morfologia de ápices radiculares e sobre o acúmulo de substâncias fenólicas em raízes e parte aérea de plantas de duas cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor*) com tolerância diferencial ao  $\text{Al}^{+3}$ .

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Nos experimentos, foram utilizadas duas cultivares híbridas de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) procedentes da Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas, MG, Brasil), sendo uma tolerante (BR006R) e a outra sensível (BR007A) ao  $\text{Al}^{+3}$ .

As sementes, após esterilização superficial com hipoclorito de sódio 0,5% (v/v) durante 15 minutos, foram lavadas em água corrente e em água desmineralizada sendo, então, colocadas para germinar em cartuchos de papel do tipo germiteste, pH neutro, imersos em recipientes contendo solução nutritiva de CLARK (1975), a um terço da concentração original, sob arejamento constante. Após sete dias, as plântulas foram selecionadas quanto ao tamanho e forma, sendo transferidas para vasos de polietileno, pintados externamente de preto, contendo 1,6 litros de solução nutritiva de CLARK (1975), pH 4,0, onde foram submetidas ao tratamento com  $\text{Al}^{+3}$  na concentração de 185  $\mu\text{M}$ , aplicado na forma de  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18 \text{H}_2\text{O}$ . Todos os experimentos foram desenvolvidos em sala de crescimento de plantas sob densidade de fluxo luminoso de 230  $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fotoperíodo de 16 horas, temperatura de  $25 \pm 3$  °C, sob arejamento contínuo. O pH bem como o volume das soluções nutritivas foram corrigidos diariamente.

Para ilustrar os efeitos do  $\text{Al}^{+3}$  sobre a morfologia externa dos ápices radiculares, amostras das duas cultivares de sorgo foram removidas após

dez dias de tratamento, lavadas em água corrente e em água desmineralizada e, então, imediatamente fotografadas em estereomicroscópio BX92 (Micronal). A intensidade de acúmulo do  $Al^{+3}$  nas raízes das duas cultivares foi analisada pela coloração dos ápices com hematoxilina férrica. Após exposição das plantas, em intervalos de 30, 60 e 120 minutos a tratamentos com ou sem  $Al^{+3}$ , suas raízes foram mergulhadas em solução de hematoxilina férrica 0,2% (p/v) em  $NaIO_3$  0,02% (p/v), durante 15 min (POLLE et al., 1978). Visando eliminar o excesso do corante, as plantas foram removidas e transferidas para recipientes contendo água deionizada, durante 30 minutos, sob aeração constante. Finalmente, as raízes foram coletadas e imediatamente fotografadas em estereomicroscópio BX92 (Micronal).

Para os estudos relativos à morfologia interna das raízes foram utilizadas amostras de ápices radiculares, obtidas a partir de plantas tratadas ou não com  $Al^{+3}$  durante 10 dias. As raízes foram coletadas, lavadas em água desmineralizada e imediatamente fixadas em solução de formaldeído:ácido acético glacial:etanol:água (5:5:45:45, v/v), por 2 horas. Em seguida, os ápices radiculares foram desidratados em série alcoólica progressiva e incluídos em parafina. Para o estudo em microscopia óptica, cortes de 5  $\mu m$  de espessura foram obtidos a partir do material emblocado, utilizando-se micrótomo rotativo (Jung). Os cortes foram corados com safranina e azul de astra e montados em bálsamo do Canadá, entre lâmina e lamínula (BERLYN e MIKSCHKE, 1976). As observações e a fotodocumentação foram realizadas em fotomicroscópio BX41 (Olympus).

Para determinar os efeitos do  $Al^{+3}$  sobre o acúmulo de lignina, amostras frescas de raízes e de parte aérea, pesando 0,2 g, foram coletadas em plantas expostas ou não ao  $Al^{+3}$  durante 10 dias, sendo maceradas em 5 mL de etanol 95% (v/v) e centrifugadas a 1.000 xg durante 5 minutos (SASAKI et al., 1996). O conteúdo de lignina nos tecidos foi determinado pelo método proposto por MORRISON (1972) e modificado por FUKUDA e KOMAMINE (1982), com a utilização de brometo de acetila e hidroxilamina-HCl. O teor de lignina foi expresso em unidades de absorvância a 280 nm por mg de matéria fresca (SASAKI et al., 1996).

A determinação dos teores de compostos fenólicos solúveis foi realizada a partir de amostras frescas de raízes e de parte aérea, pesando 0,5 g, coletadas em plantas expostas ou não ao  $Al^{+3}$  durante 10 dias, homogeneizadas em almofariz de porcelana na presença de 4 mL da mistura de metanol:clorofórmio:água (12:5:3, v/v) (RENGEL et al., 1993). Aliquotas dos materiais

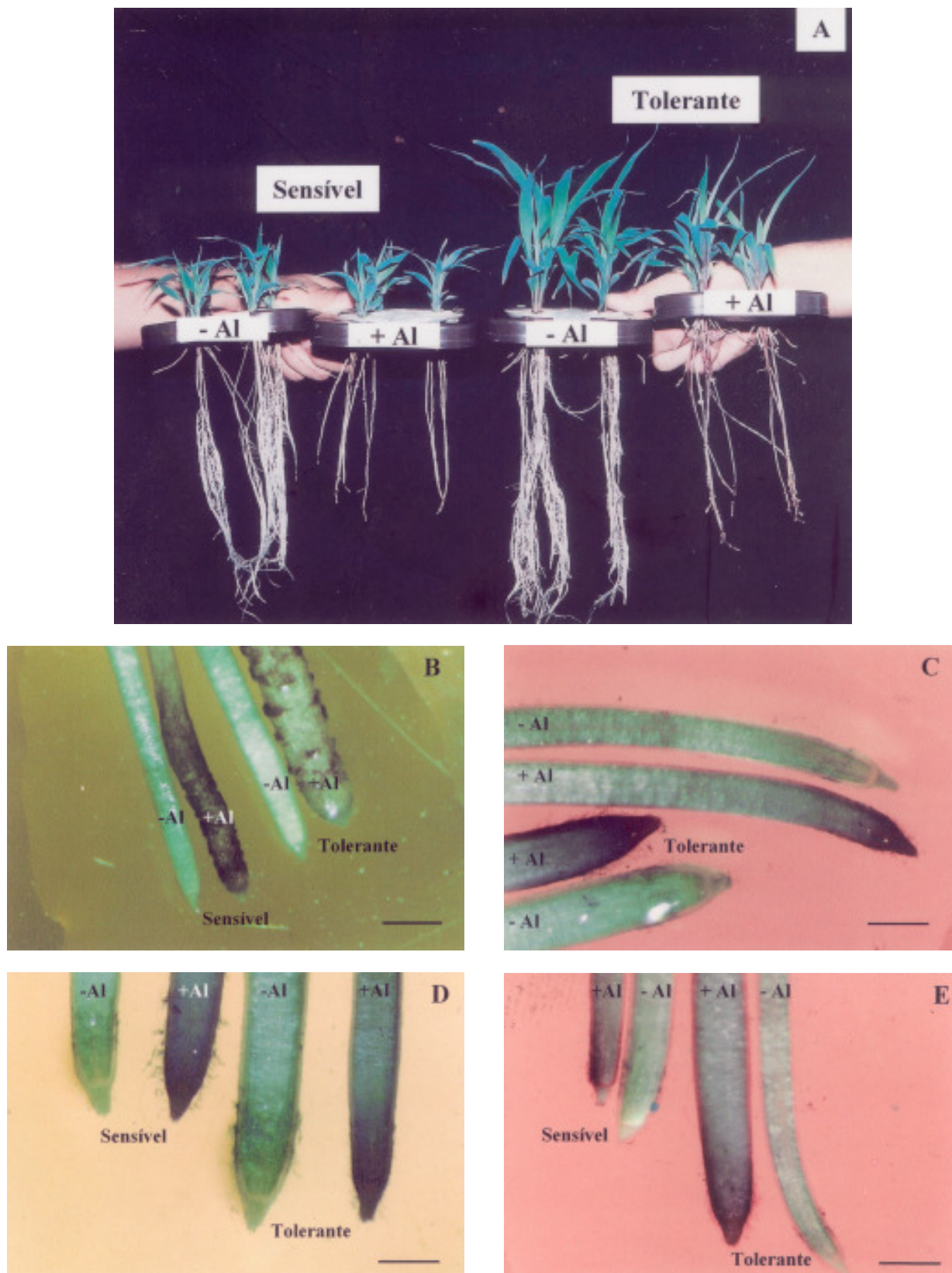
obtidos após centrifugação foram adicionadas ao reagente alcalino de Folin-Ciocalteu (JENNINGS, 1981). O teor de fenóis solúveis totais ( $\mu g g^{-1}$  de matéria fresca) foi calculado por meio de uma curva de calibração, utilizando-se a tirosina como padrão (JENNINGS, 1981).

Todos os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial (2 x 2) constituído por duas cultivares de sorgo (sensível ou tolerante) e por duas concentrações de  $Al^{+3}$  (0 ou 185  $\mu M$ ), em delineamento experimental de blocos casualizados, com três repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas plantas das duas cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor*), após a exposição ao  $Al^{+3}$  durante dez dias, observou-se decréscimo no crescimento da parte aérea e do sistema radicular, além de redução na formação de raízes laterais, o que ocorreu em maior intensidade no sistema radicular da cultivar sensível (Figura 1A). Nas folhas das plantas tratadas com  $Al^{+3}$  verificou-se coloração amarelada, característica de uma interferência sobre a biossíntese da clorofila (Ohki, 1986). Além disso, foi observado o aparecimento de tonalidades arroxeadas nas folhas (Figura 1A), principalmente nas bainhas e nas margens do limbo, sintomas característicos da deficiência do fósforo (DELHAIZE et al. 1993).

Constatou-se, também, que após exposição das plantas ao  $Al^{+3}$  por dez dias, havia desintegração de tecidos da epiderme e de porções externas do córtex nos ápices das raízes das duas cultivares (Figuras 1B e 2B,C,F). Resultados similares foram observados por WAGATSUMA et al. (1995), em raízes de ervilha, por DELIMA e COPELAND (1994), em raízes de trigo, e por LENOBLE et al. (1996), em raízes de abóbora. Em raízes tratadas com  $Al^{+3}$  ocorreu engrossamento dos ápices em ambas as cultivares (Figura 1B), sintoma também relatado por Delhaize e RYAN (1995) e por SASAKI et al. (1996) em trigo. O espessamento, aparentemente, é causado pela inibição do alongamento celular e pelo aumento no alargamento de algumas camadas de células, em particular das células do córtex (SASAKI et al., 1996). Segundo GRABSKI e SCHINDLER (1995), o enrijecimento da rede de filamentos de actina, provocado pelo  $Al^{+3}$ , interfere na divisão celular, o que também contribui para a ocorrência desses espessamentos.



**Figura 1.** Aspecto geral das plantas e morfologia externa das raízes seminais de dois cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor*) tratados ou não com Al<sup>3+</sup>. Plantas após 10 dias de cultivo (A); Detalhes das pontas de raízes após 10 dias de cultivo (B); Detalhes das pontas de raízes tratadas com hematoxilina férrica após imersão em solução nutritiva por 30 (C), 60 (D) e 120 (E) minutos. Barras = 1000 μm.

Na presença do  $Al^{+3}$ , as pontas das raízes tratadas com hematoxilina férrica apresentaram a tonalidade característica da reação do  $Al^{+3}$  com o corante (Figura 1C). A tonalidade da cor, após tratamento por 120 minutos (Figura 1E), entretanto, foi menos intensa do que após os tratamentos de 30 e 60 minutos (Figuras 1C,D), efeito também observado por VÁSQUEZ et al. (1999), em raízes de milho e por DELHAIZE et al. (1993), em raízes de trigo. A hematoxilina férrica reage com depósitos de Al-P (OWNBY, 1993), formados em ápices radiculares após exposição ao  $Al^{+3}$ . A redução na intensidade da cor no teste da hematoxilina férrica, em exposições mais prolongadas, segundo VÁSQUEZ et al. (1999), pode ser resultante do aumento na exsudação de ácidos orgânicos nos ápices radiculares, o que tornaria solúvel parte do precipitado de Al-P. Corroborando esta hipótese, MA (2000) demonstrou que a adição de ácido cítrico antes da aplicação da hematoxilina férrica inibia a formação da coloração característica e indicadora da presença de  $Al^{+3}$ . GONÇALVES et al. (2005) constataram exsudação de ácidos orgânicos em ápices radiculares tratados com  $Al^{+3}$  nas duas cultivares de sorgo utilizadas no presente experimento, o que pode explicar, pelo menos em parte, a redução na intensidade da coloração com hematoxilina férrica em tempo mais prolongado de exposição. Embora GONÇALVES (1998) tenha observado maior acúmulo de  $Al^{+3}$  nas raízes e menor exsudação de ácido málico para a solução por parte da cultivar sensível, a intensidade da reação com hematoxilina férrica nos ápices radiculares foi bastante similar entre ambas as cultivares (Figuras 1C,D,E). Uma correlação direta entre a tolerância ao  $Al^{+3}$  e a coloração das raízes com hematoxilina férrica é relatada em diversos trabalhos da literatura (POLLE et al., 1978; Wagatsuma et al., 1995; DELHAIZE et al., 1993). Todavia, RYAN et al. (1993) também não observaram diferenças de coloração entre cultivares de milhos sensíveis e tolerantes ao  $Al^{+3}$ , ressaltando que o teste com hematoxilina férrica não deve ser aplicado, isoladamente, para discriminação entre genótipos tolerantes ou não ao  $Al^{+3}$ .

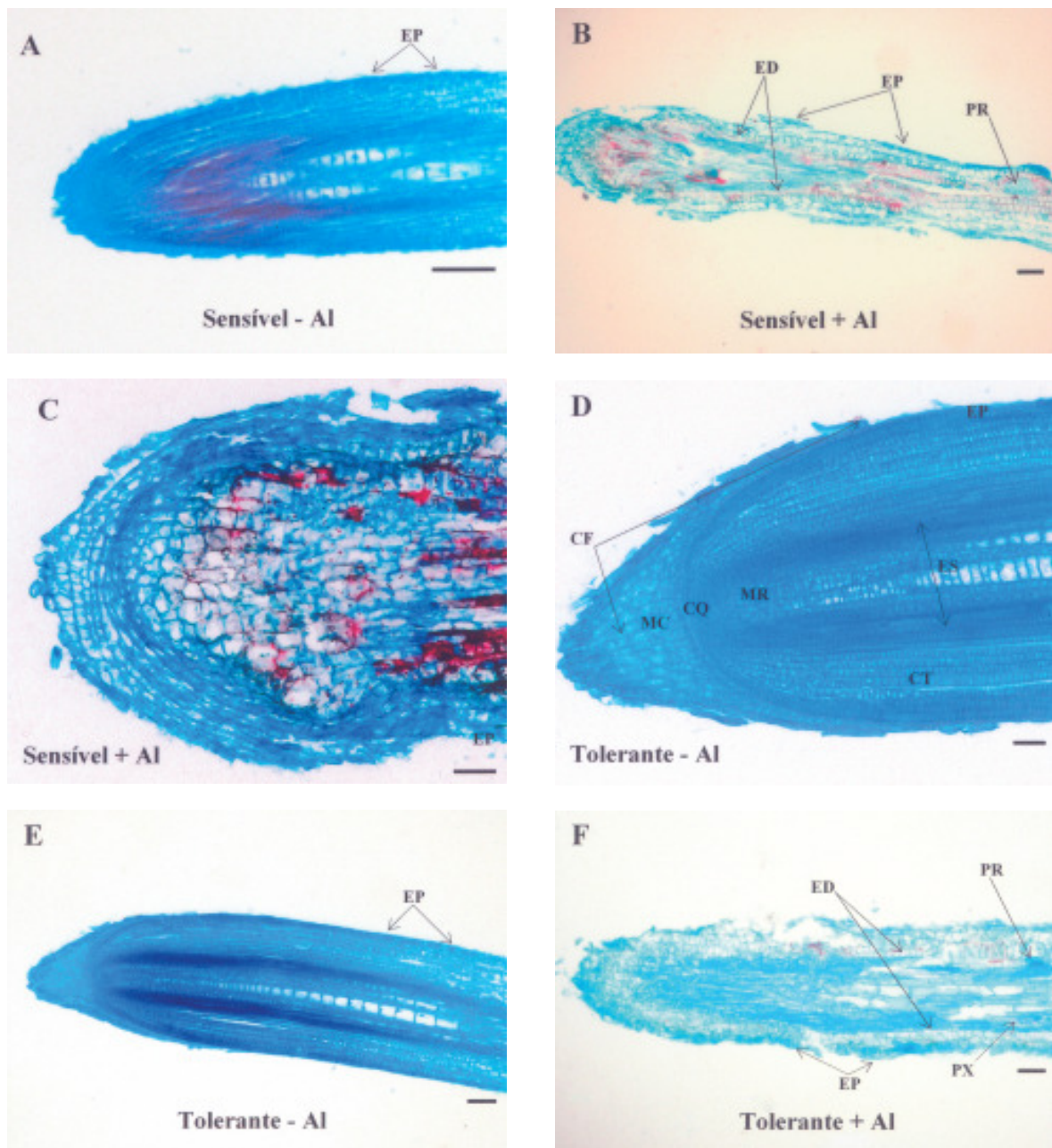
Os cortes longitudinais realizados nos ápices radiculares das plantas das duas cultivares, cultivadas na ausência do  $Al^{+3}$ , evidenciaram um desenvolvimento meristemático típico e característico de pontas de raízes das gramíneas quando cultivadas sob condições não estressantes (Figura 2A,D,E). A figura 2D ilustra, em detalhe, as regiões correspondentes ao meristema apical em plantas de sorgo não tratadas com  $Al^{+3}$ , sendo possível a identificação das regiões de divisão, alongamento e de diferenciação do meristema.

Nos cortes obtidos em ápices radiculares de plantas submetidas ao tratamento com  $Al^{+3}$ , ao contrário, notaram-se alterações morfológicas, principalmente nos tecidos da epiderme e do córtex (Figuras 2B e 2F). As células ficaram enrugadas e, nos casos mais extremos, colapsadas. Na figura 2C, é possível observar, também em detalhe, as regiões correspondentes ao meristema apical em plantas de sorgo tratadas com  $Al^{+3}$ . Esta região, segundo diversos autores (BENNET e BREEN, 1991; RYAN et al., 1993; ELEFTHERIOU et al., 1993), é a mais afetada pelo  $Al^{+3}$  sob condições de estresse. Pela figura 2C, é possível verificar redução no tamanho da coifa e desorganização do tecido meristemático, o que resultou no desaparecimento das regiões correspondentes ao meristema fundamental e ao procâmbio nos ápices radiculares, alterações também relatadas por BENNET e BREEN (1991) em raízes de plantas de milho e de alho tratadas com  $Al^{+3}$ . ELEFTHERIOU et al. (1993) também observaram a ocorrência de alterações morfológicas em raízes tratadas com  $Al^{+3}$ . Segundo esses autores, em raízes mantidas sob condições de estresse ocorreram alterações morfoestruturais, especialmente no tamanho do caliptrogênio e da zona meristemática, além de danos nas células epidérmicas e em células internas do córtex, que podem se destacar, distorcer e até mesmo colapsar, sintomas similares aos observados no presente trabalho.

Como consequência das alterações causadas pelo  $Al^{+3}$ , o tamanho dos meristemas, nas regiões de divisão e alongamento foi reduzido (Figura 2C), sendo possível observar, nessa região, tecidos já em diferenciação, com destaque para a formação de primórdios radiculares em regiões muito próximas ao ápice (Figuras 2B,F), o que, aparentemente, resulta da inibição do desenvolvimento dos meristemas apicais das raízes em plantas submetidas ao tratamento com  $Al^{+3}$  (LENOBLE et al., 1996). Embora o número de primórdios seja aumentado sob estresse de  $Al^{+3}$  (Figuras 2B,F), tal fato não resulta em maior ramificação das raízes (Figura 1A), uma vez que esses primórdios, ao entrarem em contato com o  $Al^{+3}$ , também passam a sofrer inibição (Bennet e Breen, 1991). Segundo LENOBLE et al. (1996), o  $Al^{+3}$  promove "maturação tecidual precoce" nos tecidos localizados nos ápices radiculares. Como as figuras 2A e 2D, correspondentes, respectivamente, às cultivares sensível e tolerante, mantidas na ausência de  $Al^{+3}$ , e as figuras 2B e 2F, relativas, respectivamente, às cultivares sensível e tolerante, cultivadas na presença de  $Al^{+3}$ , estão na mesma escala, é possível observar que o  $Al^{+3}$  promoveu a formação de tecidos diferenciados (protoxilema e endoderme) em regiões relativamente próximas ao ápice radicular, o que não foi observado nos cortes provenientes de plantas mantidas na ausência de  $Al^{+3}$  (Figuras 2A,D,E).

No presente trabalho, as alterações anatômicas provocadas pelo tratamento com  $Al^{+3}$  foram verificadas nos tecidos radiculares de ambas as cultivares e com intensidades semelhantes, sendo sua utilização isolada insuficiente para a discriminação entre elas quanto à tolerância ao

$Al^{+3}$ . Sugere-se, para esse fim, a necessidade da utilização de análises morfológicas mais complexas (ELEFTHERIOU et al., 1993; DELIMA e COPELAND, 1994), bem como o auxílio de estudos complementares, como os fisiológicos e/ou bioquímicos, por exemplo.



**Figura 2.** Morfologia interna das raízes seminais de dois cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor*) tratados ou não com  $Al^{+3}$  durante 10 dias. ED = endoderme; PR = primórdio radicular; EP = epiderme; CF = coifa; MC = meristema da coifa; CQ = centro quiescente; MR = Meristema radicular; ES = estelo; CT = córtex; PX = protoxilema. Barras: 100  $\mu$ m.

Na ausência de  $Al^{+3}$ , os teores de lignina nas raízes da cultivar sensível foram significativamente mais elevados do que na tolerante (Tabela 1). A exposição das plantas ao  $Al^{+3}$  resultou em aumento nos teores de lignina nos ápices radiculares, tanto na cultivar sensível (32%) quanto na tolerante (42%). Apesar de o aumento ter sido maior na tolerante, na cultivar sensível ocorreu, na presença de  $Al^{+3}$ , teor de lignina 11% mais elevado, o que pode ser verificado pela coloração mais intensa observada nas células do protoxilema e da endoderme, localizadas na região de diferenciação das raízes (Figuras 2B e 2F). Os teores de lignina nos tecidos da parte aérea não foram influenciados significativamente pelo  $Al^{+3}$ , embora as cultivares tenham diferido entre si (Tabela 1).

**Tabela 1.** Efeito do  $Al^{+3}$  sobre os teores de lignina nas duas partes da planta de duas cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor*) com tolerância diferencial ao  $Al^{+3}$

Concentração de Al ( $\mu M$ )	Lignina			
	(Unidades de Absorvância <sub>(280 nm)</sub> $mg^{-1}$ MF)		$mg^{-1}$ MF	
	Parte Aérea		Sistema Radicular	
	Sensível	Tolerante	Sensível	Tolerante
0	0,017 aB	0,019 aA	0,031 bA	0,026 bB
185	0,017 aB	0,019 aA	0,041 aA	0,037 aB

As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas na linha, para cada parte da planta, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O acúmulo de lignina em tecidos de plantas tem sido associado a diferentes tipos de estresses ambientais, incluindo de  $Al^{+3}$  (SIEGEL, 1993). Segundo SNOWDEN e GARDNER (1993), uma explicação para esse aumento no teor de lignina pode ser a capacidade de o  $Al^{+3}$  induzir a expressão de um gene que codifica uma proteína com alta homologia de seqüência para a fenilalanina amônia-liase (PAL), enzima considerada precursora da síntese de substâncias fenólicas.

Segundo SASAKI et al. (1996), a deposição de lignina em plantas tratadas com  $Al^{+3}$  ocorre nas células correspondentes à zona de alongamento, o que também foi observado no presente trabalho (Figuras 2B,F). Embora SASAKI et al. (1996) não considerem a deposição de lignina em tecidos radiculares uma resposta primária aos efeitos tóxicos do  $Al^{+3}$ , eles sugerem que esse processo pode contribuir indiretamente para a redução dos danos às membranas celulares.

Na parte aérea, ao contrário do observado para o sistema radicular, na cultivar sensível verificou-se teor de fenóis 30% mais elevado do que na tolerante (Tabela 2). Nessa parte da planta, o  $Al^{+3}$ , também,

provocou aumento no teor de fenóis, mas em menor intensidade do que no sistema radicular. Na cultivar sensível, o aumento foi de 57%, e na tolerante, de 47%. Na presença de  $Al^{+3}$ , a cultivar sensível passou a ter um teor de fenóis ainda maior do que a tolerante. Na presença do  $Al^{+3}$ , os teores de fenóis aumentaram nas raízes das duas cultivares (Tabela 2), sendo o aumento na cultivar sensível mais intenso (seis vezes) do que na tolerante (duas vezes). No sistema radicular das plantas mantidas em ausência de  $Al^{+3}$ , na cultivar tolerante ocorreu um teor de fenóis solúveis totais cerca de três vezes maior do que na sensível.

**Tabela 2.** Efeito do  $Al^{+3}$  sobre o teor de compostos fenólicos solúveis nas duas partes da planta de duas cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor*) com tolerância diferencial ao  $Al^{+3}$

Concentração de Al ( $\mu M$ )	Fenóis solúveis totais ( $\mu g g^{-1}$ MF)			
	Parte Aérea		Sistema Radicular	
	Sensível	Tolerante	Sensível	Tolerante
0	214,9 bA	165,3 bB	58,0 bB	173,2 bA
185	337,3 aA	243,1 aB	410,0 aB	550,8 aA

As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas na linha, para cada parte da planta, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Esses resultados não evidenciaram a existência de correlação direta entre o acúmulo de lignina (Tabela 1) e de compostos fenólicos solúveis (Tabela 2) nas raízes das plantas das duas cultivares em presença de  $Al^{+3}$ . Tal fato permite sugerir que, na cultivar sensível, uma parcela considerável desses compostos fenólicos pode ter originado ou funcionado como substrato para moléculas pró-oxidantes (CAKMAK e HORST, 1991; SAKIHAMA e YAMASAKI, 2002). Embora BARCELÓ et al. (2002) considerem a exsudação de compostos fenólicos e a sua ligação intracelular ao  $Al^{+3}$  mecanismos de desintoxicação (KIDD et al., 2001), SAKIHAMA e YAMASAKI (2002) associaram a peroxidação de lipídios em raízes de cevada à atuação conjunta do  $Al^{+3}$  e de compostos fenólicos, sendo esses compostos considerados moléculas pró-oxidantes.

Parte do acúmulo de fenóis solúveis observado no presente trabalho pode ser resultante da interação entre o  $Al^{+3}$  e o boro (B). O  $Al^{+3}$  induz deficiência de B (LENOBLE et al., 1996) e essa deficiência resulta em acúmulo de fenóis (DIXON e PAIVA, 1995). O acúmulo de fenóis, portanto, pode ser resultante tanto da deficiência de B quanto da toxidez de  $Al^{+3}$ . Ambos os fatores provocam o aumento na atividade da polifenoloxidase (PPO), enzima que, segundo MAYER (1987), pode estar relacionada à degradação da lignina sob condições de estresses.

Essa correlação de causa-efeito, contudo, carece de maiores evidências, uma vez que não fica claro se a ação do  $Al^{+3}$  é direta, sobre a atividade da enzima, ou indireta, pela indução da deficiência de B. Segundo SASAKI et al. (1996), a redução na peroxidação dos lipídios parece estar relacionada aos mecanismos celulares de remoção de  $H_2O_2$  e de imobilização de compostos fenólicos, substâncias potencialmente tóxicas e cuja concentração é aumentada nos tecidos dessas cultivares na presença do  $Al^{+3}$ .

O intenso acúmulo de fenóis e o menor acúmulo de lignina observado nas raízes da cultivar sensível em resposta ao  $Al^{+3}$  corroboram os resultados obtidos por PEIXOTO et al. (1999), em estudo anterior envolvendo as mesmas cultivares de sorgos utilizadas no presente trabalho. Naquele trabalho, foi observada menor intensidade de peroxidação de lipídios nos tecidos radiculares da cultivar tolerante, o que foi atribuído à menor produção de espécies reativas de oxigênio e/ou à existência de mecanismos enzimáticos de remoção e/ou de eliminação de radicais livres mais eficientes do que na cultivar sensível.

Aparentemente, o maior acúmulo de compostos fenólicos nos tecidos radiculares da cultivar sensível influencia negativamente a atividade de enzimas do metabolismo oxidativo, aumentando a produção de radicais tóxicos de oxigênio, o que tem reflexo direto sobre a peroxidação de lipídios e sobre a sensibilidade das plantas ao  $Al^{+3}$  (ZHANG e KIRKHAM, 1996).

#### 4. CONCLUSÕES

1. O teste da hematoxilina férrica e as análises morfoanatômica não discriminam as cultivares de sorgo quanto à tolerância ao  $Al^{+3}$ .

2. O maior acúmulo de lignina e, principalmente, a menor produção de compostos fenólicos solúveis nas raízes da cultivar BR006R, em resposta ao  $Al^{+3}$ , evidenciam a maior tolerância desse genótipo a esse elemento tóxico.

#### AGRADECIMENTOS

Aos professores Eldo Antônio Monteiro da Silva e Aristéa Alves de Azevedo pelo auxílio na realização dos estudos morfológicos. Ao CNPq e à FAPEMIG pelo auxílio financeiro para a realização da pesquisa e à CAPES pela concessão de Bolsa de Doutorado ao primeiro autor.

#### REFERÊNCIAS

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**, Amsterdam, v. 48, n. 1, p. 75-92, 2002.

BENNET, B. J.; BREEN, C.M. The recovery of the roots of *Zea mays* L. from various aluminium treatments: towards elucidating the regulatory processes that underlie root growth control. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 31, n. 2, p. 153-163, 1991.

BERLYN, G. P.; MIKSCH, J.P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Iowa: The Iowa State University Press, 1976. 326 p.

CAKMAK, I.; HORST, J.H. Effects of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 83, n. 3, p. 463-468, 1991.

CLARK, R.B. Characterization of phosphatase of intact maize roots. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 23, n. 3, p. 458-460, 1975.

DELHAIZE, E.; CRAIG, S.; BEATON, C.D.; BENNET, R.J.; JAGADISH, V.C.; RANDALL, P.J. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). I. uptake and distribution of aluminum in root apices. **Plant Physiology**, Rockville, v. 103, n. 3, p. 685-693, 1993.

DELHAIZE, E.; RYAN, P.R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 107, n. 2, p. 315-321, 1995.

DeLIMA, M.L.; COPELAND, L. Changes in the ultrastructure of the root tip of wheat following exposure to aluminium. **Australian Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v. 21, n. 1, p. 85-94, 1994.

DIXON, R.A.; PAIVA, N. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**, Rockville, v. 7, n. 7, p. 1085-1097, 1995.

ELEFThERIOU, P.E.; MOUSTAKAS, M.; GRAGISKOS, N. Aluminate-induced changes in morphology and ultrastructure of *Thinopyrum* roots. **Journal of Experimental and Botany**, London, v. 44, n. 2, p. 427-436, 1993.

FUKUDA, H.; KOMAMINE, A. Lignin synthesis and its related enzymes as markers of tracheary-element differentiation in single cells isolated from the mesophyll on *Zinnia elegans*. **Planta**, Berlin, v. 55, n. 5, p. 423-430, 1982.

GONÇALVES, J.F.C. **Produção de ácidos orgânicos e tolerância do sorgo a toxicidade do alumínio**. 1998. 95 f. Dissertação (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.



- GONÇALVES, J.F.C.; CAMBRAIA, J.; MOSQUIM, P.R.; ARAÚJO, E.F. Aluminum effect on the organic acid and accumulation in sorghum. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 28, n. 3, p. 507-520, 2005.
- GRABSKI, S.; SCHINDLER, M. Aluminum induces rigor within the actin network of soybean cells. **Plant Physiology**, Rockville, v. 108, n. 3, p. 897-901, 1995.
- JENNINGS, A.C. The determination of dihydroxy phenolic compounds in extracts of plant tissues. **Analytic Biochemical**, Orlando, v. 118, n. 2, p. 396-398, 1981.
- KIDD, P.S.; LLUGAY, M.; POSCHENRIEDER, C.; GUNSE, B.; BARCELÓ, J. The role of root exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L.). **Journal of Experimental Botany**, London, v. 52, n. 359, p. 1339-1352, 2001.
- KOCHIAN, L. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Review Plant Physiology Molecular Biology**, Palo Alto, v. 46, p. 237-260, 1995.
- LAZOF, D.B.; GOLDSMITH, J.G.; RUFTY, T.W.; LINTON, R.W. Rapid uptake of aluminum into cells of intact soybean root tips. A microanalytical study using secondary ion mass spectroscopy. **Plant Physiology**, Rockville, v. 106, n. 3, p. 1107-1114, 1994.
- LeNOBLE, M.E.; BLEVINS, D.G.; SHARP, R.E.; CUMBIE, B.G. Prevention of aluminium toxicity with supplemental boron. I. maintenance of root elongation and cellular structure. **Plant Cell Environment**, Oxford, v. 19, n. 10, p. 1132-1142, 1996.
- MA, J.F. Role of organic acids in detoxification of Al in higher plant. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v. 41, n. 4, p. 383-390, 2000.
- MAYER, A.M. Polyphenol oxidase in plants – recent progress. **Phytochemistry**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 11-20, 1987.
- MORRISON, I.M. A semi-micro method for the determination of lignin and its use in predicting the digestibility of forage crops. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 23, n. 5, p. 455-463, 1972.
- NICHOL, E.; OLIVEIRA, L.A.; GLASS, A.D.M.; SIDDIQI, M.Y. (1995). The effects of aluminum on the influx of calcium, potassium, ammonium, nitrate, and phosphate in an aluminum-sensitive cultivar of barley (*Hordeum vulgare* L.). **Plant Physiology**, Rockville, v. 101, n. 4, p. 1263-1266, 1993.
- OHKI, K. Photosynthesis, chlorophyll, and transpiration responses in aluminum stressed wheat and sorghum. **Crop Science**, Madison, v. 26, n. 3, p. 572-575, 1986.
- OWNBY, J.D. Mechanisms of reaction of hematoxylin with aluminium-treated wheat roots. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 87, n. 3, p. 371-380, 1993.
- PEIXOTO, P.H.P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANNA, R.; MOSQUIM, P.R.; MOREIRA, M.A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 11, n. 3, p. 137-143, 1999.
- POLLE, E.; KONZAK, C.F.; KITTRICK, J.A. Visual detection of aluminum tolerance levels in wheat by hematoxylin staining of seedling roots. **Crop Science**, Madison, v. 18, n. 5, p. 823-827, 1978.
- RENGEL, Z.; GRAHAM, R.D.; PEDLER, J.F. Manganese nutrition and accumulation of phenolics and lignin as related to differential resistance of wheat genotypes to the take-all fungus. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 151, n. 2, p. 255-263, 1993.
- RYAN, P.R.; DITOMASO, J.M.; KOCHIAN, L.V. Aluminium toxicity in roots: an investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. **Journal Experimental Botany**, London, v. 44, n. 259, p. 437-446, 1993.
- SAKIHAMA, Y.; YAMASAKI, H. Lipid peroxidation induced by phenolics in conjunction with aluminum ions. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 45, n. 2, p. 249-254, 2002.
- SASAKI, M.; YAMAMOTO, Y.; MATSUMOTO, H. Lignin deposition induced by aluminium in wheat (*Triticum aestivum*) roots. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 96, n. 2, p. 193-198, 1996.
- SIEGEL, B.Z. Plant peroxidase - an organismic perspective. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 12, n. 3, p. 303-312, 1993.
- SNOWDEN, K.C.; GARDNER, R.C. Five genes induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. **Plant Physiology**, Rockville, v. 103, n. 3, p. 855-861, 1993.
- TICE, K.R.; PARKER, D.R.; DeMASON, D. Operationally defined apoplastic and symplastic aluminum fractions in root tips of aluminum-intoxicated wheat. **Plant Physiology**, Rockville, v. 100, n. 1, p. 309-318, 1992.
- VÁSQUEZ, 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**, Rockville, v. 119, n. 2, p. 435-444, 1999.
- WAGATSUMA, T.; ISHIKAWA, S.; OBATA, H.; TAWARAYA, K.; KATOHDA, S. Plasma membrane of younger and outer cells is the primary specific site for aluminium toxicity in roots. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 171, n. 1, p. 105-112, 1995.
- ZHANG, J.; KIRKHAM, M.B. Lipid peroxidation in sorghum and sunflower seedlings as affected by ascorbic acid, benzoic acid, and propyl gallate. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 149, n. 5, p. 489-493, 1996.