

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Agronomia



Tese

**Caracterização de cultivares de arroz (*Oryza sativa*
L.) quanto ao estresse por alumínio e análise da
expressão do gene *OsFRDL1***

Denise dos Santos Colares

Pelotas, 2009.

DENISE DOS SANTOS COLARES

**Caracterização de cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.)
quanto ao estresse por alumínio e análise da expressão do
gene *OsFRDL1***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área do conhecimento: Fitomelhoramento).

Orientador: Antônio Costa de Oliveira, Ph.D - FAEM/UFPel

Co-orientadores: Fernando Irajá Félix de Carvalho, Ph.D

Ana Lúcia Soares Chaves, Ph.D – IQG/UFPel

Pelotas, 2009.

Dados de catalogação na fonte:

(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

C683c Colares, Denise dos Santos

Caracterização de cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) quanto ao estresse por alumínio e análise da expressão do gene *OsFRDL1* / Denise dos Santos Colares. - Pelotas, 2009.

109f. : il.

Tese (Doutorado) –Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. - Pelotas, 2009, Antônio Costa de Oliveira, Orientador; co-orientadores Fernando Irajá Félix de Carvalho e Ana Lúcia Soares Chaves.

1.*Oryza sativa* L. 2. Variabilidade genética 3. Análise multivariada 4. Mecanismos de tolerância 5. MATE 6. Estresse abiótico I Oliveira, Antônio Costa de (orientador) II .Título.

CDD 633.18

Banca examinadora:

Antônio Costa de Oliveira, Ph.D –FAEM/UFPeI (presidente)

José Fernandes Barbosa Neto, Ph.D - UFRGS

Rosa Lía Barbieri, Dra. – Embrapa Clima Temperado

Ariano Martins de Magalhães Jr., Dr. - Embrapa Clima Temperado

Ana Lúcia Soares Chaves, Ph.D – IQG/UFPeI

Aos meus pais Moacir José e Luiza;

Aos meus irmãos Cláudia e Paulo Renato e minha cunhada Marisa;

Aos meus sobrinhos Helena e João;

pelos exemplos que são para a minha vida e pelo seu amor incondicional.

Ao meu noivo Cláudio Roberto

por compartilhar a sua vida comigo.

Dedico

Agradecimentos

A Deus, sentido para a vida.

Ao Professor Antônio Costa de Oliveira por sua orientação, preciosa confiança e constante incentivo, o meu reconhecimento eterno.

Ao Professor Fernando Irajá Félix de Carvalho pelo entusiasmo permanente na transmissão dos conhecimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (FAEM/UFPeI) pela possibilidade de realização deste curso.

Ao colega e amigo Professor Luciano do Amarante pelo incentivo permanente.

À colega e amiga Professora Ana Lúcia Soares Chaves pelo apoio constante.

Ao pesquisador Ariano Martins de Magalhães Jr., da Embrapa Clima Temperado, pela cedência das sementes utilizadas neste trabalho.

Aos colegas do Centro de Genômica e Fitomelhoramento, com os quais muito aprendi nesses anos de convivência.

Ao colega Luciano Carlos da Maia pelo auxílio nunca negado na área de bioinformática.

Ao professor José Antônio Gonzalez da Silva pelo apoio na execução dos primeiros experimentos.

À amiga Giselle Mendes Camargo pelo aprendizado conjunto na execução da PCR em Tempo Real.

Aos Professores Andréa Miyasaka de Almeida e Marco Antônio Oliva Cano, da Universidade Federal de Viçosa, pelo apoio prestado durante minha estada naquela universidade.

A Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida para intercâmbio dentro do projeto de cooperação UFPel/UFV.

Aos colegas do Departamento de Bioquímica pela liberação e apoio para a realização deste curso.

A todos que, mesmo de maneira simples, me auxiliaram durante estes anos.

Resumo

COLARES, Denise dos Santos. **Caracterização de cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) quanto ao estresse por alumínio e análise da expressão do gene *OsFRDL1***. 2009. 109f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O alumínio é o metal mais abundante da crosta terrestre, estando presente, em sua maior parte, sob formas não prejudiciais às plantas. Condições de reduzido pH, entretanto, originam a espécie fitotóxica Al^{3+} , que se constitui em um dos principais fatores limitantes à produção agrícola em solos ácidos. O principal sintoma da toxidez causada por alumínio é um rápido decréscimo no crescimento radicular, dificultando a absorção de água e nutrientes pela planta. O arroz é considerado, dentre as culturas de importância econômica, como uma das mais tolerantes a esse metal. Apesar disso, os mecanismos dessa elevada tolerância não são ainda conhecidos. Por outro lado, seu genoma é modelo para as poáceas, além de apresentar elevada sintonia com essa família de plantas. Com o objetivo de caracterizar 30 cultivares de arroz quanto à tolerância ao alumínio, as mesmas foram submetidas a quatro níveis do metal em solução nutritiva. Através de análise multivariada, foi avaliada a variabilidade existente entre os genótipos. Com base na resposta ao estresse, dez cultivares foram escolhidas para serem analisadas em relação ao aumento no tempo de exposição a diferentes doses de alumínio. Por fim, foi avaliada a expressão do gene *OsFRDL1* em dois genótipos contrastantes quanto à tolerância ao alumínio. Foi verificada variabilidade em relação à tolerância ao alumínio entre as 30 cultivares. As mais tolerantes foram IAC 500, BRS Liderança e BRS Curinga, enquanto as mais sensíveis foram BR-IRGA 410, IAS 12-9 Formosa e Arroz da Terra. BRS Curinga, BRS Liderança e IAC 500, tolerantes ao alumínio, apresentaram elevada similaridade genética e são promissores para serem utilizados em cruzamentos que visem à obtenção de progênies superiores para tolerância ao alumínio. Através do experimento que combinou doses de alumínio x tempos de exposição foi possível verificar que os genótipos respondem de forma diferenciada ao aumento no tempo de exposição às diferentes concentrações de alumínio. A melhor combinação para diferenciar genótipos foi de 48 horas de exposição a 14 mg L^{-1} de alumínio. A expressão do gene *OsFRDL1* foi maior na cultivar Farroupilha, tolerante ao alumínio, do que na BR-IRGA 410, sensível ao metal.

Palavras-chave: Variabilidade genética. Análise multivariada. Mecanismos de tolerância. MATE. Estresse abiótico.

Abstract

COLARES, Denise dos Santos. **Characterization of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars in relation to aluminum stress and analysis of the expression of the gene *OsFRDL1***. 2009. 109p. Thesis (Doctor of Science) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Aluminum is the most abundant metal in the earth's crust. Under acidic conditions, aluminum is solubilized to its ionic form, which shows toxicity to plants. Aluminum rapidly inhibits root elongation and subsequently the uptake of water and nutrients, resulting in significant reduction of crop production on acid soils. Rice is one of the most aluminum-tolerant species among economically important crops. However, the physiological mechanism responsible for the high aluminum tolerance in rice has not been elucidated. On the other hand, rice genome is a model for the Poaceae and shows high synteny with this family of plants. In this work, 30 rice cultivars were evaluated under four aluminum concentrations in hydroponic system. The genetic variability between the rice cultivars was evaluated through multivariate analysis. According to the tolerance response observed, 10 genotypes were selected to be evaluated in relation to a dose x time of exposition experiment. Finally, the expression of the gene *OsFRDL1* was quantified in two rice cultivars differing in aluminum tolerance. There was variability in relation to aluminum tolerance between the 30 rice cultivars evaluated. The most tolerant genotypes were IAC 500, BRS Liderança and BRS Curinga and the sensitive ones were BR-IRGA 410, IAS 12-9 Formosa and Arroz da Terra. The tolerant cultivars IAC 500, BRS Liderança and BRS Curinga showed high genetic similarity and are promising genotypes for crosses aiming to increase aluminum tolerance in the progenies. Cultivars responded in a different way to the dose x time of exposition to aluminum experiment. Forty-eight hours of exposition to a solution containing an aluminum concentration of 14 mg L⁻¹ showed to be the best combination of treatments to perform the screening of tolerant and sensitive cultivars. The expression of the gene *OsFRDL1* was higher in the aluminum tolerant cultivar Farroupilha than in the aluminum-sensitive cultivar BR-IRGA 410.

Keywords: Genetic variability. Multivariate analysis. Tolerance mechanisms. MATE. Abiotic stress.

Lista de Figuras

Capítulo I. Reação de tolerância ao alumínio em cultivares de arroz de diferentes sistemas de cultivo sob condições de hidroponia.

- Figura 1 Comprimento de raiz de cultivares de arroz agrupadas por sistema de cultivo, submetidos a diferentes concentrações de alumínio em hidroponia..... 31

Capítulo II. Variabilidade genética entre cultivares de arroz submetidas a diferentes concentrações de alumínio em cultivo hidropônico.

- Figura 1 Dendrograma representativo da dissimilaridade genética de 30 genótipos de arroz para variáveis avaliadas sob estresse por alumínio na concentração de 0 mg L⁻¹ (controle), resultante da análise de conglomeração obtida pelo método da distância média entre genótipos, utilizando Mahalanobis como medida de dissimilaridade..... 48
- Figura 2 Dendrograma representativo da dissimilaridade genética de 30 genótipos de arroz para variáveis avaliadas sob estresse por alumínio na concentração de 7 mg L⁻¹ (controle), resultante da análise de conglomeração obtida pelo método da distância média entre genótipos, utilizando Mahalanobis como medida de dissimilaridade..... 49
- Figura 3 Dendrograma representativo da dissimilaridade genética de 30 genótipos de arroz para variáveis avaliadas sob estresse por alumínio na concentração de 14 mg L⁻¹ (controle), resultante da análise de conglomeração obtida pelo método da distância média entre genótipos, utilizando Mahalanobis como medida de dissimilaridade..... 50

Figura 4	Dendrograma representativo da dissimilaridade genética de 30 genótipos de arroz para variáveis avaliadas sob estresse por alumínio na concentração de 28 mg L ⁻¹ (controle), resultante da análise de conglomeração obtida pelo método da distância média entre genótipos, utilizando Mahalanobis como medida de dissimilaridade.....	51
Capítulo III. Efeito da concentração de alumínio e do tempo de exposição sobre o crescimento de plântulas de arroz em cultivo hidropônico.		
Figura 1	Efeito do aumento no tempo de exposição a quatro concentrações de alumínio sobre o comprimento de raiz de 10 genótipos de arroz.....	74
Capítulo IV. Expressão de <i>OsFRDL1</i>, pertencente à família gênica MATE, em genótipos de arroz contrastantes quanto à resposta ao estresse por alumínio.		
Figura 1	Relação filogenética entre os genes <i>AtFRD3</i> , <i>HvAACT</i> e <i>SbMATE</i> e seus homólogos em arroz.....	83
Figura 2	Comprimento de raiz (cm) do genótipo de arroz BR-IRGA 410 submetido a diferentes tempos de exposição às concentrações de 0 e 14 mg L ⁻¹ de alumínio em sistema de cultivo hidropônico.....	90
Figura 3	Comprimento de raiz (cm) do genótipo de arroz BRS Curinga submetido a diferentes tempos de exposição às concentrações de 0 e 14 mg L ⁻¹ de alumínio em sistema de cultivo hidropônico... ..	91
Figura 4	Comprimento de raiz (cm) do genótipo de arroz Farroupilha submetido a diferentes tempos de exposição às concentrações de 0 e 14 mg L ⁻¹ de alumínio em sistema de cultivo hidropônico.....	92
Figura 5	Comprimento de raiz (cm) do genótipo de arroz IAS 12-9 Formosa submetido a diferentes tempos de exposição às concentrações de 0 e 14 mg L ⁻¹ de alumínio em sistema de cultivo hidropônico.....	92

Figura 6	Curva padrão da PCR em Tempo Real realizada a partir de diluições do cDNA de raízes do genótipo BR-IRGA 410 no tempo 0h de exposição ao alumínio e os seus respectivos valores de Ct para o gene <i>OsFRDL1</i>	94
Figura 7	Curva padrão da PCR em Tempo Real realizada a partir de diluições do cDNA de raízes do genótipo BR-IRGA 410 no tempo 0h de exposição ao alumínio e os seus respectivos valores de Ct para o gene <i>UBQ5</i>	95
Figura 8	Valores de ΔCt ($Ct_{OsFRDL1} - Ct_{UBQ5}$) em relação ao logaritmo das diluições do cDNA de raízes do genótipo BR-IRGA 410 no tempo 0h de exposição ao alumínio.....	96
Figura 9	Expressão do gene <i>OsFRDL1</i> no genótipo de arroz BR-IRGA 410 submetido a diferentes tempos de exposição (h) a 14 mg L ⁻¹ de alumínio em solução nutritiva.....	97
Figura 10	Expressão do gene <i>OsFRDL1</i> no genótipo de arroz Farroupilha submetido a diferentes tempos de exposição (h) a 14 mg L ⁻¹ de alumínio em solução nutritiva.....	98

Lista de Tabelas

Capítulo I. Reação de tolerância ao alumínio em cultivares de arroz de diferentes sistemas de cultivo sob condições de hidroponia.

Tabela 1	Cultivares de arroz de dois sistemas de cultivo empregados no estudo de caracterização quanto à tolerância ao alumínio em cultivo hidropônico.....	23
Tabela 2	Resumo da análise de variância para o caráter comprimento de raiz (CR) de 30 cultivares de arroz submetidas a diferentes doses de alumínio na solução e de forma individual fixando o fator dose...	25
Tabela 3	Comprimento de raiz (cm) de 30 cultivares de arroz submetidas a quatro doses de alumínio em cultivo hidropônico.....	27
Tabela 4	Parâmetros das equações de regressão linear e quadrática: interceptação no eixo y (a), coeficiente de regressão linear (b_1) e quadrático (b_2) e coeficiente de determinação (R^2) de 30 genótipos de arroz submetidos a quatro concentrações de alumínio em hidroponia para a variável comprimento de raiz.....	33

Capítulo II. Variabilidade genética entre cultivares de arroz submetidas a diferentes concentrações de alumínio em cultivo hidropônico.

Tabela 1	Relação dos genótipos de arroz utilizados no experimento.....	43
Tabela 2	Resumo da análise de variância univariada para os caracteres avaliados em arroz submetido a diferentes concentrações de alumínio em solução nutritiva.....	47
Tabela 3	Agrupamento dos 30 genótipos de arroz pelo método de Tocher com base nos caracteres comprimento de raiz, comprimento de parte aérea, comprimento de coleóptilo, comprimento da 1ª. folha, inserção da 1ª. folha, comprimento da 2ª. folha e número de raízes no nível de 0 mg L ⁻¹ de alumínio (controle).....	52

Tabela 4	Agrupamento dos 30 genótipos de arroz pelo método de Tocher com base nos caracteres comprimento de raiz, comprimento de parte aérea, comprimento de coleóptilo, comprimento da 1ª. folha, inserção da 1ª. folha, comprimento da 2ª. folha e número de raízes no nível de 7 mg L ⁻¹ de alumínio.....	53
Tabela 5	Agrupamento dos 30 genótipos de arroz pelo método de Tocher com base nos caracteres comprimento de raiz, comprimento de parte aérea, comprimento de coleóptilo, comprimento da 1ª. folha, inserção da 1ª. folha, comprimento da 2ª. folha e número de raízes no nível de 14 mg L ⁻¹ de alumínio.....	54
Tabela 6	Agrupamento dos 30 genótipos de arroz pelo método de Tocher com base nos caracteres comprimento de raiz, comprimento de parte aérea, comprimento de coleóptilo, comprimento da 1ª. folha, inserção da 1ª. folha, comprimento da 2ª. folha e número de raízes no nível de 28 mg L ⁻¹ de alumínio.....	55
Tabela 7	Contribuição relativa para a dissimilaridade genética, dada em valores absolutos (S.j.) e em percentagem, dos caracteres: comprimento de raiz (CR), comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de coleóptilo (CC), comprimento da 1ª. folha (CPF), inserção da 1ª. folha (IPF), comprimento da 2ª. folha (CSF) e número de raízes (NR) avaliados em plântulas de arroz submetidas a diferentes níveis de alumínio em solução nutritiva.....	56
Tabela 8	Estimativas de correlação de Pearson entre a variável comprimento de raiz (CR) e comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de coleóptilo (CC), comprimento da 1ª. folha (CPF), inserção da 1ª. folha (IPF), comprimento da 2ª. folha (CSF) e número de raízes (NR) avaliados em plântulas de arroz submetidas a diferentes níveis de alumínio em solução nutritiva.....	57

Capítulo III. Efeito da concentração de alumínio e do tempo de exposição sobre o crescimento de plântulas de arroz em cultivo hidropônico.

Tabela 1	Relação dos genótipos utilizados no experimento.....	66
Tabela 2	Resumo da análise de variância para o caráter comprimento de raiz (CR) de 10 cultivares de arroz submetidos a diferentes doses de alumínio na solução por diferentes tempos de exposição.....	68
Tabela 3	Comparação de médias para o caráter comprimento de raiz de 10 genótipos de arroz submetidos às concentrações de 0, 14, 28 e 40 mg L ⁻¹ de alumínio considerando os efeitos simples de genótipo, tempo de exposição e dose.....	69
Tabela 4	Parâmetros das equações de regressão linear e quadrática: interceptação no eixo y (a), coeficiente de regressão linear (b ₁) e quadrático (b ₂) e coeficiente de determinação (R ²) de 10 genótipos de arroz submetidos a quatro tempos de exposição a 0 mg L ⁻¹ de alumínio em hidroponia para a variável comprimento de raiz.....	70
Tabela 5	Parâmetros das equações de regressão linear e quadrática: interceptação no eixo y (a), coeficiente de regressão linear (b ₁) e quadrático (b ₂) e coeficiente de determinação (R ²) de 10 genótipos de arroz submetidos a quatro tempos de exposição a 14 mg L ⁻¹ de alumínio em hidroponia para a variável comprimento de raiz.....	71
Tabela 6	Parâmetros das equações de regressão linear e quadrática: interceptação no eixo y (a), coeficiente de regressão linear (b ₁) e quadrático (b ₂) e coeficiente de determinação (R ²) de 10 genótipos de arroz submetidos a quatro tempos de exposição a 28 mg L ⁻¹ de alumínio em hidroponia para a variável comprimento de raiz.....	72
Tabela 7	Parâmetros das equações de regressão linear e quadrática: interceptação no eixo y (a), coeficiente de regressão linear (b ₁) e quadrático (b ₂) e coeficiente de determinação (R ²) de 10 genótipos de arroz submetidos a quatro tempos de exposição a 40 mg L ⁻¹ de alumínio em hidroponia para a variável comprimento de raiz.....	73

Sumário

Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tabelas.....	xi
Sumário.....	xiv
1. Introdução Geral.....	16
2. Capítulo I. Reação de tolerância ao alumínio em cultivares de arroz de diferentes sistemas de cultivo sob condições de hidroponia.....	20
2.1 Introdução.....	20
2.2 Material e métodos.....	23
2.3 Resultados e discussão.....	25
2.4 Conclusões.....	37
2.5. Referências bibliográficas.....	38
3. Capítulo II. Variabilidade genética entre cultivares de arroz submetidas a diferentes concentrações de alumínio em cultivo hidropônico.....	41
3.1 Introdução.....	41
3.2 Material e métodos.....	43
3.3 Resultados e discussão.....	46
3.4 Conclusões.....	60
3.5. Referências bibliográficas.....	61
4. Capítulo III. Efeito da concentração de alumínio e do tempo de exposição sobre o crescimento de plântulas de arroz em cultivo hidropônico.....	64
4.1 Introdução.....	64
4.2 Material e métodos.....	66

4.3 Resultados e discussão.....	68
4.4 Conclusões.....	77
4.5. Referências bibliográficas.....	78
5. Capítulo IV. Expressão de <i>OsFRDL1</i>, pertencente à família gênica MATE, em genótipos de arroz contrastantes quanto à resposta ao estresse por alumínio.....	81
5.1 Introdução.....	81
5.2 Material e métodos.....	85
5.3 Resultados e discussão.....	90
5.4 Conclusões.....	101
5.5. Referências bibliográficas.....	102
6. Considerações finais.....	105
7. Referências bibliográficas (Introdução geral).....	106
Vitae.....	109

1. INTRODUÇÃO GERAL

O arroz é o cereal mais cultivado no mundo. No Brasil, ele contribui com mais de 10% do total de grãos produzidos no país. De acordo com projeções da FAO, em 2030 o consumo previsto será da ordem de 807.150 milhões de toneladas, tornando necessário que se aumente a produção em quase 200 milhões de toneladas nos próximos 26 anos (IRGA, 2004).

O incremento na produtividade tem sido o objetivo final da maioria dos programas de melhoramento genético. Algumas vezes isso tem sido obtido pelo desenvolvimento de cultivares basicamente mais produtivas, não devido a melhoramento específico, como resistência a moléstias, por exemplo, mas como resultado de uma maior eficiência fisiológica geral (Allard, 1999).

A toxidez causada por alumínio é a forma mais difundida de toxicidade por metais em plantas. Em razão de que a solubilidade deste metal é dependente do pH, a toxidez ocorre somente em solos que apresentam valores de pH abaixo de 5,0 (Vitorello *et al.*, 2005). É estimado que 40% do solo arável do mundo sejam ácidos e, desta forma, apresentem os efeitos danosos do alumínio (von Uexküll e Mutert, 1995).

A maior parte dessas áreas está localizada em países em desenvolvimento da América do Sul, África central e sudeste asiático, onde a produção de alimentos pode ser crítica (Wood *et al.*, 2000). Somente no Brasil, mais de 500 milhões de hectares são cobertos por solos ácidos que ocupam, aproximadamente, dois terços da área total do país – a maior área dentro de um único país (Vitorello *et al.*, 2005).

Em solos com valores de pH próximos à neutralidade o alumínio pode ser encontrado sob formas insolúveis, geralmente não tóxicas. Porém, em solos mais ácidos (pH<5,0), o mesmo se solubiliza, podendo atingir níveis tóxicos que afetam o crescimento das plantas (Kochian, 1995). Nestes solos, o alumínio se apresenta na forma de octaedro hexahidratado, $Al(H_2O)_6^{3+}$, mais conhecida como Al^{3+} e considerada a forma mais tóxica deste elemento no solo (Kochian, 1995; Delhaize e Ryan, 1995).

À medida em que o pH se eleva, o alumínio passa a formas menos tóxicas às plantas. Na prática, a correção do pH do solo, pela aplicação de calcário, pode resolver o problema de toxidez do mineral. No entanto, a aplicação de calcário corrige a acidez apenas nas camadas superficiais do solo, sendo ineficaz nas camadas inferiores. A aplicação de calcário, além disso, implica em aumentos dos custos de produção (Echart e Cavalli-Molina, 2001; Freitas *et al.*, 2006). Por estas razões, a obtenção de cultivares tolerantes ou resistentes a níveis tóxicos de alumínio torna-se uma estratégia altamente desejável para a produção de culturas economicamente importantes em solos ácidos (Fageria e Carvalho, 1982; Ferreira *et al.*, 1999; Freitas *et al.*, 2006).

Apesar dos numerosos trabalhos, os mecanismos fisiológicos da tolerância das plantas ao alumínio ainda não estão totalmente esclarecidos. Porém, sabe-se que a região do ápice radicular é o alvo primário da ação fitotóxica do metal (Ryan *et al.*, 1992). Este, ao ser absorvido, tende a se acumular, preferencialmente, no ápice da raiz, promovendo a inibição da divisão celular e, conseqüentemente, do alongamento radicular (Kochian, 1995).

Outros sintomas causados ao sistema radicular pelo estresse por alumínio incluem reduções no peso de massa seca, no número e no comprimento das raízes, freqüentemente associados ao aumento no raio médio e no volume radicular (Sivaguru e Paliwal, 1993). Isso resulta em redução na absorção de água e nutrientes minerais (Mendonça *et al.*, 2003), com efeitos nas taxas fotossintéticas e respiratórias (Ohki, 1986), promovendo severas perdas em crescimento e produtividade.

O estresse causado pelo alumínio pode modificar a translocação de nutrientes para a parte aérea das plantas, provocando o aparecimento de clorose (Chang *et al.*, 1998) e necrose foliar (Nguyen *et al.*, 2003). Em alguns casos, estes sintomas assemelham-se aos das deficiências de fósforo, cálcio ou nitrogênio (Rout *et al.*, 2001). Esses fatos foram observados por Mendonça *et al.* (2003) e Freitas *et al.* (2006) que, trabalhando com diferentes cultivares de arroz submetidos ao estresse por alumínio, evidenciaram alterações nas concentrações dos macronutrientes na parte aérea das plantas.

A carga elétrica positiva permite que o Al^{3+} reaja com numerosos sítios nas células, alvos potenciais de injúria, incluindo a parede celular, o citoesqueleto, o núcleo e a membrana plasmática (Kochian *et al.*, 2004). Segundo Wagatsuma *et al.*

(1995), a membrana plasmática parece ser o alvo primário dos danos provocados pelo alumínio.

Na parede celular o alumínio pode se ligar aos grupos carboxílicos das pectinas e das proteínas, diminuindo a extensibilidade (Delhaize e Ryan, 1995). Já na membrana plasmática, a ligação do metal aos lipídios e às proteínas atua inibindo o transporte de nutrientes e acarretando distúrbios no metabolismo celular (Emmanuel e Peter, 1995). Além disso, o alumínio pode alterar a permeabilidade das membranas em decorrência de modificações na fluidez e na densidade da bicamada lipídica (Zhao *et al.*, 1987), assim como no aumento da síntese de calose (Wissemeier *et al.*, 1992).

A peroxidação de lipídios é outro processo induzido nas membranas celulares pelo alumínio. Os danos peroxidativos decorrem principalmente da deterioração oxidativa de ácidos graxos insaturados das membranas pela ação de intermediários reativos de oxigênio presentes no interior das células (Scandalios, 1993)

Embora muitos dos efeitos tóxicos do alumínio sobre o funcionamento e o crescimento das plantas tenham sido descritos, pouco se conhece sobre os mecanismos de tolerância das plantas a este metal. Segundo Kochian (1995), os mecanismos de tolerância ao alumínio podem ser classificados em dois grupos: os de tolerância externa e os de tolerância interna.

Nos mecanismos de tolerância externa, o alumínio seria excluído do ápice radicular por diferentes processos, incluindo a sua imobilização nas paredes celulares, a permeabilidade seletiva das membranas, a formação de barreira de pH induzida pela planta na rizosfera, bem como pela liberação de ácidos orgânicos para o apoplasto e rizosfera. Neste último caso, os principais ácidos exsudados seriam o cítrico e o málico, os quais se ligariam ao alumínio formando complexos estáveis que dificultariam a absorção deste metal pela planta (Delhaize e Ryan, 1995; Ma *et al.*, 2001).

Dentre os mecanismos de tolerância interna são citados a complexação do alumínio por várias substâncias quelantes, como por exemplo, ácidos orgânicos, seguido de sua compartimentalização nos vacúolos e a ligação do alumínio a determinadas proteínas (Kasai *et al.*, 1992; Taylor *et al.*, 1997).

A cultura do arroz é considerada como uma das mais tolerantes ao alumínio dentre aquelas de importância econômica. Apesar disso, os mecanismos para essa

elevada tolerância não foram ainda esclarecidos. É sabido que existe grande variação entre as cultivares de arroz quanto à tolerância a este mineral e que alguns são seriamente afetados por elevadas concentrações do mesmo (Fageria e Carvalho, 1982). Nesse sentido, a compreensão dos mecanismos de tolerância do arroz ao alumínio poderá resultar na identificação dos genes ligados à tolerância e, possivelmente, na de genótipos ainda mais tolerantes (Nguyen *et al.*, 2001).

Recentemente, genes especificamente envolvidos na resposta à toxicidade do alumínio foram identificados: *ALMT1* em trigo (Sasaki *et al.*, 2004), *HvAACT1* em cevada (Furukawa *et al.*, 2007) e *SbMATE* em sorgo (Magalhães *et al.*, 2007). Esses genes estão envolvidos na secreção de ácidos orgânicos em resposta ao alumínio, um dos mecanismos de tolerância dos vegetais a esse estresse. No genoma do arroz existem seis genes homólogos próximos a *HvAACT* e *SbMATE*, que foram identificados como *OsFRDL* (*Ferric Reductase Defective-like*). Destes, *OsFRDL1* (Os03g0216700), um transportador de citrato, é o mais próximo do gene *HvAACT*.

É sabido que o arroz apresenta importantes relações de sintonia com as outras espécies de cereais e é considerado o genoma modelo para as gramíneas (IRGSP, 2005). Além disso, é a primeira cultura alimentar para a qual a seqüência completa dos genes está disponível. Esse fato oferece uma oportunidade sem precedentes para identificar e caracterizar funcionalmente os genes e rotas bioquímicas responsáveis pelo desempenho agrônômico e resistência a estresses bióticos e abióticos (Coffman *et al.*, 2004).

O objetivo deste trabalho foi selecionar, através de cultivo hidropônico, genótipos de arroz que apresentem tolerância diferencial ao alumínio tóxico e avaliar a expressão do gene *OsFRDL1* em dois genótipos contrastantes.

2. CAPÍTULO I

REAÇÃO DE TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM CULTIVARES DE ARROZ DE DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO SOB CONDIÇÕES DE HIDROPONIA

2.1 INTRODUÇÃO

O alumínio é o metal mais abundante da crosta terrestre, estando presente, em sua maior parte, sob formas não prejudiciais às plantas. Em condições de reduzido pH, entretanto, sua solubilização é intensificada, originando a espécie Al^{3+} , a mais fitotóxica dentre as existentes, e que se constitui em um dos principais fatores limitantes à produção agrícola em solos ácidos (Delhaize e Ryan, 1995). É estimado que entre 30 e 40% de todo solo arável existente no mundo apresente pH inferior a 5,5 (von Uexküll e Mutert, 1995), e que esta condição atinja em torno de 60% do território brasileiro (Brondani e Paiva, 1996).

O sintoma primário da fitotoxicidade causada pela forma Al^{3+} é um imediato decréscimo no crescimento da raiz em função da inibição nos processos de divisão e alongamento celulares, o que dificulta a absorção de água e nutrientes pela planta (Barceló e Poschenrieder, 2002). Como consequência, há redução no desenvolvimento e produtividade das culturas, que também se tornam mais suscetíveis aos estresses ambientais (Ma e Furukawa, 2003; Samac e Tesfaye, 2003).

A cultura do arroz (*Oryza sativa* L.), embora seja considerada como uma das mais tolerantes ao alumínio dentre os cereais, é afetada por sua toxicidade (Nguyen *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2002).

É sabido, porém, que existem variações genotípicas na espécie em relação à resposta a esse estresse (Fageria, 1982; Ferreira *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 2002), tornando possível o desenvolvimento de cultivares mais ajustadas às condições de

solos ácidos. Por outro lado, os mecanismos responsáveis por essa elevada tolerância ainda não foram esclarecidos (Ma *et al.*, 2005).

Em arroz, diversos trabalhos buscaram determinar a tolerância de genótipos submetendo-os a diferentes concentrações de alumínio em cultivo hidropônico (Fageria *et al.*, 1982; Vicente *et al.*, 1998; Vasconcelos *et al.*, 2002; Freitas *et al.*, 2003). Outras espécies de poáceas tais como milho (Paterniani e Furlani, 2002), trigo (Bertan *et al.*, 2005), aveia (Sánchez-Chacón *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2007), sorgo (Magalhães *et al.*, 2007) e azevém (Bresolin, 2007) também já foram alvo de estudos para a detecção de diferentes níveis de tolerância ao alumínio tóxico.

O Brasil é um dos dez principais produtores mundiais de arroz, com cerca de 11 milhões de toneladas por ano. Essa produção é oriunda de dois sistemas de cultivo: o irrigado e o de sequeiro. O primeiro responde por cerca de 65% do total produzido, estando concentrado na Região Sul do país, onde são encontradas as várzeas subtropicais (EMBRAPA, 2005). O sistema de sequeiro, por sua vez, é utilizado nas áreas de cerrado, as quais ocupam quase um quarto do território nacional. Os solos predominantes nessa região são caracteristicamente ácidos e com alta saturação de alumínio (Ferreira *et al.*, 1995; EMBRAPA, 2003).

A possível existência de uma relação direta entre a tolerância ao alumínio e o sistema de cultivo do arroz foi relatada por Ferreira *et al.* (1995) e Freitas (2003). Em ambos os trabalhos, de modo geral, as constituições genéticas de sequeiro se mostraram mais tolerantes ao íon metálico, enquanto as do sistema irrigado foram mais sensíveis.

Os autores afirmam que, ao selecionar genótipos produtivos no sistema de cultivo de sequeiro, os melhoristas, indiretamente, selecionaram genótipos tolerantes à toxidez de alumínio, o que não ocorreu na seleção daqueles cultivados no sistema irrigado, em que esse estresse não se constitui em um problema a ser considerado. Entretanto, dentro de cada um deles foi observada variabilidade na resposta ao metal (Freitas, 2003).

O estudo do caráter tolerância ao alumínio em arroz se reveste de grande importância não só pelos avanços que possa trazer à cultura *per se*, mas também pelo fato de que o genoma dessa espécie é modelo para as poáceas (IRGSP, 2005), de modo que o conhecimento das regiões genômicas que determinam importantes relações de sintenia com outros cereais pode oportunizar inferências mais conclusivas dos mecanismos genéticos relacionados à tolerância nas diferentes

espécies vegetais também afetadas pelo problema, como trigo, aveia e milho, por exemplo.

Este capítulo teve como objetivo caracterizar cultivares de arroz dos sistemas de cultivo irrigado e sequeiro quanto à tolerância ao alumínio tóxico sob condições de hidroponia.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e condições de cultivo

Os genótipos foram testados em cultivo hidropônico, sob condições controladas de ambiente, no Laboratório de Duplo-Haplóides e Hidroponia pertencente ao Centro de Genômica e Fitomelhoramento (LDH/CGF) da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas (FAEM/UFPeI),

No estudo, foram avaliadas 30 cultivares de arroz dos sistemas de cultivo irrigado e sequeiro, que representam constituições genéticas elite pertencentes à coleção de trabalho da Embrapa Clima Temperado (Tabela 1).

Tabela 1. Cultivares de arroz de dois sistemas de cultivo empregadas no estudo de caracterização quanto à tolerância ao alumínio em cultivo hidropônico. FAEM/UFPeI, 2009.

Sistema de Cultivo			
Irrigado		Sequeiro	
BRS 6 “Chuí”	BRS Ligeirinho	Arroz da Terra	BRS Brilhante
BRS Pelota	BR-IRGA 409	BRS Conai	BRS Bonança
BR-IRGA 410	BRS 7 “Taim”	Arroz de Seco	BRS Diamante
BRS Fronteira	BRS Atalanta	BRS Vencedora	BRS Primavera
BRS Bojuru	BR-IRGA 412	BRS Curinga	BRS Liderança
BRS Firmeza	BR-IRGA 414	IAC 202	IAC 500
BRS Agrisul	IAS 12-9 Formosa	BRS Colosso	BRS Talento
BRS Querência	Farroupilha		

Inicialmente, as sementes foram colocadas para germinar em papel umedecido com água destilada, o qual foi acondicionado em caixas gerbox que foram mantidas em estufa à temperatura de 28°C por 60 horas.

Dez plântulas de cada cultivar que apresentavam comprimento de raiz uniforme foram dispostas em telas de náilon, as quais foram adaptadas a recipientes plásticos de dois litros de capacidade, de modo que a raiz mantivesse contato permanente com a solução nutritiva completa (Camargo e Oliveira, 1981) composta por $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 4mM; MgSO_4 2mM; KNO_3 4mM; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,435mM; KH_2PO_4 0,5mM; MnSO_4 2mM; CuSO_4 0,3 μM ; ZnSO_4 0,8 μM ; NaCl 30 μM ; Fe-EDTA 10 μM ; NaMoSO_4 0,10 μM e H_3BO_3 10 μM , permanecendo nesta condição por 48 horas.

Após este período, as telas com as plântulas foram transferidas para as soluções tratamento, que consistiram de um décimo da solução completa (sem adição de fosfato para evitar possível precipitação do alumínio) mais as concentrações de 0, 7, 14 e 28 mg L^{-1} de alumínio, fornecido como $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, onde foram mantidas por 48 horas. Posteriormente, retornaram para a solução completa por mais 72 horas antes de serem coletadas para a avaliação do caráter comprimento da raiz principal (CR).

Os recipientes com as soluções completa e tratamento foram colocados em tanque com sistema de banho-maria com água à temperatura de 27°C. As soluções foram permanentemente oxigenadas e seu pH corrigido para $4,0 \pm 0,3$ pela adição HCl 1N, segundo metodologia descrita por Camargo e Oliveira (1981). As plantas foram mantidas sob iluminação constante.

Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi realizado seguindo o delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial dose x genótipo (4x30) com três repetições.

Para estabelecer o tipo de resposta ao alumínio dos diferentes genótipos de arroz empregados no experimento, os dados foram submetidos à análise de variância. Para a comparação das médias dentro de cada tratamento foi utilizado o teste de Scott-Knott (5% de probabilidade) com auxílio do programa computacional GENES (Cruz, 2001).

Na avaliação da resposta das cultivares frente ao aumento na concentração de alumínio, foi feita a determinação do grau de polinômio e o ajustamento da equação de regressão utilizando o programa estatístico SAS (SAS, 2002). Além disso, foi feita também a comparação das médias entre os diferentes níveis de alumínio através do teste de Tukey (5% de probabilidade).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância apresentada na Tabela 2 revela que a interação cultivar x dose foi significativa, evidenciando a necessidade de avaliação dos efeitos simples para cada concentração de alumínio. Desta forma, a hipótese de diferença entre as constituições genéticas de arroz quanto ao caráter comprimento de raiz foi confirmada para cada nível do íon metálico adicionado à solução. Além disso, os reduzidos valores de coeficiente de variação (CV) observados atribuíram confiabilidade e precisão nas inferências formuladas em relação aos resultados obtidos no presente trabalho.

Tabela 2. Resumo da análise de variância para o caráter comprimento de raiz (CR) de 30 cultivares de arroz submetidas a diferentes doses de alumínio na solução e de forma individual fixando o fator dose. FAEM/UFPel, 2009.

Fonte de Variação	GL	QM _{CR}	Média Geral		
			(cm)	CV(%)	
Modelo	119	10,47**	8,75	6,07	
Cultivar	29	29,89**	-	-	
Dose	3	62,52**	-	-	
Cultivar x Dose	87	2,20**	-	-	
Erro	240	0,28	-	-	
Total	359	-	-	-	
Fixando o Fator					
Dose		QM _{CR} 0mg L ⁻¹	QM _{CR} 7mg L ⁻¹	QM _{CR} 14mg L ⁻¹	QM _{CR} 28mg L ⁻¹
Cultivar	29	8,41**	10,99**	11,85**	5,24**
Erro	60	0,24	0,33	0,34	0,21
Total	89	-	-	-	-
Média (cm)	-	9,63	9,14	8,51	7,70
CV(%)	-	5,11	6,29	6,87	6,00

** Significativo a 1% de probabilidade de erro pelo teste F;

QM_{CR} = Quadrado médio do comprimento de raiz.

Na Tabela 3 são apresentadas as médias do CR das cultivares de arroz avaliados nas diferentes doses de alumínio, tendo sido comparados os genótipos entre si em cada um dos níveis do tratamento,

A formação de oito classes distintas na concentração de 0 mg L⁻¹ de alumínio evidencia, claramente, a diferença genética existente entre os genótipos de arroz quanto ao caráter CR. As cultivares do grupo sequeiro, em especial Arroz da Terra, BRS Conai e Arroz de Seco, apresentaram os maiores valores no caráter (14,77, 12,40 e 12,03 cm, respectivamente). Os do grupo irrigado, ao contrário, mostraram os menores valores médios, com destaque para IAS 12-9 Formosa, com apenas 6,8 cm de CR.

No primeiro tratamento com alumínio (7 mg L⁻¹), foi observado que a resposta de grande parte das constituições genéticas não diferiu daquela obtida na dose 0 mg L⁻¹, demonstrando uma pequena contribuição deste nível do íon na detecção de diferenças quanto ao grau de tolerância entre os genótipos, o que foi confirmado pela formação de sete classes distintas, próximo ao padrão original (oito classes). No entanto, algumas cultivares como Arroz da Terra, BR-IRGA 410, BRS Firmeza, BRS Atalanta e IAS 12-9 Formosa, exibiram comportamento distinto quando comparados ao controle (0 mg L⁻¹ de alumínio).

Na concentração de 14 mg L⁻¹ de alumínio, seis classes foram observadas. As cultivares BRS Vencedora, BRS Conai e BRS Colosso (grupo sequeiro), mais Farroupilha (grupo irrigado) se destacaram como os de maiores CR, enquanto IAS 12-9 Formosa e BRS Atalanta (grupo irrigado) apresentaram os menores valores para o caráter.

Na dose de 28 mg L⁻¹ de alumínio, os genótipos foram agrupados em quatro classes distintas, o menor número entre todas as doses. Isto se deveu, principalmente, à significativa redução observada no CR das cultivares do grupo sequeiro. Por outro lado, ainda que tenham sido negativamente afetados pelo tratamento, seus desempenhos quanto ao caráter foram, em geral, superiores aos do grupo irrigado. Nesse sentido, as cultivares Arroz de Seco, BRS Curinga, BRS Vencedora, IAC 500, BRS Liderança e BRS Colosso, mais Farroupilha (sistema irrigado), se sobressaíram em relação às demais (Tabela 3).

Tabela 3. Comprimento de raiz (cm) de 30 cultivares de arroz submetidas a quatro doses de alumínio em cultivo hidropônico. FAEM/UFPel, 2009.

Genótipos	Concentração de alumínio (mg L ⁻¹)							
	0		7		14		28	
Arroz da Terra	14,77	a A	9,20	d B	7,95	d C	7,4	c C
BRS Conai	12,40	b A	11,80	a A	11,39	a A	8,96	b B
Arroz de Seco	12,03	b A	11,61	a A	10,63	b B	10,24	a B
Farroupilha	11,35	c A	11,96	a A	12,34	a A	9,64	a B
BRS Vencedora	11,25	c A	11,81	a A	11,71	a A	9,73	a B
BRS Curinga	11,09	c A	10,59	b A	10,61	b A	9,79	a A
IAC 202	10,85	c A	10,59	b AB	9,10	c BC	8,95	b C
BRS Colosso	10,67	d A	10,25	c AB	11,17	a A	9,32	a B
BRS Brilhante	10,31	d A	10,14	c A	9,38	c A	7,51	c B
BRS Bonança	10,28	d A	11,05	b A	10,34	b A	8,45	b B
BRS Diamante	9,87	e A	9,21	d AB	8,47	d AB	7,29	c C
BRS Primavera	9,79	e A	11,47	a A	10,32	b A	7,67	c B
BRS 6 “Chuí”	9,54	e A	7,94	e AB	6,50	e B	6,59	d B
BRS Liderança	9,45	e A	10,69	b A	10,72	b A	9,41	a A
BRS Pelota	9,42	e A	10,18	c A	7,72	d B	7,58	c B
BR-IRGA 410	9,27	e A	7,66	e B	6,89	e BC	6,77	d C
BRS Fronteira	9,26	e A	8,95	d A	7,75	d B	6,82	d B
BRS Bojuru	9,09	f A	9,71	c A	7,90	d B	6,82	d B
BRS Firmeza	9,03	f A	6,99	e B	7,73	d B	7,66	c B
IAC 500	8,91	f A	9,18	d A	9,25	c A	9,35	a A
BRS Agrisul	8,74	f A	8,10	e AB	7,60	d AB	6,56	d B
BRS Querência	8,62	f A	7,82	e AB	6,53	e B	6,58	d B
BRS Talento	8,58	f A	9,32	d A	8,82	c A	7,58	c B
BRS Ligeirinho	8,41	g A	7,38	e AB	7,25	e AB	6,50	d B
BR-IRGA 409	8,03	g A	7,91	e AB	6,94	e BC	6,60	d C
BRS 7 “Taim”	7,87	g A	7,17	e AB	6,38	e B	6,38	d B
BRS Atalanta	7,78	g A	4,50	g B	4,67	f B	5,95	d B
BR-IRGA 412	7,74	g A	7,32	e AB	6,92	e AB	6,30	d B
BR-IRGA 414	7,66	g AB	8,17	e A	7,14	e BC	6,60	d C
IAS 12-9 Formosa	6,85	h A	5,50	f C	5,28	f C	5,99	d B

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem significativamente entre si pelos testes de Scott-Knott e Tukey a 5% de probabilidade, respectivamente.

É interessante ressaltar a resposta diferenciada das cultivares dos dois sistemas de cultivo na concentração de 14 mg L⁻¹ alumínio, pois, enquanto apenas três genótipos do grupo sequeiro foram afetados negativamente (Arroz da Terra, Arroz de Seco e IAC 202), os do grupo irrigado apresentaram, em sua maioria, CR significativamente inferiores aos da dose padrão (0 mg L⁻¹ de alumínio), com exceção de BRS 6 “Chuí”, BRS Agrisul, BRS Ligeirinho e BR-IRGA 412, levantando a hipótese de que os genótipos de sequeiro apresentam, de certa forma, maior tolerância ao alumínio do que os de ambiente irrigado.

O comportamento diferenciado em relação ao alumínio tóxico entre cultivares de arroz destes sistemas de cultivo foi relatado por outros autores (Ferreira *et al.*, 1995; Freitas, 2003). Os genótipos de sequeiro têm sua origem em áreas caracterizadas por alta concentração de Al³⁺ trocável e baixo pH, o que favorece a seleção natural daqueles mais ajustados em ambientes de elevada concentração do íon metálico.

Por outro lado, os genótipos do sistema irrigado sofrem pressão de seleção em ambientes submetidos à irrigação, onde a presença da água eleva o pH do solo. Assim, a seleção de plantas superiores é feita com base nesse ambiente em que não há presença de alumínio em sua forma Al³⁺, de modo que as plantas selecionadas poderão apresentar sensibilidade ao metal, principalmente quando houver ausência dos genes de tolerância na genealogia dos genótipos obtidos.

De acordo com os resultados obtidos, a seleção com o objetivo de detectar diferentes níveis de tolerância entre os genótipos do grupo irrigado pode ser realizada utilizando a concentração de 14 mg L⁻¹ de alumínio, pois não foi observada, neste nível do tratamento, diferença no comportamento destes materiais em relação à dose mais elevada (28 mg L⁻¹) (Tabela 3). Desta forma, é possível que 14 mg L⁻¹ de alumínio seja o limite para que os contrastes entre as cultivares do grupo irrigado sejam expressos com maior clareza. No entanto, essa informação só poderá ser confirmada através de análise de regressão.

Ao ser considerado o CR dentro de cada uma das doses de alumínio empregadas, é observado que, em todas elas, as cultivares de sequeiro foram as que apresentaram os maiores valores para o caráter. Como exceção, destaca-se o genótipo Farroupilha, de sistema irrigado. É provável, pois, que o maior CR esteja estreitamente ligado com a tolerância ao metal e a outros estresses.

É sabido que o sintoma primário da toxidez causada pelo alumínio aos vegetais é uma rápida inibição no crescimento radicular, a qual decorre, principalmente, da interação do íon com as células da raiz e seus componentes, causando severos prejuízos aos processos de divisão e alongamento celulares (Čiampovorá, 2002).

Embora a prática da calagem seja capaz de reduzir a presença da forma tóxica do elemento no solo, ela atinge, geralmente, apenas suas camadas superficiais, limitando o desenvolvimento das raízes dos genótipos que apresentam sensibilidade ao íon (Foy *et al.*, 1978). Na hipótese de que as plantas sejam submetidas a uma deficiência nutricional ou hídrica, por exemplo, aquelas constituições genéticas com potencial para um maior crescimento radicular e que, ao mesmo tempo, tolerarem a presença do alumínio, terão capacidade de explorar, também, as camadas inferiores do solo em busca de água e nutrientes, mantendo, de acordo com as possibilidades, seu desempenho mesmo nessas condições ambientais adversas.

Segundo Camargo *et al.* (2005), para que plântulas de trigo obtenham água e nutrientes das camadas mais profundas do solo nos primeiros estádios de desenvolvimento, é necessário que combinem as características de elevado comprimento de raiz e tolerância à toxicidade de alumínio.

A Tabela 3 apresenta também a comparação das médias de CR entre os diferentes níveis de alumínio dentro de cada genótipo.

As cultivares BRS Curinga, BRS Liderança e IAC 500 não tiveram reduzido seu CR em nenhum dos níveis de alumínio empregados, destacando-se como as mais tolerantes ao lado de BRS BRS Bonança, BRS Brilhante, BRS Conai, BRS Primavera, Farroupilha, BRS Talento e BRS Vencedora, que foram afetados somente na dose mais elevada (28 mg L^{-1}). Comportamento semelhante mostraram BRS Colosso, BRS Agrisul, BRS Diamante, BR-IRGA 412 e BRS Ligeirinho, embora com menor intensidade.

Por outro lado, Arroz da Terra e BR-IRGA 410 sofreram o efeito prejudicial do estresse já no primeiro tratamento com alumínio e foram grandemente afetadas na dose mais alta, demonstrando serem os genótipos mais sensíveis ao íon metálico dentre os avaliados, juntamente com IAS 12-9 Formosa, que teve uma queda acentuada no CR nos dois primeiros tratamentos, parecendo experimentar, porém, um processo de recuperação na dose mais elevada.

Os genótipos BR-IRGA 409, IAC 202 e BR-IRGA 414, embora não tenham sofrido redução no CR no nível de 7 mg L^{-1} de alumínio, apresentaram severa diminuição no mais alto, enquanto BRS Firmeza e BRS Atalanta tiveram diminuição significativa em relação ao controle na primeira dose, mantendo a resposta nas demais.

As cultivares BRS 6 “Chuí”, BRS Querência, BRS 7 “Taim”, Arroz de Seco, BRS Bojuru, BRS Fronteira e BRS Pelota foram negativamente influenciados pelo alumínio somente a partir da concentração de 14 mg L^{-1} .

A Figura 1 apresenta o comportamento do CR das cultivares agrupadas com base no sistema de cultivo (16 irrigados e 14 de sequeiro) em relação às diferentes concentrações de alumínio empregadas no experimento. É possível observar que as do grupo sequeiro foram superiores às do irrigado em todas as doses estudadas, além de terem sofrido redução significativa no CR somente na mais alta delas (28 mg L^{-1}), ao passo que as do sistema irrigado foram afetadas já no primeiro nível com alumínio, confirmando os resultados observados anteriormente em relação às cultivares de forma individual (Tabela 3).

O maior contraste quanto ao CR entre os dois grupos de genótipos foi observado ao se utilizar 14 mg L^{-1} de alumínio na solução, visto que, nesta dose, as cultivares de sequeiro mantiveram seu comportamento em relação às anteriores, enquanto as do sistema irrigado continuaram a apresentar queda significativa no valor do caráter.

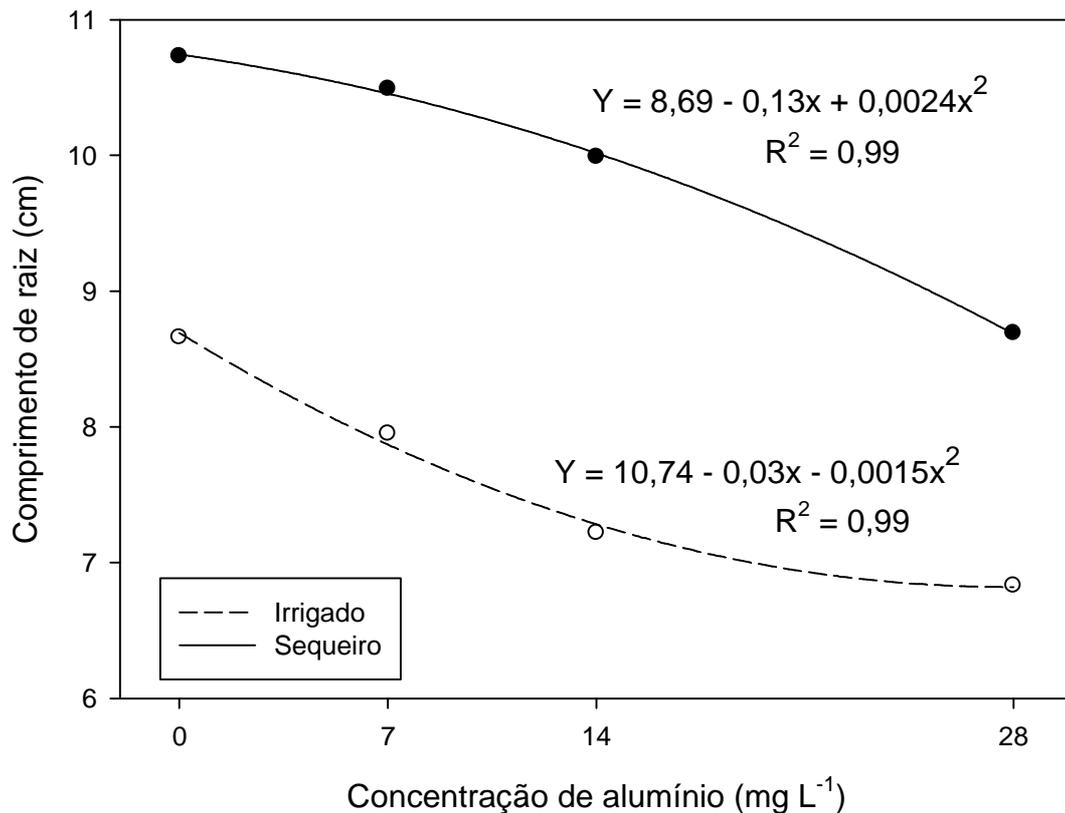


Figura 1. Comprimento de raiz de cultivares de arroz agrupadas por sistema de cultivo, submetidas a diferentes concentrações de alumínio em hidroponia. FAEM/UFPel, 2009.

A significância da interação genótipo x dose (Tabela 2) determinou que fossem fixados os fatores de interesse que propiciaram uma explicação geral acerca da resposta dos diferentes genótipos frente às doses de alumínio. Com base na análise de regressão é possível verificar o comportamento de cada genótipo de modo geral, já na análise de médias a inferência é feita somente no ponto estabelecido referente a cada dose (0, 7, 14 e 28 mg L⁻¹). Conseqüentemente, o nível de tolerância determinado dentro de cada ponto pode não representar o comportamento do genótipo quando analisado através da regressão.

Por se tratar de um fator quantitativo, a análise de regressão representa o parâmetro mais ajustado para determinar o comportamento dos genótipos frente às doses de alumínio. Através desta análise, foi possível avaliar de modo efetivo o comportamento de cada constituição genética estudada, bem como determinar as doses ideais de seleção.

Na Tabela 4 são apresentados os parâmetros das equações de regressão ajustadas, bem como o teste de significância do coeficiente de regressão (ou angular) relativo à respectiva equação, para a variável dependente CR das 30 cultivares de arroz, individualmente, em relação às diferentes concentrações de alumínio utilizadas no experimento.

Os genótipos BRS Agrisul, Arroz de Seco, BRS Bojuru, BRS Brilhante, BRS Conai, BRS Curinga, BRS Diamante, BRS Fronteira, IAC 202, BR-IRGA 409, BR-IRGA 412, BR-IRGA 414, BRS Ligeirinho, BRS Pelota, BRS Querência e BRS 7 “Taim” responderam de forma linear às doses crescentes de alumínio na solução (Tabela 4). O parâmetro a na equação de regressão é um estimador do CR no nível 0 de alumínio, enquanto o parâmetro b é um estimador da taxa de declínio do CR por unidade de alumínio adicionado na solução. Portanto, quanto maior o valor do coeficiente, maior o efeito tóxico do alumínio sobre a característica avaliada.

A análise do coeficiente angular (b_1) pelo teste t mostrou que ele foi significativo para todas as cultivares, ou seja, as diferenças encontradas no CR ao aumentar a concentração de alumínio na solução nutritiva foram decorrentes do tratamento e não devidas ao acaso. Seus valores foram, respectivamente, -0,08, -0,07, -0,10, -0,10, -0,12, -0,04, -0,09, -0,09, -0,07, -0,06, -0,05, -0,05, -0,06, -0,08, -0,07 e -0,05.

O sinal negativo, presente em todos os coeficientes, indica que, quanto maior a dose de alumínio, menor a capacidade de recuperação no CR no período de 72 h. Para o genótipo BRS Agrisul, por exemplo, a equação de regressão linear, $Y = 8,69 - 0,08 x$ indica que cada acréscimo de 1 mg L^{-1} de alumínio na solução implicará na diminuição do comprimento da raiz em 0,08 cm, até que seu crescimento seja totalmente inibido.

Tabela 4. Parâmetros das equações de regressão linear e quadrática: interceptação no eixo y (a), coeficiente de regressão linear (b_1) e quadrático (b_2) e coeficiente de determinação (R^2) de 30 genótipos de arroz submetidos a quatro concentrações de alumínio em hidroponia para a variável comprimento de raiz. FAEM/UFPel, 2009.

Genótipo	Parâmetro			
	a	b_1x	b_2x^2	R^2
BRS Agrisul	8,69	-0,08*	-	0,99
Arroz da Terra	14,47	-0,77	0,02*	0,97
Arroz de Seco	11,94	-0,07*	-	0,95
BRS Atalanta	7,52	-0,43	0,01*	0,88
BRS Bojuru	9,55	-0,10*	-	0,82
BRS BRS Bonança	10,39	0,09	-0,006*	0,96
BRS Brilhante	10,62	-0,10*	-	0,85
BRS 6 “Chuí”	9,61	-0,32	0,007*	0,99
BRS Colosso	10,46	0,08	-0,004*	0,71
BRS Conai	12,65	-0,12*	-	0,87
BRS Curinga	11,05	-0,04*	-	0,94
BRS Diamante	9,84	-0,09*	-	0,99
Farroupilha	11,27	0,19	-0,009*	0,98
BRS Firmeza	8,76	-0,19	0,005*	0,59
IAS 12-9 Formosa	6,79	-0,21	0,006*	0,97
BRS Fronteira	9,32	-0,09*	-	0,96
IAC 202	10,78	-0,07*	-	0,87
IAC 500	-	-	-	-
BR-IRGA 409	8,05	-0,06*	-	0,90
BR-IRGA 410	9,24	-0,26	0,006*	0,99
BR-IRGA 412	7,70	-0,05*	-	0,99
BR-IRGA 414	7,97	-0,05*	-	0,75
BRS Liderança	9,51	0,20	-0,007*	0,97
BRS Ligeirinho	8,15	-0,06*	-	0,95
BRS Pelota	9,75	-0,08*	-	0,61
BRS Primavera	10,02	0,19	-0,009*	0,92
BRS Querência	8,29	-0,07*	-	0,95
BRS 7 “Taim”	7,59	-0,05*	-	0,98
BRS Talento	8,68	0,09	-0,005*	0,93
BRS Vencedora	11,26	0,12	-0,006*	0,99

* Significativo pelo teste t ao nível de 5% de probabilidade de erro para o modelo de regressão em quatro níveis de tratamento

Com base nas equações de regressão linear, é possível afirmar que a cultivar BRS Curinga foi a que demonstrou o maior nível de tolerância ao estresse

aplicado, pois apresenta a menor redução no CR com o aumento no nível de alumínio em solução, ou seja, o maior nível de recuperação do estresse. Esse comportamento está de acordo com o resultado obtido por meio da análise das médias (Tabela 3), em que pode ser observado que este genótipo não sofreu redução significativa no CR em nenhuma das concentrações de alumínio utilizadas, além do fato de que está dentre aquelas constituições genéticas que apresentaram o maior valor para a variável resposta em avaliação. Por outro lado, BRS Conai foi o genótipo que apresentou a maior diminuição do CR com o incremento na concentração de alumínio.

O comportamento das cultivares Arroz da Terra, BRS Atalanta, BRS Bonança, BRS 6 “Chuí”, BRS Colosso, Farroupilha, BRS Firmeza, IAS 12-9 Formosa, BR-IRGA 410, BRS Liderança, BRS Primavera, BRS Talento e BRS Vencedora foi do tipo quadrático, com coeficientes de regressão iguais, pela ordem, a 0,02, 0,013, -0,006, 0,007, -0,004, -0,009, 0,005, 0,006, 0,006, -0,007, -0,01, -0,005 e -0,006 (Tabela 4).

Os genótipos cujo sinal do coeficiente angular é negativo apresentaram incremento no CR no primeiro nível de alumínio em relação ao controle, comportamento que se manteve também no de 14 mg L⁻¹, porém com menor intensidade. Todavia, tiveram significativa redução na concentração mais alta, com exceção de BRS Liderança, que retornou ao valor observado na ausência do íon metálico, demonstrando não ter sido afetado negativamente pelo estresse no intervalo de doses avaliado (sendo necessário utilizar concentrações mais elevadas para verificar um possível efeito tóxico do alumínio sobre esta cultivar). Por outro lado, as constituições genéticas com coeficiente angular positivo tiveram decréscimo no CR com o aumento na concentração do íon metálico.

É possível observar que, com exceção dos genótipos Arroz da Terra (sequeiro), BRS Bojuru e Farroupilha (irrigados), o sinal do coeficiente angular foi igual para as constituições genéticas pertencentes ao mesmo sistema de cultivo, isto é, os de sequeiro apresentaram sinal negativo e os irrigados, positivo, sinalizando um comportamento semelhante entre eles.

O aumento no CR com o acréscimo do alumínio, verificado nas constituições genéticas cujo sinal foi negativo, indica que o período de 72 horas em que os materiais permaneceram na solução completa (sem alumínio), após 48 horas de exposição ao metal, foi suficiente para evidenciar grande capacidade de

recuperação quando considerada a concentração de 7 mg L^{-1} de alumínio, a qual, de modo geral, se manteve também no nível subsequente, mas que não se repetiu na dose superior (28 mg L^{-1}) para estas cultivares - exceto BRS Liderança - nem em nenhum dos níveis do tratamento para as do grupo irrigado, que não foram capazes de retornar ao patamar de crescimento radicular alcançado pelo controle.

IAS 12-9 Formosa, por sua vez, quando considerado o último nível de tratamento, demonstrou o início de um processo de recuperação que, ao que parece, demandaria um tempo maior do que o utilizado neste experimento.

A interpretação biológica da equação $y = a + b_1x + b_2x^2$ é possível de ser realizada através do modelo matemático $-b_1/2b_2$. Desse modo, $19,3 \text{ mg L}^{-1}$ de alumínio representa a concentração em que, teoricamente, o sistema radicular não tem capacidade para se recuperar do estresse para a cultivar Arroz da Terra, 21 mg L^{-1} para BRS Atalanta, $7,5 \text{ mg L}^{-1}$ para BRS Bonança, $22,9 \text{ mg L}^{-1}$ para BRS 6 "Chuí", 10 mg L^{-1} para BRS Colosso, $10,6 \text{ mg L}^{-1}$ para Farroupilha, 19 mg L^{-1} para BRS Firmeza, $17,5 \text{ mg L}^{-1}$ para IAS 12-9 Formosa, $21,7 \text{ mg L}^{-1}$ para BR-IRGA 410, $14,3 \text{ mg L}^{-1}$ para BRS Liderança, $9,5 \text{ mg L}^{-1}$ para BRS Primavera, $9,0 \text{ mg L}^{-1}$ para BRS Talento e 10 mg L^{-1} para BRS Vencedora.

A julgar por estes resultados, poderia ser afirmado que as cultivares do sistema irrigado demonstraram maior tolerância ao alumínio tóxico do que as de sequeiro, pois a dose de inibição da recuperação do crescimento radicular após a exposição ao metal para os primeiros se situou entre $17,5$ e $22,9 \text{ mg L}^{-1}$ (exceto Farroupilha), enquanto para os últimos variou de $7,5$ a $14,3 \text{ mg L}^{-1}$ de alumínio.

Ao se observar, entretanto, a comparação entre as médias obtidas para cada genótipo, comparando as diferentes doses de alumínio, (Figura 2), é possível verificar que os do grupo sequeiro somente sofreram o efeito tóxico do tratamento na dose 28 mg L^{-1} , ao passo que os do irrigado já foram afetados no primeiro nível na presença do elemento. Assim, a comparação entre constituições genéticas de sistemas de cultivo distintos é inadequada, devendo ser feita apenas dentro de cada um deles.

Deste modo, com base no modelo matemático, BRS Liderança e BRS 6 "Chuí" evidenciaram a maior tolerância dentre as cultivares de sequeiro e irrigado, respectivamente, enquanto BRS Bonança e Farroupilha foram as mais sensíveis dentro dos mesmos grupos.

Nenhuma das equações de regressão foi significativa para a cultivar IAC 500 (Tabela 4), demonstrando que o CR da mesma não foi afetado pelo aumento na concentração de alumínio na solução (Tabela 3), o que, conforme observado anteriormente, a caracteriza como tolerante a esse estresse.

A análise dos resultados acima permite verificar que os dez genótipos que exibiram os maiores níveis de tolerância ao alumínio pertencem ao grupo sequeiro, enquanto os do irrigado encontram-se entre os mais sensíveis ao metal.

Na concentração mais elevada, ou seja, 28 mg L^{-1} , a quase totalidade das constituições genéticas avaliadas sofreu os efeitos prejudiciais do estresse causado pelo alumínio, demonstrando que ela é fortemente restritiva para os genótipos de ambos os sistemas de cultivo, exceção feita a BRS Curinga, BRS Liderança e IAC 500 (sequeiro), que não foram afetados pelo incremento do metal na solução (Tabela 3). Esse fato, aliado ao de que estão dentre os materiais que apresentaram os maiores valores de CR, caracteriza estas três cultivares como as mais tolerantes ao alumínio nas condições de realização desse experimento.

2.4 CONCLUSÕES

Existe variabilidade genética para o caráter tolerância ao alumínio entre as cultivares avaliadas, tomando como base o comprimento de raiz.

A dose de 14 mg L^{-1} de alumínio é a que melhor diferencia as cultivares quanto à tolerância ao metal.

As cultivares oriundas do sistema de cultivo de sequeiro apresentam, de modo geral, maior nível de tolerância ao alumínio.

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAMARGO, C.E.O. e OLIVEIRA, O.F. Tolerância de cultivares de trigo a diferentes níveis de alumínio em solução nutritiva e no solo. **Bragantia**, v.40, p.21-31, 1981.
- CAMARGO, C.E.O; FERREIRA FILHO, A.W.P; SALOMON, M.V. Efeito da concentração salina e pH de soluções nutritivas no crescimento radicular de plântulas de trigo. **Bragantia**, v.64, p. 315-321, 2005.
- BARCELÓ, J. e 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.
- BRESOLIN, A.P.S. **Avaliação de populações de azevém anual quanto à tolerância ao alumínio tóxico e estimativa de tamanho de amostra para estudos de diversidade genética com marcadores AFLP**. 76 p. Dissertação (Mestrado em Fitomelhoramento). Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2007.
- BRONDANI, C. e PAIVA, E. Análise de “RFLP” da tolerância à toxidez do alumínio no cromossomo 2 do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.31, n.8, p. 575-579, 1996.
- CRUZ, C.D. Programa genes: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 2001. 648 p.
- ČIAMPOVORÁ, M. Morphological and structural responses of plant roots to aluminium at organ, tissue, and cellular levels. **Biologia Plantarum**, v.45, n.2, p. 161-171, 2002.
- DELHAIZE, E. e RYAN, P.R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiology**, v.107, p. 315-321, 1995.
- FAGERIA, N.K. Tolerância diferencial de cultivares de arroz ao alumínio em solução nutritiva. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.17, n.1, p.1-9, 1982.
- FAGERIA, N.K.; BALIGAR, V.C.; WRIGHT, R.J. The effects of aluminum on growth and uptake of Al and P by rice. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.24, n.6, p.677-682, 1989.

- FERREIRA, R.P. *et al.* Identificação de cultivares de arroz tolerantes à toxidez de alumínio por técnica multivariada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.30, n.6, p. 789-795, 1995.
- FOY, C.D. *et al.* The physiology of metal toxicity in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v.29, p. 511-566, 1978.
- FREITAS, F.A. **Dissimilaridade genética em arroz (*Oryza sativa* L.) quanto à toxicidade de alumínio**. Dissertação de Mestrado. Pelotas, 2003. 69 p.
- GOMES, A.S. *et al.* Embrapa. Cultivo do arroz irrigado no Brasil. Embrapa Clima Temperado. Sistemas de Produção, 3. Versão eletrônica. 2005.
- INTERNATIONAL RICE GENOME SEQUENCING PROJECT. The map-based sequence of the rice genome. **Nature**, v.436, p. 793-800, August 2005.
- KLUTHCOUSKI, J. e PINHEIRO, B.S. Embrapa. Cultivo do arroz de Terras Altas. Embrapa Arroz e Feijão. Sistemas de Produção, 1. Versão eletrônica. 2003.
- MA, J.F. *et al.* Response of rice to Al stress and identification of quantitative trait loci for Al tolerance. **Plant and Cell Physiology**, v.43, n.6, p. 652-659, 2002.
- MA, J.F. e FURUKAWA, J. Recent progress in the research of external Al detoxification in higher plants: a minireview. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.97, p. 46-51, 2003.
- MA, J.F. *et al.* Isolation and characterization of a rice mutant hypersensitive to Al. **Plant and Cell Physiology**, v.46, n.7, p. 1054-1061, 2005.
- MAGALHÃES, J.V. *et al.* A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. **Nature Genetics**, v.39, p. 1156-1161, 2007.
- NGUYEN, V.T. *et al.* Molecular mapping of genes conferring aluminum tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.102, p. 1002-1010, 2001.
- SAMAC, D.A. e TESFAYE, M. Plant improvement for tolerance to aluminum in acid soils – a review. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.75, p. 189-207, 2003.
- SAS Learning Edition, getting started with the SAS Learning Edition, Care, North Carolina: SAS Institute Inc. 2002.
- VASCONCELOS, S.S.; ROSSIELLO, R.O.P.; JACOB-NETO, J. Parâmetros morfológicos para estabelecer tolerância diferencial à toxicidade de alumínio em cultivares de arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n.3, p. 357-363, 2002.

VICENTE, F.M.P.; ROSSIELLO, R.O.P.; PEREIRA, M.P. Características indicativas de sensibilidade ao alumínio em arroz. I. Crescimento em solução nutritiva. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, n.1, p. 9-15, 1998.

von UEXKÜLL, H.R. e MUTERT, E. Global extent, development and economic impact of acid soils. **Plant Soil**, v.171, p. 1-15, 1995.

3. CAPÍTULO II

VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE CULTIVARES DE ARROZ SUBMETIDAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ALUMÍNIO EM CULTIVO HIDROPÔNICO

3.1. INTRODUÇÃO

A toxidez causada por alumínio é a principal limitação do solo à produção de alimentos e biomassa em todo mundo (Vitorello *et al.*, 2005). Pelo fato de que muitas espécies de plantas são sensíveis a concentrações micromolares desse elemento, o potencial de toxicidade dos solos em relação a ele é considerável (Delhaize e Ryan, 1995).

Embora a maior parte do alumínio ocorra em formas não fitotóxicas (como aluminossilicatos, por exemplo), a sua solubilização é aumentada sob condições de baixo pH. Desse modo, seu efeito tóxico é um dos principais fatores limitantes da produção agrícola em solos ácidos (Delhaize e Ryan, 1995). Estima-se que entre 30 e 40% do solo arável do mundo tenha pH inferior a 5,5 (von Uexküll e Mutert, 1995).

O sintoma primário da toxicidade causada pelo Al^{3+} é uma rápida inibição do crescimento da raiz, o que limita a absorção de água e nutrientes (Jones e Kochian, 1995; Barcelo e Poschenrieder, 2002). Como consequência, há diminuição no desenvolvimento e produtividade das culturas (Ma e Furukawa, 2003).

A cultura do arroz é afetada pela toxicidade do alumínio (Nguyen *et al.*, 2001). Por outro lado, variações genotípicas em relação à resposta a esse estresse foram descritas (Khatiwada *et al.*, 1996; Ma *et al.*, 2002).

A existência de variabilidade genética entre genótipos é essencial para o melhoramento, visto que cruzamentos que envolvam progenitores geneticamente diferentes são os mais indicados para que seja produzido alto efeito heterótico e, também, maior variabilidade genética em gerações segregantes (Rao *et al.*, 1981).

Nesse sentido, a quantificação da dissimilaridade genética pode servir como parâmetro para identificação de genitores que possibilitem este efeito heterótico na progênie e maior possibilidade de recuperação de recombinantes superiores nas gerações segregantes (Bertan *et al.*, 2006).

A determinação da divergência genética com o uso da análise multivariada, em que diversos caracteres avaliados podem ser dimensionados simultaneamente nos genótipos, tem se apresentado bastante vantajosa, podendo ser identificadas fontes de variabilidade genética, além da importância de cada caráter avaliado (Moura *et al.*, 199).

A técnica de análise multivariada foi bastante promissora na discriminação de genótipos de arroz (Morais *et al.*, 1999; Magalhães Jr., 2007), pimentão (Moura *et al.*, 1999), aveia (Marchioro *et al.*, 2003) e mamona (Costa *et al.*, 2006), entre outras espécies. Especificamente em relação à tolerância à toxidez por alumínio, este método foi utilizado com sucesso em arroz (Ferreira *et al.*, 1995; Ferreira *et al.*, 1998; Freitas, 2003) e trigo (Bertan *et al.*, 2006).

A cultura do arroz é considerada como uma das mais tolerantes ao alumínio dentre cereais como centeio, trigo e cevada. Apesar disso, os mecanismos para essa elevada tolerância ainda não foram esclarecidos (Ma *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2005).

O arroz apresenta importantes relações de sintenia com as outras espécies de cereais e é o genoma modelo para as gramíneas (IRGSP, 2005), de modo que informações obtidas através de seu estudo podem ser utilizadas para inferências em outras espécies desta família vegetal

Para a realização de estudos sobre tolerância de arroz ao alumínio é indispensável, primeiramente, conhecer a variabilidade genética existente entre as cultivares disponíveis, bem como determinar níveis de estresse capazes de diferenciar cultivares tolerantes e sensíveis. Nesse sentido, este capítulo teve por objetivo estimar a dissimilaridade genética entre genótipos de arroz pertencentes à coleção de trabalho da Embrapa Clima Temperado cultivados em sistema de hidroponia e submetidos a diferentes níveis de alumínio em solução, bem como estimar a contribuição relativa das variáveis para a dissimilaridade genética.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e condições de cultivo

Os genótipos foram testados em cultivo hidropônico, sob condições controladas de ambiente, no Laboratório de Duplo-Haplóides e Hidroponia pertencente ao Centro de Genômica e Fitomelhoramento (LDH/CGF) da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas (FAEM/UFPeI),

No estudo, foram avaliadas 30 cultivares de arroz de dois sistemas de cultivo (irrigado e sequeiro), que representam constituições genéticas elite pertencentes à coleção de trabalho da Embrapa Clima Temperado (Tabela 1).

Tabela 1. Relação dos genótipos de arroz utilizados no experimento. FAEM/UFPeI, 2009.

Sistema de Cultivo			
Irrigado		Sequeiro	
BRS 6 “Chuí”	BRS Ligeirinho	Arroz da Terra	BRS Brilhante
BRS Pelota	BR-IRGA 409	BRS Conai	BRS Bonança
BR-IRGA 410	BRS 7 “Taim”	Arroz de Seco	BRS Diamante
BRS Fronteira	BRS Atalanta	BRS Vencedora	BRS Primavera
BRS Bojuru	BR-IRGA 412	BRS Curinga	BRS Liderança
BRS Firmeza	BR-IRGA 414	IAC 202	IAC 500
BRS Agrisul	IAS 12-9 Formosa	BRS Colosso	BRS Talento
BRS Querência	Farroupilha		

Inicialmente, as sementes foram colocadas para germinar em papel umedecido com água destilada, o qual foi acondicionado em caixas gerbox que foram mantidas em estufa à temperatura de 28°C por 60 horas.

Dez plântulas de cada cultivar que apresentavam comprimento de raiz uniforme foram dispostas em telas de náilon, as quais foram adaptadas a recipientes

plásticos de dois litros de capacidade, de modo que a raiz mantivesse contato permanente com a solução nutritiva completa (Camargo e Oliveira, 1981) composta por $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 4mM; MgSO_4 2mM; KNO_3 4mM; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,435mM; KH_2PO_4 0,5mM; MnSO_4 2mM; CuSO_4 0,3 μM ; ZnSO_4 0,8 μM ; NaCl 30 μM ; Fe-EDTA 10 μM ; NaMoSO_4 0,10 μM e H_3BO_3 10 μM , permanecendo nesta condição por 48 horas.

Após este período, as telas com as plântulas foram transferidas para as soluções tratamento, que consistiram de um décimo da solução completa (sem adição de fosfato para evitar possível precipitação do alumínio) mais as concentrações de 0, 7, 14 e 28 mg L^{-1} de alumínio, fornecido como $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, onde foram mantidas por 48 horas. Posteriormente, retornaram para a solução completa por mais 72 horas antes de serem coletadas para a avaliação dos caracteres comprimento da raiz principal (cm), comprimento da parte aérea (cm), comprimento do coleóptilo (cm), comprimento da primeira folha (cm), inserção da primeira folha (cm), comprimento da segunda folha (cm) e número de raízes.

Os recipientes com as soluções completa e tratamento foram colocados em tanque com sistema de banho-maria com água à temperatura de 27°C. As soluções foram permanentemente oxigenadas e seu pH corrigido para $4,0 \pm 0,3$ pela adição de HCl 1N, segundo metodologia descrita por Camargo e Oliveira (1981). As plantas foram mantidas sob iluminação constante.

Delineamento experimental e análise multivariada

O experimento foi realizado seguindo o delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial dose x genótipo (4x30) com três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância univariada e a significância foi testada pelo teste F a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SAS (SAS, 2002).

A distância genética entre todos os pares de genótipos foi estimada por meio da distância generalizada de Mahalanobis (D^2) a partir de médias padronizadas, utilizando o programa computacional GENES (Cruz, 2001). Com base na matriz de dissimilaridade genética gerada foi aplicado o método de agrupamento de Tocher (Rao, 1952) e construído um dendrograma pelo método de agrupamento da distância média (UPGMA). Para a estimativa do ajuste entre a matriz de dissimilaridade e o dendrograma gerado foi calculado o coeficiente de correlação

cofenética (r) (Sokal e Rohlf, 1962), utilizando o programa computacional NTSYS pc 2.1 (Rohlf, 2000).

A importância relativa dos caracteres avaliados para a estimativa da dissimilaridade genética foi obtida por meio da participação dos componentes da D^2 , relativos a cada caráter, no total da dissimilaridade observada (Singh, 1981).

Para avaliar a existência de correlação fenotípica entre o comprimento de raiz e os demais caracteres avaliados, os dados foram submetidos ao teste de correlação de Pearson através do programa estatístico SAS (SAS, 2002).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resumo da análise de variância univariada (Tabela 2) demonstra que houve diferença significativa em todas as concentrações de alumínio para todos os caracteres avaliados, indicando, dessa forma, a existência de variabilidade genética entre os genótipos estudados.

O sintoma primário da toxicidade causada pelo alumínio é uma rápida inibição do crescimento radicular (Jones e Kochian, 1995; Barcelo e Poschenrieder, 2002). Deste modo, a medição do comprimento de raiz é usualmente utilizada na avaliação da tolerância de genótipos a esse estresse. De acordo com Vasconcelos *et al.* (2002), apenas as variáveis morfológicas ligadas ao sistema radicular permitem reconhecer a tolerância diferencial ao alumínio entre uma cultivar selecionada em condição de sequeiro adaptada à toxicidade por este metal e uma cultivar altamente sensível selecionada em condição de irrigação. Na mesma linha, o índice de sensibilidade do crescimento radicular à toxicidade por alumínio mostrou-se eficiente na avaliação da tolerância diferenciada de linhagens de terras altas esse estresse (Guimarães *et al.*, 2006).

Pode ser observado pela análise dos quadrados médios (Tabela 2) que, considerando o caráter comprimento de raiz como o principal para a avaliação da tolerância de genótipos de arroz ao alumínio, o nível de 14 mg L^{-1} é o que resulta na obtenção de maior variabilidade entre os genótipos, resultado semelhante ao encontrado por Freitas (2003), que indicou a dose de 15 mg L^{-1} de alumínio como a mais adequada para estudos de dissimilaridade genética em arroz visando à tolerância a este metal.

Tabela 2. Resumo da análise de variância univariada para os caracteres avaliados em arroz submetido a diferentes concentrações de alumínio em solução nutritiva. FAEM/UFPel, 2009.

Caracteres	Quadrado Médio			
	Concentração de alumínio (mg L ⁻¹)			
	0	7	14	28
Comprimento de raiz (cm)	8,41**	10,99**	11,85**	5,24**
Comprimento de parte aérea (cm)	34,22**	19,36**	30,63**	28,42**
Comprimento de coleóptilo (cm)	0,17**	0,20**	0,18**	0,18**
Comprimento da 1ª. folha (cm)	2,05**	1,67**	1,63**	1,77**
Inserção da 1ª. folha (cm)	3,25**	2,94**	2,91**	2,14**
Comprimento da 2ª. folha (cm)	36,09**	18,60**	33,85**	18,53**
Número de raízes	2,26**	1,82*	3,20**	0,87*

** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F

As Figuras 1, 2, 3 e 4 apresentam os dendrogramas representativos da dissimilaridade genética dos 30 genótipos de arroz para as variáveis avaliadas sob cada um dos níveis de alumínio utilizados. Os mesmos foram construídos com base no método UPGMA e a distância média de Mahalanobis entre as cultivares foi utilizada como critério para a formação dos grupos. Para a divisão dos mesmos, foi utilizado o cálculo da dissimilaridade média entre os genótipos.

A partir da análise da Figura 1, que representa a dissimilaridade genética entre os 30 genótipos na ausência de alumínio, é possível verificar a formação de quatro grandes grupos. O primeiro (I) é formado pelos genótipos IAS 12-9 Formosa e BRS Bojuru. O grupo II pode ser subdividido em três subgrupos (a, b e c): a), subdividido em a1) BRS Atalanta, BRS 6 “Chuí”, BRS Fronteira, BR-IRGA 410, BRS Ligeirinho, BRS Talento e BRS Pelota; a2) BRS Bonança, BRS Liderança, BRS Colosso, BRS Curinga e BRS Primavera e a3) BR-IRGA 409; b) BRS 7 “Taim”, BR-IRGA 412, BR-IRGA 414, BRS Agrisul e BRS Querência; e, por último, c) Farroupilha, BRS Brilhante, BRS Diamante, IAC 202, BRS CONAI, BRS Vencedora e Arroz de Seco. O grupo III contém BRS Firmeza e IAC 500, enquanto o IV grupo foi formado pelo genótipo Arroz da Terra.

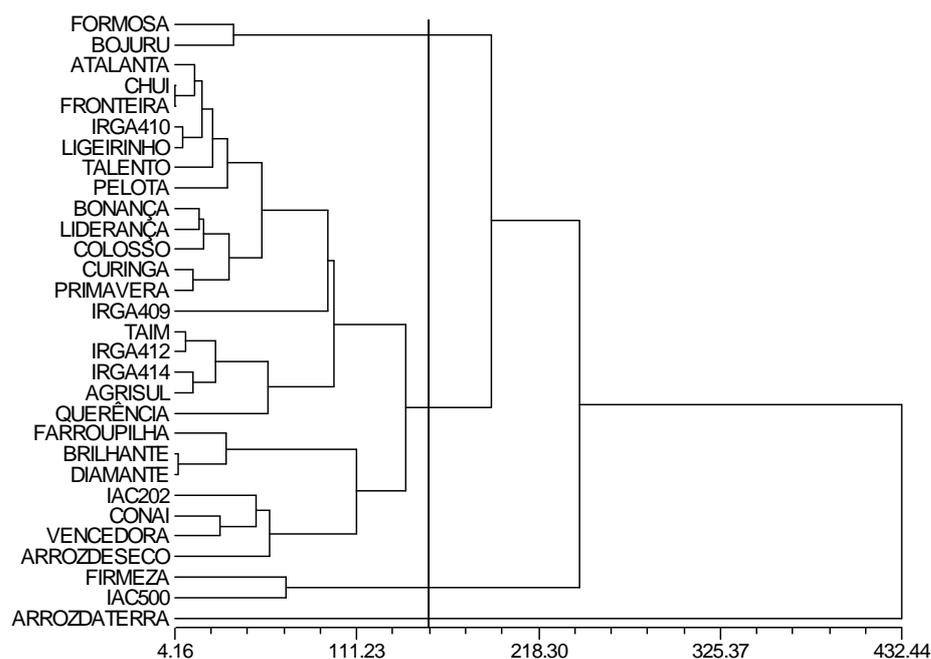


Figura 1. Dendrograma representativo da dissimilaridade genética de 30 genótipos de arroz para variáveis avaliadas sob estresse por alumínio na concentração de 0 mg L^{-1} (controle), resultante da análise de conglomeração obtida pelo método da distância média entre genótipos, utilizando Mahalanobis como medida de dissimilaridade. O coeficiente de correlação cofenética (r) foi de 0,80. FAEM/UFPel, 2009.

Os genótipos com menor dissimilaridade foram BRS 6 “Chuí” x BRS Fronteira e BRS Brilhante x BRS Diamante. A maior distância em relação aos demais foi observada no genótipo Arroz da Terra.

Pode ser observado que, de modo geral, os genótipos foram agrupados de acordo com seu sistema de cultivo, o que era esperado em função de que este agrupamento foi feito com base no tratamento controle, ou seja, 0 mg L^{-1} de alumínio na solução nutritiva. Da mesma forma, as cultivares IAS 12-9 Formosa e BRS Bojuru, pertencentes à subespécie japônica, formaram grupo isolado neste tratamento e se mantiveram sempre no mesmo grupo nos demais tratamentos, com exceção do de 7 mg L^{-1} . O coeficiente de correlação cofenética de 0,8 indica um bom ajuste entre a matriz de dissimilaridade e a representação gráfica obtida, de modo que há confiabilidade nas inferências realizadas.

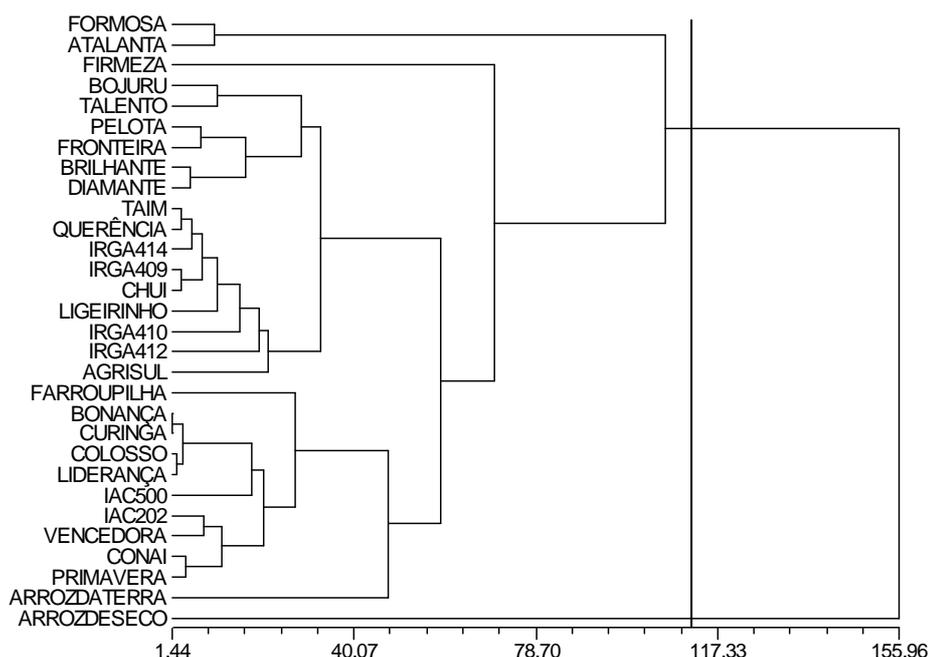


Figura 2. Dendrograma representativo da dissimilaridade genética de 30 genótipos de arroz para variáveis avaliadas sob estresse por alumínio na concentração de 7 mg L^{-1} , resultante da análise de conglomeração obtida pelo método da distância média entre genótipos, utilizando Mahalanobis como medida de dissimilaridade. O coeficiente de correlação cofenética (r) foi de 0,74. FAEM/UFPel, 2009.

A análise do dendrograma apresentado na Figura 2 indica a formação de dois grandes grupos, sendo que o primeiro (I) deles pode ser subdividido em cinco sub-grupos: a) formado pelos genótipos IAS 12-9 Formosa e BRS Atalanta; b) BRS Firmeza; c), com dois subgrupos: c1) BRS Bojuru, BRS Talento, BRS Pelota, BRS Fronteira, BRS Brilhante, BRS Diamante e c2) BRS 7 “Taim”, BRS Querência, BR-IRGA 414, BR-IRGA 409, BRS 6 “Chuí”, BRS Ligeirinho, BR-IRGA 410, BR-IRGA 412 e BRS Agrisul; d) composto por d1) Farroupilha e d2) BRS Bonança, BRS Curinga, BRS Colosso, BRS Liderança, IAC 500, IAC 202, BRS Vencedora, BRS Conai e BRS Primavera; e) constituído por Arroz da Terra. O segundo (II) grupo é formado pelo genótipo Arroz de Seco.

Na concentração de 7 mg L^{-1} de alumínio os genótipos que apresentaram menor dissimilaridade foram BRS Bonança x BRS Curinga e BRS Colosso e BRS Liderança. Por outro lado, o cultivar Arroz de Seco foi o que apresentou maior distância em relação aos outros.

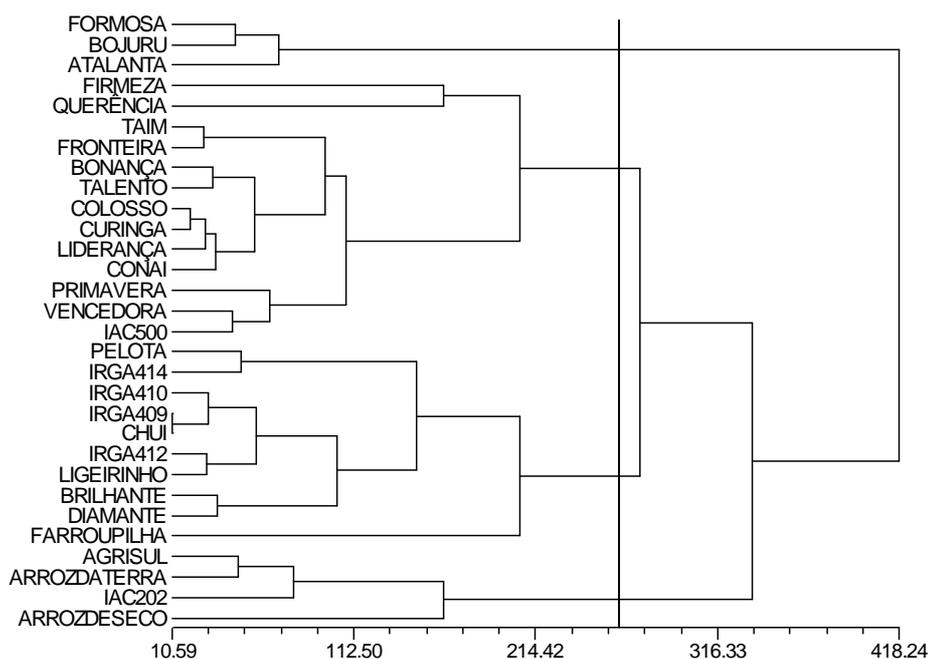


Figura 3. Dendrograma representativo da dissimilaridade genética de 30 genótipos de arroz para variáveis avaliadas sob estresse por alumínio na concentração de 14 mg L^{-1} , resultante da análise de conglomerção obtida pelo método da distância média entre genótipos, utilizando Mahalanobis como medida de dissimilaridade. O coeficiente de correlação cofenética (r) foi de 0,59. FAEM/UFPel, 2009.

A avaliação do dendrograma da Figura 3 revela a formação de quatro grupos. O grupo I é constituído pelos genótipos IAS 12-9 Formosa, BRS Bojuru e BRS Atalanta. O II, por sua vez, pode ser subdividido em dois subgrupos, a saber: a) BRS Firmeza e BRS Querência e b) BRS 7 “Taim”, BRS Fronteira, BRS Bonança, BRS Talento, BRS Colosso, BRS Curinga, BRS Liderança, BRS Conai, BRS Primavera, BRS Vencedora e IAC 500. No grupo III são encontrados BRS Pelota, BR-IRGA 414, BR-IRGA 410, BR-IRGA 409, BRS 6 “Chuí”, BR-IRGA 412, BRS Ligeirinho, BRS Brilhante, BRS Diamante e Farroupilha. O grupo IV é formado por BRS Agrisul, Arroz da Terra, IAC 202 e Arroz de Seco.

O menor nível de dissimilaridade foi verificado entre os genótipos BR-IRGA 409 x BRS 6 “Chuí”, enquanto IAS 12-9 Formosa, BRS Bojuru e BRS Atalanta são os mais distantes geneticamente na concentração de 14 mg L^{-1} de alumínio em relação às demais constituições genéticas avaliadas.

O dendrograma representativo da dissimilaridade genética dos 30 genótipos de arroz para variáveis avaliadas sob estresse por alumínio na concentração de 28 mg L⁻¹ é mostrado na Figura 4. Pode ser observada a formação de quatro grupos. O grupo I compreende os genótipos IAS 12-9 Formosa, BRS Bojuru e BRS Talento. O II pode ser subdividido em dois subgrupos, sendo que o primeiro deles (a) também pode ser subdividido em a1) constituído por BRS Atalanta, BRS Pelota, BR-IRGA 410, BR-IRGA 409, BRS Fronteira, BRS 6 “Chuí”, BRS Ligeirinho, BRS 7 “Taim”, BRS Querência e BR-IRGA 412 e a2) em que são encontrados BRS Firmeza, BRS Vencedora, IAC 500, BRS Bonança, BRS Colosso, BRS Liderança, BRS Curinga, BRS Brilhante, BRS Primavera, BRS Diamante e BRS Conai. O segundo subgrupo, (b), tem na sua composição as cultivares BR-IRGA 414, BRS Agrisul e IAC 202. O genótipo Farroupilha é o único componente do grupo III, ao passo que Arroz de Seco e Arroz da Terra formam o grupo IV.

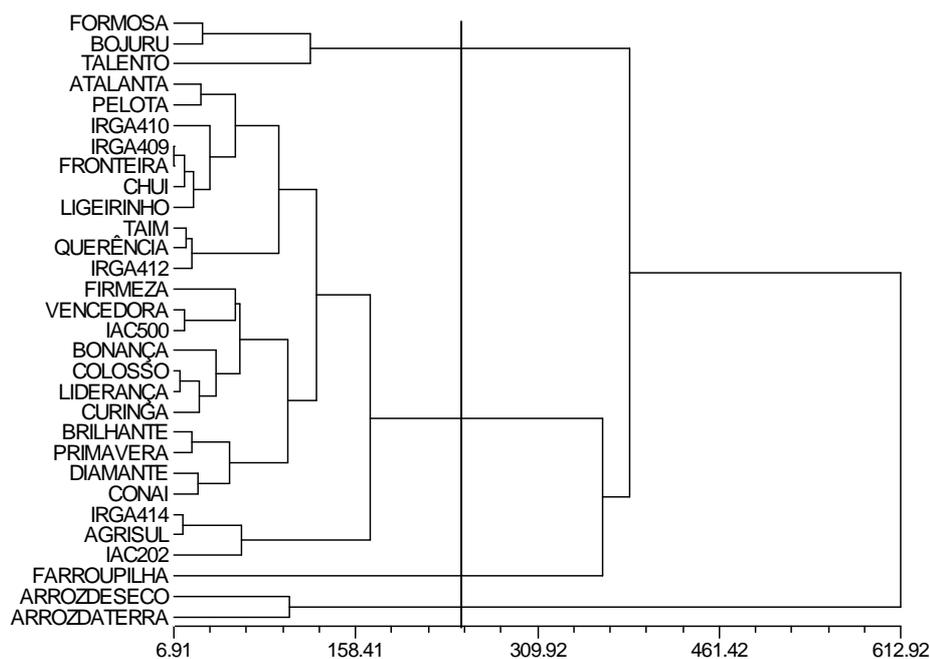


Figura 4. Dendrograma representativo da dissimilaridade genética de 30 genótipos de arroz para variáveis avaliadas sob estresse por alumínio na concentração de 28 mg L⁻¹, resultante da análise de conglomeração obtida pelo método da distância média entre genótipos, utilizando Mahalanobis como medida de dissimilaridade. O coeficiente de correlação cofenética (r) foi de 0,74. FAEM/UFPel, 2009.

As cultivares BR-IRGA 409 x BRS Fronteira demonstraram o menor nível de dissimilaridade. Por outro lado, Arroz de Seco e Arroz da Terra foram aqueles que apresentaram maior distância em relação aos outros.

A análise dos agrupamentos gerados pelo método de Tocher (Tabelas 3, 4 5 e 6) nas quatro doses de alumínio utilizadas revelou que o maior número de grupos (nove) foi gerado na concentração de 14 mg L⁻¹ (Tabela 5), enquanto houve a formação de cinco, sete e oito grupos nas doses de 0 (Tabela 3), 7 (Tabela 4) e 28 mg L⁻¹ de alumínio (Tabela 6), respectivamente. Dessa forma, o nível de 14 mg L⁻¹ foi identificado como aquele que possibilitou a melhor dissimilaridade entre os genótipos, podendo ser utilizado para estudos genéticos relacionados à tolerância ao alumínio em arroz.

Esse resultado está de acordo com o observado a partir da comparação entre as médias do comprimento de raiz dos 30 genótipos nas quatro doses de alumínio, quando foi evidenciado que no nível de 14 mg L⁻¹ houve a maior diferenciação de resposta ao estresse entre as cultivares de arroz irrigado e de sequeiro (Capítulo I).

Tabela 3. Agrupamento dos 30 genótipos de arroz pelo método de Tocher com base nos caracteres comprimento de raiz, comprimento de parte aérea, comprimento de coleóptilo, comprimento da 1^a. folha, inserção da 1^a. folha, comprimento da 2^a. folha e número de raízes no nível de 0 mg L⁻¹ de alumínio (controle). FAEM/UFPel, 2009.

Grupo	Genótipos
1	BRS 6 “Chuí”, BRS Fronteira, BRS Atalanta, BRS Ligeirinho, BR-IRGA 410, BRS Talento, BRS Liderança, BRS Pelota, BRS Primavera, BRS Curinga, BRS Bonança, BRS Colosso, BRS Querência, BRS 7 “Taim”, BR-IRGA 412, BRS Agrisul, BR-IRGA 409, BRS Brilhante, BRS Diamante, IAC 202, BR-IRGA 414, BRS Vencedora
2	Arroz de Seco, BRS Conai, Farroupilha
3	IAS 12-9 Formosa, BRS Bojuru
4	BRS Firmeza, IAC 500
5	Arroz da Terra

Diferentemente do observado no dendrograma da Figura 1, a maioria dos genótipos, independentemente do sistema de cultivo, foram agrupados em um mesmo grupo (Grupo 1) pelo método de Tocher na ausência de alumínio (Tabela 3).

Na presença de 7 mg L⁻¹ do metal, ao contrário (Tabela 4), com exceção da presença dos genótipos Farroupilha e BRS Pelota no Grupo 1 e BRS Talento no Grupo 2, foi verificada a formação de grupos constituídos apenas por cultivares de sistema de sequeiro (Grupos 1, 6 e 7) e sistema irrigado (Grupos 2, 3, 4 e 5).

Tabela 4. Agrupamento dos 30 genótipos de arroz pelo método de Tocher com base nos caracteres comprimento de raiz, comprimento de parte aérea, comprimento de coleóptilo, comprimento da 1^a. folha, inserção da 1^a. folha, comprimento da 2^a. folha e número de raízes no nível de 7 mg L⁻¹ de alumínio. FAEM/UFPel, 2009.

Grupo	Genótipos
1	BRS Bonança, BRS Curinga, BRS Colosso, BRS Liderança, BRS Conai, BRS Vencedora, IAC 202, BRS Primavera, IAC 500, BRS Brilhante, Farroupilha, BRS Pelota, BRS Diamante
2	BR-IRGA 409, BRS 6 “Chuí”, BR-IRGA 414, BRS 7 “Taim”, BRS Querência, BRS Ligeirinho, BRS Fronteira, BR-IRGA 410, BR-IRGA 412, BRS Agrisul, BRS Talento
3	IAS 12-9 Formosa, BRS Atalanta
4	BRS Firmeza
5	BRS Bojuru
6	Arroz da Terra
7	Arroz de Seco

A presença de 14 mg L⁻¹ de alumínio propiciou a formação de nove grupos. Dois grandes grupos foram formados, predominantemente, com genótipos de arroz irrigado (Grupo 1) e de sequeiro (Grupo 2). Por outro lado, os Grupos 3, 5, 6, 7 e 8 tiveram, em sua composição, somente cultivares do sistema irrigado (Tabela 5).

Tabela 5. Agrupamento dos 30 genótipos de arroz pelo método de Tocher com base nos caracteres comprimento de raiz, comprimento de parte aérea, comprimento de coleótilo, comprimento da 1ª. folha, inserção da 1ª. folha, comprimento da 2ª. folha e número de raízes no nível de 14 mg L⁻¹ de alumínio. FAEM/UFPEl, 2009.

Grupo	Genótipos
1	BR-IRGA 409, BRS 6 “Chuí”, BR-IRGA 410, BR-IRGA 412, BRS Ligeirinho, BRS Brilhante, BRS Diamante
2	BRS Colosso, BRS Curinga, BRS Liderança, BRS Conai, BRS Vencedora, BRS Fronteira, BRS Talento, BRS Bonança, BRS Primavera, IAC 500
3	IAS 12-9 Formosa, BRS Bojuru, BRS Atalanta
4	BRS Agrisul, Arroz da Terra, IAC 202
5	BRS Pelota, BR-IRGA 414, BRS 7 “Taim”
6	BRS Querência
7	Farroupilha
8	BRS Firmeza
9	Arroz de Seco

O nível mais alto de alumínio fez com que fossem reunidos, em um mesmo grupo, de forma similar ao tratamento controle, cultivares dos dois sistemas de cultivo. Entretanto, grupos constituídos unicamente por genótipos do sistema irrigado (Grupos 4, 6 e 7) e de sequeiro (Grupos 3, 5 e 8) também foram observados (Tabela 6).

Observando conjuntamente os agrupamentos gerados através da distância média entre genótipos (Figuras 1, 2, 3 e 4), bem como pelo método de Tocher (Tabelas 3, 4, 5 e 6), os quais representam as distâncias entre os genótipos avaliados neste trabalho, foi possível observar que, quando submetidos aos tratamentos com alumínio, as cultivares BRS Curinga, BRS Liderança e IAC 500, consideradas de resposta tolerante ao alumínio (Capítulo I), demonstraram baixa dissimilaridade genética entre si, estando, inclusive, em um mesmo grupo estabelecido por ambos os métodos de agrupamento.

Tabela 6. Agrupamento dos 30 genótipos de arroz pelo método de Tocher com base nos caracteres comprimento de raiz, comprimento de parte aérea, comprimento de coleótilo, comprimento da 1ª. folha, inserção da 1ª. folha, comprimento da 2ª. folha e número de raízes no nível de 28 mg L⁻¹ de alumínio. FAEM/UFPEl, 2009.

Grupo	Genótipos
1	BR-IRGA 409, BRS Fronteira, BRS 6 “Chuí”, BRS Ligeirinho, BRS Pelota, BR-IRGA 410, BR-IRGA 412, BRS Querência, BRS Colosso, BRS Brilhante, BRS Liderança, BRS Curinga, BRS Bonança, BRS Atalanta, BRS Firmeza, IAC 500, BRS Vencedora
2	BR-IRGA 414, BRS Agrisul, IAC 202
3	BRS Diamante, BRS Conai, BRS Primavera
4	IAS 12-9 Formosa, BRS Bojuru
5	Arroz de Seco, Arroz da Terra
6	Farroupilha
7	BRS 7 “Taim”
8	BRS Talento

Por outro lado, IAS 12-9 Formosa, BR-IRGA 410 e Arroz da Terra, os quais foram considerados sensíveis ao alumínio, apresentaram grande distância genética entre si, tendo sido agrupados separadamente nos dois métodos utilizados. Este resultado é devido, provavelmente, ao fato de que estes genótipos apresentam origens diferentes. Embora IAS 12-9 Formosa e BR-IRGA 410 sejam cultivares de sistema irrigado, o primeiro pertence à subespécie japônica e o segundo é da subespécie indica, enquanto Arroz da Terra é oriundo do sistema de sequeiro.

Analisando a contribuição relativa dos caracteres avaliados para a dissimilaridade genética (Tabela 7) pode ser observado, diferentemente do que era esperado, que o comprimento de raiz apresentou a maior contribuição para a divergência genética (46,9%) dentre todos os caracteres avaliados somente na dose de 7 mg L⁻¹ de alumínio. Na presença de 14 mg L⁻¹ a contribuição desse caráter, utilizado na avaliação para a discriminação da tolerância, foi de apenas 7,6%, a menor dentre todas, mostrando ser o menos eficiente em expressar as diferenças genéticas entre as 30 cultivares de arroz avaliadas. Esse resultado contrasta com o obtido por Freitas (2003) em arroz, que observou aumento na contribuição relativa da variável comprimento de raiz com o incremento na concentração de alumínio.

As variáveis comprimento da primeira folha e inserção da primeira folha apresentaram elevadas contribuições em todos os níveis de alumínio, de modo que interferiram significativamente na formação dos diferentes agrupamentos de genótipos (Tabela 7). Testando diferentes protocolos em aveia submetida a doses variadas de alumínio, Crestani (2008) demonstrou que, além destes caracteres, o comprimento da parte aérea e da segunda folha também foram importantes na disposição dos genótipos nos diferentes grupos formados,

O caráter comprimento de raiz é a variável mais expressiva na distinção entre genótipos sensíveis e tolerantes ao alumínio tóxico, uma vez que a raiz é o órgão mais afetado pelas propriedades nocivas deste elemento químico, pois o alumínio está diretamente em contato com o sistema radicular (Ryan *et al.*, 1993). Entretanto, este caráter não revelou grande importância na determinação dos agrupamentos observados nas diferentes doses de alumínio utilizadas (exceto na de 7 mg L⁻¹), indicando falta de consistência dos grupos formados em relação à classificação dos genótipos avaliados segundo o comprimento de raiz (Capítulo I).

Tabela 7. Contribuição relativa para a dissimilaridade genética, dada em valores absolutos (S.j.) e em percentagem, dos caracteres: comprimento de raiz (CR), comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de coleótilo (CC), comprimento da 1ª. folha (CPF), inserção da 1ª. folha (IPF), comprimento da 2ª. folha (CSF) e número de raízes (NR) avaliados em plântulas de arroz submetidas a diferentes níveis de alumínio em solução nutritiva. FAEM/UFPel, 2009.

Caráter	Concentração de alumínio (mg L ⁻¹)							
	0		7		14		28	
	S.j	%	S.j	%	S.j	%	S.j	%
CR	10903,1	16,6	12036,4	46,9	8807,9	7,6	10533,4	10,0
CPA	10087,1	15,4	1430,5	5,6	9140,7	7,9	15044,0	14,2
CC	202,9	0,3	523,9	2,0	15378,6	13,3	699,3	0,7
CPF	16901,5	25,7	2485,2	9,7	32322,9	27,9	42124,2	39,8
IPF	16404,6	24,9	6274,4	24,5	9483,6	8,2	32651,7	30,9
CSF	9226,8	14,0	2539,2	9,9	31125,8	26,8	4137,4	3,9
NR	1974,4	3,0	357,4	1,4	9700,9	8,4	541,6	0,5

As estimativas de correlação fenotípica de Pearson entre a variável comprimento de raiz e as demais variáveis analisadas (Tabela 8) demonstraram que houve correlação linear negativa com a variável número de raízes e positiva com a inserção da primeira folha em todos os níveis de alumínio.

Em relação ao número de raízes, os valores evidenciam a existência de correlação média com o comprimento de raiz, exceto para o nível 7 mg L⁻¹ de alumínio, em que a mesma foi fraca. A magnitude da correlação e a dificuldade em mensurar este caráter de forma precisa comprometem o seu uso na avaliação da tolerância ao alumínio. Por outro lado, houve forte correlação entre o comprimento de raiz e a inserção da primeira folha na ausência de alumínio. Entretanto, a presença do metal reduziu esta correlação para níveis médios (Tabela 8),

As variáveis comprimento de parte aérea e comprimento da segunda folha não apresentaram correlação com comprimento de raiz em nenhum dos tratamentos. Por outro lado, pode ser observada correlação positiva, porém de reduzida magnitude, com o comprimento do coleótilo nos níveis de 0, 7 e 14 mg L⁻¹ de alumínio e com o comprimento da primeira folha no controle.

Tabela 8. Estimativas de correlação de Pearson entre a variável comprimento de raiz (CR) e comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de coleótilo (CC), comprimento da 1ª. folha (CPF), inserção da 1ª. folha (IPF), comprimento da 2ª. folha (CSF) e número de raízes (NR) avaliados em plântulas de arroz submetidas a diferentes níveis de alumínio em solução nutritiva. FAEM/UFPel, 2009.

Caráter	Comprimento de Raiz			
	Concentração de alumínio (mg L ⁻¹)			
	0	7	14	28
CPA	0,11 ^{ns}	-0,05 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,12 ^{ns}
CC	0,40*	0,28*	0,24*	0,15 ^{ns}
CPF	0,23*	0,15 ^{ns}	0,15 ^{ns}	0,15 ^{ns}
IPF	0,68*	0,38*	0,39*	0,43*
CSF	-0,11 ^{ns}	-0,16 ^{ns}	-0,01 ^{ns}	0,05 ^{ns}
NR	-0,31*	-0,26*	-0,56*	-0,37*

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste t;

ns = Não significativo

Estimativas de correlação possuem ampla possibilidade de utilização no melhoramento vegetal pois, quando o caráter desejado é difícil de ser selecionado em razão de dificuldades de avaliação ou apresentar baixa herdabilidade, pode ser mais conveniente selecionar, de forma indireta, caracteres de alta herdabilidade e facilmente mensuráveis (Carvalho *et al.*, 2004). Pelo fato das correlações obtidas entre o comprimento de raiz e as demais variáveis analisadas, principalmente na presença de alumínio, terem sido de fracas a médias, o emprego destas variáveis na seleção indireta para tolerância ao alumínio em plântulas de arroz não apresentará confiabilidade, devendo ser utilizado o comprimento de raiz. Em outro estudo envolvendo plântulas de arroz, Freitas *et al.* (2006) também observaram que esta variável é a mais indicada para a avaliação das mesmas em relação ao alumínio.

A análise dos resultados apresentados nas Tabelas 7 e 8 no tocante à concentração de 14 mg L^{-1} de alumínio - considerada como a mais indicada para a avaliação da dissimilaridade entre os genótipos utilizando como caráter principal o comprimento de raiz - demonstra que, uma vez que não ocorreu correlação significativa entre este caráter e o comprimento da primeira folha (o que mais contribuiu para a dissimilaridade), é provável que as diferenças encontradas entre os genótipos decorram da constituição genética variável existente entre eles em relação a esse último caráter, independentemente da reação ao alumínio, o que poderia explicar a baixa contribuição do comprimento de raiz para a divergência observada neste tratamento.

Essa afirmativa pode ser corroborada através da análise da contribuição relativa dos caracteres no nível 0 mg L^{-1} (Tabela 7), em que o comprimento da primeira folha também foi a variável que mais contribuiu para a dissimilaridade.

Por outro lado, poderia ser inferido que a dose de 14 mg L^{-1} é muito forte e começa a aproximar os genótipos quanto ao comprimento de raiz, explicando a baixa contribuição relativa deste caráter. Conforme pode ser observado na Tabela 3 do Capítulo I, seis classes genotípicas foram formadas neste nível de alumínio, contra oito no nível 0 mg L^{-1} e sete no nível de 7 mg L^{-1} . Embora tenha havido uma redução no número de classes com o aumento da dose, quando comparadas as doses entre si dentro de cada genótipo o nível de 14 mg L^{-1} foi o que melhor discriminou os genótipos tolerantes e sensíveis.

A análise conjunta dos resultados em relação à dissimilaridade entre os genótipos avaliados, à contribuição relativa dos caracteres e às correlações

observadas indica que, ao contrário da hipótese inicial, o comprimento de raiz não foi o caráter mais importante para a diferenciação entre as 30 cultivares de arroz. Assim, diferentemente do que seria esperado em função de que o comprimento de raiz das cultivares de sequeiro foi maior do que as de sistema irrigado (Tabela 3, Capítulo I), os genótipos destes dois sistemas de cultivo foram, de modo geral, dispostos em um mesmo grupo. Do mesmo modo, a constituição dos diferentes grupos não foi grandemente afetada pelo aumento na concentração de alumínio.

Esse resultado pode estar ligado ao fato de que os caracteres que mais influenciaram na dissimilaridade genética foram aqueles relacionados à parte aérea. A redução do crescimento da parte aérea ocorre num momento posterior e parece ser uma consequência dos danos que são observados primeiramente na raiz (Ryan *et al.*, 1993; Jones e Kochian, 1995). É provável, pois, que os agrupamentos gerados com base na distância média de Mahalanobis e pelo método de Tocher sejam devido às características genotípicas de cada um em relação à parte aérea, independentemente do alumínio, visto que em nenhum momento foram observados sintomas de toxidez pelo metal nas folhas.

Pelo fato de haver elevada concordância entre as técnicas de agrupamento empregadas no trabalho, mesmo que os genótipos considerados tolerantes ao alumínio estejam em grupos similares, é possível indicar o cruzamento destas mesmas cultivares entre si, e também para com as demais, desde que apresentem algum nível de tolerância. Assim, pode ser esperado que a segregação e recombinação dos genes que controlam a tolerância a esse estresse nos distintos genitores proporcionem a obtenção de classes de indivíduos superiores e que, por ocasião da seleção, possam resultar em ganho genético para o caráter.

3.4. CONCLUSÕES

Existe variabilidade genética entre os genótipos estudados para as variáveis avaliadas em todas as concentrações de alumínio utilizadas.

De modo geral, as cultivares de sistema de cultivo irrigado e sequeiro formaram grupos separados.

O nível de 14 mg L^{-1} de alumínio é o que proporciona a maior dissimilaridade entre os genótipos estudados. Esta dissimilaridade é devida ao comprimento da primeira folha, variável que apresenta a maior contribuição relativa para a dissimilaridade genética nesta concentração de alumínio. Essa elevada contribuição não está relacionada com esta dose de alumínio, visto que no tratamento controle a resposta foi semelhante.

Apesar da existência de correlações significativas entre o comprimento de raiz e as variáveis comprimento de coleóptilo, inserção da primeira folha e número de raízes na presença de alumínio, as mesmas são de reduzida magnitude, não sendo indicadas para uso na avaliação de genótipos em relação à tolerância ao alumínio.

Os genótipos BRS Curinga, BRS Liderança e IAC 500, tolerantes ao alumínio, apresentam elevada similaridade genética. Desta forma, são promissores para serem utilizados em cruzamentos que visem à obtenção de progênies superiores para a tolerância ao alumínio.

3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARCELÓ, J. e 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.
- BERTAN, I. *et al.* Dissimilaridade genética entre genótipos de trigo avaliados em cultivo hidropônico sob estresse por alumínio. **Bragantia**, v.65, p. 55-63, 2006.
- CAMARGO, C.E.O. e OLIVEIRA, O.F. Tolerância de cultivares de trigo a diferentes níveis de alumínio em solução nutritiva e no solo. **Bragantia**, v.40, p.21-31, 1981.
- CARVALHO, F.I.F.; LORENCETTI, C.; BENIN, G. **Estimativas e implicações da correlação no melhoramento genético vegetal**. Pelotas: Editora Universitária da Universidade Federal de Pelotas, 2004. 142p.:il.
- COSTA, M.N. *et al.* Divergência genética entre acessos e cultivares de mamoneira por meio de estatística multivariada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.1617-1622, 2006
- DELHAIZE, E. e RYAN, P.R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiology**, v.107, p. 315-321, 1995.
- von UEXKÜLL, H.R. e MUTERT, E. Global extent, development and economic impact of acid soils. **Plant Soil**, v.171, p. 1-15, 1995.
- FERREIRA, R.P. *et al.* Identificação de cultivares de arroz tolerantes à toxidez de alumínio por técnica multivariada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.30, p. 789-795, 1995.
- FERREIRA, R.P. *et al.* Herança da tolerância à toxidez de alumínio em arroz com base em análise dialélica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p. 615-621, 1999.
- FREITAS, F.A. **Dissimilaridade genética em arroz (*Oryza sativa* L.) quanto à toxicidade de alumínio**. Dissertação de Mestrado. Pelotas, 2003. 69 p.
- GUIMARÃES, C.M.; NEVES, P.C.F.; STONE, L.F.; ZIMMERMANN, F.J.P. Resistência do arroz de terras altas ao alumínio. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.10, p. 855-860, 2006.

- JONES, D.L. e KOCHIAN, L.V. Aluminum inhibition of the inositol 1,4,5-trisphosphate signal transduction pathway in wheat roots: a role in aluminum toxicity? **The Plant Cell**, v.7, p. 1913-1922, 1995.
- KHATIWADA, S.P. *et al.* Variability and genetics of tolerance for aluminum toxicity in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.93, p. 738-744, 1996.
- MA, J.F. e FURUKAWA, J. Recent progress in the research of external Al detoxification in higher plants: a minireview. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.97, p. 46-51, 2003.
- MA, J.F. *et al.* Response of rice to Al stress and identification of quantitative trait loci for Al tolerance. **Plant and Cell Physiology**, v.43, n.6, p. 652-659, 2002.
- MA, J.F. *et al.* Isolation and characterization of a rice mutant hypersensitive to Al. **Plant and Cell Physiology**, v.46, n.7, p. 1054-1061, 2005.
- MAGALHÃES JÚNIOR, A. M. **Recursos genéticos de arroz (*Oryza sativa* L.) no sul do Brasil**. 2007. 160f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- MARCHIORO, V.S. *et al.* Dissimilaridade genética entre genótipos de aveia. **Ciências Agrotécnicas**, v.27, p. 285-294, 2003.
- MORAIS, O. P. *et al.* Divergência genética entre os genitores da população de arroz irrigado CNA-IRAT 4. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.33, p. 1339-1348, 1998.
- MOURA, W.M. *et al.* Divergência genética em linhagens de pimentão em relação a eficiência nutricional de fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p. 217-224, 1999.
- NGUYEN, V.T. *et al.* Molecular mapping of genes conferring aluminum tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.102, p. 1002-1010, 2001.
- RAO, A.V. *et al.* Genetic divergence among some brown plant hopper resistant rice varieties. **The Indian Journal of Genetic Plant Breeding**, v.41, p.179-185, 1981.
- 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.
- ROHLF, F.J. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. New York: Exeter Software, 2000. 38p.

SAS Learning Edition, getting started with the SAS Learning Edition, Cary, North Carolina: SAS Institute Inc. 2002.

SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **The Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**, New York, v.41, n.2, p. 237-245, 1981.

SOKAL, R. R. e ROHLF, F.J. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, v.11, p. 33-40, 1962.

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

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

4. CAPÍTULO III

EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ALUMÍNIO E DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO SOBRE O CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE ARROZ EM CULTIVO HIDROPÔNICO

4.1 INTRODUÇÃO

O alumínio é o metal mais abundante e o terceiro elemento mais comum na crosta terrestre, estando presente em todos os solos (Foy *et al.*, 1978). Embora a maior parte seja encontrada como aluminossilicatos e óxidos, os quais são insolúveis, sua solubilidade é grandemente aumentada em condições de baixo pH, dando origem à forma Al^{3+} , cuja ação tóxica às plantas tem sido amplamente documentada, sendo considerada o principal fator limitante à produtividade das culturas em solos ácidos (Delhaize e Ryan, 1995; Kochian, 1995).

Solos com esta característica compreendem grandes áreas, mais especificamente nas regiões tropicais e subtropicais, sendo estimado que entre 30 e 40% do solo arável do mundo apresente pH inferior a 5,5. Deste modo, sua presença restringe a produção de alimentos em muitos países em desenvolvimento (Kochian, 1995; von Uexküll e Mutert, 1995), dentre os quais está o Brasil, onde estão presentes em cerca de 60% do território (Brondani e Paiva, 1996).

Em razão da impossibilidade de corrigir o pH do subsolo e também da elevada capacidade de fixação do fósforo por esses solos, o desenvolvimento de um sistema de produção sustentável para reduzir sua acidez e melhorar a fertilidade através da aplicação de calcário e fertilizantes não é suficiente (Wu *et al.*, 2000).

O sintoma primário da toxicidade causada pelo Al^{3+} é uma rápida inibição do crescimento radicular, restringindo a absorção de água e nutrientes (Jones e Kochian, 1995; Barcelo e Poschenrieder, 2002). É sabido que ele interfere na divisão celular das raízes, aumenta a rigidez da parede celular, reduz a replicação do DNA,

fixa o fósforo sob formas menos disponíveis no solo e na superfície radicular, diminui a respiração da raiz, interfere com a atividade enzimática relacionada com a fosforilação dos açúcares e a deposição dos polissacarídeos da parede celular, além de interferir na absorção, transporte e utilização de vários nutrientes essenciais (Ca, Mg, K, P e Fe) (Rout *et al.*, 2001). Como consequência, há diminuição no desenvolvimento e produtividade das culturas (Ma e Furukawa, 2003).

O arroz, embora seja grandemente afetado pela toxicidade deste íon (Nguyen *et al.*, 2001), é considerado, de modo geral, como um dos cereais mais tolerantes ao alumínio. É sabido, entretanto, que os mecanismos responsáveis por essa tolerância não foram ainda determinados (Ma *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2005).

Variações genótípicas em relação à resposta a esse estresse foram descritas em diversos trabalhos (Khatiwada *et al.*, 1996; Ma *et al.*, 2002; Freitas, 2006), de modo que é possível o desenvolvimento de cultivares de arroz tolerantes ao alumínio através de programas de melhoramento (Wu *et al.*, 1997).

Diferenças na sensibilidade ao alumínio de acordo com o estágio de desenvolvimento também foram relatadas. Em arroz, a germinação não é afetada pelo metal, ao passo que as plântulas são muito sensíveis. Esta sensibilidade diminui com o passar do tempo (Macedo *et al.*, 1997).

Um dos principais problemas encontrados na avaliação de plantas para a tolerância ao alumínio é o correto ajuste dos níveis de estresse, de modo que se obtenha uma redução marcante no crescimento radicular das plantas mais sensíveis e um efeito limitado nas mais resistentes (Macedo *et al.*, 1997).

Em arroz, diversos trabalhos buscaram determinar a tolerância de genótipos submetendo-os a diferentes concentrações de alumínio em cultivo hidropônico (Fageria *et al.*, 1982; Vicente *et al.*, 1998; Vasconcelos *et al.*, 2002; Freitas *et al.*, 2003). Outras espécies de poáceas tais como milho (Paterniani e Furlani, 2002), trigo (Bertan *et al.*, 2005), aveia (Sánchez-Chacón *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2007) e azevém (Bresolin, 2007) também já foram alvo de estudos para a detecção de diferentes níveis de tolerância ao alumínio tóxico. Entretanto, o tempo de exposição é também um importante fator a ser considerado (Macedo *et al.*, 1997).

O objetivo deste capítulo foi avaliar o efeito do aumento no tempo de exposição a diferentes níveis de alumínio em solução nutritiva sobre o comprimento de raiz de 10 genótipos de arroz.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Duplo-Haplóides e Hidroponia do Centro de Genômica e Fitomelhoramento (FAEM/UFPel), em condições controladas de ambiente, utilizando 10 genótipos, cinco de sistema de cultivo irrigado e cinco de sistema de sequeiro (Tabela 1).

As sementes foram colocadas para germinar em papel umedecido com água destilada, o qual foi acondicionado em caixas gerbox que foram mantidas em estufa à temperatura de 28°C por 60 horas.

Imediatamente, 10 plântulas uniformes de cada cultivar foram dispostas em telas de náilon adaptadas a recipientes de dois litros de capacidade contendo solução nutritiva completa (Camargo e Oliveira, 1981) composta por $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 4mM; MgSO_4 2mM; KNO_3 4mM; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,435mM; KH_2PO_4 0,5mM; MnSO_4 2mM; CuSO_4 0,3 μM ; ZnSO_4 0,8 μM ; NaCl 30 μM ; Fe-EDTA 10 μM ; NaMoSO_4 0,10 μM e H_3BO_3 10 μM , permanecendo nesta condição por 48 horas. Após, foram transferidas para as soluções tratamento, que consistiram de um décimo da solução completa mais as concentrações de 0, 14, 28 e 40 mg L⁻¹ de alumínio, fornecido como $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, por períodos de 24, 48, 72 e 96 horas, quando foram coletadas para a medição do comprimento da raiz principal.

Tabela 1. Relação dos genótipos utilizados no experimento. FAEM/UFPel, 2009.

Sistema de cultivo	
Irigado	Sequeiro
BRS Atalanta	Arroz da Terra
Farroupilha	BRS Curinga
BRS Firmeza	IAC 500
IAS 12-9 Formosa	BRS Liderança
BR-IRGA 410	BRS Vencedora

Os recipientes com as soluções completa e tratamento foram colocados em tanque com sistema de banho-maria com água à temperatura de 27°C. As soluções foram permanentemente oxigenadas e seu pH corrigido para $4,0 \pm 0,3$ pela adição HCl 1N, segundo metodologia descrita por Camargo e Oliveira (1981). As plantas foram mantidas sob iluminação constante.

O experimento foi realizado seguindo o delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial triplo dose x tempo de exposição x cultivar (4x4x10) com três repetições.

Para estabelecer o tipo de resposta ao alumínio dos diferentes genótipos de arroz empregados no experimento, os dados foram submetidos à análise de variância. Para a comparação das médias de comprimento de raiz entre as cultivares foi utilizado o teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Na avaliação da resposta das cultivares, dentro de cada dose de alumínio, frente ao aumento no tempo de exposição ao metal, foi feita a determinação do grau de polinômio e o ajustamento da equação de regressão utilizando o programa estatístico SAS (SAS, 2002).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise da Tabela 2 demonstra que ocorreu interação significativa entre os três fatores estudados, indicando que o efeito da concentração de alumínio foi variável conforme o tempo de exposição ao tratamento, ambos influenciando de forma diferenciada sobre o crescimento da raiz principal de cada genótipo.

Tabela 2. Resumo da análise de variância para o caráter comprimento de raiz (CR) de 10 cultivares de arroz submetidas a diferentes doses de alumínio na solução por diferentes tempos de exposição. FAEM/UFPel, 2009.

Fonte de Variação	G.L.	QM _{CR}
Dose	3	161,14**
Tempo	3	84,47**
Cultivar	9	58,40**
Dose x Tempo	9	32,68**
Dose x Cultivar	27	5,93**
Tempo x Cultivar	27	0,77**
Dose x Tempo x Cultivar	81	1,07**
Erro	320	0,32**
Total	479	
C.V. (%)	10,3	

**Significativo a 1% de probabilidade de pelo teste F;

QM_{CR} = Quadrado médio do comprimento de raiz

A comparação entre as médias de comprimento de raiz apresentadas pelos genótipos revela que existe variabilidade para o caráter em todos os níveis dos tratamentos utilizados. Pode ser observado que, na presença de alumínio, o maior número de classes (seis) foi obtido na concentração de 14 mg L⁻¹ nos tempos de 48 e 96 horas de exposição, bem como na de 28 mg L⁻¹ no tempo 24 horas, indicando que estas combinações seriam as mais adequadas para diferenciar as constituições genéticas entre si quanto à tolerância ao alumínio (Tabela 3).

Tabela 3. Comparação de médias para o caráter comprimento de raiz (cm) de 10 genótipos de arroz submetidos às concentrações de 0, 14, 28 e 40 mg L⁻¹ de alumínio considerando os efeitos simples de genótipo, tempo de exposição e dose. FAEM/UFPel, 2009.

Genótipos	Concentração de alumínio (mg L ⁻¹)							
	0				14			
	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h
IAS 12-9 Formosa	7,50a	9,70a	11,6a	12,97a	6,7a	8,0a	7,93a	7,83ab
BR-IRGA 410	6,23b	7,20b	8,30b	11,67b	6,43a	7,50ab	6,20c	6,40de
BRS Atalanta	6,03b	6,57bc	6,97cd	10,33c	4,77bc	6,20cd	6,23bc	6,03ef
Farroupilha	4,17c	5,73cd	6,23def	9,60cd	5,13b	6,80bc	7,10ab	8,57a
BRS Vencedora	4,13c	5,67d	7,77bc	10,23c	4,53bcd	5,40de	6,0c	7,30b
IAC 500	3,93c	5,0de	6,33de	8,80d	4,07cd	5,23e	5,03d	6,90c
Arroz Terra	3,80c	7,40b	8,57b	13,67a	5,23b	5,60d	5,43cd	6,63cde
BRS Liderança	3,30cd	5,07de	5,67 f	7,40ef	3,77d	5,30e	5,67 cd	7,03b
BRS Firmeza	2,87d	4,77e	5,40f	6,63f	2,77e	3,80f	3,57e	5,27f
BRS Curinga	2,57d	3,23f	4,4g	7,53e	3,67d	4,93e	4,87d	6,67cde

Genótipos	Concentração de alumínio (mg L ⁻¹)							
	28				40			
	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h
IAS 12-9 Formosa	6,33a	6,17ab	6,20a	6,43a	5,80a	5,33b	5,73a	5,57ab
BR-IRGA 410	6,23ab	5,97ab	6,13ab	4,73bcd	4,33b	4,53bc	4,50b	4,63c
BRS Atalanta	5,10cd	5,40bc	5,27bc	5,40b	4,43bc	4,53bc	4,50b	4,70bc
Farroupilha	5,83abc	6,77a	6,87a	6,87a	4,87b	6,27a	6,13a	6,07a
BRS Vencedora	4,43de	4,43de	4,0d	4,37cde	3,10c	3,57d	3,90bc	4,0cd
IAC 500	3,73ef	4,43de	4,43cd	4,17de	3,0c	3,87cd	4,20bc	3,07e
Arroz Terra	5,37bc	5,37bc	3,97d	4,17de	4,13b	3,87cd	4,20bc	3,33de
BRS Liderança	4,40de	4,87cd	5,03c	5,17bc	3,17c	3,57d	4,17bc	4,30c
BRS Firmeza	3,50f	3,93e	3,80d	3,83e	2,60c	3,03de	3,37c	3,37de
BRS Curinga	3,43f	3,77e	4,07d	4,50cde	2,70c	3,37de	3,53c	3,40de

*Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Com o intuito de avaliar o efeito do aumento no tempo de exposição ao alumínio dentro de cada nível do metal, foi feito o ajuste da curva de regressão que evidencia a resposta das cultivares de forma individual.

Todos os genótipos responderam de forma linear na ausência de alumínio. Sem a concorrência de algum fator de estresse no meio de cultivo, os resultados

obtidos expressam o potencial genético de crescimento radicular de cada um deles, fato confirmado pela significância do teste t para o coeficiente angular. Nesse sentido, Arroz da Terra apresentou o maior crescimento radicular, visto que cada acréscimo de 1 hora de permanência na solução implica no incremento do comprimento da raiz em 0,13 cm. Por outro lado, os genótipos com menor crescimento foram BRS Firmeza e BRS Liderança, com 0,05 cm (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros das equações de regressão linear e quadrática: interceptação no eixo y (a), coeficiente de regressão linear (b_1) e quadrático (b_2) e coeficiente de determinação (R^2) de 10 genótipos de arroz submetidos a quatro tempos de exposição a 0 mg L^{-1} de alumínio em hidroponia para a variável comprimento de raiz. FAEM/UFPel, 2009.

Genótipo	Parâmetro			
	a	b_1x	b_2x^2	R^2
Arroz da Terra	0,67	0,13*	-	0,97
BRS Atalanta	4,15	0,06*	-	0,78
BRS Curinga	0,42	0,07*	-	0,89
Farroupilha	2,23	0,07*	-	0,90
BRS Firmeza	1,93	0,05*	-	0,96
IAS 12-9 Formosa	5,87	0,08*	-	0,94
IAC 500	2,03	0,07*	-	0,96
BR-IRGA 410	3,99	0,07*	-	0,90
BRS Liderança	2,13	0,05*	-	0,98
BRS Vencedora	1,85	0,09*	-	0,98

* Significativo pelo teste t ao nível de 5% de probabilidade de erro para o modelo de regressão em quatro níveis de tratamento

Na concentração de 14 mg L^{-1} pode ser observado que a velocidade do crescimento radicular foi reduzida em todos os genótipos em relação ao verificado no controle, porém sem ter havido inibição com o aumento do tempo de tratamento, com exceção do cultivar BR-IRGA 410. Arroz da Terra, por exemplo, que havia apresentado um crescimento de $0,13 \text{ cm h}^{-1}$, teve este valor diminuído para $0,02 \text{ cm}$. Outras cultivares foram igualmente afetadas de forma severa pelo tratamento submetido. Não foi obtido ajuste de regressão para BR-IRGA 410, indicando que

houve paralisação do crescimento da raiz. Por outro lado, o teste t para os coeficientes angulares de BRS Atalanta e IAS 12-9 Formosa não foi significativo, ou seja, o incremento observado não está relacionado ao aumento no tempo de tratamento (Tabela 5).

Tabela 5. Parâmetros das equações de regressão linear e quadrática: interceptação no eixo y (a), coeficiente de regressão linear (b_1) e quadrático (b_2) e coeficiente de determinação (R^2) de 10 genótipos de arroz submetidos a quatro tempos de exposição a 14 mg L^{-1} de alumínio em hidroponia para a variável comprimento de raiz. FAEM/UFPel, 2009.

Genótipo	Parâmetro			
	a	b_1x	b_2x^2	R^2
Arroz da Terra	4,72	0,02*	-	0,70
BRS Atalanta	4,85	0,02 ^{ns}	-	0,50
BRS Curinga	2,80	0,04*	-	0,87
Farroupilha	4,25	0,04*	-	0,94
BRS Firmeza	2,03	0,03*	-	0,81
IAS 12-9 Formosa	6,78	0,01 ^{ns}	-	0,49
IAC 500	3,23	0,03*	-	0,83
BR-IRGA 410	-	-	-	-
BRS Liderança	2,90	0,04*	-	0,96
BRS Vencedora	3,58	0,04*	-	0,98

* Significativo pelo teste t ao nível de 5% de probabilidade de erro para o modelo de regressão em quatro níveis de tratamento

Nas Tabelas 6 e 7 são encontrados os parâmetros das equações de regressão ajustadas para os níveis de 28 e 40 mg L^{-1} de alumínio, respectivamente. Não houve ajuste, em ambos os tratamentos, para as cultivares BRS Atalanta, BRS Firmeza, IAS 12-9 Formosa e BRS Vencedora, evidenciando que o crescimento radicular foi inibido desde as 24 horas de exposição ao estresse.

Os genótipos Arroz da Terra e BR-IRGA 410, de resposta linear, apresentaram coeficientes angulares iguais a -0,02 quando expostos a 28 mg L^{-1} de alumínio. O sinal negativo revela que, a cada hora em que as plantas permaneceram na solução, o crescimento da raiz foi reduzido em 0,02 cm, até a paralisação total.

Ao contrário, BRS Curinga e BRS Liderança mostraram incremento no comprimento da raiz na ordem de 0,01 cm h⁻¹ (Tabela 6).

Tabela 6. Parâmetros das equações de regressão linear e quadrática: interceptação no eixo y (a), coeficiente de regressão linear (b₁) e quadrático (b₂) e coeficiente de determinação (R²) de 10 genótipos de arroz submetidos a quatro tempos de exposição a 28 mg L⁻¹ de alumínio em hidroponia para a variável comprimento de raiz. FAEM/UFPel, 2009.

Genótipo	Parâmetro			
	a	b ₁ x	b ₂ x ²	R ²
Arroz da Terra	5,97	-0,02*	-	0,73
BRS Atalanta	-	-	-	-
BRS Curinga	3,07	0,01*	-	0,99
Farroupilha	4,61	0,06	-0,0004	0,98
BRS Firmeza	-	-	-	-
IAS 12-9 Formosa	-	-	-	-
IAC 500	2,66	0,06	-0,0004	0,97
BR-IRGA 410	6,85	-0,02	-	0,64
BRS Liderança	4,25	0,01*	-	0,90
BRS Vencedora	-	-	-	-

* Significativo pelo teste t ao nível de 5% de probabilidade de erro para o modelo de regressão em quatro níveis de tratamento

Em relação à dose de 40 mg L⁻¹, BRS Curinga e BRS Liderança mantiveram o crescimento radicular na ordem de 0,009 e 0,02 cm h⁻¹, respectivamente. Por outro lado, a inexistência de significância para os coeficientes angulares de Arroz da Terra e BR-IRGA 410 demonstra que o resultado observado não deve ser explicado pelo aumento no tempo de tratamento (Tabela 7).

Os dados relativos ao comprimento de raiz dos genótipos Farroupilha e IAC 500 nas concentrações de 28 e 40 mg L⁻¹ de alumínio ajustaram equações do tipo quadrático. Dessa forma, a interpretação biológica da equação $y = a + b_1x + b_2x^2$ é possível de ser realizada através do modelo matemático $-b_1/2b_2$. Com base neste modelo, a cultivar Farroupilha é capaz de tolerar até 75 horas de exposição a 40 mg L⁻¹ sem que haja paralisação do crescimento da raiz, enquanto para IAC 500 essa

mesma resposta é obtida até 61 horas de tratamento. O coeficiente de regressão não foi significativo na dose de 28 mg L⁻¹ (Tabelas 6 e 7).

Tabela 7. Parâmetros das equações de regressão linear e quadrática: interceptação no eixo y (a), coeficiente de regressão linear (b₁) e quadrático (b₂) e coeficiente de determinação (R²) de 10 genótipos de arroz submetidos a quatro tempos de exposição a 40mg L⁻¹ de alumínio em hidroponia para a variável comprimento de raiz. FAEM/UFPel, 2009.

Genótipo	Parâmetro			
	a	b ₁ x	b ₂ x ²	R ²
Arroz da Terra	4,40	-0,009	-	0,46
BRS Atalanta	-	-	-	-
BRS Curinga	2,68	0,009*	-	0,61
Farroupilha	3,13	0,09	-0,006*	0,90
BRS Firmeza	-	-	-	-
IAS 12-9 Formosa	-	-	-	-
IAC 500	0,9	0,11	-0,0009*	0,96
BR-IRGA 410	4,28	0,004	-	0,81
BRS Liderança	2,8	0,02*	-	0,94
BRS Vencedora	-	-	-	-

* Significativo pelo teste t ao nível de 5% de probabilidade de erro para o modelo de regressão em quatro níveis de tratamento

A análise conjunta das respostas ao efeito fitotóxico do alumínio apresentadas na Figura 1 e dos parâmetros obtidos nas equações de regressão (Tabelas 4, 5, 6 e 7) evidencia que os genótipos Arroz da Terra, BRS Vencedora, IAC 500, BRS Atalanta, IAS 12-9 Formosa e, principalmente, BR-IRGA 410 mostraram-se sensíveis ao alumínio já no primeiro nível utilizado, conforme pode ser depreendido através da análise do valor de seus coeficientes angulares (b₁), que sofreram uma redução superior a 50% em relação ao controle, o que indica um significativo decréscimo na taxa de crescimento da raiz.

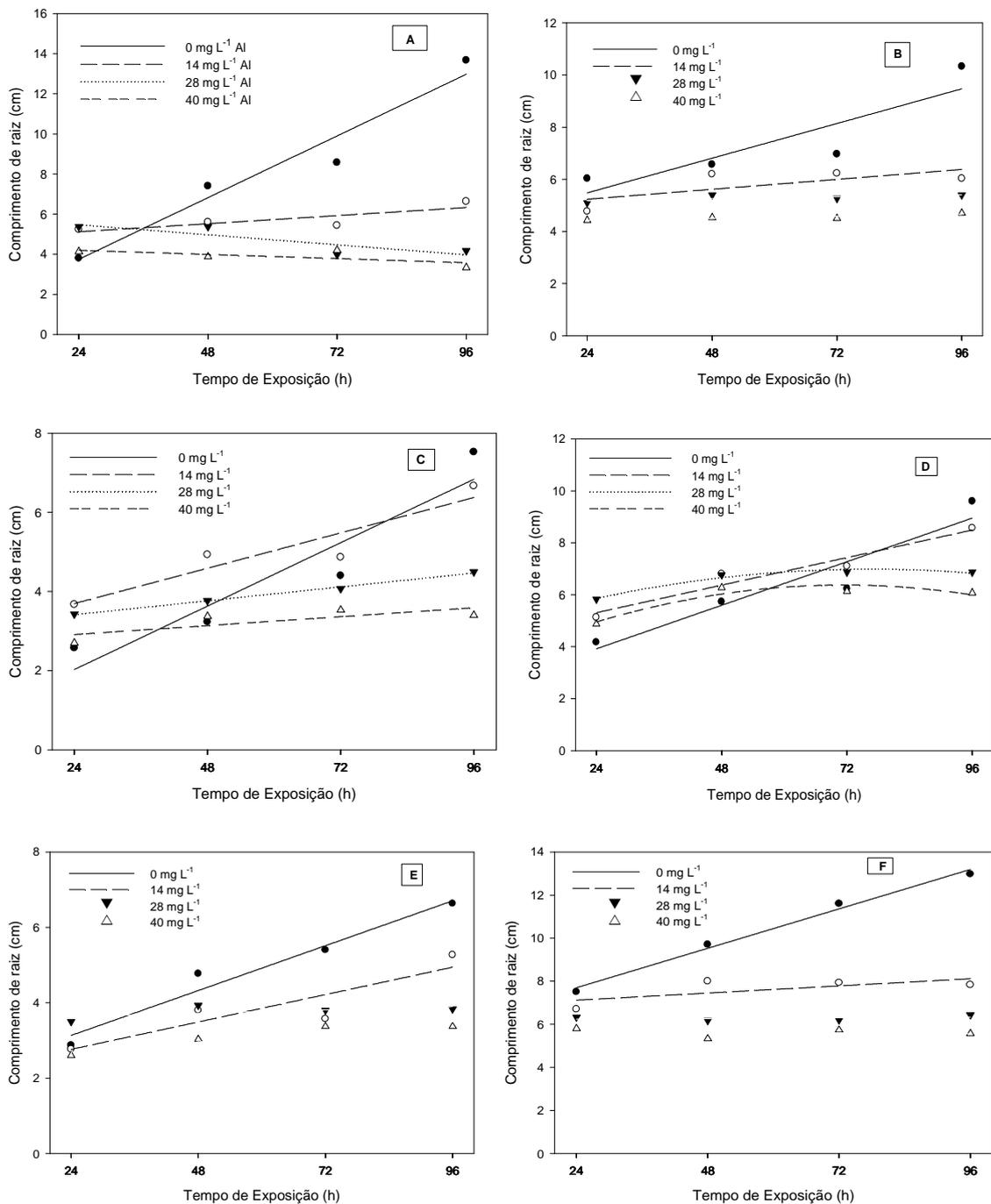


Figura 1. Efeito do aumento no tempo de exposição a quatro concentrações de alumínio sobre o comprimento de raiz de 10 genótipos de arroz. A)Arroz da Terra; B)BRS Atalanta; C)BRS Curinga; D)Farroupilha; E)BRS Firmeza; F)IAS 12-9 Formosa; G)IAC 500; H)BR-IRGA 410; I)BRS Liderança; J)BRS Vencedora. FAEM/UFPel, 2009.

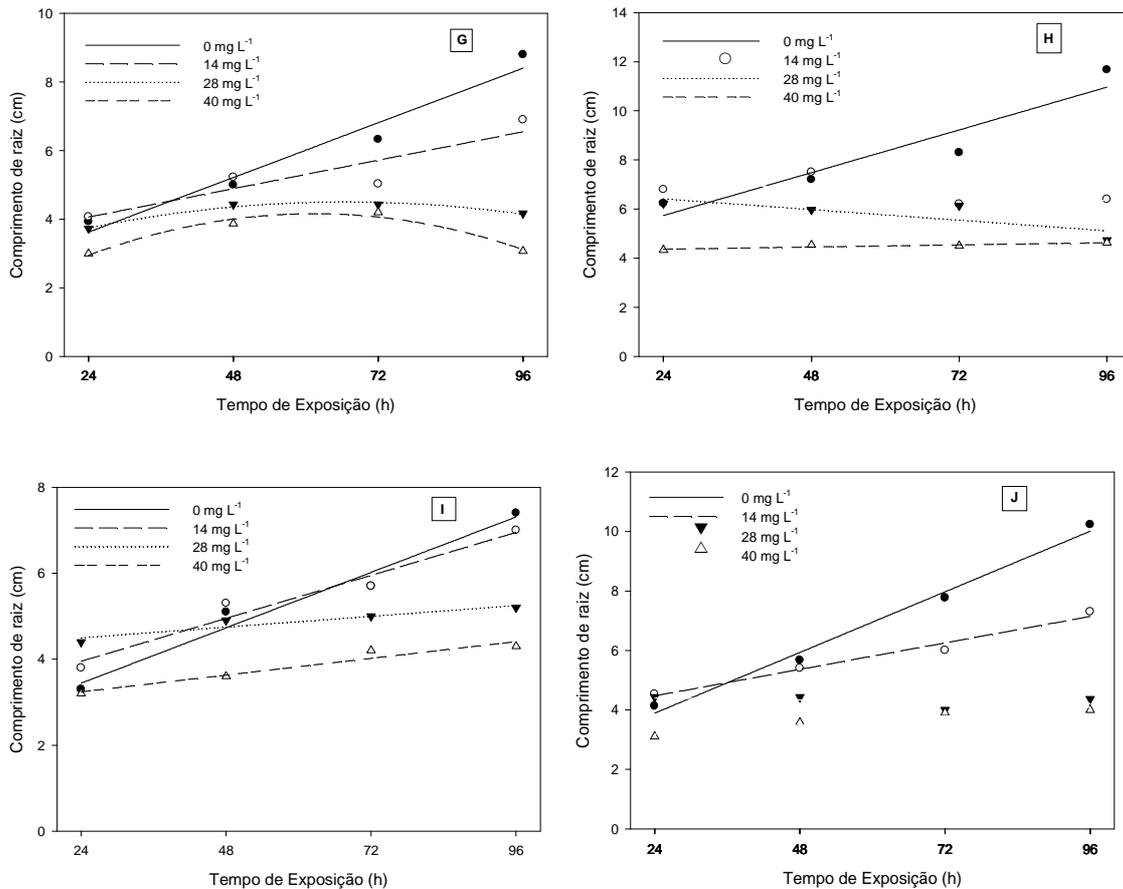


Figura 1 (continuação). Efeito do aumento no tempo de exposição a quatro concentrações de alumínio sobre o comprimento de raiz de 10 genótipos de arroz. A)Arroz da Terra; B)BRS Atalanta; C)BRS Curinga; D)Farroupilha; E)BRS Firmeza; F)IAS 12-9 Formosa; G)IAC 500; H)BR-IRGA 410; I)BRS Liderança; J)BRS Vencedora. FAEM/UFPel, 2009.

É interessante observar que as três primeiras constituições genéticas são do sistema de cultivo de sequeiro, notadamente mais tolerante ao alumínio que as cultivares de arroz irrigado, conforme Ferreira *et al.* (1995) e Freitas (2003). Quanto à cultivar Arroz da Terra, resultado semelhante já havia sido encontrado anteriormente quando a mesma foi submetida a 7, 14 e 28 mg L⁻¹ de alumínio em solução nutritiva (Capítulo I). No mesmo trabalho, entretanto, os genótipos BRS Vencedora e IAC 500 foram classificados entre os mais tolerantes. É possível que essa diferença seja devida à variação entre a metodologia empregada naquele e neste experimento.

Dentre os genótipos identificados como tolerantes neste estudo encontram-se BRS Curinga, BRS Liderança e Farroupilha, os quais, embora tenham apresentado alguma redução no crescimento da raiz na presença de alumínio, em nenhuma das concentrações utilizadas evidenciaram inibição total. Este resultado está de acordo com o observado previamente (Capítulo I), principalmente em relação às cultivares BRS Curinga e BRS Liderança, ambas do sistema de sequeiro. Por outro lado, o genótipo de arroz Farroupilha, do sistema irrigado, destacou-se, nos experimentos anteriores, por apresentar respostas semelhantes às das constituições genéticas de sequeiro, seja em relação ao comprimento de raiz e à tolerância ao alumínio (Capítulo I) ou nas avaliações de dissimilaridade realizadas (Capítulo II).

A cultivar BRS Firmeza, por sua vez, demonstrou tolerância somente até o nível de 14 mg L^{-1} de alumínio, evidenciando sensibilidade nos demais.

4.4 CONCLUSÕES

Os genótipos respondem de forma diferenciada ao aumento no tempo de exposição às diferentes concentrações de alumínio.

As cultivares sensíveis revelam esta resposta mesmo nas concentrações reduzidas e tempos menores de exposição ao estresse. As cultivares tolerantes, por sua vez, têm reduzido seu desempenho quando submetidas a elevadas doses de alumínio por períodos mais longos de tempo.

Neste estudo, a melhor combinação capaz de discriminar genótipos de arroz tolerantes e sensíveis ao alumínio é de 48 horas de exposição a 14 mg L^{-1} de alumínio em solução nutritiva.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARCELÓ, J. e 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.
- BERTAN, I. *et al.* Caracteres associados à tolerância ao alumínio tóxico em genótipos de trigo sul brasileiros. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.11, p. 149-154, 2005.
- BRESOLIN, A.P.S. **Avaliação de populações de azevém anual quanto à tolerância ao alumínio tóxico e estimativa de tamanho de amostra para estudos de diversidade genética com marcadores AFLP**. 76 p. Dissertação (Mestrado em Fitomelhoramento). Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2007.
- BRONDANI, C. e PAIVA, E. Análise de “RFLP” da tolerância à toxidez do alumínio no cromossomo 2 do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.31, n.8, p. 575-579, 1996.
- CAMARGO, C.E.O. e OLIVEIRA, O.F. Tolerância de cultivares de trigo a diferentes níveis de alumínio em solução nutritiva e no solo. **Bragantia**, v.40, p.21-31, 1981.
- DELHAIZE, E. e RYAN, P.R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiology**, v.107, p. 315-321, 1995.
- FOY, C.D.; CHANEY, R.L.; WHITE, M.C. The physiology of metal toxicity in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v.29, p. 511-66 1978.
- FREITAS, F.A. **Dissimilaridade genética em arroz (*Oryza sativa* L.) quanto à toxicidade de alumínio**. 69 p. Dissertação (Mestrado). Ciência e Tecnologia de Sementes. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2003.
- FREITAS, F.A. *et al.* Evaluation of aluminum tolerance in rice. **Journal of Crop Improvement**, v.16, n.1/2, p. 141-151, 2006.

- JONES, D.L. e KOCHIAN, L.V. Aluminum inhibition of the inositol 1,4,5-trisphosphate signal transduction pathway in wheat roots: a role in aluminum toxicity? **The Plant Cell**, v.7, p. 1913-1922, 1995.
- KHATIWADA, S.P. *et al.* Variability and genetics of tolerance for aluminium toxicity in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.93, p. 738-744, 1996.
- 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.
- MA, J.F. e FURUKAWA, J. Recent progress in the research of external Al detoxification in higher plants: a minireview. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.97, p. 46-51, 2003.
- MA, J.F. *et al.* Response of rice to Al stress and identification of quantitative trait loci for Al tolerance. **Plant and Cell Physiology**, v.43, n.6, p. 652-659, 2002.
- MA, J.F. *et al.* Molecular mapping of a gene responsible for Al-activated secretion of citrate in barley. **Journal of Experimental Botany**, v.55, p. 1335-1341, 2004.
- MA, J.F. *et al.* Isolation and characterization of a rice mutant hypersensitive to Al. **Plant and Cell Physiology**, v.46, n.7, p. 1054-1061, 2005.
- MACEDO, C.C.; KINET, J.M.; JAN, V.V.S. Effects of duration and intensity of aluminum stress on growth parameters in four rice genotypes differing in aluminum sensitivity. **Journal of Plant Nutrition**, v. 20, n.1, p. 181-193, 1997.
- NGUYEN, V.T. *et al.* Molecular mapping of genes conferring aluminum tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.102, p. 1002-1010, 2001.
- PATERNIANI, M.E.A.G.Z. e Furlani, P.R. Tolerância à toxicidade de alumínio de linhagens e híbridos de milho em solução nutritiva. **Bragantia**, v.61, p. 11-16, 2002.
- ROUT, G.R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. Aluminium toxicity in plants: a review. **Agronomie**, v.21, p. 3-21, 2001.
- SÁNCHEZ-CHACÓN, C.D.; FEDERIZZI, L.C.; MILACH, S.C.K.; PACHECO, M.T. Variabilidade genética e herança da tolerância à toxicidade do alumínio em aveia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p. 1797-1808, 2000.
- SAS Learning Edition, getting started with the SAS Learning Edition, Care, North Carolina: SAS Institute Inc. 2002.
- SILVA, J.A.G. da *et al.* Tolerância ao alumínio em cultivares de aveia branca sob cultivo hidropônico. **Bragantia**, v.66, n.4, p. 587-593, 2007.

- SOSBAI. Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil/ Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado; V Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado, XXVII Reunião da Cultura do Arroz Irrigado. – Pelotas: SOSBAI, 2007. 161 p., il.
- VASCONCELOS, S.S.; ROSSIELLO, R.O.P.; JACOB-NETO, J. Parâmetros morfológicos para estabelecer tolerância diferencial à toxicidade de alumínio em cultivares de arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n.3, p. 357-363, 2002.
- VICENTE, F.M.P.; ROSSIELLO, R.O.P.; PEREIRA, M.P. Características indicativas de sensibilidade ao alumínio em arroz. I. Crescimento em solução nutritiva. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, n.1, p. 9-15, 1998.
- von UEXKÜLL, H.R. e MUTERT, E. Global extent, development and economic impact of acid soils. **Plant and Soil**, v.171, n.1, p. 1-15, 1995.
- WU, P. *et al.* Genetic control of seedling tolerance to aluminum toxicity in rice. **Euphytica**, v.97, p. 289-293, 1997.
- WU, P. *et al.* QTLs and epistasis for aluminum tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) at different seedling stages. **Theoretical and Applied Genetics**, v.100, p. 1295-1303, 2000.

5. CAPÍTULO IV

EXPRESSÃO DE *OsFRDL1*, PERTENCENTE À FAMÍLIA GÊNICA MATE, EM GENÓTIPOS DE ARROZ CONTRASTANTES QUANTO À RESPOSTA AO ESTRESSE POR ALUMÍNIO

5.1 INTRODUÇÃO

O alumínio é o metal mais abundante da crosta terrestre. Sob condições de acidez do solo, ele é solubilizado à sua forma iônica (Al^{3+}), que é altamente tóxica para as plantas (Foy, 1988). A presença do alumínio no meio de cultivo rapidamente inibe o crescimento radicular e, posteriormente, a absorção de água e nutrientes pela planta, resultando em uma redução significativa na produção das culturas nestas condições, que compreendem entre 30 e 40% do solo arável do mundo (Von Uexküll e Mutert, 1995).

Algumas espécies vegetais desenvolveram mecanismos para lidar com a toxidez por alumínio, tanto interna como externamente (Ma *et al.*, 2001; Ryan *et al.*, 2001; Kochian *et al.*, 2005). O mecanismo de resistência mais estudado diz respeito à secreção de ânions de ácidos orgânicos pelas raízes (Ma, 2000; Ma *et al.*, 2001; Ryan e Delhaize, 2001; Kochian *et al.*, 2005). Após a realização dos primeiros estudos relacionados à secreção de malato induzida por alumínio em milho, na década de 80, relatos tem sido feitos sobre uma grande variedade de espécies vegetais que secretam ânions de ácidos orgânicos em resposta ao alumínio, incluindo espécies mono e dicotiledôneas como trigo, milho, centeio e soja (Furukawa *et al.*, 2007).

Estudos fisiológicos têm sido realizados para entender a natureza da secreção de ácidos orgânicos induzida por alumínio (Ma *et al.*, 2001; Ryan e Delhaize, 2001; Kochian *et al.*, 2005). As plantas diferem entre si em relação ao tipo de ácido orgânico secretado, padrões temporais de secreção, sensibilidade à temperatura e respostas a diferentes doses de alumínio (Ma, 2000). Atualmente, os

ânions de ácidos orgânicos liberados pelas raízes em resposta ao alumínio incluem citrato, oxalato e/ou malato. Estes ânions são capazes de se complexar com o alumínio, não permitindo a entrada do metal na planta (Furukawa *et al.*, 2007).

Dois padrões na liberação de ácidos orgânicos podem ser identificados com base no ritmo da secreção. Em plantas do Padrão I, ela ocorre quase imediatamente após a adição de alumínio, o que sugere que o metal ativa um canal iônico pré-existente na membrana plasmática e que não é necessária a indução da expressão gênica. Por outro lado, nas plantas do Padrão II a liberação de ácidos orgânicos é retardada por várias horas após a exposição ao alumínio, sugerindo que há necessidade de indução gênica. Algumas proteínas induzíveis poderiam estar envolvidas no metabolismo de ácidos orgânicos ou no transporte de seus ânions (Ma, 2000).

Evidências experimentais demonstram que a secreção de ácidos orgânicos é realizada através de canais aniônicos ou transportadores. Dois trabalhos com milho revelaram que o alumínio ativa o efluxo de Cl^- , bem como o canal aniônico permeável a citrato (Kollmeier *et al.*, 2001; Piñeros e Kochian, 2001).

Estudo realizado por Sasaki *et al.* (2004) identificou o primeiro gene relacionado diretamente à tolerância ao alumínio em plantas, denominado *ALMT1* (*Al-Activated Malate Transporter 1*), responsável pela liberação de malato. A proteína codificada por ele está localizada na membrana plasmática (Yamaguchi *et al.*, 2005). A expressão heteróloga desse gene em oócitos de *Xenopus* evidenciou atividade transportadora para malato, mas não para citrato. Homólogos do gene *ALMT1* de trigo foram clonados a partir de *Arabidopsis*, *Brassica napus* e *Secale cereale*, embora seus padrões de expressão sejam diferentes entre essas espécies vegetais (Hoekenga *et al.*, 2006; Ligaba *et al.*, 2006; Fontecha *et al.*, 2007).

Recentemente, evidências mostraram que algumas proteínas pertencentes à família MATE (*Multidrug and Toxic Compound Extrusion*) estão envolvidas no transporte de citrato em plantas. Membros funcionais desta família protéica foram encontrados primeiramente em organismos procariotos e depois em eucariotos, e estão, de modo geral, envolvidos no efluxo de pequenos solutos orgânicos (He *et al.*, 2004).

Em *Arabidopsis* foi demonstrado que a proteína FRD3 (*Ferric Reductase Defective3*) atua no transporte de citrato, o qual é necessário para a translocação de ferro das raízes para a parte aérea (Durret *et al.*, 2007). Por outro lado, dois estudos

evidenciaram que a liberação de citrato induzida por alumínio em cevada (*Hordeum vulgare*) (Furukawa *et al.*, 2007) e sorgo (*Sorghum bicolor*) (Magalhães *et al.*, 2007) é mediada por transportadores da família MATE;

Em cevada, Furukawa *et al.* (2007) identificaram o gene *HvAACT1* (*Aluminum-Activated Citrate Transporter1*), o qual codifica a proteína transportadora *HvAACT1*, localizada na membrana plasmática das células epidérmicas da raiz. A secreção de citrato através da mesma é ativada por alumínio. Em sorgo, por outro lado, um gene similar, *SbMATE*, foi caracterizado por Magalhães *et al.* (2007). Sua análise funcional indicou que também está envolvido no efluxo de citrato, ou seja, na resistência ao alumínio.

No genoma do arroz existem seis genes homólogos próximos a *AtFRD3*, *HvAACT* e *SbMATE*, que foram identificados como *OsFRDL* (*Ferric Reductase Defective-like*). Destes, *OsFRDL1* (Os03g0216700), um transportador de citrato isolado inicialmente como um homólogo de *AtFRD3*, é o mais próximo do gene *HvAACT*, como mostra a Figura 1 (Furukawa *et al.*, 2007; Yokosho *et al.*, 2009).

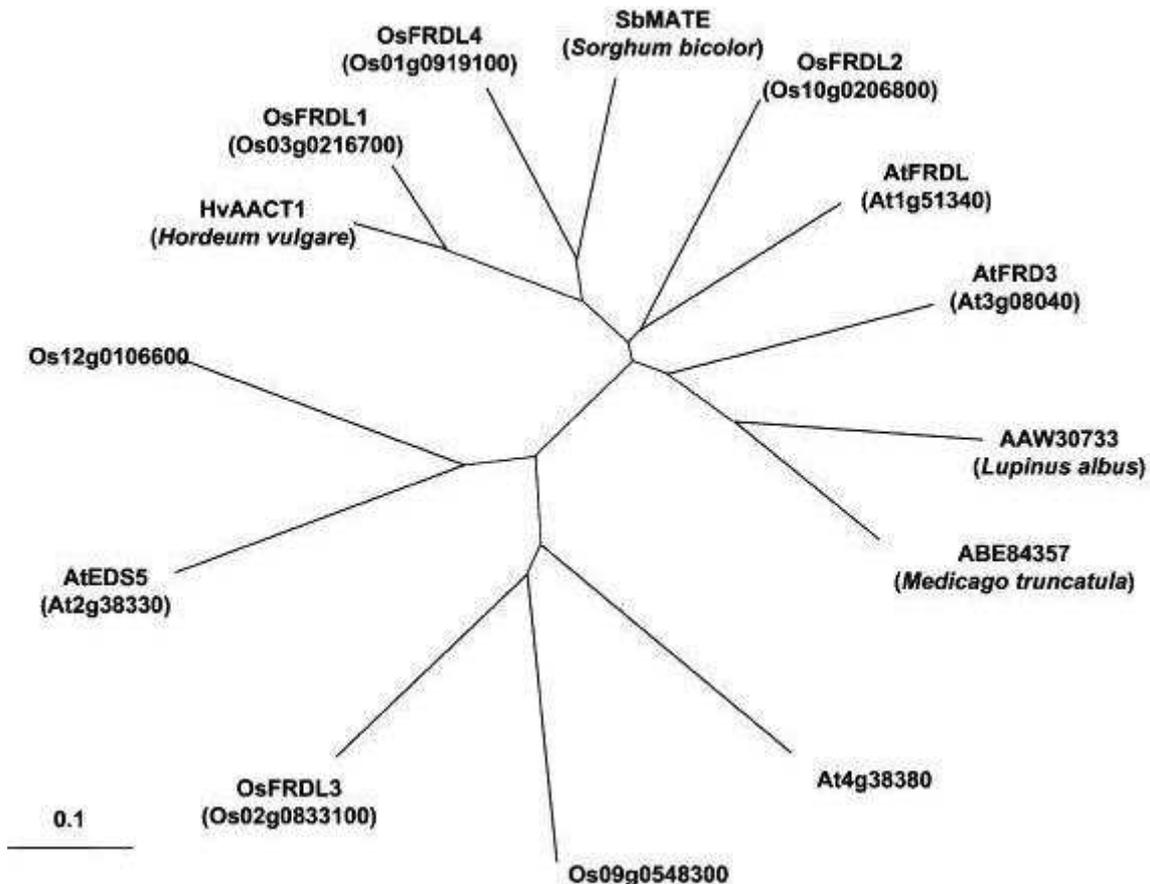


Figura 1. Relação filogenética entre os genes *AtFRD3*, *HvAACT* e *SbMATE* e seus homólogos em arroz. Fonte: Yokosho *et al.* (2009).

O arroz tem importantes relações de sintenia com as outras espécies de cereais e é o genoma modelo para as gramíneas (IRGSP, 2005). É a primeira cultura alimentar para a qual a seqüência completa dos genes está disponível. Esse fato oferece uma oportunidade sem precedentes para identificar e caracterizar funcionalmente os genes e rotas bioquímicas responsáveis pelo desempenho agronômico, bem como resistência a estresses bióticos e abióticos (Coffman *et al.*, 2004).

É conhecido que as raízes de arroz secretam citrato em resposta ao alumínio. Dessa forma, pode ser esperado que haja diferença na expressão de genes envolvidos nesse processo, ao se estudarem genótipos tolerantes e sensíveis. A identificação de possíveis diferenças na expressão poderá contribuir para a elucidação dos mecanismos envolvidos na tolerância de arroz a esse metal.

O objetivo deste capítulo foi avaliar a expressão do gene *OsFRDL1* em genótipos de arroz contrastantes quanto à resposta ao alumínio.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e condições de cultivo

Os genótipos de arroz BRS Curinga e Farroupilha (tolerantes) e BR-IRGA 410 e IAS 12-9 Formosa (sensíveis) foram cultivados em sistema hidropônico, sob condições controladas de ambiente, no Laboratório de Duplo-Haplóides e Hidroponia do Centro de Genômica e Fitomelhoramento (LDH/CGF) da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas (FAEM/UFPel).

As sementes foram colocadas para germinar em telas de náilon adaptadas a recipientes plásticos de dois litros de capacidade contendo solução nutritiva completa (Camargo e Oliveira, 1981) composta por $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 4mM; MgSO_4 2mM; KNO_3 4mM; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,435mM; KH_2PO_4 0,5mM; MnSO_4 2mM; CuSO_4 0,3 μM ; ZnSO_4 0,8 μM ; NaCl 30 μM ; Fe-EDTA 10 μM ; NaMoSO_4 0,10 μM e H_3BO_3 10 μM . Após quatro dias no escuro, os genótipos foram submetidos a um fotoperíodo de 12h de luz/12h de escuro à intensidade luminosa de 7.000 Lux.

Ao atingirem o estágio de desenvolvimento V3 (SOSBAI, 2007), as plantas foram transferidas para as soluções tratamento, as quais consistiram de um décimo da solução completa (sem adição de fosfato para evitar possível precipitação do Al^{3+}) acrescidas das concentrações de 0 e 14 mg L^{-1} de alumínio, fornecido na forma de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$.

Os recipientes com as soluções completa e tratamento foram mantidos em tanque com sistema de banho-maria para manutenção da temperatura ambiente em 26°C durante o experimento. As soluções foram permanentemente oxigenadas e seu pH corrigido para $4,0 \pm 0,3$ pela adição de HCl 1N, segundo metodologia descrita por Camargo e Oliveira (1981).

Após 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas de exposição aos tratamentos, as raízes foram coletadas, lavadas em água ultrapura autoclavada e imediatamente congeladas em N_2 líquido. Posteriormente, foram armazenadas a -80°C até a extração do RNA.

Para a avaliação morfológica, dez plantas por tratamento foram avaliadas quanto ao comprimento da raiz principal.

Extração de RNA

Para a extração do RNA total, as raízes foram maceradas em N₂ líquido e transferidas para tubos eppendorf de 2 mL contendo 1 mL de reagente TRIzol® (Invitrogen, Califórnia, USA). A mistura foi homogeneizada em aparelho tipo *vortex* e incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. Após este período, para melhorar a qualidade do RNA obtido ao final do processo, foram adicionados 0,5 µL de glicogênio na concentração de 0,2 µg µL⁻¹. O homogenato foi, então, centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C (Eppendorf 5810R, Rotor F 45-30-11, USA).

O sobrenadante foi retirado para um novo tubo ao qual foram adicionados 200 µL de clorofórmio gelado para a solubilização dos lipídeos. Os tubos foram agitados manualmente por 15 segundos. Após a incubação por sete minutos à temperatura ambiente, os mesmos foram centrifugados a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C (Eppendorf 5810R, Rotor F 45-30-11, USA) para a separação de fases e posterior coleta da fase aquosa que continha o RNA.

A precipitação do RNA da fase aquosa foi realizada através da adição, seguida de incubação à temperatura ambiente por 10 minutos, de ½ volume de isopropanol e ½ de citrato de Na 0,5M + NaCl 1,2M (armazenados a 4°C), com posterior centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C (Eppendorf 5810R, Rotor F 45-30-11, USA).

O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em 1 mL de etanol 70% a 4°C. O material foi centrifugado a 7.000 rpm por 5 minutos a 4°C (Eppendorf 5810R, Rotor F 45-30-11, USA). Em seguida, o etanol foi descartado e o RNA precipitado foi deixado à temperatura ambiente até a eliminação do excesso de álcool. Posteriormente, o mesmo foi ressuscitado em 30 µL de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC, GIBCO BRL) e armazenado a 4°C até o dia seguinte, quando foi feita a sua quantificação e posterior avaliação de sua qualidade.

A determinação da quantidade (µg mL⁻¹) de RNA extraído foi feita por espectrofotometria (espectrofotômetro Hitachi, modelo U-1800). Foram diluídos 5 µL da suspensão de RNA em 495µL de água DEPC e, imediatamente, foi realizada a

medição da densidade óptica (D.O.) das amostras a 260 nm. A seguinte fórmula foi utilizada:

$$[\text{RNA}] \text{ em } \mu\text{g/ml} = \text{D.O.}_{260\text{nm}} \times \text{fc} \times \text{fd}, \text{ em que}$$

$\text{D.O.}_{260\text{nm}}$ é o valor da leitura da amostra a 260nm;

fc diz respeito ao fator de conversão, no qual a $\text{D.O.}_{260\text{nm}}$ máxima é 1 e corresponde a $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ de RNA;

fd se refere ao fator de diluição da amostra de leitura (100).

A qualidade do RNA, por outro lado, foi aferida com base na relação da absorvância $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$, assim como na sua visualização após eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TBE 1x autoclavado.

Síntese de cDNA

Para eliminar possíveis resíduos de DNA genômico das amostras de RNA, estas foram submetidas ao tratamento com a enzima Dnase I (*Amplification Grade Dnase I*, Invitrogen), como segue: a um tubo de 0,5 mL foram adicionados 1 μg de RNA, 1 μL de tampão de reação 10x, 1 μL de DNase I e água DEPC q.s.p. 10 μL , os quais foram incubados a 37°C por 15 minutos. Em seguida foi acrescentado 1 μL de EDTA 25 mM e a mistura foi incubada a 65°C por 15 minutos para inativar a enzima sendo, imediatamente, transferida para gelo por um minuto.

A síntese da primeira fita de cDNA foi iniciada a partir da adição de 1 μL de dNTP 10mM e 1 μL de oligo(dT)₁₂₋₁₈ ($0,5 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$), com posterior incubação da mistura a 65°C por 5 minutos. Em seguida, um mix composto por 2 μL de tampão RT 10x, 4 μL de MgCl_2 25 mM, 2 μL de DTT 0,1M e 1 μL de RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor foi adicionado a cada amostra e mantido a 42°C por 2 minutos.

Posteriormente, 0,25 μL (50 U) de SuperScript™ II RT ($200\text{U } \mu\text{L}^{-1}$) foram acrescentados a todos os tubos, com exceção daqueles utilizados como controle negativo (RT-), ou seja, para verificação se existiu ou não presença de DNA genômico no momento da amplificação do gene alvo por PCR. A mistura foi, então, incubada a 42°C por 50 minutos e, imediatamente, a 70°C por 15 minutos, sendo em seguida resfriada em gelo. Por fim, 1 μL da enzima RNase H foi adicionada a cada tubo e os mesmos foram incubados a 37°C por 20 minutos, visando degradar as moléculas de RNA restantes em cada amostra.

PCR em Tempo Real

Para a avaliação da expressão do gene *OsFRDL1* em raízes de arroz, foram escolhidos um dos genótipos tolerantes (Farroupilha) e um dos sensíveis (BR-IRGA 410). A análise foi realizada nos tempos de 0, 12, 24 e 48 horas de exposição a 14 mg L⁻¹ de alumínio, utilizando o sistema de detecção SYBR® Green (Applied Biosystems, California, USA), através do método de quantificação relativa $\Delta\Delta C_t$, no qual os dados de expressão do gene alvo foram normalizados com o nível de expressão do gene Ubiquitina5 (UBQ5), utilizado como controle interno. Para tanto, foi utilizado o equipamento modelo ABI RT PCR 7500 (Applied Biosystems).

As seqüências de *primers* utilizadas foram Os03g0216700: 5'-TGCTGAAAAGACCAGGAAGACA-3' (*forward*) e 5'-GTTGGCTCATTCTTGGGCTAC-3' (*reverse*); UBQ5: ACCACTTCGACCGCCACTACT (*forward*) e ACGCCTAAGCCTGCTGGTT (*reverse*).

As reações de PCR em Tempo Real foram realizadas em triplicata a partir de 2 µL de cDNA, 10,5 µL de água Milli-Q e 12,5 µL do Kit SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, California, USA). Para todas as corridas foi feito um “branco” (reação com todos os reagentes e água substituindo o cDNA) para o par de *primers* do gene *OsFRDL1*. As condições de ciclagem utilizadas para amplificação foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, ocorrendo a leitura da fluorescência neste último passo. Por último, um ciclo de 72°C por 5 minutos.

Para se iniciar a quantificação relativa das amostras é necessário primeiramente fazer a validação dos *primers* utilizados, tanto para o gene de interesse quanto para o controle endógeno, calculando a eficiência da amplificação de ambos e posteriormente normalizando os dados do gene de interesse com os dados do controle.

A eficiência é calculada através da fórmula:

$$E = (10^{(-1/\text{slope})} - 1) \times 100,$$

onde *slope* é a inclinação da curva padrão gerada pelos dados: log da concentração das amostras x Ct (*Threshold Cycle*: ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o *Threshold*, servindo como base para comparação entre amostras). O valor da eficiência deve ser próximo a 100% (100 ± 10) e deve ser semelhante entre controle endógeno e gene alvo. O valor de R^2 , também gerado a partir da curva padrão, indica o quanto as réplicas estão parecidas, ou seja, indica o grau de confiabilidade dos dados. Este valor deve ser maior que 0,95, o que indica acima de 95% de confiabilidade.

Para a placa de validação do gene *OsFRDL1* foram feitas triplicatas de uma amostra de cDNA (amostra de raízes do genótipo BR-IRGA 410 no tempo 0h de exposição ao Al^{3+}) em quatro diluições diferentes (1, 1:5, 1:25 e 1:125), utilizando os *primers* para os genes *OsFRDL1* e *UBQ5* em reações separadas. Essa variação de concentrações permite conhecer se, posteriormente, poderá se trabalhar com segurança com possíveis amostras que tenham a expressão muito baixa, por exemplo.

Após o cálculo das eficiências de amplificação individuais dos genes alvo e endógeno foi construída, como indicado pelo protocolo, uma curva. No eixo X foram colocados os mesmos valores de log da concentração das amostras e no eixo Y a diferença entre a média do Ct do gene de interesse e a média do Ct do controle endógeno (ΔCt), normalizando a amplificação do gene alvo e do endógeno. O valor da inclinação da curva deve estar entre -0,1 e 0,1.

Com base nos resultados obtidos, foram utilizados, para os experimentos de expressão gênica, 2 μL de cDNA não diluído.

Delineamento experimental e análise estatística

O experimento seguiu o delineamento inteiramente casualizado com quatro tempos de exposição ao alumínio e três repetições.

Para estabelecer o tipo de resposta de cada um dos genótipos de arroz empregados no experimento frente ao aumento no tempo de exposição ao alumínio, os dados foram submetidos à determinação do grau de polinômio e ajustamento da equação de regressão utilizando, para análise, o programa estatístico SAS (SAS, 2002).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação morfológica

O comprimento de raiz dos genótipos BR-IRGA 410, BRS Curinga, IAS 12-9 Formosa e Farroupilha, submetidos a 0 e 14 mg L⁻¹ de alumínio por períodos crescentes de tempo, é apresentado nas Figuras 2, 3 4 e 5.

Pode ser observado que o aumento no tempo de exposição ao alumínio resultou na redução no comprimento de raiz do cultivar BR-IRGA 410 desde as primeiras horas de tratamento ao se comparar com o controle, tendo esta redução sido grandemente intensificada a partir das 24 horas de exposição, alcançando valor superior a 50% às 96 horas (Figura 2).

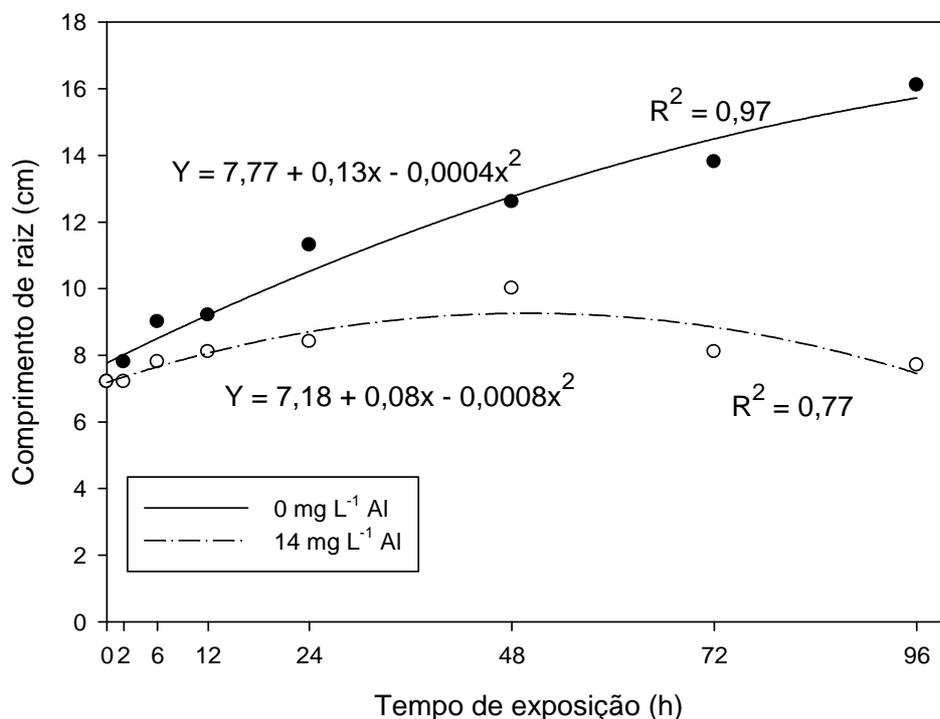


Figura 2. Comprimento de raiz (cm) do genótipo de arroz BR-IRGA 410 submetido a diferentes tempos de exposição às concentrações de 0 e 14mg L⁻¹ de alumínio em sistema de cultivo hidropônico. FAEM/UFPeL, 2009.

Em relação à cultivar BRS Curinga, o efeito negativo da presença de alumínio na solução nutritiva começou a se verificar a partir das 48 horas de tratamento, com intensidade maior depois de 72 horas (Figura 3), enquanto que para o genótipo Farroupilha essa mesma resposta se deu, com pequena magnitude, somente a partir de 72 horas de exposição ao metal (Figura 4).

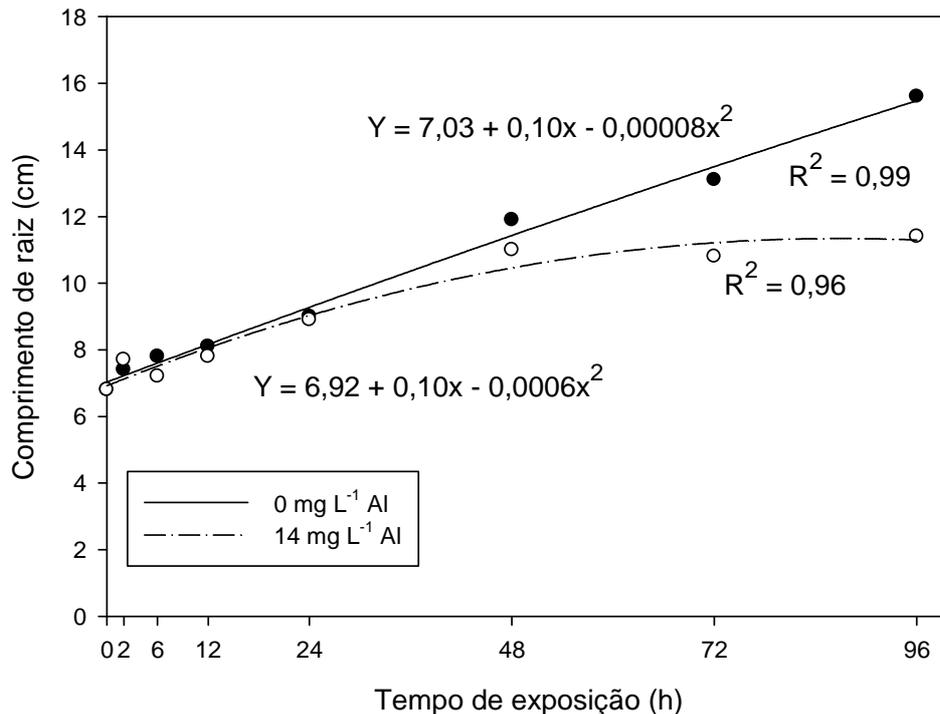


Figura 3. Comprimento de raiz (cm) do genótipo de arroz BRS Curinga submetido a diferentes tempos de exposição às concentrações de 0 e 14 mg L⁻¹ de alumínio em sistema de cultivo hidropônico. FAEM/UFPeL, 2009.

A presença de alumínio no meio de cultivo também foi prejudicial ao crescimento radicular da cultivar IAS 12-9 Formosa (Figura 5), de forma semelhante ao observado anteriormente para BR-IRGA 410 (Figura 2), desde as primeiras horas de tratamento. Pode ser observado, entretanto, que o efeito em IAS 12-9 Formosa foi menos intenso à medida que o tempo de exposição ao metal aumentou.

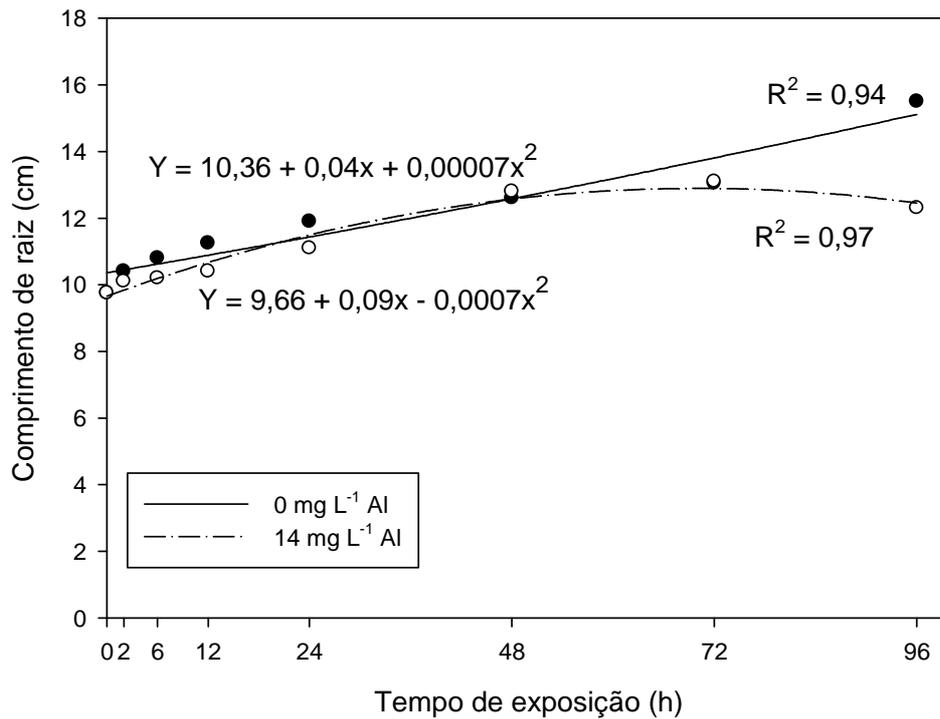


Figura 4. Comprimento de raiz (cm) do genótipo de arroz Farroupilha submetido a diferentes tempos de exposição às concentrações de 0 e 14 mg L⁻¹ de alumínio em sistema de cultivo hidropônico. FAEM/UFPeL, 2009.

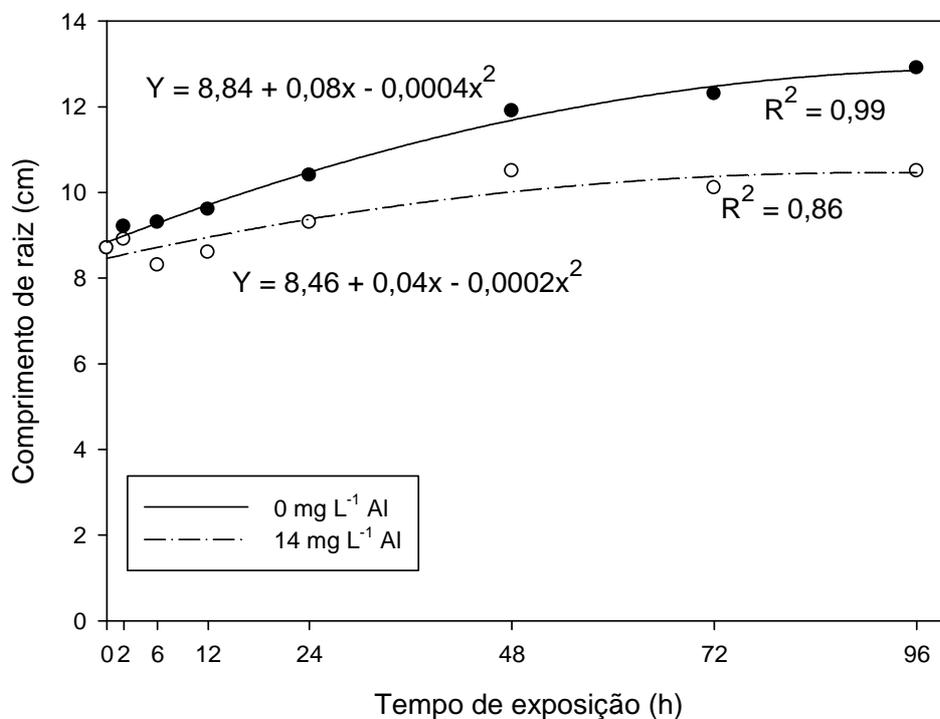


Figura 5. Comprimento de raiz (cm) do genótipo de arroz IAS 12-9 Formosa submetido a diferentes tempos de exposição às concentrações de 0 e 14 mg L⁻¹ de alumínio em sistema de cultivo hidropônico. FAEM/UFPeL, 2009.

A toxicidade causada pelo alumínio é um importante fator limitante do crescimento vegetal em solos ácidos. Concentrações muito pequenas (micromolares) do metal são capazes de inibir a elongação radicular em minutos ou horas, interferindo negativamente na absorção de água e nutrientes, com conseqüente redução no crescimento e produtividade (MA e FURUKAWA, 2003).

Nesse sentido, inúmeros trabalhos em diferentes espécies vegetais utilizam, como principais caracteres na avaliação da resposta das mesmas ao estresse causado por esse metal, aqueles relacionados ao crescimento do sistema radicular. Em arroz podem ser citados, entre outros, estudos realizados por Vicente *et al.* (1998), Vasconcelos *et al.* (2002a, 2002b) e Freitas *et al.* (2006).

Um dos principais problemas encontrados na avaliação de plantas para a tolerância ao alumínio é o correto ajuste dos níveis de estresse, de modo que se obtenha uma redução marcante no crescimento radicular das plantas mais sensíveis e um efeito limitado nas mais resistentes. Aliado a este, o tempo de exposição é também um importante fator a ser considerado (Macedo *et al.*, 1997).

O nível de 14 mg L^{-1} de alumínio empregado nesse experimento, bem como os tempos de exposição utilizados, mostraram-se adequados para que fosse feita a diferenciação na reação das constituições genéticas avaliadas ao estresse, de modo que pudessem ser selecionados dois genótipos de comportamento contrastante para a realização da avaliação da expressão do gene *OsFRDL1*.

A análise dos resultados obtidos na avaliação morfológica demonstrou que o efeito negativo da presença de alumínio na solução nutritiva sobre todos os genótipos, embora em magnitudes diferentes, ocorreu somente às 96 horas de tratamento, indicando que este tempo não é adequado para a análise da expressão gênica.

Para o experimento de avaliação da expressão do gene *OsFRDL1* foram escolhidos os genótipos Farroupilha e BR-IRGA 410, submetidos a 0, 12, 24 e 48 horas de exposição ao alumínio em solução nutritiva.

PCR em Tempo Real

Para avaliar o efeito da exposição crescente (0, 12, 24 e 48 horas) dos genótipos de arroz BR-IRGA 410 e Farroupilha à dose de 14 mg L^{-1} de alumínio sobre a expressão do gene *OsFRDL1* foi empregada a técnica de PCR em Tempo

Real. Esta metodologia quantitativa e altamente específica tem como objetivo quantificar a expressão de genes de interesse.

Os resultados do experimento de validação, necessário para determinar se o cálculo de $\Delta\Delta Ct$ é válido, são encontrados nas Figuras 6, 7 e 8. A qualidade da curva padrão pode ser aferida a partir do *slope* da equação de regressão linear, utilizado para o cálculo da eficiência de amplificação, assim como do coeficiente de regressão (R^2) (Deprez *et al.*, 2002).

Na validação de amostras com diferentes concentrações de cDNA da região codificadora do gene *OsFRDL1* (Fig. 6) e do controle endógeno *UBQ5* (Figura 7), foi encontrada uma eficiência de 86% para ambos os genes, resultado evidenciado pela observação de que o valor de *slope* foi igual nas duas equações obtidas a partir das curvas-padrão.

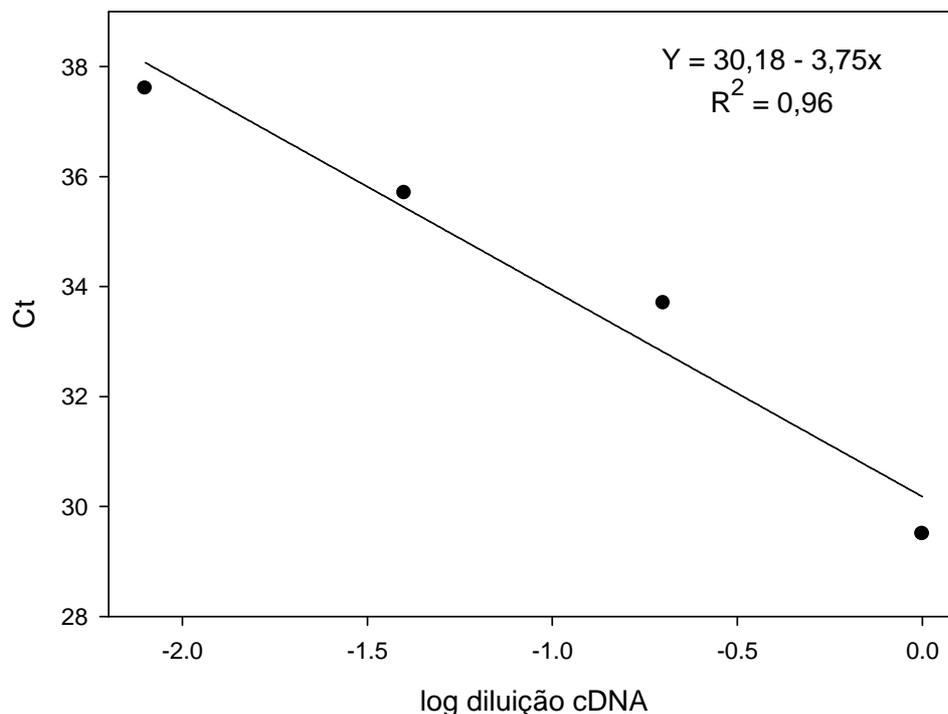


Figura 6. Curva padrão da PCR em Tempo Real realizada a partir de diluições do cDNA de raízes do genótipo BR-IRGA 410 no tempo 0h de exposição ao alumínio e os seus respectivos valores de Ct para o gene *OsFRDL1*. FAEM/UFPeL, 2009.

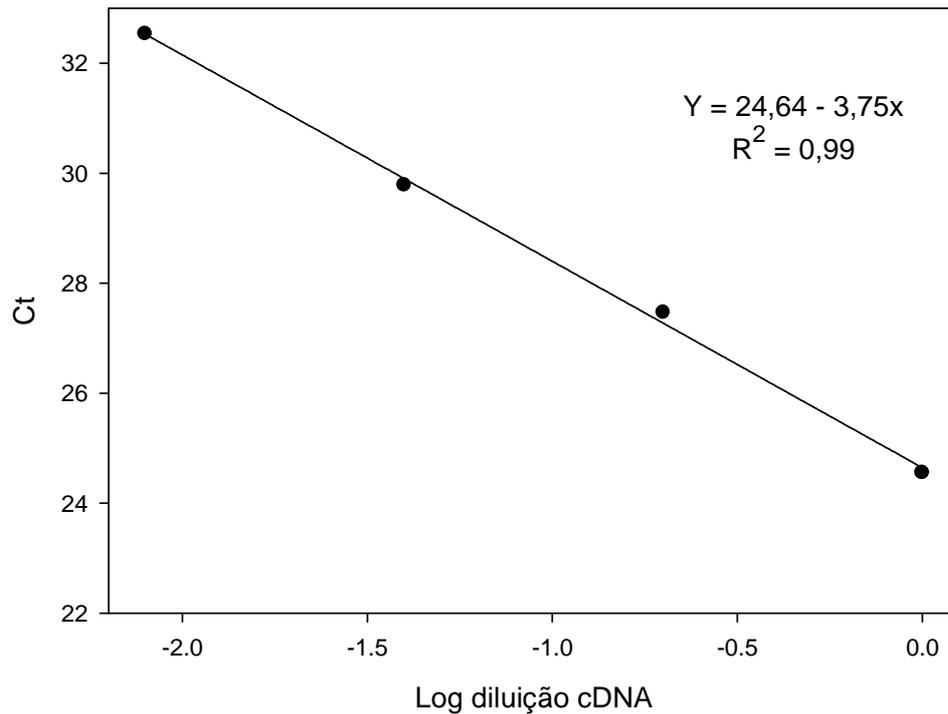


Figura 7. Curva padrão da PCR em Tempo Real realizada a partir de diluições do cDNA de raízes do genótipo BR-IRGA 410 no tempo 0h de exposição ao alumínio e os seus respectivos valores de Ct para o gene *UBQ5*. FAEM/UFPeL, 2009.

A Figura 8 apresenta o gráfico de validação do ΔCt em comparação ao logaritmo das diluições do cDNA. Se a eficiência de amplificação do gene alvo e do endógeno forem semelhantes, o valor de *slope* da equação obtida deverá estar entre -0,1 e 0,1. Este resultado foi observado no experimento de validação realizado, em que o *slope* encontrado foi igual a -0,03, indicando que o método de quantificação relativa $\Delta\Delta Ct$ pode ser utilizado neste estudo.

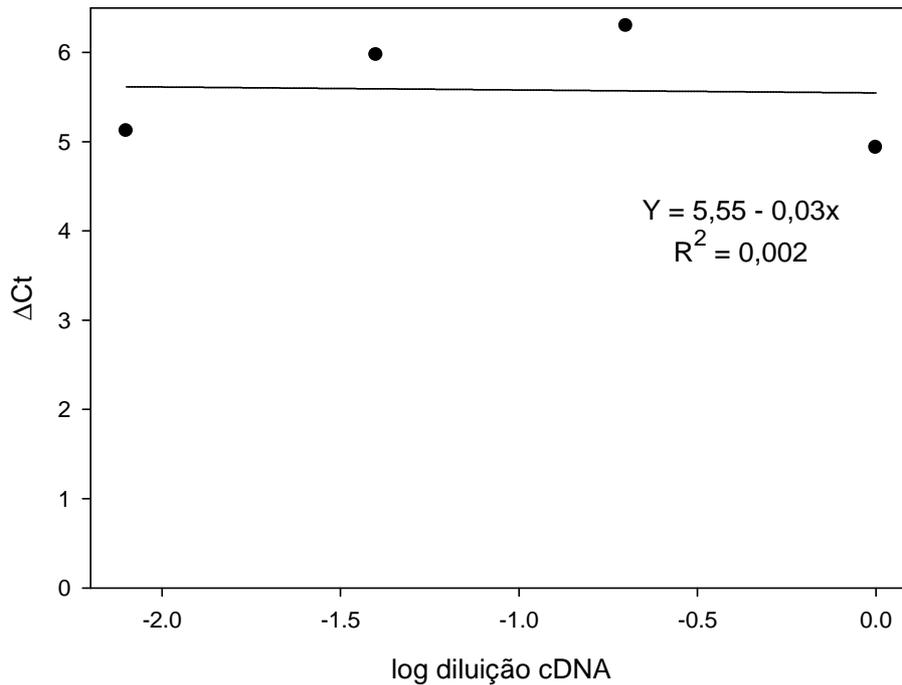


Figura 8. Valores de ΔCt ($Ct_{OsFRDL1} - Ct_{UBQ5}$) em relação ao logaritmo das diluições do cDNA de raízes do genótipo BR-IRGA 410 no tempo 0h de exposição ao alumínio. FAEM/UFPeL, 2009.

A avaliação da expressão do gene *OsFRDL1* foi feita utilizando, para ambos os genótipos, a amostra coletada no tempo de 0 horas de exposição ao alumínio como calibradora. Por definição seu nível de expressão é igual a um e as demais amostras são comparadas a ela.

Doze horas de tratamento com 14 mg L^{-1} de alumínio não causaram aumento na expressão do gene *OsFRDL1* no genótipo BR-IRGA 410. Por outro lado, 24 e 48 horas aumentaram sua expressão em 1,5 e 3,6 vezes, respectivamente (Figura 9).

Em relação à cultivar Farroupilha, houve aumento de 9,03 vezes na expressão do gene *OsFRDL1* às 12 horas de tratamento. Às 48 e 72 horas a expressão foi aumentada, nesta ordem, em 5,2 e 6,1 vezes (Figura 10).

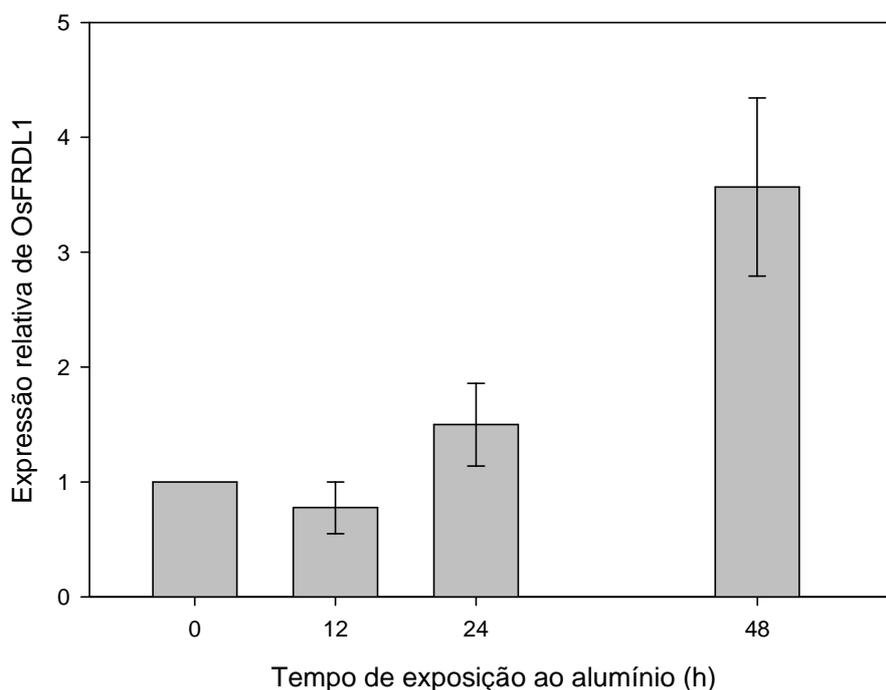


Figura 9. Expressão do gene *OsFRDL1* no genótipo de arroz BR-IRGA 410 submetido a diferentes tempos de exposição (h) a 14 mg L^{-1} de alumínio em solução nutritiva. A amostra do tempo 0h foi utilizada como calibrador e seu nível de expressão é igual a 1. As barras representam a média \pm desvio padrão (n=3). FAEM/UFPeL, 2009.

Recentemente, duas espécies da família Poaceae, a mesma do arroz, tiveram identificados genes com elevada homologia a *OsFRDL1*: cevada (Furukawa *et al.*, 2007) e sorgo (Magalhães *et al.*, 2007).

Em cevada submetida a 0 e $30 \mu\text{M}$ de alumínio por seis horas, o RNA mensageiro do gene *HvAACT1* que codifica uma proteína de membrana transportadora de citrato, foi expresso tanto nas raízes quanto na parte aérea, porém o nível de expressão foi maior nas raízes (Furukawa *et al.*, 2007). A quantidade de transcrito foi 26 vezes maior na cultivar resistente do que na sensível, porém o nível de expressão não foi induzido pelo alumínio em nenhuma delas. Os autores sugerem que *HvAACT1* é constitutivamente expresso em raízes de cevada e que a secreção de citrato é mediada pela ativação da proteína *HvAACT1*.

A análise da expressão do gene *SbMATE* em sorgo, também relacionado à liberação de citrato, demonstrou que a mesma ocorreu somente em raízes

pertencentes à linhagem isogênica tolerante ao alumínio e quando induzida pelo metal. Além disso, houve aumento na expressão gênica com o aumento no tempo de exposição (Magalhães *et al.*, 2007).

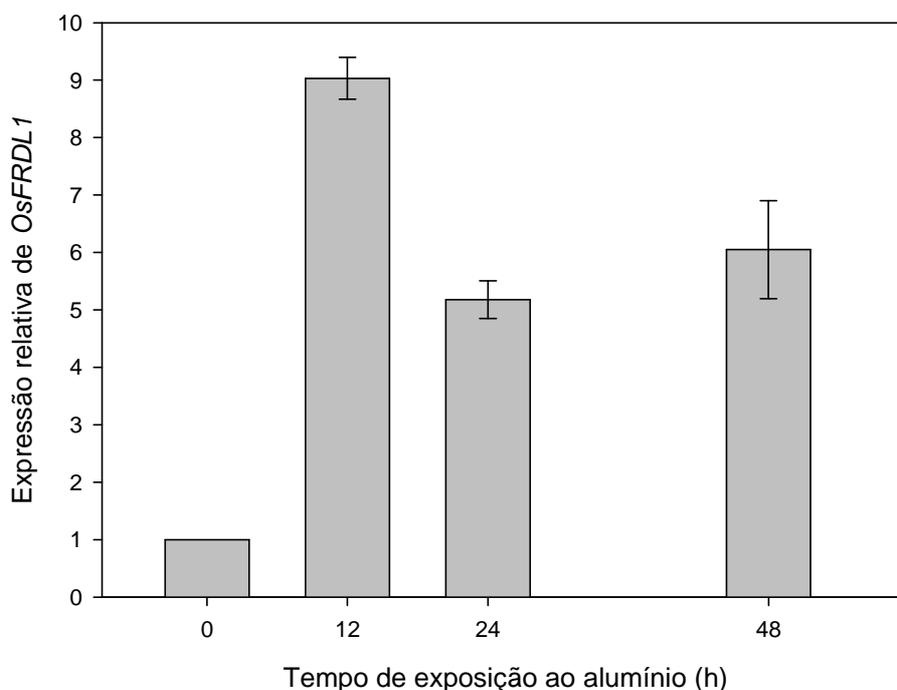


Figura 10. Expressão do gene *OsFRDL1* no genótipo de arroz Farroupilha submetido a diferentes tempos de exposição (h) a 14mg L^{-1} de alumínio em solução nutritiva. A amostra do tempo 0h foi utilizada como calibrador e seu nível de expressão é igual a 1. As barras representam a média \pm desvio padrão ($n=3$). FAEM/UFPeL, 2009.

Considerando a homologia em nível de seqüência de aminoácidos, *OsFRDL1* apresenta 87% de identidade com *HvAACT1* e 57% com *AtFRD3* (Yokosho *et al.*, 2009). *HvAACT1* está envolvida com a secreção de citrato induzida por alumínio (Furukawa *et al.*, 2007), enquanto *AtFRD3* libera citrato que participa no transporte de ferro das raízes para a parte aérea das plantas (Durrett *et al.*, 2007). Portanto, espera-se que esta proteína de membrana do arroz esteja funcionalmente relacionada à liberação de citrato para o meio extracelular em resposta ao alumínio, o que corresponde a um dos principais mecanismos de tolerância vegetal a esse estresse (Kochian *et al.*, 2005).

No genoma do arroz há seis genes homólogos próximos a *AtFRD3*, *HvAACT1* e *SbMATE*. Entretanto, a função desses genes ainda não é conhecida.

Estudando a função do gene *OsFRDL1* (Os03g0216700), o mais próximo a *HvAACT1*, Yokosho *et al.* (2009) observaram que sua expressão não foi afetada pela exposição a 50 μM de alumínio por três horas. Além disso, não observaram diferença na secreção de citrato entre uma linhagem Tos-17 com o gene *OsFRDL1* inativado e o cultivar Nipponbare na presença de alumínio, de modo que os autores concluíram que *OsFRDL1* não é responsável pela secreção de citrato induzida por este metal em raízes de arroz.

No presente trabalho, por outro lado, foi observado aumento na expressão de *OsFRDL1* tanto no genótipo BR-IRGA 410 (sensível) (Figura 9) como em Farroupilha (tolerante) (Figura 10). Os níveis de expressão, entretanto, foram diferentes.

Em relação a BR-IRGA 410, não foi detectado aumento na expressão nas primeiras 12 horas de exposição a 14 mg L^{-1} de alumínio. Depois de 24 horas ocorreu pequena elevação (1,5 vezes) e o maior nível (3,6 vezes) foi alcançado às 48 horas (Figura 9). Ao se analisar a expressão no genótipo Farroupilha, por outro lado, pode ser observado um incremento de nove vezes na quantidade de RNA mensageiro obtida às 12 horas de tratamento, seguida de um decréscimo para 5,2 e 6,1 vezes às 24 e 48 horas, respectivamente, porém sem diferença significativa entre estes dois níveis de expressão (Figura 10).

Conforme revelam os resultados obtidos, Farroupilha teve aumentada a expressão do gene *OsFRDL1* em resposta à presença de alumínio na solução de cultivo. Isto pode ser concluído pelo fato de que o nível de expressão foi calculado em relação a uma amostra dita calibradora e que, neste experimento, correspondeu ao tratamento no tempo 0 hora, ou seja, as plantas foram coletadas antes de serem submetidas ao estresse. Nesse sentido, o incremento observado de expressão - nove vezes maior que a da amostra calibradora às 12 horas de exposição ao alumínio - indica, quase certamente, que o aumento na expressão se deu antes de 12 horas, o que poderia explicar a não existência de diferença no comprimento de raiz entre os tratamentos com e sem alumínio observado na Figura 4.

Resposta diversa foi demonstrada por BR-IRGA 410. Para este genótipo, um aumento significativo na síntese de RNA mensageiro do gene *OsFRDL1* em resposta à presença de alumínio só foi observado após 48 horas de estresse e,

ainda assim, em nível inferior à cultivar Farroupilha. Como pode ser visualizado na Figura 2, houve tendência de redução no comprimento de raiz já nas primeiras horas de tratamento em razão, provavelmente, de que não houve ativação da síntese do gene responsável pelo transporte de citrato para o meio, o qual tem ação quelante e neutraliza o Al^{3+} , forma mais tóxica do metal, impedindo-o de penetrar nas células da raiz e, conseqüentemente, prejudicar o crescimento do sistema radicular sob condições de pH reduzido (Kochian, 1995).

Por outro lado foi verificado, também, que ambos os genótipos apresentaram expressão constitutiva do gene (dados não mostrados), ou seja, o gene é expresso mesmo na ausência de alumínio, concordando com a resposta obtida para o gene *HvAACT1* em cevada (Furukawa *et al.*, 2007). Todavia, a ativação do gene do arroz foi mais eficiente na cultivar Farroupilha, o que pode explicar, pelo menos em parte, a sua tolerância, enquanto BR-IRGA 410 parece não poder superar o estresse por alumínio utilizando este mecanismo.

Estudos posteriores são necessários para relacionar a diferença na expressão do gene *OsFRDL1* entre os genótipos e a secreção de citrato na presença de alumínio.

5.4. CONCLUSÕES

O genótipo Farroupilha apresenta expressão do gene *OsFRDL1* superior a BR-IRGA 410. As diferenças encontradas nos níveis de expressão são condizentes com as respostas observadas para estes genótipos em relação à tolerância ao alumínio, neste estudo e em outros realizados anteriormente.

5.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAMARGO, C.E.O. e OLIVEIRA, O.F. Tolerância de cultivares de trigo a diferentes níveis de alumínio em solução nutritiva e no solo. **Bragantia**, v.40, p.21-31, 1981.
- COFFMAN, R.; McCOUCH, S.R.; HERDT, R.W. Potentials and limitations of biotechnology in rice. In: **Proceedings of the FAO Rice Conference. International Rice Commission Newsletter**, v.53, p. 26-40, February 2004.
- DEPREZ, R.H.L. *et al.* Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. **Analytical Biochemistry**, v.307, p. 63-69, 2002.
- FONTECHA, G. *et al.* Candidate gene identification of an aluminum-activated organic acid transporter gene at the *Alt4* locus for aluminum tolerance in rye (*Secale cereale* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.114, p. 249-260, 2007.
- FOY, C.D. Plant adaptation to acid aluminum-toxic soils. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**, v.19, p. 959-987, 1988.
- FREITAS, F.A. *et al.* Evaluation of aluminum tolerance in rice. **Journal of Crop Improvement**, v.16, n.1/2, p. 141-151, 2006.
- FURUKAWA, J. *et al.* An aluminum-activated citrate transporter in barley. **Plant Cell Physiology**, v.48, p. 1081-1091, 2007.
- HE, G-X *et al.* An H⁺-coupled multidrug efflux pump, PmpM, a member of the MATE family transporters, from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v.186, p. 262-265, 2004.
- HOEKENGA, O.A. AtALMT1, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.103, n.25, p. 9738-9743, 2006.
- KOCHIAN, L.V.; PIÑEROS, M.A.; HOEKENGA, O.A. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. **Plant and Soil**, v.274, p. 175-195, 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.
- KOLLMEIER, M. *et al.* Aluminum activates a citrate-permeable anion channel in the aluminum-sensitive zone of the maize root apex. A comparison between an aluminum-sensitive and an aluminum-resistant cultivar. **Plant Physiology**, v.126, p. 397-410, 2001.
- LIGABA, A. *et al.* The *BnALMT1* and *BnALMT2* genes from rape encode aluminum-activated malate transporters that enhance the aluminum resistance of plant cells. **Plant Physiology**, v.142, p. 1294-1303, 2006.
- MA, J.F. Role of organic acids in detoxification of Al in higher plants. **Plant Cell Physiology**, v.44, p. 482-488, 2000.
- 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, n.6, p. 273-278, June 2001.
- MA, J.F. e FURUKAWA, J. Recent progress in the research of external Al detoxification in higher plants: a minireview. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.97, p. 46-51, 2003.
- MACEDO, C.C.; KINET, J.M.; JAN, V.V.S. Effects of duration and intensity of aluminum stress on growth parameters in four rice genotypes differing in aluminum sensitivity. **Journal of Plant Nutrition**, v. 20, n.1, p. 181-193, 1997.
- MAGALHÃES, J.V. *et al.* A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. **Nature Genetics**, v.39, p. 1156-1161, 2007.
- PIÑEROS, M.A. e KOCHIAN, L.V. A patch-clamp study on the physiology of aluminum toxicity and aluminum tolerance in maize. Identification and characterization of Al³⁺-induced anion channels. **Plant Physiology**, v.125, p. 292-305, 2001.
- RYAN, P.R. e DELHAIZE, E. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.52, p. 527-560, 2001.
- SASAKI, T. *et al.* A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. **The Plant Journal**, v.37, p. 645-653, 2004.

SOSBAI. Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil/ Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado; V Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado, XXVII Reunião da Cultura do Arroz Irrigado. – Pelotas: SOSBAI, 2007. 161 p., il.

VASCONCELOS, S.S.; JACOB-NETO, J.; ROSSIELLO, R.O.P. Differential root responses to aluminum stress among brazilian rice genotypes. **Journal of Plant Nutrition**, v.25, n.3, p. 655-669, 2002a.

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

VICENTE, F.M.P.; ROSSIELLO, R.O.P.; PEREIRA, M.P. Características indicativas de sensibilidade ao alumínio em arroz.I. Crescimento em solução nutritiva. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, n.1, 1998.

Von UEXKÜLL, H.R. e MUTERT, E. Global extent, development and economic impact acid soils. **Plant Soil**, v.171, p. 1-15, 1995.

YOKOSHO, K. *et al.* OsFRDL1 is a citrate transporter required for efficient translocation of iron in rice. **Plant Physiology**, v.149, p. 297-305, 2009.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi determinado que um período de 48 horas de exposição à concentração de 14 mg L^{-1} de alumínio é adequado para a diferenciação de genótipos de arroz quanto à tolerância ao estresse por esse metal.

A caracterização da variabilidade genotípica quanto à resposta ao alumínio tóxico e a identificação de constituições genéticas superiores quanto a esse caráter, realizadas neste estudo, permitirão que se avancem os estudos genéticos sobre a tolerância de arroz ao alumínio através da construção de populações segregantes e que podem ser utilizadas para o mapeamento de QTLs para identificação de genes envolvidos nesta tolerância, visto que, em arroz, este é um caráter quantitativo.

Por outro lado, a análise da expressão do gene *OsFRDL1* em genótipos contrastantes quanto à tolerância ao alumínio revelou um interessante resultado, visto que o cultivar Farroupilha, de resposta tolerante, apresentou nível de expressão superior a BR-IRGA 410, sensível ao metal, o que possibilita que os estudos sejam aprofundados no sentido de caracterizar a secreção de citrato como um mecanismo de tolerância de arroz ao alumínio.

A caracterização dos genes de tolerância deve acelerar o desenvolvimento de culturas mais tolerantes, produtivas e adaptadas às condições de estresse.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(Introdução Geral)

- ALLARD, R.W. **Principles of plant breeding**. New York: J. Wiley, 1999. 254 p.
- CHANG, Y.C.; MA, J.F.; MATSUMOTO, H. Mechanisms of Al-induced iron chlorosis in wheat (*Triticum aestivum*) Al-inhibited biosynthesis and secretion of phytosiderophore. **Physiologia Plantarum**, v. 102, p. 9-15, 1998.
- COFFMAN, R.; McCOUCH, S.R.; HERDT, R.W. Potentials and limitations of biotechnology in rice. In: Proceedings of the FAO Rice Conference. International Rice Commission Newsletter, v.53, p. 26-40, February 2004.
- DELHAIZE, E. e RYAN, P.R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiology**, v.107, p. 315-321, 1995.
- ECHART, C.L. e CAVALLI-MOLINA, S. Fitotoxicidade do alumínio: efeitos, mecanismo de tolerância e seu controle genético. **Ciência Rural**, v.31, n.3, p. 531-541, 2001.
- FAGERIA, N.K. e CARVALHO, J,R.P. Influence of aluminum in nutrient solutions on chemical composition in upland rice cultivars. **Plant and Soil**, v.69, p. 31-44, 1982.
- FERREIRA, R.P. et al. Herança da tolerância à toxidez de alumínio em arroz com base em análise dialélica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.4, p. 615-621, 1999.
- FREITAS, F.A. et al. Absorção de P, Mg, Ca e K e tolerância de genótipos de arroz submetidos à estresse por alumínio em sistemas hidropônicos. **Ciência Rural**, v.36, n.1, p. 72-79, 2006.
- INTERNATIONAL RICE GENOME SEQUENCING PROJECT. The map-based sequence of the rice genome. **Nature**, v.436, p. 793-800, August 2005.
- IRGA. Boletim Técnico. Fertilidade dos solos cultivados com arroz irrigado no Rio Grande do Sul. ANGHINONI, I. *et al.* Cachoeirinha, 2004. 52 p.
- KASAI, M.; SASAKI, M.; YAMAMOTO, Y.; MATSUMOTO, H. Al increases K⁺ efflux and activities of ATP-dependent and PPI-dependent H⁺ pumps of tonoplast-enriched vesicles from barley roots. **Plant Cell Physiology**, v.33, p.1035-1039, 1992.

- 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.
- 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.
- MENDONÇA, R.J.; CAMBRAIA, J.; OLIVEIRA, J.A.; OLIVA, M.A. Efeito do alumínio na absorção e na utilização de macronutrientes em duas cultivares de arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, p.843-848, 2003.
- NGUYEN, N.T.; MOHAPATRA, P.K.; FUJITA, K. Leaf necrosis is a visual symptom of the shift from growth stimulation to inhibition effect of Al in *Eucalyptus camaldulensis*. **Plant Science**, v.165, p.147-157, 2003.
- NGUYEN, V.T. *et al.* Molecular mapping of genes conferring aluminum tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.102, p. 1002-1010, 2001.
- OHKI, K. Aluminium stress on sorghum growth and nutrient relationship. **Plant Soil**, v.98, p. 195-202, 1986.
- ROUT, G.R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. Aluminium toxicity in plants: a review. **Agronomie**, v.21, p. 3-21, 2001.
- RYAN, P.R.; SHAFF, J.E.; KOCHIAN, L.V. Aluminum toxicity in roots: correlation among ionic currents, ion fluxes and root elongation in aluminum-sensitive and aluminum tolerant cultivars. **Plant Physiology**, v.99, p. 1193-1200, 1992.
- SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, v.103, p. 7-12, 1993.
- SIVAGURU, M. e PALIWAL, K. Differential aluminum tolerance in some tropical Rice cultivars. II. Mechanism of aluminum tolerance. **Journal of Plant Nutrition**, v.16, p.1717-1732, 1993.
- TAYOR, G.J. *et al.* Al induced 51-kilodalton membrane-bound proteins are associated with resistance to Al in a segregating population of wheat. **Plant Physiology**, v.114, p. 363-372, 1997.

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

von UEXKÜLL, H.R. e MUTERT, E. Global extent, development and economic impact of acid soils. **Plant Soil**, v.171, p. 1-15, 1995.

WAGATSUMA, T. *et al.* Plasma membrane of younger and outer cells in the primary specific site for aluminum toxicity in roots. **Plant Soil**, v.171, p. 105-112, 1995.

WISSEMEIER, A.H.; DIENING, A.; HERGENRÖDER, A. Callose formation as parameter for assessing genotypical plant tolerance of aluminum and manganese. **Plant and Soil**, v.146, p. 67-75, 1992.

WOOD, S.; SEBASTIAN, K; SCHERR, S. Soil resource condition. In Pilot Analysis of Global Ecosystems: Agroecosystems. International Food Policy Research Institute and the World Resources Institute, Washington, DC, pp 45-54, 2000.

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

Vitae

Denise dos Santos Colares nasceu em Pelotas no dia 29 de agosto de 1969. É filha de Moacir José Velho Colares e Luiza dos Santos Colares. Coursou o 1º. e 2º. Graus no Instituto de Educação Assis Brasil. Em 1987 ingressou no curso de agronomia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, onde se graduou em janeiro de 1991. Durante o período de graduação, atuou como estagiária e monitora na disciplina de Genética. Em 1991, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitomelhoramento, obtendo o título de Mestre em maio de 1994. Foi bolsista recém-mestre da Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). Em junho de 1996 ingressou como professora substituta no Departamento de Bioquímica do Instituto de Química e Geociências da Universidade Federal de Pelotas. Em junho de 1998 prestou concurso no mesmo Departamento, tendo sido classificada em 1º. lugar. Em agosto do mesmo ano, assumiu como professora assistente. Em 2005 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitomelhoramento, para cursar doutorado. Atualmente é professora adjunta do Departamento de Bioquímica.