

**RESPOSTA DE CULTIVARES DE *Urochloa brizantha* À TOXIDADE  
DE ALUMÍNIO LIVRE DURANTE AS FASES DE GERMINAÇÃO E  
DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS**

**CLÁUDIA JAQUELINE TOME YAMAMOTO**

**RESPOSTA DE CULTIVARES DE *Urochloa brizantha* À TOXIDADE  
DE ALUMÍNIO LIVRE DURANTE AS FASES DE GERMINAÇÃO E  
DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS**

**CLÁUDIA JAQUELINE TOME YAMAMOTO**

Dissertação apresentada a Pró - Reitoria de Pesquisa e Pós - Graduação, como parte dos requisitos pra obtenção do título de Mestre em Agronomia. - Área de concentração: Produção Vegetal.

Orientadora:  
Prof<sup>a</sup>. Dr. Ceci Castilho Custódio

631.521  
Y19r

Yamamoto, Claudia Jaqueline Tome.

Resposta de cultivares de *Urochloa brizantha* à toxicidade de alumínio livre durante as fases de germinação e desenvolvimento de plântulas / Claudia Jaqueline Tome Yamamoto. – Presidente Prudente, 2014.

53f.: il.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2014.

Bibliografia.

Orientador: Ceci Castilho Custódio

1. Germinação. 2. Sementes. 3. Alumínio. I. Título.

**CLAUDIA JAQUELINE TOME YAMAMOTO**

**RESPOSTA DE CULTIVARES DE *Urochloa brizantha* À TOXIDADE DE ALUMÍNIO LIVRE DURANTE AS FASES DE GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS**

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Presidente Prudente, 4 de Abril de 2014

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof. Dr. Ceci Castilho Custódio  
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE  
Presidente Prudente

---

Banca: Prof. Dr. Fabiana Abrantes  
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE  
Presidente Prudente

---

Banca: Prof. Dr. Edvaldo Ap. Amaral da Silva  
Universidade Estadual Paulista – UNESP  
Botucatu

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho com muito orgulho aos meus amados pais Armando e Lucia, que nunca mediram esforços para que eu pudesse realizar mais esta etapa de meus estudos.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus acima de tudo.

Agradeço aos meus pais Armando e Lucia.

Agradeço a minha irmã Amanda e ao Cledilson, pessoas especiais que nas horas difíceis estiveram ao meu lado, me apoiando e colaborando para o andamento deste trabalho.

Agradeço também minha querida orientadora Ceci e ao meu co-orientador Tiritan, ao Profº Nelson e a todos os demais professores pelos ensinamentos e confiança em mim aplicados.

E não poderia deixar de agradecer às queridas Inaê e Rita, que estiveram ao meu lado no laboratório, nos momentos de distração e principalmente nos momentos de descobertas, tornando este trabalho menos difícil de ser concretizado.

**“Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Não importam quais sejam os obstáculos e as dificuldades. Se estamos possuídos de uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los.”**

**Dalai Lama**

## RESUMO

### Resposta de cultivares de *Urochloa brizantha* à toxicidade de alumínio livre durante as fases de germinação e desenvolvimento de plântulas

Considerando obter maior produtividade de pastagens para evitar a ocupação de novas áreas, a manutenção e a sustentabilidade do setor agropecuário, tanto no Brasil como no mundo, o aumento da eficiência de uso da água na agricultura e a utilização de solos ácidos associados ao alumínio, o objetivo deste trabalho foi avaliar as mudanças na germinação, no desenvolvimento inicial das plântulas e em alguns parâmetros bioquímicos em cultivares de *Urochloa brizantha* submetidos a estresses causados pela toxicidade de alumínio livre. Os tratamentos foram resultantes da combinação de seis cultivares (Marandú, BRS Piatã, MG4, MG5, Xaraés e Basilisk), com cinco níveis de toxicidade de alumínio (0; 1; 2; 4 e 8 mmol<sub>c</sub> Al<sup>3+</sup> dm<sup>3</sup>) obtidos com soluções de tricloreto de alumínio (0; 0,3996; 0,7992; 1,5984 e 3,1968 AlCl<sub>3</sub>(g.L<sup>-1</sup>)) em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Nas avaliações preliminares foram selecionados lotes com aproximadamente mesma qualidade fisiológica inicial das sementes (grau de umidade, germinação e viabilidade). No ensaio 1, os lotes selecionados foram submetidos à germinação em condições de estresse simulado em laboratório analisando-se germinação por protrusão de raiz e por plântula normal, comprimento e massa seca de parte aérea e raiz. No ensaio 2, a avaliação foi realizada no sétimo dia, após a transferência das plântulas para a condição de estresse, medindo-se a taxa de crescimento relativo do comprimento e massa de parte aérea e raiz e realizada também as análises bioquímicas: índice de estabilidade da membrana (IEM), atividade de superóxido dismutase (SOD), determinação de prolina, de antioxidantes totais (DAT) e de malonaldeído (MDA). Na fase de desenvolvimento estudada, até 14 dias após semeadura, o cultivar mais tolerante ao alumínio consegue manter crescimento de raiz na condição de estresse, enquanto o mais suscetível reduz o crescimento radicular e desenvolve proporcionalmente mais parte aérea, uma vez que o crescimento ocorre com base na mobilização de reservas dos tecidos da semente. A metodologia utilizada no ensaio 1 indicou que a qualidade inicial de semente interfere na avaliação e que os níveis crescentes de Al<sup>3+</sup> são danosos a germinação. O cultivar MG5 apresenta plântulas com maior comprimento e massa na condição sem estresse e a partir da dose 1 mmol<sub>c</sub>. dm<sup>-3</sup> de Al<sup>3+</sup> apresenta maior declínio nas determinações, indicando baixa tolerância ao estresse. O cultivar Basilisk não é o mais tolerante em função da germinação, mas seu desenvolvimento, principalmente de raiz, é menos afetado com o aumento das doses de Al<sup>3+</sup>. A metodologia utilizada no ensaio 2, por não envolver a germinação e portanto não sofrer interferência desse evento, conseguiu evidenciar mais claramente as diferenças entre os cultivares. Os cultivares, Xaraés (taxa de crescimento relativo de massa seca de parte aérea), MG5 e MG4 (taxa de crescimento relativo de comprimento de parte aérea), se destacam apenas na situação sem estresse, com maiores desenvolvimentos no controle (0) até o nível 1 mmol<sub>c</sub>. dm<sup>-3</sup> de Al<sup>3+</sup>. O cultivar Basilisk é o mais tolerante conseguindo acumular massa seca na raiz mesmo nas doses de Al<sup>3+</sup> mais elevadas, enquanto o cultivar Marandú consegue fazer o mesmo até o nível 4 mmol<sub>c</sub>. dm<sup>-3</sup> de Al<sup>3+</sup>. Diante das determinações bioquímicas, Prolina, SOD e DAT não são indicadoras da toxicidade de Al<sup>3+</sup>, porém, IEM e MDA foram mais promissoras.

Palavras-chave: Estresse; Pastagem; *Brachiaria brizantha*.



## ABSTRACT

### ***Urochloa brizantha* cultivars response to free aluminum toxicity during germination and seedling development**

Whereas it is necessary to obtain higher pastures productivity to prevent new areas occupation, agriculture maintenance and sustainability, even in Brazil and in the world, the increasing demand for water use efficiency in agriculture and use of acid soils associated with aluminium. The aim of this study was to evaluate the changes in germination and in the early seedlings development and some biochemical parameters in *Urochloa brizantha* cultivars subjected to stresses caused by free aluminum toxicity. The treatments were resulting from the combination of six cultivars (Marandú, BRS Piatã, MG4, MG5, Xaraés and Basilisk), with five levels of aluminium toxicity (0; 1; 2; 4 and 8 mmolc Al<sup>3+</sup> dm<sup>3</sup>) obtained using aluminium trichloride solutions (0; 0.3996; 0.7992; 1.5984 and 3.1968 AlCl<sub>3</sub> (g. L<sup>-1</sup>)) in random design with four replicates. At the preliminary evaluations lots were selected with almost the same seed initial physiological quality (moisture content, germination and viability). During first trial, the selected lots were submitted to germination in simulated stress condition in laboratory quantifying germination considering root protrusion or normal seedling, shoot and root length and dry mass. At the second trial, the evaluations were done at the seventh day after seedling transfer to stress conditions, measuring length and dry mass of shoot and root relative growth-rate and biochemical determinations: membrane stability index (MSI), superoxide dismutase activity (SOD), proline, total antioxidants (DAT) and malondialdehyde amount (MDA). At the seedling studied period, up to 14 days after sowing, the most aluminium tolerant cultivar maintain root growth in that conditions, while the most susceptible one reduced root growth and developed proportionally more shoot, once the growth is done with reserves mobilization from seed tissue. The first trial methodology shows that the initial seed quality interferes in the evaluation and the Al<sup>3+</sup> increasing levels were harmful to germination. The MG5 cultivar presented longer and heavier seedlings without stress and following 1 mmolc. dm<sup>-3</sup> de Al<sup>3+</sup> presented decreasing measurements, showing low stress tolerance. The Basilisk cultivar is not the more tolerant considering germination results, but its development, principally of the root, is lower affected with Al<sup>3+</sup> levels increasing. The second trial methodology, once do not include the germination period and its influence, achieve cultivar differences clearer. The cultivars, Xaraés (dry mass of shoot relative growth-rate), MG4 and MG5 (length of shoot relative growth-rate), was superior only at the non-stress situation, with more development at control (0) up to 1 mmolc. dm<sup>-3</sup> de Al<sup>3+</sup> level. The Basilisk cultivar is more tolerant accumulating root dry mass even in high Al<sup>3+</sup> levels, while the Marandu cultivar do the same up to 4 mmolc. dm<sup>-3</sup> de Al<sup>3+</sup>. The biochemical analyses, Proline amount, SOD and DAT was not related with Al<sup>3+</sup> toxicity, but MSI e MDA was promising.

Keywords: Stress; Grassland; *Brachiaria brizantha*.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1A	Germinação por protrusão de raiz de sementes de <i>Urochloa brizantha</i> em função de diferentes níveis de alumínio.....	31
FIGURA 1B	Germinação de sementes de <i>Urochloa brizantha</i> em função de diferentes níveis de alumínio.....	31
FIGURA 2A	Comprimento de parte aérea de plântulas de <i>Urochloa brizantha</i> em função de diferentes níveis de alumínio.....	34
FIGURA 2B	Comprimento de raiz de plântulas de <i>Urochloa brizantha</i> em função de diferentes níveis de alumínio.....	34
FIGURA 3A	Massa seca de parte aérea de plântulas de <i>Urochloa brizantha</i> em função de diferentes níveis de alumínio.....	36
FIGURA 3B	Massa seca de raiz de plântulas de <i>Urochloa brizantha</i> em função de diferentes níveis de alumínio.....	36
FIGURA 4A	Taxa de crescimento relativo de comprimento de parte aérea de plântulas de <i>Urochloa brizantha</i> em função de diferentes níveis de alumínio.....	42
FIGURA 4B	Taxa de crescimento relativo de comprimento de raiz de plântulas de <i>Urochloa brizantha</i> em função de diferentes níveis de alumínio.....	42
FIGURA 5A	Taxa de crescimento relativo de massa seca de parte aérea de plântulas de <i>Urochloa brizantha</i> em função de diferentes níveis de alumínio.....	44
FIGURA 5B	Taxa de crescimento relativo de massa seca de raiz de plântulas de <i>Urochloa brizantha</i> em função de diferentes níveis de alumínio.....	44
FIGURA 6	Índice de estabilidade de membrana celular (IEM) de plântulas de <i>Urochloa brizantha</i> em função de diferentes níveis de alumínio.....	46
FIGURA 7	Determinação do conteúdo de malondealdeído de massa fresca de plântulas de <i>Urochloa brizantha</i> em função de diferentes níveis de alumínio.....	48

## LISTA DE TABELA

TABELA 1	Valores de F obtidos na análise de variância para Germinação por protrusão de raiz (GPR), Germinação (GPN), Comprimento de parte aérea (CPA), Comprimento de raiz (CR), Massa seca de parte aérea (MSPA) e Massa seca de raiz (MSR), durante a germinação de sementes de seis cultivares de <i>Urochloa brizantha</i> em função de diferentes níveis de alumínio.....	30
TABELA 2	Médias entre cultivares de Germinação por protrusão de raiz (GPR) e Germinação (GPN) de plântulas de <i>Urochloa brizantha</i> em função de diferentes níveis de alumínio.....	32
TABELA 3	Valores de F obtidos na análise de variância para Taxa de crescimento relativo de comprimento de parte aérea (TCR-CPA), Taxa de crescimento relativo de comprimento de raiz (TCR-CR), Taxa de crescimento relativo de massa seca de parte aérea (TCR-MSPA), Taxa de crescimento relativo de massa seca de raiz (TCR_MSR), Índice de estabilidade de membrana (IEM), Prolina , Atividade de enzima Superóxido Dismutase (SOD), Determinação de antioxidantes totais (DAT) e Determinação do conteúdo de malondialdeído (MDA) de plântulas de seis cultivares de <i>Urochloa brizantha</i> em função de diferentes níveis de alumínio.....	37
TABELA 4	Médias para cultivares de Índice de estabilidade de membrana celular (IEM), Determinação do teor de prolina (Prolina) Atividade de enzima Superóxido Dismutase (SOD) e Determinação de antioxidantes totais (DAT) de plântulas de <i>Urochloa brizantha</i> em função de diferentes níveis de alumínio.....	47

## LISTA DE SIGLAS

<b>Al</b>	- Alumínio
<b>AlCl<sub>3</sub></b>	- Tricloreto de Alumínio
<b>CPA</b>	- Comprimento de parte aérea
<b>CR</b>	- Comprimento de raiz
<b>Cu</b>	- Cobre
<b>DAT</b>	- Determinação de Antioxidantes Totais
<b>EDTA</b>	- Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
<b>ERO</b>	- Espécie Reativa de Oxigênio
<b>IEM</b>	- Índice de Estabilidade de Membrana Celular
<b>MDA</b>	- Determinação do conteúdo de malondialdeído
<b>MSPA</b>	- Massa seca de parte aérea
<b>MSR</b>	- Massa seca de raiz
<b>NBT</b>	- Nitro Blue Tetrazolium
<b>O<sub>2</sub></b>	- Oxigênio
<b>SOD</b>	- Superóxido Dismutase
<b>TCR_CPA</b>	- Taxa de Crescimento Relativo do Comprimento de Parte Aérea
<b>TCR_CR</b>	- Taxa de Crescimento Relativo do Comprimento de Raiz
<b>TCR_MSPA</b>	- Taxa de Crescimento Relativo de Massa Seca de Parte Aérea
<b>TCR_MSR</b>	- Taxa de Crescimento Relativo de Massa Seca de Raiz
<b>Zn</b>	- Zinco

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	<i>Urochloa brizantha</i> .....	16
2.2	Toxidez de Alumínio.....	17
2.3	SOD (Superóxido Dismutase).....	19
2.4	Prolina.....	20
3	OBJETIVO.....	22
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1	Estresse Durante a Germinação (Ensaio 1).....	23
4.2	Estresse em Plântula (Ensaio 2).....	24
4.3	Avaliação do Índice de Estabilidade de Membrana Celular.....	25
4.4	Superóxido Dismutase (SOD, EC 1.15.11) .....	26
4.5	Determinação Deprolina.....	26
4.6	Determinação de Antioxidantes Totais.....	27
4.7	Determinação do Conteúdo de Malondialdeído.....	27
4.8	Análise Estatística.....	28
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1	Estresse Durante a Germinação (ensaio 1).....	30
5.2	Estresse em Plântula (Ensaio 2).....	37
6	CONCLUSÃO.....	49
	REFERÊNCIAS.....	50

## 1 INTRODUÇÃO

A produção, de carne e leite no Brasil, é feita em grandes áreas de pastagens (172 milhões de hectares, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2006) e uma grande porcentagem destas é de pastagens cultivadas (~55% ou 94 milhões de hectares, FERRAZ, 2003). A produção de carne possui um valor de exportação da ordem de US\$ 4,4 bilhões, sendo o Brasil o maior exportador de carne do mundo (PICCIANI, 2010). O valor da produção de carne é de R\$13,8 bilhões, ficando atrás apenas das culturas de cana-de-açúcar, soja e cereais (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2006).

As áreas dedicadas à pecuária ocupam 20% do território nacional contra apenas 10% das áreas agrícolas. No Estado de São Paulo a área ocupada com pastagens representa 39,37% do total (6,5% das áreas de pastagens do país, sétima posição no ranking do país, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2006), sendo que desta, 89% é cultivada com gramíneas do gênero *Urochloa* (LUPA, 2008). Em relação à produção de carne por área, o Brasil tem uma média de 75 kg equivalente carcaça ano<sup>-1</sup> ha<sup>-1</sup> e possui um potencial de mais de 300 kg (PANIAGO, 2010). O aumento da produtividade das forrageiras, com consequente aumento da lotação de animais, poderia liberar entre 50 e 60 milhões de hectares nos próximos anos para a agricultura no Brasil (PICCIANI, 2010).

Além deste impacto econômico direto, o crescente uso de gramíneas forrageiras tem auxiliado o desenvolvimento da indústria de sementes no Brasil. Em decorrência disso, o país transformou-se no maior produtor, consumidor e exportador de sementes (ANDRADE; VALENTIM, 2006). De importador destas sementes na década de 70, o Brasil passou a ocupar o posto de maior produtor e exportador de sementes tropicais do mundo, exportando para mais de 40 países (SILVA FILHO, 2009). As sementes do gênero *Urochloa*, principalmente de *U. brizantha* cv. Marandu dominam o comércio nos mercados interno e externos (VECHIATTO, 2004).

No Brasil a maioria dos solos destinados à produção vegetal apresenta baixa fertilidade e problemas de acidez e toxidez por alumínio, fatores responsáveis pelo baixo rendimento da maioria das culturas. No caso específico das pastagens, que normalmente ocupam áreas marginais, esses problemas são ainda mais sérios. A alta concentração de alumínio nos solos ácidos assume, portanto, papel

importante na agricultura e pecuária nacionais, afetando diretamente os processos fisiológicos e metabólicos da grande maioria das espécies cultivadas (MARTINS et al., 2010). A solução encontrada para a produção agrícola nesses solos é uma combinação de práticas de manejo, calagem associada à correção de deficiência de nutrientes e o uso de cultivares desenvolvidos para essas condições (ALVES, 1984).

Na composição do solo, o alumínio é considerado o terceiro elemento químico mais frequente na crosta terrestre, e em situação de pH abaixo de 5,5, tende a se dissociar das estruturas minerais de argila para a solução do solo, onde geralmente está presente em concentrações na faixa de 10 a 350 mmol L (MACHADO, 1997).

Dentre as alternativas consideradas viáveis para contornar essas dificuldades, a obtenção de cultivares melhoradas tolerantes ao alumínio tóxico, têm sido consideradas a mais promissora, constituindo uma das mais importantes demandas dos produtores pecuários de todo o País, sendo intensa a procura de variedades de forrageiras adaptadas aos diferentes ecossistemas (MARTINS et al., 2010). A adaptação ao nível populacional, ou a aclimatação, ao nível de uma planta individual, ocorre por meio da combinação de processos comportamentais, morfológicos, anatômicos, fisiológicos e bioquímicos que, por sua vez, dependem de processos moleculares (GASPAR et al., 2002).

Considerando a necessidade de obter maior produtividade de pastagens para evitar a ocupação de novas áreas, a manutenção e a sustentabilidade do setor agropecuário, tanto no Brasil como no mundo, demandarão do aumento da eficiência de uso da água na agricultura e utilização de solos ácidos associados ao alumínio.

A intensificação da produção de bovinos de corte tem gerado uma demanda por cultivares de *Urochloa* superiores, que devem combinar elevada capacidade de produção e plasticidade ecológica. Assim, para que esta forrageira atinja o seu potencial de produção e crescimento, torna-se necessário a escolha de genótipos mais tolerantes à deficiência de água, salinidade e toxidez por alumínio, principalmente na fase de maior susceptibilidade que vai da germinação da semente à emergência da plântula no campo, fases estas fundamentais para o efetivo estabelecimento da cultura, especialmente em uma cultura que poderá ser mantida por mais de 15 anos (SANO et al., 2008) sem renovação, desde que em boas condições de manejo (BODDEY et al., 2004).

O objetivo deste trabalho foi avaliar as mudanças na germinação, no desenvolvimento inicial das plântulas e em alguns parâmetros bioquímicos em cultivares de *Urochloa brizantha* disponíveis comercialmente (Marandú, BRS Piatã, MG4, MG5, Xaraés e Basilisk) submetidos a estresses causados pela toxidez de alumínio livre.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Urochloa brizantha*

As gramíneas do gênero *Urochloa* constituem, no Brasil, as principais espécies forrageiras tropicais cultivadas, ocupando a maioria da extensão das pastagens cultivadas (COSTA et al., 2008). Sete espécies africanas perenes (*B. arrecta*, *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. dictyoneura*, *B. humidicola*, *B. mutica* e *B. ruziziensis*) têm sido amplamente utilizadas como forrageiras, especialmente, na América Tropical, e em menores proporções na Ásia, no Sul do Pacífico e na Austrália (KELLER-GREIN et al., 1996). O interesse dos pecuaristas por essas espécies deve-se à capacidade de produção de matéria seca, aos reduzidos problemas fitossanitários, à estabilidade de crescimento em todas as estações do ano e à ampla adaptabilidade edáfica (CASTRO; CARVALHO; REIS, 1996).

Classificada como *Urochloa brizantha*, e originária de uma região vulcânica da África (BOGDAN, 1977), planta cespitosa, muito robusta, de 1,5 a 2,5m de altura, com colmos iniciais prostrados, mas produzindo afilhos predominantemente eretos. Rizomas muito curtos e encurvados. Colmos floríferos eretos, frequentemente com afilhamentos nos nós superiores, que leva à proliferação de inflorescências, especialmente sobre regime de corte ou pastejo (NUNES et al., 1985).

A temperatura ideal para o crescimento é de 30-35°C, e a temperatura mínima é de 15°C. Apresenta boa tolerância ao frio permanecendo verde no inverno (BOGDAN, 1977; SKERMAN; RIVEROS, 1990). Em relação à profundidade efetiva, é ótima em solos profundos, boa tolerância a solos de textura média a arenosa, e solos com boa drenagem do perfil (ALCÂNTARA; PEDRO JR; DONZELLI, 1993).

Por sua plasticidade genética, que lhes permite adaptar-se a variadas condições de solo e clima numa ampla faixa de latitudes, espécies desse gênero vêm ganhando considerável importância como gramíneas forrageiras (VALLE, 1990). A formação de pastagem deve apresentar um elevado nível tecnológico, com o uso de sementes de alta qualidade e poder germinativo (ARONIVICHI; ROCHA, 1985).

A *U. brizantha* caracteriza-se por sua diversidade de usos como pastejo direto, forrageira para fenação e silagem e, na integração lavoura-pecuária

ou como cultura produtora de palhada em sistema plantio direto, por apresentar elevado potencial de produção de biomassa em regiões tropicais (RODRIGUES; RODRIGUES, 1987), principalmente quando recebe tratos culturais, correção do solo, fertilização e, até em alguns casos, irrigação, como uma cultura agrícola (DIAS; ALVES, 2008). A grande demanda no uso de *Urochloa* como pastagens é devido à fácil adaptação a solos ácidos e pobres, resistência à seca e a pragas, e à sua qualidade nutricional adequada para a alimentação bovina (LAPOINTE; MILES, 1992; KELLER-GREIN et al., 1996). Esta forrageira apresenta facilidade de adaptação a vários tipos de solos e algumas espécies são resistentes a determinadas pragas como a cigarrinha das pastagens (FISHER; KERRIDGE, 1996; MILES; MAASS; VALLE, 1996).

Embora seja inegável o aumento de cultivares de *U. brizantha* disponíveis no mercado, a disponibilidade de informações sobre estes cultivares ainda é escassa, principalmente quanto aos aspectos de tolerância a estresses abióticos. Portanto, estudos para identificar possíveis fontes de variação que orientem tomadas de decisão no melhoramento genético de *U. brizantha* que, por ser apomítica, teoricamente apresenta pouca variabilidade genética dentro dos cultivares, apresentam-se como prioritários.

## **2.2 Toxidez de Alumínio**

Os solos tropicais, onde ocorre a produção de pastagens, são intemperizados e apresentam acidez, tanto devido à concentração de prótons ( $H^+$ ) quanto de alumínio trocável ( $Al^{3+}$ ) (FAGERIA, 1985). Sendo que o uso da fase juvenil pode ser útil para a seleção de plantas mais tolerantes a este estresse (DELHAIZE et al., 1993; BLAHA et al., 1997; MA et al., 2001, RYAN et al., 2011), estratégias de tolerância ao meio são requeridas principalmente para culturas perenes onde a aplicação de insumos corretivos da acidez, em profundidade, é difícil de ser introduzida no sistema produtivo.

A fase de estabelecimento da cultura implica em sucesso da germinação das sementes e desenvolvimento inicial das plântulas até que apresentem condições de sobrevivência, baseada na produção ativa de fotoassimilados e absorção de água e nutrientes do solo, quando passa a ser

considerada uma planta estabelecida no meio. É considerada de grande risco, sendo muito exigente em condições favoráveis, como água, luz, temperatura e ausência de fatores impeditivos ou tóxicos (FINCH-SAVAGE, 2004).

Souza Filho e Dutra (1998) mostraram que a germinação de sementes de *Calopogonium mucunoides* em solos com concentração de alumínio de 20 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> foi 6% menor que o controle. Em concentrações inferiores não ocorreram prejuízos à germinação. Já Szymanska e Molas (1996) não encontraram efeito do Al<sup>3+</sup> na germinação de *Cucumis sativus*. Porém, as concentrações de Al<sup>3+</sup> influenciaram significativamente no crescimento. Em concentrações de 1 a 5 mg dm<sup>-3</sup> de Al<sup>3+</sup> o crescimento da plântula foi estimulado, não acarretando anormalidades morfológicas ou de desenvolvimento, porém em concentrações de 20 a 40 mg dm<sup>-3</sup> de Al<sup>3+</sup> ocorreu inibição do crescimento de plântulas e danos nas mesmas.

O uso de seleção na fase juvenil mostra-se adequado para avaliar diferenças genótípicas quanto à tolerância à toxidez de Al<sup>3+</sup> (BLAHA et al., 1997). Esta seleção pode ser executada pela coloração de hematoxilina, na qual os genótipos resistentes não se colorem de vermelho e os genótipos susceptíveis se coram (OWNBY, 1993). Segundo Ruddy et al. (1995) concentrações de apenas 0,132 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> já seriam suficientes para afetar o desenvolvimento de plântulas. Entretanto, estresse por alumínio, em cultivares de soja, estudados por Custódio et al. (2002), indicou que o comprimento da plântula foi estimulado na faixa entre 0,25 e 1,0 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> com maior desenvolvimento em 1,0 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>. Concentrações maiores foram prejudiciais aos cultivares estudados.

A fitotoxidez do alumínio manifesta-se, principalmente, na inibição do crescimento das raízes dos vegetais, o que resulta num menor volume de solo explorado pela planta, o que traz consequências negativas sobre a nutrição mineral e sobre a absorção de água (FOY; CHANEY; WHITE, 1978). A rápida resposta da raiz indica que num primeiro momento o Al inibe a expansão e alongamento das células das raízes, e depois a divisão celular também passa a ser inibida (KOCHIAN, 1995; MATSUMOTO, 2000).

Segundo Fleming e Foy (1968), a tolerância das plantas a este íon metálico está relacionada à capacidade de continuidade da divisão e alongamento celular sob condições de estresse, modificação do ambiente radicular reduzindo a concentração de alumínio disponível, e possibilidade de manter áreas meristemáticas viáveis para a formação de novos tecidos. A capacidade para

sobreviver ao estresse é regida por mecanismos que conferem resistência e podem ser escape ou tolerância. Os mecanismos de escape envolvem reduzida atividade metabólica – levando a um estado de estabilização do desenvolvimento “repouso”. São aqueles que evitam a exposição ao estresse. Os mecanismos de tolerância, por sua vez, envolvem alta atividade metabólica sob estresse moderado, e baixo sob estresse severo permitem a planta suportar o estresse (OSMOND, 1987; BRAY; BAILEY-SERRES; WEWRETILNYK, 2000; CAMARA; WILLADINO, 2005).

A absorção e o acúmulo de Al pela planta afetam células e organelas em nível morfológico, citogenético e fisiológico, prejudicando consideravelmente o estabelecimento, desenvolvimento e a produtividade final da lavoura (KUMAR et al., 1995). A toxidez causada pelo Al aumenta o rompimento dos dictiossomos e sua função secretória, a vacuolização e a degradação de grãos de amido na ponta e nas células meristemáticas da raiz (TAMÁS et al., 2006). Diante disso, vários processos bioquímicos e fisiológicos podem já ter sido alterados antes da inibição do crescimento da raiz induzida por Al (ZHANG; ZHANG; GUO, 2007), entre eles o estresse oxidativo (YAMAMOTO; MATSUMOTO; DEVI, 2003). Uma característica comum a esse tipo de estresse é a produção de muitas moléculas do radical superóxido (CHAFFAI; MARZOUK; FERJAN, 2005), sendo essa espécie reativa de oxigênio (ERO) altamente citotóxica, podendo causar dano oxidativo a biomoléculas tais como lipídios, proteínas, pigmentos e os ácidos nucleicos, levando à peroxidação de lipídios de membranas, perda de íons, hidrólise de proteínas e até mesmo dano ao DNA (ZHANG; ZHANG; GUO, 2007).

### **2.3 Superóxido Dismutase (SOD, EC.1.15.11)**

A SOD é uma enzima antioxidante envolvida na eliminação de EROs em plantas (APEL; HERT, 2004; SCANDALIOS, 2005), estas, por sua vez têm a função de sinalizadoras nas células vegetais, e requerem no mínimo dois mecanismos diferentes para regular as concentrações intracelulares desta espécie reativa. Um mecanismo permite a fina modulação de baixos níveis de EROs com o propósito de sinalização e o outro mecanismo permite a remoção do excesso de EROs, especialmente durante o estresse. Os processos oxidativos normais da célula são responsáveis pela geração destas espécies reativas. Durante o transporte de

elétrons nos cloroplasto e mitocôndrias, muitos desses elétrons são perdidos, e então captados pelo  $O_2$  formando as EROs (DELHAIZE et al., 2009).

Como o acúmulo das EROs pode resultar em prejuízos consideráveis, a célula dispõe de vários mecanismos para detoxificar eficientemente essas EROs. Esses mecanismos de proteção foram desenvolvidos pelas plantas durante o processo de evolução, para controlar os níveis dessas moléculas e anular essa toxicidade. Moléculas antioxidantes, enzimas simples e um sistema mais complexo de detoxificação podem estar envolvidos na proteção celular contra as EROs. Conhecidas como “escavengers” ou sequestradoras, várias enzimas reguladoras, como a SOD, impedem a ação tóxica das EROs à célula vegetal (BOWLER, 1993; MITTLER, 2002).

A SOD participa ativamente na remoção do  $O_2$  gerado através de diferentes processos do metabolismo celular, tais como o transporte de elétrons na mitocôndria e cloroplasto (MITTLER, 2002). O Zn se encontra associado com o cobre (Cu) na SOD dependente de Cu e Zn (Cu/Zn SOD). A Cu/Zn SOD está localizada nos cloroplastos, citosol e possivelmente no espaço extracelular. Muito provavelmente o átomo de Cu é o componente catalítico e o Zn é o componente estrutural da Cu/Zn SOD. Contudo, na deficiência do Zn, a atividade da Cu/Zn SOD é drasticamente reduzida, mas pode ser restabelecida *in vitro* pelo suprimento de Zn. Portanto, o átomo de Zn é um componente estrutural essencial para o funcionamento normal da Cu/Zn SOD. A redução na atividade da SOD ocorre com o aumento simultâneo do acúmulo de  $O_2$ . O radical superóxido é um dos principais oxidantes responsáveis pela peroxidação de lipídios e consequente aumento na permeabilidade das membranas (INZÉ; MONTAGU, 1995).

## 2.4 Prolina

Acúmulo de prolina é uma resposta fisiológica comum em muitas plantas, em resposta a uma vasta gama de estresses bióticos e abióticos, como o sal, seca, alta temperatura, baixa temperatura, metal pesado, patógeno, anaerobiose, a deficiência de nutrientes, poluição atmosférica e irradiação UV. (HARE; CRESS, 1997; SARADHI et al., 1995; SIRIPORNADULSIL et al., 2002).

Vários autores relataram acúmulo de prolina quando as plantas foram submetidas ao déficit hídrico (SHEVYAKOVA, 1984; HARE; CRESS, 1997; CARCELLER; PRYSTUPA; LEMCOFF, 1999; LAZCANO-FERRAT; LOVATT, 1999). O acúmulo de prolina não está associado somente às plantas que se desenvolvem sob condições de estresse hídrico, mas também pode ser verificado em plantas sob condições de elevada acidez do solo, assim, os mecanismos fisiológicos envolvidos nessa resposta devem ser similares (ZAIFNEJAD; CLARK; SULLIVAN, 1997).

Sob a influência do estresse, a síntese de proteínas é inibida e a degradação de proteínas é acelerada, o que leva a um acúmulo de aminoácidos e aminas livres. Uma característica marcante de um distúrbio no metabolismo das proteínas é a mudança nas proporções dos aminoácidos e, frequentemente, um aumento elevado na concentração de prolina (LARCHER, 2000). O acúmulo de prolina nas plantas sob estresse poderia ser decorrente da regulação osmótica e proteção da integridade celular (STEWART; LEE, 1974; SHEVYAKOVA, 1984), e ainda participar na constituição de um estoque de N e C que poderia ser utilizado depois do período de estresse (TAYLOR, 1996).

### 3 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar as mudanças na germinação, no desenvolvimento inicial das plântulas e em alguns parâmetros bioquímicos em cultivares de *Urochloa brizantha* disponíveis comercialmente (Basilisk, Marandú, MG4, MG5, BRS Piatã e Xaraés) submetidos a estresses causados pela toxidez de alumínio livre.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Os tratamentos foram resultantes da combinação de seis cultivares de *Urochloa brizantha* (Basilisk, Marandú, MG4, MG5, BRS Piatã e Xaraés), com cinco níveis de toxidez de alumínio (0; 1; 2; 4 e 8 mmol<sub>c</sub> dm<sup>3</sup> de Al<sup>3+</sup>) com quatro repetições. Foram solicitadas, pelo menos três lotes de sementes por cultivar, as empresas produtoras, as quais foram escarificadas com ácido sulfúrico concentrado por 10 minutos, e avaliadas pelos testes de germinação, pureza, determinação de umidade e teste de tetrazólio, seguindo as metodologias estabelecidas em Brasil, Ministério da Agricultura e Reforma Agrária (2009). Baseado no teste de germinação, os lotes dos cultivares escolhidos, mostraram porcentagem (%) e desvio padrão de germinação, respectivamente, de: Basilisk (83,25 e 1,87), Marandu (77 e 2,00), MG4 (87,5 e 3,75), MG5 (91,25 e 3,87), Piatã (65,75 e 6,94) e Xaraés (88 e 1,41) sendo utilizados para instalação dos ensaios 1 e 2.

### 4.1 Estresse Durante a Germinação (Ensaio 1)

As sementes dos lotes selecionados foram germinadas em condições de estresse simulado em laboratório utilizando-se soluções de tricloreto de alumínio (0; 0,3996; 0,7992; 1,5984 e 3,1968 AlCl<sub>3</sub>(g.L<sup>-1</sup>)), para obtenção dos 5 níveis de estresse de alumínio (0, 1, 2, 4 e 8 mmol<sub>c</sub> dm<sup>3</sup> de Al<sup>3+</sup>) de acordo com Custódio et al. (2002).

A germinação foi conduzida em caixas plásticas para germinação, sobre papel, com quatro repetições de 100 sementes por cultivar e nível de estresse, em germinador sob temperatura alternada de 15-35°C com emprego de luz por 8h na maior temperatura. O papel foi embebido com água (nível zero) ou com as soluções correspondentes aos diferentes níveis de estresse, na proporção equivalente a 2,5 vezes a sua massa. A avaliação foi conduzida após 14 dias computando-se a protrusão de raiz primária, plântulas normais, anormais e sementes não germinadas de acordo com Brasil, Ministério da Agricultura e Reforma Agrária (2009). Os resultados foram apresentados em porcentagem.

O desempenho das plântulas foi obtido por outro teste com 15 sementes por repetição e quatro repetições por cultivar e nível de estresse. As



sementes foram envolvidas entre três folhas de papel para germinação (Germitest®), duas como base e uma para cobrir, umedecidas com 2,5 vezes sua massa, com água (nível zero) ou com as soluções correspondentes aos diferentes níveis de estresse. As sementes foram posicionadas formando linha única a 10 cm da borda superior das folhas base. A avaliação foi conduzida 14 dias após a colocação dos rolos em germinador, que foram envolvidos em sacos de polietileno e mantidos sob temperatura alternada de 15-35°C com emprego de luz por 8h na maior temperatura. As medidas de comprimento foram tomadas utilizando régua graduada em mm medindo-se todas as plântulas individualmente enquanto que as medidas de massa foram realizadas juntando-se todas as partes de uma repetição que foram acondicionadas em embalagem de papel e secas em estufa com circulação de ar a 60°C e 48h. Ao término da secagem, os materiais foram resfriados em dessecador e pesados em balança analítica com precisão de 0,001 g (NAKAGAWA, 1999). Os resultados foram denominados comprimento de parte aérea e de raiz, e massa seca de parte aérea e raiz.

#### **4.2 Estresse em Plântula (Ensaio 2)**

As sementes dos lotes selecionados foram utilizadas para a aplicação do estresse em plântulas. Para isso um grande número de sementes de cada cultivar (aproximadamente 800) foi germinado em condições não estressantes. As sementes foram envolvidas entre três folhas de papel para germinação (Germitest®), duas como base e uma para cobrir, umedecidas com 2,5 vezes sua massa, com água, até o 7º dia a partir da semeadura, em germinador com temperatura alternada de 15-35°C e fotoperíodo de 8h na temperatura mais elevada. No 7º dia após a instalação da germinação em água, foram selecionadas plântulas de tamanho uniforme, para a aplicação dos tratamentos de estresse conforme Echer et al. (2010). As plântulas foram suficientes para compor quatro repetições de 15 plântulas por cultivar e nível de estresse. Quatro repetições de 15 plântulas foram utilizadas para a obtenção da massa seca inicial das partes, obtida pela secagem em estufa com circulação de ar 60°C por 48 horas.

O estresse nas plântulas selecionadas no 7º dia foi aplicado transferindo-as para rolos de papel confeccionados com três folhas de papel para

germinação (Germitest®), duas como base e uma para cobrir, umedecidas com 2,5 vezes a sua massa, com água (nível zero) ou com as soluções correspondentes aos diferentes níveis de estresse, marcando o comprimento de raiz e parte aérea inicial de cada plântula com o lápis cópia que deixa uma marca azul no papel umedecido. As folhas de papel foram enroladas e envolvidas em sacos de polietileno, os quais foram fechados e mantidos em germinador a 25°C constantes durante mais 7 dias. A avaliação foi realizada no sétimo dia, após a transferência para a condição de estresse, em quatro repetições de 15 plântulas, medindo-se o comprimento inicial (marcado com o lápis cópia) e final de raiz e parte aérea das plântulas e as massas secas conforme descrito para as avaliações do ensaio 1, calculando-se as taxas de crescimento relativo pela fórmula adaptada de Hunt (1982).

$$R = \frac{\ln W_2 - \ln W_1}{t_2 - t_1}$$

Onde; R = taxa de crescimento; ln = logaritmo neperiano;  $W_1$  = comprimento ou massa inicial;  $W_2$  = comprimento ou massa final;  $t_1$  = tempo inicial e  $t_2$  = tempo final. Os dados referentes à taxa de crescimento relativo foram expressos em  $\text{cm dia}^{-1}$  ou  $\text{g dia}^{-1}$ .

Durante o ensaio 2, aproximadamente 60 plântulas, por cultivar e nível de estresse, tratadas do mesmo modo como descrito no ensaio 2, foram utilizadas para análises bioquímicas: Índice de estabilidade de membrana celular (IEM), atividade de superóxido dismutase (SOD), determinação de prolina, determinação de antioxidantes totais (DAT) e determinação do conteúdo de malondialdeído (MDA).

#### **4.3 Avaliação do Índice de Estabilidade de Membrana Celular (IEM)**

O índice de estabilidade de membrana celular foi determinado indiretamente pela medida da condutividade elétrica, através de medições de dispersão de íons para verificar a morte celular, segundo Rizhsky et al. (2002). Para esta avaliação foram utilizados segmentos foliares das plântulas do ensaio 2. Três segmentos foliares de 1 cm de cada plântula, com 4 repetições por cultivar e nível de estresse, foram retirados no 13º dia após a instalação dos rolos no germinador (sexto dia após transferência para a condição de estresse), incubados por 1h em 5 ml de água destilada a temperatura ambiente. Após a incubação, a condutividade da

solução de banho foi medida por um condutímetro Hanna modelo HI2300; o valor obtido foi referido como valor **C1**. Os segmentos foliares retornaram então a essa solução de banho e foram incubados a 98°C por 25 min. Após resfriar a temperatura ambiente, a condutividade da solução de banho foi medida novamente, referida como valor **C2**. Para cada medição a dispersão de íons foi expressa como porcentagem de dispersão, segundo a fórmula:

$$IEM (\%) = (\text{valor } C1 / \text{valor } C2) * 100$$

#### **4.4 Superóxido Dismutase (SOD, EC.1.15.11)**

As plântulas inteiras do ensaio 2, com 14 dias após semeadura ou sete dias após aplicação do estresse, sendo 3 repetições de cada cultivar e nível de estresse, com aproximadamente 0,2g de massa fresca por repetição, foram trituradas em tampão fosfato 0,1M (pH 7,0) gelado, contendo 0,4g de polivinilpolipirrolidona, 2mM dithiothreitol, 0,1mM EDTA, centrifugando-se os extratos a 12000g por 20 minutos a 4°C. No extrato resultante foi quantificada proteína de acordo com Bradford (1976). O sobrenadante restante de cada amostra foi estocado a -80°C.

Do extrato obtido, 50 µL foram adicionados a tampão fosfato 0,1M (pH 7,8) contendo 1,3µM riboflavina, 13mM metionina e 63 µM Nitro blue tetrazolium (NBT). Os tubos foram incubados a 25°C por 15 min sob iluminação de lâmpadas fluorescentes, sendo medida a absorbância a 560nm. Tubos, contendo o mesmo meio e não submetidos à luz, foram utilizados como branco. Uma unidade de SOD foi definida como a atividade de enzima capaz de inibir a fotoredução do NBT a formazan azul em 50% e foi expressa em unidades de SOD (mg proteína)<sup>-1</sup>(LEI et al., 2005).

#### **4.5 Determinação de Prolina**

Para se determinar a quantidade de prolina utilizou-se o método descrito por Bates et al. (1973) modificado por Machado Neto et al. (2004), macerando-se 300 mg de material fresco das plântulas inteiras do ensaio 2 com 14

dias após semeadura ou sete dias após aplicação do estresse, sendo 3 repetições de cada cultivar e nível de estresse, foram maceradas em 5 ml de ácido sulfosalicílico a 3%. O extrato foi filtrado e 2 ml do material obtido, foi colocado em um tubo de ensaio com 2 ml de ácido acético glacial e 2ml de ninidrina ácida e mantidas em estufa à 100°C por uma hora, sendo resfriadas, em banho de gelo e em seguida fez se a leitura em espectrofotômetro a 520nm, em triplicatas. Os resultados foram plotados contra uma curva de prolina (0 a 80ug/ml).

#### **4.6 Determinação de Antioxidantes Totais (DAT)**

A determinação de antioxidantes totais foi realizada seguindo Re et al. (1999). Para a obtenção dos extratos, 100 mg de tecido foliar macerado, das plântulas do ensaio 2 com 14 dias após semeadura ou sete dias após aplicação do estresse, foram homogeneizados em 2 ml de metanol 50% (v/v). A solução foi mantida em temperatura ambiente por 1h e centrifugada. O sobrenadante transferido para um novo tubo e ao precipitado foram adicionados 2 ml de acetona 70% (v/v), incubando por mais 1h, seguido de centrifugação. O sobrenadante foi misturado à primeira solução e o volume completado para 5 ml de água destilada. O radical ABTS<sup>+</sup> foi preparado adicionando 88 µL de persulfato de potássio 140 mM em 5 ml de ABTS 7 mM. A solução foi mantida no escuro por 12-16 h para a completa oxidação de ABTS em ABTS<sup>+</sup>, sendo posteriormente diluída em etanol 100%, até atingir absorvância de 0,700 (± 0,020) em 734 nm. O ensaio foi realizado com a adição de 10 µl do extrato em 1 ml da solução de radical ABTS<sup>+</sup> diluída e após 30 min a 30°C a absorvância foi determinada em espectrofotômetro a 734 nm. Os resultados foram comparados com curva-padrão de solução de Trolox em etanol. As análises foram realizadas em triplicata e os valores expressos em milimol equivalentes de Trolox por grama de massa fresca (mM equivalentes trolox.gMF<sup>-1</sup>).

#### **4.7 Determinação do Conteúdo de Malondialdeído (MDA)**

A metodologia utilizada foi baseada em protocolo descrito por Heath e Packer (1968). Cerca de 100 mg de tecido foliar macerado, das plântulas do ensaio

2 com 14 dias após semeadura ou sete dias após aplicação do estresse, foi homogeneizado em 6,5 ml de etanol 80% (v/v) e em seguida a solução foi centrifugada. Desse extrato foi coletado 1 ml e transferido para tubo de microcentrífuga contendo 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,65% (p/v) em ácido tricloroacético (TCA) 20% (p/v). As amostras foram incubadas a 95°C durante 25 min, transferidas para o gelo e centrifugadas novamente para realizar leitura em espectrofotômetro.

Os equivalentes de MDA foram calculados através da seguinte expressão:

$$\text{Equivalentes MDA} = [(A_{532} - A_{600}) / 155000] \times 10^6$$

Onde  $A_{532}$  indica a absorvância máxima do complexo MDA-TBA a 532 nm,  $A_{600}$  é a absorvância a 600 nm, que corrige interferentes não-específicos e 155000 é o coeficiente de extinção molar para o MDA. O ensaio foi realizado em triplicata e os valores expressos em nanomol de MDA por grama de massa fresca ( $\text{nmol g MF}^{-1}$ ).

#### 4.8 Análise Estatística

O ensaio 1 foi conduzido e analisado em delineamento inteiramente casualizado e tratamentos arranjados em esquema fatorial de 6\*5 (cultivares x nível de estresse) com quatro repetições e as variáveis analisadas foram germinação por protrusão da raiz (GPR), germinação por plântulas normais (GPN), comprimento e massa seca de parte aérea (CPA e MSPA) e raiz (CR e MSR).

O ensaio 2 foi conduzido e analisado no mesmo esquema do ensaio 1 e foram avaliadas as taxas de crescimento relativo de comprimento de parte aérea (TCR – CPA) e raiz (TCR – CR), e taxas de crescimento relativo de massa seca de parte aérea (TCR – MSPA) e raiz (TCR – MSR), IEM, SOD, prolina, DAT e MDA.

Os dados percentuais foram transformados em arco seno  $(x.100)^{1/2}$  enquanto os demais não foram transformados. Quando indicado pela análise de variância, os cultivares foram comparados pelo teste Tukey com 5% de probabilidade enquanto que os tratamentos de estresse foram avaliados por

regressão polinomial optando-se pela equação significativa com 5% de probabilidade com menor grau do polinômio e maior coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

Os cálculos foram executados com auxílio do SISVAR (FERREIRA, 2008) para as análises de variância, comparações de média e regressões polinomiais e Excel Microsoft Office para Windows 7 e para as regressões lineares.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Estresse Durante a Germinação (Ensaio 1)

A análise de variância (Tabela 1) indicou que apenas a germinação, avaliada pela protrusão da raiz e porcentagem de plântulas normais, não apresentou significância para a interação cultivar x níveis de alumínio. Todas as outras avaliações foram influenciadas pela interação dos dois fatores de variação estudados.

**Tabela 1.** Valores de F obtidos na análise de variância para Germinação por protrusão de raiz (GPR), Germinação por plântulas normais (GPN), Comprimento de parte aérea (CPA), Comprimento de raiz (CR), Massa seca de parte aérea (MSPA) e Massa seca de raiz (MSR), durante a germinação de sementes de seis cultivares de *Urochloa brizantha* em função de diferentes níveis de alumínio.

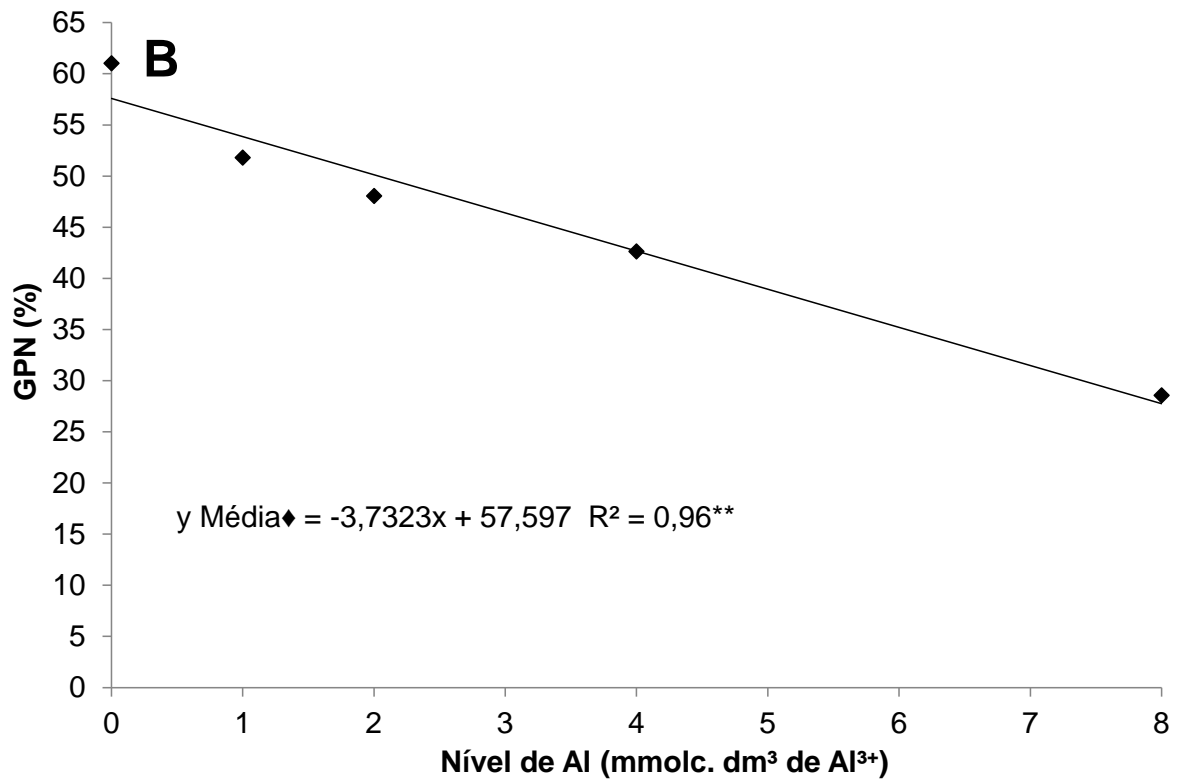
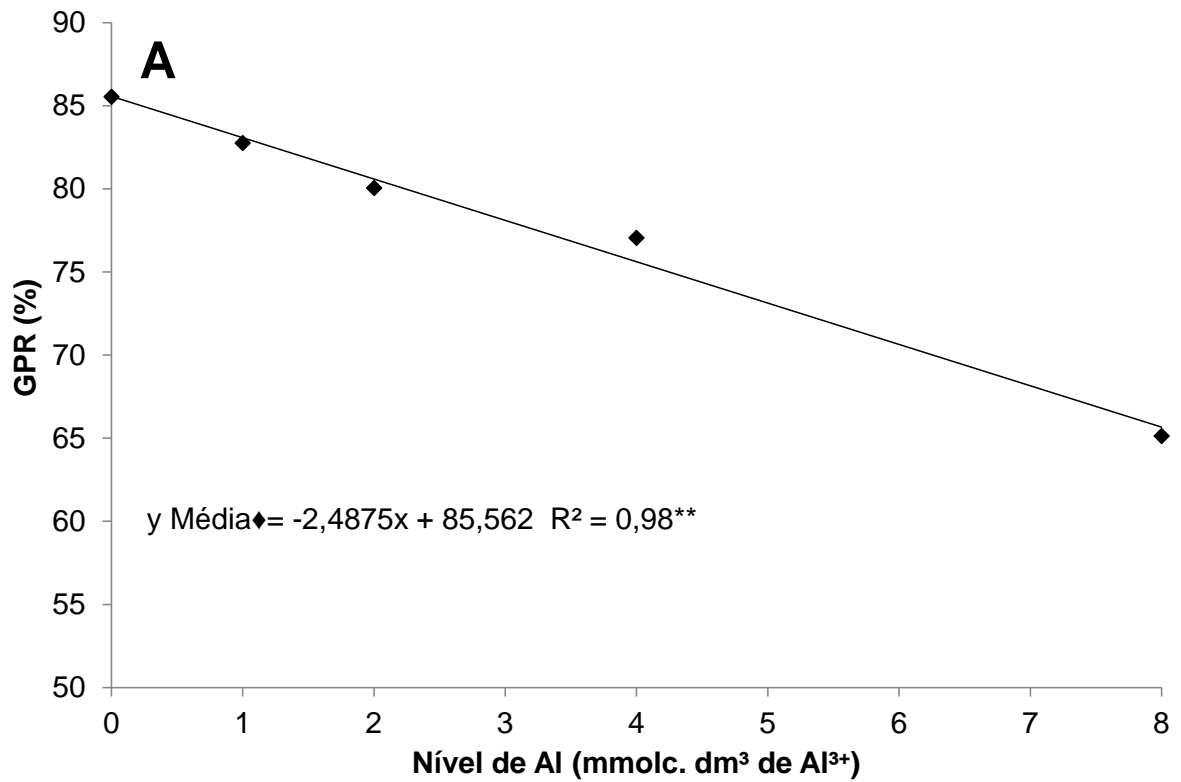
FV	GL	GPR	GPN	CPA	CR	MSPA	MSR
<b>Cultivar (A)</b>	5	7,38**	9,93**	14,42**	14,43**	13,68**	13,83**
<b>Tratamento (B)</b>	4	9,29**	13,69**	65,92**	301,32**	20,86**	155,20**
<b>A x B</b>	20	1,34 <sup>ns</sup>	1,59 <sup>ns</sup>	7,53**	12,14**	2,78**	7,27**
<b>Erro</b>	90						
<b>Média</b>		78,1	46,4	1,77	1,07	0,017	0,002
<b>CV%</b>		16,27	34,3	29,57	39,34	34,42	42,59

FV fontes de variação. GL graus de liberdade. Média de GPR, GPN em porcentagem; CPA e CR em cm; MSPA e MSR em gramas. CV% coeficiente de variação em porcentagem.

Na germinação por protrusão de raiz (Figura 1A), a média inicial (nível zero) foi de 85,5%, decrescendo 2,48% com o aumento dos níveis de alumínio. Este modo de avaliação considera todas as sementes que conseguem iniciar o desenvolvimento da raiz primária e foi menos sensível que o parâmetro seguinte.

A germinação, considerando apenas as plântulas normais (Figura 1B), decresceu 3,73% com o aumento dos níveis de alumínio, durante 14 dias, sendo que a média inicial foi de 57,5%.

**Figura 1.** Germinação por protrusão de raiz (GPR) (A) e Germinação (GPN) (B) de sementes de *Urochloa brizantha* em função de diferentes níveis de alumínio.





O cultivar MG5 se destacou dos outros cinco cultivares (Tabela 2), com maior porcentagem germinação por protrusão de raiz (89,9%) e de germinação por plântula normal (55,65%). Já o cultivar Basilisk, com 24,6% mostrou menor resposta aos níveis de alumínio na germinação por plântulas normais, e os cultivares Marandu (67,65%) Basilisk (72,6%) e Xaraés (76,6%) na germinação por protrusão de raiz. Ao contrario deste trabalho, resultados mostrados por Rao et al. (2006) indicaram que o cv. Basilisk possui elevada resistência ao  $Al^{3+}$  e que o nível de resistência deste cultivar é muito superior à de variedades de culturas tais como o milho, arroz de sequeiro ou trigo (Wenzl et al., 2001).

**Tabela 2.** Médias entre cultivares de Germinação por protrusão de raiz (GPR) e Germinação por plântulas normais (GPN) e de plântulas de *Urochloa brizantha* em função de diferentes níveis de alumínio.

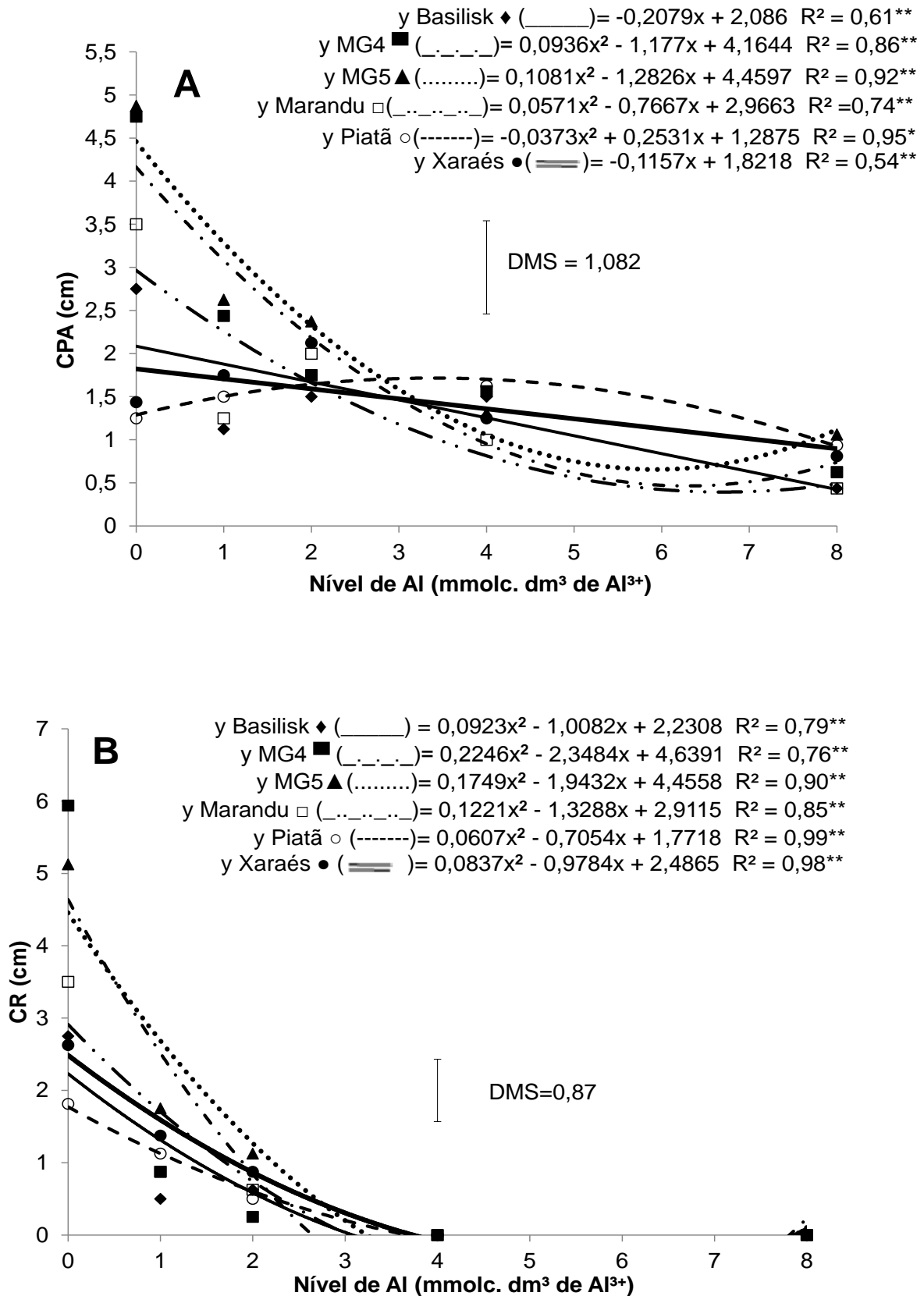
Cultivares	GPR (%)	GPN (%)
Basilisk	72,60 bc	24,60 b <sup>1</sup>
MG4	80,15 ab	51,15 a
MG5	89,90 a	55,65 a
Marandú	67,65 c	44,95 a
Piatã	81,70 ab	50,35 a
Xaraés	76,60 bc	71,70 a

<sup>1</sup>Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey com 5% de probabilidade.

Quanto ao comprimento de parte aérea (Figura 2A) do cultivar Basilisk, ocorreu um ajuste linear de 2,08cm inicialmente, no nível zero, com decréscimo de 0,2cm conforme aumento dos níveis de alumínio. Os cultivares MG4, MG5 e Marandu, apresentaram ajustes quadráticos com mínimos em 6,28; 5,93; 6,71  $mmolc\ dm^{-3}$  de  $Al^{3+}$ , respectivamente. O cultivar Piatã adequou se um ajuste quadrático, com máxima em 3,39  $mmolc\ dm^{-3}$  de  $Al^{3+}$ . Já o cultivar Xaraés, apresentou um ajuste linear com 1,8 cm, no nível zero, com decréscimo de 0,11cm com o aumento das doses de alumínio. Pelo DMS obtido no teste de comparação de médias, no nível zero e 1  $mmolc\ dm^{-3}$  de  $Al^{3+}$ , MG4 e MG5 mostraram superioridade, enquanto que, não ocorreram diferenças entre os cultivares nos níveis 2, 4 e 8  $mmolc\ dm^{-3}$  de  $Al^{3+}$ .

No comprimento de raiz (Figura 2B), o efeito do nível de Al para os seis cultivares foram altamente significativos, no qual o Basilisk, MG4, MG5, Marandu, Piatã e Xaraés, apresentaram ajustes quadráticos com mínimas em 5,49; 5,22; 5,55; 5,44; 5,81 e 5,84 mmolc dm<sup>-3</sup> de Al<sup>3+</sup> respectivamente. De acordo com Haussler et al. (2006), sementes de *B. ruziziensis* e *B. dictyoneura* cultivadas em solos com alta saturação de alumínio (76 a 87%) são capazes de desenvolverem o sistema radicular sem apresentarem sintomas de toxicidade a esse elemento. Por outro lado, Almeida, Monteiro e Jank (2000), diz que a presença de alumínio influiu, de forma distinta, no crescimento radicular dos 30 genótipos de *Panicum maximum* estudados por ele, e que para a maioria dos genótipos, o comprimento das raízes foi grandemente inibido pela presença do alumínio, havendo comportamento diferenciado entre eles. Pelo DMS obtido no teste de comparação de médias, os cultivares MG4 e MG5 apresentaram os maiores comprimentos de raízes na ausência de Al. No nível 1 mmolc dm<sup>-3</sup> de Al<sup>3+</sup> os cultivares MG5 e Xaraés conseguem apresentar comprimento de raiz maior que o cultivar que menos desenvolveu raiz, que foi o Basilisk. Neste ensaio também foi observado que o comprimento radicular é inibido mais fortemente que o comprimento de parte aérea na presença de Al<sup>3+</sup>.

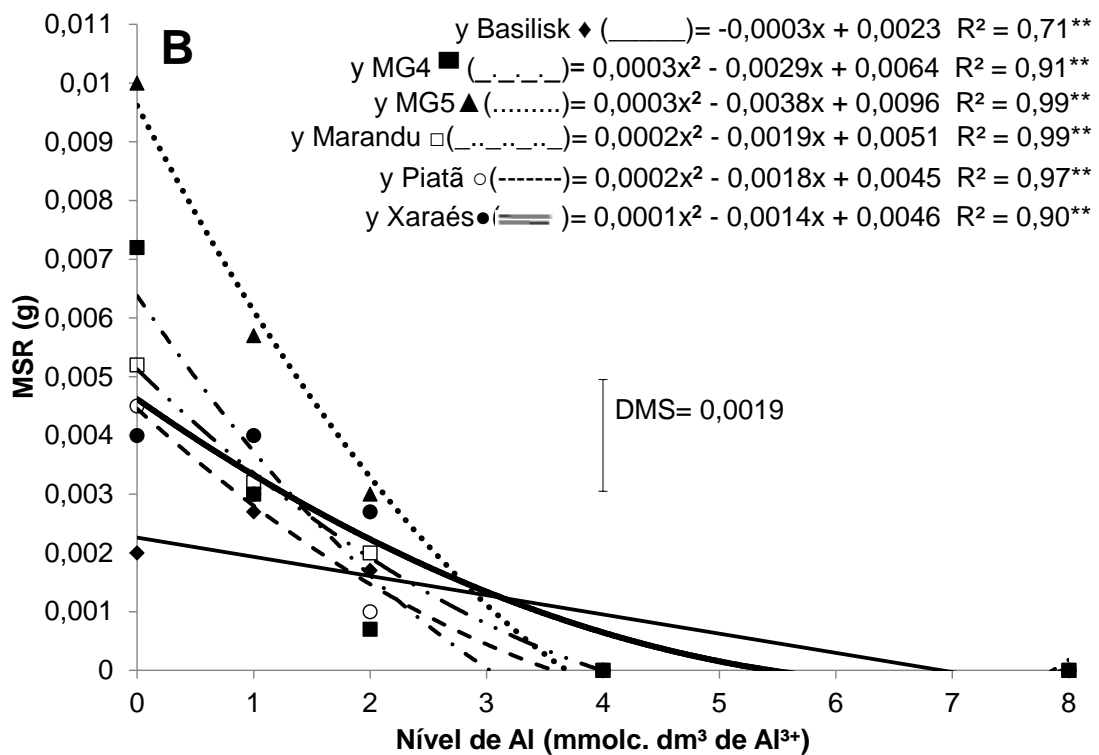
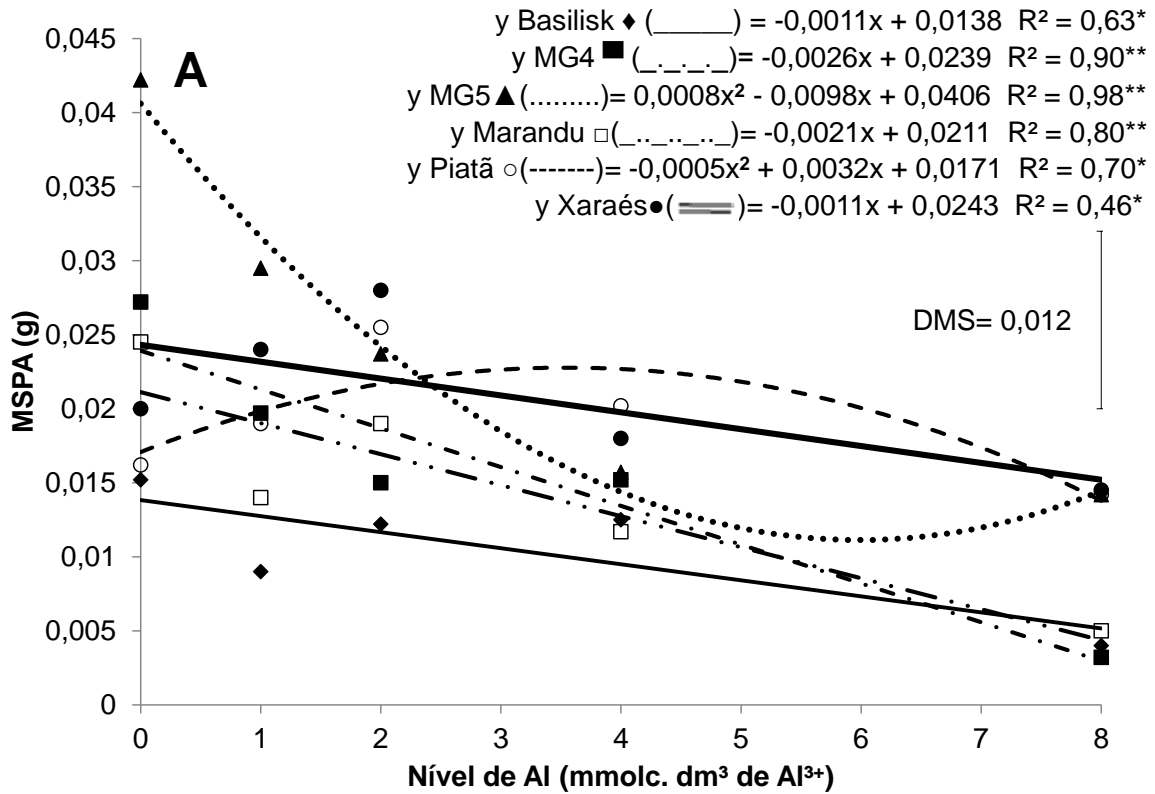
**Figura 2.** Comprimento de parte aérea (CPA) (A) e Comprimento de raiz (CR) (B) de plântulas de *Urochloa brizantha* em função de diferentes níveis de alumínio. DMS (diferença mínima significativa) obtida no teste Tukey (5% de probabilidade).



Para massa seca de parte aérea (Figura 3A), os cultivares Basilisk, MG4, Marandu e Xaraés apresentaram uma média inicial, no potencial zero, de 0,0138; 0,0239; 0,0211 e 0,0243g respectivamente, diminuindo 0,0011; 0,0026; 0,0021 e 0,0011g a cada aumento do nível de alumínio. Já o cultivar MG5, mostrou um ajuste quadrático com mínima em 6,12 mmolc dm<sup>-3</sup> de Al<sup>3+</sup>, e o cultivar Piatã, ajuste quadrático com máxima em 3,2 mmolc dm<sup>-3</sup> de Al<sup>3+</sup>. Considerando o DMS obtido de 0,012, o cultivar MG5 apresentou a maior massa de parte aérea sem presença de Al. O mesmo aconteceu no nível de 1 mmolc dm<sup>-3</sup> de Al<sup>3+</sup>. Nos níveis com maior concentração de Al não ocorreram diferenças entre os cultivares.

Quanto à massa seca de raiz (Figura 3B), o cultivar Basilisk mostrou média inicial de 0,0023g, diminuindo 0,0003g a cada aumento do nível de alumínio. Os outros cinco cultivares, MG4, MG5, Marandu, Piatã e Xaraés, com ajustes quadráticos, apresentaram mínimas em 4,83; 6,33; 4,75; 4,5 e 7,2 mmolc dm<sup>-3</sup> de Al<sup>3+</sup>. No experimento efetuado por Martins et al. (2011), o aumento gradativo das concentrações de alumínio na solução afetou a produção de matéria seca da parte aérea de *B. ruziziensis*, mas não das raízes. Nolla, Schindwein e Anghinoni (2007), em soja, verificaram decréscimos tanto para matéria seca da parte aérea quanto para as raízes quando aumentadas às doses de alumínio. Neste ensaio, no entanto, as massas de raízes foram mais afetadas que as de partes aéreas. Com 4 mmolc dm<sup>-3</sup> de Al<sup>3+</sup> por exemplo, os cultivares reduziram a zero a massa de raiz enquanto ainda foram observadas massas de partes aéreas (Figuras 3A e 3B). O DMS obtido para massa seca de raiz foi 0,0019 (Figura 3B), então os cultivares MG4 e MG5 apresentaram as maiores massas diferindo dos cultivares Xaraés e Basilisk na condição sem Al<sup>3+</sup>. No primeiro nível de Al<sup>3+</sup>, apenas o cultivar MG5 manteve a superioridade. Nos demais níveis não houve diferença entre os cultivares.

**Figura 3.** Massa seca de parte aérea (MSPA) (A) e Massa seca de raiz (MSR) (B) de plântulas de *Urochloa brizantha*. DMS (diferença mínima significativa) obtida no teste Tukey (5% de probabilidade).



## 5.2 Estresse em Plântula (Ensaio 2)

Os valores de F obtidos na análise de variância de todos os parâmetros estudados no ensaio 2 encontram-se na Tabela 3. Como no ensaio 2 as plântulas foram uniformizadas antes do início dos tratamentos e durante o período de estresse (7 dias) elas só puderam contar com as reservas da semente, não houve alteração de massa total significativa. Então, as alterações significativas de massa observadas nas taxas de crescimento relativo de massa seca de parte aérea e raiz foram, na maioria das vezes, uma em detrimento da outra.

Os parâmetros bioquímicos estudados foram, em maior número, significativos apenas em relação aos cultivares (Prolina, SOD e DAT). O IEM apresentou respostas em relação aos cultivares e doses de  $Al^{3+}$ , no entanto não houve significância da interação. Para MDA houve significância para o estudo de cultivares, para as doses de  $Al^{3+}$  e para a interação dos fatores.

**Tabela 3.** Valores de F obtidos na análise de variância para Taxa de crescimento relativo de comprimento de parte aérea (TCR-CPA), Taxa de crescimento relativo de comprimento de raiz (TCR-CR), Taxa de crescimento relativo de massa seca de parte aérea (TCR-MSPA), Taxa de crescimento relativo de massa seca de raiz (TCR\_MSR), Índice de estabilidade de membrana (IEM), Prolina, Atividade de enzima Superóxido Dismutase (SOD), Determinação de antioxidantes totais (DAT) e Determinação do conteúdo de malondialdeído (MDA) de plântulas de seis cultivares de *Urochloa brizantha* em função de diferentes níveis de alumínio.

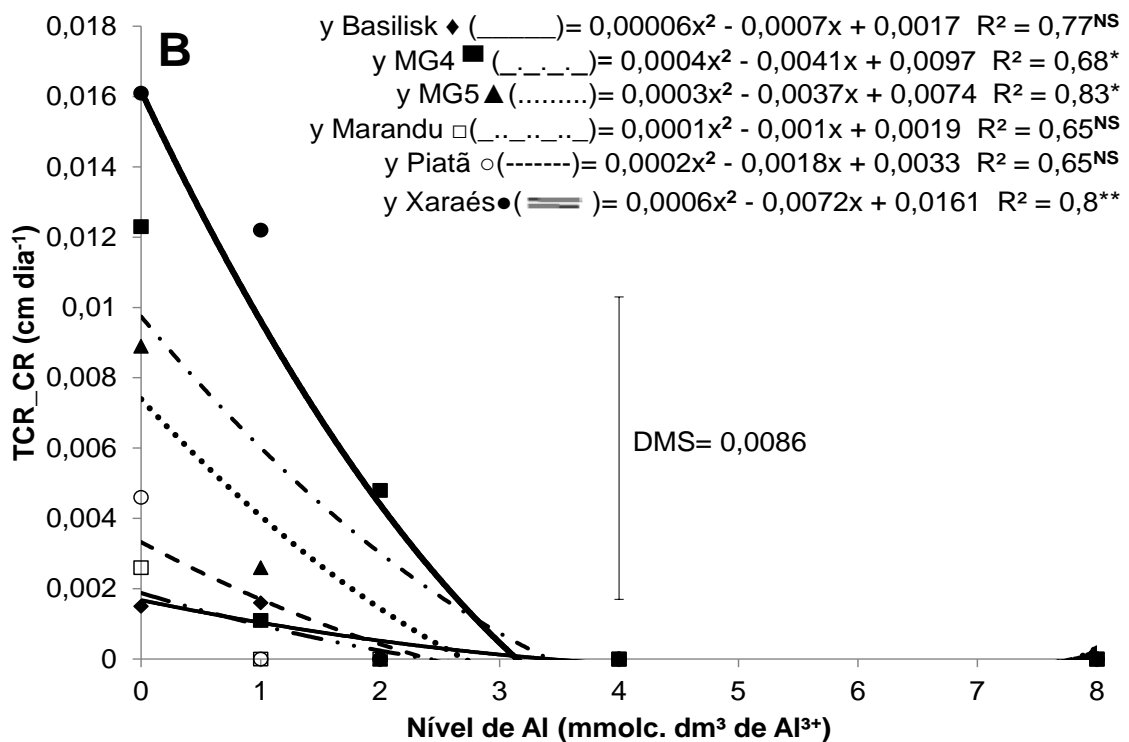
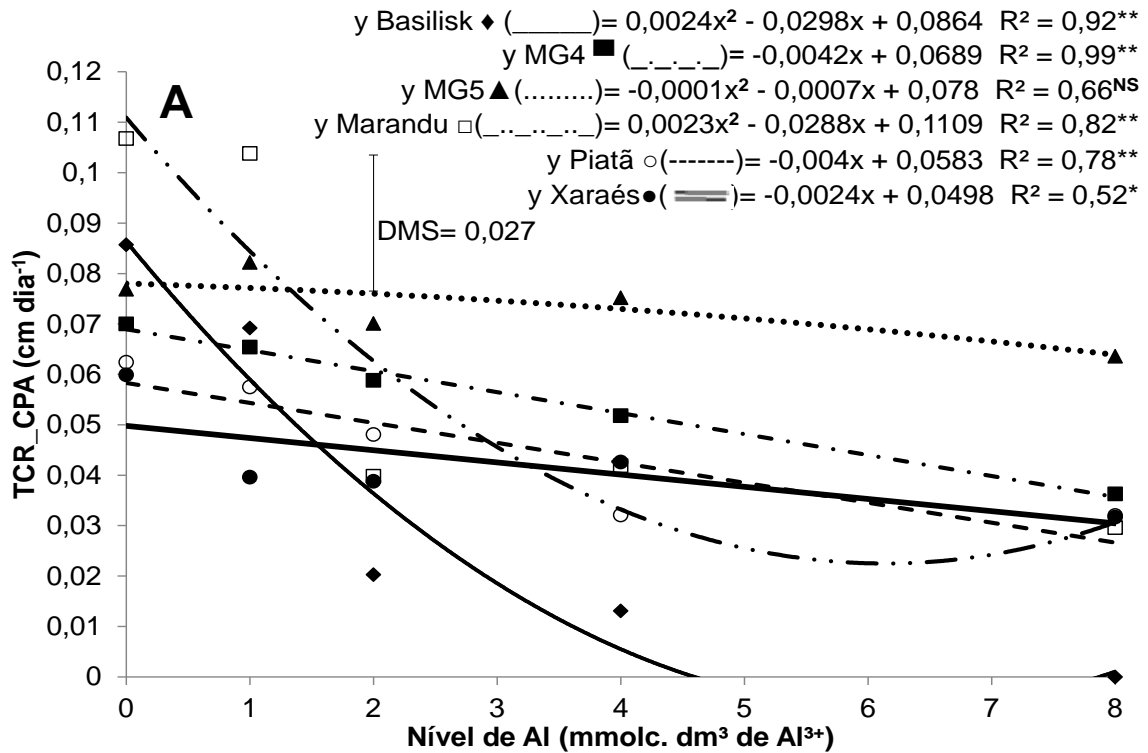
FV	GL	TCR-CPA	TCR-CR	TCR-MSPA	TCR-MSR	IEM	PROLINA	SOD	DAT	MDA
<b>Cultivar (A)</b>	5	21,00**	4,83**	7,28**	64,35**	68,64**	16,28**	12,75**	28,72**	22,60**
<b>Tratamento (B)</b>	4	47,79**	14,50**	3,24**	8,28**	5,17**	5,30 <sup>ns</sup>	1,60 <sup>ns</sup>	1,44 <sup>ns</sup>	5,77**
<b>A x B</b>	20	5,31**	2,18**	2,59**	8,70**	1,19 <sup>ns</sup>	2,17 <sup>ns</sup>	1,15 <sup>ns</sup>	1,63 <sup>ns</sup>	4,76**
<b>Erro</b>	90									
<b>Média</b>		0,053	0,002	0,01	0,019	24,32	5,76	0,001	5,75	0,56
<b>CV%</b>		24,8	182,9	69,31	51,01	45,91	87,42	68,11	56,94	53,08

FV fontes de variação. GL graus de liberdade. Média de TCR\_CPA e TCR\_CR em  $cm\ dia^{-1}$ ; TCR\_MSPA e TCR\_MSR em  $g\ dia^{-1}$ . Média de IEM em porcentagem; Prolina em  $ug\ g^{-1}$ , SOD  $mg\ proteína^{-1}$ , DAT  $mM\ equivalentes\ trolox.gMF^{-1}$  e MDA em  $nmol\ g\ MF^{-1}$ . CV% coeficiente de variação em porcentagem.

Para TCR\_CPA (Figura 4A), os cultivares Basilisk e Marandu apresentaram um ajuste quadrático com mínimas em 6,2 e 6,26 mmolc dm<sup>-3</sup> de Al<sup>3+</sup>, respectivamente. Os cultivares MG4, Piatã e Xaraés mostraram um ajuste linear com médias no potencial zero de 0,0689; 0,0583 e 0,0498 cm dia<sup>-1</sup>, e foram diminuindo respectivamente, 0,0042; 0,004 e 0,0024 cm dia<sup>-1</sup>, a cada aumento do nível de alumínio. O cultivar MG5 não exibiu variação desse parâmetro em função do aumento nos níveis de Al<sup>3+</sup> (valor de F do desdobramento não significativo), indicando que não sofreu redução de crescimento da parte aérea durante o período de duração do estresse e dos níveis de Al<sup>3+</sup> utilizados. De acordo com o DMS de 0,027 calculado pelo teste Tukey (5% de probabilidade), sem Al e no nível 1 mmolc dm<sup>-3</sup> de Al<sup>3+</sup>, o Marandú difere do cultivar que menos cresce parte aérea (Xaraés). No nível 4 mmolc dm<sup>-3</sup> de Al<sup>3+</sup>, no entanto, os cultivares MG5 e MG4 diferem do cultivar que menos cresce parte aérea (Basilisk). No nível 8 mmolc dm<sup>-3</sup> de Al<sup>3+</sup>, apenas o cultivar MG5 difere do Basilisk como, respectivamente, de maior e menor crescimento de parte aérea.

Quanto a TCR\_CR (Figura 4B), apenas os cultivares MG4, MG5 e Xaraés foram significativos, mostrando os três respectivamente, ajuste quadrático com mínimas em 5,12; 6,16 e 6 mmolc dm<sup>-3</sup> de Al<sup>3+</sup>. Os cultivares Basilisk, Marandú e Piatã não exibiram variação de taxa de crescimento de comprimento de raiz em função do aumento das doses de Al (valores de F do desdobramento não significativo). Neste caso, de acordo com o DMS de 0,0086 calculado pelo teste Tukey (5% de probabilidade), na ausência de Al o cultivar Xaraés foi o que mais alongou raiz em oposição ou cultivar Basilisk, que foi o que menos apresentou taxa de crescimento de raiz. No nível 1 mmolc dm<sup>-3</sup> de Al<sup>3+</sup>, apenas o cultivar Xaraés manteve crescimento de raiz, diferindo dos demais.

**Figura 4.** Taxa de crescimento relativo de comprimento de parte aérea (TCR\_CPA) (A) e taxa de crescimento relativo de comprimento de raiz (TCR\_CR) (B) de plântulas de *Urochloa brizantha* em função de diferentes níveis de alumínio. DMS (diferença mínima significativa) obtida no teste Tukey (5% de probabilidade).

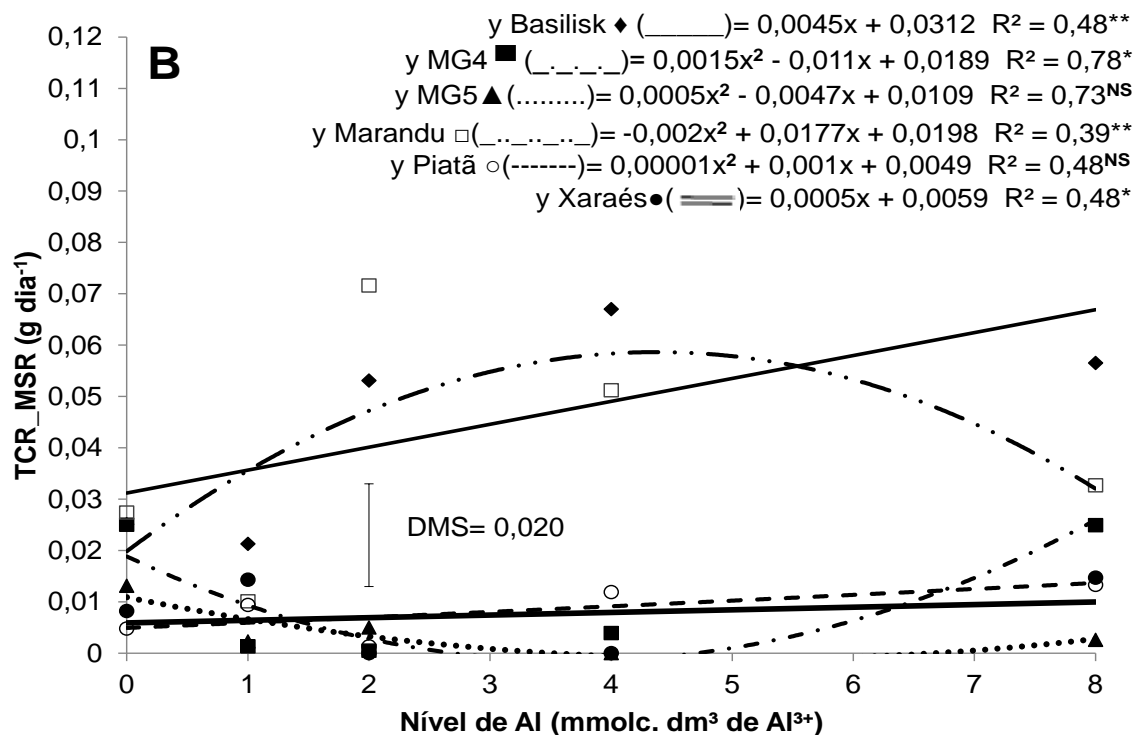
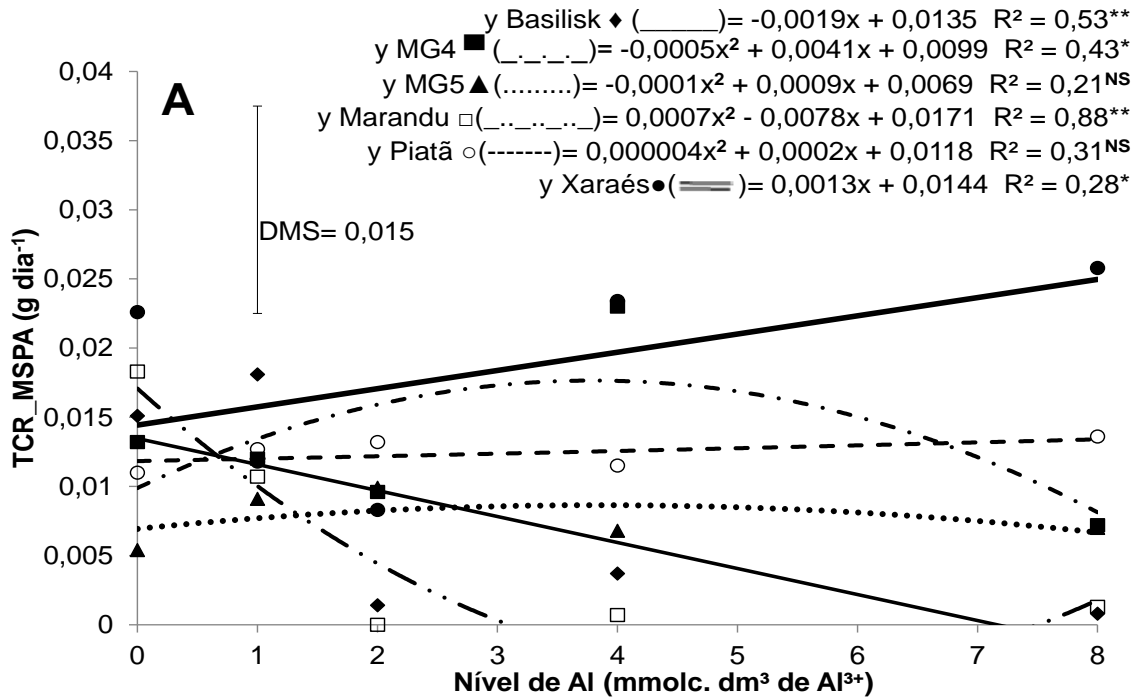




Para TCR\_MSPA (Figura 5A), os cultivares Basilisk e Xaraés, apresentaram um ajuste linear com médias iniciais de 0,0135 e 0,0144 g dia<sup>-1</sup>, decrescendo respectivamente, 0,0019 e 0,0013 g dia<sup>-1</sup> a cada aumento do nível de alumínio. Os cultivares MG4 e Marandu, apresentaram ajuste quadrático com máxima de 4,1 mmolc dm<sup>-3</sup> de Al<sup>3+</sup> e mínima de 5,5 mmolc. dm<sup>3</sup> de Al<sup>3+</sup>, respectivamente. Os cultivares MG5 e Piatã não apresentaram resposta ao aumento da concentração de Al no substrato (valor de F do desdobramento não significativo) para essa avaliação). De acordo com o DMS de 0,015 calculado pelo teste Tukey (5% de probabilidade), na dose zero, o cultivar Xaraés translocou mais massa das reservas alimentares da semente para a parte aérea diferindo do cultivar MG5 que menos translocou massa para a parte aérea, nos níveis 1 e 2 mmolc dm<sup>-3</sup> de Al<sup>3+</sup> não houve diferença entre os cultivares. Na dose 4 mmolc dm<sup>-3</sup> de Al<sup>3+</sup>, os cultivares Xaraés e MG4 diferem dos cultivares Basilisk e Marandú como os que apresentaram maior e menor taxa de translocação de massa para crescimento de parte aérea na presença de Al<sup>3+</sup>.

Na TCR\_MSR (Figura 5B), os cultivares Basilisk e Xaraés, apresentaram um ajuste linear com médias iniciais de 0,0312 e 0,0059 g dia<sup>-1</sup>, decrescendo respectivamente, 0,0045 e 0,0005 g dia<sup>-1</sup> a cada aumento do nível de alumínio. Já os cultivares MG4 e Marandu, mostraram um ajuste quadrático com mínima em 3,6 mmolc. dm<sup>3</sup> de Al<sup>3+</sup> e máxima em 4,4 mmolc dm<sup>-3</sup> de Al<sup>3+</sup>, respectivamente. Os cultivares MG5 e Piatã não foram influenciados pelos níveis de Al<sup>3+</sup> estudados (valores de F do desdobramento não significativos). O DMS de 0,020 calculado pelo teste Tukey (5% de probabilidade) sugere que os cultivares não diferiram quanto à translocação de reservas dos tecidos da semente para o crescimento da raiz (aumento de massa) na ausência e na menor concentração de Al. No nível 4 mmolc dm<sup>-3</sup> de Al<sup>3+</sup>, os cultivares Basilisk e Marandú conseguem translocar mais massa para as raízes do que os demais cultivares estudados. Porém, notou-se uma relação inversa entre a translocação de massa para a raiz e para a parte aérea e diferentes estratégias dos cultivares. Enquanto Basilisk e Marandú, na presença de alumínio, translocaram reservas principalmente para o crescimento de raiz comprometendo o crescimento de parte aérea, o que pode ser interpretado como uma reação de tolerância, os cultivares Xaraés e MG5 responderam de modo contrário (Figura 5A).

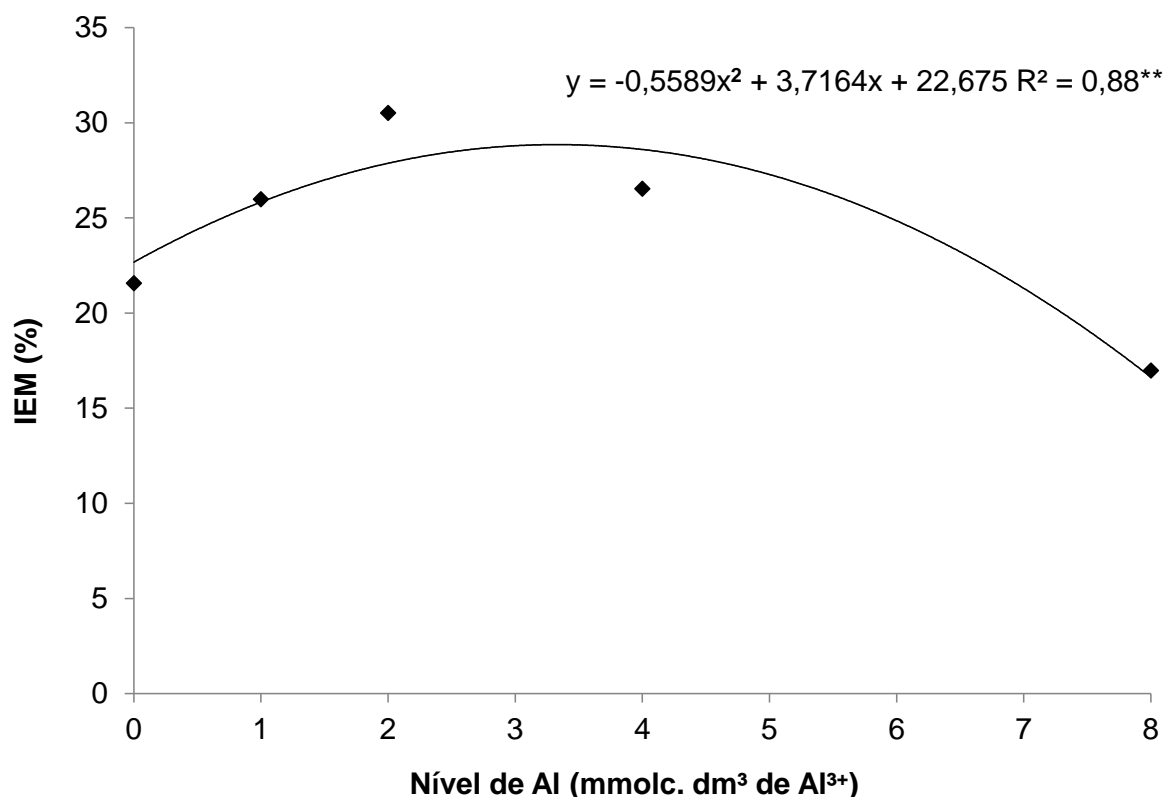
**Figura 5.** Taxa de crescimento relativo de massa seca de parte aérea (TCR\_MSPA) (A) e Taxa de crescimento relativo de massa seca de raiz (TCR\_MSR) (B) de plântulas de *Urochloa brizantha* em função de diferentes níveis de alumínio. DMS (diferença mínima significativa) obtida no teste Tukey (5% de probabilidade).



Para o índice de estabilidade de membrana (IEM) (Figura 6), os resultados ajustaram-se a um modelo quadrático com máxima em  $3,32 \text{ mmolc dm}^{-3}$  de  $\text{Al}^{3+}$ , quanto ao estudo de doses, porém não houve interação entre os fatores estudados (Tabela 3). O cultivar Basilisk, com o maior índice entre todos os cultivares, conseqüentemente, estruturas mais conservadas, corrobora resultados obtidos por Bitencourt et al. (2011), onde sugeriu-se a utilização do cultivar Basilisk como o mais tolerante ao alumínio e sendo também uma excelente opção para mapeamento, entre os genótipos testados em seu experimento. Verificou-se que Basilisk apresentou maior IEM (Tabela 4) e um dos menores de MDA (Figura 7) (quanto maior MDA, maior peroxidação de lipídeos) o que indica coerência, pois com menor peroxidação de lipídeos as membranas permanecem mais íntegras e, portanto, mais aptas para impedir a lixiviação de eletrólitos, o que realmente aconteceu.

Na determinação do teor de prolina não ocorreu significância dos tratamentos de níveis de  $\text{Al}^{3+}$  e na interação entre os cultivares e tratamentos. De acordo com a Tabela 4, o cultivar que melhor respondeu a análise de prolina foi o cultivar Xaraés, com  $15,327 \text{ ug g}^{-1}$ , superior a todos os outros cultivares. O cultivar Marandu, com  $0,498 \text{ ug g}^{-1}$ , apresentou menor média de teor de prolina, porém não diferiu de Basilisk, MG4 e MG5. Autores como Hare e Cress (1997) relataram acúmulo de prolina quando as plantas de trigo foram submetidas ao déficit hídrico, o acúmulo de prolina nas plantas sob estresse poderia ser decorrente da regulação osmótica e proteção da integridade celular (STEWART; LEE, 1974; SHEVYAKOVA, 1984). Mas neste trabalho, pela análise estatística, não houve alteração no conteúdo de prolina com o aumento da concentração de alumínio e os cultivares diferiram quanto ao teor de prolina, independentemente do alumínio, como uma característica constitutiva.

**Figura 6.** Índice de estabilidade de membrana celular (IEM) de plântulas de *Urochloa brizantha* em função de diferentes níveis de alumínio.



Para a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD - Tabela 4), o cultivar Xaraés foi o que apresentou maior atividade da enzima com  $0,00215 \text{ mg proteína}^{-1}$ . O cultivar Marandu, com  $0,00043 \text{ mg proteína}^{-1}$ , mostrou a menor média em resposta a análise, porém não diferiu dos cultivares Basilisk, MG4 e Piatã. Não ocorreu atividade significativa em relação aos diferentes níveis de alumínio, ao contrário de Hossain (2011), onde, em sementes de trigo, o estresse de alumínio aumentou significativamente a atividade da SOD em comparação com os controles.

A análise de atividade de SOD indicou o cultivar Xaraés com a maior atividade dessa enzima enquanto também foi observado maior conteúdo de prolina, embora não tenha havido significância, na análise de variância, para a determinação de SOD em relação aos níveis crescentes de Al. A maior atividade de SOD e o maior conteúdo de prolina desse cultivar pode, talvez, explicar uma menor tolerância ao aumento das concentrações de Al no substrato. Como, nessa fase, a plântula usa as reservas da semente, na impossibilidade de desenvolver raiz na presença de

alumínio, ocorre o desenvolvimento da parte aérea e a ativação das reações de defesa.

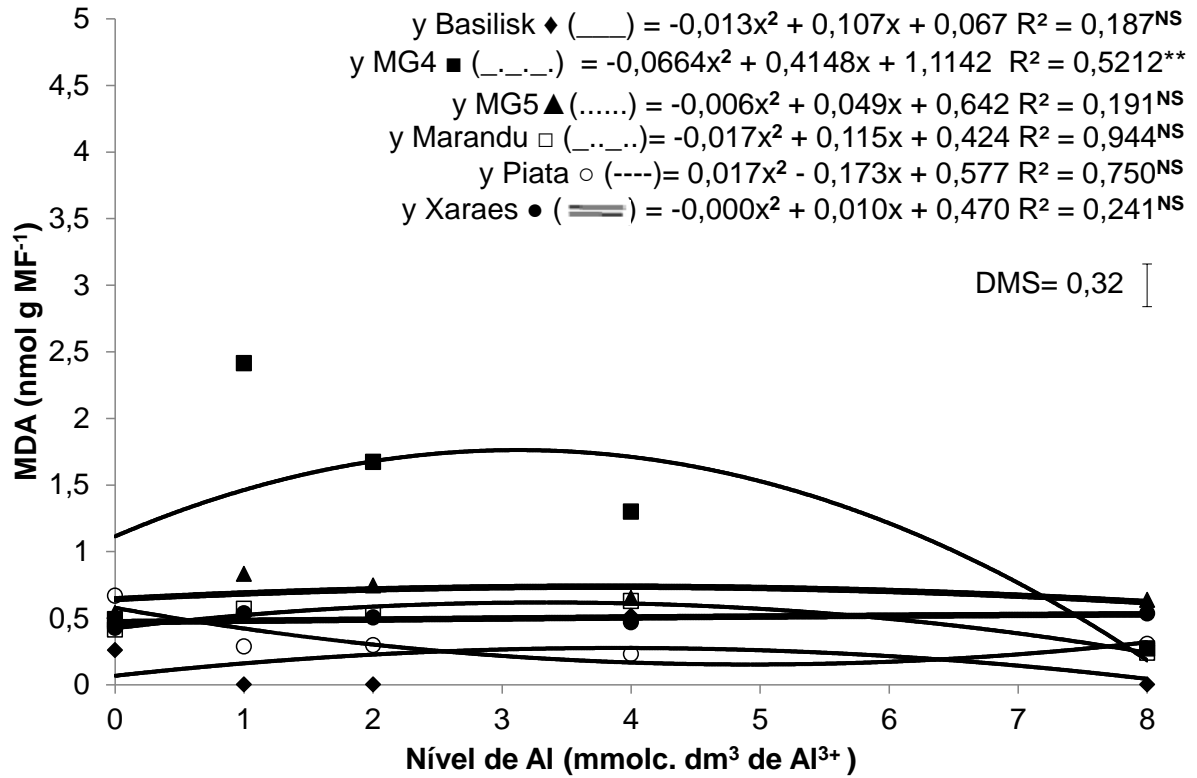
**Tabela 4.** Índice de estabilidade de membrana celular (IEM), Determinação do teor de prolina (Prolina), Atividade de enzima Superóxido Dismutase (SOD) e Determinação de antioxidantes totais (DAT) de plântulas de *Urochloa brizantha* em função de diferentes níveis de alumínio.

Cultivares	IEM (%)**	PROLINA (ug g <sup>-1</sup> )**	SOD (mg proteína <sup>-1</sup> )**	DAT (mM equivalentes trolox.gMF <sup>-1</sup> )**
Basilisk	65,87 a	2,00 bc	0,00107 bc	5,430 b
MG4	17,75 b	4,03 bc	0,00064 bc	11,733 a
MG5	11,85 b	5,71 bc	0,00127 b	10,684 a
Marandú	20,65 b	0,49 c	0,00043 c	2,484 bc
Piatã	18,33 b	7,00 b	0,00054 bc	0,500 c
Xaraés	11,46 b	15,32 a	0,00215 a	3,685 bc

<sup>1</sup>Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey com 5% de probabilidade.

O MG4 foi superior em produção de MDA (Figura 7) com o aumento da concentração de Al. Os cultivares não diferiram na situação sem estresse. Os demais cultivares não responderam a essa determinação (não ocorreram ajustes de modelos matemáticos significativos). O MDA é um intermediário que indica alta peroxidação de lipídeos e comprometimento da membrana celular das plântulas. Este resultado pode ser justificado em função da grande sensibilidade do MG4 ao alumínio, pois houve transferência de massa seca para a parte aérea em detrimento da raiz que ficou inibida devido ao alumínio presente no substrato (Figura 5A) até 4,1 mmolc dm<sup>-3</sup> de Al<sup>3+</sup>.

**Figura 7.** Determinação do conteúdo de malondialdeído (MDA) de massa fresca de plântulas de *Urochloa brizantha* em função de diferentes níveis de alumínio. DMS (diferença mínima significativa) obtida no teste Tukey (5% de probabilidade).



## 6 CONCLUSÃO

Na fase de desenvolvimento estudada, até 14 dias após semeadura, o cultivar mais tolerante ao alumínio consegue manter crescimento de raiz na condição de estresse, enquanto o mais suscetível reduz o crescimento radicular e desenvolve proporcionalmente mais parte aérea, uma vez que o crescimento ocorre com base na mobilização de reservas dos tecidos da semente.

A metodologia utilizada no ensaio 1 indicou que a qualidade inicial de semente interfere na avaliação e que os níveis crescentes de  $Al^{3+}$  são danosos a germinação. O cultivar MG5 apresenta plântulas com maior comprimento e massa na condição sem estresse e a partir da dose  $1 \text{ mmolc. dm}^{-3}$  de  $Al^{3+}$  apresenta maior declínio nas determinações, indicando baixa tolerância ao estresse. O cultivar Basilisk não é o mais tolerante em função da germinação, mas seu desenvolvimento, principalmente de raiz, é menos afetado com o aumento das doses de  $Al^{3+}$ .

A metodologia utilizada no ensaio 2, por não envolver a germinação e portanto não sofrer interferência desse evento, conseguiu evidenciar mais claramente as diferenças entre os cultivares. Os cultivares, Xaraés (taxa de crescimento relativo de massa seca de parte aérea), MG5 e MG4 (taxa de crescimento relativo de comprimento de parte aérea), se destacam apenas na situação sem estresse, com maiores desenvolvimentos no controle (0) até o nível  $1 \text{ mmolc. dm}^{-3}$  de  $Al^{3+}$ . O cultivar Basilisk é o mais tolerante conseguindo acumular massa seca na raiz mesmo nas doses de  $Al^{3+}$  mais elevadas, enquanto o cultivar Marandu consegue fazer o mesmo até o nível  $4 \text{ mmolc. dm}^{-3}$  de  $Al^{3+}$ . Diante das determinações bioquímicas, Prolina, SOD e DAT não são indicadoras da toxidez de  $Al^{3+}$ , porém, IEM e MDA foram mais promissoras.

## REFERÊNCIAS

- ALCÂNTARA, P.B.; PEDRO JR., M.J.; DONZELLI, P.L. Zoneamento edafoclimático de plantas forrageiras. In: SIMPÓSIO SOBRE ECOSISTEMAS DE PASTAGENS, 2. **Anais...** Jaboticabal: FUNEP, 1993. p.1-16.
- ALMEIDA, A.A.S.; MONTEIRO, F.A.; JANK, L. Avaliação de *Panicum maximum* Jacq. para tolerância ao alumínio em solução nutritiva. **Revista Brasileira Ciência Solo**, v.24, p.339-344, 2000.
- ALVES, M.C.A. **Efeito do Alumínio sobre a cinética de absorção e translocação de fósforo e sobre o crescimento e composição mineral de dois cultivares de trigo**. 1984. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa.
- ANDRADE, C.M.S.; VALENTIM, J.F. Soluções tecnológicas para a síndrome da morte do capim-marandu. In: BARBOSA, R.A. (eds.) **Morte de pastos de braquiárias**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2006. p.175-197.
- APEL, K.; HERT H. Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review Plant Biotechnology**, v.55, p.373-399, 2004.
- ARONOVICH, S.; ROCHA, G.L. Gramíneas e leguminosas de importância para o Brasil Central pecuário. **Informe Agropecuário**. Belo Horizonte, v.131, II, p.3-11, 1985.
- BATES, L.S. et al. Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant and Soil**, v.39, p.205-207, 1973.
- BITENCOURT, G.A. et al. Aluminum tolerance on genotypes of signal grass. **Revista Brasileira Zootecnia**. Viçosa, v.40, n.2, 2011.
- BLAHA, L. et al. Influence of low pH and aluminium ions on the nutrient uptake and growth in juvenile phase of cereal cultivars. **Scientia Agriculturae Bohemica**, v.28, p.81-94, 1997.
- BODDEY, R.M. et al. Nitrogen cycling in *Brachiaria* pastures: the key to understanding the process of pasture decline. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.103, p.389-403, 2004.
- BOGDAN, A.V. **Tropical pastures and fodder plants**. Londres: Logman, 1977. 475p.
- BOWLER, C. et al. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology, Plant Molecular Biology**, v.43, p.83-116, 1993.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-54, 1976.



BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análises de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 2009. 399 p.

BRAY, E.A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (eds). **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. cap.22, p1158-1203.

CAMARA, T.R.; WILLADINO, L. Compreendendo o estresse abiótico *in vitro*. In: NOGUEIRA, R.J.M.C.; ARAÚJO, E.L.; WILLADINO, L.; CAVALCANTE, U.M.T. (eds). **Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas**. Recife: MXM, 2005. parte v, cap.29, p.325-335.

CARCELLER, M.; PRYSTUPA, P.; LEMCOFF, J.H. Remobilization of proline and other nitrogen compounds from senescing leaves of maize under water stress. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Berlin, v.183, p.61-66, 1999.

CASTRO, C.R.T.; CARVALHO, W.L.; REIS, F.P. Influência do tratamento com ácido sulfúrico na germinação de sementes de *Brachiaria brizantha* Stapf. **Revista Ceres**, Lavras, v.41, n.236, p.451-458, 1996.

CHAFFAI, R.; MARZOUK, B.; FERJAN, E. Aluminum immediate compositional alterations of polar lipid classes in maize seedlings. **Phytochemistry**, v.66, p.1903-1912, 2005.

COSTA, C. et al. Evolução das pastagens cultivadas e do efetivo bovino no Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, v.15, p.8-17, 2008.

CUSTÓDIO, C.C. et al. Estresse por alumínio e por acidez em cultivares de soja. **Scientia Agricola**, v.59, p.145-153, 2002.

DELHAIZE, E. et al. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). II. Aluminum stimulates excretion of malic acid from root apices. **Plant Physiology**, v.103, p.695-702, 1993.

DELHAIZE, E. et al. Second mechanism for aluminum resistance in wheat relies on the constitutive efflux of citrate from roots. **Plant Physiology**, v.149, p.340-351, 2009.

DIAS, M.C.L.L.; ALVES, S.J. Avaliação da viabilidade de sementes de *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich) Stapf pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v.30, p.145-151, 2008.

ECHER, F.R. et al. Estresse hídrico induzido por manitol em cultivares de algodão. **Revista Ciência Agronômica**, v.41, p.638-645, 2010.

FAGERIA, N.K. Influence of aluminum in nutrient solutions on chemical composition in two rice cultivars at different growth stages. **Plant Soil**, v.85, p.423-429.1985.

FERRAZ, F.M. Pastures ensure the future of dairy cattle ranching. p. 55-56. In: **ANUALPEC 2003: anuário da pecuária brasileira**. São Paulo: FNP, 2003.

FERREIRA, D.F. SISVAR: programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v.6, n.2, p.36-41, 2008.

FISHER, M.J.; KERRIDGE, P.C. The agronomy and physiology of *Brachiaria* species. In: MILES, J.W.; MAASS, B.L.; VALLE, C.B. (eds). **Brachiaria: biology, agronomy and improvement**. Cali: CIAT/Brasília: EMBRAPA-CNPGC, 1996. p.43-52.

FINCH-SAVAGE, W.E. The use of population-based threshold models to describe and predict the effects of seedbed environmental on germination and seedling emergence of crops. In: BENECH-ARNOLD, R.L.; SÁNCHEZ, R.A. **Handbook of seed physiology: applications to agriculture**. New York: Haworth Press, 2004. p.51-95.

FLEMING, A.L.; FOY, C.D. Root structure reflects differential aluminum tolerance in wheat varieties. **Agronomy Journal**, Madison, v.60, p.172-176, 1968.

FOY, C.D.; CHANEY, R.L.; WHITE, M.C. The physiology of metal toxicity in plants. **Ann. Rev Plant Physiol.**, v.29, p.511-516, 1978.

GASPAR, T. et al. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. **Plant Growth Regulation**, v.37, p.263-285, 2002.

HARE, P.D.; CRESS, W.A. Metabolic implications of stress induced proline accumulation in plants. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.21, p.79-102, 1997.

HAUSSLER, K. et al. Shoot and root growth of two tropical grasses, *Brachiaria ruziziensis* and *B. dictyoneura*, as influenced by aluminium toxicity and phosphorus deficiency in a sandy loam Oxisol of the eastern plains of Colombia. **Tropical Grasslands**, v.40, p.213-221, 2006.

HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplast I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v.125, n.2, p.189-198, 1968.

HOSSAIN, M.A. et al. Reduction of Al-induced oxidative damage in wheat. **Australian Journal of Crop Science**, p.1157-1162, 2011.

HUNT, R. **Plant growth curves: the functional approach to plant growth analysis**. London: Edward Arnold, 1982. 248 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo da agropecuária**. Rio de Janeiro: IBGE, 2006.

INZÉ, D.; MONTAGU, M.V. Oxidative stress in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v.6, p.153-158, 1995.

KELLER-GREIN, G. et al. Natural variation in *Brachiaria* and existing germplasm collections. In: MILES, J.W. et al. (eds.). **Brachiaria: biology, agronomy, and improvement**. Cali: CIAT, 1996. p.18-45.

- KOCHIAN, L.V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.46, n.1, p.237-260, 1995.
- KUMAR, P.B.A.N. et al. Phytoextraction: The use of plants to remove heavy metals from soils. **Environmental Science and Technology**, v.29, p.1232-1238, 1995.
- LAPOINTE, S.L.; MILES, J.W. Germplasm case study: *Brachiaria* species. In: CIAT (ed.). **Pastures for the tropical lowlands**. Cali: CIAT, 1992. p.43-55.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RiMa, 2000. 531p.
- LAZCANO-FERRAT, I.; LOVATT, C.J. Relationship between relative water content, nitrogen pools, and growth of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. acutifolius* A. Gray during water deficit. **Crop Science**, Madison, v.39, p.467-475, 1999.
- LEI, Y-B. et al. Possible involvement of antioxidant enzymes in the cross tolerance of the germination/growth of wheat seed to salinity and heat stress. **Journal of Integrative Plant Biology**, v.47, p.1211-1219, 2005.
- LUPA. Levantamento censitário das unidades de produção agropecuária do estado de São Paulo. Secretaria de Agricultura e Abastecimento. **CATI/IEA 2007/08**. Disponível em: <<http://www.cati.sp.gov.br/projetolupa/dadosestado.php>>. Acesso em: 09 maio 2011.
- MA, J.F. et al. Aluminum tolerance in plants and the complexing role of organic acids. **Trends in Plant Science**, v.6, p.273-278, 2001.
- MACHADO NETO, N.B. et al. Water stress induced by mannitol and sodium chloride in soybean cultivars. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.47, p.521-529, 2004.
- MACHADO, P.L.O.A. **Considerações gerais sobre a toxicidade do alumínio nas plantas**. Rio de Janeiro: EMBRAPA/CNPS, 1997. 22p.
- MARTINS, C.E. et al. Tolerância à toxidez por alumínio em capim-elefante. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v.3, n.1, 2010.
- MARTINS, C.E. et al. Seleção de genótipos de *Brachiaria Ruziziensis* quanto à tolerância ao alumínio em solução nutritiva. I: Resposta a diferentes concentrações de alumínio e valores de pH em solução nutritiva. **Revista de Ciências Agrárias**, v.34, n.1, 2011.
- MATSUMOTO, H. Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. **International Review Cytology**, San Diego, v.200, p.1-46, 2000.
- MILES, J.W.; MAASS, B.L.; VALLE, C.B. **Brachiaria: biology, agronomy and improvement**. Cali: CIAT, 1996. v.1, 258 p.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v.7, p.405-410, 2002.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados nos desempenhos das plântulas. In: KRZYŻANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (eds.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: Abrates, 1999. p.2-24.

NOLLA, A.; SCHLINDWEIN, J.A.; ANGHINONI, I. Crescimento, morfologia radicular e liberação de compostos orgânicos por plântulas de soja em função da atividade de alumínio na solução do solo de campo natural. **Revista Ciência Rural**, v.37, n.1/6, p.97-101, 2007.

NUNES, D.G. et al. **Brachiaria brizantha cv. Marandu**. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 1985. 31p.

OSMOND, C.B. et al. Stress physiology and the distribution of plants. **Bioscience**, v.37, p.38-48, 1987.

OWNBY, J.D. Mechanisms of reaction of hematoxylin with aluminium-treated wheat roots. **Physiologia Plantarum**, v.87, p.371–380, 1993.

PANIAGO, R. Via sustentável para a pecuária no Brasil. **Revista JC Maschietto**, v.8, n.8, p.6, 2010.

PICCIANI, F. O “PAC” do campo. **Revista JC Maschietto**, v.8, n.8, p.3, 2010.

RAO, I.M. et al. Selección de híbridos de brachiaria con resistencia al aluminio. **Pasturas Tropicales**, v.26,n.3, p.20, 2006.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v.26, p.1231-1237, 1999.

RIZHSKY, L. et al. Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase. **The Plant Journal**, v.32, p.329–342, 2002.

RODRIGUES, L.R.A.; RODRIGUES, T.J.D. Ecofisiologia de plantas forrageiras. In: CASTRO, P.R.C. et al. (eds.). **Ecofisiologia da produção agrícola**. Piracicaba: Potafós, 1987. cap. 12, p.203-230.

RUTTY, T.W. et al. Effects of aluminium on nitrate uptake and assimilation. **Plant, Cell and Environment**, v.18, p.1325-1331, 1995.

RYAN, P.T. et al. The identification of aluminum resistance genes provides opportunities for enhancing crop production on acid soils. **Journal of Experimental Botany**, v.62, p.9-20, 2011.

SANO, E.E. et al. Mapeamento semi-detalhado do uso da terra do bioma cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.153-156, 2008.

SARADHI, P. et al. Proline accumulates in plants exposed to UV radiation and protects them against UV induced peroxidation. **Biochem Biophys Res Commun** v.209, p.1–5, 1995.

SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38, p.995-1014, 2005.

SHEVYAKOVA, N.I. Metabolism and the physiological role of proline in plants under conditions of water and salt stress. **Soviet Plant Physiology**, New York, v.30, p.597-608, 1984.

SILVA FILHO, J.P. Qualidade de sementes de forrageiras. **Informativo ABRATES**, v.19, p.81-82, 2009.

SIRIPORNADULSIL, S. et al. Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. **Plant Cell** v.14, p.2837–2847, 2002.

SKERMAN, P.J.; RIVEROS, F. **Tropical grasses**. Roma: FAO, 1990. 932p.

SOUZA FILHO, A.S.; DUTRA, S. Germination of seeds of *Calopogonium mucunoides*. **Pasturas Tropicales**, v.20, p.26-30, 1998.

SZYMANSKA, M.; MOLAS, J. The effect of aluminium on early development stages of *Cucumis sativus* L. **Folia Horticulturae**, v.8, p.73- 83, 1996.

STEWART, G. R.; LEE, J. A. The role of proline accumulation in halophytes. **Planta**, Berlin, v.120, p.279-289, 1974.

TAMÁS, L. et al. Aluminum induced drought and oxidative stress in barley roots. **Journal of Plant Physiology**, v.163, p.781-784, 2006.

TAYLOR, C.B. Proline and water deficit: ups, downs, ins, and outs. **Plant Cell**, Rockville, v.8, p.1221-1224, 1996.

VALLE, C. B. **Coleção de germoplasma de espécies de Brachiaria no CIAT: estudos básicos visando ao melhoramento genético**. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 1990.

VECHIATTO, M.H. Sanidade de sementes de Gramíneas Forrageiras. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 8, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: UFPB, 2004. p.55-57.

ZEIFNEJAD, M.; CLARK, R.B.; SULLIVAN, C.Y. Aluminum and water stress effects on growth and proline of sorghum. **Journal of Plant Physiology**, v.150, p.338-344, 1997.

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

YAMAMOTO, Y.; MATSUMOTO, H.; DEVI, S.R. An intracellular mechanism of aluminum tolerance associated with high antioxidant status in cultured tobacco cells. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.97, p.59-68, 2003.

WENZL, P. et al. The high level of aluminum resistance in signalgrass is not associated with known mechanisms of external detoxification in root apices. **Plant Physiology**, v.125, p.1473-1484, 2001.