

Método de avaliação de tolerância à toxidez de alumínio em trigo, em condições de hidroponia, na Embrapa Trigo

Foto: Marcio Voss



Marcio Voss¹, Cantídio Nicolau Alves de Sousa², Augusto C. Baier², Alfredo Nascimento Júnior¹,
Tatiana Boff³



Introdução

A restrição ao crescimento radicular provocada pelo alumínio é a base de diversos métodos de determinação da resposta de trigo a esse cátion, em hidroponia. Métodos hidropônicos fornecem uma caracterização específica da tolerância à toxidez de alumínio, enquanto que métodos que envolvem solo incluem potencialmente outros fatores ligados à acidez, tais como elevados teores de manganês e de ferro e deficiência de fósforo e de molibdênio. O conjunto desses fatores é considerado como a causa do crestamento, originalmente atribuído por Paiva (1942) para descrever as restrições ao desenvolvimento vegetativo e ao rendimento de trigo em solos ácidos. Além disso, as concentrações relativas de outros elementos e a temperatura afetam a solubilidade e severidade do alumínio (Camargo, 1984, 1985). Somando a isso as variações espaciais de pH e de teor de alumínio e de outros elementos no solo, entende-se que haja menor precisão na capacidade de fenotipar as plantas quanto à tolerância ao crestamento a campo (Camargo, 1984). O cultivo hidropônico permite o

¹ Pesquisador da Embrapa Trigo. Caixa Postal 451, CEP 99001-970 Passo Fundo, RS. E-mail: marciov@cnpt.embrapa.br

² Pesquisador da Embrapa Trigo, aposentado.

³ Doutora, UFRGS.

controle de todas essas variáveis e possibilita estudos genéticos e caracterização de germoplasma especificamente para tolerância a alumínio. Ainda assim, em testes de tolerância a alumínio em hidroponia se alcançou correlação em torno de 80%, com os testes de campo de tolerância à acidez (Baier et al., 1995), confirmando que o maior fator responsável pelo crestamento é o alumínio (Araújo, 1956).

Os diversos métodos hidropônicos para tolerância a alumínio constituem-se de solução nutritiva de baixa força iônica, pH 4, sem fósforo na presença de alumínio e avaliação do efeito sobre as raízes na fase inicial de crescimento das plantas.

Há dois tipos básicos de métodos hidropônicos utilizados para avaliação da tolerância a alumínio em plantas. Um deles consiste em deixar as plântulas crescerem em solução nutritiva completa, inclusive com fósforo, retirando-as após alguns dias dessa solução e colocando-as em soluções exclusivas de alumínio, em doses crescentes desse cátion, por um ou dois dias, retornando, então, para a solução completa menos alumínio, em que é quantificado o recrescimento. O uso desse método em trigo foi descrito por Camargo & Freitas (1981). Para auxiliar na visualização do recrescimento, pode-se empregar tinturas indicadoras, como "Eriochrome cyanine" 0,1% (Aniol, 1983) ou Hematoxilina (2 g/L) com NaIO_3 (0,2 g/L) (Polle et al., 1978). Outro tipo de método consiste em deixar sementes pré-germinadas se desenvolverem em solução nutritiva sem fósforo, por um período aproximado de uma semana, comparando o crescimento das raízes na ausência ou presença de alumínio. O crescimento por um período curto assegura menor dependência de nutrientes da solução nutritiva, que precisa ser de baixa concentração para possibilitar completa disponibilidade de alumínio.

Esse último tipo de método é o mais freqüentemente usado na Embrapa Trigo, desde 1999. A seguir é descrito detalhadamente o protocolo usado para avaliar a tolerância de trigo a alumínio, conforme descrito em Baier et al. (1995), que aperfeiçoaram os métodos descritos em Moore et al. (1976) e Aniol (1991). Esse protocolo pode ser seguido para outros cereais de inverno, alterando-se as concentrações de alumínio solúvel.

Metodologia para avaliação de tolerância a alumínio em trigo, na Embrapa Trigo, baseada em Baier et al. (1995).

1. Preparo de semente

1.1 Desinfecção externa de semente

Desinfetar semente mediante imersão em solução comercial de hipoclorito de sódio (2%), por 3 a 5 minutos, enxaguando em seguida com seis passagens de água destilada.

1.2 Germinação

Dispor as sementes sobre dois círculos de papel germiteste dentro de placa de petri, umedecendo os papéis com água destilada. Recobrir com outro disco de papel. Tampar e identificar a placa e colocar a 5-7 graus Celsius até o momento de iniciar a germinação.

Colocar em ambiente com temperatura de 20-25 graus Celsius por 36-40 horas para promover a germinação (Fig.1).

Foto: Paulo Kurtz



Fig 1. Sementes pré-germinadas, com tamanho adequado para colocação na tela.

2 Preparo de soluções

2.1 Solução-estoque

Preparar soluções-estoque, individualizadas, usando os seguintes reagentes p.a. e respectivas quantidades: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 58,80 g/L; KNO_3 , 65,70 g/L; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 50,80 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,30 g/L; NH_4NO_3 , 3,20 g/L. Pesar cada reagente, dissolvendo-o em copo de becker com cerca de 100 ml de água destilada. Transferir quantitativamente para balão volumétrico de 1 L, com sucessivas lavagens do copo de becker e completar a 1 L com água destilada. Colocar cada solução em um frasco e armazená-lo em local sem incidência direta de luz.

2.2. Solução nutritiva

Preparar solução nutritiva com a seguinte composição e concentração finais: 400 $\mu\text{mol/L}$ de CaCl_2 , 650 $\mu\text{mol/L}$ de KNO_3 , 250 $\mu\text{mol/L}$ de MgCl_2 , 10 $\mu\text{mol/L}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 40 $\mu\text{mol/L}$ de NH_4NO_3 (pH 4,0). Para isso, usar 1 mL da solução estoque de cada sal por litro de água destilada e deionizada. Corrigir o pH para 4, usando HCl (cerca de 0,8 mL de HCl 0,1 N/L de solução), monitorando com pHmetro.

2.3. Solução-estoque de alumínio

Dissolver 0,894 g de AlCl_3 em balão volumétrico de 100 mL usando água destilada. Armazenar em local sem luz direta, em frasco escuro. A concentração da solução-estoque é de 1 mg de Al/mL.

3. Preparo das bandejas e transplante

3.1. Preparo das bandejas

Revestir com saco plástico novo, bandeja de alumínio, de 43 cm de comprimento por 27,5 de largura, com 5 cm de altura, para evitar contato da solução com a superfície da bandeja. Colocar dentro uma estrutura formada por tela plástica com 2 mm de malha firmada em grade de plástico rígido, com alvéolos de 6 cm comprimento por 3 cm de largura por 1,8 cm de altura. Usar tiras de poliestireno, nas margens externas da estrutura telada, para promover a flutuação dela. Colocar dois litros da solução nutritiva (Fig. 2).

Foto: Paulo Kurtz



Fig. 2. Bandeja montada, mostrando detalhes de encaixe da grade de plástico, dos tubos e mangueiras para aeração e da colocação de bóias de poliestireno.

3.2. Transplante

Transplantar oito sementes pré-germinadas com raízes menores do que 0,5 cm de comprimento, inserindo as raízes nos orifícios da tela. Tomar cuidado para não danificar as raízes, substituindo a semente pré-germinada por outra, em caso de dobradura ou quebra de raiz. Colocar oito sementes de um mesmo genótipo por alvéolo, repetindo a operação com o mesmo genótipo em tantas bandejas quantas forem as doses previstas de alumínio (Fig.3).

Colocar, da mesma maneira, sementes pré-germinadas das cultivares IAC 5 e Anahuac 75, como testemunhas de material resistente e sensível a alumínio, respectivamente.

Foto: Paulo Kurtz



Fig. 3. Plantas no momento de término de teste, (96 horas), mostrando à esquerda bandeja sem Al e à direita, bandeja com 2 mg Al/L.

4. Ajustes na câmara de crescimento

4.1. Ajustar a câmara de crescimento para 23 ° Celsius, $\pm 1^{\circ}\text{C}$.

4.2 Colocar as bandejas em prateleira com lâmpadas fluorescentes, sobre estrado para evitar troca de calor com a prateleira (Fig.4).

Foto: Paulo Kurtz



Fig. 4. Vista geral do teste, mostrando o sistema de iluminação e o compressor de ar à direita.

4.3. Proporcionar aeração na solução nutritiva inserindo nela dois tubos de vidro, pelas laterais da bandeja. O tubo de vidro, com 20 cm de comprimento e diâmetro interno de 3 mm conecta-se a um compressor pequeno através de tubo de silicone.

5. Aplicação do teste

5.1. Deixar uma bandeja sem alumínio e adicionar a quantidade desejada de alumínio por bandeja, para se ter a concentração estabelecida para o teste. Normalmente os testes para trigo, na Embrapa Trigo, são realizados com as doses zero e 2 mg/L, ou seja, zero e 4 mL da solução estoque de alumínio por dois litros de solução nutritiva.

5.2. Anotar a hora de aplicação da solução de alumínio e deixar as plântulas crescendo, sob luz contínua, por 96 horas, substituindo a solução a 24, 48 e 72 horas. A cada substituição, recolocar alumínio no tratamento correspondente.

6. Coleta de dados

6.1. Após 96 horas de crescimento, retirar a solução nutritiva e colocar as bandejas em geladeira ou congelador até o momento da quantificação do crescimento das raízes (Fig. 5 e 6).

Foto: Paulo Kurtz



Fig. 5. Vista de raízes de trigo, em solução sem alumínio, no término do teste.

Foto: Paulo Kurtz



Fig. 6. Vista de raízes de trigo, em solução com a 2 mg Al/L, no término do teste.

6.2. Anotar o crescimento das duas raízes maiores de cada plântula, em mm (Fig.7). Descartar os dados da plântula com maior soma de comprimento das raízes e da plântula com menor soma, para diminuir a variabilidade.

Foto: Paulo Kurtz



Fig. 7. Medição das duas raízes maiores de cada plântula de trigo.

7. Interpretação dos dados

A interpretação da tolerância do genótipo de cereal de inverno pode ser baseada no quociente entre o comprimento médio das raízes em solução com alumínio e o comprimento médio das raízes crescidas na solução sem alumínio, sendo definido como sensível o material semelhante à testemunha sensível e resistente o material semelhante à testemunha resistente. Os materiais genéticos com crescimento radicular intermediário são considerados medianamente suscetíveis quando apresentam índices numéricos de 26 a 50% maiores do que a média da testemunha sensível (Anahuac 75) e medianamente resistentes quando seus índices estão entre 51 e 75% do valor obtido pela testemunha resistente (IAC 5). Outra forma de interpretação é a comparação direta entre as médias do comprimento de raízes dos genótipos com as testemunhas.

No caso de trigo, o uso de 1 mg de Al/L ou de 2 mg Al/L apresentaram correlação semelhante com os dados do índice de suscetibilidade ao crestamento, obtidos a campo (R de -0,75 e -0,77, respectivamente (Voss & Sousa, 2001). Na Embrapa Trigo adotou-se o uso de 2 mg de Al/L para os testes comparativos de rotina, mas outros níveis de alumínio podem ser adotados conforme os objetivos dos estudos (Fig. 8).

Foto: Paulo Kurtz



Fig. 8. À esquerda raízes submetidas a solução nutritiva sem Al e à direita, raízes submetidas a solução nutritiva com 2 mg Al/L, por 4 dias.

8. Observações

Todo material que entra em contato com a solução e sementes deve ser lavado com uma passagem de ácido clorídrico 1%, seguido por três passagens de água destilada e deionizada, para limpeza de cátions potencialmente remanescentes na limpeza com detergentes.

Um vídeo mostrando essa metodologia foi desenvolvido na Embrapa Trigo, para disponibilizar a técnica para interessados (Avaliação, 2003).

9. Resultados

Alguns resultados obtidos utilizando essa metodologia para fenotipagem para tolerância a alumínio em genótipos de trigo, para o programa de melhoramento genético, são comentados a seguir. Testes iniciais de Voss et al. (1999), compararam diversos genótipos em doses de 0, 1, 4 e 8 mg Al/L, mostrando correspondência entre resultados de tolerância à toxidez de alumínio em hidroponia com os resultados de crestamento, em campo. Com essa metodologia, outro grupo de cultivares foi avaliado nas doses de 1, 2 e 3 mg Al/L, mostrando comportamento diferenciado das cultivares Jacuí, Trintecino e Toropi com relação à cultivar BH 1146 (Tabela 1). Essas cultivares apresentaram maior desenvolvimento de raízes em dose de 3 mg/L do que BH 1146, mantendo cerca de 80% do valor obtido na dose 1 mg/L enquanto para BH 1146 a redução foi de 50% (Tabela 1). Esse elevado percentual de redução relativa entre 3 e 1 mg Al/L foi encontrado também em Anahuac, BR 18 e CEP 24. As razões dessa diferença entre BH 1146 e Toropi foram pesquisadas em estudos posteriores (Carvalho et al. 2002, Boff et al. 2005), confirmando que o principal gene que atua na tolerância a alumínio em Toropi não é o mesmo de BH 1146. Tal como para BH 1146, o gene de tolerância a Al de Toropi encontra-se no cromossoma 4 D, mas está localizado no braço menor, enquanto que o gene principal de tolerância a Al de BH 1146 está localizado no braço maior do cromossoma (Riede & Anderson, 1996).

Outros estudos usando esta técnica foram desenvolvidos visando comparar a tolerância de duplo-haplóides produzidos na Embrapa Trigo (Lângaro et al., 2003) e

para caracterizar fenotipicamente os diversos acessos da cultivar de trigo Frontana quanto à tolerância a alumínio. Embora originalmente Frontana fosse conhecido como resistente ao crestamento, observou-se, em teste hidropônico, variação na resposta ao Al solúvel conforme a origem do acesso, muitos dos quais recebidos de órgãos de pesquisa de outros países (Rocha et al., 2003). Essa técnica foi também usada para eliminar, já na geração F2, material genético sensível a alumínio, proveniente de cruzamentos que incluíam algum genitor com esse tipo de reação, como Anahuac 75, Buck Pronto e Jupateco 73. Essa seleção é expedita, pois os materiais sensíveis praticamente não desenvolvem raízes, não havendo necessidade de medições. As plântulas tolerantes são retiradas da solução e imediatamente transplantadas para avanço de geração.

Tabela 1. Comprimento médio e relativo de raízes de trigo crescidas em solução nutritiva com três doses de Al. Embrapa Trigo, Passo Fundo. 1999.

Genótipo	Comprimento médio e relativo de raízes ¹				
	1 mg Al/L	2 mg Al/L		3 mg Al/L	
	cm	cm	2/1 ²	cm	3/1 ³
Anahuac 75	1,34	0,75	0,56	0,64	0,48
BH 1146	5,57	3,71	0,67	2,94	0,53
BR 18	4,69	3,24	0,69	2,38	0,51
BR 49	5,30	3,38	0,64	2,06	0,40
CEP 24	4,34	3,18	0,73	2,24	0,52
Embrapa 120	3,44	1,50	0,44	1,66	0,48
IAC 24	4,72	2,57	0,54	2,18	0,46
Jacuí	4,70	4,62	0,98	3,96	0,84
Klein Orion	4,14	1,85	0,45	1,51	0,36
Toropi	5,35	4,55	0,85	4,36	0,81
Trintecinco	4,35	4,60	1,06	3,50	0,80

(1) Média de duas raízes/planta de seis plantas.

(2) 2/1 Razão entre média de raízes em 2 mg Al/L e 1 mg Al/L.

(3) 3/1 Razão entre média de raízes em 3 mg Al/L e 1 mg Al/L.

Considerações finais

O método hidropônico descrito acima tem sido útil em estudos detalhados para estudos genéticos e de biotecnologia, fornecendo dados quantitativos para tolerância de trigo ao alumínio solúvel. No entanto, uma alternativa para separar os genótipos de trigo em categorias conforme sua resposta a alumínio de forma mais expedita e menos dependente do vigor das sementes, é desejável. Variações no vigor das sementes são comuns, principalmente quando originadas de safras e de locais diferentes. Essa variabilidade é uma fonte de erro experimental, dificultando a repetibilidade dos índices numéricos. A Embrapa Trigo está desenvolvendo procedimentos que permitam uma discriminação visual das categorias de tolerância a

alumínio, conforme classificação de Sousa (1999) e simplificando alguns passos na execução dos testes.

Referências Bibliográficas

- ANIOL, A. Aluminum uptake by roots of two winter wheat varieties of different tolerance to aluminium. **Biochemie und Physiologie der Pflanzen**, Jena, v. 178, p. 11-20, 1983.
- ANIOL, A. Genetics of acid tolerant plants. In: WRIGHT, R. J. (Ed.). **Plant-soil interactions at low pH**. Netherlands: Kluwer, 1991. p. 1007-1017.
- ARAÚJO, J. E. G. O alumínio trocável, possível causa do crestamento do trigo. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO, 4., 1953, Belo Horizonte. **Anais...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1956. p. 329-337.
- AVALIAÇÃO de toxidez de alumínio em cereais de inverno em condições de hidroponia. Coordenação de Marcio Voss; Cantídio Nicolau Alves de Sousa. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2003. 1 videocassete (12 min), VHS, son., color.
- BAIER, A. C.; SOMMERS, D. J.; GUSTAFSON, J. P. Aluminium tolerance in wheat: correlating hydroponic evaluations with field and soil performances. **Plant Breeding**, Berlin, v. 114, p. 291-296, 1995.
- BOFF, T.; ESPINDULA, L. F.; MINELLA, E.; VOSS, M.; MILACH, S. C. K. Toropi e BH 1146 diferem geneticamente quanto à tolerância ao alumínio em trigo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 3., 2005, Gramado. **Anais...** Passo Fundo: Embrapa Trigo: Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas, 2005. 1 CD-ROM.
- CAMARGO, C. E. O. Efeitos de níveis de cálcio combinados com diferentes concentrações de sais na tolerância de trigo à toxicidade de alumínio, em solução nutritiva. **Bragantia**, Campinas, v. 44, p. 659-668, 1985.
- CAMARGO, C. E. O. O pH das soluções nutritivas no comportamento de cultivares de trigo à toxicidade de alumínio. **Bragantia**, Campinas, v. 43, p. 327-335, 1984.
- CAMARGO, C. E. O.; FREITAS, J. G. Tolerância de cultivares de trigo a diferentes níveis de alumínio em solução nutritiva. **Bragantia**, Campinas, v. 40, p. 21-31, 1981.
- CARVALHO, M. F.; MILACH, S. C. K.; MINELLA, E.; VOSS, M. Mapeamento da tolerância ao alumínio em trigo na cultivar Toropi. In: MOSTRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 12., 2002, Passo Fundo. **Uma mostra de suas conquistas**. Passo Fundo: UPF, 2002. 1 CD-ROM.
- LÂNGARO, N. C.; SCHEEREN, P. L.; IORCZESKI, E. J.; BIANCHIN, V.; VOSS, M.; BRAMMER, S. P.; ZANATTA, A. C. A.; HAAS, J. C.; MILACH, S. C. K. Caracterização da tolerância ao alumínio em linhas duplo-haplóides de trigo. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 49., 2003, Águas de Lindóia. Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Genética, 2003. p. 404. 1 CD-ROM.

MOORE, D. P.; KRONSTAD, W. E.; METZGER, R. J. Screening wheat for aluminum tolerance. In: WRIGHT, M. J. (Ed.). **Plant adaptation to mineral stress in problem soils**. Ithaca: Cornell University Press, 1976. p. 287-295.

PAIVA, O. Notas sobre fisiologia e seleção de trigo. **Revista Agrônômica**, Porto Alegre, v. 6, p. 535-536, 1942.

POLLE, E.; KONZAK, C. F.; KITTRICK, J. A. Visual detection of aluminum tolerance levels in wheat by hematoxylin staining of seedling roots. **Crop Science**, Madison, v. 18, p. 823-827, 1978.

RIEDE, C.R.; ANDERSON, J.A. Linkage of RFLP markers to an aluminum tolerance in wheat. *Crop Science*, v.36, p 905-909. 1996.

ROCHA, R. da.; LÂNGARO, N. C.; IORCZESKI, E. J.; VOSS, M.; ZANATTA, A. C. A.; SOUSA, C. N. A. de; MINELLA, E. Caracterização da tolerância ao alumínio em alguns acessos da cultivar Frontana do banco de germoplasma da Embrapa Trigo. In: MOSTRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 13., 2003, Passo Fundo. **Resumos...** Passo Fundo: UPF, 2003. 1 CD-ROM.

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

SOUSA, C. N. A. de. **Reação de linhagens de trigo de sigla PF ao crestamento em testes de campo**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 1999. 6 p. html. (Embrapa Trigo. Pesquisa em Andamento Online, 2). Disponível em:
<http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_pa02.htm>.

VOSS, M.; SOUSA, C. N. A. de. Results of tests for the reaction of wheat genotypes to Al toxicity in laboratory conditions and to soil acidity in the field. **Annual Wheat Newsletter**, Manhattan, p. 34, 2001.

VOSS, M.; SOUSA, C. N. A. de; BAIER, A. C. Resposta de trigo ao alumínio em hidroponia. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE TRIGO, 18., 1999, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo. Embrapa Trigo, 1999. p. 730-735.



Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: **Leandro Vargas**

Ana Lúcia V. Bonato, José A. Portella, Leila M. Costamilan, Márcia S. Chaves, Maria Imaculada P. M. Lima, Paulo Roberto V. da S. Pereira, Rainoldo A. Kochhann, Rita Maria A. de Moraes

Expediente

Referências bibliográficas: Maria Regina Martins

Editoração eletrônica: Márcia Barrocas Moreira Pimentel

VOSS, M.; SOUSA, C. N. A. de; BAIER, A. C.; NASCIMENTO JÚNIOR, A.; BOFF, T. **Método de avaliação de tolerância à toxidez de alumínio em trigo, em condições de hidroponia, na Embrapa Trigo.** Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2006. 16 p. html. (Embrapa Trigo. Documentos Online, 67). Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do67.htm