

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**SILÍCIO ATENUA OS EFEITOS TÓXICOS DO ALUMÍNIO EM
PLANTAS JOVENS DE CANA-DE-AÇÚCAR CULTIVADAS
EM HIDROPONIA**

Gilmar da Silveira Sousa Junior

Agroecólogo

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**SILÍCIO ATENUA OS EFEITOS TÓXICOS DO ALUMÍNIO EM
PLANTAS JOVENS DE CANA-DE-AÇÚCAR CULTIVADAS
EM HIDROPONIA**

Gilmar da Silveira Sousa Junior

Orientadora: Profa. Dra. Durvalina Maria Mathias dos Santos

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Custódio Gasparino

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Produção Vegetal).

2017

Sousa Junior, Gilmar da Silveira
S725s Silício atenua os efeitos tóxicos do alumínio em plantas jovens de
cana-de-açúcar cultivadas em hidroponia / Gilmar da Silveira Sousa
Junior. – – Jaboticabal, 2017
64 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
Orientadora: Durvalina Maria Mathias dos Santos
Coorientador: Eduardo Custódio Gasparino
Banca examinadora: Priscila Lupino Gratão, Fabio Luís Ferreira
Dias
Bibliografia

1. *Saccharum* spp. 2. Estresse ácido. 3. Osmólitos compatíveis. 4.
Estresse oxidativo. 5. Anatomia radicular. I. Título. II. Jaboticabal-
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 633.61:631.45

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

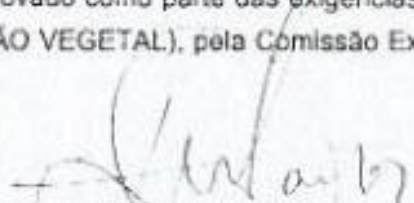
TÍTULO: SILÍCIO ATENUA OS EFEITOS TÓXICOS DO ALUMÍNIO EM PLANTAS JOVENS DE CANA-DE-AÇÚCAR CULTIVADAS EM HIDROPONIA

AUTOR: GILMAR DA SILVEIRA SOUSA JÚNIOR

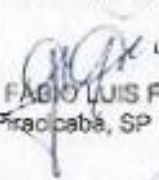
ORIENTADORA: DURVALINA MARIA MATHIAS DOS SANTOS

COORIENTADOR: EDUARDO CUSTODIO GASPARINO

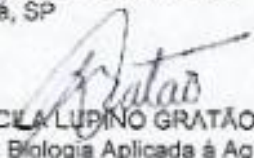
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. DURVALINA MARIA MATHIAS DOS SANTOS
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. FÁBIO LUIS FERREIRA DIAS
APTA / Piracicaba, SP



Profa. Dra. PRISCILA LUPINO GRATÃO
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 22 de fevereiro de 2017.

GILMAR DA SILVEIRA SOUSA JUNIOR – nascido em 19 de março de 1988, em Araraquara-SP, é Agroecólogo, formado pela Universidade Federal de São Carlos – Centro de Ciências Agrárias, em dezembro de 2014. Foi bolsista CNPq de iniciação científica no período de 2012 a 2013 e FUNDAG de 2013 a 2014, neste último período de iniciação científica trabalhou e realizou projetos em nutrição e manejo na cultura da cana-de-açúcar. Em março de 2015 iniciou o curso de mestrado em Agronomia - Produção Vegetal, na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Câmpus Jaboticabal. Durante o período de realização do curso de mestrado, foi bolsista do programa de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

“A utopia está lá no horizonte. Me aproximo dois passos, ela se afasta dois passos. Caminho dez passos e o horizonte corre dez passos. Por mais que eu caminhe, jamais alcançarei. Para que serve a utopia? Serve para isso: para que eu não deixe de caminhar.”

Eduardo Galeano citando Fernando Birri

“Se um dia, já homem feito e realizado, sentires que a terra cede a teus pés, que tuas obras desmoronam, que não há ninguém à tua volta para te estender a mão, esquece a tua maturidade, passa pela tua mocidade, volta à tua infância e balbucia, entre lágrimas e esperanças, as últimas palavras que sempre te restarão na alma: minha mãe, meu pai.”

(Rui Barbosa)

À **Deus** e sempre a Ele, por ter me dado vocês **Gilmar da Silveira Sousa** e **Vanilda Ferrarresi Sousa**, meus pais, pelas vezes em que a terra cedeu aos meus pés e vocês estavam ali e sempre vão estar com o abraço e a palavra certa.

DEDICO

Por acreditar que o que temos de mais valioso é o tempo.

OFEREÇO...

...esse trabalho à minha orientadora **Profa Dra Durvalina Mathias dos Santos**, por cada momento de paciência, amizade, dedicação, compreensão e responsabilidade em me mostrar sempre o melhor caminho a ser seguido.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”** – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias pela oportunidade de realização do mestrado;

À **CAPES** pela auxílio financeiro para a condução do estudo;

Ao meu coorientador **Eduardo Custódio Gasparino**, por todas as vezes que você sempre me recebeu com paciência e educação, quero levar pra minha formação todos os exemplos de conhecimento, comportamento e humildade que você me ensinou;

À minha irmã **Grace Silva**, meu cunhado **Paulo Silva**, e as minhas sobrinhas, por serem as pessoas que mais torcem por mim;

À minha **Família**, principalmente aos meus avós **Isolina**, **Euclides** (*in memoriam*), e **Joel**, por todo incentivo e preocupação, em especial a minha avó **Tereza** (*in memoriam*) quando criança em nossas conversas nunca pensamos que eu chegaria até aqui, mas cheguei com suas palavras e por lembrar que o caminho vale mais que a chegada;

À **Ana Carolina Simamura**, pelo amor, apoio, parceria, carinho e dedicação em fazer dos momentos tensos do mestrado, momentos de conversas e amadurecimentos;

Aos meus amigos-irmãos, **Willian Duarte** e **César Zanello**, embora a distância tenha nos separados, foi com ela que eu descobri o quanto irmãos vocês são;

Aos amigos da graduação **Jessica Freitas**, **Luciano Delmondes** e **Hugo Romania**, por todas as vezes que mesmo distante vocês estiveram perto e me ajudaram com o melhor apoio;

Aos irmãos que fiz durante esse processo de mestrado, **Murillo**, **Felipe** e **Sthefani**, no meio de tantas mudanças vocês se tornaram meus irmãos e com vocês eu dividi não só os momentos bons, mas dividi todos os problemas e isso fez de vocês pessoas importantes para mim;

Aos irmãos da REP. ANTRO DO HV, **Otavio**, **Buda (Augusto)**, **Dido/Yudi/Anão (Cleber)**, **Tofu (Diego)**, **Aladim (Thiago)**, **Frito (Vinicius)**, **KY-rex (Kayo)**, **Pumba (João)**, **Balu (Marcelo)**, **Mariano (Felipe)** e **Naza (Carlos)**, por todos os conselhos, risadas, mural de perolas, idas ao SAPÃO e churras na rep. Vocês todos me

mostraram que a vida, o meio acadêmico e as nossas escolhas em seguir nesse meio, pode e deve ser prazerosa. Vocês fizeram com que um lugar totalmente diferente torna-se minha casa e hoje você são e sempre serão meus irmãos;

À minha **Família ANTRO DO HV** (Moradores, ex-moradores, esposas dos ex-moradores e namoradas, pelas vezes que fizeram de um república um lar, uma família e um lugar bom para se cultivar uma boa amizade a base de conversas e cerveja) e em especial a **Jussara (JUJU)** pelas vezes em que organizou a rep. e fez do nosso ambiente um lugar habitável.

À **Rita de Cássia, Domingos Ferreira Jr. e Augusto Traira** por toda amizade, parceira e ajuda em todo o processo de montagem, avaliações e desmontagem do trabalho, sem vocês eu ainda estaria levando os baldes de solução nutritiva;

À **Sonia Carregari** (Sônica), por todo o seu conhecimento e por saber passar de uma maneira singular cada detalhe de cada protocolo e por ser a pessoa que é e por saber sempre ter o abraço mais aconchegante e a palavra mais amiga que alguém pode dar a uma pessoa,

Ao **Jamil Ferraz** por toda ajuda durante o trabalho e por sempre estar disposto a ajudar e cooperar;

À **Roseli Munhoz** pelos pequenos momentos de ajuda com as raízes, pelas conversas e pelo carinho que sempre me tratou;

As meninas do Lab de morfologia vegetal **Cintia e Fernanda**, pelas pequenas ajudas em me ensinar todas as vezes como liga os aparelhos e pela paciência e educação que sempre me trataram;

À **Denise Chiconato** pela amizade, conselhos, BSL e pastel as 16h no Sapão. Sem você o primeiro momento no laboratório não seria o mesmo, no meio de tantas perdas pela distancia você me fez me sentir em casa em um lugar totalmente desconhecido;

Aos meus colegas do Lab. de Fisiologia Vegetal, **Leonardo, Antônio, Joel, Leticia, Lucas, Rafael, Patrícia, Emilaine, Marina e Paloma** sem vocês todos os trabalhos seriam mais difíceis, teriam menos risadas e com certeza não seria a mesma coisa. Em especial agradeço a **Mirela e Mayara** por todas as vezes que vocês não foram apenas IC, vocês foram amigas e me ajudaram, seja no trabalho ou com uma palavra de incentivo;

Aos amigos, **Danubia, Rodolfo, Greice, Alexson, Larissa, Willian, Ana e Neriane**, cada um de vocês tiveram e vão sempre ter um admiração minha seja pelas nossas conversas ou pela humildade que cada um leva em viver e beber uma "quase" toda sexta depois das 17:00h;

À minha família que ganhei na graduação, **Janaina Torres, Luciana Dias e Fábio Dias** por toda ajuda e conselhos, mesmo com a distância e não tendo mais que me orientar, vocês sempre estiveram presentes e por isso eu serei sempre grato e pronto ajudar, sem vocês a minha formação não seria a mesma e eu não estaria aqui;

Aos Professores **Priscila Lupino Gratão e Rogério Falleiro Carvalho**, pelas dicas, conselhos e amizade ao longo do meu mestrado, vocês se tornaram amigos e isso fez com que eu os admirasse ainda mais;

Aos meus ex-orientadores **Andréa Pimentel, Rodolfo Figueiredo e Katia Kupper** e as minhas sub ex-orientadoras **Tatiane Cunha e Mariana Klein** pelas vezes em que não passaram a mão na minha cabeça e me ensinaram a nunca desistir.

À todos os funcionários e professores do Departamento de Biologia, em especial a **Eliane Alves, Aldo Souza, Aracyara Afonso e Marcia Macri** pelas vezes em que vocês me ajudaram com alguma informação, conversa ou preocupação;

Ao meu filho-Dog **Prince** e aos meus sobrinhos-Dog, **Jackinho, Hoffmann, Brahma, Vick, Chico, Tomas e Carla** (*in memoriam*), pelas vezes em que eu chegava em casa e vocês me esperavam, pulando, correndo, mordendo ou parados com preguiça (Prince) fazendo uma enorme diferença;

À todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para que eu pudesse chegar até aqui.

...MUITO OBRIGADO!!!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	2
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
3.1. Toxidez de alumínio.....	7
3.2. Silício	8
3.3. Cana-de-açúcar (<i>Saccharum spp.</i>).....	9
3.4. Parametros bioquímicos, fisiológicos em plantas sob estresse por Al	10
3.4.1. Solutos Organicos: Prolina e Glicina betaína	10
3.5. Estresse Oxidativo	12
3.6. Pigmentos Clorofilianos.....	13
3.7. Morfoanatomia de raízes	14
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1. Delineamento experimental	16
4.2. Obtenção do material propagativo e Características das cultivares.....	16
4.3. Crescimento em solução nutritiva.....	17
4.4. Osmolitos Compatives: prolina(PRO) e glicina betaina (GB).....	17
4.5. Peroxidação lipídica (H₂O₂ e MDA).....	18
4.6. Crescimento: acúmulo de biomassa	19
4.7. Clorofilas.....	19
4.8. Anatomia de raízes	20
4.9. Analise estatística	21
5. Resultados e Discussão.....	22
6. Conclusão.....	44
REFERÊNCIAS.....	45

PLANTAS JOVENS DE CANA-DE-AÇÚCAR SOB EFEITO TÓXICO DO ALUMÍNIO NA AUSÊNCIA OU PRESENÇA DE SILÍCIO

RESUMO – Visando constatar se o silício (Si) atenua a toxidez do alumínio (Al) em plantas jovens de cana-de-açúcar, neste trabalho foram estudados em plantas jovens de cana-de-açúcar, os parâmetros fisiológicos de acúmulo de biomassa, peroxidação lipídica com a avaliação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido malondialdeído (MDA), teores de compostos não-enzimáticos antioxidantes, prolina (Pro) e glicina betaína (GB), pigmentos clorofilianos (chl a e b) e anatomia das raízes. O delineamento experimental foi em esquema fatorial $2 \times 4 \times 2$, com duas cultivares (CTC9002 e CTC9003), quatro concentrações de sulfato de Al (0,0; 10,0; 15,0 e 20,0 $mg\ L^{-1}$) e duas concentrações de silicato de potássio, ausência (0,0 $mg\ L^{-1}$) e presença (2,0 $mmol\ L^{-1}$). Foram realizadas três repetições em triplicata em todas as avaliações, exceto para crescimento, onde foram realizadas apenas as repetições. Para a obtenção de plantas jovens, os minitoletes de ambas cultivares foram cultivados em areia esterilizada por 30 dias. Após este período, as plantas foram aclimatadas por 10 dias em solução nutritiva. A seguir, procedeu-se aos tratamentos de Al nas plantas jovens, as quais foram cultivadas hidroponicamente por 15 dias. Os tratamentos com Si foram realizados ao término deste período, permanecendo as plantas sob toxidez de Al e tratadas na ausência ou presença de Si por mais 20 dias. Todas as avaliações biológicas foram realizadas aos 35 dias dos tratamentos de Al e Si. Comparando-se os resultados obtidos nas plantas jovens de cana-de-açúcar sob toxidez de Al e com ausência de Si, verificou-se que em plantas com suplementação de Si houve significativa melhora do crescimento, que pode ser atribuída pela redução da peroxidação lipídica devido à diminuição de H_2O_2 e MDA, pelo maior acúmulo de prolina e pela menor redução nos teores de clorofilas a e b, além da redução dos efeitos deletérios causados pelo Al nas raízes. Ao contrário dos resultados de Pro, os teores de GB foram reduzidos pelo Si nas plantas sob toxidez de Al, não tendo atividade antioxidante pela adição de Si. Conclui-se que, de modo geral, a presença de Si causou atenuação do estresse por Al em ambas as cultivares de cana-de-açúcar, com maior mitigação dos efeitos do Al na cv. CTC9003 que apresentou menor sensibilidade à toxidez comparada com a cv. CTC9002.

Palavras-chave: *Saccharum* spp., estresse ácido, osmólitos compatíveis, estresse oxidativo; pigmentos, anatomia radicular.

YOUNG SUGARCANE PLANTS UNDER ALUMINUM TOXICITY IN THE ABSENCE OR PRESENCE OF SILICON

ABSTRACT – Aiming to evaluate if Silicon (Si) ameliorates Aluminum (Al) toxicity in young sugarcane plants, at this work were assessed physiological parameters of biomass accumulation, lipid peroxidation through evaluation of hydrogen peroxide (H₂O₂) and malondialdehyde (MDA), contents of the non-enzymatic compounds proline (Pro) and glycine betaine (GB), and chlorophyll pigments (chl a and b). Furthermore, to determine if there was Si attenuated deleterious effects caused by Al, an anatomical study of roots was carried out. The experimental design was a 2x4x4 layout, with two sugarcane cultivars (CTC9002 and CTC9003), four Al sulfate concentrations (0.0; 10.0; 15.0; and 20.0 mg L⁻¹) and two potassium silicate concentrations, absence (0.0 mg L⁻¹) and presence (2.0 mmol L⁻¹). There were three replicates in triplicate for each evaluation, except for growth. For obtaining young plants, micro seed pieces were sown and grown in sterilized sand for 30 days. After this period, the plants were acclimated in nutrient solution for 30 days. Then, the plants were submitted to the Al treatments, and grown in hydroponics for 15 days. Only then Si treatments were applied, with plants growing under Al toxicity and in the presence or absence of Si for additional 20 days. All the biological evaluations were performed 35 days after the plants were exposed to Al and Si treatments. Comparing the results obtained from young plants under Al toxicity and without Si, it was verified that Si supply improved growth, what can be attributed to a decrease in lipid peroxidation verified through lower H₂O₂ and MDA rates, to higher accumulation of proline and lower decrease in chlorophyll a and b contents, besides the mitigation of deleterious effects caused by Al in roots. Unlike Pro results, GB contents were reduced by Si in plants under Al stress, not having antioxidant activity through Si addition. It is concluded that Si presence ameliorated Al stress in both sugarcane cultivars, with higher protection to cv. CTC9003, which demonstrated lower sensitivity to toxicity when compared to cv. CTC9002.

Keywords: *Saccharum* spp., acid stress, compatible osmolytes, oxidative stress; Pigments, root anatomy.

1. INTRODUÇÃO

Em áreas tropicais e subtropicais úmidas é comum a ocorrência de solos ácidos, com pH abaixo de 5,5 que disponibilizam alumínio (Al) em nível tóxico. O estresse por Al é um dos mais sérios fatores limitantes para a produtividade vegetal em solos ácidos, que constituem cerca de 50% das terras cultiváveis do mundo, causando entre 25% a 80% de perdas no campo dependendo da espécie (MA et al., 2014; SADE et al., 2016). No Brasil, 32% dos solos exibem toxicidade do Al (ABREU et al., 2003; NAVASCUÉS et al., 2012). O Al é encontrado sob diferentes formas, como aluminossilicatos insolúveis ou óxidos, que favorecem a liberação na solução do solo do Al tóxico, denominado Al^{3+} , que permanece, predominantemente, retido pelas cargas negativas das partículas do solo (ARUNAKUMARA et al., 2013; MA et al., 2014). O efeito tóxico do Al nas plantas provoca sintomas imediatos e acentuados, particularmente, na redução do crescimento da raiz (HORST et al., 2010; SILVA, 2012; ARUNAKUMARA et al., 2013; MATSUMOTO; MOTODA, 2012; 2013; EMAMVERDIAN et al., 2015). Porém estudos relatam também o efeito do Al na redução dos teores de clorofilas das folhas o que corresponde ao fotossistema e crescimento vegetal (CHEN et al., 2010). Da mesma forma a toxidez do Al induz ao estresse oxidativo (TABALDI et al., 2009; GIANNAKOULA et al., 2010; DAWOOD et al., 2012; INOSTROZA-BLANCHETEAU et al., 2012; SADE et al., 2012), enquanto outros estudos relatam que o estresse oxidativo pode ser consequência da toxidez do Al nas plantas (NAVASCUÉS et al., 2012).

O silício (Si), segundo elemento mais abundante nos solos e não essencial para as plantas (EPSTEIN, 2009), tem sido reconhecido como atenuador dos efeitos deletérios dos estresses abióticos, como a toxicidade do Al. De acordo com LIANG et al. (2007), um dos principais mecanismos da atenuação dos efeitos dos estresses abióticos em plantas superiores mediada pelo Si inclui a estimulação dos sistemas antioxidantes nas plantas. Tais sistemas podem incluir a atividade antioxidante não-enzimática de solutos orgânicos, prolina (Pro) e glicina betaína (GB), que se acumulam para atuar na osmoproteção celular.

O aminoácido Pro e a amina quaternária GB são considerados indicadores dos estresses abióticos, por participar do ajuste osmótico, importante mecanismo

para impedir a diminuição do potencial hídrico celular, mantendo a turgidez e preservando a integridade de compostos e estruturas celulares, fundamentais para a continuidade das atividades vitais (CHEN; MURATA, 2011; GIRI, 2011; PINTÓ-MARIJUAN; MUNNÉ-BOSCH, 2013; WANI et al., 2013; SHARMA et al., 2014). Além do mais, Pro e GB possuem importante função na prevenção dos danos oxidativos provocados pelas espécies reativas de oxigênio (ERO), com a participação da remoção de radicais livres em excesso (GIANNAKOULA et al., 2008; 2010; REJEB et al., 2014; EMAMVERDIAN et al., 2015). As principais formas de ERO são radicais superóxido (O_2^-), hidroxila (OH^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete (1O_2), que provocam redução da fluidez de membrana e, conseqüente, maior peroxidação lipídica (MATSUMOTO; MOTODA, 2012; 2013; BARBOSA et al., 2014). Em elevadas concentrações, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) possui efeito deletério devido à participação na reação formadora de OH^- , oxidante mais reativo da ERO, além de inativar enzimas por oxidação dos grupos tiol (BARBOSA et al., 2014). O aldeído malônico (MDA) é o último produto formado como resultado da peroxidação lipídica da membrana celular e a concentração deste aldeído citotóxico expressa o grau da peroxidação evidenciando conseqüente, dano celular, sendo considerado marcador-chave bioquímico em plantas sob estresses (MOLINARI et al., 2007; SHARMA et al., 2012; COOKE; LEISHMAN, 2016). A peroxidação lipídica pode ser o sintoma mais proeminente do estresse oxidativo causado pelo estresse por Al, uma vez que este íon está relacionado a um aumento do conteúdo de H_2O_2 (TABALDI et al., 2009; GUO et al., 2012; ADREES et al., 2015).

As clorofilas são pigmentos que ocorrem em nos cloroplastos das folhas (STREIT et al., 2005). Clorofilas participam da absorção e conversão da luminosidade em moléculas de ATP e NADPH, que são consumidas pelo ciclo de Calvin e outras reações metabólicas (TAIZ; ZEIGER, 2013). Por essa razão as clorofilas podem ser utilizadas como indicadoras de estresses em plantas, visto que as folhas constituem o local onde se encontra o maquinário fotossintético das plantas (CHEN et al., 2010).

Devido à importância econômica e social da cultura de cana-de-açúcar, pela produção do etanol e açúcar, a partir do ano 2000, o cultivo tem se expandido para o cerrado, região Centro-Oeste, com solo ácido em que o Al trocável tende a ser o

cátion dominante (MANZATTO et al, 2009; CASTANHO; SOUTO, 2014; RIBEIRO et al., 2015).

Estudos sobre o efeito atenuador do Si em cana-de-açúcar sob toxicidade do Al não foram encontrados na literatura. Assim, baseando-se na hipótese que o Si atenua os efeitos da toxicidade do Al, plantas jovens de duas cultivares de cana-de-açúcar foram expostas hidroponicamente em diferentes concentrações de Al na ausência e presença de Si, para verificar se o Si pode estar relacionada com o acúmulo de Pro, GB, redução da peroxidação lipídica, aumento dos teores de clorofilas, aumento da biomassa e anatômica das raízes.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Toxidez de alumínio

Em solos tropicais e subtropicais úmidos, com altas precipitações pluviométricas, ocorre a diminuição do pH. O hidrogênio (H^+) atua sobre os minerais liberando íons Al, ou seja, os hexahidratados de $Al(H_2O)_6^{3+}$ denominado de Al^{3+} (SCANCAR; MILACIC, 2006; MA et al., 2014). Al^{3+} permanece, predominantemente, retido pelas cargas negativas das partículas de argila do solo, em equilíbrio com o Al^{3+} em solução e, portanto, a quantidade de Al^{3+} em solução aumenta com a acidez do solo (ARUNAKUMARA et al., 2013; MA et al., 2014; SADE et al., 2016).

O processo de acidificação do solo é muitas vezes intensificado por práticas agrícolas, pela mineração e por práticas de descarte de resíduos, no que se refere aos efeitos da agricultura, pode-se salientar que resíduos de plantas, fertilizantes à base de nitrogênio e matérias nitrogenadas de origem animal, como esterco, são fontes responsáveis pela acidificação do solo (LANGE et al., 2006). Todavia, os problemas de acidificação do solo podem ser corrigidos pela calagem, num processo que neutraliza os íons H^+ e Al^{3+} . Entretanto, com os corretivos da acidez são poucos solúveis, e os produtos da reação do calcário com o solo tem mobilidade limitadas, a ação da calagem é restrita às camadas superficiais do solo (HORST et al., 2010).

Nos solos ácidos, as plantas cultivadas, mesmo em condições adequadas de nutrientes, podem não atingir a taxa de crescimento e produtividade ótima quando teores elevados de Al estão presente, principalmente, devido as alterações estruturais no sistema radicular provocadas pelo Al que restringem a absorção dos nutrientes (HORST et al., 2010; SILVA, 2012; ARUNAKUMARA et al., 2013; EMAMVERDIAN et al., 2015). Os efeitos prejudiciais do Al^{3+} nas diversas espécies, são observados tanto no sistema radicular quanto na parte aérea.

A toxidez do Al é considerada um dos mais importantes problemas de toxidez de metais em solos ácidos com $pH \leq 5,5$ (HORST et al., 2010; SILVA, 2012), por representar um fator limitante de crescimento para as plantas. Desde que praticamente 50% dos solos com potencial agricultável no mundo são ácidos, a toxidez do Al representa um sério problema para a produção agrícola

(GIANNAKOULA et al., 2008; SILVA, 2012;). Ainda a toxidez de Al induz nas plantas sintomas de deficiência de nutrientes, tais como fosforo, cálcio, magnésio, potássio e molibdênio, devido à interferência do Al^{3+} nos processos de absorção, transporte e utilização destes nutrientes pelas plantas as quais tornam mais suscetíveis ao estresse hídrico (HORST et al., 2010; SILVA, 2012;).

Por ser um elemento de pouca mobilidade dentro da planta (CASTRO, 2016), os efeitos do Al são mais evidentes no sistema radicular, induzindo ao sintoma inicial mais drástico da toxidez, a inibição do alongamento celular, e também induz engrossamento e a diminuição da permeabilidade das células radiculares (HORST et al., 2010; SILVA, 2012; ARUNAKUMARA et al., 2013; MATSUMOTO & MOTODA, 2012; 2013; EMAMVERDIAN et al., 2015), com consequentemente inibição da divisão celular e redução da síntese de DNA (RIBA, 2001). Também fisiologicamente a toxidez de Al pode inibir as enzimas envolvidas na respiração e na translocação e absorção de nutrientes e induzir ao estresse oxidativo (TABALDI et al., 2009; GIANNAKOULA et al., 2010; DAWOOD et al., 2012; INOSTROZA-BLANCHETEAU et al., 2012; SADE et al., 2012), enquanto outros estudos relatam que o estresse oxidativo é consequência da toxidez do Al nas plantas (NAVASCUÉS et al., 2012).

3.2. Silício

Os efeitos do Si tem beneficiado muitas espécies vegetais, conferindo resistências às plantas pela sua deposição e formando uma barreira mecânica, além de propiciar proteção contra estresses abióticos (LIANG et al., 2007; VASANTHI et al., 2014), podendo atuar tanto *ex planta* e quanto *in plant*, isto é pode ocorrer complexação do Si-Al tornando o Al indisponível à planta ou uma vez sendo absorvido pelo vegetal os efeitos tóxicos do Al são minimizados por uma série de fatores bioquímicos-fisiológicos induzido pelo Si (HORST et al., 2010). De acordo com FREITAS (2015) muitas pesquisas consolidaram que a interação Si e Al ocorre, especialmente, no interior da planta (*in plant*), embora ainda assim, possa ocorrer formação de complexo Si e Al externamente (*ex plant*), contribuindo para a amenização da toxidez ao Al. Pesquisas revelam o efeito mitigador do Si *in plant* sob toxicidade de Al como milho (HORST et al., 2010; GIONGO & BOHNEN, 2011),

arroz (FREITAS et al., 2015), batata (DORNELES et al, 2016) e eucalipto (LIMA et al., 2016)

A aplicação de Si vem demonstrando efeitos importantes no combate a estresses causados em plantas devido a sua atuação na formação de complexos protetores e reguladores, assim diminuindo a perda de água por evapotranspiração, elevando a eficiência fotossintética e consequentemente, os benefícios proporcionados podem resultar no aumento do crescimento vegetal, em ganhos de produtividade e de qualidade (LIMA FILHO, 2011).

De acordo com FREITAS et al. (2015), resultados positivos com a aplicação de Si no aumento da produtividade são observados em plantas acumuladoras desse elemento, como ocorre com a maioria das gramíneas.

De acordo com LIANG et al. (2007), um dos principais mecanismos da atenuação dos efeitos dos estresses abióticos em plantas superiores mediada pelo Si inclui a estimulação dos sistemas antioxidantes nas plantas. Tais sistemas podem incluir a atividade antioxidante não-enzimática, pelo acúmulo de prolina (Pro) e glicina betaína (GB), mediante a maior biossíntese ou a menor degradação destes solutos compatíveis.

3.3. Cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)

Pertencente à família *Poaceae*, o gênero *Saccharum* é cultivado em diversos países, destacando o Brasil como um dos maiores produtores desta cultura.

Segundo GUERZONI et al. (2014) a cultura tem um grande destaque no cenário agrícola pela importância de seus produtos, principalmente pelo açúcar e álcool, e no desenvolvimento de energias renováveis, com isso a cana-de-açúcar é considerada uma das principais “commodities” agrícolas em todo o mundo.

Estes fatores associados acabam por induzir ao maior aumento da produção de cana-de-açúcar, o qual demanda de desenvolvimentos de tecnologias de produção e meios de se cultivar em diversos tipos de ambientes.

A cultura é cultivada em quase todas as áreas tropicais e subtropicais do mundo, estima-se que 50% das terras cultivadas com esta cultura sejam afetadas

pela toxicidade de Al (MA et al., 2014; SADE et al., 2016). No Brasil, 32% dos solos exibem toxicidade do Al (ABREU et al., 2003; NAVASCUÉS et al., 2012).

A cana-de-açúcar pode ser cultivada em diversos tipos de solo, porem para a alta produtividade, requer solos corrigidos, pois sem essas condições ocorre uma redução no rendimento, conforme as características do solo vão se afastando das condições ideais (RIBEIRO et al., 2015). Por ser uma cultura semiperene seu sistema radicular permite exploração de camadas mais profundas do solo passando a ter uma estreita relação com o pH, saturação por base (V%), por Al (m%) e teores de cálcio nas camadas mais profundas do solo. A produtividade alcançada está diretamente correlacionada a esses fatores (MANZATTO et al, 2009; CASTANHO & SOUTO, 2014; RIBEIRO et al., 2015). Ainda que existam praticas alternativas como a incorporação profunda do calcário, ou uso de sais mais solúveis, como o gesso agrícola, tais opções sofrem restrições de ordem técnica ou econômica, que podem inviabilizar sua utilização. Segundo ROSSETTO; DIAS, (2005) a melhor oportunidade para a incorporação do calcário é na ocasião do plantio, o que ocorre a cada cinco ou seis anos, com a cultura já implantada a utilização desses insumos acaba sendo inviável.

3.4. Parâmetros bioquímicos, fisiológicos em plantas sob estresse de Al

3.4.1. Solutos orgânicos: Prolina e Glicina Betaina

Estes compostos são conhecidos como osmólitos compatíveis, ou osmoprotetores, e entre eles estão os aminoácidos prolina (Pro) e amina quaternária glicina betaína (GB) (CHEN & MURATA, 2008; 2011; SZÁBADOS et al., 2011; SILVA, 2012; SHARMA et al., 2014). De longa data, tais substâncias têm sido estudadas como indicadores dos estresses nas plantas pela participação no processo de ajuste osmótico, acumulando-se, mediante a maior biossíntese ou a menor degradação, no vacúolo ou no citosol, exercendo função osmoprotetora às substâncias tóxicas gerados pelos estresses, com a manutenção do equilíbrio hídrico e preservação da integridade celular de proteínas, enzimas e membranas para a continuidade das atividades vitais (SHARMA et al., 2014).

A Pro (L-prolina) é um aminoácido essencial, componente de proteínas de todos os organismos e, portanto, presente em todos os seres vivos. Além da sua função como estrutura de proteínas, a prolina desempenha função de osmólito compatível em plantas sob estresses, sendo um dos mais pesquisados nos estudos em plantas cultivadas (CHEN & MURATA, 2008; 2011; SZÁBADOS et al., 2011). Em condições adversas plantas sob estresse, o conteúdo de Pro pode aumentar até 100 vezes contribuindo substancialmente para o ajuste osmótico citosólico, que pode ser associado à tolerância das plantas aos mais variados estresses (SZÁBADOS et al., 2011; HAYAT et al., 2012; SHARMA et al., 2014). As alterações no metabolismo da Pro podem ser mais benéficas para a tolerância das plantas aos estresses ambientais do que as propriedades do próprio aminoácido, (SHAHNAZ et al. 2011; REJEB et al., 2014). Além desta função muito conhecida da prolina, ainda há outras sendo estudadas e comprovadas, como anti oxidante não-enzimático na prevenção dos danos oxidativos provocados pelas ERO (TUTEJA, 2007; REJEB et al., 2014; EMAMVERDIAN et al., 2015) como fonte de carbono e nitrogênio (GUPTA; HUANG, 2014), auxiliando no potencial redox de transferência de elétrons, das células sob estresse (TUTEJA, 2007).

O acúmulo de Pro está associado aos estresses abióticos, bem como a outras substâncias, e a ação deste osmólito será evidenciada dependendo da espécie e cultivar embora haja abundante literatura sobre o acúmulo de Pro, em plantas sob vários tipos de estresse, não se sabe ao certo se esse acúmulo sempre ocorre (ASHRAF et al., 2010; SZÁBADOS et al., 2011; YIN et al., 2013).

GB, composto de amina quaternária (*N,N,N-trimetilglicina*), interage com macromoléculas hidrofílicas e/ou hidrofóbicas, enzimas e complexos protéicos, com função osmoprotetora na maioria dos vegetais em resposta aos estresses ambientais, correlacionando-se aos níveis de tolerância das plantas (CHEN; MURATA, 2011; WANI et al., 2013).

Este osmólito é conhecido pela sua função de regulador osmótico, aumentando a capacidade das células em reter água sob estresses, sem causar prejuízos às plantas (CHEN; MURATA, 2011). A maioria das plantas produzem GB quando submetidas a estresses abióticos, induzem à biossíntese de GB que varia de

40 $\mu\text{mol (g massa seca)}^{-1}$ a 400 $\mu\text{mol (g massa seca)}^{-1}$ e, portanto, considerada natural acumulador de planta (WANI et al., 2013).

Estudos para melhor entendimento das funções da GB nas plantas ainda são necessários mesmo plantas não acumuladoras de GB como arroz, tomate, brássicas, caqui e batata, que tiveram expressão gênica para este, demonstraram maior tolerância aos estresses abióticos (AHMAD et al., 2013).

Muitos benefícios da produção de GB têm sido evidenciados em diversas plantas como o ajuste osmótico. Além disso, esta amina atua na proteção de enzimas como a RuBisCO e como antioxidante. Por estes motivos, os efeitos de GB vão depender da concentração aplicada e da resposta de diferentes tipos de plantas ao seu acúmulo (AHMAD et al., 2013).

3.5. Estresse Oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas pelas plantas em condições normais de crescimento e estão envolvidas na sinalização celular. No entanto, sob estresse oxidativo, a produção aumenta e o controle das plantas passa ser insuficiente e as ERO a causarem danos. Alterações no sistema REDOX das células das plantas podem induzir compostos como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ocasionando a peroxidação lipídica (MATSUMOTO; MOTODA, 2013). O H_2O_2 é produzido em plantas sob estresse oxidativo que pode ser causado por outros tipos de estresses, conduzindo a prejuízos na membrana plasmática das células, permitindo o extravasamento de eletrólitos (TUTEJA, 2007; TABALDI et al., 2009; GUO et al., 2012, ADREES et al., 2015). O estresse oxidativo está relacionado com todos os estresses abióticos que atingem as plantas, desenvolvendo-se a partir do acúmulo de ERO, o que acarretará em modificações químicas e fisiológicas (DEMIDCHIK, 2015) que alteram diversas biomoléculas, sendo os lipídios as mais danificadas. Os produtos da peroxidação lipídica são altamente reativos, podendo se ligar a biomoléculas como DNA e proteínas danificando-os irreversivelmente, causando prejuízos nas funcionalidades das células, tanto dentro quanto fora delas (TABALDI et al., 2009). A oxidação lipídica origina diversos produtos secundários que agravam o dano oxidativo, entre eles o ácido malondialdeído (MDA), que é o

principal e mais estudado produto da peroxidação lipídica (TABALDI et al., 2009; GUO et al., 2012, ADREES et al., 2015). O aldeído malônico (MDA) é conhecido como um marcador molecular para designar peroxidação lipídica em células de plantas submetidas a diferentes estresses abióticos (COOKE; LEISHMAN, 2016). O MDA é o último produto formado como resultado da peroxidação lipídica da membrana celular e a concentração expressa o grau desta peroxidação e consequente dano celular (SHARMA et al., 2012).

A produção de ERO pode ocorrer nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomas. A eliminação rápida da ERO, nos fotossistemas, antes de chegarem até o estroma e prejudicar o ciclo de Calvin, é um mecanismo de proteção dos cloroplastos (ASADA 2006). Uma série de reações pode acarretar a produção de O_2^- permitindo a produção de H_2O_2 (GILL; TUTEJA, 2010). O H_2O_2 é um composto estável com relativa longa meia vida e pode causar inativação de enzimas (GILL; TUTEJA, 2010) sendo, relativamente, pouco reativo quando comparado a outras ERO (GRATÃO et al., 2005; BIENERT et al., 2007). O estudo deste composto tem permitido o acesso a uma gama de informações para se entender o estresse oxidativo (DEMIDCHIK, 2015). A concentração deste elemento pode variar de 0,03 – 1 μ M (sem estresse) a 0.1 - 10 μ M (sob estresse), bem como a quantidade de dias que isso pode ocorrer, dependendo de uma série de variáveis (DEMIDCHIK, 2015).

3.6. Pigmentos Clorofilianos

As clorofilas são pigmentos naturais presentes em plantas e ocorrem em maior abundância nos cloroplastos das folhas (STREIT et al., 2005). Estes pigmentos fotossintéticos são moléculas constituídas por um anel tetrapirrólico contendo um átomo de magnésio no centro e uma cauda fitol hidrofóbica constituída por 20 carbonos e que ancora a molécula de clorofila aos complexos protéicos embebidos na matriz lipídica das membranas dos tilacóides. Há dois principais tipos de clorofila, as quais se diferenciam pelo radical ligado ao anel II da porfirina, onde na clorofila a este radical é o grupamento metila (-CH₃) enquanto que na clorofila b este radical é o formila (-CHO). Encontrados de forma organizada nas membranas dos cloroplastos, no entanto, as moléculas dos pigmentos fotossintéticos nas

membranas dos tilacóides são estruturadas de forma a otimizar a absorção de luz (MAJEROXWICZ, 2008).

A participação destes pigmentos é decisiva na absorção e conversão da luminosidade em moléculas de ATP e NADPH que serão consumidas pelo ciclo de Calvin e outras reações metabólicas importantes (TAIZ; ZEIGER, 2013). Por este fato, a concentração de clorofilas pode ser utilizada como indicador de estresses em plantas, visto que as folhas constituem o local onde se encontra o maquinário fotossintético de plantas (CHEN et al., 2010). Além disso, estes pigmentos são fortemente influenciados pela disponibilidade de fatores ambientais reinantes como luz, água e nutrientes minerais. Isto pode ser observado quando plantas são submetidas a estresse por Al, onde se observa efeito negativo nos níveis destes pigmentos fotossintéticos (CHEN et al., 2010).

Este efeito do estresse por Al sobre este pigmento pode ser atribuído a inibição da atividade de ácido aminolevulinico desidratase que é responsável pela formação de monofirrol porfobilonogenio, que é uma parte da molécula de clorofila,. Além disso, pode acontecer que o Al reduza a clorofila na linha endogâmica sensível ao Al (CHEN et al., 2010).

3.7. Morfoanatomia de raízes

O desenvolvimento do sistema radicular tem influência direta sobre alguns fatores para a produtividade final, tais como: resistência à seca, eficiência na absorção dos nutrientes do solo, entre outros (COSTA et al., 2007). Além disso o sistema radicular da cultura é essencial para a regeneração das soqueiras após a colheita (ALVAREZ et al., 2000). Todos os fatores que favorecem a expansão do sistema radicular são importantes para aumentar a produtividade da cana-de-açúcar, já que seu caráter semi-perene permite e exige que a planta explore maior volume de solo em maiores profundidades.

Impedimentos físicos e químicos são as causas mais frequentes da redução do crescimento radicular. De todos os atributos químicos, a toxidez por Al é uma das principais barreiras químicas ao aprofundamento do sistema radicular e à sua

capacidade de absorção de água e de nutrientes, sendo muitas vezes a causa da baixa produtividade de muitos solos (ABREU JR et al., 2003).

O Al induz alterações no sistema radicular, reprimindo o crescimento das raízes laterais, inibindo a área e o volume dos pêlos radiculares (ROSSIELLO; JACOB-NETTO, 2006; GIONGO; BOHNEN, 2011; MATSUMOTO; MOTODA, 2013). Há a rápida inibição do processo de alongamento radicular em razão da paralisação da divisão celular e, se a exposição for continua o Al, ocorrerá alterações anatômicas como o engrossamento e encurtamento das raízes, com aspecto quebradiço (GIONGO; BOHNEN, 2011; MATSUMOTO; MOTODA, 2013).

Embora muitos estudos e respostas são encontrados para o efeito do Al na anatomia de raízes de plantas cultivadas (GIANNAKOULA et al., 2010; GIONGO; BOHNEN, 2011; MATSUMOTO; MOTODA, 2013); escassos são os estudos que envolvem a toxicidade do Al e o uso de Si como mitigador desse estresse em cana-de-açúcar.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido de janeiro a março de 2016 em casa de vegetação, com temperatura de $29,7 \pm 4,3^{\circ}\text{C}$ e $75 \pm 10\%$ UR, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária (FCAV), da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Câmpus de Jaboticabal, SP.

4.1. Delineamento experimental

O delineamento experimental foi em blocos casualizados em esquema fatorial $4 \times 2 \times 2$, com quatro concentrações de Al^{3+} de 0, 10, 15 e 20 mg L⁻¹ duas cultivares de cana-de-açúcar (CTC9002 e CTC9003), na ausência e presença de Si (0,0 mmol L⁻¹ e 2,0 mmol L⁻¹) com três repetições.

4.2. Obtenção de plantas e características das cultivares

Os mini-toletes de uma gema foram provenientes da AZOCANA, Guariba-SP e após 24 horas da coleta dos toletes, os mesmos foram plantados em recipientes plásticos com capacidade de 2L preenchidos com areia lavada e esterilizada em estufa de ventilação forçada (CARLIN, 2009) e as mudas foram mantidas em areia estéril sem restrição hídrica durante 30 dias.

CTC9002: Ambiente de produção C e D, a cultivar apresenta como características rusticidade com tolerância a seca para o cerrado, longevidade, porte ereto facilitando o manejo mecanizado e a colheita.

CTC9003: Ambiente de produção A, B e C, a cultivar apresenta alto perfilhamento e permite o plantio mecanizado.

4.3. Crescimento em Solução Nutritiva

Após o período de 30 dias em germinação, Realizou-se a aclimação de 25%, 50% e 100% das mudas à solução nutritiva de CLARK, (1977) por 10 dias. Após a aclimação, as mudas foram fixadas em placas de isopor para imersão do sistema radicular na solução e o sistema foi mantido sob arejamento constante da solução por borbulhamento de ar suprido de bomba de ventilação. As mudas foram expostas por 15 dias aos tratamentos com o sulfato de Al $[Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O]$, nas concentrações de 0; 10; 15 e 20 $mg\ L^{-1}$ de acordo com HETHERINGTON et al. (1988) que também trabalhou com a cultura da cana-de-açúcar. Após este período, as plantas foram tratadas Si, permanecendo 20 dias sob estresse por Al e na ausência ou presença de Si, para os tratamentos com presença de Si foram adicionados 2,0 $mmol\ L^{-1}$ (silicato de potássio, K_2SiO_3) devido ao fato que a partir de uma concentração de 2,0 $mmol\ L^{-1}$ de Si ocorre a precipitação do Si e, portanto não é possível a utilização de uma concentração maior (COSTA, 2012), os tratamentos que não receberam K_2SiO_3 , receberam uma complementação de potássio na solução nutritiva a fim de só se avaliar o efeito do Si na solução nutritiva em plantas jovens de cana-de-açúcar. As soluções foram trocadas a cada cinco dias, em virtude de possíveis alterações da composição química e das concentrações de Al. Este procedimento foi mantido até o final do experimento.

4.4. Osmólitos compatíveis: prolina (Pro) e glicina betaína (GB)

Os teores de prolina foram determinados pela adaptação do método de BATES et al. (1973). Utilizou-se 250 mg de material seco de raiz e de folha, utilizando-se a folha +1 segundo critério de KUIJPER (1915). A extração foi realizada em banho-maria a 100°C, por 30 min, homogeneizando as amostras em 5 mL de água destilada. Após centrifugação a 700 x g, por 20 min, o sobrenadante foi coletado e deste foi utilizado uma alíquota de 1 mL para a quantificação de prolina, iniciada pela adição de 1 mL de ninhidrina ácida e 1 mL de ácido acético glacial 99,5%. A mistura foi agitada e incubada a 100°C por 60 min. As amostras foram resfriadas em banho de gelo. Após o resfriamento foram adicionados 2 mL de

tolueno para a separação das fases. A fração contendo grupo cromóforo foi coletada e a absorbância determinada a 520 nm em espectrofotômetro (Beckman DU 640). A concentração de prolina foi determinada por meio de uma curva de calibração de prolina e o resultado expresso em mmolL prolina g⁻¹ de massa seca (MS).

A quantificação de GB foi determinada segundo o método de GRIEVE; GRATTAN (1983). As amostras de 250 mg de massa seca de raiz e folha (folha +1) foram maceradas em 2 mL de água destilada sob agitação constante, à temperatura ambiente, por um período de quatro horas, seguindo de centrifugação a 3.500 x g por 10 minutos, a 25°C. O sobrenadante foi coletado e dele retirado uma alíquota de 250 µL para a quantificação de GB. Para tanto, 250 µL de ácido sulfúrico concentrado foi adicionado a cada amostra, seguindo de incubação em banho de gelo por 1 hora. Após esse tempo, 200 µL de iodeto de potássio (à aproximadamente 8°C) foram adicionados e a mistura incubada por 16 horas a 0°C. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 3.500 g, por 15 min a 0°C e o resíduo coletado. Este foi lavado por duas vezes em 2 mL de ácido sulfúrico 1 N (à aproximadamente 8°C) e após centrifugação a 3.500 g, por cinco minutos a 0 °C, o precipitado dissolvido em 3 mL de 1,2-dicloroetano, por meio de agitação vigorosa. Após 2 horas e 30 minutos de repouso, foi realizada a leitura da absorbância das amostras em 365 nm, mediante espectrofotômetro (Beckman DU 640). Para os cálculos foi utilizada uma curva padrão de glicina betaína. Os resultados foram expressos em mg glicina betaína g⁻¹ MS.

4.5. Peroxido H₂O₂ e MDA

O teor de H₂O₂ foi determinado de acordo com GAY et al. (1999). As folhas foram homogeneizadas em metanol (5:1, volume de tampão: massa fresca) e centrifugou-se a 10.000 x g durante 5 min. A absorbância foi lida a 560 nm e o conteúdo de H₂O₂ foi determinado usando uma curva padrão.

O conteúdo de MDA foi determinado estimando-se as substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) e expresso em equivalentes de aldeído malônico (MDA) (CAKMAK; HORST, 1991). O tecido foliar (0,25 g) foi macerado na presença de nitrogênio líquido e homogeneizado com 0,1% (p/v) de ácido tricloroacético (TCA) e

20% de insolúvel polivinilpirrolidona. O homogenato foi centrifugado a 15000 x g por 15 min a 4°C. Foi adicionada uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante a 1,5 mL de 0,5% de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) (preparado em 20% de TCA). As amostras foram homogeneizadas e a reação colorimétrica foi conduzida a 90 °C por 20 min após incubação em banho-maria. A seguir, as amostras foram imersas em banho de gelo e clarificadas através de centrifugação a 15000 x g por 15 min a 4 °C. A absorbância das amostras foi lida a 532 nm e a absorbância inespecífica (660 nm) descontada, em espectrofotômetro (modelo Beckman DU 640, USA). A peroxidação de lipídios foi estimada como conteúdo total de substâncias reativas ao TBA e expressa como equivalentes de MDA. Os resultados foram expressos em nmol de MDA g⁻¹ MF.

4.6. Crescimento: acúmulo de biomassa

A massa seca da parte aérea e das raízes foi obtida após secagem em estufa de ventilação forçada à temperatura de 65 °C até peso constante.

4.7. Clorofilas

A determinação de clorofilas a e b foi realizada a partir de 0,025g de tecido foliar (folha +1) em Eppendorf protegido da luminosidade com papel alumínio que foram adicionadas a 2 mL de acetona 80% e mantidos sobre refrigeração pelo período de 48 h (LICHTENTHALER, 1987). Os extratos obtidos foram submetidos às leituras de absorbância, utilizando-se espectrofotômetro Beckman DU 640, nos comprimentos de onda de 663 nm, 645 nm e 652 nm. A leitura realizada no comprimento de onda 663 nm corresponde ao pico de maior absorção da clorofila a; no comprimento de onda 645 nm corresponde ao pico de maior absorção da clorofila b e no comprimento de onda 652 nm corresponde ao pico de maior absorção de clorofila total (a + b). Diante disso, a partir dos dados das leituras de absorbância foram calculados os teores das clorofilas a, b, total (a + b) e razão clorofila a/b, expressos em mg g⁻¹ de massa de matéria fresca, de acordo com as fórmulas propostas por ARNON (1949):

$$\text{Clorofila } \underline{a} = (12,7 \times (A_{663}) - 2,69 \times (A_{645})) \times \frac{V}{1000 \times W}$$

$$\text{Clorofila } \underline{b} = (22,9 \times (A_{645}) - 4,68 \times (A_{663})) \times \frac{V}{1000 \times W}$$

$$\text{Clorofila total } (\underline{a} + \underline{b}) = \frac{((A_{652}) \times 1000)}{34,5} \times \frac{V}{1000 \times W}$$

$$\text{Razão clorofila } \underline{a/b} = \frac{4,70 A_{663} - A_{645}}{4,87 A_{645} - A_{663}} \times 0,574$$

onde:

A = absorvância (nm);

V = volume final do extrato (acetona 80% + clorofila);

W = massa fresca das amostras (g).

4.8. Anatomia de raízes

Os estudos morfoanatomicos das raízes foram realizados segundo a orientação do Prof. Dr. Eduardo Custodio Gasparino no laboratório de morfologia vegetal da Universidade Estadual Paulista – FCAV, Câmpus de Jaboticabal.

Para verificar as alterações anatômicas provocadas pelo Al no sistema radicular, porções de aproximadamente 5 mm do ápice da raiz principal foram coletadas e armazenadas em frascos de vidro contendo solução de FAA (Formalina-aceto-álcool: 90 mL de etanol 50%, 5 mL de ácido acético glacial e 5 mL de formaldeído a 37%). Para o preparo das lâminas permanentes, as amostras foram desidratadas utilizando-se a série alcoólica com álcool butílico terciário seguindo protocolo de JOHANSEN (1940). As pequenas porções apicais da raiz principal foram incluídas em blocos de parafina, seccionadas transversalmente em micrótomo rotativo LEICA RM 2065, e aderidas às lâminas histológicas com adesivo de Meyer. As secções foram contrastadas com safranina, e para a montagem final da lâmina

foi utilizado balsamo do Canadá como adesivo para a lâminula (MÔRO, 2000). A avaliação ocorreu através da mediação da espessura geral da raiz e da espessura dos vasos condutores e o material foi observado e fotografado em fotomicroscópios JENAVAL Carl Zeiss e Bel Photonics.

4.9. Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as diferenças significativas entre os tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. A análise estatística dos dados foi realizada pelo software estatístico AgroStat (BARBOSA; MALDONADO JÚNIOR, 2011).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foram avaliados parâmetros bioquímicos-fisiológicos do efeito atenuador do Si no estresse por Al que possam se tornar candidatos à manipulação gênica para aumentar a tolerância em plantas jovens de cana-de-açúcar cultivada em solos ácidos. Também, o efeito do Si verificado no cultivo das plantas jovens de cana-de-açúcar sob toxidez de Al em hidroponia, mostrou-se ser *in plant* que *ex planta*. De acordo com HORST et al. (2010), pode ocorrer complexação do Si-Al tornando indisponível à planta (*ex planta*). Mas, diante dos resultados encontrados pelas avaliações realizadas neste trabalho o Si foi absorvido pelas plantas, os efeitos tóxicos do Al foram minimizados pelo metabolismo vegetal. Muitos estudos corroboram que existe efeito mitigador do Si *in plant* sob toxicidade de Al (HORST et al., 2010; GIONGO; BOHNEN, 2011; DORNELES et al, 2016 e LIMA et al., 2016). Porém, os resultados evidenciaram que, tanto na parte aérea quanto nas raízes das plantas jovens de cana-de-açúcar sob toxidez Al, a presença de Si causou acentuada redução de Pro (Figura 1A e 1B).

Na parte aérea, em cada concentração de Al, a redução de Pro foi de 45%, 41% e 26%, respectivamente, para 10, 15 e 20 mg L⁻¹, enquanto que nas raízes, as mesmas concentrações de Al causaram redução de 41% 38% e 45%. Nossos resultados corroboram com os encontrados por SHAHNAZ et al. (2011) em plantas de borragem (*Borago officinalis* L.) sob toxidez de Al, que apresentaram menor acúmulo de Pro quando tratadas com Si. RIZWAN et al. (2015) destacam que, a redução de Pro ocorre em muitas espécies vegetais sob estresse e tratadas com Si. Também, o Si causou redução de Pro, mesmo em plantas não estressadas (0,0 mg L⁻¹ de Al), com diminuição de 45% e 36%, na parte aérea e nas raízes, respectivamente. Como na ausência do Al, o Si também causa decréscimo nos teores de Pro, pode-se inferir que, provavelmente, o Si exógeno provoque maior degradação ou menor síntese do aminoácido estando ou não a planta sob estresse. Assim, o resultados deste trabalho são corroborados por estudos em plantas não estressadas de trigo (TUNA et al., 2008; PEI et al., 2010), de soja (LEE et al., 2010)

e sorgo (YIN et al., 2013), que verificaram acentuada redução de Pro quando o Si foi adicionado. Deste modo, na ausência de Si, plantas estressadas apresentam

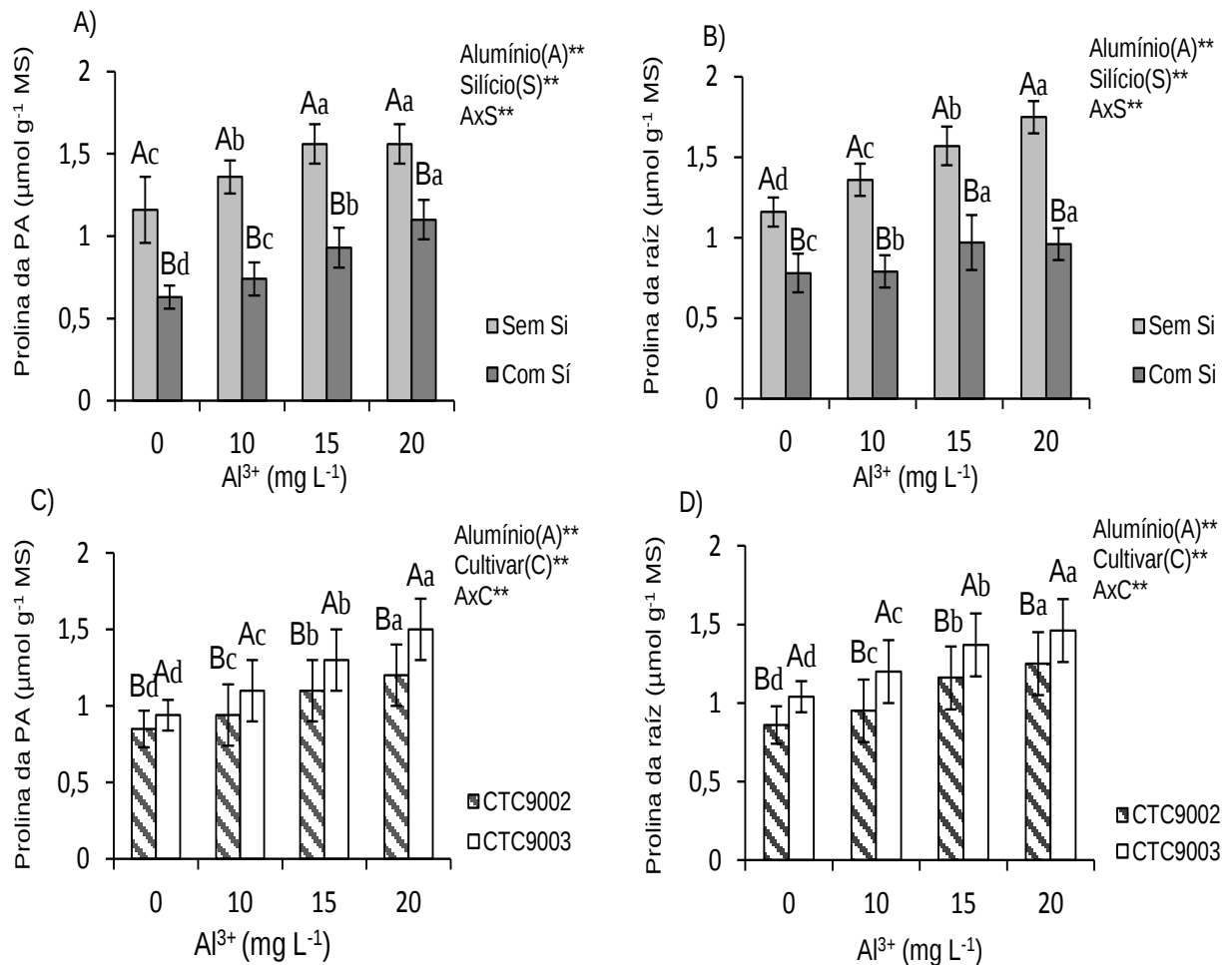


Figura 1. Acúmulo de prolina em plantas jovens de cana-de-açúcar sob concentrações de Al^{3+} , na ausência e presença de Si. A e B) concentrações de Al^{3+} na ausência e presença de Si; C) e D) concentrações de Al^{3+} em cada cultivar. Teste F^{ns} não significativo, $*p<0,05$; $**p<0,01$. Letras maiúsculas iguais (em cada concentração de Al) e letras minúsculas iguais (entre as concentrações de Al) não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$). As barras indicam o desvio padrão da média de três repetições. Coeficiente de variação (C.V%) igual a 1,59 para acúmulo de Pro da parte aérea e 1,74 para acúmulo de Pro na raiz. Parte Aérea (P.A.).

acúmulo significativo de Pro, vindo ao encontro de pesquisas, as quais relacionam Pro e estresses, que relatam aumento de 100 vezes dos teores de Pro contribuindo substancialmente para o ajuste osmótico citosólico (SZÁBADOS et al., 2011; HAYAT et al., 2012; SHARMA et al., 2014).

Os resultados deste trabalho mostram ainda que, conforme houve aumento da toxidez de Al, em ambas cultivares de cana-de-açúcar, houve aumento nos teores de Pro na parte aérea e nas raízes, independente da presença de Si (Figura 1A e 1B). YIN et al. (2013) trabalhando com sorgo, planta acumuladora de Si como cana-de-açúcar, verificaram que o Si induziu ao maior acúmulo de Pro conforme aumento das concentrações de estresse salino. Por outro lado, o efeito de redução de Pro em plantas estressadas e com adição de Si pode basear-se nos resultados de pesquisas, as quais sugerem que o acúmulo de Pro nestas plantas é um sintoma de injúria, ao invés de indicador de tolerância ao estresse. Neste contexto, como a biossíntese de Pro demanda elevado gasto energético, a redução dos teores poderiam beneficiar a planta estressada pela energia que seria destinada para responder ao estresse por outras vias que não o acúmulo do osmólito (YIN et al., 2013). YIN et al. (2013) relatam que, o menor acúmulo de Pro em plantas de sorgo sob estresse salino e tratadas com Si pode ser interpretado como efeito atenuador do Si, considerando que a presença de Si pode ter favorecido as plantas a ficarem menos estressadas e, por consequência, apresentarem menor acúmulo de Pro. Por outro lado, estudando estresse por deficiência hídrica em trigo mostram que o Si exógeno provocou aumento no conteúdo de Pro, indicando que o Si pode ser associado ao ajuste osmótico deste osmólito (AHMAD; HADDAD, 2011). Os teores de Pro foram determinados na parte aérea e nas raízes, pois autores ressaltam que, pode haver significativa diferença no acúmulo de Pro nos diferentes órgãos que nas plantas intactas quando expostas ao estresse por Al (SHAHNAZ et al., 2011; REJEB et al., 2014). Com base nos resultados de maior teor de Pro em genótipo de milho tolerante ao Al comparado com o sensível, o conteúdo de Pro pode ser um parâmetro importante que evidencie a diferença entre as cultivares em resposta à toxicidade de Al (GIANNAKOULA et al., 2008; GUO et al., 2012). Porém, estudos mais detalhados são necessários para explorar os mecanismos acionados pelo Si exógeno para amenizar o ajuste osmótico nas plantas (RIZWAN et al., 2015).

Nossos resultados revelaram que, na comparação de ambas as cultivares sob efeito de Al tóxico, houve maior acúmulo de Pro na cv. CTC9003, em 24%, 17% e 26% na parte aérea e 26%, 17% e 16% nas raízes, respectivamente para as concentrações de 10, 15 e 20 mg L⁻¹ de Al, indicando que esta cultivar mais tolerante aos efeitos tóxicos do Al que a cv. CTC9002 (Figura 1C e 1D).

Muitas espécies de plantas acumulam GB, como principal osmólito compatível quando submetidas aos estresses ambientais. Neste estudo, em cada concentração de Al o Si causou redução significativa dos teores de GB, na parte aérea e nas raízes, em comparação ao tratamento sem estresse (Figura 2A e 2B).

Na parte aérea a redução de GB foi de 33%, 37% e 40%, respectivamente para 10, 15 e 20 mg L⁻¹ (Figura 2A). Para as raízes, as mesmas concentrações de Al, também causaram redução, com valores de 31%, 36% e 45% (Figura 2B). Estes resultados mostram que, a concentração mais severa de Al (20 mg L⁻¹) causou maior redução de GB nas raízes que na parte aérea. Estes dados são concordantes com os encontrados para milho sob deficiência hídrica no solo, em que o Si causou decréscimo acentuado de GB (MOTA et al., 2015). Em plantas não estressadas (0,0 mg L⁻¹ de Al), o Si também causou redução de 20% de GB, apenas nas raízes (Figura 2B). Na parte aérea, o Si exógeno não alterou os teores de GB em 0,0 mg L⁻¹ de Al (Figura 2A). Assim, a redução de GB na parte aérea provocada pelo Si, pode ser atribuída ao efeito do estresse por Al. Também, conforme houve aumento das concentrações de Al, o efeito do Si na redução de GB foi mais acentuada nas raízes, principalmente, considerando-se os resultados das concentrações mais severas de 15 mg L⁻¹ e 20 mg L⁻¹, com 8,6% de decréscimo de GB, evidenciando significativa diferença (Figura 2B). Na parte aérea a diminuição entre as concentrações, 15 mg L⁻¹ e 20 mg L⁻¹, com 2,17%, evidenciando semelhança estatística (Figura 2A). Assim, as plantas jovens de cana-de-açúcar sob estresse por Al evidenciaram que, nas raízes houve quatro vezes menos GB que na parte aérea (Figura 2B). Estudos com várias espécies vegetais mostrando que, quantidades maiores de GB na parte aérea podem ser atribuídas à presença de enzimas participantes da biossíntese (colina monooxidase, CMO e betaína aldeído desidrogenase, BADH) presentes no estroma dos cloroplastos das folhas (AHMAD; HADDAD, 2011; CHEN; MURATA, 2011; GIRI, 2011). Portanto, a menor quantidade nas raízes pode ter sido devido às

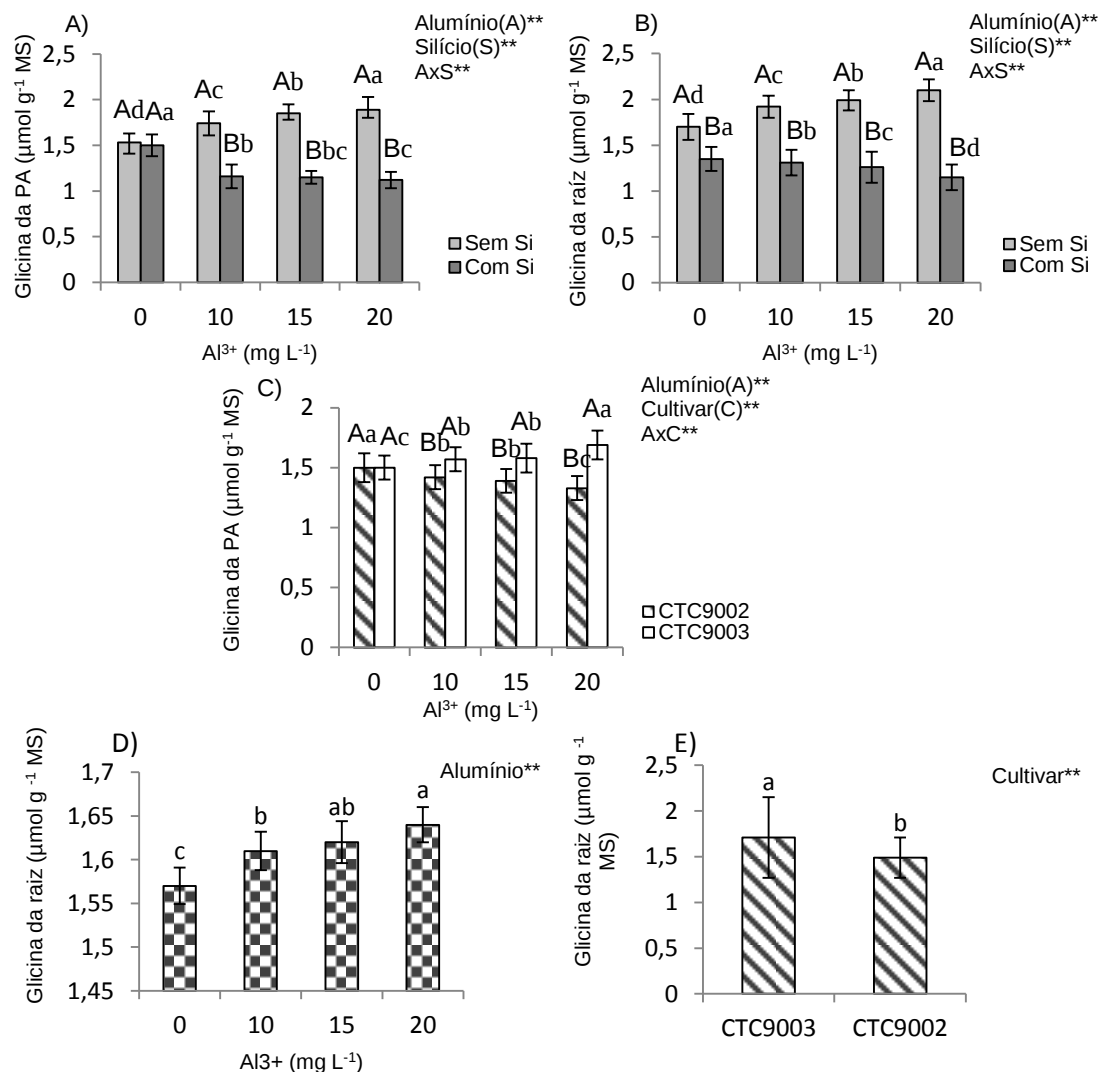


Figura 2. Acúmulo de glicina betaina (GB) em plantas jovens de cana-de-açúcar sob concentrações de Al^{3+} , na ausência e presença de Si. A) e B) concentrações de Al^{3+} na ausência e presença de Si; C) concentrações de Al^{3+} em cada cultivar; D) Concentrações de Al^{3+} e E) Cultivares. Teste F^{ns} não significativo, $*p < 0,05$; $**p < 0,01$. Letras maiúsculas iguais (em cada concentração de Al) e letras minúsculas iguais (entre as concentrações de Al) não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As barras indicam o desvio padrão da média de três repetições. Coeficiente de variação (C.V%) igual a 2,97 para teor de GB da parte aérea e 4,27 para teor de GB na raiz. Parte Aérea (P.A.).

enzimas participantes da biossíntese não estarem presentes nos vacúolo ou em outros plastídios, já que cloroplastos são ausentes neste órgão. Nas raízes, a compartimentalização de GB pode ocorrer no vacúolo, apesar de AHMAD; HADDAD (2011) e CHEN; MURATA (2011) afirmarem que a real compartimentalização da GB ainda não foi esclarecida. De modo geral, os resultados deste trabalho mostram que, o Si causa redução nos níveis de GB nas plantas sob toxidez de Al. AHMAD; HADDAD (2011) e SHAHID et al. (2015) verificaram que, em trigo sob deficiência hídrica e em ervilha sob estresse salino, respectivamente, o Si aumentou significativamente o conteúdo de GB. Nossos resultados mostram que o aumento de GB ocorreu na ausência de Si, tanto na parte aérea quanto nas raízes sob estresse por Al (Figura 2A e 2B). Ao contrário dos resultados para Pro, neste caso o Si não causou menor aumento. Provavelmente, o Si tenha modificado rotas metabólicas que conduziram à degradação ou diminuição da biossíntese de GB. Nos estudos de MOTA et al. (2015) em milho sob deficiência hídrica, a presença de 2,0 mM de Si causou maior redução de GB raízes (90%) que na parte aérea (41,5%) indo ao encontro dos resultados verificados para a mesma concentração de Si utilizada neste trabalho. Conforme houve aumento das concentrações de Al, tanto na parte aérea quanto nas raízes houve redução significativa de GB na presença de Si (Figura 2A e 2B). Isto indica que o Si não deve atenuar a toxidez de Al pela participação da GB como osmólito compatível. Ainda, de acordo com LOBATO et al. (2009) e MOTA et al. (2015) o Si pode causar maior potencial hídrico celular ($>\Psi$) e, consequentemente, a GB não é acumulada com função de osmólito compatível. Na comparação de ambas as cultivares, verificou-se que o Al tóxico aumentou os teores de GB na parte aérea da cv. CTC9003, em 14%, 15% e 20%, respectivamente, para as concentrações de 10, 15 e 20 mg L⁻¹ de Al, quando comparado com a cv. CTC9002 (Figura 2C). Genótipos tolerantes normalmente acumulam mais GB do que os genótipos sensíveis em resposta ao estresse (SUPRASANNA et al., 2016). Como osmólito compatível em plantas estressadas, a GB tem a função de proteger a fotossíntese e a estrutura quaternária das proteínas, melhorando a reparação da PSII, que conduz a uma maior tolerância ao estresse (CHEN; MURATA, 2008; GIRI, 2011). Na comparação das cultivares, apesar de não ter sido constatada interação significativa das cultivares e toxidez de Al, pelo estudo dos fatores isolados

(cultivares ou concentrações de Al), verificou-se que, as raízes de ambas cultivares apresentam maior conteúdo de GB sob estresse de Al (Figura 2D). Porém, destaca-se que cv. CTC9003 apresenta mais GB que a cv. CTC9002 (Figura 2E). Considerando que, as plantas mais tolerantes ao estresse acumulam mais osmólito compatível que plantas sensíveis, o aumento de GB pode atuar na osmoproteção no ajuste osmótico da cv. CTC9003 sob estresse por Al.

Como a toxidez de Al está relacionada com a produção de ERO no estresse oxidativo, os resultados deste trabalho evidenciam que, o Si atenuou este estresse pela redução da peroxidação lipídica, tanto na parte aérea quanto nas raízes de ambas cultivares (Figura 3A, 3B, 4A e 4B).

Tanto na parte aérea quanto nas raízes sob toxidez de Al, a produção de H_2O_2 foi menor na presença de Si (Figura 3A e 3B). Em consequência, o MDA foi reduzido (Figura 4A e 4B). Estes resultados são corroborados por estudos de SHAHNAZ et al. (2011) os quais verificaram que, a aplicação exógena de Si neutraliza os impactos negativos de Al em borago causando redução da peroxidação lipídica. Também, nossos resultados corroboram com os encontrados por LIMA et al. (2016) que estudando eucalipto sob toxidez de Al, verificaram que a concentração de 2.0 mmol L^{-1} de Si causou significativa redução de MDA em comparação com as plantas sem adição de Si. Segundo estes autores, a redução de H_2O_2 e do MDA causada pelo Si evidencia que, este elemento atua na prevenção da deteriorização estrutural e funcional da permeabilidade da membrana e nas membranas e na estimulação de vias antioxidantes contra os danos oxidativos causado pela toxidez do Al. Embora tenha havido atenuação da toxidez do Al pelo Si nas cultivares de cana-de-açúcar, esta atenuação não foi capaz de evitar que houvesse aumento do conteúdo de H_2O_2 e de MDA com relação à severidade da toxidez de Al (Figura 3A, 3B, 4A e 4B). Na parte aérea das plantas tratadas com Si, todas as concentrações de Al tóxico provocaram aumento de H_2O_2 e de MDA, enquanto que nas raízes isto ocorreu somente em 20 mg L^{-1} de Al tóxico (Figura 4B). Porém, considerando a severidade do estresse por Al, ainda se observa que, aplicação de Si atenuou a peroxidação lipídica comparada com os resultados com ausência de Si, pois na presença do elemento tanto o H_2O_2 e MDA evidenciaram menor aumento. Estes resultados são coincidentes aos encontrado para Pro (Figura 1A e 1B),

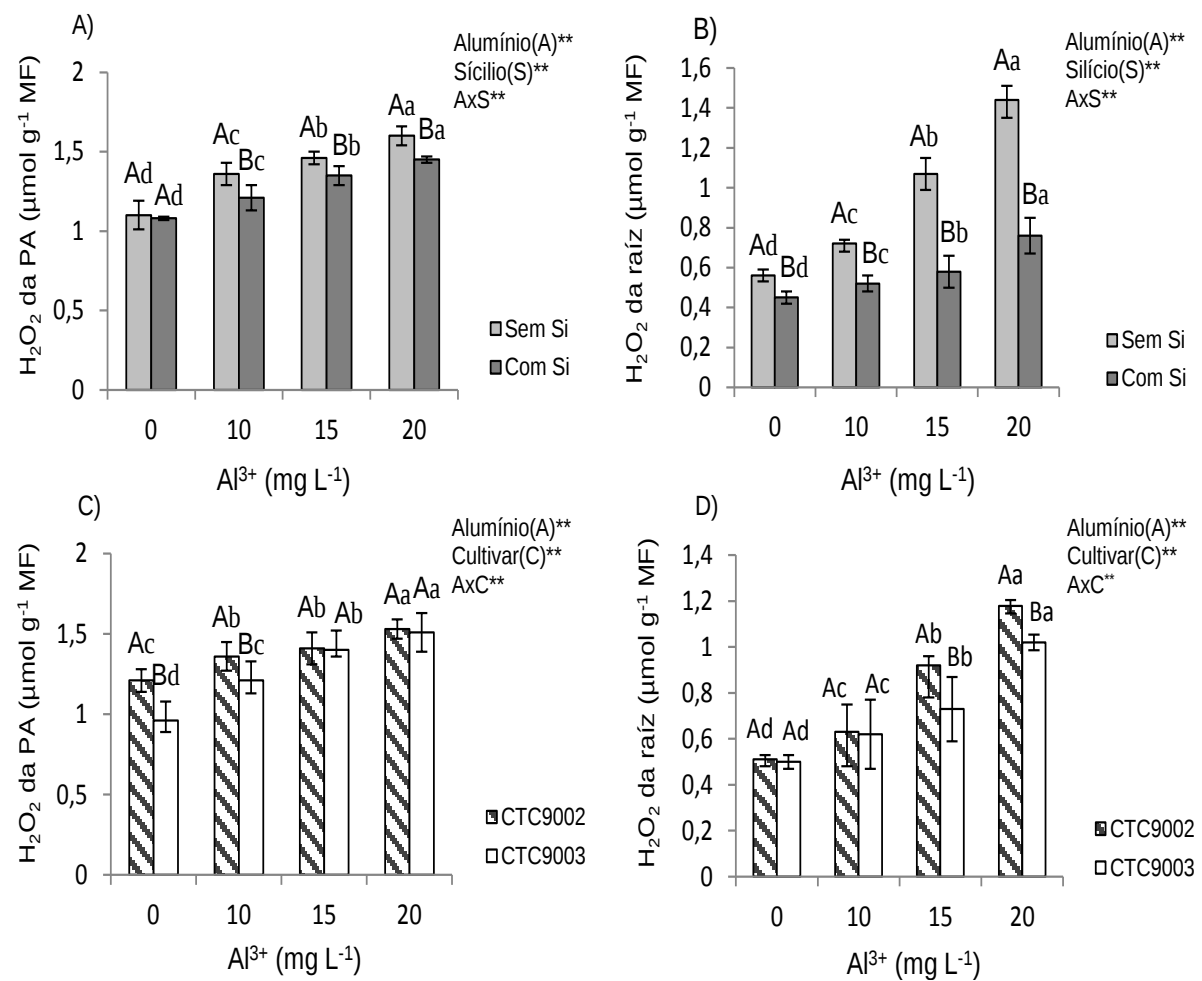


Figura 3. Peróxido de hidrogênio em plantas jovens de cana-de-açúcar sob concentrações de Al³⁺, na ausência e presença de Si. A) e B) concentrações de Al³⁺ na ausência e presença de Si; C) e D) concentrações de Al³⁺ em cada cultivar. Letras maiúsculas iguais (em cada concentração de Al) e letras minúsculas iguais (entre as concentrações de Al) não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). Teste F^{ns} não significativo, *p<0,05; **p<0,01. As barras indicam o desvio padrão da média de três repetições. Coeficiente de variação (C.V%) igual a 2,97 para acúmulo de H₂O₂ da parte aérea e 4,27 para acúmulo de H₂O₂ na raiz. Parte Aérea (P.A.).

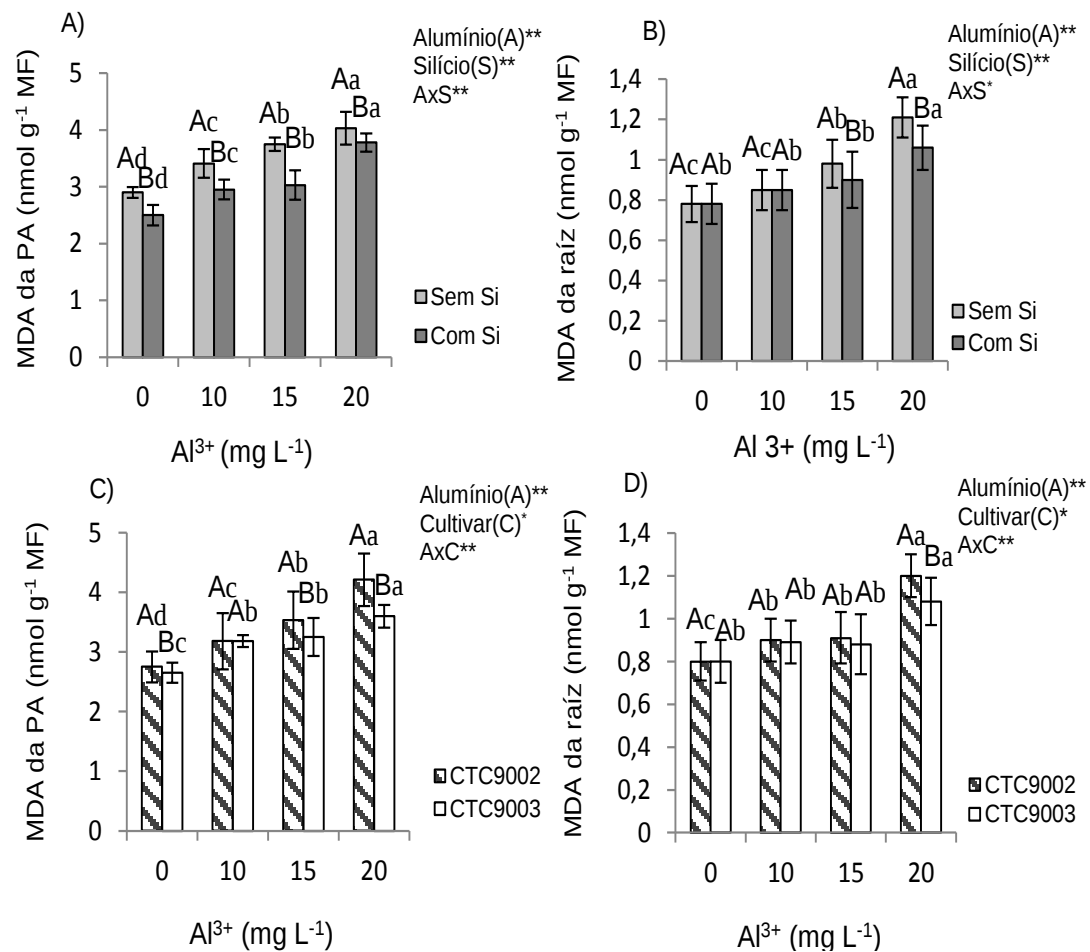


Figura 4. Acúmulo de MDA de plantas jovens de cana-de-açúcar sob concentrações de Al³⁺, na ausência e presença de Si. A) e B) concentrações de Al³⁺ na ausência e presença de Si; C) e D) concentrações de Al³⁺ em cada cultivar. Teste F^{ns} não significativo, *p<0,05; **p<0,01. Letras maiúsculas iguais (em cada concentração de Al) e letras minúsculas iguais (entre as concentrações de Al) não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). As barras indicam o desvio padrão da média de três repetições. Coeficiente de variação (C.V%) igual a 2,64 para acúmulo de MDA na parte aérea e 8,65 para acúmulo de MDA na raiz. Parte Aérea (P.A.).

em que o aumento de Pro da menor a maior concentração de Al foi menor comparado com os resultados com ausência de Si. Os resultados evidenciados para Pro (Figura 1A e 1B) e para a peroxidação lipídica (3A, 3B, 4A e 4B) podem ser encontrar explicação nos relatos de REJEB et al. (2014). Estes autores salientaram que, pode existir correlação positiva entre a ativação do metabolismo de Pro pela sinalização de ERO, em plantas sob estresse. Estes autores salientam que, a correlação positiva é devido à ERO mediar o acúmulo de Pro pela ativação da isoforma da enzima de síntese de Pro, pirrolina-5-carboxilase sintetase (P5CS1 e P5CS2), ou inibição da enzima da degradação de Pro, pirrolina-5-carboxilase desidrogenase (P5CDH).

Quanto à comparação de ambas cultivares, nossos resultados revelaram que, sob efeito de Al tóxico houve maior peroxidação lipídica na cv CTC9002 que na CTC9003 (Figuras 3C, 3D, 4C e 4D). Em plantas tolerantes à toxidez de Al, ocorre menor acúmulo de H_2O_2 que em planta sensível (TAHARA et al., 2008). Ambas as cultivares evidenciaram aumento da peroxidação lipídica conforme houve aumento das concentrações de Al (Figuras 3C, 3D, 4C e 4D). Em pesquisas realizadas por vários autores foi constatado que com a maior severidade do estresse do Al houve maior acúmulo de H_2O_2 e MDA (TABALDI et al., 2009; GIANNAKOULA et al., 2010; GUO et al., 2012). De fato, plantas que crescem em solos com elevados níveis de Al exibem elevados níveis dos indicadores de estresse, como o H_2O_2 e MDA (MATSUMOTO; MOTODA, 2012; NOGUEIROL et al., 2015). Como a cv CTC9003 apresentou maior quantidade de Pro e GB em comparação com a cv. CTC9002, a peroxidação lipídica foi menor na a cv CTC9003, provavelmente, pelo fato de Pro e GB atuarem como inibidores do estresse oxidativo (Figura 1C, 1D, 2C e 2D). MOLINARI et al. (2007) verificaram que, houve aumento de Pro e redução de H_2O_2 e MDA em plantas transformadas para superprodução deste osmólito. GIANNAKOULA et al. (2010) verificam que existe correlação entre aumento de Pro e diminuição da peroxidação lipídica em milho tolerante ao estresse por Al. COOKE; LEISHMAN, (2016) consideram marcadores oxidativos o aumento do conteúdo de H_2O_2 , MDA e Pro, enquanto que CHEN; MURATA, (2011) e WANI et al. (2013) destacam GB como marcador bioquímico em várias plantas sob estresse.

A importância da avaliação dos teores de clorofilas nas folhas de plantas sob estresse reside na evidência da estreita relação destes pigmentos com a fotossíntese e produtividade. Tais pigmentos são considerados biomarcadores indiretos de plantas sob estresse. Neste estudo, a toxicidade causada pelo Al causou redução significativa nos teores de clorofila a, clorofila b, clorofila total (a+b) e na razão de clorofila a/b. Tais resultados são concordantes com os encontrados por CARLIN et al. (2009) que verificaram redução significativa das clorofilas em plantas jovens de cana-de-açúcar cultivada em solo ácido com disponibilidade tóxica de Al. Contudo, a adição de Si provocou acentuada inibição deste decréscimo (Figura 5A, 5B, 5C e 5D). Assim, os resultados indicam que, nas concentrações de 10, 15 e 20 mg L⁻¹ de Al, a presença de Si causou aumento da clorofila a de 8%, 21% e 31%, (Figura 5A), clorofila b de 16%, 41% e 49% (Figura 5B), clorofila total de 11%, 22% e 43% (Figura 5C) e razão clorofila a/b de 2%, 23% e 42% (Figura 5D). Estes resultados mostram que, o Si pode estar relacionado com os teores de Mg e N, reduzindo os efeitos tóxicos do Al na absorção ou transporte destes nutrientes, principais constituintes da molécula de clorofilas. Estudos relacionam a toxidez do Al com a redução da absorção, transporte e utilização dos nutrientes minerais nas plantas (ROUT et al., 2001). De fato, estudos dos efeitos do Al na nutrição mineral de trigo evidenciam que a translocação do Mg é reduzida (SILVA et al., 2010). Além do mais, Al e Mg competem pelos mesmos transportadores de membrana e nos locais de ligação de metal em enzima (BOSE et al., 2011). O transporte de N é negativamente afetado pela toxidez do Al em plantas (GIANNAKOULA, et al., 2008). Ainda, o Al inibe a atividade da redutase do nitrato e da glutamina sintetase em arroz (MISHRA et al., 2011). Também, pode estar relacionado com a atividade da enzima δ-aminolevulinato desidratase (δALA-D), que é muito sensível à toxidez de vários metais como o Al, e tem por função regular o desenvolvimento do cloroplasto e o rápido acúmulo de clorofila que ocorre nesta fase (PEREIRA et al., 2010). A presença de Si deve, provavelmente, ter inibido os efeitos prejudiciais do Al na nutrição e atividade enzimática das plantas jovens de cana-de-açúcar. Verifica-se, também, que a presença de Si causou maior atenuação dos efeitos tóxicos do Al nos teores de clorofila b que nos teores de clorofila a, considerando o aumento percentual que ocorreu no tratamentos Al com Si, clorofila

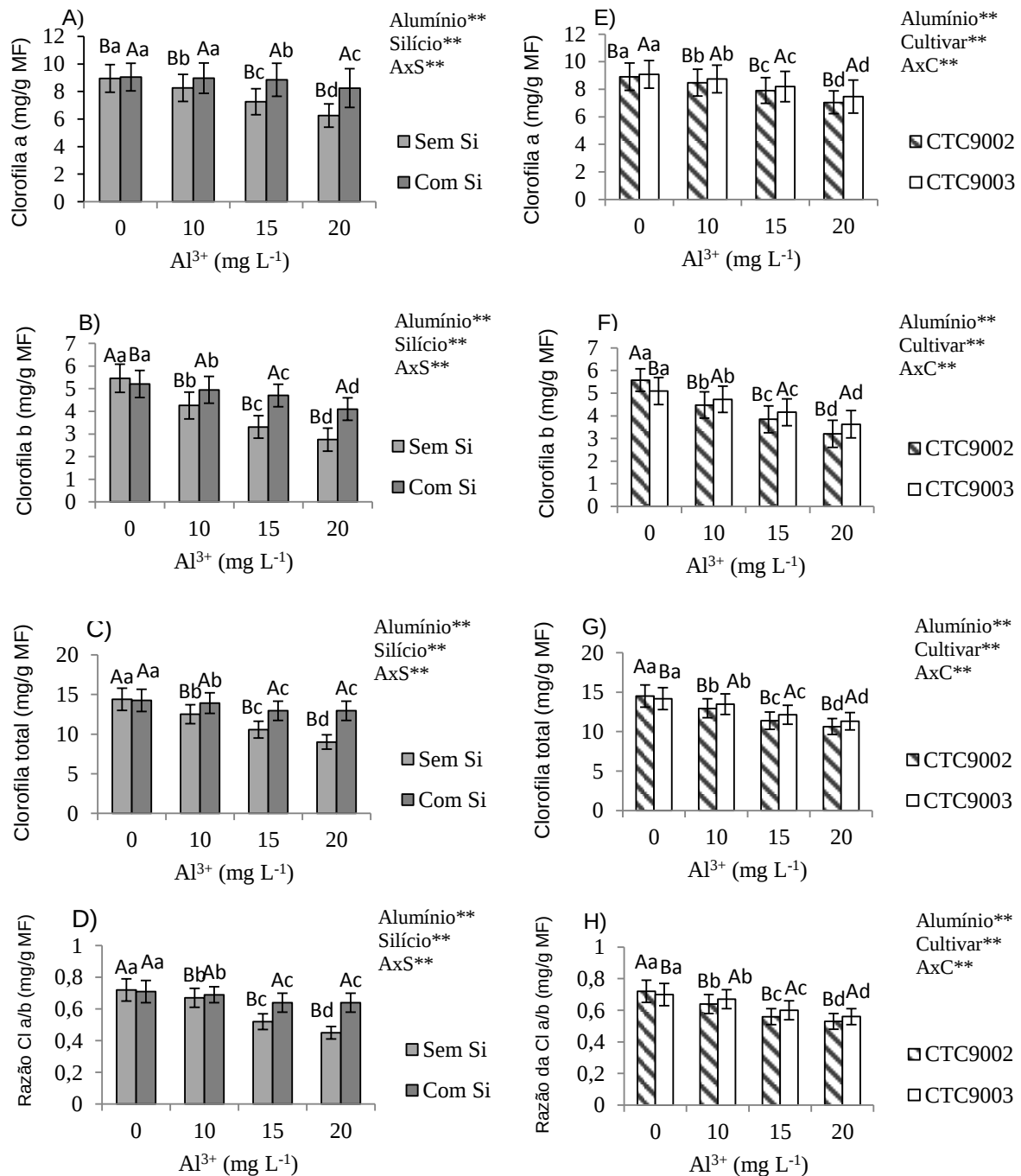


Figura 5. Teor de clorofila a (A), clorofila b (C) e clorofila total (E) de plantas jovens de cana-de-açúcar sob concentrações de Al³⁺, na ausência e presença de Si. Clorofila a (B), clorofila b (D) e clorofila total (F) de cada cultivar sob concentrações de Al³⁺. Teste F ^{ns} não significativo, *p<0,05; **p<0,01. Letras maiúsculas iguais (em cada concentração de Al) e letras minúsculas iguais (entre as concentrações de Al) não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). As barras indicam o desvio padrão da média de três repetições. Coeficiente de variação (C.V%): 0,67 Clorofila a, 3,6 clorofila b, 1,36 clorofila total e 1,3 Razão da Clorofila a/b.

a de 8%, 21% e 31%, (Figura 5A) da clorofila b de 16%, 41% e 49% (Figura 5B),. Interessante, pelo fato da clorofila a ser o principal pigmento para a atividade fotoquímica da fotossíntese e a clorofila b atuar neste processo, como pigmento acessório. Ambas as clorofilas nas membranas tilacoidias, ocorrem na razão clorofila a/clorofila b de aproximadamente 3 para 1 (LICHTENTHALER et al, 1981).

Na comparação de ambas as cultivares, verificou-se que o Al tóxico aumentou os teores de clorofila a, clorofila b, clorofila total e a razão da clorofila a/b da cv. CTC9003, em 3%, 3% e 5%, para clorofila a, 5%, 8% e 13% para clorofila b, 4%, 5% e 7% para clorofila total e 5%, 8% e 13% para razão de clorofila a/b, para as concentrações de 10, 15 e 20 mg L⁻¹ de Al, quando comparado com a cv. CTC9002 (Figura 5E, 5F, 5G e 5H). Porém conforme houve aumento das concentrações de Al, houve redução dos teores de clorofila a, clorofila b, clorofila total e razão de clorofila a/b, no entanto esta redução foi menor para a cv. CTC9003 quando comparada com a cv. CTC9002. A presença de Si inibiu os efeitos tóxicos do Al sobre o conteúdo de clorofila a e b na cv. CTC9003 em comparação com a cv. CTC 9002.

A aplicação de Si pode minimizar os efeitos dos estresses que reduzem o crescimento vegetal. De fato, os resultados deste trabalho mostram que, a presença de Si incrementou o crescimento da parte aérea e raízes de ambas cultivares de cana-de-açúcar (Figuras 6A e 6B). Este aumento significativo ocorreu em todas as concentrações de Al, pois o Si causou aumento da massa seca da parte aérea e das raízes (Figuras 6A e 6B). Várias hipóteses foram relatadas por LIANG et al., (2007), dentre as quais estão a redução da peroxidação lipídica nas membranas via estimulação de antioxidantes não-enzimáticos, que podem explicar a tolerância de plantas à toxidez de vários íons de metais, incluso o Al. Também, nossos resultados evidenciam que em plantas não estressadas (0,0 mmol L⁻¹ Al), a presença de Si causou aumento de 12% no crescimento da parte aérea e 13% no crescimento das raízes (Figuras 6A e 6B), revelando o efeito benéfico para o crescimento mesmo em planta acumuladora do Si, como cana-de-açúcar. Por outro lado, o aumento das concentrações de Al mesmo em plantas com Si causou redução acentuada do crescimento da parte aérea e do sistema radicular (Figura 6A e 6B). Estes resultados podem, primeiramente, serem interpretados como a não atenuação pelo

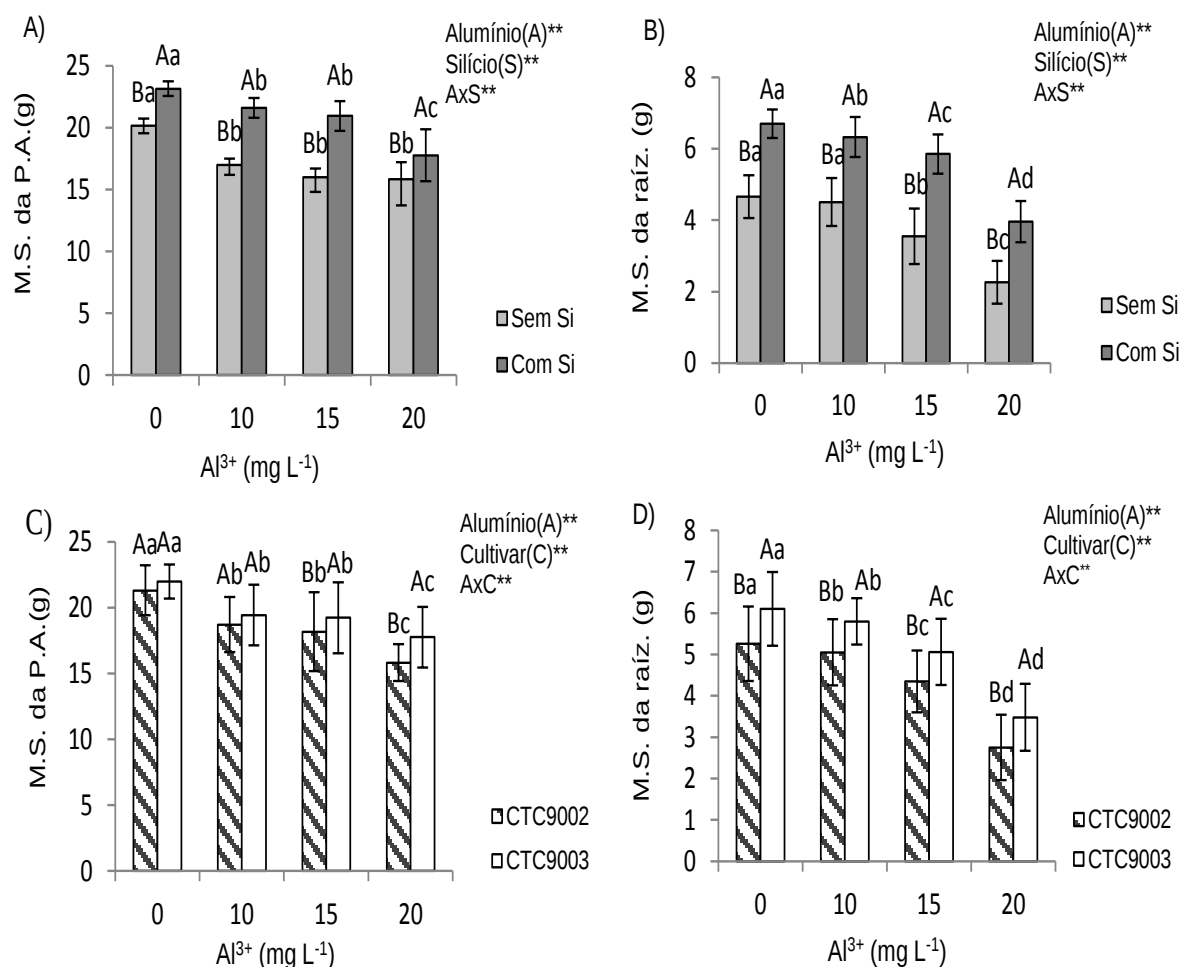


Figura 6. Crescimento (Massa seca (M.S)) de plantas jovens de cana-de-açúcar sob concentrações de Al^{3+} , na ausência e presença de Si. A) e B) concentrações de Al^{3+} na ausência e presença de Si; C) e D) concentrações de Al^{3+} em cada cultivar. Letras maiúsculas iguais (em cada concentração de Al) e letras minúsculas iguais (entre as concentrações de Al) não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$ Teste F ^{ns} não significativo, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). As barras indicam o desvio padrão da média de três repetições. Coeficiente de variação (C.V%) igual a 2,64 para massa seca da parte aérea e 8,00 para massa seca de raiz. Parte Aérea (P.A.).

Si exógeno no crescimento das plantas sob estresse por Al, mas verifica-se que, houve menor redução do crescimento na presença de Si (Figura 6A e 6B). Em plantas de cana-de-açúcar sob estresse salino, a adição de Si na cultivar sensível aumentou significativamente o crescimento da parte aérea e das raízes (ASHRAF et al., 2010). Também, a redução do crescimento pelo efeito tóxico do Al mesmo na presença de Si pode ser relacionada com os resultados de Pro. Mesmo tendo ocorrido ajuste osmótico, pelo aumentado dos teores de Pro na presença de Si (Figura 1A e 1B), a síntese de solutos compatíveis é um processo metabólico ativo, i.e., exige muita energia e este gasto energético na síntese não é direcionada para o aumento significativo de biomassa (MARIJUAN; BOSCH, 2013). O acúmulo de Pro não deve estar unicamente associado ao ajuste osmótico, pois em plantas transgênicas sob estresse, Molinari et al. (2007) verificaram que a superexpressão da enzima chave da biossíntese de Pro (P5CS), provocou significativo aumento do crescimento em comparação com as plantas selvagens e o ajuste osmótico evidenciado pelo conteúdo hídrico celular foi semelhante nas plantas transgênicas e selvagens.

Comparando ambas as cultivares, em cada concentração de Al, verificou-se que o efeito do Al tóxico no crescimento da parte aérea e das raízes da cv. CTC9003 foi maior que a cv. CTC9002 (Figuras 6C e 6D). O crescimento da parte aérea da cv. CTC9002 foi menor em 15 e 20 mg L⁻¹ de Al. O crescimento das raízes da CTC9002 (Figura 6D) foi menor em todas as concentrações de Al. Porém, pelo fato desta cultivar possuir menor crescimento de raízes que a cv. CTC9003 no tratamento isento de Al, não se pode aferir que a toxidez de Al causou redução do crescimento (Figura 6D). Todavia, considerando a severidade do estresse por Al, ambas as cultivares mostraram redução acentuada do crescimento da parte aérea e das raízes (Figuras 6C e 6D). O crescimento das raízes de plantas não estressadas da cv. CTC9002 foi 14% menor que o crescimento da cv. CTC9003, evidenciando que a cv. CTC9002 de cana-de-açúcar é menos produtiva que a cv. CTC9003.

Os efeitos deletérios da toxidez de Al nas plantas ocorrem principalmente nas raízes e neste trabalho foi verificado que o Si exógeno atuou na minimização destes efeitos nas raízes de plantas jovens de cana-de-açúcar. Os resultados para espessura geral de raízes e espessura dos vasos condutores (xilema e floema) em

raízes mostraram que, na presença do Si há houve uma redução no diâmetro das espessuras (Figura 7A e 7b). Na espessura geral das raízes, em cada concentração de Al, a redução foi de 8%, 5% e 3%, respectivamente para 10, 15 e 20 mg L⁻¹ de Al, enquanto que nas espessuras dos vasos condutores, as mesmas concentrações de Al causaram redução de 35%, 17% e 7%. Nossos resultados também mostram que mesmo na ausência do estressor (0,0 mg L⁻¹ de Al), o Si promoveu uma maior redução da espessura geral e espessura dos vasos condutores da raiz, com diminuição de 45% e 36% respectivamente, isso indica que na presença do Si a uma maior integridade da epiderme e da espessura dos vasos condutores, mesmo a raiz estando na ausência do estressor, corroborando aos dados de SINGHT et al. (2011) e VACULÍKOVÁ et al. (2016), onde na presença do Si houve uma maior integridade da morfologia das raízes de milho e arroz, respctivamente, segundo os autores a adição de Si reduz as anormalidades anatomicas das raízes mesmo na ausência do estressor, através da estabilização dos níveis de alguns elementos minerais. Por outro lado conforme houve aumento de cada concentrações Al, houve o aumento na espessura geral da raiz e da espessura dos vasos condutores da raiz, independente da presença de Si. Porém na presença de Si houve menor aumento das espessuras quando comparado com o tratamento isento de Si. O aumento da concentração de Al promoveu uma maior fragilidade da parede celular, causando rompimento na região dos vasos condutores e espessura geral da raiz (Figura 8, 9, 10 e 11). A exposição ao Al diminui a quantidade alterando a estrutura e a integridade das células mesofílicas e do floema (SINGHT et al., 2011).

Segundo, GIONGO; BOHNEN (2011) e MATSUMOTO; MOTODA (2013), as células epidérmicas, endodérmicas, e corticais quando afetadas por Al, rapidamente se autolizam tornando-se inchadas e desorganizadas, a um ponto em que os danos morfológicos nas raízes dificultam a distinção entre coifa e os elementos vasculares. Na comparação de ambas as cultivares, em cada concentração de Al, verificou-se que o efeito do Al tóxico na espessura geral e na espessura dos vasos condutores da raiz da cv. CTC9003 obteve diferença significativa menor na presença do estressor, apenas para os valores da espessura dos vasos condutores quando comparados com a cv. CTC9002 (Figuras 7C e 7D), para espessura geral dentro das concentrações de Al não houve diferença significativa, porém tanto para espessura

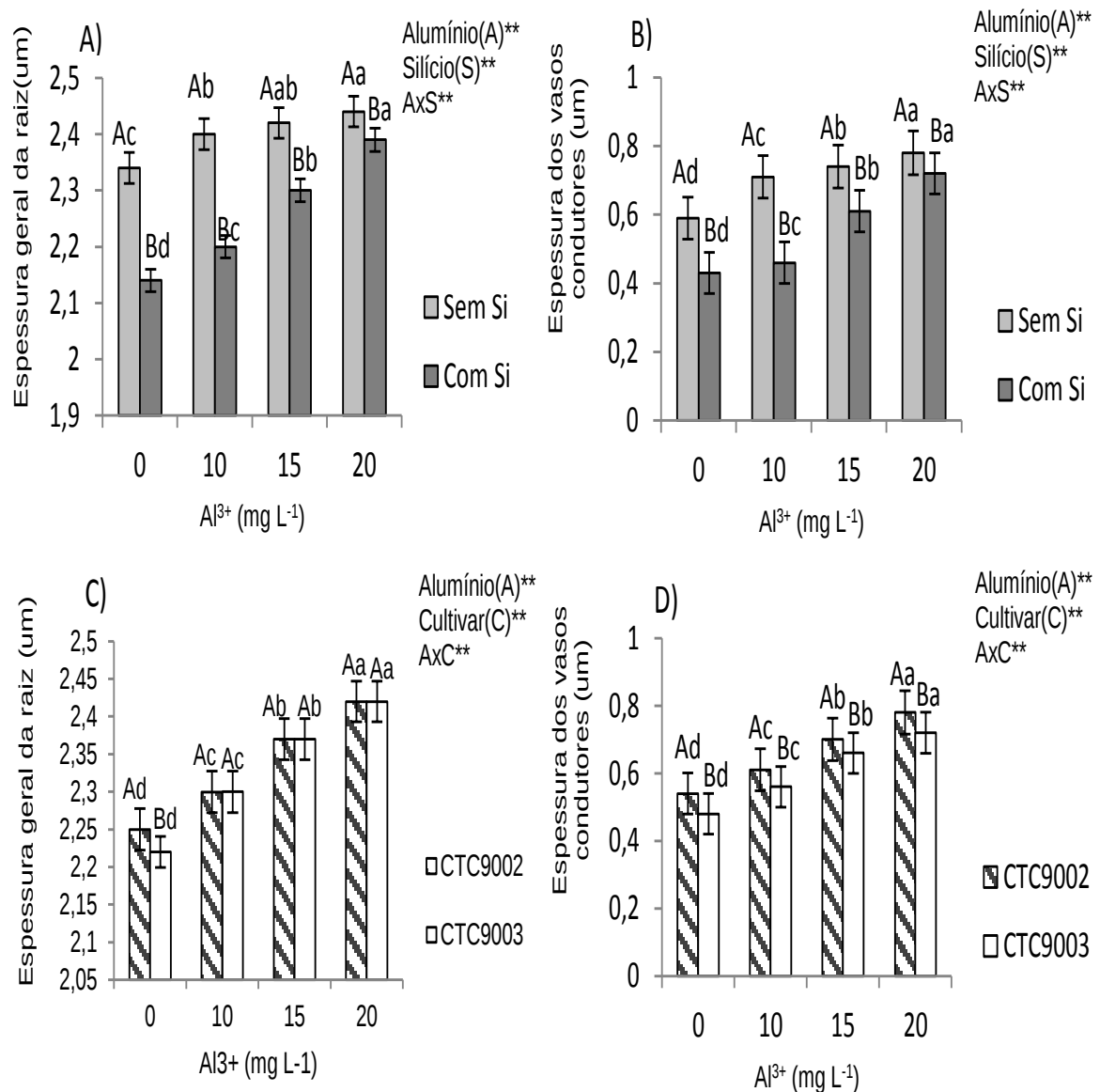


Figura 7 Anatomia da raiz de plantas jovens de cana-de-açúcar sob concentrações de Al³⁺, na ausência e presença de Si. A) e B) concentrações de Al³⁺ com ausência e presença de Si; C) e D) concentrações de Al³⁺ em ambas cultivares. Letras maiúsculas iguais (em cada concentração de Al) e letras minúsculas iguais (entre as concentrações de Al) não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$ Teste F ^{ns} não significativo, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). As barras indicam o desvio padrão da média de três repetições. Coeficiente de variação (C.V%) igual a 2,64 para espessura geral da raiz e 6,00 para espessura dos vasos condutores.

geral quanto para espessura dos vasos condutores na ausência do estressor (0,0 mg L⁻¹ de Al) houve diferença significativa, demonstrando que mesmo na ausência de Al a cv. CTC9003 apresenta uma menor espessura geral e dos vasos condutores em relação a CTC9002. Considerando a severidade do estresse por Al, ambas as cultivares mostraram aumento acentuado da espessura geral e da espessura dos vasos condutores (Figuras 7C e 7D). GIANNAKOULA et al. (2010), observaram em trabalhos com milho que a cultivar menos afetada por Al era a cultivar mais tolerante ao estresse, indicando que essa estava mais apta as condições de altas concentrações de Al, com isso nosso trabalho demonstra que a cv. CTC9003 é menos sensível às concentrações de Al quando comparada a cv. CTC9002 e a seleção de plantas que sejam mais produtivas e tolerantes a toxicidade do Al é um componente muito importante para as estratégias de produção em solos ácidos (TABALDI et al., 2009).

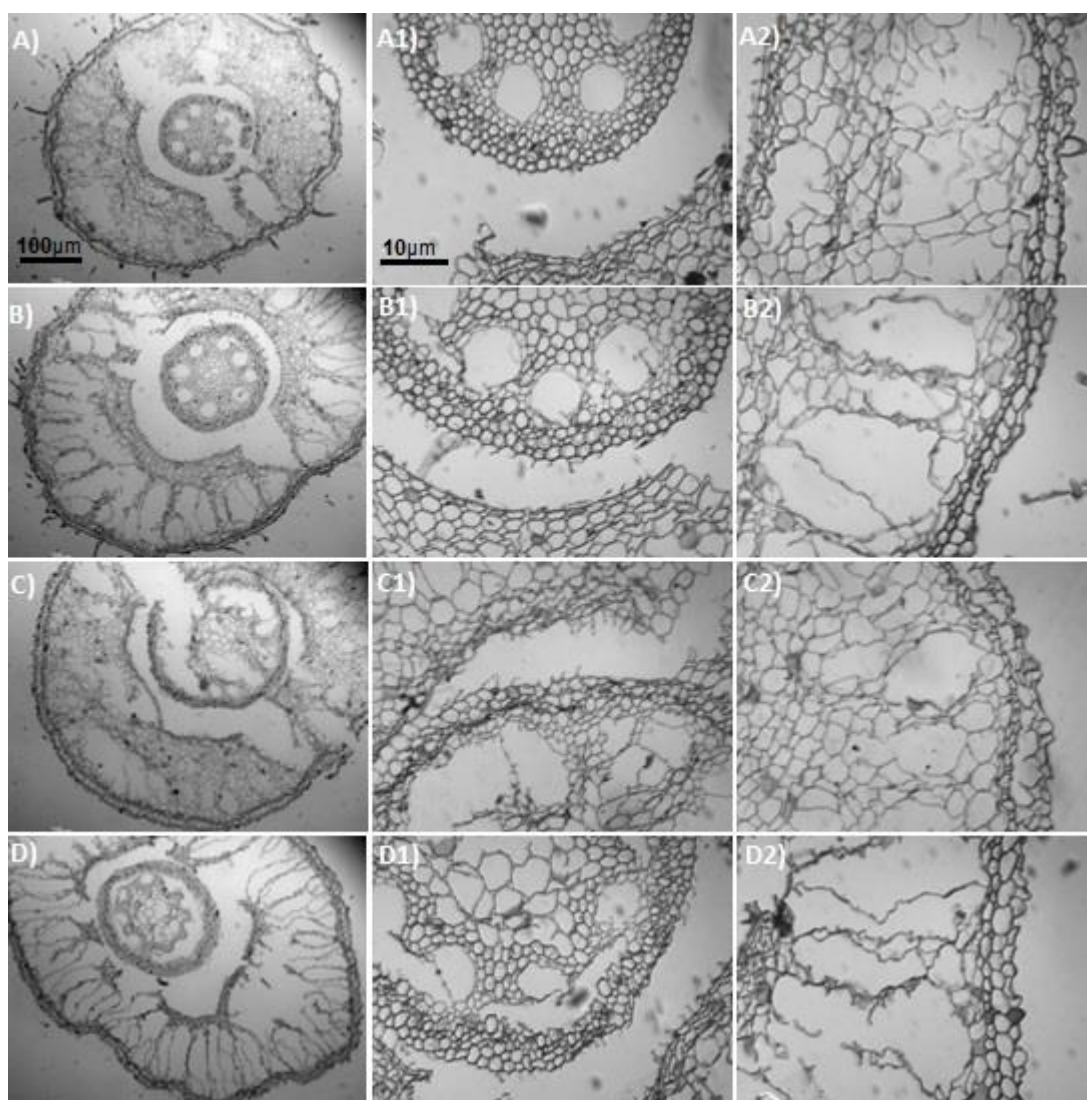


Figura 8. Secções transversais de raízes de plantas jovens de cama-de-açúcar. cv. CTC9002 submetidas a diferentes concentrações de Al, sob microscópio óptico. A) Controle; A1) Vasos condutores; A2) Espessura da raiz; B) 10mg L^{-1} de Al; B1) Vasos condutores; B2) Espessura da raiz; C) 15mg L^{-1} de Al; C1) Vasos condutores; C2) Espessura da raiz; D) 20mg L^{-1} de Al; D1) Vasos condutores; D2) Espessura da raiz. (---) $10\mu\text{m}/100\mu\text{m}$)

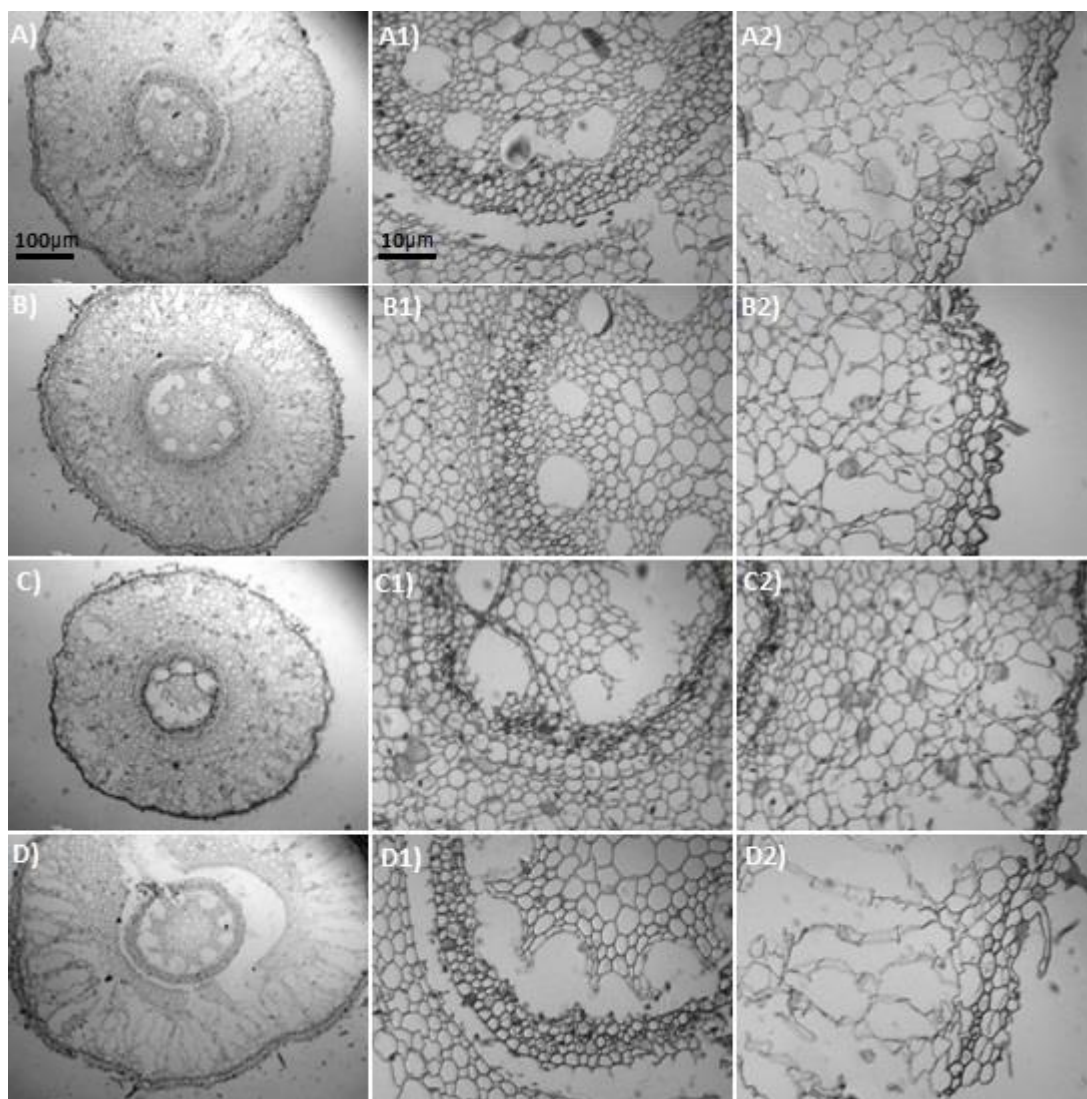


Figura 9. Secções transversais de raízes de plantas jovens de cama-de-açúcar. cv. CTC9002 submetidas a diferentes concentrações de Al com Si, sob microscópio óptico. A) Controle; A1) Vasos condutores; A2) Espessura da raiz; B) 10mg L⁻¹ de Al com 2mmol de Si; B1) Vasos condutores; B2) Espessura da raiz; C) 15mg L⁻¹ de Al com 2mmol de Si; C1) Vasos condutores; C2) Espessura da raiz; D) 20mg L⁻¹ de Al com 2mmol de Si; D1) Vasos condutores; D2) Espessura da raiz. ((---) 10µm/100µm).

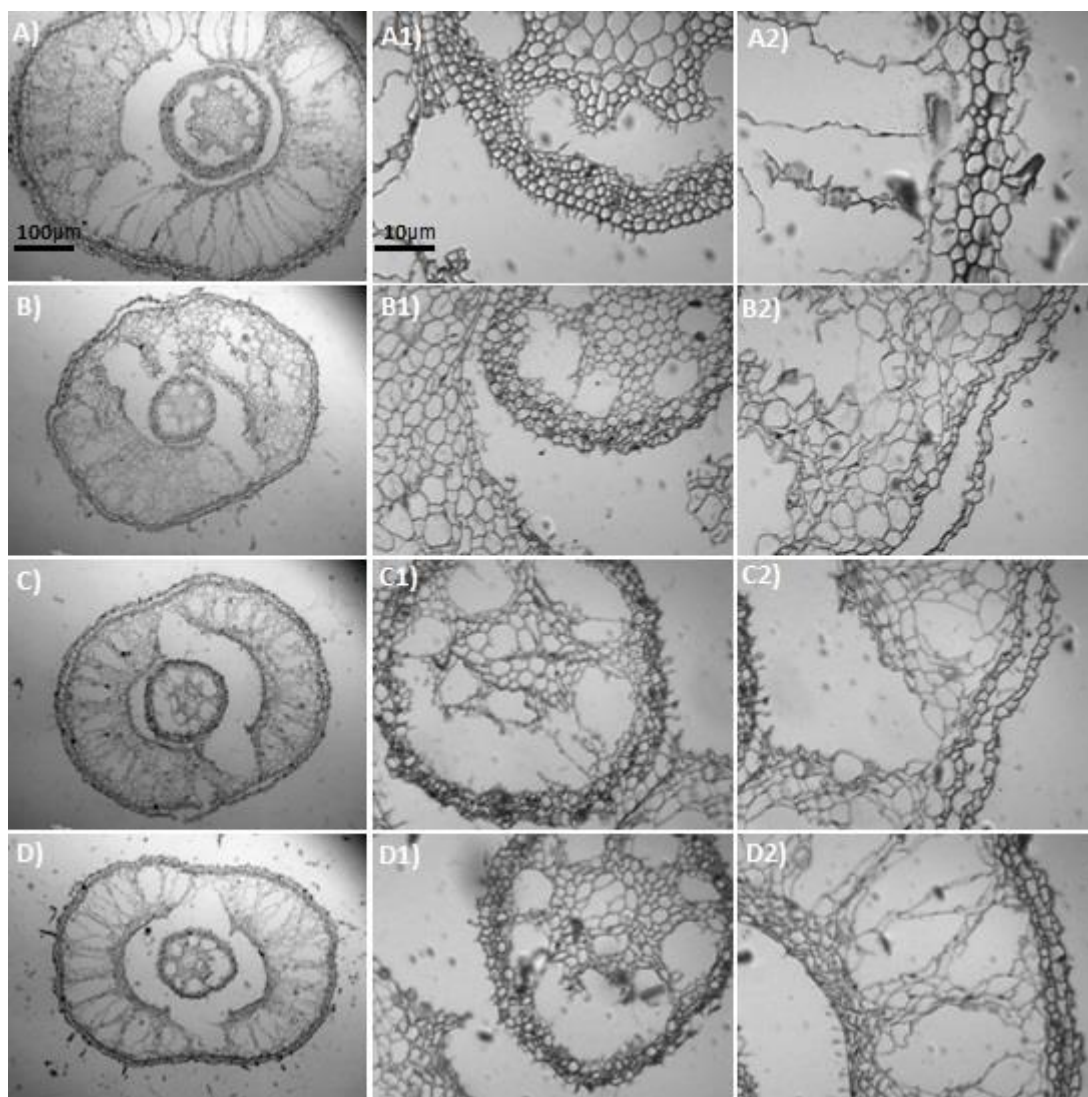


Figura 10. Secções transversais de raízes de plantas jovens de cama-de-açúcar. cv. CTC9003 submetidas a diferentes concentrações de Al, sob microscópio óptico. A) Controle; A1) Vasos condutores; A2) Espessura da raiz; B) 10mg L-1 de Al; B1) Vasos condutores; B2) Espessura da raiz; C) 15mg L-1 de Al; C1) Vasos condutores; C2) Espessura da raiz; D) 20mg L-1 de Al; D1) Vasos condutores; D2) Espessura da raiz. (---) 10µm/100µm).

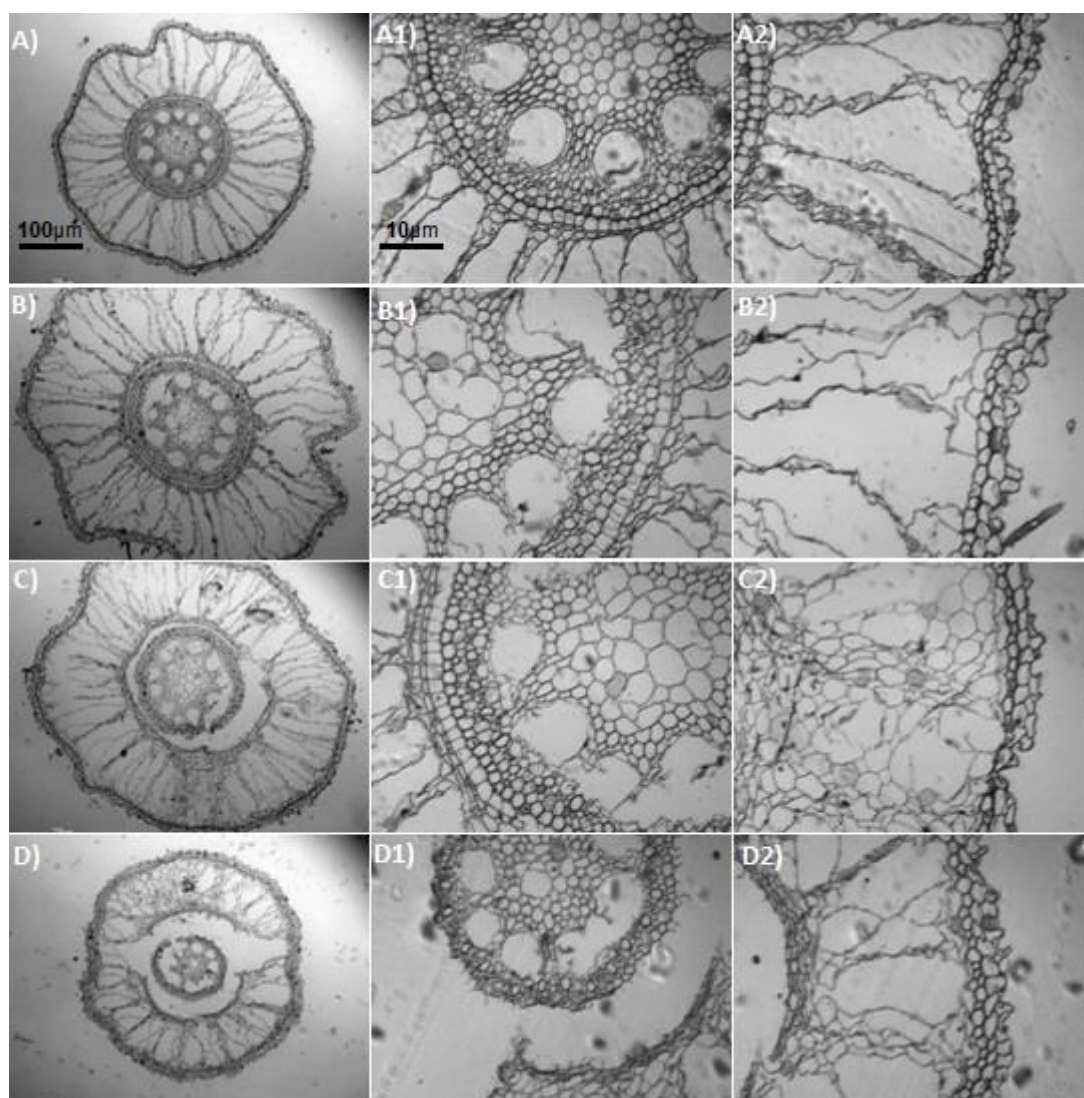


Figura 11. Secções transversais de raízes de plantas jovens de cama-de-açúcar. cv. CTC9002 submetidas a diferentes concentrações de Al com Si, sob microscópio óptico. A) Controle; A1) Vasos condutores; A2) Espessura da raiz; B) 10mg L^{-1} de Al com 2mmol de Si; B1) Vasos condutores; B2) Espessura da raiz; C) 15mg L^{-1} de Al com 2mmol de Si; C1) Vasos condutores; C2) Espessura da raiz; D) 20mg L^{-1} de Al com 2mmol de Si; D1) Vasos condutores; D2) Espessura da raiz. (---) $10\mu\text{m}/100\mu\text{m}$).

6. Conclusão

1. O Silício atenuou os efeitos do Al^{3+} tóxico na peroxidação lipídica, nos teores de clorofila, na morfoanatomia das raízes e no crescimento de cana-de-açúcar;
2. A prolina pode ser indicador do estresse por alumínio, na ausência e na presença de silício, enquanto glicina betaína apenas na ausência de silício;
3. A cv. CTC9003 é menos sensível ao estresse por alumínio comparada com a cv. CTC9902.

REFERÊNCIAS

- ABREU, C.H. JR.; MURAOKA, T.; LAVORANTE, A.F. Relationship between acidity and chemical properties of Brazilian soils. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.60, n.2, p.337–343, 2003.
- ADREES, M.; ALI, S.; RIZWAN, M.; ZIA-UR-REHMAN, M.; IBRAHIM, M.; ABBAS, F. Mechanisms of silicon-mediated alleviation of heavy metal toxicity in plants: a review. **Ecotoxicology and Environmental**, v.119, p.186-197, 2015.
- AHMAD, R.; JU LIM, C.; KWON, S. Y. Glycine betaine: a versatile compound with great potential for gene pyramiding to improve crop plant performance against environmental stresses. **Plant Biotechnology Reports**, Daejeon, v. 7, p. 49–57, 2013.
- AHMAD, T.S.; HADDAD, R. Study of silicon effects on antioxidant enzyme activities and osmotic adjustment of wheat under drought stress. **Czech Journal of Genetics and Plant Breeding**, v.47, p.17-27, 2011.
- ALVAREZ, I. A.; CASTRO, P. R. de C.; NOGUEIRA, M. C. S. Root growth of cane ratoons harvested green or burned. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 4, p. 653-659, 2000.
- ARNON, D. I. Cooper enzymes in isolated chloroplast polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 24, n. 1, p. 1-15, 1949.
- ARUNAKUMARA, K. K. I. U.; WALPOLA, B. C.; YOON, M. Aluminum toxicity and tolerance mechanism in cereals and legumes - a review. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 56, p. -9, 2013.
- ASADA, K. Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 141, n. 2, p. 391-396, 2006.
- ASHRAF, M.; AHMAD, R.; BHATTI, A. S.; AFZAL, M.; SARWAR, A.; MAQSOOD, M. A.; KANWAL, S. Amelioration of salt stress in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) by supplying potassium and silicon in hydroponics. **Pedosphere**, v.20, n.2, p.153-162, 2010.
- ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, v.59, p.206-216, 2007.
- BAKER, N. R. Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis *in vivo*. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 89-113, 2008.
- BARBOSA, J. C.; MALDONADO, JÚNIOR, W. 2011. **AgroEstat** - Sistema para análises estatísticas de ensaios agrônômicos versão 1.1.0.694. Jaboticabal: FCAV/UNESP.

BARBOSA, M. R.; SILVA, M. M. D. A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T. R. Plant generation and enzymatic detoxification of reactive oxygen species. **Ciência Rural**, v.44, n.3, p.453-460, 2014.

BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, v.39, p.205-207, 1973.

BIENERT, G. P.; MOLLER, A. L.; KRISTIANSEN, K. A.; SCHULZ, A.; MOLLER, I. M.; SCHJOERRING, J. K.; JAHN, T. P. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v.282, n.2, p.1183-1192, 2007.

BOSE, J.; BABOURINA, O.; RENGEL, Z. Role of magnesium in alleviation of aluminium toxicity in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 7, p. 2251-2264, 2011.

BUSO, P.H.M. Estudo do Sistema radicular de cana-de-açúcar no plantio em gema e tolete. Dissertação de mestrado – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.73p.

CAKMAK, I.; HORST, W.J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiol. Plant**. 83:463-468, 1991.

CARLIN, S.D. **Mecanismos fisiológicos de cana-de-açúcar sob efeito da interação dos estresses hídricos e ácido no solo**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 102f., Jaboticabal, 2009

CASTANHO, R. B.; SOUTO, T. S. A importância da orizicultura na constituição do espaço geográfico: evolução e dinâmica da produção de arroz no período de 1930 a 2010 em Ituiutaba (Minas Gerais – MG, Brasil) e a inserção de novas culturas. **Revista Colombiana de Geografía**, v.23, p.93-107, 2014.

CASTRO, P. R. C. **Fisiologia aplicada à cana-de-açúcar**: STAB, 2016. p. 19-29.

CHEN, L. S.; QI, Y. P.; JIANG, H. X.; YANG, L. T.; YANG, G. H. Photosynthesis and photoprotective systems of plants in response to aluminum toxicity. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n.54, p.9237-9247, 2010.

CHEN, T.H.; MURATA, N. Glycinebetaine protects plants against abiotic stress: mechanisms and biotechnological applications. **Plant Cell Environ**, v.34, p.1-20, 2011.

CHEN, T.H.; MURATA, N. Glycinebetaine: an effective protectant against abiotic stress in plants. **Trends Plant Sci**, v.13, p.499–505, 2008.

CLARK, R. B. Effect of aluminum on growth and mineral elements of Al-tolerant and Al-intolerant corn. **Plant and Soil**, v.47, p.653-662, 1977.

COOKE, J.; LEISHMAN, M. R. Consistent alleviation of abiotic stress with silicon addition: a meta-analysis. **Functional Ecology**, v.30, p. 1340-1357, 2016.

COSTA, L. R. T. **Resposta de cultivares de milho ao alumínio sob doses de silício em solução nutritiva**. 2012. 85p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu.

COSTA, M. C. G.; MAZZA, J. A.; VITTI, G. C.; JORGE, L.A. DE C. Distribuição radicular, estado nutricional e produção de colmos e de açúcar em soqueira de dois cultivares de cana-de-açúcar em solos distintos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.31, p.1503-1514, 2007.

DATNOFF, L. E.; SEEBOLD, K. W.; CORREA-V. F. J. The use of silicon for integrated disease management: reducing fungicide applications and enhancing host-plant resistance. Pg. 171-184. DATNOFF, L. E.; SNYDER, H.; KORNDORFER, G. H.; (ed) Elsevier Science, **Silicon in Agriculture**. 2001

DAWOOD, M.; CAO, F.; JAHANGIR, M. M.; ZHANG, G.; WU, F. Alleviation of aluminum toxicity by hydrogen sulfide is related to elevated ATPase, and suppressed aluminum uptake and oxidative stress in barley. **Journal of hazardous materials**, 209, 121-128, 2012.

DEMIDCHIK, V. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. **Environmental and Experimental Botany**, v.109, p. 212-228, 2015.

DORNELES, A. O. S.; PEREIRA, A. S.; ROSSATO, L. V.; POSSEBOM, G.; SASSO, V. M.; BERNARDY, K.; TABALDI, L. A. Silicon reduces aluminum content in tissues and ameliorates its toxic effects on potato plant growth. **Ciência Rural**, v.46, p.506-512, 2016.

EMAMVERDIAN, A.; DING, Y.; MOKHBERDORAN, F.; XIE, Y. Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. **The Scientific World Journal**, 2015.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. Londrina: (Ed.)Planta, 2007. 403 p.

FREITAS, L. B.; FERNANDES, D. M.; MAIA, S. C. M. Silicon on the mineral nutrition and aluminum accumulation in upland rice plants. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.45, p.440-448, 2015.

GAY, C.; COLLINS, J.; GEBICKI, J. M. Hydroperoxide assay with the ferric-xylenol orange complex. **Analytical Biochemistry**, v.273, p.149–155, 1999.

GIANNAKOULA, A.; MOUSTAKAS, M.; MYLONA, P.; PAPADAKIS, I.; YUPSANIS, T. Aluminum tolerance in maize is correlated with increased levels of mineral nutrients, carbohydrates and proline, and decreased levels of lipid peroxidation and Al accumulation. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.165, n. 4, p.385-396, 2008.

GIANNAKOULA, A.; MOUSTAKAS, M.; SYROS, T.; YUPSANIS, T. Aluminum stress induces up-regulation of an efficient antioxidant system in the Al-tolerant maize line but not in the Al-sensitive line. **Environmental and Experimental Botany**, v.39, p.487–494, 2010.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.48, p. 909-930, 2010.

GIONGO, V.; BOHNEN, H. Relação entre alumínio e silício em genótipos de milho resistente e sensível a toxidez de alumínio. **Bioscience Journal**, v. 27, n. 3, p. 348-356, 2011.

GIRI, J. Glycinebetaine and abiotic stress tolerance in plants. **Plant signaling & behavior**, v. 6, p.1746-1751, 2011.

GRATÃO, P. L.; POLLE, A.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, v.32, n.6, p.481-494, 2005.

GRIEVE, C. M.; GRATTAN, S. R. Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. **Plant and Soil**, The Hague, v. 70, p. 303-307, 1983.

GUERZONI, J. T. S.; BELINTANI, N. G.; MOREIRA, R. M. P.; HOSHINO, A. A.; DOMINGUES, D. S.; BESPALHOKFILHO, J. C.; VIEIRA, L. G. E. Stress-induced D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) gene confers tolerance to salt stress in transgenic sugarcane. **Acta Physiologiae Plantarum**, Krakow, v. 36, p. 309–2319, 2014.

GUNTZER, F.; KELLER, C.; MEUNIER, J. Benefits of plant silicon for crops: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, v.32, p. 201-213, 2012.

GUO, T. R.; ZHANG G. P.; ZHOU M. X.; WU F. B.; CHEN J. X. Influence of aluminum and cadmium stresses on mineral nutrition and root exudates in two barley cultivars. **Pedosphere**, Nanjing, v. 17, n. 4, p. 505-512, 2007.

GUPTA, B.; HUANG, B. Mechanism of Salinity Tolerance in Plants: Physiological, Biochemical, and Molecular Characterization. **International Journal of Genomics**, v. 1, p. 1-18, 2014.

HAYAT, S.; HAYAT, Q.; ALYEMENI, M. N.; WANI, A. S.; PICHTEL, J.; AHMAD, A. Role of proline under changing environments: a review. **Plant signaling & behavior**, v.7, p.1456-1466, 2012.

HETHERINGTON, S.J.; ASHER, C.J.; BLAMEY, F.P.C. Comparative tolerance of sugarcane, navy bean, soybean and maize to aluminum toxicity. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.39, p.171-176, 1988.

HORST, W.J.; WANG, Y.; ETICHA, D. The role of the root apoplast in aluminium-induced inhibition of root elongation and in aluminium resistance of plants: **a review**. **Ann Bot** (Lond) 106: 185–197, 2010.

INOSTROZA-BLANCHETEAU, C.; RENGEL, Z.; ALBERDI, M.; DE LA LUZ MORA, M.; AQUEA, F.; ARCE-JOHNSON, P.; REYES-DÍAZ, M. Molecular and physiological strategies to increase aluminum resistance in plants. *Molecular biology reports*, v.39, n.3, p.2069-2079, 2012.

JOHANSEN D.A. *Plant Microtechnique*. **McGraw-Hill**, New York, 1940.

KUIJPER, J. De groei van blad schijf, blad scheede en stengel van het suikerriet. **Archief Suikerind**, Nederland, v. 23, p. 528-556, 1915.

LANA R.M.Q.; KORNDORFER G.H.; ZANÃO JÚNIOR L.A.; SILVA A.F.; LANA A.M.Q. Effect of calcium silicate on the productivity and silicon accumulation in the tomato plant. **Bioscience Journal**, v.19: p.15–20, 2003.

LANGE, A.; CARVALHO, J. L. N.; DAMIN, V.; CRUZ, J. C.; MARQUES, J. J. Alterações em atributos do solo decorrentes da aplicação de nitrogênio e palha em sistema de semeadura direta na cultura do milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n.2, p.460-467, 2006.

LAWLOR, D. W. **Photosynthesis**. Third edition. New York: springer-Verlag, 2001. p. 79-115.

LEE, S. K.; SOHN, E. Y.; HAMAYUN, M.; YOON, J. Y.; LEE, I. J. Effect of silicon on growth and salinity stress of soybean plant grown under hydroponic system. **Agroforest Systems**, v.80, p.333–340, 2010.

LIANG, Y.C.; SUN, W.; ZHU, Y.G.; CHRISTIE, P. Mechanisms of silicon mediated alleviation of abiotic stress in higher plants: a review. **Environmental Pollution**, v.147, p.422-428, 2007.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in enzymology**, v.148, p.350-382, 1987.

LIMA FILHO, O. F. O silício é um fortificante e antiestressante natural para as plantas. **Embrapa Agropecuaria Oeste** 2011. Disponível em <<http://www.silifertil.com.br/artigos/silico02.pdf>>, ultimo acesso em 25 de julho de 2016.

LIMA, M. D. R.; BARROS JR, U. O.; BARBOSA, M. A. M.; SEGURA, F. R.; SILVA, F. F.; BATISTA, B. L.; LOBATO, A. K. S. Silicon mitigates oxidative stress and has positive effects in *Eucalyptus platyphylla* under aluminium toxicity. **Plant Soil Environ**, v.62, p.164-170, 2016.

LOBATO, A.K.S.; LUZ, L.M.; COSTA, R.C.L.; SANTOS FILHO, B.G.; MEIRELLES, A.C.S.; OLIVEIRA NETO, C.F.; LAUGHINGHOUSE, H.D.; NETO, M.A.M.; ALVES, G.A.R.; LOPES, M.J.S.; NEVES, H.K.B. Silicon Exercises Influence on Nitrogen Components in Pepper Subjected to Water Deficit. **Research Journal of Biological Sciences**, v.4, p.1048-1055, 2009.

MA, J. F.; CHEN, Z. C.; SHEN, R. F. Molecular mechanisms of Al tolerance in gramineous plants. **Plant and Soil**, v. 381, n. 1-2, p. 1-12, 2014.

MAGHSOUDI, K.; EMAM, Y.; PESSARAKLI, M. Effect of silicon on photosynthetic gas exchange, photosynthetic pigments, cell membrane stability and relative water content of different wheat cultivars under drought stress conditions. **Journal of Plant Nutrition**, v.39, n.7, p.1001-1015, 2016.

MAJEROWICZ, N. Fotossíntese. In: KERBAUY, G. B. (Ed.). **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. Cap.5, p. 82-133.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. Agronomica Ceres 638 p.2006.

MANZATTO, C. V.; ASSAD, E. D.; BACA, J. F. M.; ZARONI, M. J.; PEREIRA, S. E. M. Zoneamento agroecológico da cana-de-açúcar: expandir a produção, preservar a vida, garantir o futuro. Rio de Janeiro: **Embrapa Solos**, 55 p. 2009.

MARIJUAN M. P.; BOSCH M. S. Ecophysiology of invasive plants: Osmotic adjustment and antioxidants. **Trends Plant Sci**, v.18, p.660–666, 2013.

MARIN, A.; SANTOS, D. M. M. Interação da deficiência hídrica e da toxicidade do alumínio em guandu cultivado em hidroponia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 10, p. 1267-1275, 2008.

MATSUMOTO, H.; MOTODA, H. Aluminum toxicity recovery processes in root apices. Possible association with oxidative stress. **Plant science**, v.185, p.1-8, 2012. Matsumoto, H.; Motoda, H. Oxidative stress is associated with aluminum toxicity recovery in apex of pea root. **Plant and soil**, v. 363, n.1-2, p.399-410, 2013.

MISHRA, P.; DUBEY, R. S. Nickel and Al-excess inhibit nitrate reductase but upregulate activities of aminating glutamate dehydrogenase and aminotransferases in growing rice seedlings. **Plant Growth Regulation**, v. 64, n. 3, p. 251-261, 2011.

MOLINARI H. B. C.; MARUR C. J.; DAROS E., DE CAMPOS M. K. F.; DE CARVALHO J.; BESPALHOK J. C. Evaluation of the stress-inducible production of

proline in transgenic sugarcane (*Saccharum spp.*): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. **Physiol. Plant**, v. 130, p.218–229, 2007.

MÔRO, F. V. **Tolerância de genótipos de milho (*Zeamaiz* L.) ao herbicida nicosulfuron**. 2000. 88 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2000.

MOTA, J. A.; SILVA, J. L. S.; SOUZA, L. C.; SILVA, J. N.; COELHO, C. C. R.; NEVES, M. G.; OLIVEIRA NETO, C. F.; CONCEIÇÃO, H. E. O.; MARIANO, D. C.; OKUMURA, R. S. Osmoprotectors in maize (*Zea mays*) under the effect of water availability and silicon levels in soil. **Journal: Food, Agriculture and Environment**, v.13, p.291-296, 2015.

NAVASCUÉS, J.; PÉREZ-RONTOMÉ, C.; SÁNCHEZ, D. H.; STAUDINGER, C.; WIENKOOP, S.; RELLÁN-ÁLVAREZ, R.; BECANA, M. Oxidative stress is a consequence, not a cause, of aluminum toxicity in the forage legume *Lotus corniculatus*. **New Phytologist**, v.193, p.625-636, 2012.

NOBEL, P. S. **Physicochemical and environmental Plant physiology**. Oxford: Academic Press, 2009. p. 229-275.

NOGUEIROL, R. C.; MONTEIRO, F. A.; GRATÃO, P. L.; BORGIO, L.; AZEVEDO, R. A. Tropical soils with high aluminum concentrations cause oxidative stress in two tomato genotypes. **Environmental monitoring and assessment**, v.187, p.1-16, 2015.

PEI, Z. F.; MING, D. F.; LIU, D.; WAN, G. L.; GENG, X. X.; GONG, H. J.; ZHOU, W. J. Silicon improves the tolerance to water-deficit stress induced by polyethylene glycol in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.29, p.106-115, 2010.

PETROV, V.; HILLE, J.; MUELLER-ROEBER, B.; GECHEV, T. S. ROS-mediated abiotic stress-induced program med cell death in plants. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 6, p. 1-16, 2015.

PINTÓ-MARIJUAN, M.; MUNNÉ-BOSCH, S. Ecophysiology of invasive plants: osmotic adjustment and antioxidants. **Trends in plant science**, v.18, n.12, p.660-666, 2013.

PLAŽEK, A., TATRZAŃSKA, M., MACIEJEWSKI, M., KOŚCIELNIAK, J., GONDEK, K., BOJARCZUK, J., DUBERT, F. Investigation of the salt tolerance of new Polish bread and durum wheat cultivars. **Acta Physiologiae Plantarum**, Krakow, v. 35, n. 8, p. 2513-2523, 2013.

REJEB, K. B.; ABDELLY, C.; SAVOURÉ, A. How reactive oxygen species and proline face stress together. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.80, p.278-284, 2014.

RIBA, X. F. **Poliaminas y tolerancia al aluminio en variedades tolerantes y sensibles de *Zea mays***. 2001. 148 f. Tese (Covtoral em Ciències) – Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 2001.

RIBEIRO, N. V.; FERREIRA, L. G.; FERREIRA, N. C. Padrões e impactos ambientais da expansão atual do cultivo da cana-de-açúcar: uma proposta para o seu ordenamento no bioma Cerrado. **Ateliê Geográfico**, v.9, p.99-113, 2015.

RIZWAN, M.; ALI, S.; IBRAHIM, M.; FARID, M.; ADREES, M.; BHARWANA, S. A.; ABBAS, F. Mechanisms of silicon-mediated alleviation of drought and salt stress in plants: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v.22, p.15416-15431, 2015.

ROSSETTO, R.; DIAS, F. L. F. Nutrição e adubação de cana-de-açúcar: indagações e reflexões. **Encarte Informação Agronomias Potafos**, n.110, p.6-11, 2005.

ROSSIELLO, R. O. P.; JACOB NETTO, J. Toxidez de alumínio em plantas: Novos enfoques para um velho problema. L. Fernandes, M.S (Ed). **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa. Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, 2006. P. 375-488.

ROUT, G.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. Aluminium toxicity in plants: a review. **Agronomie**, v. 21, n. 1, p. 3-21, 2001.

SADE, H.; MERIGA, B.; SURAPU, V.; GADI, J.; SUNITA, M. S. L.; SURAVAJHALA, P.; KISHOR, P. K. Toxicity and tolerance of aluminum in plants: tailoring plants to suit to acid soils. **Biometals**, v.29, n.2, p.187-210, 2016.

ŠČANČAR, J.; MILAČIČ, R. Aluminium speciation in environmental samples: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 386, n. 4, p. 999-1012, 2006.

SHAHID, M. A.; BALAL, R. M.; PERVEZ, M. A.; ABBAS, T.; AQUEEL, M. A.; JAVAID, M. M.; GARCIA-SANCHEZ, F. Foliar spray of phyto-extracts supplemented with silicon: an efficacious strategy to alleviate the salinity-induced deleterious effects in pea (*Pisum sativum* L.). **Turkish Journal of Botany**, v.39, p.408-419, 2015.

SHAHNAZ, G.; SHEKOOFEH, E.; KOUROSH, D.; MOOHAMADBAGHER, B. Interactive effects of silicon and aluminum on the malondialdehyde (MDA), proline, protein and phenolic compounds in *Borago officinalis* L. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 24, p. 5818-5827, 2011.

SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum. **Plant cell reports**, v.26, n.11, p.2027-2038, 2007.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, v. 2012, 26 p, 2012.

SHARMA, R.; BHARDWAJ, R.; THUKRAL, A. K.; HANDA, N.; KAUR, R.; KUMAR, V. Osmolyte Dynamics: New Strategies for Crop Tolerance to Abiotic Stress Signals. In: AHMAD, P.; RASOOL, S. (Eds): **Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance**, v.2, p.405-430, 2014.

SILVA, O. N.; LOBATO, A. K. S.; ÁVILA, F. W.; COSTA, R. C. L.; OLIVEIRA NETO, C. F.; SANTOS FILHO, B. G.; CARDOSO, M. S. Silicon-induced increase in chlorophyll is modulated by the leaf water potential in two water-deficient tomato cultivars. **Plant Soil Environ**, v.58, p.481-486, 2012.

SILVA, S. Aluminium toxicity targets in plants. **Journal of Botany**, v. 2012, p.1-8, 2012.

SILVEIRA, J. A. G.; VIÉGAS, R. A.; ROCHA, I. M. A.; MOREIRA, A. C. O. M.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A. Proline accumulation and glutamine synthetase activity are increased by salt-induced proteolysis in cashew leaves. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.160, p.115-123, 2003.

SINGH, V. P.; TRIPATHI, D. K.; KUMAR, D.; CHAUHAN, D. K. Influence of exogenous silicon addition on aluminium tolerance in rice seedlings. **Biological trace element research**, v. 144, n.1-3, p.1260-1274, 2011.

SOUSA P. L.; DO CARMO S. B.; DE PINHO, W. C. S.; BARBOSA, M. A. M.; SILVA GUEDES-LOBATO, E. M.; SEGURA, F. R.; DA SILVA L., A. K. Silicon (Si) ameliorates the gas exchange and reduces negative impacts on photosynthetic pigments in maize plants under Zinc (Zn) toxicity. **Australian Journal of Crop Science**, v.9, n.10, p.901, 2015.

STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; do CANTO, M. W.; HECKTHEUER, L. H. H.; As clorofilas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 3, p. 748-755, 2005.

SUPRASANNA, P.; NIKALJE, G.C.; RAI, A.N. Osmolyte accumulation and implications in plant abiotic stress tolerance. In Osmolytes and plants acclimation to changing environment: emerging omics technologies; IQBAL, N., NAZAR, R., KHAN, N.A. (Ed). **Springer**, p.1–12, 2016.

SZÁBADOS, L.; KOVÁCS, H.; ZILBESTEIN, A.; BOUCHEREAU, A. Plants in extreme environments: importance of protective compounds in stress tolerance. **Advances in Botanical Research**, v.57, p.106-133, 2011.

TABALDI, L. A.; CARGNELUTTI, D.; GONÇALVES, J. F.; PEREIRA, L. B.; CASTRO, G. Y.; MALDANER, J.; NICOLOSO, F. T. Oxidative stress is an early symptom

triggered by aluminum in Al-sensitive potato plantlets. **Chemosphere**, v.76, p.1402-1409, 2009.

TAHARA, K.; YAMANOSHITA, T.; NORISADA, M.; HASEGAWA, I.; KASHIMA, H.; SASAKI, S.; KOJIMA, K. Aluminum distribution and reactive oxygen species accumulation in root tips of two *Melaleuca* trees differing in aluminum resistance, **Plant Soil**, v.307, p.167–178, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. In: **Respostas e adaptações ao estresse abiótico**. Porto Alegre: Artmed, 2013, cap.26, p. 753-780.

TUNA, A. L.; KAYA, C.; HIGGS, D.; MURILLO-AMADOR, B.; AYDEMIR, S.; GIRGIN, A. R. Silicon improves salinity tolerance in wheat plants. **Environmental and Experimental Botany**, v.62, p.10-16, 2008.

TUTEJA, N. Mechanisms of high salinity tolerance in plants. **Methods in Enzymology**, New York, v. 428, p. 419-438, 2007.

VACULÍKOVÁ, M.; VACULÍK, M.; TANDY, S.; LUXOVÁ, M.; SCHULIN, R. Alleviation of antimonate (SbV) toxicity in maize by silicon (Si). **Environmental and Experimental Botany**, v.128, p.11-17, 2016.

VASANTHI, N.; SALEENA, L. M.; RAJ, S. A. Silicon in crop production and crop protection-A review. **Agricultural Reviews**, v.35, n.1, p.14-23, 2014.

WANG, Y.X.; STASS, A.; HORST, W.J. Apoplastic binding of aluminium is involved in silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in maize. **Plant Physiology** v.136, p.3762–3770, 2004.

WANI, H. S.; SINGH, B. N.; HARIBHUSHAN, A.; MIR, I. J. Compatible solute engineering in plants for abiotic stress tolerance-role of glycine betaine. **Current genomics**, v.14, p.157-165, 2013.

YIN, L.; WANG, S.; LI, J.; TANAKA, K.; OKA, M. Application of silicon improves salt tolerance through ameliorating osmotic and ionic stresses in the seedling of *Sorghum bicolor*. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.35, p.3099–3107, 2013.