

LEANDRO TORRES DE SOUZA

**PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NA TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM DOIS
GENÓTIPOS DE MILHO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S729p
2012

Souza, Leandro Torres de, 1981-

Papel do óxido nítrico na tolerância ao alumínio em dois genótipos de milho / Leandro Torres de Souza. – Viçosa, MG, 2012.

xii, 82f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: José Cambraia.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Zea mays* L. 2. Óxido nítrico. 3. Alumínio. 4. Stress oxidativo. 5. Milho. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 633.15

LEANDRO TORRES DE SOUZA

**PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NA TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM DOIS
GENÓTIPOS DE MILHO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

Aprovada em: 29 de junho de 2012

Cleberon Ribeiro
(Coorientador)

Juraci Alves de Oliveira
(Coorientador)

Luzimar Campos da Silva

Luzia Valentina Modolo

José Cambraia
(Orientador)

Aos meus queridos pais por todo esforço e dedicação realizados
durante todos estes anos em prol da minha felicidade e sucesso

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado.

Ao programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES) pelas bolsas e auxílios concedidos.

À Deus, Pai todo Poderoso, por mais esta importante etapa de minha vida!

Aos meus pais Reni Torres de Souza e Antônio Carlos de Souza, aos meus irmãos Leonardo, Vinicius e Ana Paula, meus sobrinhos Matheus e Ana Carolina, meus eternos agradecimentos.

À minha querida e amada JERUSA minha grande incentivadora por toda ajuda e apoio nos momentos que eu mais precisei. Serei eternamente grato por todo esforço e dedicação em prol da realização deste sonho.

Ao professor José Cambraia pela orientação, ensinamentos, dedicação, confiança e amizade durante estes quatro anos e meio de convivência, minha eterna gratidão.

Ao José Antônio Bhering pela ajuda e amizade durante todos estes anos.

Aos professores coorientadores da UFV: Juraci Alves de Oliveira e Cleberson Ribeiro.

Aos Professores do Curso de Fisiologia Vegetal.

A querida amiga Daniela Cassol pela ajuda nas montagens, conduções e coletas de dados dos experimentos. Agradeço por todos os feriados e fins de semana dedicados a conclusão desta importante etapa em minha vida.

A amiga Tânia que sempre esteve à disposição para ajudar na montagem e coleta de dados. Pelas conversas e idéias sugeridas, que sempre foram de grande valia, agradeço imensamente.

Aos amigos Daniel e Kauê pela ajuda prestada durante a coleta dos dados e pelos momentos de descontração.

Aos amigos da pós-graduação: Camilo, Cleber, Marcus (Baiano), Neidiquele, Rosilene e Sandro Tatagiba.

Aos amigos de laboratório Gládis Jucoski e Élcio serei eternamente grato pela amizade, ajuda e conselhos durante meu curso.

Aos amigos de república: Heder Braun “Matuto”, Flávio “doidão”, Tarço “Lanhouse”, Reinaldo e a querida Emiliane que sempre esteve ao meu lado nos momentos felizes e tristes que vivi nestes 5 anos de convivência.

Aos funcionários do Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da UFV, em especial a Karla Ribeiro que se disponibilizou a ajudar.

BIOGRAFIA

LEANDRO TORRES DE SOUZA, filho de Antônio Carlos de Souza e Reni Torres de Souza, nasceu na cidade de Alegre, Espírito Santo, Brasil, no dia 18 de outubro de 1981.

Em 1995 concluiu o primeiro grau na “Escola de Primeiro e Segundo Graus Aristeu Aguiar” em Alegre-ES. Em 1998 concluiu o segundo grau na “Escola Agrotécnica Federal de Alegre”, Alegre-ES, onde também obteve o título de Técnico em Agropecuária. Em janeiro de 2001 ingressou na Universidade Federal do Espírito Santo, graduando-se em Engenharia Agrônômica em agosto de 2005.

Em setembro de 2005, iniciou o Mestrado em Fitotecnia, na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, concluindo em julho de 2007.

Em março de 2008, iniciou o curso de Doutorado em Fisiologia Vegetal, na mesma universidade, submetendo-se à defesa de tese no dia 29 de junho de 2012.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. OBJETIVO GERAL	3
2.1. Objetivos específicos	3
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4
CAPÍTULO I	7
INFLUÊNCIA DE NÍVEIS TÓXICOS DE ALUMÍNIO SOBRE O CRESCIMENTO E A MORFOLOGIA DE RAÍZES DE MILHO	7
RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. MATERIAL E MÉTODOS	11
2.1. Obtenção do material vegetal e condições de crescimento	11
2.2. Efeito de diferentes tempos de exposição e de concentrações de alumínio sobre o alongamento radicular.	11
2.3. Determinação dos teores de alumínio em ápices radiculares de plantas expostas a diferentes concentrações deste elemento	12
2.4. Determinação do acúmulo e localização do alumínio em raízes pela técnica da hematoxilina	12
2.5. Análise da micromorfologia dos ápices radiculares por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microanálise por energia dispersiva de raios-X	13
2.6. Delineamento experimental e análise estatística	13
3. RESULTADOS	14
3.1. Efeito de diferentes tempos de exposição e concentrações de alumínio sobre o alongamento radicular.	14
3.2. Teores de alumínio em ápices radiculares de plantas expostas a diferentes concentrações deste elemento	15
3.3. Determinação do acúmulo e localização do alumínio em raízes pela técnica da hematoxilina	16
3.4. Análise da micromorfologia dos ápices radiculares por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microanálise por energia dispersiva de raios-X	17
4. DISCUSSÃO	21
5. CONCLUSÕES	25
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
CAPÍTULO II	32
PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NAS RESPOSTAS AO ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR ALUMÍNIO EM RAÍZES DE MILHO	32

RESUMO-----	32
ABSTRACT-----	34
1. INTRODUÇÃO-----	36
1.1. Alumínio e o estresse oxidativo-----	37
1.2. Óxido nítrico e seu metabolismo em células vegetais-----	39
1.3. Óxido nítrico e tolerância das plantas a estresses bióticos e abióticos-----	41
2. MATERIAL E MÉTODOS-----	43
2.1. Obtenção do material vegetal e condições de crescimento-----	43
2.2. Experimento 1: Avaliação do efeito de nitroprussiato de sódio sobre o alongamento radicular-----	43
2.3. Experimento 2: Avaliação do efeito do nitroprussiato de sódio sobre os teores de alumínio em ápices radiculares-----	44
2.4. Experimento 3: Avaliação da influência do inibidor da sintase do óxido nítrico (NOS) sobre a inibição do alongamento radicular causado por alumínio-----	44
2.5. Experimento 4: Avaliação da influência do inibidor da redutase do nitrato (RN) sobre a inibição do alongamento radicular induzida por alumínio-----	45
2.6. Experimento 5: Avaliação do efeito do óxido nítrico (NO) sobre a inibição do alongamento radicular induzida por alumínio-----	45
2.7. Experimento 6: Avaliação do efeito do alumínio sobre a atividade da sintase do óxido nítrico (NOS)-----	46
2.8. Experimento 7: Efeito do alumínio sobre a atividade da redutase do nitrato (NR)-----	46
2.9. Determinação do teor de óxido nítrico nos tecidos-----	47
2.10. Experimento 8: Efeito aliviador do óxido nítrico sobre o estresse oxidativo causado pelo alumínio-----	48
2.10.1. Determinação dos teores de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)-----	48
2.10.2. Determinação dos teores de ânion superóxido ([•] O ₂ ⁻)-----	49
2.10.3. Determinação dos teores de radical hidroxila ([•] OH)-----	49
2.10.4. Determinação da atividade de enzimas antioxidativas-----	49
2.10.4.1. Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)-----	50
2.10.4.2. Determinação da atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6)-----	50
2.10.4.3. Determinação da atividade da peroxidase (POX, EC 1.11.1.7)-----	51
2.10.4.4. Determinação da atividade da peroxidase do ascorbato (APX, EC1.11.1.11)-----	51
2.10.4.5. Determinação da atividade da redutase da glutationa (GR; EC 1.6.4.2)-----	51
2.10.4.6. Determinação da atividade da peroxidase da glutationa (GPX, EC 1.11.1.9)-----	52
2.10.4.7. Determinação da atividade da monodesidroascorbato redutase (MDHAR– EC 1.6.5.4)-----	52
2.10.4.8. Determinação da atividade da desidroascorbato redutase (DHAR – EC 1.8.5.1)-----	53
2.10.5. Determinação da peroxidação de lipídios-----	53
2.10.6. Determinação da atividade da lipoxigenase (LOX)-----	53

2.10.7.	Determinação das concentrações de metabólitos antioxidativos-----	54
2.10.7.1.	Determinação dos teores de ascorbato (AA) e desidroascorbato (DHA)-----	54
2.11.	Determinação de proteínas-----	54
2.12.	Delineamento experimental e Análise estatística-----	55
3.	RESULTADOS-----	56
3.1.	Efeito de concentrações crescentes de nitroprussiato de sódio sobre o alongamento radicular-----	56
3.2.	Efeito do nitroprussiato de sódio sobre os teores de alumínio em ápices radiculares-----	57
3.3	Efeito do alumínio, nitroprussiato de sódio (SNP), N ^w -nitro-L-arginina (L-NNA), tungstato e 2 fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazilina-1-oxil-3-óxido (PTIO) sobre o alongamento radicular-----	57
3.4.	Efeito de alumínio, nitroprussiato de sódio (SNP), N ^w -nitro-L-arginina (L-NNA), tungstato e 2 fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazilina-1-oxil-3-óxido (PTIO) sobre o teor de óxido nítrico-----	59
3.5	Efeito do alumínio sobre as atividades das enzimas sintase do óxido nítrico (NOS; EC 1.14.13.39) e redutase do nitrato (RN; EC 1.7.1.1)-----	62
3.6	Efeito do alumínio sobre a produção de intermediários reativos de oxigênio (ROIs)-----	63
3.7	Efeito do alumínio sobre as atividades de enzimas antioxidativas-----	64
3.8	Efeito do alumínio sobre a peroxidação de lipídeos e sobre a atividade da lipoxigenase.-----	67
3.9.	Efeito do alumínio sobre os teores de ascorbato e desidroascorbato e as atividades das enzimas desidroascorbato redutase e monodesidroascorbato redutase-----	68
4.	DISCUSSÃO-----	71
5.	CONCLUSÕES-----	78
6.	CONCLUSÕES GERAIS-----	79
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	80

RESUMO

SOUZA, Leandro Torres de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2012. **Papel do óxido nítrico na tolerância ao alumínio em dois genótipos de milho.** Orientador: José Cambraia. Coorientadores: Cleberson Ribeiro e Juraci Alves de Oliveira.

Os objetivos deste estudo foram avaliar os efeitos de níveis tóxicos de alumínio (Al) sobre o crescimento e a morfologia externa das raízes e avaliar a influência do óxido nítrico (NO) sobre a intensidade do estresse oxidativo induzido pelo Al, bem como sobre a atividade de enzimas e a concentração de metabólitos antioxidativos em dois genótipos de milho, com tolerância diferencial a este elemento. Os genótipos de milho UFVM 100 (sensível) e UFVM 200 (tolerante) foram submetidos aos tratamentos com 0, 25, 50, 100 e 200 μM de Al em solução de CaCl_2 0,5 mM, pH 4,5, durante 12, 24, 36 e 48 horas ou submetidos aos tratamentos com 0 e 50 μM de Al e 0 e 25 μM de SNP em solução de CaCl_2 0,5 mM, pH 4,5, durante 24 horas. Decorrido este tempo, foram determinados os teores de Al, alongamento radicular e a morfologia externa dos ápices radiculares. Adicionalmente, foram avaliados os efeitos dos inibidores da sintase do óxido nítrico (NOS) e da redutase do nitrato (RN) e do sequestrador de NO (PTIO) sobre a inibição do alongamento radicular, as atividades da NOS e RN e os teores de NO, em plantas tratadas com Al. Num terceiro experimento foram avaliados os efeitos do Al e do NO sobre os teores de intermediários reativos de oxigênio (ROIs), ascorbato (AA), desidroascorbato (DHA), malondialdeído (MDA) e sobre a atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD), peroxidase do ascorbato (APX), catalase (CAT), peroxidase (POX), peroxidase da glutathione (GPX), redutase da glutathione (GR), lipoxigenase (LOX), redutase do monodesidroascorbato (MDHAR) e redutase do desidroascorbato (DHAR). A análise química, o teste de hematoxilina e fotos obtidas por microscopia eletrônica de varredura com energia dispersiva de raios-X (EDS) mostraram maior acúmulo de Al nos ápices radiculares do genótipo UFVM 200. O Al, contudo, causou maior redução no alongamento radicular no genótipo UFVM 100 para todas as concentrações de Al e tempos de exposição estudados. Observou-se correlação entre o teor de Al nos ápices radiculares e o alongamento radicular nos dois genótipos. O acúmulo de Al nos ápices radiculares resultou em danos às células desta parte da planta, caracterizados por ruptura das células da epiderme e consequente alteração na

morfologia externa das raízes nos dois genótipos de milho, principalmente no genótipo UFVM 100. A microanálise de varredura com raios-X (EDS) mostrou acúmulo de Al e de fósforo nos ápices radiculares indicando uma possível precipitação de Al na forma de fosfato. O genótipo UFVM 200, considerado mais tolerante ao Al, acumulou mais Al e P do que o genótipo UFVM 100, provavelmente no apoplasto radicular, indicativo de um possível envolvimento do fosfato inorgânico no mecanismo de tolerância ao Al em milho. A absorção e acúmulo de Al pelas raízes das plantas induziram a produção e acúmulo de ROIs estabelecendo um estresse oxidativo, caracterizado por aumento na peroxidação de lipídeos e na atividade da LOX. Paralelamente, observou-se aumento na atividade de algumas enzimas antioxidativas (SOD, CAT, POX, GR e GPX), indicativo de uma participação ativa destas enzimas no processo de eliminação do excesso de ROIs induzidos pela toxidez de Al. A aplicação exógena de NO (SNP) restabeleceu a homeostase celular deste radical nitrogenado atenuando o efeito inibitório do Al sobre o alongamento radicular. O efeito protetor da aplicação de SNP parece ser resultado de reação direta do NO com os ROIs e pela elevação da atividade de algumas enzimas antioxidativas, envolvidas não apenas na eliminação dos ROIs produzidos, mas também controlando os níveis celulares de importantes metabólitos antioxidativos do ciclo do ascorbato. O genótipo UFVM 200 exibiu melhores respostas bioquímicas ao estresse causado por Al, principalmente na presença de NO que, em conjunto, demonstram ter ele maior tolerância ao Al do que o UFVM 100.

ABSTRACT

SOUZA, Leandro Torres de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2012. **Role of nitric oxide on aluminum tolerance in two maize genotypes.** Adviser: José Cambraia. Co-advisers: Cleberson Ribeiro and Juraci Alves de Oliveira.

The objectives of this study were to evaluate the effects of toxic levels of aluminum (Al) on the growth and external morphology of roots and to evaluate the influence of nitric oxide (NO) on the intensity of the oxidative stress induced by Al, as well as on the activity enzymes and the contents of metabolites of the antioxidative system in maize genotypes, with differential tolerance to this element. The UFVM 100 (sensitive) and UFVM 200 (tolerant) maize genotypes were treated with 0, 25, 50, 100 and 200 μM Al in 0.5 mM CaCl_2 solution, pH 4.5, for 12, 24, 36 and 48 hours, or treated with 0 and 50 μM Al and 0 and 25 μM SNP in 0.5 mM CaCl_2 , pH 4.5 for 24 hours. Plants were then harvested and Al contents, root elongation and external morphology of root tips were determined. Additionally, the influence of the inhibitors of the nitric oxide synthase (NOS) and nitrate reductase (NR) and of the NO sequestering PTIO on the inhibition of root elongation and on the NO contents as well as the activity of NOS and NR in Al treated plants. In a third experiment, the effects of Al and NO on the contents of ROIs, ascorbate (AA), desidroascorbate (DHA), malondialdehyde (MDA) and on the activities of the enzymes superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT), peroxidase (POX), glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase (GR), lipoxygenase (LOX), monohydroascorbate reductase (MDHAR) and dehydroascorbate reductase (DHAR) were evaluated. Chemical analysis, hematoxylin's test and scanning electron microscopy with energy dispersive X-ray (EDS) showed greater Al accumulation in the root tips the UFVM 200 genotype. Nevertheless, Al caused greater reduction in root elongation in the UFVM 100 genotype at all Al concentrations and exposure times studied. A negative correlation between the Al content in the root tips and root elongation was found for both genotypes. Al damage to root tips was visualized by disruption of epidermal cells and also by changes in the external morphology of roots. The scanning microanalysis X-ray (EDS) showed also Al and P accumulation in root tips indicative of a precipitation of Al as a phosphate salt. The UFVM 200 genotype, considered more tolerant to Al, showed higher accumulation of Al and P than UFVM 100 genotype, probably in the root apoplasto,

indicative of a possible involvement of the inorganic phosphate in the mechanism of tolerance to Al in maize. Aluminum uptake and accumulation in roots tips induced the production and/or accumulation of ROIs establishing an oxidative stress, characterized by an increase in lipid peroxidation and in LOX activity. Parallel to this, there was an increase in the activity of some antioxidant enzymes (SOD, CAT, POX, GR and GPX) indicative of an active participation of these enzymes in the process of eliminating the excess of ROIs produced during Al stress. The exogenous application of NO (SNP) re-established the cellular homeostasis of NO attenuating the inhibitory effect of Al on root elongation. The protective effect of the application of SNP may be the result of a direct reaction of NO with ROIs as well as by increasing the activity of some antioxidative enzymes, involved not only in the elimination of the produced ROIs, but also controlling the cell levels of essential antioxidative metabolites of the ascorbate cycle. The genotype UFVM 200 showed better biochemical responses to stress caused by Al, especially in the presence of NO which, taken together, demonstrate its higher tolerance to Al than UFVM 100.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O alumínio (Al) é o 3º elemento mais abundante na litosfera participando com 8% na composição da crosta terrestre (Rossiello e Netto, 2006). Em solos neutros, este metal apresenta-se na forma insolúvel e atóxica, ao passo que a acidificação do solo eleva as formas de alumino-silicatos e óxidos solúveis, os quais atingem concentrações tóxicas na solução do solo (Ma e Furukawa, 2003). Tendo em vista que cerca de 30% de toda área terrestre do mundo consiste de solos ácidos e que 50% das terras aráveis do mundo são potencialmente ácidas, a toxidez de Al representa uma das mais importantes limitações para a produção agrícola mundial (Piñeros et al., 2005).

Como a raiz é o primeiro órgão da planta a entrar em contato com o Al no solo, os sintomas de toxidez se expressam aí de forma mais acentuada. Plantas expostas a níveis tóxicos de Al apresentam uma série de alterações na arquitetura e morfologia de suas raízes como: redução na formação de raízes laterais e de pêlos radiculares, alteração na cor, engrossamento, atrofia e curvatura das raízes (Čiamporová, 2002). Além disso, a rizoderme e o córtex podem apresentar rupturas transversais (Yamamoto et al., 2001; Blamey et al., 2004; Jones et al., 2006; Kopittke et al., 2008). A localização da formação destas rupturas em raízes de feijão (Kopite et al., 2008), ervilha (Yamamoto et al., 2001) e milho (Jones et al., 2006) tem sido verificadas a partir de 1mm do ápice radicular nas células externas do córtex e na epiderme na região de alongamento.

Além dos vários efeitos da exposição das plantas a níveis tóxicos de Al, muitos estudos mostram que o excesso de Al induz a produção de intermediários reativos de oxigênio (ROIs), desencadeando o estresse oxidativo (Boscolo et al., 2003; Meriga et al., 2004; Sharma e Dubey, 2007). Estes ROIs são formas reduzidas do oxigênio molecular responsável por danos oxidativos a diversos componentes celulares (Mittler, 2002) e incluem o ânion superóxido (\dot{O}_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil ($HO\dot{O}$) e oxigênio “singleto” (1O_2). Em função disso, as plantas desenvolveram estratégias que mantêm constantes os níveis destes ROIs no interior das células (Apel e Hirt, 2004), apresentando mecanismos de defesa enzimáticos e/ou não enzimáticos (Scandalios, 1993). Dentre as enzimas que participam dos sistemas de defesa das plantas destacam-se: catalase (CAT), dismutase do superóxido (SOD), peroxidase (POX), peroxidase do ascorbato (APX), peroxidase da glutatona (GPX) e redutase da glutatona (GR). Dentre os metabólitos que podem ser importantes nos sistemas de defesa

não-enzimáticos destacam-se: ascorbato (AA), monodesidroascorbato (MDHA), glutationa reduzida (GSH), α -tocoferol e carotenóides (Mittler, 2002).

O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso com meia-vida relativamente longa, permanecendo em sistemas biológicos por 3-5 s (Tuteja et al., 2004). Apresenta alta difusibilidade ($4,8 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ em H_2O) e pode se movimentar facilmente não apenas em regiões hidrofílicas na célula, mas também se difundir livremente através da bicamada lipídica das membranas (Arasimowicz e Floryszak-Wieczorek, 2007).

O NO, em plantas, pode ser sintetizado a partir de arginina pela ação da enzima sintase do óxido nítrico (NOS) ou a partir de nitrito, pela ação da enzima redutase do nitrato (RN) ou por fontes não enzimáticas (Neill et al., 2003). A atividade da NOS, dependente de arginina, pode ocorrer nos peroxissomos (Corpas et al., 2004), cloroplastos (Foissner et al., 2000; Gould et al., 2003) e mitocôndrias (Guo e Crawford, 2005). A NOS converte L-arginina para L-citrulina em uma reação dependente de NADPH e oxigênio molecular liberando uma molécula de NO por cada molécula de L-arginina. Em plantas, a atividade da NOS pode ser inibida por inibidores da NOS animal que atuam como análogos, tais como L-N^G-monometil arginina (L-NAME) e L-Nitro amino arginina metil ester (L-NMMA) (Guo e Crawford, 2005). A RN é enzima chave na assimilação de nitrato em plantas, catalisando a conversão de nitrato a nitrito utilizando NADPH como fonte de elétrons. Esta enzima, porém, pode produzir NO a partir da redução do nitrito usando novamente o NADPH como doador de elétrons (Neill et al., 2003). A terceira possibilidade seria a biossíntese do NO a partir de fontes não enzimáticas (Bethke et al., 2004). Neste caso, o nitrito é protonado produzindo ácido nitroso (HNO_2) por meio de uma reação reversível favorecida por baixos valores de pH. Segundo Durnet et al. (1998) NO pode, também, ser produzido não-enzimaticamente a partir da redução de nitrito pelos carotenóides.

Esta molécula sinalizadora com ação antioxidante regula o nível e a toxidez dos ROIs que são gerados por diversos tipos de estresses (Delledone, 1998; Durner et al., 1998; Sang et al., 2008). Assim sendo, o NO é um fator que desencadeia a tolerância de várias espécies vegetais a diversos tipos de estresses abióticos como estresse hídrico (Tian e Lei, 2006), salino (Shi et al., 2007), por metais pesados (Singh et al., 2008) e por Al (Wang e Yang, 2005; Tian et al., 2007; Wang et al., 2010).

O preciso mecanismo pelo qual o NO melhora a tolerância das plantas aos efeitos tóxicos do Al não é perfeitamente conhecido (Xue et al., 2008). Há indicações de que o NO reduza a toxicidade do Al impedindo o estresse oxidativo causado por este metal (Wang e

Yang, 2005), quer seja pela eliminação de radicais superóxidos (\dot{O}_2^-), quer seja pela elevação da atividade de enzimas antioxidativas, especialmente da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) (Kopyra et al., 2003; Zhao et al., 2008).

Várias evidências acumuladas nos últimos anos indicam o envolvimento do NO nos mecanismos de defesa de plantas a estresses ambientais, inclusive ao estresse causado por excesso de Al. O mecanismo da ação protetora do NO sobre a toxidez de Al, entretanto, não foi ainda perfeitamente esclarecido em nenhuma espécie vegetal de valor econômico, em especial nos cultivares de milho desenvolvidos para cultivo regional, como os que foram utilizados na presente pesquisa.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência do alumínio sobre o crescimento e a morfologia externa de raízes e a influência do óxido nítrico (NO) sobre o estresse oxidativo causado por níveis tóxicos de Al em dois cultivares de milho com tolerância diferencial a este metal.

2.1. Objetivos específicos

1. Avaliar o perfil do crescimento e da morfologia externa das raízes de cultivares de milho com tolerância diferencial ao alumínio.
2. Avaliar a influência do NO sobre os efeitos tóxicos do Al no alongamento radicular.
3. Analisar os efeitos do Al sobre a atividade de enzimas da biossíntese de NO.
4. Avaliar a influência do NO sobre a intensidade do estresse oxidativo e sobre o funcionamento dos mecanismos antioxidativos enzimáticos e não enzimático em plantas de milho sob níveis tóxicos de Al.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Apel, K., Hirt, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, 55: 373-399, 2004.
- Arasimowicz, M., Floryszak-Wieczorek, J. Nitric oxide as a bioactive signaling molecule in plant stress responses. **Plant Science**, 172: 876-887, 2007.
- Bethke, P.C., Badger, M.R., Jones, R.L. Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. **Plant Cell**, 16: 332-341, 2004.
- Blamey, F.P.C., Nishizawa, N.K., Yoshimura, E. Timing, magnitude, and location of initial soluble aluminium injuries to mungbean roots. **Soil Science and Plant Nutrition**, 50: 67-76. 2004.
- Boscolo, P.R.S., Menossi, M., Jorge, R.A. Aluminum-induced oxidative stress in maize. **Phytochemistry**, 62: 181-189, 2003.
- Čiamporová, M. Morphological and structural response of plant roots to aluminum at organ, tissue and cellular levels. **Biologia Plantarum**, 45:161-171, 2002.
- Corpas, F.J., Barroso, J.B., Carreras, A., Quirós, M., Leon, A.M., Romero-Puertas, M.C., Esteban, F.J., Valderrama, R., Palma, J.M., Sandalio, L.M., Gomez, M., Del Rio, L.A. Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plant. **Plant Physiology**, 136: 2722-273, 2004.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R.A., Lamb, C. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. **Nature**, 394: 585-588, 1998.
- Durner, J., Wendehenne, D., Klessig, D.F. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP and cyclic ADP-ribose. **Plant Biology**, 95: 10328-10333, 1998.
- Foissner, I., Wendehenne, D., Langebartels, C., Durner, J. In vivo imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco. **Plant Journal**, 23: 817-82, 2000.
- Gould, K.S., Klinguer, A., Pugin, A., Wendehenne, D. Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response. **Plant, Cell and Environment**, 26: 1851-1862, 2003.
- Guo, F.Q., Crawford, N.M. Arabidopsis Nitric Oxide Synthase1 Is Targeted to Mitochondria and Protects against Oxidative Damage and Dark-Induced Senescence. **Plant Cell**, 17: 3436-3450, 2005.
- Jones, D.L., Blancaflor, E.B., Kochian, L.V., Gilroy, S. Spatial coordination of aluminium uptake, production of reactive oxygen species, callose production and wall rigidification in maize roots. **Plant, Cell and Environment**, 29: 1309-1318, 2006.

- Kopittke, P.M., Blamey, F.P.C., Menzies, N.W. Toxicities of soluble Al, Cu, and La include ruptures to rhizodermal and root cortical cells of cowpea. **Plant Soil**, 303: 217-227, 2008.
- Kopyra, M., Gwózd, E.A. Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. **Plant Physiology Biochemistry**, 41: 1011-1017, 2003.
- Ma, J.F., Furukawa, J. Recent progress in the research of external Al detoxification in higher plants: a minireview. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 97: 46-51, 2003.
- Meriga, B., Reddy, B.K., Rao, K.R., Reddy, L.A., Kishor, P.B.K. Aluminium-induced production of oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA damage in seedlings of rice (*Oryza sativa*). **Journal Plant Physiology**, 161: 63-68, 2004.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Breusegem, F.V. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends Plant Science**, 9: 490-498, 2004.
- Mittler, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Science**, 7: 405-409, 2002.
- Neill, S.J., Desikan, R., Hancock, J.T. Nitric oxide signaling in plants. **New Phytologist**, 159: 11-35, 2003.
- Piñeros, M.A., Shaff, J.E., Manslank, H.S., Carvalho, V.M., Kochian, L.V. Aluminum resistance in maize cannot be solely explained by root organic acid exudation. A comparative physiology study. **Plant Physiology**, 137: 231-41, 2005.
- Rosiello, R.O.P., Netto, J.J. Toxidez de alumínio em plantas: novos enfoques para um velho problema. In: Fernandes M.S. (ed.). *Nutrição Mineral de Plantas*. Viçosa, MG, p. 375-418, 2006.
- Sang, J., Jiang, M., Lin, F., Xu, S., Zhang, A., Tan, M. Nitric oxide reduces hydrogen peroxide accumulation involved in water stress-induced subcellular anti-oxidant defense in maize plants. **Journal of Integrative Plant Biology**, 50: 231-243, 2008.
- Scandalios, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, 103: 7-12, 1993.
- 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**, 26: 2027-2038, 2007.
- Shi, Q., Dinf, F., Wang, X., Wei, M. Exogenous nitric oxide protect cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, 45: 542-550, 2007.

- Singh, H.P., Batish, D.R., Kaur, G., Arora, K., Kohli, R.K. Nitric oxide (as sodium nitroprusside) supplementation ameliorates Cd toxicity in hydroponically grown wheat roots. **Environmental and Experimental Botany**, 63: 158-167, 2008.
- Tian, Q.Y., Sun, D.H., Zhao, M.G., Zhang, W.H. Inhibition of nitric oxide synthase (NOS) underlies aluminum-induced inhibition of root elongation in *Hibiscus moscheutos* L. **New Phytologist**, 174: 322-331, 2007.
- Tian, X., Lei, Y. Nitric oxide treatment alleviates drought stress in wheat seedlings. **Biologia Plantarum**, 50: 775-778, 2006.
- Tuteja, N., Chandra, M., Tuteja, R., Misra M.K. Nitric oxide as a unique bioactive signaling messenger in physiology and pathophysiology. **Journal of Biomedicine Biotechnology**, 4: 227-237, 2004.
- Wang, H.H., Huang, J.J., Bi, Y.R. Nitrate reductase-dependent nitric oxide production is involved in aluminum tolerance in red kidney bean roots. **Plant Science**, 179: 281-288, 2010.
- Wang, Y.S., Yang, Z.M. Nitric oxide reduces aluminum toxicity by preventing oxidative stress in the roots of *Cassia tora* L. **Plant Cell Physiology**, 46: 1915-1923, 2005.
- Xue, Y.J., Tao, L., Yang, Z.M. Aluminum-induced cell wall peroxidase activity and lignin synthesis are differentially regulated by jasmonate and nitric oxide. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, 56: 9676-9684, 2008.
- Yamamoto, Y., Kobayashi, Y., Matsumoto, H. Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots, **Plant Physiology**, 125: 199-208, 2001.
- Zhao, L., He, J., Wang, X., Zhang, L. Nitric oxide protects against polyethylene glycol-induced oxidative damage in two ecotypes of reed suspension cultures. **Journal of Plant Physiology**, 165: 182-191, 2008.

CAPÍTULO I

INFLUÊNCIA DE NÍVEIS TÓXICOS DE ALUMÍNIO SOBRE O CRESCIMENTO E A MORFOLOGIA DE RAÍZES DE MILHO

RESUMO

Os objetivos deste estudo foram avaliar os efeitos de níveis tóxicos de alumínio (Al) sobre o crescimento e a morfologia externa das raízes de dois genótipos de milho com tolerância diferencial a este elemento. Os genótipos de milho UFVM 100 (sensível) e UFVM 200 (tolerante) foram submetidos aos tratamentos com 0, 25, 50, 100 e 200 μM de Al em solução de CaCl_2 0,5 mM, pH 4,5, durante 12, 24, 36 e 48 horas e, então, foram determinados os teores de Al, o alongamento radicular (AR) e a morfologia externa de ápices radiculares. A análise química, o teste de hematoxilina e fotos obtidas por microscopia eletrônica de varredura com energia dispersiva de raios-X (EDS) mostraram maior acúmulo de Al nos ápices radiculares do genótipo UFVM 200. O Al, contudo, causou maior redução no alongamento radicular no genótipo UFVM 100 para todas as concentrações e tempos de exposição estudados. Observou-se correlação entre o teor de Al nos ápices radiculares e o alongamento radicular nos dois genótipos. O acúmulo de Al nos ápices radiculares em ambos os genótipos de milho causou danos nos ápices radiculares que foram verificados por ruptura das células da epiderme e consequente alteração na morfologia externa das raízes. A microanálise de varredura com raios-X (EDS) mostrou acúmulo de Al concomitante a uma elevação na concentração de fósforo nos ápices radiculares indicando uma possível precipitação de Al na forma de fosfato. O genótipo UFVM 200 mostrou-se mais tolerante ao Al que o genótipo UFVM 100 e os dados sugerem que parte desta tolerância possa ser resultado da neutralização do Al, por precipitação com fósforo, no apoplasto radicular.

TOXIC EFFECTS OF ALUMINUM LEVELS ON GROWTH AND MORPHOLOGY OF MAIZE ROOTS

ABSTRACT

The objectives of this study were to evaluate the effects of toxic levels of aluminum (Al) on growth and external morphology of the roots of two maize genotypes with different tolerance to this element. Genotypes UFVM 100 (sensitive) and UFVM 200 (moderately tolerant) were subjected to treatment with 0, 25, 50, 100 and 200 μM of Al in 0,5 mM CaCl_2 , pH 4.5, for 12, 24, 36 and 48 hours, and then we determined the contents of Al, root elongation (AR) and the external morphology of root tips. Chemical analysis, testing hematoxylin and photos taken by scanning electron microscopy with energy dispersive X-ray (EDS) showed greater Al accumulation in root tips of genotype UFVM 200. Al, however, caused greater reduction in root elongation in genotype UFVM 100 at all concentrations and exposure times studied. Correlation was observed between the Al content in the tissues of the root tips and root elongation in both genotypes. Al accumulation in root tips in both maize genotypes caused damage to root tips that have been verified by disruption of the epidermal cells and the consequent change in the external morphology of roots. The scanning microanalysis X-ray (EDS) showed Al accumulation concomitant with a rise in the concentration of phosphorus in root tips suggesting a precipitation of Al as a phosphate salt. The genotype UFVM 200 was more tolerant than the Al genotype UFVM 100 and the data suggest that this part may be tolerance results from the neutralization of Al, by precipitation with phosphorus in the root apoplast.

1. INTRODUÇÃO

A toxidez por alumínio (Al) é um dos principais fatores limitantes para a produção agrícola em solos ácidos, com valores de pH abaixo de 5,5. Muitos desses solos estão localizados em países em desenvolvimento, com crescente pressão populacional, levando à insegurança alimentar nestas regiões (Ligaba et al., 2009). Vários fatores podem contribuir para a acidificação do solo como por exemplo, a alta utilização de fertilizantes amoniacais e a frequente liberação atmosférica de poluentes industriais, associada à lixiviação dos solos com chuva ácida (Rengel e Zhang, 2003), bem como as próprias condições naturais do solo.

No Brasil, 205 milhões de hectares dos solos apresentam baixa capacidade de troca de íons e alta toxidez de Al, estando estes solos concentrados na região do cerrado (Fuente-Martínez e Herrera-Estrella, 1999). Além da toxidez de Al, os solos ácidos apresentam outros fatores que podem limitar a produção agrícola, como a toxidez por manganês (Mn), ferro (Fe) e deficiência de fósforo (P) (Kochian et al., 2004).

O sintoma primário da toxidez do Al em plantas é a inibição do crescimento radicular, que se manifesta poucos minutos após a exposição ao elemento (Kochian 1995; Yamamoto et al., 2003; Tian et al., 2007; Kopittke et al., 2008; Horst et al., 2010; Arroyave et al., 2011). Apesar de várias pesquisas terem sido desenvolvidas nos últimos anos, os mecanismos pelos quais o Al induz a inibição do alongamento radicular ainda não são perfeitamente compreendidos, e ainda geram dúvidas se as lesões primárias do Al ocorrem no apoplasto ou no simplasma (Horst et al., 2010).

Numerosos estudos indicam que o ápice radicular é o sítio primário da percepção da toxidez ao Al (Ma 2007; Tian et al., 2007; Yang et al., 2007; Horst et al., 2010; Motoda et al., 2011) e da posterior expressão da resistência a este metal (Wang et al., 2010). O Al interage com as células em múltiplos locais, como na parede celular, membrana plasmática e diversas estruturas do simplasma, resultando em danos estruturais e/ou funcionais, com alterações nas vias de transdução de sinais e na homeostase do íon cálcio (Ma et al., 2004; Ma 2007).

As paredes celulares são as primeiras regiões das raízes a entrarem em contato com o Al e, em função de suas características físico-químicas, elevada fração deste íon se liga a elas. Estudos mostram que, aproximadamente 85 a 90 % de todo Al acumulado nas raízes está fortemente ligado a grupos carboxílicos presentes na

matriz das pectinas das paredes celulares (Rengel e Reid 1997; Chang et al., 1999; Eticha et al., 2005; Yang et al., 2007).

Plantas expostas a níveis tóxicos de Al podem apresentar uma série de alterações na arquitetura e morfologia de suas raízes. Geralmente, ocorre redução na formação de raízes laterais e de pêlos radiculares, alteração na cor, engrossamento, atrofia e curvatura das raízes (Čiamporová, 2002). Adicionalmente a rizoderme e o córtex podem apresentar rupturas transversais (Yamamoto et al., 2001; Blamey et al., 2004; Jones et al., 2006; Kopittke et al., 2008). Segundo Čiamporová (2000), o aumento na concentração de Al no meio induz sérios danos à estrutura das células da coifa, da epiderme e de camadas corticais mais externas na região meristemática e de alongamento de plantas de milho. A localização da formação destas rupturas em raízes de ervilha (Yamamoto et al., 2001), milho (Jones et al., 2006) e feijão (Kopite et al., 2008) tem sido verificadas nas regiões a partir de 1mm do ápice radicular nas células externas do córtex da região de alongamento. Isso ocorre por que, as células mais externas da raiz acumulam mais Al em suas paredes do que as células localizadas mais internamente. Esse fato resulta em rigidez mais acentuada nas paredes das células mais externas, reduzindo significativamente a taxa de expansão, enquanto, as células mais internas continuam a se expandir, gerando força mecânica suficiente para romper as camadas mais externas das células da raiz.

Embora a formação e o estudo mais detalhado das rupturas celulares tenham sido relatados em plantas de *Vigna unguiculata* L. sob estresse por metais como Al, cobre (Cu) e lantânio (La) Kopite et al. (2008), pouca ênfase tem sido dada as pesquisas que utilizam metodologias mais detalhadas, como a microscopia eletrônica de varredura, em outras espécies de interesse econômico.

De forma geral, a intensidade dos danos gerados pelo Al depende do estágio de desenvolvimento da planta, da concentração desse metal e do nível de tolerância da planta (Ma et al., 2004; Meriga et al., 2004; Tahara et al., 2008). A tolerância das plantas ao Al parece ser resultado da operação concomitante ou não de mecanismos de exclusão e de desintoxicação interna (Kochian et al., 2004). Estes mecanismos possibilitam que as raízes de plantas expostas a níveis tóxicos de Al consigam reduzir ou evitar a expressão dos efeitos tóxicos deste elemento, como a inibição do alongamento radicular.

O objetivo do presente trabalho foi, portanto, avaliar os efeitos de níveis tóxicos de Al sobre o crescimento e a morfologia externa das raízes de dois cultivares de milho com tolerância diferencial ao Al.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção do material vegetal e condições de crescimento

Nos experimentos foram utilizados dois genótipos de milho (*Zea mays* L.) com tolerância diferencial ao Al: UFVM 100 e UFVM 200, considerados sensível e moderadamente tolerante ao Al, respectivamente, fornecidos pelo Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, MG.

As sementes, selecionadas quanto ao tamanho e forma, foram tratadas com ácido sulfúrico concentrado, durante 1 minuto e lavadas em água corrente e água desmineralizada. Em seguida, as sementes foram desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio 3% (v/v) por 15 minutos, sendo lavadas, novamente, em água corrente e água desmineralizada. As sementes foram colocadas para germinar em cartuchos de papel “germiteste”, pH neutro, que foram mergulhados em solução de CaCl_2 0,5 mM, pH 4,5, sob aeração contínua e mantidos em câmara úmida a 25 °C. Quatro dias após a semeadura, as plântulas foram selecionadas, quanto à uniformidade de tamanho e forma, e transplantadas para recipientes de polietileno contendo solução de CaCl_2 0,5 mM, pH 4,5, e submetidas aos tratamentos. O cultivo das plantas, tanto na fase preliminar quanto durante a aplicação dos tratamentos, foi realizado em sala de crescimento com temperatura controlada (25 ± 1 °C), sob irradiância de $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas.

2.2. Efeito de diferentes tempos de exposição e de concentrações de alumínio sobre o alongamento radicular.

Plântulas dos dois genótipos de milho obtidas e selecionadas conforme item 2.1 foram transferidas, em número de quatro para vasos de polietileno contendo 1,2 L de solução de CaCl_2 0,5 mM, pH 4,5, e submetidas aos tratamentos com AlCl_3 nas concentrações: 0, 25, 50, 100 e 200 μM . O comprimento da raiz principal foi mensurado imediatamente antes e após o tratamento das plântulas com Al durante

12, 24, 36 e 48 horas, utilizando régua milimetrada. O alongamento relativo ao controle foi estimado por:

$$\text{AR (\% controle)} = (\text{Alongamento Alt} / \text{Alongamento A10}) \times 100$$

AR (% controle) = Alongamento radicular em relação ao controle

A10 = Alongamento da raiz principal de plântulas controle (sem tratamento com Al)

Alt = Alongamento da raiz principal de plântulas submetidas ao tratamento com Al

2.3. Determinação dos teores de alumínio em ápices radiculares de plantas expostas a diferentes concentrações deste elemento

Os teores de Al foram determinados nos ápices radiculares das plântulas tratadas com 0, 25, 50, 100 e 200 μM de Al, por 24 h. Para isso, ápices radiculares de aproximadamente 1 cm, pesando cerca de 0,1 g de massa fresca foram incubados em solução de HCl 2M, por 48 horas (Wang e Yang, 2005). O teor de Al no extrato foi, então, determinado por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado - ICP-OES, no comprimento de onda 394,401 nm. Os resultados foram expressos em nmol g^{-1} de massa fresca.

2.4. Determinação do acúmulo e localização do alumínio em raízes pela técnica da hematoxilina

Plântulas dos dois genótipos de milho obtidas e selecionadas conforme item 2.1 foram transferidas, em número de seis, para vasos de polietileno contendo 1,6 L de solução de CaCl_2 0,5 mM, pH 4,5, e submetidas aos tratamentos com AlCl_3 nas concentrações: 0 e 50 μM durante 24 horas.

Após exposição aos tratamentos, foram selecionadas, aleatoriamente, seis plântulas, cujas raízes foram mergulhadas em solução de hematoxilina férrica 0,2% (m/v) em KIO_3 0,02% (m/v), durante 15 minutos (Polle et al., 1978). Para eliminar o excesso de corante, as plântulas foram removidas e transferidas para recipientes contendo água desmineralizada, sob aeração, por 15 minutos. Por fim, as raízes foram fotografadas em estereomicroscópio (Zeiss Stemi, modelo DV4).

2.5. Análise da micromorfologia dos ápices radiculares por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microanálise por energia dispersiva de raios-X

Plântulas dos dois genótipos de milho obtidas e selecionadas conforme item 2.1 foram transferidas, em número de seis, para vasos de polietileno contendo 1,6 L de solução de CaCl_2 0,5 mM, pH 4,5, e submetidas aos tratamentos com AlCl_3 nas concentrações: 0 e 50 μM durante 24 horas.

Após exposição das plântulas aos tratamentos foram coletados de seis plântulas por tratamento, escolhidas aleatoriamente, ápices radiculares, de aproximadamente 0,5 cm. O material foi fixado em glutaraldeído 2,5%, desidratado em série etílica, seco com CO_2 em equipamento de ponto crítico (Baltec, modelo CPD 030, Liechtenstein), afixado com fita dupla face em suporte de alumínio e, finalmente, coberto com carbono em metalizador. A documentação fotográfica foi realizada em microscópio eletrônico de varredura (Leo, modelo 1430VP, Cambridge, Inglaterra) operado a 20 kV com sonda de raios-X acoplada. A análise dos elementos carbono (C), oxigênio (O), sódio (Na), alumínio (Al), fósforo (P) e enxofre (S) por EDS foi realizada na região meristemática localizada logo acima da coifa (1 mm a partir do ápice radicular).

2.6. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado em todos os experimentos foi o de blocos casualizados, em esquema fatorial, com três repetições. No caso da avaliação do efeito do Al sobre o alongamento radicular utilizou-se esquema fatorial (2x5x5): dois genótipos de milho (UFVM 100 e UFVM 200), cinco níveis de Al (0, 25, 50, 100 e 200 μM) e cinco períodos de tempo (0, 12, 24, 36 e 48 horas). Na análise do teor de Al nos ápices radiculares utilizou-se o fatorial (2x5): dois genótipos de milho (UFVM 100 e UFVM 200) e cinco níveis de Al (0, 25, 50, 100 e 200 μM). E para a avaliação da localização e acúmulo de Al pela técnica da hematoxilina e do efeito do Al sobre a micromorfologia dos ápices radiculares utilizou-se o esquema fatorial (2x2): dois genótipos (UFVM 100 e UFVM 200) e dois níveis de Al (0 e 50 μM); Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), as médias comparadas pelo agrupamento de Skott Knott a 5% de probabilidade, e os fatores

quantitativos analisados por regressão. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa Sisvar, desenvolvido por Ferreira (1999).

3. RESULTADOS

3.1. Efeito de diferentes tempos de exposição e concentrações de alumínio sobre o alongamento radicular.

As raízes das plantas de ambos os genótipos expostas ao Al apresentaram aspecto quebradiço, principalmente na região do ápice radicular (dados não mostrados). O Al induziu, também, alterações na morfologia externa das raízes, como a curvatura e torção dos ápices radiculares, aumento radial das raízes e a inibição do desenvolvimento de pêlos radiculares e das ramificações laterais, resultando em redução no volume do sistema radicular (dados não mostrados).

O Al reduziu o alongamento da raiz principal nos dois genótipos em todas as concentrações e tempos de exposição estudados (Fig.1A e 1B). Independentemente da concentração de Al e do tempo de exposição a este metal, o genótipo UFVM 200 sofreu menor redução do alongamento radicular em comparação ao UFVM 100. Após 24 horas de exposição das plantas às concentrações de 25, 50, 100 e 200 μM de Al, as taxas relativas do alongamento radicular (% do controle) do genótipo UFVM 200 foram: 85,8; 70,4; 51,2 e 44,8 %, respectivamente. Para o genótipo UFVM 100 as taxas foram de 73,9; 50,1; 40,8 e 31,4 %, respectivamente.

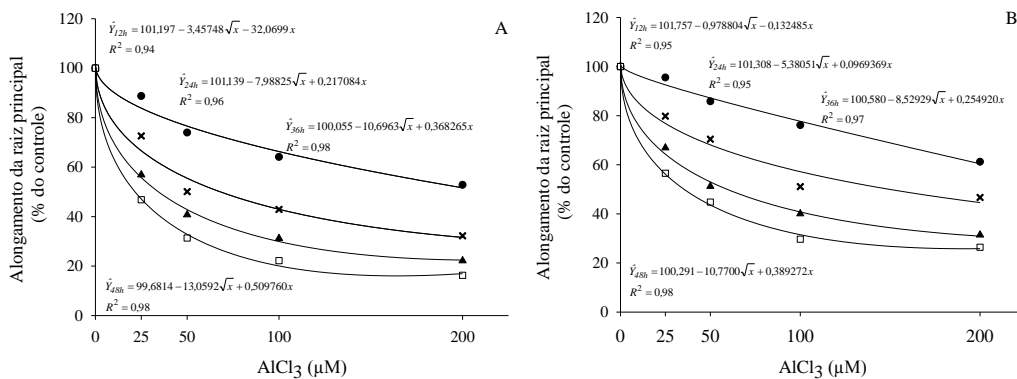


Figura 1 - Efeito do alumínio sobre o alongamento da raiz principal nos genótipos de milho UFVM 100 (A) e UFVM 200 (B) tratados com 0, 25, 50, 100 e 200 μM de Al, durante 12 (●), 24 (×), 36 (▲) e 48 (□) horas.

3.2. Teores de alumínio em ápices radiculares de plantas expostas a diferentes concentrações deste elemento

Após 24 h de exposição ao Al, verificou-se aumento significativo nos teores deste elemento nos ápices radiculares de ambos os genótipos de milho (Fig. 2). Os genótipos diferiram entre si apenas no tratamento com 50 μM de Al, tendo o genótipo UFVM 200 apresentado teor de Al cerca de 19% maior que o verificado para o genótipo UFVM 100. Após 24 h as plantas expostas a 200 μM de Al, apresentaram teores deste íon cerca de 23 e 21 vezes maiores que o de seus respectivos controles, nos genótipos UFVM 100 e 200, respectivamente.

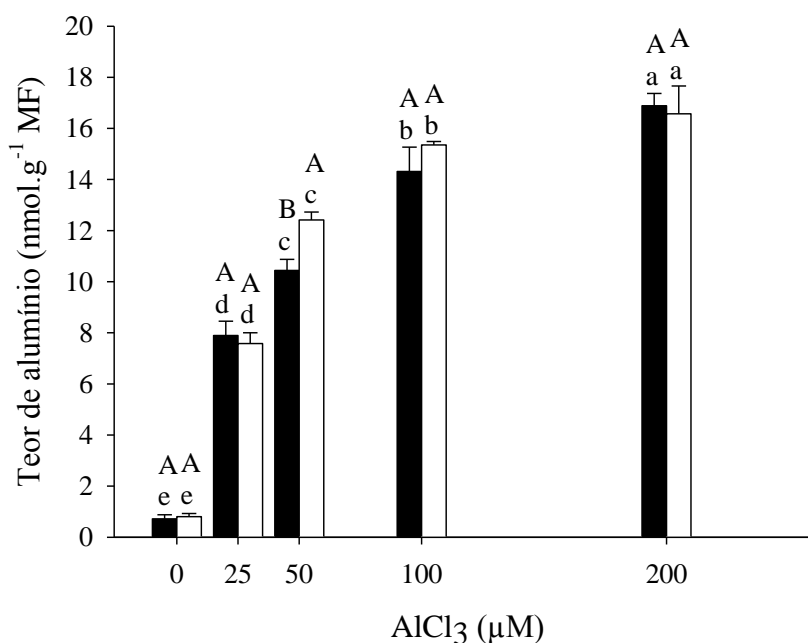


Figura 2 - Teores de alumínio nas raízes de dois genótipos de milho, submetidos a diferentes concentrações de AlCl_3 por 24 horas. UFVM 100 (■) e UFVM 200 (□). MF, massa fresca.

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, entre genótipos para o mesmo tratamento, e pela mesma letra minúscula entre tratamentos para o mesmo genótipo, não diferem significativamente pelo agrupamento de Skott Knott em nível de 5% de probabilidade. Barras representam o desvio padrão.

A análise de correlação feita para os dados de alongamento radicular (Fig. 1) e os teores de Al nos tecidos de ápices radiculares (Fig. 2) expostos as concentrações de (0, 25, 50, 100 e 200 μM de Al) por 24 horas apresentaram coeficientes de correlação de -0,98 e - 0,97 para os genótipos UFVM 100 e UFVM 200, respectivamente.

3.3. Determinação do acúmulo e localização do alumínio em raízes pela técnica da hematoxilina

As raízes das plantas dos dois genótipos tratadas com 50 μM de Al, após serem coradas com hematoxilina apresentaram coloração roxa escura, característica da reação deste corante com o Al (Fig. 3). Como esperado, raízes de plantas controle não exibiram coloração roxa após tratamento com hematoxilina. Observou-se que o ápice radicular (cerca de 2 mm), apresentou reação mais intensa à hematoxilina. O Al acumulou-se também nas regiões meristemática e de alongamento acima da coifa. O genótipo UFVM 200 apresentou coloração mais intensa do que o genótipo UFVM 100.

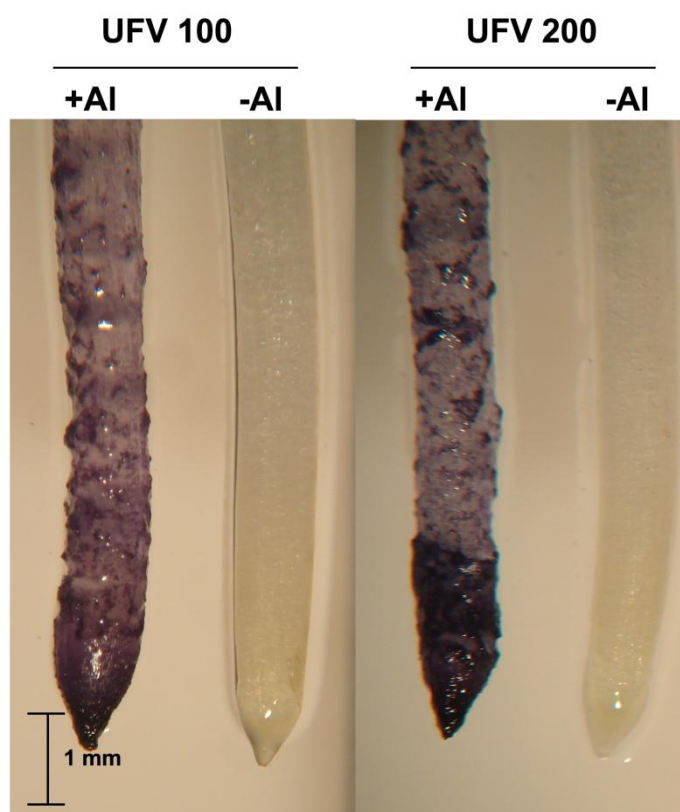
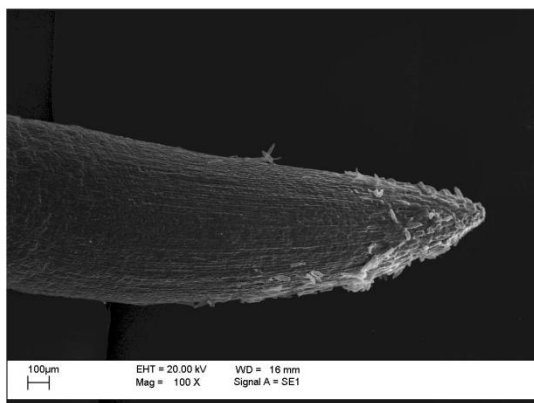


Figura 3 - Detecção de Al na raiz principal de milho (genótipos UFVM 100 e UFVM 200), após coloração com hematoxilina, após 24 h de exposição a 50 μM de Al. (N = 6).

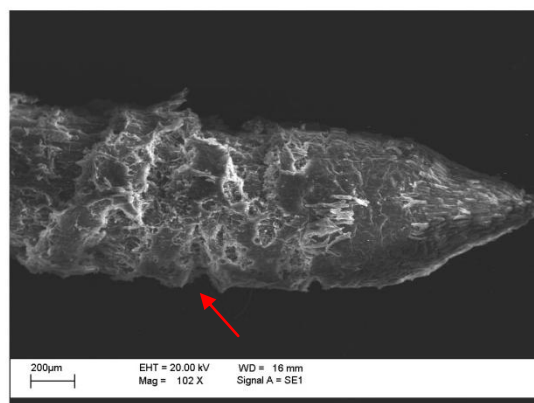
3.4. Análise da micromorfologia dos ápices radiculares por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microanálise por energia dispersiva de raios-X

UFV 100

Controle

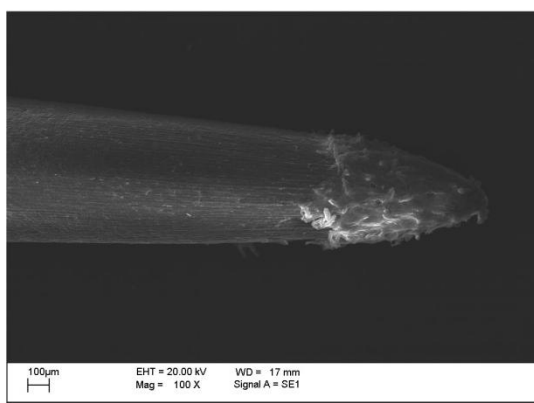


Alumínio



UFV 200

Controle



Alumínio

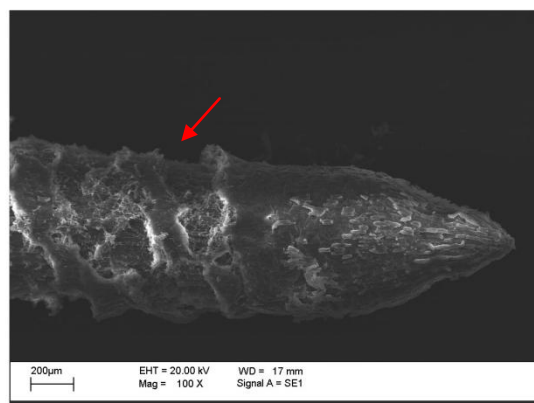


Figura 4 - Micromorfologia da raiz principal de plantas dos genótipos UFVM 100 e UFVM 200 expostas a Al 50 µM, por 24h. (Setas indicam local de ruptura transversal). (N = 6).

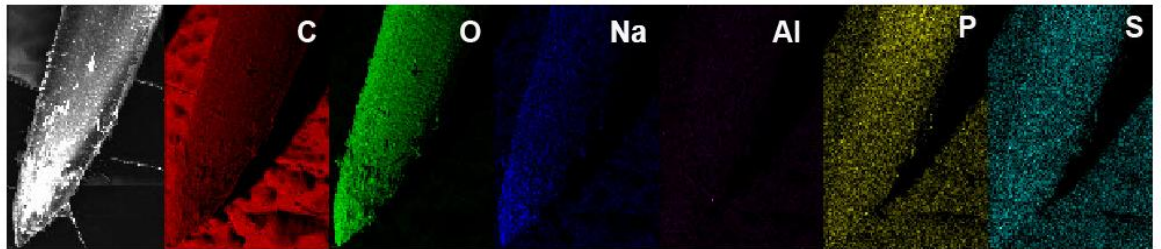
A observação dos ápices radiculares em microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrou diversos tipos de danos nos dois genótipos de milho, após exposição a 50 µM de Al por 24 horas (Fig. 4). Estes danos caracterizaram-se por intensa desorganização das células da protoderme comparadas as do tratamento controle. Pode-se notar o surgimento de rupturas transversais das células protodérmicas e de camadas externas do córtex. Estas rupturas caracterizam-se pelo “rascamento” das células em várias camadas logo acima da coifa (1 mm acima do ápice), nos dois genótipos, mas com maior intensidade no genótipo UFVM 100.

Os mesmos ápices radiculares da análise anterior, submetidos a uma análise por microscopia eletrônica de varredura com energia dispersiva de raios-X (EDS), mostram o incremento visual dos elementos carbono (C), alumínio (Al), fósforo (P) e enxofre (S) nos dois genótipos de milho após 24 h de exposição a 50 μ M de Al (Figura 5).

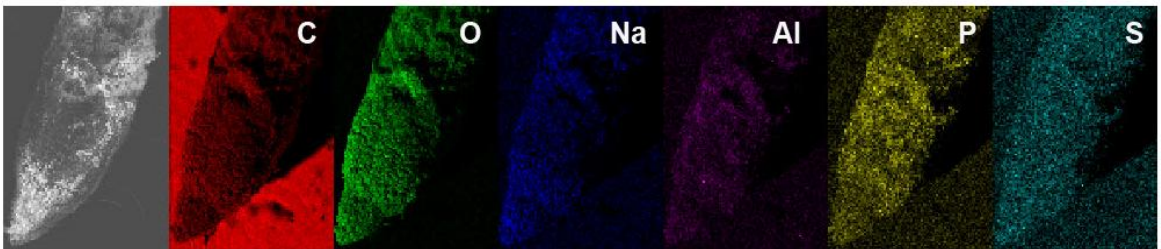
A

UFV 100

Controle



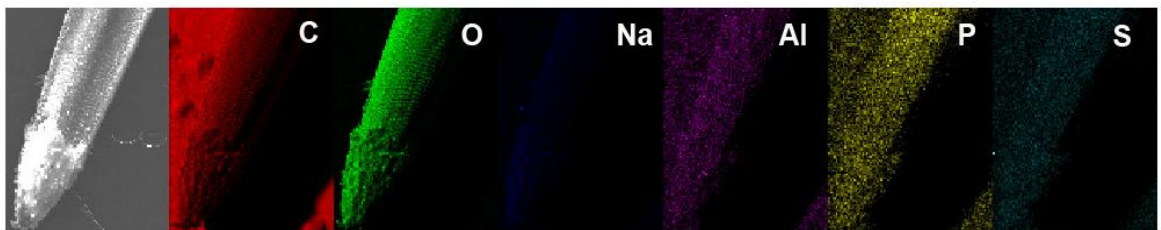
Alumínio



B

UFV 200

Controle



Alumínio

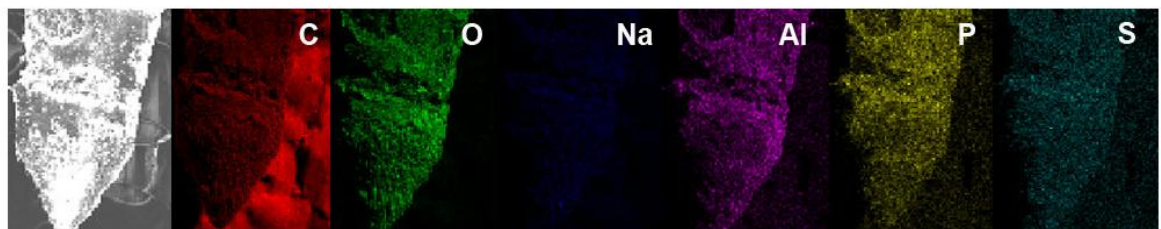


Figura 5 – Análise dos ápices radiculares dos genótipos de milho UFVM 100 (A) e UFVM 200 (B) após 24 h de exposição a 50 µM de Al em microscopia eletrônica de varredura com energia dispersiva de raios-X (EDS). A imagem a esquerda em escala cinza, representa a raiz da qual se originaram as demais imagens.

Após exposição das plantas ao Al, observou-se incremento significativo nos teores dos elementos C, Al, P e S, mas decréscimo no teor de O nos dois genótipos (Fig. 6). No caso do Na observou-se aumento no seu teor apenas no genótipo UFVM 200, após exposição ao Al. Os elementos Al e P apresentaram, respectivamente, aumentos de 3 e de 7 vezes para o genótipo UFVM 100 e de 5 e 9 vezes para o genótipo UFVM 200 após exposição a 50 μ M de Al, comparados ao controle.

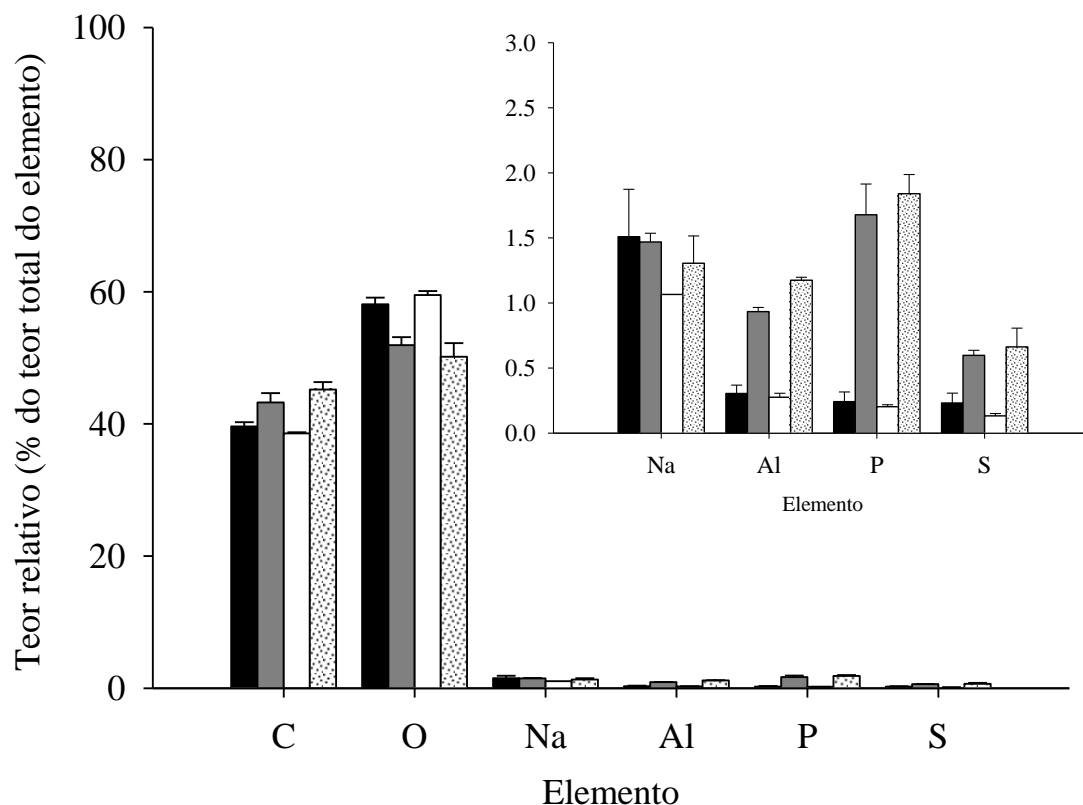


Figura 6 – Teores relativos dos elementos: carbono (C), oxigênio (O), sódio (Na), alumínio (Al), fósforo (P) e enxofre (S) em ápices radiculares dos genótipos UFVM 100 e UFVM 200, após tratamento com 0 ou 50 μ M de Al por 24 h. Valores foram obtidos por análise de microscopia eletrônica de varredura com energia dispersiva de raios-X (EDS). UFVM 100 Controle (■) e UFVM 100 + Al (▒), UFVM 200 Controle (□) e UFVM 200 + Al (▤). Barras representam o desvio padrão.

4. DISCUSSÃO

A maioria dos solos destinados à produção agrícola no Brasil apresenta problemas de acidez e toxidez por alumínio (Al) (Mazzocatto et al., 2002). Danos típicos da toxidez de Al ocorrem principalmente no sistema radicular que é, em geral, a parte da planta mais afetada por este íon, sendo que estes danos se manifestam poucos minutos após a exposição das plantas ao metal (Kochian, 1995; Vitorello et al., 2005; Tahara et al., 2008). Por essa razão, a avaliação do crescimento radicular tem sido amplamente utilizada como indicadora de tolerância ao Al, principalmente em seleções rápidas de genótipos tolerantes (Piñeros et al., 2005).

A inibição do alongamento radicular é o principal sinal de toxidez de Al, cuja intensidade pode variar com a espécie e com os diferentes tecidos (Motoda et al., 2010). Em nosso estudo, a inibição foi intensificada pelo incremento nas concentrações de Al e pelo tempo de exposição a este elemento. A menor inibição no alongamento radicular verificada no genótipo UFVM 200 corroboram os resultados obtidos por Dos Anjos (2007) e Fonseca (2011) caracterizando este genótipo como mais tolerante a este elemento do que o genótipo UFVM 100.

A absorção e o acúmulo do Al afetam as plantas em nível celular, fisiológico e bioquímico, principalmente na região radicular (Kumar et al., 1995; Wagatsuma et al., 1995). O principal alvo da ação tóxica do Al é o ápice da raiz (Wang et al., 2006; Hartwig, et al., 2007) especialmente a região meristemática, comprometendo o alongamento celular (Chaffai et al., 2005).

A inibição do alongamento radicular causada por níveis tóxicos de Al se dá, provavelmente, por aumento na estabilização da rede de microtúbulos, com conseqüente aumento da rigidez da parede celular (Blancaflor et al., 1998; Sivaguru et al., 1999). Segundo Matsumoto (2000) o acúmulo do íon Al nos tecidos radiculares correlaciona-se inversamente com a sensibilidade das plantas ao estresse por Al. No presente estudo, contudo, esta hipótese não foi comprovada, conforme obtido com dois genótipos de arroz (Miftahudin et al., 2007). Os dois genótipos de milho não diferiram entre si, exceto quando sob tratamento com 50 μ M de Al no qual observou-se maior teor de Al nos ápices do genótipo considerado mais tolerante (UFVM 200). Na concentração de 15 ppm, o cultivar tolerante (Krowal) absorveu mais Al. Na concentração de 30 ppm, o genótipo sensível (IR64) absorveu mais Al e em concentrações mais elevadas eles passaram a não diferir estatisticamente entre si.

Esta tendência de diminuir e, até mesmo, serem eliminadas as diferenças genótípicas em concentrações mais elevadas de Al foi confirmada neste experimento. Os dois genótipos não diferiram entre si quando tratados com Al a concentrações acima de 50 μM , indicando que a tolerância do genótipo UFVM 200 se restringia a concentrações de Al iguais ou inferiores a 50 μM .

Para os dois genótipos de milho foram encontradas correlações significativas entre as concentrações de Al nas raízes e a redução no alongamento radicular. Vários autores têm investigado os efeitos tóxicos do Al em diferentes genótipos de milho. Estudos realizados com outros genótipos de milho (*Zea mays* L.), com tolerância diferencial ao Al, têm mostrado quase que invariavelmente maior redução no alongamento radicular nos genótipos considerados mais sensíveis (Pintro et al., 1995; Boscolo et al., 2003; Piñeros et al., 2005; Giannakoula et al., 2008). O mesmo se tem observado em outras gramíneas, como trigo (Kikui et al., 2007; Ye et al., 2011), arroz (Justino et al., 2006) e, também, em Urochloa (Arroyave et al., 2011). Desta forma, os efeitos tóxicos do Al são caracterizados pelo menor crescimento e espessamento do sistema radicular, resultando em menor volume de solo explorado pelas raízes. Isso prejudica a absorção de água e nutrientes e, conseqüentemente o desenvolvimento da planta.

A coloração de ápices radiculares com hematoxilina para a detecção da presença de Al tem sido amplamente utilizada na discriminação de genótipos quanto à tolerância ao Al (Yamamoto et al., 2001; Miftahudin et al., 2007; Peixoto et al., 2007; Zhen et al., 2009; Castilhos et al., 2011). A hematoxilina é um corante orgânico, de caráter básico, que ao complexar o Al promove a formação de uma cor azul-turquesa ao ápice radicular (Baker, 1962). Como este corante é específico ao Al, tem-se uma boa margem de segurança quanto à presença deste elemento. Os resultados do presente trabalho não deixam dúvida quanto ao maior teor de Al nos ápices de raízes do genótipo UFVM 200. É interessante salientar que esta observação tem respaldo na análise química do metal no ápice radicular após o mesmo tempo e a mesma concentração de Al. O genótipo UFVM 200, portanto, deveria ter a maior inibição do alongamento radicular, mas não foi isto que aconteceu. A menor redução no alongamento radicular do genótipo UFVM 200, apesar do maior acúmulo de Al, pode indicar que o Al, ou grande parte dele, não tenha entrado na célula. É provável que o Al tenha se complexado a componentes moleculares da parede celular

conforme sugerem Delhaize e Ryan 1995, Chang et al., 1999, Eticha et al., 2005 e Yang et al., 2011.

A inibição radicular causada pelo Al foi acompanhada por alterações morfológicas no ápice radicular, caracterizado por rupturas transversais acima da coifa em ambos os genótipos de milho. Rupturas externas de raízes expostas a níveis tóxicos de Al foram verificadas, também, em feijão (*Vigna unguiculata* L.) (Kopittke et al., 2008), ervilha (*Pisum sativum* cv. Alaska) (Yamamoto et al., 2001; Motoda et al., 2011), e milho (*Zea mays*) (Budikova et al., 1998; Jones et al., 2006). Estas rupturas transversais, geralmente, se desenvolvem nas regiões subapicais pelo aumento do diâmetro e “rasgamento” das células exteriores do córtex e da rizoderme na região de alongamento (Blancaflor et al., 1998; Blamey et al., 2004; Kopittke et al., 2008; Motoda et al., 2010). Segundo estes autores, a redução do alongamento e formação das rupturas resultam da ligação do Al aos componentes das paredes celulares e do incremento na síntese de lignina, aumentando assim a rigidez e reduzindo a elasticidade da parede celular. Adicionalmente, as células protodérmicas e corticais do meristema fundamental de raízes de milho sob toxidez de Al, apresentam-se mais curtas e mais largas do que em células de raízes controle (Čiamporová et al., 2000).

Segundo Sivaguru e Horst (1998) a zona distal de transição (ZDT) caracteriza-se por células que estão mudando de uma fase de atividade mitótica para uma fase preparatória para o rápido alongamento. Portanto, nesta região, localizada acima de 1 mm do ápice radicular que foram observadas as rupturas, conforme descrito por (Yamamoto et al., 2001; Jones et al., 2006; Motoda et al., 2010; 2011). Em estudo realizado por Čiamporová et al. (2002), o Al foi detectado na ZDT de células epidérmicas após alguns segundos após o tratamento com este metal. Já em outros tecidos, houve incremento gradual na absorção de Al após 1 hora de exposição. Na epiderme ocorreu o maior acúmulo de Al, seguido pelas células externas do córtex, células medianas do córtex, células interiores do córtex e estelo.

Análise em microscopia eletrônica de varredura com energia dispersiva de raios-X (EDS) permitiu a estimativa dos teores de nutrientes localizados nas camadas celulares mais externas do tecido. Ficou evidente um incremento significativo no teor dos elementos C, Al, P e S nas plantas tratadas com Al comparado ao controle. De modo semelhante, Vázquez et al. (1999), utilizando a técnica de EDS com microscopia eletrônica de transmissão detectaram Al e P em depósitos eletrodensos

localizados nas paredes celulares de raízes de um genótipo de milho tolerante ao Al, após tratamento com 25 μM deste elemento por 4 h. Após vinte e quatro horas, entretanto, Al e P não foram detectados na região de 0-1,5 mm do ápice radicular. Estes autores por outro lado, encontraram quantidades significativas de Al e P em depósitos eletrodensos localizados nos vacúolos após 24 h de tratamento com Al. Segundo os autores, os resultados obtidos são reflexos da complexação e transporte do Al da parede celular para os vacúolos, provavelmente após sua complexação com P ou ácidos orgânicos. Consubstancia esta hipótese o trabalho de Macklon e Sim (1992) demonstrou a existência de quantidades consideráveis de uma forma condensada de fósforo inorgânico (Pi) capaz de complexar o Al nos vacúolos de células corticais da raiz de *Lolium perenne* L.

A microanálise de varredura com raios-X da superfície de ápices radiculares de dois genótipos de brachiaria não indicou a presença de quantidade significativa de Al na superfície dos ápices radiculares após 24 h de exposição a 200 μM deste elemento (Arroyave et al., 2011). Embora tenham encontrado pequenos depósitos brancos de silicato de Al, os autores relatam que eles não fazem parte do mecanismo de tolerância desta espécie ao Al. A maior tolerância da *Urochloa decumbens* em relação à *U. brizantha* foi atribuída por Arroyave et al. (2011) a um eficiente mecanismo de exclusão envolvendo a síntese do ácido clorogênico.

Plantas submetidas a níveis tóxicos de Al manifestam, quase sempre, sintomas de deficiência de P, indicativo de ocorrência de alguma interação entre estes dois elementos, especialmente na superfície e no interior das raízes (Gaume et al., 2001). Na parede celular, a interação entre Al e P pode resultar na formação de complexos e, principalmente, de compostos pouco solúveis como o $\text{Al}_4(\text{PO}_4)_3$, reduzindo a absorção do P (Zheng et al., 2005). O aumento na concentração de P na solução nutritiva resultou em aumento nos teores de P e de Al nas raízes e redução do efeito do Al sobre o crescimento de cultivares de milho (Gaume et al., 2001). Resultados como estes têm levado alguns autores a postularem um possível papel do P na tolerância ao Al em trigo (Pellet et al., 1996; Zheng et al., 2005) e milho (Gaume et al., 2001). Corroborando com estes autores, a análise em EDS no presente trabalho verificou que houve aumento do P e do Al à medida que aumentou-se o teor de Al na solução (Fig. 6).

O maior alongamento radicular do genótipo UFVM 200, para toda a faixa de concentração de Al estudada, demonstra a maior tolerância deste genótipo ao Al em

relação ao genótipo UFVM 100. O genótipo UFVM 200, contudo, apresentou maior teor de Al com base na análise química, na coloração com hematoxilina e nas análises com ICP-OES e EDS. Apesar disto, a análise micromorfológica externa das raízes mostram menores danos ao ápice das raízes do genótipo UFVM 200. Os resultados, portanto, indicam que uma fração substancial do Al no genótipo UFVM 200 pode estar na forma de precipitado no apoplasto, possivelmente na forma de fosfato, conforme sugerem vários autores (Taylor, 1991; Pellet et al., 1996; Zheng et al., 2005) e, ou acumulado em vacúolos das células radiculares numa forma inócua ao metabolismo celular, complexado com fosfato, silício (Vázquez et al., 1999) ou ligantes orgânicos como oxalato (Kochiam, 1995). Zheng et al. (2005) encontraram maiores concentrações de Al e P nas raízes do genótipo tolerante de milho. Formas precipitadas de Al com P podem se acumular na superfície radicular, nas paredes celulares de células radiculares (Taylor, 1991) e são geralmente consideradas não tóxicas para as plantas.

5. CONCLUSÕES

Os dois genótipos de milho submetidos a níveis tóxicos de Al sofreram reduções no alongamento radicular com maior intensidade no genótipo UFVM 100, considerado mais sensível a este elemento. Verificou-se por análise química, teste de hematoxilina e microscopia eletrônica de varredura com energia dispersiva de raios-X (EDS) que houve acúmulo de Al nos ápices radiculares. O acúmulo de Al nos ápices radiculares causou alterações morfológicas na região meristemática nos dois genótipos, especialmente no UFVM 100. O acúmulo de Al foi acompanhado por elevação nos teores de P na região externa proveniente de remobilização do metabolismo celular, indicando uma possível precipitação de fosfato de Al no apoplasto dos ápices radiculares.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arroyave, C., Barceló, J., Poschenrieder, C., Tolrà, R. Aluminium-induced changes in root epidermal cell patterning, a distinctive feature of hyperresistance to Al in *Brachiaria decumbens*. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 105: 1477-1483, 2011.
- Baker, J.R. Experiments on the action of mordants. 2. Aluminum-haematein. **Quarterly Journal of Microscopical Science**, 103: 493-517, 1962.
- Blamey, F.P.C., Nishizawa, N.K., Yoshimura, E. Timing, magnitude, and location of initial soluble aluminum injuries to mungbean roots. **Soil Science and Plant Nutrition**, 50: 67-76, 2004.
- Blancaflor, E.B., Jones, D.L. Gilroy, S. Alterations in the cytoskeleton accompany aluminum-induced growth inhibition and morphological changes in primary roots of maize. **Plant Physiology**, 118, 159-172, 1998.
- Boscolo, P.R.S., Menossi, M., Jorge, R.A. Aluminum-induced oxidative stress in maize. **Phytochemistry**, 62: 181-189, 2003.
- Budikova, S. Čiamporova, M. Growth and structural responses of maize roots to aluminium stress, in: I. Tsekos, M. Moustakao (Eds.), **Progress in Botanical Research**, pp. 419-422, 1998.
- Castilhos, G., Farias, J.G., Schneider, A.B., Oliveira, P.H., Nicoloso, F.T., Schetinger, M.R.C., Delatorre, C.A. Aluminum-stress response in oat genotypes with monogenic tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, 74: 114-121, 2011.
- Chaffai, R. Marzouk, B. El Ferjani, E. Aluminum mediates compositional alterations of polar lipid classes in maize seedlings. **Phytochemistry**, 66: 1903-1912, 2005.
- Chang, Y.C., Yamamoto, Y., Matsumoto, H. Accumulation of aluminium in the cell wall pectin in cultured tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cells treated with a combination of aluminium and iron. **Plant, Cell and Environment**, 22:1009–1017, 1999.
- Čiamporová, M. Diverse responses of root cell structure to aluminum stress. **Plant Soil**, 226: 113-116, 2000.
- Čiamporová, M. Morphological and structural response of plant roots to aluminum at organ, tissue and cellular levels. **Biologia Plantarum**, 45: 161-171, 2002.

- Delhaize, E., Ryan, P.R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiology**, 107:315-321, 1995.
- Dos Anjos, O. F. Exsudação de ácido málico e alongamento radicular de genótipos de milho tratados com níveis tóxicos de alumínio. Viçosa, MG: UFV. 2007. 38 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, 2007.
- Eticha, D., Stass, A., Horst, W.J. Cell-wall pectin and its degree of methylation in the maize root-apex: significance for genotypic differences in aluminium resistance. **Plant, Cell and Environment**, 28: 1410-1420, 2005.
- Ferreira, D.F. (1999) SISVAR - Sistema de análises estatísticas. Versão 4.3. Lavras: UFLA.
- Fonseca Junior, E.M. 2011. Ação do etileno e de intermediários reativos de oxigênio sobre o crescimento de ápices radiculares em dois genótipos de milho, na presença de alumínio. Viçosa, MG: UFV. 2011. 92 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, 2011.
- Fuente-Martínez, J.M., Herrera-Estrella, L. Advances in the understanding of aluminum toxicity and the development of aluminum-tolerant transgenic plants. **Advances in Agronomy**, 66: 103-120, 1999.
- Gaume, A.; Mächler, F.; Frossard, E. Aluminum resistance in two cultivars of *Zea mays* L.: root exudation of organic acids and influence of phosphorous nutrition. **Plant and Soil**, 234: 73-81, 2001.
- Giannakoula, A., Moustakas, M., Mylona, P., Papadakis, L., Yupsani, T. Aluminum tolerance in maize is correlated with increased levels of mineral nutrients, carbohydrates and proline, and decreased levels of lipid peroxidation and accumulation. **Journal of Plant Physiology**, 165: 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**, 67: 487-494. 2010.
- Hartwig, I., Oliveira, A.C., Carvalho, F.I.F., Bertan, I., Silva, J.A.G., Schmidt, D.A.M., Valério, I.P., Maia, L.C., Fonseca, D.A.R., Reis, C.E.S. Mecanismos associados à tolerância ao alumínio em plantas. **Semina: Ciências Agrárias**, 28: 219-228, 2007.

- Horst, W.J., Wang, Y.X., Eticha, D. The role of the root apoplast in aluminium-induced inhibition of root elongation and in aluminum resistance of plants: a review. **Annals of Botany**, 106: 185-197, 2010.
- Jones DL, Blancaflor EB, Kochian LV, Gilroy S. Spatial coordination of aluminium uptake, production of reactive oxygen species, callose production and wall rigidification in maize roots. **Plant, Cell and Environment**, 29: 1309-1318, 2006.
- Justino, G.C., Cambraia, J., Oliva, M.A., Oliveira, J.A. Absorção e redução de nitrato em duas cultivares de arroz na presença de alumínio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 41: 1285-1290, 2006.
- Kikui, S., Sasaki, T., Osawa, H., Matsumoto, H., Yamamoto, Y. Malate enhances recovery from aluminum-caused inhibition of root elongation in wheat. **Plant Soil**, 290: 1-15, 2007.
- Kochian, L. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 46: 237-260, 1995.
- Kochian, L.V., Hoekenga, O.A., Piñeros, M.A. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, 55: 459-493, 2004.
- Kopittke, P.M., Blamey, F.P.C., Menzies, N.W. Toxicities of soluble Al, Cu, and La include ruptures to rhizodermal and root cortical cells of cowpea. **Plant Soil**, 303: 217-227, 2008.
- Kumar, P.B.A.N., Dushenkov, V., Motto, H. Phytoextraction: The use of plants to remove heavy metals from soils. **Environmental Science Technology**, 29: 1232-1238, 1995.
- Ligaba, A., Kochian, L.V., Piñeros, M.A. Phosphorylation at S384 regulates the activity of the TaALMT1 malate transporter that underlines aluminum resistance in wheat. **Plant Journal**, 60: 411-423, 2009.
- Ma, J.F., Shen, R.F., Nagao, S., Tanimoto, E. Aluminum targets elongating cells by reducing cell wall extensibility in wheat roots. **Plant and Cell Physiology**, 45: 583-589, 2004
- Ma, J.F. Syndrome of aluminum toxicity and diversity of aluminum resistance in higher plants. **International Review of Cytology**, 264: 225-252, 2007.

- Macklon, A.E.S., Sim, A. Modifying effects of a non-toxic level of aluminium on phosphate fluxes and compartmentation in root cortex cells of intact ryegrass seedlings. **Journal of Experimental Botany**, 43: 1483-1490, 1992.
- Matsumoto, H. Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. **International Review of Cytology**, 200: 1-46, 2000.
- Mazzocato, A.C., Rocha, P.S.G., Sereno, M.J.C.M., Bohnen, H., Grongo, V., Neto, J.F.B. Tolerância ao alumínio em plântulas de milho. **Ciência Rural**, 32: 19-24, 2002.
- Meriga, B., Reddy, B.K., Rao, K.R., Reddy, L.A., Kishor, P.BK. Aluminium-induced production of oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA damage in seedlings of rice (*Oryza sativa*). **Journal Plant Physiology**, 161: 63-68, 2004.
- Miftahudin., Nurlaela., Juliarni. Uptake and distribution of aluminum in root apices of two rice varieties under aluminum stress. **Journal Bioscience**, 14: 110-114, 2007.
- Motoda, H., Kano, Y., Hiragami, F., Kawamura, K., Matsumoto, H. Morphological changes in the apex of pea roots during and after recovery from aluminum treatment. **Plant Soil**, 333: 49-58, 2010.
- Motoda, H., Kano, Y., Hiragami, F., Kawamura, K., Matsumoto, H. Changes in rupture formation and zonary region stained with evans blue during the recovery process from aluminum toxicity in the pea root apex. **Plant Signaling e Behavior**, 6: 98-100, 2011.
- Pellet, D.M., Papernik, L.A., Kochian, L.V. Multiple aluminumresistance mechanisms in wheat: roles of root apical phosphate and malate exudation. **Plant Physiology**, 112: 591-597, 1996.
- Peixoto, P.H.P., Pimenta, D.S., Cambraia, J. Alterações morfológicas e acúmulo de compostos fenólicos em plantas de sorgo sob estresse de alumínio. **Bragantia**, 66: 17-25, 2007.
- Piñeros, M.A., Shaff, J.E., Manslank, H.S., Carvalho, V.M., Kochian, L.V. Aluminum resistance in maize cannot be solely explained by root organic acid exudation. A comparative physiology study. **Plant Physiology**, 137: 231-41, 2005.
- Pintro, J., Barloy, J., Fallavier, P. Aluminium toxicity in corn plants cultivated in a low ionic strength nutrient solution discrimination of two corn cultivars. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**, 7: 121-128, 1995.

- Polle, E., Konzak, C.F., Kittrick, J.A. Visual detection of aluminum tolerance leaves in wheat by hematoxylin staining of seedling roots. **Crop Science**, 18: 823-827, 1978.
- Rengel, Z., Reid, R.J. Uptake of Al across the plasma membrane of plant cells. **Plant Soil**, 192: 31-35, 1997.
- Rengel, Z., Zhang, W.H. Role of dynamics of intracellular calcium in aluminiumtoxicity syndrome. **New Phytologist**, 159: 295-314, 2003.
- Sivaguru, M., Baluska, F., Volkman, D., Felle, H.H., Horst, W.J. Impacts of aluminum on the cytoskeleton of the maize root apex. short-term effects on the distal part of the transition zone. **Plant Physiology**, 119: 1073-1082, 1999.
- Sivaguru, M., Horst, W. The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize. **Plant Physiology**, 116: 155-163, 1998.
- 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**, 307: 167-178, 2008.
- Taylor, G.J. Current views of the aluminum stress response: the physiological basis of tolerance. **Current Top Plant Biochemical Physiology**, 10: 57-93, 1991.
- Tian, Q.Y., Sun, D.H., Zhao, M.G., Zhang, W.H. Inhibition of nitric oxide synthase (NOS) underlies aluminum-induced inhibition of root elongation in Hibiscus moscheutos L. **New Phytology**, 174: 322-331, 2007.
- Vázquez, M.D., Poschenrieder, C., Corrales, I., Barceló, J. Change in apoplastic aluminum during the initial growth response to aluminum by roots of a tolerant maize variety. **Plant Physiology**, 119: 435-444, 1999.
- Vitarello, V.A., Capaldi, F.R., Stefanuto, V.A. Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 17: 129-143, 2005.
- Wagatsuma, T., Ishikawa, S., Obata, H., et al. Plasma membrane of younger and outer cells is the primary specific site for aluminum toxicity in roots. **Plant and Soil**, 171: 105-112, 1995.
- Wang, H.H., Huang, J.J., Bi, Y.R. Nitrate reductase-dependent nitric oxide production is involved in aluminum tolerance in red kidney bean roots. **Plant Science**, 179: 281-288, 2010.

- Wang, J., Raman, H., Zhang, G., Mendham, N., Zhou, M. Aluminum tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.): physiological mechanisms, genetics and screening methods. **Journal of Zhejiang University Science B**, 7: 769-787, 2006.
- Wang, Y.S., Yang, Z.M. Nitric oxide reduces aluminum toxicity by preventing oxidative stress in the roots of *Cassia tora* L. **Plant Cell Physiology**, 46: 1915-1923, 2005.
- Yamamoto, Y., Kobayashi, Y., Matsumoto, H. Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots, **Plant Physiology**, 125: 199-208, 2001.
- Yamamoto, Y., Kobayashi, Y., Devi, S.R., Rikiishi, S., Matsumoto, H. Oxidative stress triggered by aluminum in plant roots. **Plant Soil**, 255: 239-24, 2003.
- Yang, J.L., Li, Y.Y., Zhang, Y.J., Zhang, S.S., Wu, Y.R., Wu, P., Zheng, S.J. Cell wall polysaccharides are specifically involved in the exclusion of aluminum from the rice root apex. **Plant Physiology**, 146: 602-61, 2007.
- Yang, J.L., Zhu, X.F., Peng, Y.X., Zheng, C., Li, G.X., Liu, Y., Shi, Y.Z., Zheng, S.J. Cell Wall hemicellulose contributes significantly to aluminum adsorption and root growth in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, 155: 1885-1892, 2011.
- Ye, Y., Qiaolan, W., Mingjian, G., Zaihua, G., Zhuqing, Z. 2011. Al-induced root cell wall chemical components differences of wheat (*Triticum aestivum* L.) differing in Al tolerance. **African Journal of Biotechnology**, 10: 6762-6772, 2011.
- Zhen, Y., Miao, L., Su, J., Liu, L., Yin, Y.L., Wang, S.S., Pang, Y.J., Shen, H.G., Tian, D., Qi, J.L., Yang, Y. Differential responses of anti-oxidative enzymes to aluminum stress in tolerant and sensitive soybean genotypes. **Journal of Plant Nutrition**, 32: 1255-1270, 2009.
- Zheng, S.J., Yang, J.L., He, Y.F., Yu, X.H., Zhang, L., You, J.F., Shen, R.F., Matsumoto, H. Immobilization of aluminum with phosphorus in roots is associated with high aluminum resistance in buckwheat. **Plant Physiology**, 138: 297-303, 2005.

CAPÍTULO II

PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NAS RESPOSTAS AO ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR ALUMÍNIO EM RAÍZES DE MILHO

RESUMO

Os objetivos do presente trabalho foram avaliar a influência do NO sobre os efeitos tóxicos do Al no alongamento radicular, na atividade de enzimas da biossíntese de NO, sobre a intensidade do estresse oxidativo e sobre o funcionamento dos mecanismos antioxidativos enzimáticos e não enzimáticos em plantas de milho sob níveis tóxicos de Al. Nos experimentos foram utilizados os genótipos de milho UFVM 100 (sensível) e UFVM 200 (tolerante), submetidos aos tratamentos com 0 e 50 μM de Al e 0, 25, 50 e 100 μM de SNP em solução de CaCl_2 0,5 mM, pH 4,5, durante 24 horas. Foram avaliados os efeitos dos inibidores da sintase do óxido nítrico (NOS) e da redutase do nitrato (RN) e do sequestrador de NO (PTIO) sobre a inibição do alongamento radicular, as atividades da NOS e RN e os teores de NO, em plantas tratadas com Al. Num segundo experimento foram avaliados os efeitos do Al e do NO sobre os teores de intermediários reativos de oxigênio (ROIs), ascorbato (AA), desidroascorbato (DHA), malondialdeído (MDA) e sobre a atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD), peroxidase do ascorbato (APX), catalase (CAT), peroxidase (POX), peroxidase da glutatona (GPX), redutase da glutatona (GR), lipoxigenase (LOX), redutase do monodesidroascorbato (MDHAR) e redutase do desidroascorbato (DHAR). A exposição de plantas de milho ao Al resultou em intensa absorção e acúmulo de Al nas raízes das plantas dos genótipos de milho estudados. O aumento dos teores de Al nos ápices radiculares induziu a produção de superóxidos, peróxidos de hidrogênio e radical hidroxila resultando em estresse oxidativo, caracterizado por aumento na peroxidação de lipídios e na atividade da LOX. Paralelamente, observou-se aumento na atividade de algumas enzimas antioxidativas (SOD, CAT, POX, GR e GPX) indicativo de uma participação ativa destas enzimas no processo de eliminação do excesso de ROIs induzidos pela toxidez de Al. A aplicação exógena de NO (SNP) restabeleceu a homeostase celular deste radical nitrogenado atenuando o efeito inibitório do Al sobre o alongamento radicular. O

efeito protetor da aplicação de SNP parece ser resultado de uma reação direta do NO com os ROIs e pela elevação da atividade de algumas enzimas antioxidativas, envolvidas não apenas na eliminação dos ROIs produzidos, mas também controlando os níveis celulares de importantes metabólitos antioxidativos do ciclo do ascorbato. O genótipo UFVM 200 exibiu melhores respostas bioquímicas ao estresse causado por Al, principalmente na presença de NO que, em conjunto, demonstram ter ele maior tolerância ao Al do que o UFVM 100.

ROLE OF NITRIC OXIDE IN RESPONSE TO OXIDATIVE STRESS- INDUCED ALUMINUM IN ROOTS OF MAIZE

ABSTRACT

The objectives of this study were to evaluate the influence of NO on the toxic effects of Al on root elongation, the activity of enzymes in the biosynthesis of NO, on the intensity of oxidative stress and the functioning of the mechanisms enzymatic and non-enzymatic antioxidant in plants maize under toxic levels of Al. In the experiments were used maize genotypes UFVM 100 (sensitive) and UFVM 200 (moderately tolerant), subjected to treatments with 0 and 50 μM of Al and 0, 25, 50 and 100 μM of SNP in CaCl_2 0,5 mM, pH 4,5, for 24 hours. Evaluated the effects of inhibitors of the nitric oxide synthase (NOS) and nitrate reductase (NR) and of the NO sequestering PTIO on the inhibition of root elongation and on the NO contents as well as the activity of NOS and NR in Al treated plants. In a second experiment, the effects of Al and NO on the contents of ROIs, ascorbate (AA), deshydroascorbate (DHA), malondialdehyde (MDA) and on the activities of the enzymes superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT), peroxidase (POX), glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase (GR), lipoxygenase (LOX), monohydroascorbate reductase (MDHAR) and dehydroascorbate reductase (DHAR) were evaluated. Exposure of maize plants to Al resulted in intense absorption and Al accumulation in roots of maize genotypes studied. The increased levels of Al in the root tips induced production of superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radical resulting in oxidative stress, characterized by lipid peroxidation and increased activity of LOXs. Parallel to this, there was an increase in the activity of some antioxidant enzymes (SOD, CAT, POX, GR and GPX) indicative of an active participation of these enzymes in the process of eliminating the excess of ROIs produced during Al stress. The exogenous application of NO (SNP) re-established the cellular homeostasis of NO attenuating the inhibitory effect of Al on root elongation. The protective effect of the application of SNP may be the result of a direct reaction of NO with ROIs as well as by increasing the activity of some antioxidative enzymes, involved not only in the elimination of the produced ROIs, but also controlling the cell levels of essential antioxidative metabolites of the ascorbate cycle. The genotype UFVM 200 showed better biochemical responses to stress

caused by Al, especially in the presence of NO which, together, demonstrate its higher tolerance to Al than UFVM 100.

1. INTRODUÇÃO

O alumínio (Al) é o 3º elemento mais abundante na litosfera, após o oxigênio e o silício, participando com 8% na composição da crosta terrestre (Rossiello e Netto, 2006). Tendo em vista que cerca de 30% de toda área terrestre do mundo consiste de solos ácidos e que 50% das terras aráveis do mundo são potencialmente ácidas, a toxidez de Al representa uma das mais importantes limitações para a produção agrícola mundial (Piñeros et al., 2005).

A maior parte do Al nos solos existe nas formas de alumino-silicatos e, ou óxidos que em $\text{pH} \leq 4,5$ se solubilizam atingindo concentrações tóxicas na solução do solo (Ma e Furukawa, 2003). As formas solúveis do Al, uma vez absorvidas pelas plantas, interferem em vários processos celulares, resultando em inibição do crescimento das plantas e redução da produção agrícola (Piñeros et al., 2005).

No Brasil, os solos que apresentam problema de toxidez são, em geral, aqueles cobertos por vegetação de cerrado e compreendem cerca de 205 milhões de hectares. Os solos destas áreas são ácidos (pH médio 4,6) e apresentam elevada concentração de Al e de Mn e deficiências de Ca, Mg e P, o que resulta em queda da produtividade das culturas (Lopes, 1984).

Os primeiros efeitos da toxidez de Al podem ser observados poucos minutos após a indução do estresse, seguindo de efeitos secundários que se manifestam várias horas ou dias depois (Doncheva et al., 2005). Como as raízes são o primeiro órgão da planta a entrar em contato com o Al no solo, os sintomas de toxidez se expressam aí de forma mais acentuada, produzindo raízes curtas, grossas e quebradiças, com poucas ramificações finas e com baixa eficiência na absorção de água e nutrientes do solo, como P (Pereira et al., 2008), K, Ca e Mg, causando efeitos negativos para o crescimento e produtividade de plantas sensíveis a este elemento.

Nas raízes, o Al liga-se aos resíduos de pectinas ou proteínas na parede celular, diminuindo sua extensibilidade e condutividade hidráulica (Delhaize e Ryan 1995), substitui o Ca na parede celular (Jones et al., 2006) e promove a síntese de lignina (Xue et al., 2008), causando enrijecimento da mesma. Na membrana plasmática, o Al liga-se fortemente aos grupos carboxílicos e fosfatos, reduzindo sua fluidez e afetando as atividades de enzimas e, ou de sistemas de transporte de íons, que operam em nível de membrana (Echart e Cavalli-Molina, 2001; Barceló e Poschenrieder, 2002). O Al inibe a atividade da H^+ -ATPase, impedindo a formação e

manutenção do gradiente de prótons e, assim, provocando a rápida despolarização da membrana plasmática (Ahn et al., 2004; Kochian et al., 2005). Estes efeitos causam interferência sobre a absorção de íons, quer seja pelas injúrias causadas à integridade estrutural e à permeabilidade da membrana plasmática, quer pela interferência direta sobre os sistemas de transporte iônicos (Kochian et al., 2005), e gradiente de prótons. Após penetrar no simplasma, o Al reage com as macromoléculas fundamentais e estruturas celulares desencadeando uma série de reações que podem resultar em disfunção mitocondrial resultando em morte programada das células (Panda e Matsumoto, 2007).

Espécies e cultivares de plantas apresentam grande variação no grau de tolerância ao excesso de Al (Echart e Cavalli-Molina, 2001). Os mecanismos de tolerância ao Al resumem-se, basicamente, a duas classes: os que agem no sentido de expulsar o Al depois de absorvido ou impedem/reduzem sua absorção pela raiz e os mecanismos de desintoxicação interna, que agem geralmente pela complexação do Al, seguido de transferência e armazenamento em vacúolos (Hartwing et al., 2007). Dentre os mecanismos que promovem a exclusão do Al do ápice das raízes ou que impedem sua absorção os mais importantes são: imobilização do Al nas paredes celulares, permeabilidade seletiva do Al na membrana plasmática, elevação do pH na rizosfera ou no apoplasto radicular (Echart e Cavalli-Molina, 2001), exsudação de ácidos orgânicos pelas raízes, como citrato, malato e oxalato e exsudação de compostos fenólicos (Hartwing et al., 2007). A tolerância ou desintoxicação interna do Al pode ser obtida pela sua complexação no simplasto por diferentes compostos orgânicos (Hartwing et al., 2007) e, ou compartimentalização do Al ou seus complexos em vacúolos (Echart e Cavalli-Molina, 2001).

1.1. Alumínio e o estresse oxidativo

A exposição das plantas a níveis tóxicos de Al induz a produção de intermediários reativos de oxigênio (ROIs), desencadeando o estresse oxidativo (Boscolo et al., 2003; Meriga et al., 2004; Sharma e Dubey, 2007). Estes ROIs são formas reduzidas do oxigênio molecular, extremamente reativas e que podem causar danos oxidativos a diversos componentes celulares (Mittler, 2002). Eles incluem o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (HO^\bullet) e oxigênio “singlete” ($^1\text{O}_2$). Os ROIs são considerados “subprodutos inevitáveis” do

metabolismo aeróbico, sendo continuamente produzidos e removidos das células por mecanismos antioxidativos enzimáticos ou não enzimáticos (Mittler, 2002). Eles se formam pela excitação do O₂ formando oxigênio singlete (¹O₂) ou pela transferência de um, dois ou três elétrons, formando radical superóxido ([•]O₂⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radical hidroxila ([•]HO), respectivamente (Mittler, 2002). Os principais locais de produção de ROIs em plantas são os cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos (Del Río et al., 2006). Enzimas, como as oxidases do NADPH na membrana plasmática, oxidases de aminas no apoplasto (Mittler, 2002), peroxidases e oxidases do NADH da parede celular (Mittler, 2002; Xue et al., 2008), também, contribuem para a produção de ROIs em plantas.

Sob condições normais de crescimento, a produção de ROIs pelas células é baixa e a planta consegue manter a homeostase celular. Estresses bióticos e abióticos parecem ser capazes de romper a homeostase celular elevando a produção dos ROIs (Mittler, 2002). Incremento na produção de [•]O₂⁻ e H₂O₂ em células vegetais é considerado um dos primeiros sintomas da exposição ao Al, quase sempre acompanhado por peroxidação de lipídeos constituintes de membranas celulares (Yamamoto et al., 2002). Outros trabalhos também têm confirmado que o estresse de Al realmente induz a produção de ROIs, além de ativar enzimas antioxidativas em células vegetais (Boscolo et al., 2003; Guo et al., 2004; Jones et al., 2006; Shamsi et al., 2008; Wang et al., 2010).

A peroxidação de ácidos graxos insaturados de membranas em plantas expostas ao Al também pode ser resultado do incremento da atividade ou da síntese “de novo” da enzima lipoxigenase (LOX) (Wang e Yang 2005; Xue et al., 2008). As lipoxigenases são enzimas que catalisam a peroxidação de ácidos graxos insaturados de biomembranas (ácido linoléico e linolênico) (Xue et al., 2008), produzindo uma variedade de metabólitos intermediários como hidroperóxidos (LOOH) e radicais livres (Gardner 1991; Brash, 1999). Os LOOH, produtos primários da peroxidação lipídica, podem migrar para outros sítios e sofrer decomposição catalisada por metais gerando radicais alcóxila (LO[•]) e peróxila (LOO[•]) e uma série de produtos secundários (aldeídos, cetonas, epóxidos, entre outros) capazes de danificar biomoléculas como proteínas e DNA (Miyamoto, 2005).

As plantas, em maior ou menor grau, estão adaptadas a conviverem com certos níveis de ROIs. Quando, porém, os ROIs se acumulam nos tecidos, estes podem levar à morte celular (Resende et al., 2003). Em função disso, as plantas

desenvolveram estratégias que mantêm constantes os níveis de ROIs no interior das células (Apel e Hirt, 2004), utilizando para isso mecanismos de defesa enzimáticos e/ou não enzimáticos (Scandalios, 1993). Dentre as enzimas que participam dos sistemas de defesa das plantas destacam-se: catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POX), peroxidase do ascorbato (APX), peroxidase da glutatona (GPX) e redutase da glutatona (GR). Dentre os metabólitos que podem ser importantes nos sistemas de defesa não enzimáticos destacam-se: ascorbato (AA), monodesidroascorbato (MDHA), glutatona reduzida (GSH), α -tocoferol e carotenóides (Mittler, 2002).

1.2. Óxido nítrico e seu metabolismo em células vegetais

O óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) é um radical livre gasoso com meia-vida relativamente longa, permanecendo em sistemas biológicos por 3-5 s (Tuteja et al., 2004). Apresenta alta difusibilidade ($4,8 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ em H_2O) e pode se movimentar facilmente, não apenas em regiões hidrofílicas na célula, mas também se difundir livremente através da bicamada lipídica das membranas (Arasimowicz e Floryszak-Wieczorek, 2007).

Quimicamente o NO pode existir sob três formas: radical óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$), cátion nitrosonium (NO^+) e ânion nitroxil (NO^-) (Neill et al., 2003). Em sistemas biológicos, o NO reage rapidamente com o oxigênio molecular (O_2), ânion superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) e metais de transição. A reação do NO com O_2 , resulta na geração de compostos NO_x (incluindo $\cdot\text{NO}_2$, N_2O_3 e N_2O_4), que podem reagir com aminas celulares e grupos tíois de proteínas ou, simplesmente, sofrer hidrólise formando metabólitos como nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) (Wendehenne et al., 2001). O NO, também, pode reagir com radical hidroxila formando ácido nitroso, de acordo com a reação: $\text{NO} + \text{HO}\cdot \rightarrow \text{HNO}_2$ (Yao et al., 2004), ou com H_2O_2 formando peroxinitrito ($\text{NO}^+ + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{OONO}^- + 2\text{H}^+$) (Neill et al., 2003). A reação entre NO e $\cdot\text{O}_2^-$ ($\text{NO} + \cdot\text{O}_2^- \rightarrow \text{OONO}^-$). Entretanto, pode ser considerada tanto prejudicial ao metabolismo celular como mecanismo de desintoxicação de intermediários reativos de oxigênio (ROIs) (Yao et al., 2004). A reação do $\cdot\text{O}_2^-$ com o NO é cinco vezes mais rápida do que a decomposição do $\cdot\text{O}_2^-$ pela enzima superóxido dismutase (SOD) (Yao et al., 2004). O peróxido nitrito não é reativo em solução alcalina e lentamente pode ser dismutado para NO_2^- e O_2 . O peróxinitrito pode formar ácido pernitroso (HOONO)

que pode oxidar vários substratos biológicos ou, segundo Wendehenne et al. (2001), pode ser decomposto em radical hidroxila ($\cdot\text{HO}$), altamente reativo.

O NO, em plantas, tem ação antioxidante, regulando o nível e a toxidez dos ROIs que são gerados por diversos tipos de estresses (Delledone et al., 1998; Durner et al., 1998; Sang et al., 2008). Adicionalmente, o NO pode atuar como molécula sinalizadora na cascata de eventos que induz a expressão dos genes envolvidos com a biossíntese de fenilpropanóides e ácido salicílico, como aqueles que codificam as enzimas fenilalanina amônia liase (PAL) e chalcona sintase (CHS) (Durner et al., 1998; Delledone et al., 1998; Mackerness et al., 2001). Genes relacionados à patogênese, como PR-1 em tabaco e os níveis de transcritos de ferritina, correspondem a outros alvos da sinalização ativada pelo NO (Durner et al., 1998; Murgia et al., 2002). Estes eventos envolvem a ativação de vias dependentes de cGMP/ Ca^{2+} e interações com ROIs (Durner et al., 1998). Cada agente de estresse desencadeia na célula uma cascata de sinalização levando ao acionamento de respostas específicas de defesa. O reconhecimento do estímulo do estresse pelos receptores na membrana celular resulta na formação de moléculas de sinalização, que por sua vez, levam a uma mudança na concentração ou a modulação dos chamados segundo mensageiros e, como consequência, o desencadeamento de resposta de defesa (Arazimowicz e Floryszak-Wieczorek, 2007).

O NO em plantas pode ser sintetizado a partir de arginina pela ação da enzima sintase do óxido nítrico (NOS) ou a partir de nitrito pela ação da enzima redutase do nitrato (RN) ou por fontes não enzimáticas (Neill et al., 2003). A atividade da NOS, dependente de arginina, pode ocorrer nos peroxissomos (Corpas et al., 2004), cloroplastos (Foissner et al., 2000; Gould et al., 2003) e mitocôndrias (Guo e Crawford, 2005). A NOS converte L-arginina para L-citrulina, em uma reação dependente de NADPH, e oxigênio molecular liberando uma molécula de NO por cada molécula de L-arginina. A atividade da NOS em plantas pode ser inibida por inibidores da NOS animal, os quais atuam como análogos, tais como L-N^G-monometil arginina (L-NAME) e L-Nitro amino arginina metil ester (L-NMMA) (Guo e Crawford, 2005).

A RN, é enzima chave na assimilação de nitrato em plantas, catalisa a conversão de nitrato a nitrito, utilizando NADPH como fonte de elétrons. Esta enzima, porém, pode produzir NO a partir da redução do nitrito usando novamente o NADPH como doador de elétrons (Neill et al., 2003). A terceira possibilidade seria a

biossíntese do NO a partir de fontes não enzimáticas (Bethke et al., 2004). Segundo estes autores, o nitrito é protonado produzindo ácido nitroso (HNO_2) por meio de uma reação reversível favorecida por baixos valores de pH. Segundo Durner et al. (1998) o NO pode, também, ser produzido não enzimaticamente pela conversão de nitrito pelos carotenóides.

Moléculas biologicamente ativas como o NO são rapidamente removidas ou metabolizadas depois de ocorrido o evento de sinalização. Essa metabolização ocorre por meio de sua reação com oxigênio, formando nitrito e nitrato (Gladwin et al., 2005) ou com metais de transição, ferro-heme e centros Fe-S de proteínas, alterando suas estruturas e funções. A forma catiônica (NO^+) promove o ataque eletrofílico ao enxofre, oxigênio, nitrogênio e centros de carbono aromático, num processo químico denominado nitrosação. Dentre estas reações, destaca-se aquela em que o NO reage reversivelmente com a glutatona (GSH) formando glutatona S-nitrosilada (GSNO) (Neill et al., 2008).

1.3. Óxido nítrico e tolerância das plantas a estresses bióticos e abióticos

O NO participa de complexa rede de sinalização celular que induz o fechamento estomático em resposta ao fitohormônio ácido abscísico (ABA), sob condições de déficit hídrico (Desikan et al., 2004; Bright et al., 2006; Ribeiro et al., 2009), e da regulação de múltiplas respostas a vários outros estresses abióticos, tais como, salinidade (Zhang et al., 2006; Zhao et al., 2007), temperatura, intensidade luminosa, danos mecânicos (Corpas et al., 2008), radiação UV-B (Mackerness et al., 2001; He et al., 2007) e hipóxia (Igamberdiev e Hill, 2004). Além disso, também existem evidências da atuação do NO como molécula de transdução do sinal em vias que levam à indução da resposta de defesa contra ataque de patógenos e em morte celular programada (Durner et al., 1998; Delledonne et al., 1998; Hong et al., 2008). Em função disso, admite-se que o NO seja importante segundo mensageiro em plantas (Beligni et al., 2002).

O NO aumenta a tolerância de várias espécies vegetais a diversos tipos de estresses abióticos, como o estresse hídrico (Tian e Lei, 2006), salino (Shi et al., 2007), metais pesados (Singh et al., 2008) e estresse por Al (Wang e Yang, 2005; Tian et al., 2007; Wang et al., 2010).

O preciso mecanismo pelo qual o NO induz respostas de tolerância das plantas aos efeitos tóxicos do Al não é perfeitamente conhecido (Xue et al., 2008). Há indicações de que o NO reduz a toxicidade do Al impedindo o estresse oxidativo causado por este metal (Wang e Yang, 2005). Aparentemente, o NO eleva os níveis de ascorbato e ativa enzimas do sistema antioxidativo das células (Zhang et al., 2008). O efeito benéfico do tratamento com nitroprussiato de sódio (SNP), doador de NO⁺, sobre a inibição do alongamento celular causada por Al, é atribuído ao incremento nos teores de NO nos tecidos que são reduzidos em condições de estresse por Al (Tian et al., 2007). Nesse caso, a manutenção da homeostase celular da concentração de NO em ápices radiculares é essencial para o alongamento das raízes. O efeito protetor da aplicação exógena de SNP, tem sido atribuído, também, à eliminação de radicais superóxidos ($\cdot\text{O}_2^-$) e/ou à elevação da atividade de enzimas antioxidativas, especialmente da dismutase do superóxido (SOD) (Kopyra e Gwózd, 2003; Zhao et al., 2008; Wang et al., 2010), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) (Zhao et al., 2008; Wang et al., 2010), peroxidase total (POX) (Wang et al., 2010). Há ainda a possibilidade de estar ocorrendo redução do nível de transcrição e da atividade da enzima lipoxigenase (LOX) (Xue et al., 2008; Zhao et al., 2008). O NO pode, também, interferir na atividade de peroxidases da parede celular e na síntese de lignina na presença de Al, conforme verificado por Xue et al. (2008).

O mecanismo da ação protetora do NO sobre a toxidez de Al, entretanto, não foi ainda perfeitamente esclarecido em nenhuma espécie vegetal de valor econômico, especialmente em certos cultivares de milho desenvolvidos para cultivo regional, como os que foram utilizados na presente pesquisa. Além disso, a provável participação das principais fontes produtoras de NO (NOS e RN) já encontradas em plantas ainda não foram completamente avaliadas em plantas de milho em condições de estresse por Al. Para tal, nossa abordagem experimental envolveu condições de depleção e suplementação de NO. Além disso, o uso de inibidores das enzimas produtoras de NO possibilitou acessar a participação de cada uma destas fontes na geração deste composto e a influência das mesmas no alongamento radicular em condição de estresse por este metal em plantas de milho com tolerância diferencial ao Al.

Portanto, os objetivos do presente trabalho foram avaliar a influência do NO sobre os efeitos tóxicos do Al no alongamento radicular, na atividade de enzimas da

biossíntese de NO, na intensidade do estresse oxidativo e sobre o funcionamento dos mecanismos antioxidativos enzimáticos e não enzimático em plantas de milho sob níveis tóxicos de Al.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção do material vegetal e condições de crescimento

Nos experimentos foram utilizados dois genótipos de milho (*Zea mays* L.) com tolerância diferencial ao Al: UFVM 100 e UFVM 200, considerados sensível e moderadamente tolerante ao Al, respectivamente, fornecidos pelo Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, MG.

As sementes, selecionadas quanto ao tamanho e forma, foram tratadas com ácido sulfúrico concentrado, durante 1 minuto e lavadas em água corrente e água desmineralizada. Em seguida, as sementes foram desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio 3% (v/v) por 15 minutos, sendo lavadas, novamente, em água corrente e água desmineralizada. As sementes foram colocadas para germinar em cartuchos de papel “germiteste”, pH neutro, que foram mergulhados em solução de CaCl₂ 0,5 mM, pH 4,5, sob aeração contínua e mantidos em câmara úmida a 25 °C. Quatro dias após a semeadura, as plântulas foram selecionadas, quanto à uniformidade de tamanho e forma, e transplantadas para recipientes de polietileno contendo solução de CaCl₂ 0,5 mM, pH 4,5, e submetidas aos tratamentos. O cultivo das plantas, tanto na fase preliminar quanto durante a aplicação dos tratamentos, foi realizado em sala de crescimento com temperatura controlada (25 ± 1 °C), sob irradiância de 230 μmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas.

2.2. Experimento 1: Avaliação do efeito de nitroprussiato de sódio sobre o alongamento radicular.

Neste experimento, plântulas dos dois genótipos de milho, obtidas e selecionadas conforme item 3.1, foram transferidas em número de quatro, para vasos de polietileno contendo 1,2 L de solução de CaCl₂ 0,5 mM, pH 4,5, e submetidas às seguintes concentrações 0, 25, 50 e 100 μM de nitroprussiato de sódio (SNP), durante 24 horas. O comprimento da raiz principal das plântulas foi mensurado

imediatamente antes da aplicação dos tratamentos e após 24 horas, utilizando régua milimetrada. O alongamento radicular foi estimado pela diferença entre o comprimento da raiz principal antes e depois da aplicação do tratamento. Os resultados foram expressos em relação ao controle utilizando a equação:

$$\text{AR relativo} = (\text{Alongamento Al}_t / \text{Alongamento Al}_0) \times 100$$

AR (% controle) = Alongamento radicular em relação ao controle

Al₀ = Alongamento da raiz principal de plântulas controle (sem tratamento com Al)

Al_t = Alongamento da raiz principal de plântulas submetidas ao tratamento com Al

2.3. Experimento 2: Avaliação do efeito do nitroprussiato de sódio sobre os teores de alumínio em ápices radiculares

Plântulas dos dois genótipos de milho, obtidas e selecionadas conforme item 2.1, foram transferidas em número de doze, para vasos de polietileno contendo 1,6 L de solução de CaCl₂ 0,5 mM, pH 4,5, e submetidas aos tratamentos com Al nas concentrações de 0 e 50 µM, aplicado na forma de AlCl₃, combinadas com SNP nas concentrações de 0 e 25 µM, durante 24 horas.

Terminado o experimento, segmentos de ápices radiculares de aproximadamente 1 cm, pesando cerca de 0,1 g de massa fresca foram removidos e incubados em solução de HCl 2 M por 48 horas (Wang e Yang, 2005), sob agitação ocasional. O teor de Al no extrato foi determinado por espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente - ICP-OES, no comprimento de onda 394,401 nm. Os resultados foram expressos em nmol g⁻¹ de massa fresca.

2.4 Experimento 3: Avaliação da influência do inibidor da sintase do óxido nítrico (NOS) sobre a inibição do alongamento radicular causado por alumínio

Plântulas dos dois genótipos de milho, obtidas e selecionadas conforme item 2.1, foram transferidas em número de quatro, para vasos de polietileno contendo 1,2 L de solução de CaCl₂ 0,5 mM, pH 4,5, e submetidas por 24 horas aos seguintes tratamentos:

- 1 - Controle (CaCl₂ 0,5 mM, pH 4,5)
 - 2 - Controle + AlCl₃ 50 μM
 - 3 - Controle + SNP 25 μM
 - 4 - Controle + N^w-nitro-L-arginina (L-NNA) 100 μM
 - 5 - Controle + SNP 25 μM + L-NNA 100 μM
 - 6 - Controle + AlCl₃ 50 μM + L-NNA 100 μM
 - 7 - Controle + AlCl₃ 50 μM + SNP 25 μM + L-NNA 25 μM
- O alongamento radicular foi avaliado conforme descrito no ítem 3.2.

2.5. Experimento 4: Avaliação da influência do inibidor da redutase do nitrato (RN) sobre a inibição do alongamento radicular induzida por alumínio

Plântulas dos dois genótipos de milho, obtidas e selecionadas conforme item 2.1, foram transferidas em número de quatro, para vasos de polietileno contendo 1,2 L de solução de CaCl₂ 0,5 mM, pH 4,5, e submetidas aos seguintes tratamentos durante 24 horas:

- 1 - Controle (CaCl₂ 0,5 mM, pH 4,5)
 - 2 - Controle + AlCl₃ 50 μM
 - 3 - Controle + SNP 25 μM
 - 4 - Controle + tungstato 100 μM
 - 5 - Controle + SNP 25 μM + tungstato 100 μM
 - 6 - Controle + AlCl₃ 50 μM + tungstato 100 μM
 - 7 - Controle + AlCl₃ 50 μM + SNP 50 μM + tungstato 100 μM
- O alongamento radicular foi avaliado conforme descrito no ítem 2.2.

2.6. Experimento 5: Avaliação do efeito do óxido nítrico (NO) sobre a inibição do alongamento radicular induzida por alumínio

Plântulas dos dois genótipos de milho, obtidas e selecionadas conforme item 3.1, foram transferidas em número de três, para vasos de polietileno contendo 0,1 L de solução de CaCl₂ 0,5 mM, pH 4,5, e submetidas por 24 horas aos seguintes tratamentos:

- 1 - Controle (CaCl₂ 0,5 mM, pH 4,5)
- 2 - Controle + AlCl₃ 50 μM

3 - Controle + SNP 25 μM

4 - Controle + 2 fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazilina-1-oxil-3-óxido (PTIO) 50 μM

5 - Controle + SNP 25 μM + PTIO 50 μM

6 - Controle + AlCl_3 50 μM + PTIO 50 μM

7 - Controle + AlCl_3 50 μM + SNP 50 μM + PTIO 50 μM

O alongamento radicular foi avaliado conforme descrito no ítem 2.2.

2.7. Experimento 6: Avaliação do efeito do alumínio sobre a atividade da sintase do óxido nítrico (NOS)

Plântulas dos dois genótipos de milho, obtidas e selecionadas conforme item 3.1, foram transferidas em número de 32, para vasos de polietileno contendo 7 L de solução de CaCl_2 0,5 mM, pH 4,5 e submetidas por 24 horas aos seguintes tratamentos:

1 - CaCl_2 0,5 mM, pH 4,5 (controle)

2 - Controle + Al 50 μM , aplicado na forma de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Para determinação da atividade da NOS cerca de 0,2 g de ápices radiculares foram triturados em nitrogênio líquido, homogeneizado em meio constituído de tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4. Os extratos brutos foram filtrados através de quatro camadas de gaze e centrifugados a 15,000 g durante 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade da NOS. Para isso seguindo as recomendações do fabricante Bioxytecho (22113) (Oxis International). Previamente, foi realizada a confecção da curva padrão de nitrato. A atividade da NOS foi expressa em $\text{nmol NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

2.8. Experimento 7: Efeito do alumínio sobre a atividade da redutase do nitrato (NR)

Plântulas dos dois genótipos de milho, obtidas e selecionadas conforme item 3.1, foram transferidas em número de 32, para vasos de polietileno contendo 7 L de CaCl_2 0,5 mM + KNO_3 10 mM pH 4,5 e expostas à luz durante 24 horas. No quinto dia, as plantas foram transferidas para vasos contendo a mesma solução (CaCl_2 0,5

mM + KNO₃ 10 mM pH 4,5) ou acrescida de 25 µM de Al, fornecido na forma de AlCl₃, durante 24 horas.

Segmentos de aproximadamente 1 cm de ápices radiculares, com peso final de 0,2 g de matéria fresca foram trituradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 1 mL de meio constituído de tampão Hepes-KOH 50 mM, pH 7,5, glicerol 5% (v/v), MgCl₂ 10 mM, ditioneitol (DTT) 1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 1 mM e flavina adenina dinucleotídeo (FAD) 10 µM (Wang et al., 2010). Os extratos, após filtração através de quatro camadas de gaze, foram centrifugados a 15.000 g durante 20 minutos a 4 °C e os sobrenadantes foram utilizados para a determinação da atividade enzimática. Alíquotas de 0,25 mL do extrato enzimático foram adicionadas a 0,25 mL de um meio de reação constituído de Hepes-KOH 50 mM, pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, KNO₃ 2 mM e nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) 200 µM, sendo a mistura incubada à temperatura de 30 °C durante 30 minutos. Após este período, a reação foi interrompida pela adição de 0,5 mL de sulfanilamida 1% (m/v) em mistura com N-naftil etilenodiamina 0,01% (m/v) em HCl 1,0 M. O nitrito produzido foi determinado por espectrofotometria do visível a 540 nm, utilizando-se uma curva padrão de NO₂⁻. A atividade enzimática foi expressa em nmols de NO₂⁻ h⁻¹ mg⁻¹ proteína.

2.9. Determinação do teor de óxido nítrico nos tecidos

Os teores de óxido nítrico foram determinados em segmentos de ápices da raiz principal das plântulas dos dois genótipos de milho, após a aplicação dos tratamentos dos experimentos descritos nos itens 3.4, 3.5 e 3.6 por 24 horas.

As amostras de matéria fresca de ápices radiculares foram trituradas em nitrogênio líquido e, então, homogeneizadas em tampão de fosfato salino pH 7,4 na proporção de 1:5 até 1:10 (m/v), de acordo com a disponibilidade de material vegetal.

O homogeneizado foi centrifugado a 15.000 g, por 20 minutos a 4 °C e o sobrenadante utilizado nas avaliações. O teor de óxido nítrico (NO) foi determinado com o kit de ensaio colorimétrico Cayman (780001) (Cayman Chemical Company). Para tanto, uma alíquota de 80 µL de amostra foi adicionada a uma mistura de 10 µL de uma solução de cofatores da redutase do nitrato (RN) e 10 µL de redutase do

nitrato. Após 1 hora de incubação na ausência de luz foram adicionados 100 μL de uma mistura de N-naftil etilenodiamino e sulfanilamida. Após 10 minutos de início de desenvolvimento da cor, a absorvância foi determinada a 540 nm em leitor de Elisa (Optimax Tunable microplate reader) e a quantidade de NO_2^- produzida foi estimada com base em curva de calibração. A produção de NO foi expressa em nmoles de $\text{NO}_2^- \text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ massa fresca.

2.10. Experimento 8: Efeito aliviador do óxido nítrico sobre o estresse oxidativo causado pelo alumínio

Plântulas dos dois genótipos de milho, obtidas e selecionadas conforme item 2.1, foram transferidas em número de 32, para vasos de polietileno contendo 7 L de CaCl_2 0,5 mM, pH 4,5 e submetidas aos seguintes tratamentos:

- 1 - CaCl_2 0,5 mM, pH 4,5 (controle)
- 2 - Controle + Al 50 μM , aplicado na forma de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 3 - Controle + SNP 25 μM
- 4 - Controle + SNP 25 μM + Al 50 μM

Após 24 h de tratamento, o experimento foi encerrado e foram retiradas amostras para a determinação dos teores de intermediários reativos de oxigênio (ROIs) e de enzimas antioxidativas.

2.10.1. Determinação dos teores de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Segmentos de aproximadamente 1 cm, com peso final de 0,2 g de matéria fresca de ápices radiculares foram triturados em nitrogênio líquido e, então, homogeneizados em 2,0 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,5, contendo hidroxilamina 1 mM. Após filtração através de 4 camadas de gaze, o homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g, por 15 minutos, a 4 °C (Kuo e Kao, 2003). Utilizou-se alíquotas de 50 μL do sobrenadantes nas quais foram adicionados 800 μL de solução de $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)$ 0,625 mM, 500 μL de alaranjado de xilenol 1 mM e 250 μL de sorbitol 800 mM por 30 minutos no escuro e a absorvância determinada a 560 nm (Gay e Gebicki, 2000). Brancos dos reagentes e dos extratos vegetais foram preparados em paralelo e subtraídos da amostra. Os teores de H_2O_2 foram estimados com base em curva de calibração preparada com padrões autênticos de H_2O_2 .

2.10.2. Determinação dos teores de ânion superóxido (O_2^-)

Segmentos de aproximadamente 1 cm, com peso final de 50 mg de tecido de ápices radiculares, foram cortados em fragmentos menores e incubados em 2 mL de tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,8 contendo Na_2EDTA 100 μM e NADH 20 μM (Mohammadi e Karr, 2001). Os sistemas foram hermeticamente fechados e a reação iniciada pela adição de 100 μL de epinefrina 25,2 mM em HCl 0,1 N, usando-se microseringa cromatográfica. Após incubação a 28°C , sob agitação, por 5 minutos, os segmentos tissulares foram removidos e, a partir do sétimo minuto, iniciou-se a leitura a 480 nm por um período de 5 minutos. O branco foi preparado sob as mesmas condições, mas sem tecido vegetal. A produção de ânion superóxido (O_2^-) foi avaliada pela determinação da quantidade de adenocromo acumulado (Misra e Fridovich, 1971), utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $4,0 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Boveris, 1984).

2.10.3. Determinação dos teores de radical hidroxila (OH^\cdot)

Segmentos de aproximadamente 1 cm, com peso final de 50 mg de tecido de ápices radiculares, cortados em segmentos menores foram incubados em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4 contendo 15 mM de 2-desóxi-D-ribose a 37°C por 2 horas, segundo metodologia descrita por Achary et al., (2008). Após este período, uma alíquota de 0,7 mL foi retirada e adicionada a um meio de reação contendo 3 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5 % (m/v) e 1 mL de ácido acético glacial. Em seguida, o meio foi aquecido a 100°C em banho-maria por 30 minutos e a reação paralisada em banho de gelo a 4°C por 10 minutos. A absorvância do malondialdeído (MDA) foi avaliada a 532 nm e a concentração calculada usando coeficiente de extinção molar de ($155 \text{ L mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e expresso em nmol g^{-1} de massa fresca.

2.10.4. Determinação da atividade de enzimas antioxidativas

Os extratos enzimáticos brutos para as determinações das atividades da catalase (CAT), da peroxidase (POX), da peroxidase do ascorbato (APX), da superóxido dismutase (SOD), da peroxidase da glutathione (GPX) e da redutase da glutathione (GR) foram obtidos pela maceração de 0,2 g de tecido vegetal em N_2

líquido. Em seguida foram adicionados 2 mL de meio de homogeneização, seguida de filtração em gaze e centrifugação a 12.000 g por 15 minutos, a 4°C. O meio de homogeneização eram constituídos de (1) Tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, EDTA 0,1 mM, PMSF 1 mM e PVPP 1% (p/v) (Peixoto et al., 1999), para as enzimas CAT, POX, APX e SOD; (2) Tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, EDTA 1 mM e MgCl₂ 10 mM (Nagalakshmi e Prasad, 2001) para a GPX; (3) Tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5, EDTA 1 mM, DTT 2 mM, PMSF 1 mM e PVPP 1%, para a GR (Carlberg e Mannervik, 1985).

2.10.4.1. Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)

A atividade da superóxido dismutase foi determinada no meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 µM, EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 µM (Del Longo et al., 1993). A reação foi conduzida a 25 °C numa câmara de reação, sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W, mantida no interior de uma caixa fechada. Após 5 minutos de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul, produzida pela fotorredução do NBT, medida a 560 nm (Giannopolitis e Ries, 1977). Uma unidade SOD foi definida como a quantidade da enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (Beauchamp e Fridovich, 1971).

2.10.4.2. Determinação da atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

A atividade da catalase foi determinada pela adição de 100 µL do extrato enzimático bruto a 1,9 mL de um meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H₂O₂ 12,5 mM (Havir e Mchale, 1987). O decréscimo na absorvância a 240 nm, à temperatura de 25 °C, foi medido durante o primeiro minuto de reação, sendo a atividade da CAT determinada com base na inclinação da reta no intervalo de 1 minuto, após o início da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 36 L mol⁻¹ cm⁻¹ (Anderson et al., 1995) e o resultado expresso em µmol min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

2.10.4.3. Determinação da atividade da peroxidase (POX, EC 1.11.1.7)

A atividade da peroxidase foi determinada pelo método de Kar e Mishra (1976). Alíquotas de 250 μL do extrato enzimático foram adicionados 1,9 mL de uma mistura de reação constituída de tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e H_2O_2 20 mM. O acréscimo na absorvância a 420 nm, à temperatura de 25 °C, foi medido durante o primeiro minuto de reação pela produção de purpurogalina, sendo a atividade da POX determinada com base na inclinação da reta no intervalo de 1 minuto, após o início da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,47 $\text{L mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Chance e Maehley, 1955) e o resultado expresso em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína.

2.10.4.4. Determinação da atividade da peroxidase do ascorbato (APX, EC1.11.1.11)

A atividade da peroxidase do ascorbato foi determinada de acordo com o método de Nakano e Asada (1981) modificado por Koshiba (1993). Alíquotas de 100 μL do extrato enzimático bruto foram adicionadas a 1,9 mL de um meio de reação constituído de tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, ácido ascórbico 0,8 mM e H_2O_2 1 mM. O decréscimo na absorvância a 290 nm, à temperatura de 25 °C, foi medido durante o primeiro minuto de reação, sendo, a atividade da APX determinada com base na inclinação da reta no intervalo de 1 minuto, após o início da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,8 $\text{L mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Nakano e Asada, 1981) e o resultado expresso em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína.

2.10.4.5. Determinação da atividade da redutase da glutathiona (GR; EC 1.6.4.2)

A atividade da redutase da glutathiona foi determinada pela adição de 100 μL de extrato enzimático bruto a 0,9 mL de um meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5, EDTA 1 mM, glutathiona oxidada (GSSG) 1 mM e NADPH 0,1 mM (em tampão TRIS-HCl 0,5 mM, pH 7,5), segundo Carlberg e Mannervik (1985). O decréscimo na absorvância a 340 nm, à temperatura de 30 °C,

foi medido no primeiro minuto de reação sendo, a atividade das GR determinada com base na inclinação da reta no intervalo de 1 minuto, após o início da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $6,22 \text{ L mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Foyer e Halliwell, 1976) e o resultado expresso em $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

2.10.4.6. Determinação da atividade da peroxidase da glutatona (GPX, EC 1.11.1.9)

A atividade da peroxidase da glutatona foi determinada pela adição de 100 μL do extrato enzimático bruto a 0,9 mL de um meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, EDTA 1 mM, NaCl 0,114 M, GSH 1 mM, NADPH 0,2 mM, H_2O_2 0,25 mM e 1 unidade de redutase da glutatona (Nagalakshmi e Prasad, 2001). O decréscimo na absorvância a 340 nm, à temperatura de 30 °C, foi medido no primeiro minuto de reação sendo, a atividade da GPX determinada com base na inclinação da reta no intervalo de 1 minuto, após o início da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $6,22 \text{ L mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Anderson e Davis, 2004) e o resultado expresso em $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

2.10.4.7. Determinação da atividade da monodesidroascorbato redutase (MDHAR– EC 1.6.5.4)

A atividade da MDHAR foi determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto a 0,9 mL de um meio de reação constituído de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, NADH 0,1 mM, ascorbato 2,5 mM e 0,4 unidades de ascorbato oxidase (Hossain et al., 1984). O meio de reação foi incubado a 30 °C e a variação na absorvância medida a 340 nm durante o primeiro minuto de reação. A atividade enzimática foi estimada usando-se o coeficiente de extinção molar $6,2 \text{ L mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.10.4.8. Determinação da atividade da desidroascorbato redutase (DHAR – EC 1.8.5.1)

A atividade da DHAR foi determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto a 0,9 mL de um meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, DHA 2 mM e GSH 5 mM (Nakano e Asada 1981). O meio de reação foi incubado a 30 °C e a variação na absorvância medida a 265 nm durante o primeiro minuto de reação. A atividade enzimática foi estimada usando-se o coeficiente de extinção molar $14 \text{ L mmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

2.10.5. Determinação da peroxidação de lipídios

Amostras de 0,2 g de tecido vegetal foram trituradas em N_2 líquido e homogeneizadas em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 1% (m/v). Os homogeneizados foram filtrados através de quatro camadas de gaze e centrifugados a 12.000 g por 15 minutos. Todas as etapas necessárias ao processo de extração foram conduzidas a 4 °C. Alíquotas de 0,5 mL dos sobrenadantes foram adicionadas a 1,5 mL de uma solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (m/v) em TCA 20% (m/v), os tubos de ensaio foram fechados e incubados em banho-maria a 95 °C. Após 2 horas, a reação foi paralisada com banho de gelo. Posteriormente, foram centrifugados a 9.000 g por 10 minutos e a absorvância dos sobrenadantes determinada a 532 nm. A absorvância inespecífica a 600 nm foi medida e subtraída das amostras. A concentração do complexo aldeído malônico-TBA foi calculada usando o coeficiente de extinção molar de $155 \text{ L mmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Heath e Packer, 1968).

2.10.6. Determinação da atividade da lipoxigenase (LOX)

Amostras de 0,2 g de tecido vegetal foram trituradas em N_2 líquido e homogeneizadas em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6,0, na proporção 1:3 (m/v) e, em seguida, centrifugadas a 15.300 g por 30 minutos a 4 °C. A atividade da lipoxigenase foi determinada pela adição de 10 μL do extrato bruto e 4,0 μL da solução-estoque de linoleato de sódio 10 mM em 1,0 mL de tampão fosfato 50 mM, pH 6,0. A variação na absorvância a 234 nm foi medida durante um período de 1 min

e a atividade enzimática calculada utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar de 25000 L mol⁻¹cm⁻¹ (Axelrod et al., 1981).

2.10.7. Determinação das concentrações de metabólitos antioxidativos

2.10.7.1. Determinação dos teores de ascorbato (AA) e desidroascorbato (DHA)

Os teores de AA e DHA foram determinados como descrito por Kampfenkel et al. (1995), com algumas modificações. Para isso, 0,2 g de tecido vegetal foram homogeneizados em 2,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) 6% (m/v) e centrifugado a 15.000 g, por 5 minutos. Todas as etapas necessárias ao processo de extração foram conduzidas a 4 °C.

O teor de ascorbato total foi determinado pela adição de 900 µL do extrato bruto a 200 µL de DTT 10 mM (dissolvido em tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 7,4) e 500 µL de tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 7,4. A mistura foi incubada a 42 °C, por 15 minutos. Após este tempo, foram adicionados 200 µL de N-etilmaleimida 0,5% (m/v), 200 µL de TCA 50% (m/v), 800 µL de H₃PO₄ 42% (v/v), 800 µL de 2,2'-dipiridil 4% (p/v) (dissolvido em etanol 70 %) e 400 µL de FeCl₃ 3% (p/v). Após agitação vigorosa, a mistura foi incubada a 42 °C, por 40 minutos e, então, a reação foi paralisada em banho de gelo e a absorbância da mistura determinada a 525 nm.

O teor de ascorbato reduzido (AA) foi determinado como descrito anteriormente, sendo o DTT e o N-etilmaleimida omitidos e substituídos por 400 µL de tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 7,4. O DHA foi calculado pela diferença entre o ascorbato total e o ascorbato reduzido. A concentração de AA foi determinada por meio de curva de calibração utilizando-se padrões autênticos de ácido ascórbico, sendo o resultado expresso em µmol g⁻¹ massa fresca.

2.11. Determinação de proteínas

Os teores de proteínas dos extratos enzimáticos foram determinados pelo método de Bradford et al. (1976), utilizando BSA como padrão.

2.12. Delineamento experimental e Análise estatística

O delineamento experimental utilizado em todos os experimentos foi o de blocos casualizados, em esquema fatorial, com três repetições. No caso da avaliação da avaliação do efeito do NO sobre a inibição do alongamento radicular utilizou-se esquema fatorial (2x4): dois genótipos de milho (UFVM 100 e UFVM 200), quatro níveis de SNP (0, 25, 50 e 100 μM); para a avaliação do efeito do NO sobre o teor de Al nos ápices radiculares utilizou-se esquema fatorial (2x2x2): dois genótipos de milho (UFVM 100 e UFVM 200), dois níveis de SNP (0 e 25 μM), dois níveis de Al (0 e 50 μM); para a avaliação do efeito de inibidores da síntese da sintase do óxido nítrico (NOS) sobre a inibição do alongamento radicular causado por Al utilizou-se esquema fatorial (2x7): dois genótipos de milho (UFVM 100 e UFVM 200), sete diferentes soluções a partir da combinação de Al, SNP e L-NNA; para a avaliação do efeito de inibidores da redutase do nitrato (RN) sobre a inibição do alongamento radicular causado por Al utilizou-se esquema fatorial (2x7): dois genótipos de milho (UFVM 100 e UFVM 200), sete diferentes soluções a partir da combinação de Al, SNP e tungstato; para avaliação do efeito aliviador do NO sobre a inibição do alongamento radicular causado por Al utilizou-se esquema fatorial (2x7): dois genótipos de milho (UFVM 100 e UFVM 200), sete diferentes soluções a partir da combinação de Al, SNP e PTIO; para avaliação do efeito do Al sobre os teores do NO nos tecidos radiculares utilizou-se esquema fatorial (2x2x2): dois genótipos de milho (UFVM 100 e UFVM 200), dois níveis de SNP (0 e 25 μM), dois níveis de Al (0 e 50 μM); para avaliação do efeito do Al sobre a atividade da sintase do óxido nítrico (NOS) e da redutase do nitrato (NR) nos tecidos radiculares utilizou-se esquema fatorial (2x2): dois genótipos de milho (UFVM 100 e UFVM 200), dois níveis de Al (0 e 50 μM); para a avaliação do efeito aliviador do NO sobre o estresse oxidativo causado pelo Al utilizou-se esquema fatorial (2x2x2): dois genótipos de milho (UFVM 100 e UFVM 200), dois níveis de Al (0 e 50 μM), dois níveis de SNP (0 e 25 μM).

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), as médias comparadas pelo agrupamento de Skott-Knott a 5% de probabilidade, e os fatores quantitativos analisados por regressão. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa Sisvar, desenvolvido por Ferreira (1999).

3. RESULTADOS

3.1. Efeito de concentrações crescentes de nitroprussiato de sódio sobre o alongamento radicular

Antes da utilização do nitroprussiato de sódio (SNP) como fonte exógena de NO, avaliou-se seu efeito sobre o alongamento da raiz principal. Verificou-se que alongamento radicular (AR) diminui com o incremento da concentração de SNP nos dois genótipos de milho (Fig. 1). Em concentrações de SNP de 25 e 50 μM o genótipo UFVM 200 apresentou, respectivamente, AR 22 e 23% maiores que o UFVM 100. À medida que a concentração de SNP aumentou as diferenças genotípicas diminuíram e na concentração mais elevada de SNP (100 μM) a redução no alongamento radicular foi, semelhante nos dois genótipos. Como a concentração de 25 μM de SNP apresentou menor efeito prejudicial sobre o alongamento radicular nos dois genótipos, escolheu-se esta concentração para as demais avaliações do efeito da aplicação de SNP.

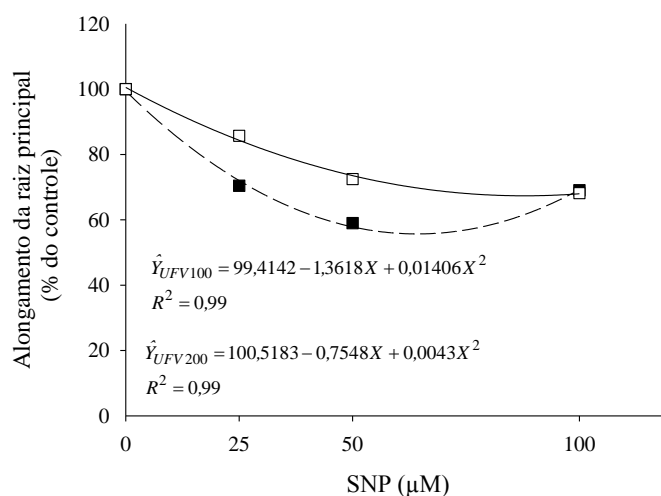


Figura 1 - Efeito de diferentes concentrações de nitroprussiato de sódio (SNP), sobre o alongamento da raiz principal em dois genótipos de milho, após 24 horas de tratamento. (■) e UFVM 200 (□).

3. 2. Efeito do nitroprussiato de sódio sobre os teores de alumínio em ápices radiculares

Os ápices radiculares dos dois genótipos de milho apresentaram elevados teores de Al, após 24 h de tratamento (Fig. 2). Na presença de Al, o genótipo UFVM 200 apresentou um teor deste elemento 19% mais elevado do que o genótipo UFVM 100. A adição de SNP as plantas tratadas com Al não alterou o teor de Al em ambos os genótipos.

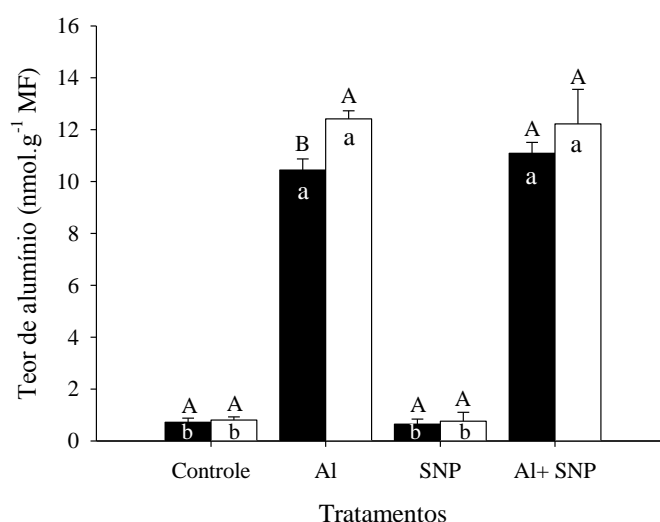


Figura 2 - Teores de alumínio nos ápices radiculares de dois genótipos de milho, submetidos a 0 e 50 μ M de Al na presença de 0 e 25 μ M de SNP, após 24 horas de tratamento. UFVM 100 (■) e UFVM 200 (□).

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, entre os genótipos para o mesmo tratamento, e médias seguidas pela mesma letra minúscula entre os tratamentos para o mesmo genótipo não diferem significativamente pelo agrupamento de Skott Knott em nível de 5% de probabilidade. Barras representam o desvio padrão.

3.3 Efeito do alumínio, nitroprussiato de sódio (SNP), N^w-nitro-L-arginina (L-NNA), tungstato e 2 fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazilina-1-oxil-3-óxido (PTIO) sobre o alongamento radicular

O tratamento com Al reduziu o alongamento radicular nos dois genótipos, mas com maior intensidade no genótipo UFVM 100 (Fig. 3). Observou-se, também, redução no alongamento radicular nas plantas tratadas com SNP isoladamente, nos dois genótipos, e mais acentuadamente no genótipo UFVM 100. Seu efeito, contudo, foi menos intenso que o do Al sozinho.

O tratamento com L-NNA, inibidor específico da sintase do óxido nítrico (NOS), reduziu o alongamento radicular somente no genótipo UFVM 200, mas não proporcionou diferença entre os genótipos. O tratamento combinado de SNP + L-NNA teve efeito similar ao dos tratamentos isolados, mas o genótipo UFVM 100 teve menor alongamento radicular que o UFVM 200. Na presença de Al + L-NNA o AR foi similar ao do tratamento com Al sozinho, mas eliminou-se a diferença entre genótipos. E, finalmente, a combinação Al + SNP + L-NNA resultou em aumento significativo no alongamento radicular no genótipo UFVM 100, mas, mesmo assim, os genótipos não diferiram entre si.

O tratamento com tungstato reduziu o alongamento radicular em intensidade similar ao efeito isolado do Al, nos dois genótipos (Fig. 3). O tratamento das plantas com Al+tungstato não modificou a intensidade da redução no alongamento radicular provocada pelos dois fatores aplicados isoladamente. A adição de SNP ao tratamento com tungstato (tungstato+SNP) eliminou parte do efeito inibitório do tungstato, mas apenas no genótipo UFVM 100. A combinação Al+tungstato+SNP resultou em recuperação parcial do efeito tóxico do Al, especialmente no genótipo UFVM 200 que apresentou um alongamento radicular estatisticamente superior ao do genótipo UFV 100. Já a inibição induzida pelo tratamento com Al + tungstato foi recuperada pelo tratamento com SNP em ambos os genótipos.

O tratamento com PTIO, eliminador específico de NO, reduziu o alongamento radicular com aproximadamente a mesma intensidade da redução causada pelo Al sozinho (Fig. 3). Na presença desta substância o genótipo UFVM 100, de igual modo, sofreu maior redução no alongamento radicular que o genótipo UFVM 200. O tratamento combinado com Al+PTIO não teve efeito adicional sobre seus efeitos isolados. A adição de SNP ao tratamento com PTIO (SNP+PTIO) eliminou parte da redução no alongamento radicular causada pelo efeito isolado de PTIO e o genótipo UFVM 200 manteve maior alongamento radicular do que o genótipo UFVM 100. A adição de Al (combinação Al+PTIO+SNP) não teve efeito significativo em comparação ao tratamento de SNP+PTIO.

3.4. Efeito de alumínio, nitroprussiato de sódio (SNP), N^w-nitro-L-arginina (L-NNA), tungstato e 2 fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazilina-1-oxil-3-óxido (PTIO) sobre o teor de óxido nítrico

Na ausência de tratamentos (controle), o genótipo UFVM 100 apresentou teor de NO 22% mais elevado que o genótipo UFVM 200 (Fig. 4). O tratamento com Al reduziu fortemente o teor de NO nos dois genótipos, eliminando as diferença entre eles. O tratamento com SNP elevou os teores de NO nos dois genótipos, atingindo níveis superiores aos das plantas controle.

O tratamento com o inibidor da NOS (L-NNA) isoladamente não causou efeito significativo sobre o teor de NO nos dois genótipos. O efeito combinado de Al+L-NNA sobre o teor de NO teve aproximadamente a mesma intensidade do efeito isolado do Al. O teor de NO no tratamento combinado de SNP+L-NNA foi significativamente maior do que no tratamento com L-NNA isolado no genótipo UFVM 200, mas menor do que no tratamento com SNP isolado, no genótipo UFVM 100. A redução do teor de NO causada pelo tratamento com Al foi parcialmente recuperada pelo tratamento combinado Al+SNP+L-NNA nos dois genótipos.

O tratamento com tungstato causou redução no teor de NO com intensidade semelhante nos dois genótipos (Fig. 4). A adição de Al juntamente com o tungstato (Al+tungstato) teve efeito adicional sobre o teor de NO e os genótipos não diferiram entre si. O tratamento combinado SNP+tungstato eliminou a redução no teor de NO, que se manteve nos níveis do tratamento com SNP isoladamente. A adição de Al à combinação (SNP+tungstato), isto é no tratamento combinado Al+SNP+tungstato, recuperou parcialmente a redução no teor de NO causada pelo Al sozinho.

O tratamento com PTIO, um sequestrador específico de NO, reduziu o teor de NO nos dois genótipos numa intensidade similar ao do efeito do Al (Fig. 4). O tratamento com Al+PTIO não teve efeito adicional sobre o teor de NO, e os genótipos não diferiram entre si. A adição de SNP ao tratamento com PTIO recuperou parcialmente o teor de NO, apenas no genótipo UFVM 100. Na presença de Al+SNP+PTIO os teores de NO elevaram-se atingindo valores próximos aos do controle.

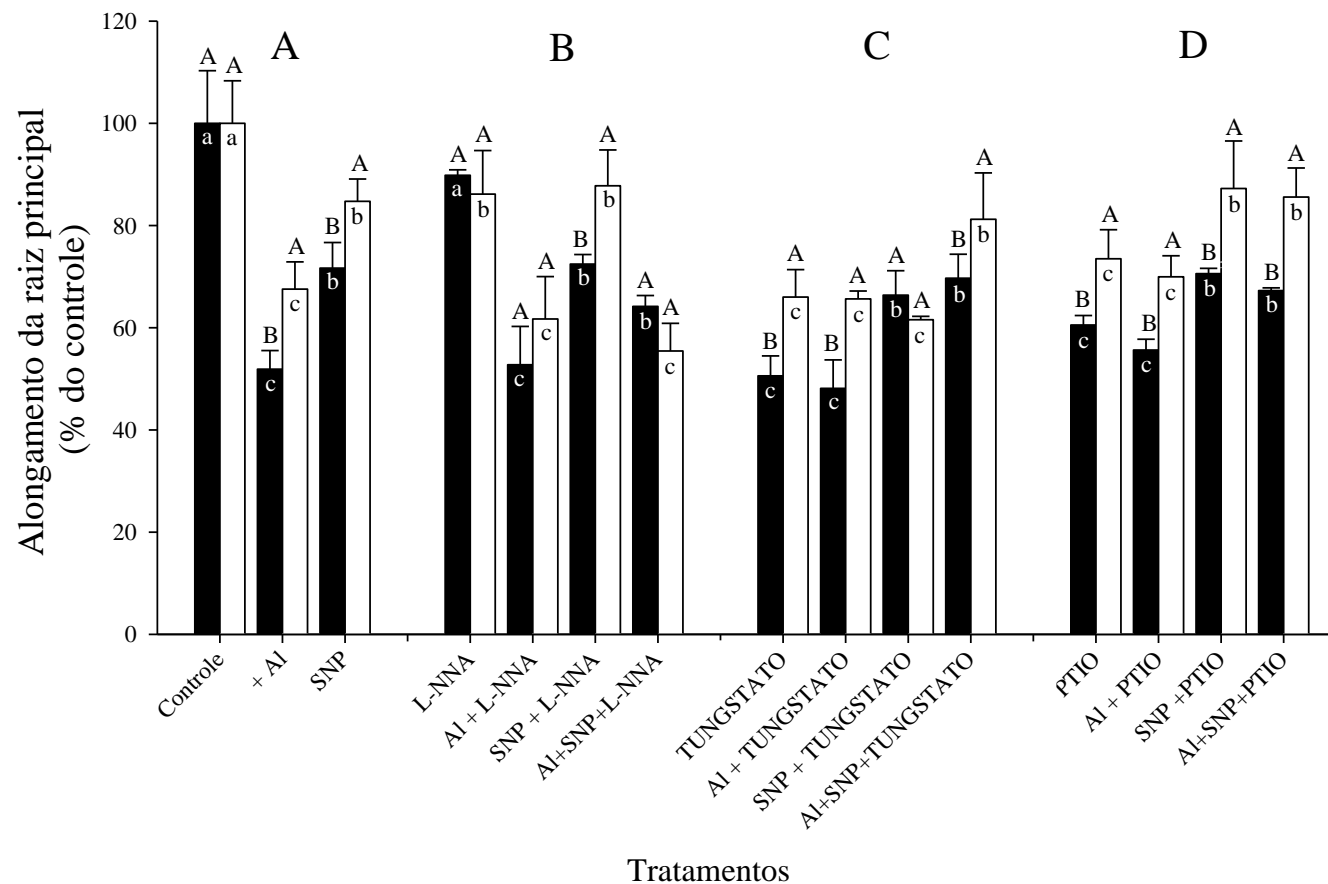


Figura 3 – Efeito de Al, de SNP, de N^w-nitro-L-arginina (L-NNA), de tungstato e de PTIO aplicados isoladamente ou em combinação sobre o alongamento radicular em dois genótipos de milho após 24 h de tratamento. Tratamentos: Al 50 μ M, SNP 25 μ M, L-NNA 100 μ M, tungstato 100 μ M e PTIO 50 μ M. UFVM 100 (■) e UFVM 200 (□).

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, entre os genótipos para o mesmo tratamento, e médias seguidas pela mesma letra minúscula entre os tratamentos do grupo (A e B), (A e C), (A e D) para o mesmo genótipo não diferem significativamente pelo agrupamento de Skott Knott em nível de 5% de probabilidade. Barras representam o desvio padrão.

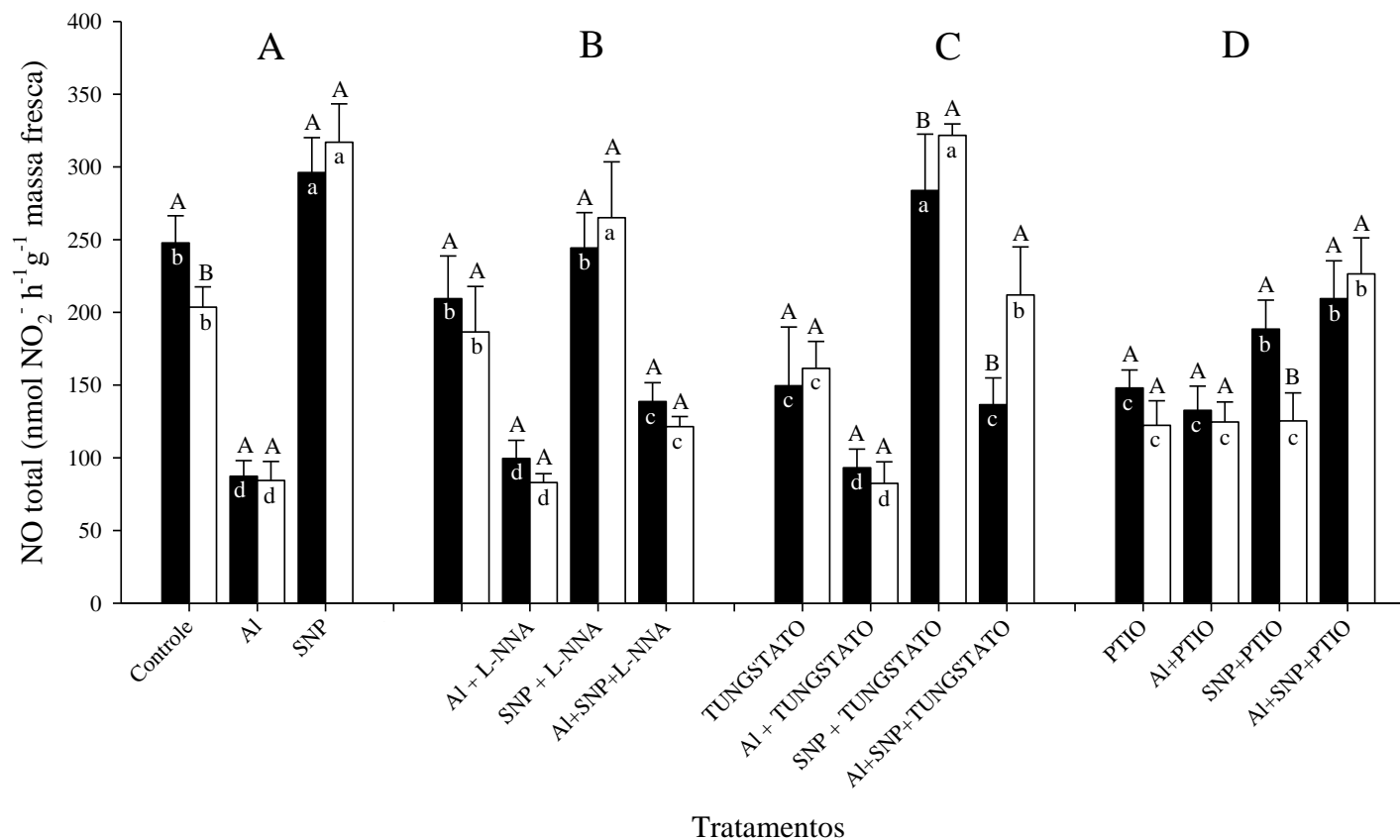


Figura 4 – Efeito de Al, de SNP, de N^W-nitro-L-arginina (L-NNA), de tungstato e de PTIO aplicados isoladamente ou em combinação sobre o teor de óxido nítrico em dois genótipos de milho após 24 h de tratamento. Tratamentos: Al 50 μ M, SNP 25 μ M, L-NNA 100 μ M, tungstato 100 μ M e PTIO 50 μ M. UFVM 100 (■) e UFVM 200 (□).

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, entre os genótipos para o mesmo tratamento, e médias seguidas pela mesma letra minúscula entre os tratamentos do grupo (A e B), (A e C), (A e D) para o mesmo genótipo não diferem significativamente pelo agrupamento de Skott Knott em nível de 5% de probabilidade. Barras representam o desvio padrão.

3.5 Efeito do alumínio sobre as atividades das enzimas sintase do óxido nítrico (NOS; EC 1.14.13.39) e redutase do nitrato (RN; EC 1.7.1.1)

Os genótipos diferiram estatisticamente entre si, tanto na ausência quanto na presença de Al para a atividade da NOS e RN (Fig. 5 A e B). Nas plantas controles as atividades das duas enzimas foram sempre maiores no genótipo UFVM 100. Após tratamento com Al 50 μ M por 24 h observou-se redução de 35% da atividade da NOS apenas no genótipo UFVM 100 (Fig. 5 A). A atividade da NOS não foi influenciada pela presença de Al no genótipo UFVM 200 e se tornou cerca de 28% mais elevada que no UFVM 100. O tratamento com Al provocou redução de 47 e 44% na atividade da RN, nos genótipos UFVM 100 e UFVM 200, respectivamente (Fig. 5 B). Na presença de Al o genótipo UFVM 100 manteve atividade da RN 60 % superior à do UFVM 200. Independentemente do tratamento, o genótipo UFVM 100 sempre apresentou maior atividade da enzima RN em relação ao UFVM 200 (Fig. 5B).

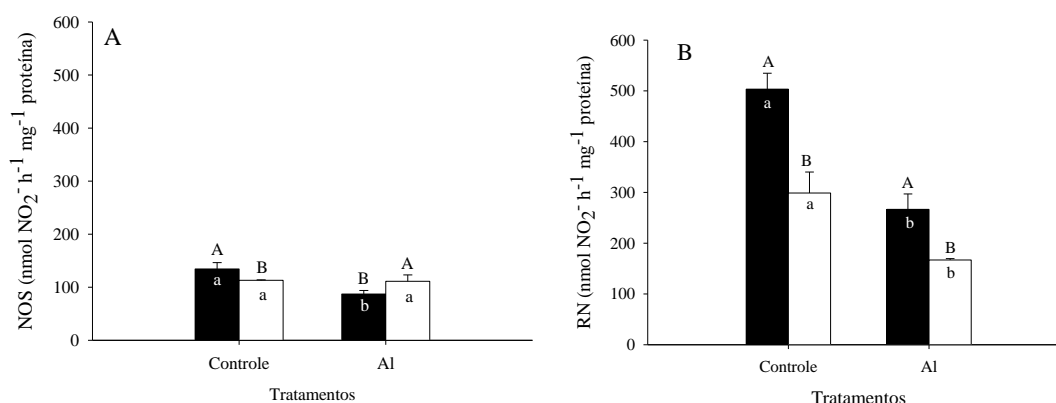


Figura 5 – Atividade das enzimas sintase do óxido nítrico (NOS) (A) e redutase do nitrato (RN) (B) em dois genótipos de milho na ausência e presença de 50 μ M de Al durante 24 horas: UFVM 100 (■) e UFVM 200 (□).

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, entre os genótipos para o mesmo tratamento, e médias seguidas pela mesma letra minúscula entre os tratamentos para o mesmo genótipo não diferem significativamente pelo teste de Skott Knott ao nível de 5% de probabilidade. Barras representam o desvio padrão.

3.6 Efeito do alumínio sobre a produção de intermediários reativos de oxigênio (ROIs)

O tratamento com Al aumentou cerca de 87% o teor de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) apenas nos ápices radiculares do genótipo UFVM 100 (Fig. 6 A). O tratamento com SNP isoladamente não teve efeito sobre o teor de H_2O_2 no genótipo UFVM 100, mas o reduziu ligeiramente no genótipo UFVM 200. O tratamento com Al+SNP combinados influenciou diferencialmente os teores de H_2O_2 nos dois genótipos: reduziu 16% o teor de H_2O_2 no genótipo UFVM 200, mas aumentou o teor de H_2O_2 em 47% no genótipo UFVM 100, em relação ao controle.

Os dois genótipos não diferiram entre si quanto ao teor do ânion superóxido (O_2^-) em ápices radiculares no tratamento controle (Fig. 6 B). O tratamento com Al aumentou em cerca de 71% o teor de O_2^- apenas no genótipo UFVM 100. Na presença de Al os teores de O_2^- no genótipo UFVM 100 foram 32% mais elevados do que no genótipo UFVM 200. A aplicação de SNP, também causou aumento no teor de O_2^- , mas apenas no genótipo UFVM 100. O aumento, entretanto, foi menor do que o causado por Al sozinho. A adição de SNP ao tratamento com Al (Al+SNP) atenuou apenas parcialmente o efeito indutor do Al sobre a produção de O_2^- no genótipo UFVM 100, mas não teve qualquer efeito sobre o genótipo UFVM 200.

As plantas controle apresentaram teores similares de radical hidroxila (HO^\bullet) em seus ápices radiculares. O tratamento com Al aumentou o teor de HO^\bullet em cerca de 17% apenas no genótipo UFVM 100, enquanto no UFVM 200 não se modificou. No tratamento com SNP aplicado isoladamente os teores de HO^\bullet foram essencialmente os mesmos dos controles. A aplicação de SNP às plantas também tratadas com Al (tratamento Al+SNP) não teve efeito significativo atenuador sobre o incremento no teor deste ROI induzido pelo Al sozinho no genótipo UFVM 100 e no genótipo UFVM 200.

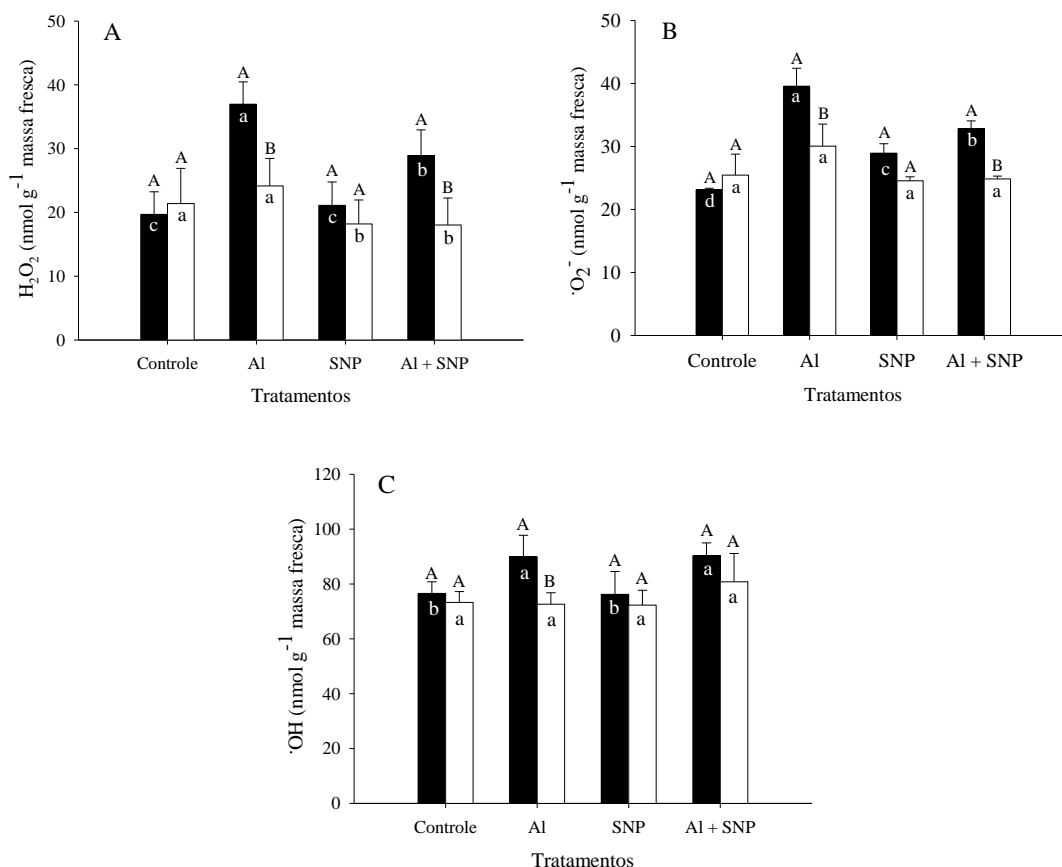


Figura 6: Teores de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (A), radical ânion superóxido (·O₂⁻) (B) e radical hidroxila (·OH) (C) em raízes dos genótipos de milho UFVM 100 (■) e UFVM 200 (□) após 24 horas de exposição a 0 e 50 μM de Al, 25 μM de SNP e 50 μM de Al + 25 μM de SNP.

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, entre os genótipos para o mesmo tratamento, e pela mesma letra minúscula entre os tratamentos para o mesmo genótipo não diferem significativamente pelo agrupamento de Skott Knott em nível de 5% de probabilidade. Barras representam o desvio padrão.

3.7 Efeito do alumínio sobre as atividades de enzimas antioxidativas

A atividade da dismutase do superóxido (SOD) em ápices radiculares de plantas controle foi essencialmente similar nos dois genótipos de milho (Fig. 7 A). Após tratamento com Al a atividade da SOD aumentou cerca de 63% e 52% nos genótipos UFVM 100 e UFVM 200, respectivamente. O tratamento com SNP isoladamente não teve qualquer efeito sobre a atividade desta enzima nos dois genótipos. A aplicação de SNP às plantas tratadas com Al (Al+SNP) reduziu o aumento na atividade da SOD induzido pelo Al apenas no genótipo UFVM 100.

Neste tratamento o genótipo UFVM 200 apresentou atividade desta enzima 25% mais elevada que o genótipo UFVM 100.

O tratamento das plantas com Al resultou em aumento de cerca de 46% na atividade da catalase (CAT) em ápices radiculares apenas do genótipo UFVM 200, que se tornou 40% mais elevada que no genótipo UFVM 100. O tratamento com SNP isoladamente não modificou a atividade desta enzima em nenhum dos genótipos. A aplicação de SNP às plantas tratadas com Al, por outro lado, aumentou ligeiramente a atividade da CAT no genótipo UFVM 100 e manteve essencialmente a mesma atividade da enzima no genótipo UFVM 200 observada no tratamento com Al aplicado isoladamente.

As plantas controle do genótipo UFVM 100 apresentaram atividade da peroxidase do ascorbato (APX) significativamente mais elevada que o genótipo UFVM 200 (Fig. 7 C). O tratamento das plantas com Al ou SNP, aplicados isoladamente não afetou a atividade da enzima em nenhum dos genótipos. A aplicação de SNP às plantas tratadas com Al (Al+SNP), no entanto, elevou a atividade da APX em 17% no genótipo UFVM 200, que se tornou essencialmente igual à do genótipo UFVM 100.

O tratamento das plantas com Al elevou a atividade da POX apenas no genótipo UFVM 200, mas não se observou diferença entre genótipos (Fig. 7 D). O tratamento com SNP isoladamente não interferiu na atividade desta enzima nos dois genótipos. O tratamento da combinação Al+SNP teve efeito similar ao do Al sozinho, isto é, aumentou a atividade da POX somente no genótipo UFVM 200, que passou a ter atividade igual à do genótipo UFVM 100.

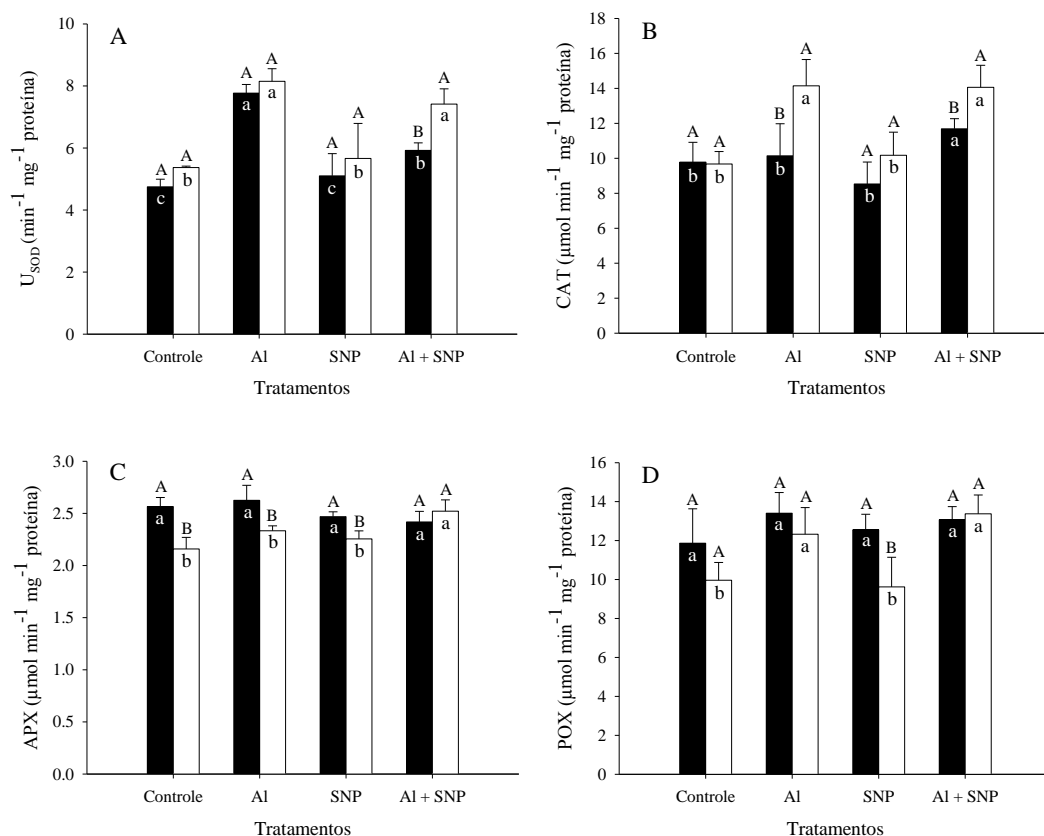


Figura 7: Atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD) (A), catalase (CAT) (B), peroxidase total (POX) (C) e peroxidase do ascorbato (APX) (D) em raízes dos genótipos de milho UFV 100 (■) e UFV 200 (□) após 24 horas de exposição a 0 e 50 μM de Al, 25 μM de SNP e 50 μM de Al + 25 μM de SNP.

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, entre os genótipos para o mesmo tratamento, e pela mesma letra minúscula entre os tratamentos para o mesmo genótipo não diferem significativamente pelo agrupamento de Skott Knott em nível de 5% de probabilidade. Barras representam o desvio padrão.

O tratamento das plantas com Al resultou num aumento na atividade da glutatona redutase (GR) de 143% e de 113% nos genótipos UFVM 100 e UFVM 200, respectivamente (Fig. 8 A). A atividade da GR no genótipo UFVM 100 foi 28 % mais elevada que no UFVM 200, após tratamento com Al (Fig. 8 A). A aplicação de SNP resultou em elevação na atividade da GR em relação às plantas controle, mas não houve diferença entre genótipos. O tratamento das plantas com a combinação Al+SNP resultou em pequena redução da atividade da GR apenas no genótipo UFVM 100, mas os genótipos não difeririam entre si.

O tratamento das plantas com Al resultou num aumento na atividade da glutatona peroxidase (GPX) apenas no UFVM 200 (Fig. 8 B). A aplicação isolada de SNP não modificou a atividade da enzima em nenhum dos genótipos. A aplicação de SNP às plantas tratadas com Al, por outro lado, resultou em forte aumento na

atividade da GPX e o efeito teve aproximadamente a mesma intensidade nos dois genótipos.

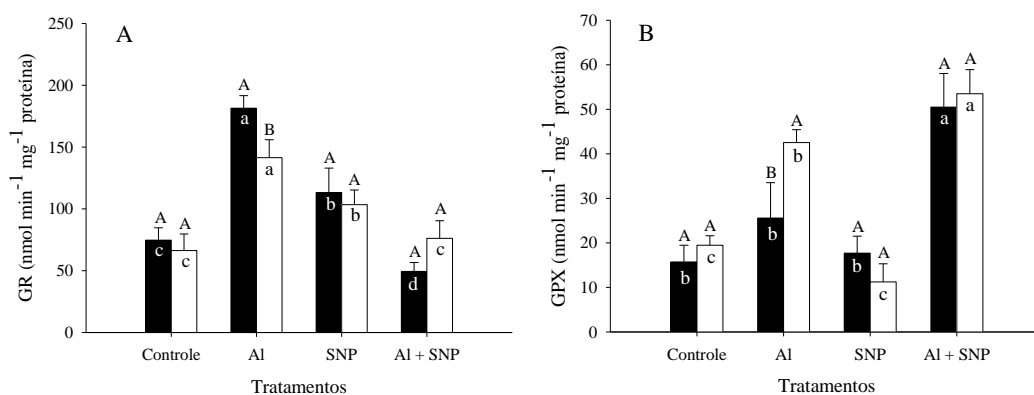


Figura 8: Atividade das enzimas redutase da glutathione (GR) (A) e peroxidase da glutathione (GPX) (B) em raízes dos genótipos de milho UFV 100 (■) e UFV 200 (□) após 24 horas de exposição a 0 e 50 μM de Al, 25 μM de SNP e 50 μM de Al + 25 μM de SNP.

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, entre os genótipos para o mesmo tratamento, e pela mesma letra minúscula entre os tratamentos para o mesmo genótipo não diferem significativamente pelo agrupamento de Skott Knott em nível de 5% de probabilidade. Barras representam o desvio padrão.

3.8 Efeito do alumínio sobre a peroxidação de lipídeos e sobre a atividade da lipoxigenase.

A peroxidação de lipídios similar nas plantas controle dos dois genótipos, aumentou nas plantas tratadas com Al em 47% e 30% nos genótipos UFVM 100 e UFVM 200, respectivamente (Fig. 9 A). Na presença de Al o teor de MDA no genótipo UFVM 200 foi 20 % menor do que no genótipo UFVM 100. Na presença de SNP sozinho, também foi observado aumento no teor de MDA, mas apenas no genótipo UFVM 200. A aplicação de SNP às plantas tratadas com Al reduziu o teor de MDA para valores similares aos do controle apenas no genótipo UFVM 200.

O tratamento com Al aumentou a atividade da lipoxigenase (LOX) em cerca de 87% apenas no genótipo UFVM 100, tornando-a 76% mais elevada que no genótipo UFVM 200 (Fig. 9 B). O tratamento com SNP sozinho não modificou a atividade da enzima em nenhum dos genótipos. Nas plantas tratadas com Al + SNP, observou-se aumento na atividade da enzima apenas no genótipo UFVM 100, mas o efeito foi atenuado em relação ao tratamento com Al isoladamente. Este efeito, entretanto, foi suficiente para eliminar a diferença entre genótipos.

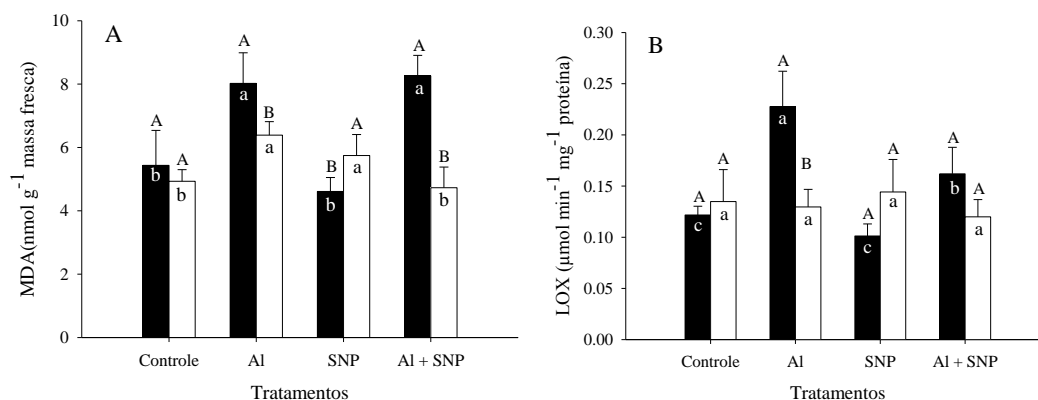


Figura 9: Teor de malondialdeído (MDA) (A) e atividade da enzima lipoxigenase (LOX) (B) em raízes dos genótipos de milho UFV 100 (■) e UFV 200 (□) após 24 horas de exposição a 0 e 50 μM de Al, 25 μM de SNP e 50 μM de Al + 25 μM de SNP.

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, entre os genótipos para o mesmo tratamento, e pela mesma letra minúscula entre os tratamentos para o mesmo genótipo não diferem significativamente pelo agrupamento de Skott Knott em nível de 5% de probabilidade. Barras representam o desvio padrão.

3.9. Efeito do alumínio sobre os teores de ascorbato e desidroascorbato e as atividades das enzimas desidroascorbato redutase e monodesidroascorbato redutase

O tratamento das plantas com Al reduziu a atividade da desidroascorbato redutase (DHAR) nos dois genótipos (Fig. 10 A). A redução no genótipo UFVM 100, no entanto, foi muito mais intensa do que no genótipo UFVM 200. Nesta condição este genótipo foi capaz de manter atividade 207 % mais elevada que o genótipo UFVM 100. O tratamento com SNP isoladamente aumentou a atividade da DHAR apenas no genótipo UFVM 100, enquanto no genótipo UFVM 200 a atividade da enzima não se modificou em relação ao controle. O tratamento combinado de Al+SNP atenuou ligeiramente o efeito do Al sobre o genótipo UFVM 100, passando a terem os genótipos atividade enzimática estatisticamente similar.

A atividade da monodesidroascorbato redutase (MDHAR) sofreu redução de 35% e 22% no genótipos UFVM 100 e UFVM 200, respectivamente (Fig. 10 B). O tratamento com SNP sozinho reduziu a atividade da enzima apenas no genótipo UFVM 100. A aplicação de SNP às plantas tratadas com Al atenuou parcialmente os efeitos do Al nos dois genótipos, mas apenas no genótipo UFVM 200 a atividade da MDHAR voltou aos níveis do controle.

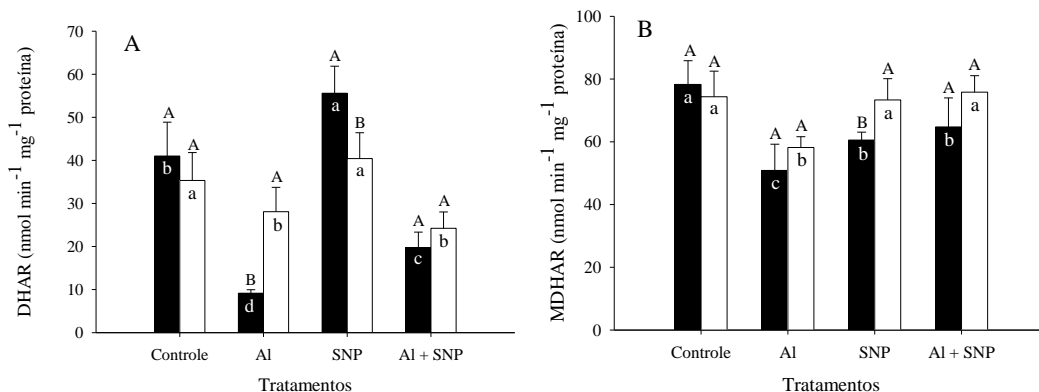


Figura 10: Atividade das enzimas desidroascorbato redutase (DHAR) (A) e monodesidroascorbato redutase (MDHR) (B) em raízes dos genótipos de milho UFVM 100 (■) e UFVM 200 (□) após 24 horas de exposição a 0 e 50 μ M de Al, 25 μ M de SNP e 50 μ M de Al + 25 μ M de SNP.

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, entre os genótipos para o mesmo tratamento, e pela mesma letra minúscula entre os tratamentos para o mesmo genótipo não diferem significativamente pelo agrupamento de Skott Knott em nível de 5% de probabilidade. Barras representam o desvio padrão.

O tratamento das plantas com Al resultou em redução no teor de ascorbato total (AA + DHA) de 36% e de 22% nos genótipos UFVM100 e UFVM 200, respectivamente (Fig.11 A). O tratamento com SNP aplicado isoladamente não teve nenhum efeito sobre os teores de ascorbato total. O tratamento combinado de SNP+Al teve pequeno efeito atenuador no genótipo UFVM 100, eliminando a diferença entre genótipos tratados com Al isoladamente.

As modificações nos teores de ascorbato reduzido (AA) nos dois genótipos com os tratamentos com Al, SNP e Al+SNP foram essencialmente as mesmas observadas com relação aos teores de ascorbato total (AA+DHA) (Fig. 11 B).

Os tratamentos das plantas com Al, SNP e Al+SNP resultaram em redução nos teores de desidroascorbato (DHA) apenas no genótipo UFVM 200, mas em todos os casos, os genótipos não diferiam entre si (Fig. 11 C).

A razão AA/DHA nas plantas controle do genótipo UFVM 100 foi 3,08 e 2,3 nos genótipos UFVM 100 e UFVM 200, respectivamente (Fig. 11D). O tratamento com Al resultou em redução de 29% na razão AA/DHA no genótipo UFVM 100, mas não foi alterada no genótipo UFVM 200. A aplicação de SNP isoladamente, ao contrário, aumentou a relação AA/DHA com aproximadamente a mesma intensidade nos dois genótipos. O tratamento das plantas com a combinação Al+SNP, embora não tenha tido efeito estatisticamente significativo sobre a relação AA/DHA

comparativamente ao efeito isolado do Al, fez com que o genótipo UFVM 200 passasse a ter uma relação AA/DHA mais elevada que o genótipo UFVM 100.

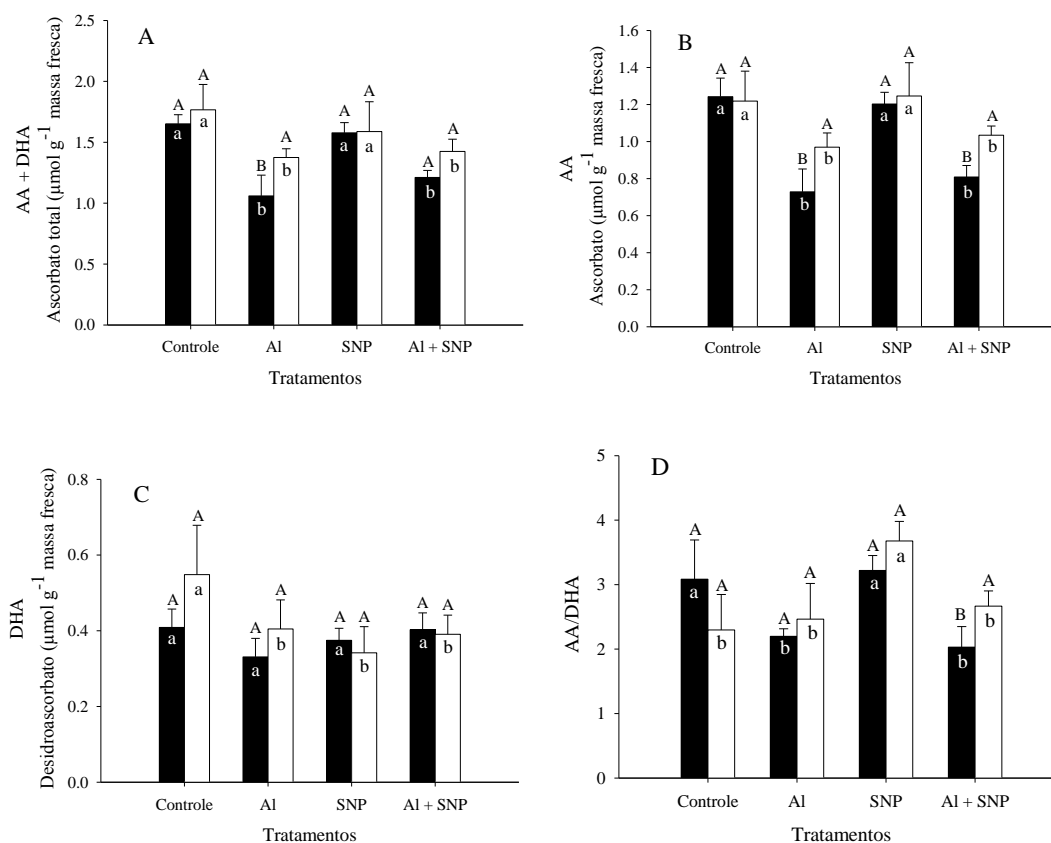


Figura 11: Teores de Ascorbato total (AA + DHA) (A), ascorbato (AA) (B), desidroascorbato (DHA) (C) e relação ascorbato/desidroascorbato (AA/DHA) (D) em raízes dos genótipos de milho UFV 100 (■) e UFV 200 (□) após 24 horas de exposição a 0 e 50 μM de Al, 25 μM de SNP e 50 μM de Al + 25 μM de SNP. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, entre os genótipos para o mesmo tratamento, e pela mesma letra minúscula entre os tratamentos para o mesmo genótipo não diferem significativamente pelo agrupamento de Skott Knott em nível de 5% de probabilidade. Barras representam o desvio padrão.

4. DISCUSSÃO

O alumínio (Al), na sua forma solúvel, em pH abaixo de 5, apresenta-se na forma do íon Al^{3+} , sendo altamente tóxico para a maioria das plantas, interferindo no alongamento radicular, na divisão celular, na estrutura e função da parede celular, na estrutura e função da membrana plasmática e, por consequência, na absorção de água e de nutrientes minerais essenciais e, vários outros processos bioquímicos e/ou fisiológicos (Kochian 1995). No entanto, as plantas variam muito na sua capacidade de tolerar o Al e diferenças na tolerância a este elemento têm sido encontradas entre genótipos de milho (Pintro et al., 1995; Boscolo et al., 2003; Piñeros et al., 2005; Giannakoula et al., 2008), trigo (Zheng et al., 2005) e outras espécies vegetais.

Assume-se, de modo geral, que espécies mais sensíveis quando expostas a níveis tóxicos de Al acumulam teores mais elevados deste elemento. Isto, contudo, pode variar em determinados estudos. A determinação dos teores de Al em raízes de dois cultivares de sorgo (Pereira et al., 2008) e dois de arroz (Justino et al., 2006), nos dois casos com tolerância diferencial ao Al, não mostrou diferença significativa entre eles quanto ao teor deste elemento. No presente estudo, o Al absorvido acumulou-se nas raízes principalmente no genótipo UFVM 200, considerado mais tolerante a este elemento (Fig. 2). Acredita-se, entretanto, que grande parte deste Al esteja na forma de precipitado, provavelmente na forma de fosfato de Al, no apoplasto radicular (Zheng et al., 2005).

A aplicação de nitroprussiato de sódio (SNP), fornecedor exógeno de óxido nítrico (NO) não foi capaz de reduzir o teor de Al nas raízes de nenhum dos dois genótipos. Em *Cassia tora* L. e feijão, ao contrário, foi verificado que o tratamento das plantas com SNP reduziu os teores de Al nas raízes destas plantas tratadas com este elemento (Wang e Yang, 2005; Wang et al., 2010), razão pela qual o NO foi considerado agente redutor da toxidez do Al. Além das espécies comparadas serem diferentes, parte da diferença entre os resultados pode estar ligada às diferenças de concentrações de SNP utilizadas nos experimentos. Enquanto Wang e Yang (2005) utilizaram SNP na concentração de 400 μ M, Wang et al. (2010) usaram 200 μ M, no presente experimento foi utilizada a concentração de SNP de 25 μ M, pois, essa substância apresentou forte efeito inibitório sobre o alongamento radicular (Fig. 1). Possíveis diferenças na determinação dos teores de Al foram descartadas uma vez que neste estudo foi utilizada a mesma metodologia utilizada por aqueles autores.

Acredita-se que, mesmo que a aplicação de SNP possa ter efeito sobre os teores radiculares de Al, este efeito deve ser casual ou indireto, a não ser que se possa diferenciar entre o Al precipitado no apoplasto e/ou no vacúolo e o Al ativo presente no citoplasma.

As raízes dos genótipos de milho utilizados no presente trabalho mostraram-se bastante sensíveis ao tratamento com SNP. Mesmo em concentração tão baixa quanto 25 μM observou-se redução do AR, especialmente no genótipo UFVM 100 (Fig. 1). Esse efeito inibitório do doador de NO sobre o AR foi, também, relatado por Tian et al. (2007) em plantas de *Hibiscus moscheutos*, especialmente em concentrações de SNP acima de 50 μM . Resultados como estes sugerem que os estudos dos efeitos benéficos do NO sobre a redução do AR induzido pelo Al precisam ser analisados com mais cuidado, pois dependem não somente da natureza da substância doadora de NO, bem como da sua concentração e da espécie/genótipo de planta usada no estudo. Em função disto, embora não se tenha verificado efeito do SNP sobre o acúmulo de Al nas raízes, como constatado por Wang e Yang (2005) e Wang et al. (2010), optou-se por utilizar este fornecedor de NO na concentração de 25 μM nas demais avaliações, uma vez que tal valor apresentou menor efeito tóxico sobre o AR.

Os resultados do presente estudo mostram que o SNP, fonte exógena de NO, de fato atenua o efeito inibitório do Al sobre o AR (Fig. 3) e que isso pode estar associado com a elevação dos teores de NO nos tecidos radiculares (Fig. 4), embora os dois genótipos não tenham diferido quanto aos teores de NO detectados. Vários artigos indicam que o NO atenua total ou parcialmente os efeitos do Al em várias espécies (Wang e Yang 2005; Tian et al., 2007; Zhang et al., 2008; Wang et al., 2010).

O NO em plantas é sintetizado basicamente por meio de duas rotas metabólicas: uma tem como precursor a L-arginina e envolve a ação da enzima sintase do óxido nítrico (NOS) e a outra parte do nitrato (NO_3^-), que é transformado em nitrito (NO_2^-) pela ação da redutase do nitrato (RN) e, em seguida, em NO (Neill et al., 2003; Crawford 2006; Wilson et al., 2008). A participação destas enzimas e a importância relativa de cada uma delas no estabelecimento e manutenção dos níveis de NO e suas consequências sobre efeitos tóxicos do Al têm sido determinadas pela utilização de três diferentes inibidores: o L-NNA, inibidor específico da NOS, o tungstato, inibidor específico da RN e o PTIO, um eliminador de NO. Após a

aplicação dos tratamentos com Al e dos inibidores individuais e, ou combinados, avalia-se a resposta das plantas em termos do AR e dos teores de NO. No presente estudo verificou-se que o L-NNA e, principalmente, o tungstato, inibidores das enzimas envolvidas na produção de NO reduziram os teores de NO e o AR, mas não numa intensidade equivalente à do efeito do Al, nos dois genótipos de milho. De modo similar, Tian et al. (2007) encontraram reduções semelhantes no alongamento radicular de *Hibiscus moscheutos* submetidos a tratamento com estes dois inibidores. Em feijão, entretanto, Wang et al. (2010) observaram redução nos teores de NO, mas não no AR de plantas tratadas com tungstato. Já o tratamento isolado com L-NNA não interferiu no AR nem no teor de NO. O tratamento das plantas com a combinação Al+tungstato aumentou a redução do AR comparativamente aos efeitos isolados daqueles inibidores, e manteve o teor de NO reduzido semelhante ao tratamento com tungstato. Já a combinação de Al + L-NNA apresentou resultados semelhantes ao tratamento isolado com Al. Este tipo de resultado indica que as concentrações daqueles inibidores podem não ter sido suficientemente altas para inibição total das enzimas NOS e RN.

A aplicação de SNP às plantas tratadas apenas com L-NNA ou tungstato atenuou o efeito destes inibidores sobre o AR em *H. moscheutos* (Tian et al., 2007). No presente estudo os tratamentos combinados de Al + L-NNA e Al + tungstato não diferiram do tratamento com Al quanto ao AR e teor de NO e o tratamento com SNP recuperou parte da redução do AR e do teor de NO.

Da mesma forma o tratamento com PTIO, um eliminador de NO, reduziu o AR e os teores de NO nos ápices radiculares dos genótipos de milho, mas seu efeito não atingiu um nível de intensidade equivalente ao do Al sozinho como se verificou em *H. moscheutos* (Tian et al., 2007). Na concentração de PTIO utilizada e para o tempo de tratamento aplicado a redução nos teores de NO dos tecidos radiculares foi de apenas 40% do valor do controle nos genótipos UFVM 100 e UFVM 200. Sob esta circunstância, entretanto, o PTIO causou uma redução nos teores de NO de até 22% e 68% daquele imposto pelo Al sozinho. Tanto neste estudo quanto em *H. moscheutos* o SNP atenuou os efeitos deste eliminador de NO.

Os efeitos dos inibidores L-NNA e tungstato sobre o AR são indicativos da importância que as duas enzimas da biossíntese do NO têm não só sobre os teores de NO, mas provavelmente sobre a tolerância das plantas ao Al (Wang et al., 2010).

Esta expectativa foi confirmada, com a redução da atividade da NOS e da RN extraídas de ápices radiculares expostos ao Al.

Observou-se certa relação entre a redução do teor de NO e a redução do AR em plantas tratadas com Al (Figuras 3 e 4). Estudos em *Hibiscus moscheutos* L. (Tian et al., 2007) e em *Arabidopsis thaliana* (Illés et al., 2006), também, demonstraram este efeito redutor do Al sobre o teor de NO nos tecidos radiculares corroborando os resultados do presente estudo. Tian et al. (2007) atribuíram a redução no teor de NO nos tecidos radiculares das plantas sob tratamento com Al a uma redução na atividade da NOS, já que a atividade da enzima RN não foi alterada nestas condições. Por outro lado, Wang et al. (2010) encontraram incremento no teor de NO nos ápices radiculares de plantas de feijão após exposição das plantas ao Al e este incremento, segundo os autores, foi resultado de maior atividade da RN. No presente estudo após exposição ao Al, verificou-se inibição das duas enzimas principalmente da RN, que foi inibida nos dois genótipos. No caso da atividade da NOS a inibição ocorreu apenas no genótipo mais sensível e, esta diferença pode estar ligada à tolerância diferencial dos genótipos de milho.

Com base na quantidade de proteína extraída, a atividade da RN no genótipo UFVM 100 foi aproximadamente 3,7 vezes maior e no UFVM 200 foi de 2,6 vezes maior do que a da NOS no tratamento controle, indicando ter esta enzima maior contribuição na produção de NO nos tecidos de raízes. O somatório das atividades das duas enzimas produtoras de NO, parece favorecer o genótipo UFVM 100. Assim, aparentemente, este genótipo poderia se beneficiar mais do efeito protetor do NO contra os efeitos tóxicos do Al do que o UFVM 200. A maior produção de NO por si só, entretanto, parece não ser suficiente para diferenciar os dois genótipos de milho quanto à tolerância ao Al.

Os resultados do presente estudo mostram que o tratamento com Al resultou em aumento nos teores de três tipos de intermediários reativos de oxigênio (ROIs) mais comuns: peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido ($\cdot O_2^-$) e radical hidroxila ($\cdot OH$) apenas no genótipo UFVM 100, considerado sensível a este elemento. A elevação nos teores de vários tipos de ROIs devido à ação tóxica do Al, resultando em estresse oxidativo em várias espécies tem sido amplamente relatada na literatura (Cakmak e Horst, 1991; Ezaki et al., 2000; Boscolo et al., 2003; Yamamoto et al., 2003; Jones et al., 2006; Tamás et al., 2006; Tabaldi et al., 2009; Yin et al., 2010a). O estresse oxidativo, por sua vez, promove a oxidação de biomoléculas

fundamentais tais como lipídios, pigmentos, proteínas e ácidos nucleicos (Tamás et al., 2006) resultando, em última análise, em redução do AR (Yamamoto et al., 2003; Kobayashi et al., 2004).

A aplicação de SNP, fornecedor exógeno de NO, reduziu os teores de H_2O_2 e $\cdot O_2^-$ nos dois genótipos de milho estudados, com aproximadamente a mesma intensidade, confirmando a ideia de que o NO tem efeito atenuador sobre o estresse oxidativo como sugerem Shi et al. (2007) e Liu et al. (2007).

O ânion superóxido é primariamente formado pelas oxidases do NADPH associadas à membrana plasmática, sendo dismutado a H_2O_2 e oxigênio (O_2) pela SOD (Matsumoto e Motoda 2011). O H_2O_2 atua como molécula sinalizadora nas células, além de fornecer os elétrons para polimerização de compostos fenólicos para a síntese de lignina, causando o enrijecimento da parede celular. Portanto, o incremento do teor de H_2O_2 durante estresse por Al pode contribuir para o aumento da lignificação das paredes celulares. Além disso, as distorções da parede celular causadas pela lignina podem induzir a formação de rupturas na região da rizoderme e camadas externas do córtex (Matsumoto e Motoda 2011) como verificado no capítulo 1. Duas possíveis vias fornecem H_2O_2 para síntese de lignina: uma via é a produção a partir da dismutação dos radicais ânions superóxidos pela Cu-Zn-SOD (SOD) gerados pelas NAD(P)H oxidases (Babourina, 2006). A outra via seria através de peroxidases ligadas à parede celular que são responsáveis pela produção do H_2O_2 utilizando NADPH ou NADH (Xue et al., 2008).

O acúmulo de ROIs induzido pelo Al ou outro agente estressante resulta na oxidação de biomoléculas, como os lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (Mittler, 2002; Sharma e Dubey, 2007). Dentre essas biomoléculas, os lipídios têm sido considerados importantes alvos da ação fitotóxica do Al (Cakmak e Host, 1991; Tabaldi et al., 2009). Yamamoto et al. (2001), contudo, sugerem que, em ervilha, a peroxidação de lipídios não seja a causa primária da inibição do AR, mas apenas um sintoma precoce da toxidez do Al. No presente trabalho, concomitante ao aumento nos teores de ROIs verificou-se elevação nas taxas de peroxidação de lipídios (Fig. 9 A) e maior atividade da LOX (Fig. 9 B) em plantas tratadas com Al apenas no genótipo UFVM 100. Semelhante aos resultados obtidos em nosso estudo, Giannakoula et al. (2010) também observaram aumentos expressivos na produção de ROIs e na taxa da peroxidação de lipídios nas raízes de um genótipo de milho sensível ao Al. Geralmente, os genótipos sensíveis apresentam sistemas de defesa

antioxidativos menos eficientes e, portanto, menor proteção contra os danos oxidativos causados pelo Al (Tabaldi et al., 2009; Giannakoula et al., 2010).

A aplicação de SNP às plantas tratadas com Al teve efeito atenuador sobre a peroxidação de lipídios induzida pelo Al, apenas no genótipo UFVM 200 (Fig. 9 A). A atividade da LOX aumentou com a aplicação de Al apenas no genótipo UFVM 100 e, este aumento, foi reduzido pela aplicação de SNP (Fig. 9 B). Em *Cassia tora* L. (Wang e Yang, 2005) tanto o aumento da atividade da LOX quanto a peroxidação de lipídios induzidas por Al foram atenuadas pelo tratamento com SNP.

A capacidade das plantas reduzir o estresse oxidativo após a exposição ao Al pode ser importante componente na tolerância ao Al (Jones et al., 2006; Tamás et al., 2006; Giannakoula et al., 2010; Yin et al., 2010b). Enquanto plantas tolerantes produzem menos ROIs, nas plantas sensíveis a ação tóxica do Al induz forte estresse oxidativo e intensas reações de peroxidação (Lin e Kao, 2001). Para suportar condições de estresse oxidativo, as plantas possuem vários sistemas enzimáticos e não enzimáticos de eliminação dos ROIs produzidas sob toxidez de Al (Noctor et al., 2002; Mittler et al., 2004; Miller et al., 2008). Acredita-se que a atividade destas enzimas e, ou a presença de metabólitos antioxidantes, envolvidos na tolerância ao estresse oxidativo, possa estar relacionado com o metabolismo de NO. Na tentativa de comprovar esta hipótese, estudou-se a influência da aplicação de SNP sobre os efeitos do Al e sobre a atividade de enzimas e teores de metabólitos do sistema antioxidativo.

A CAT parece ter sido a enzima antioxidativa mais importante para a maior tolerância do genótipo UFVM 200 ao Al. A SOD embora tenha sido ativada pelo tratamento com Al, o foi com intensidade similar nos dois genótipos. As enzimas APX e POX parecem ter pequena ou nenhuma influência sobre os teores de ROIs, induzidos pelo estresse com Al.

O NO pode atenuar os danos oxidativos dos ROIs por reação direta com o ânion superóxido ($\text{NO} + \cdot\text{O}_2^-$) ou com o peróxido de hidrogênio ($\text{NO}^+ + \text{H}_2\text{O}_2$), respectivamente, produzindo peroxinitrito (Neil et al., 2003), mas pode também ativar enzimas antioxidativas como CAT, SOD, APX e POX (Wang et al., 2010). Contrariando esta idéia, foi verificado que os aumentos nas atividades da SOD e CAT induzidos pelo Al observados no presente trabalho não foram eliminados pelo tratamento com SNP e, portanto, pelo menos para as concentrações de SNP utilizadas no presente experimento, a possibilidade de consumo dos ROIs, substrato

das enzimas, por reação com NO (Neil et al., 2003) ou ativação das enzimas envolvidas, conforme sugerido por Wang et al., (2010) fica comprometida.

Por outro lado, o aumento na atividade da enzima GR induzido por Al foi eliminado totalmente pelo tratamento com SNP, indicando um possível envolvimento do NO. Esta enzima catalisa a regeneração da GSH a partir da GSSG que é produzido pela transformação do DHA a AA, mediante catálise da DHAR, contribuindo para a manutenção homeostática dos ROIs no interior das células (Noctor e Foyer, 1998; Aravind e Prasad, 2005). A GSH, por sua vez, uma vez formada, serve de substrato para GPX que atua na decomposição do excesso de H₂O₂ produzido pelo estresse oxidativo induzido por Al (Drazkiewicz et al., 2003). Adicionalmente, o GSH pode atuar diretamente como antioxidante celular (Ascher, 1989), protegendo as células contra os possíveis danos causados pelo acúmulo de (ROIs), formadas durante o estabelecimento de um estresse oxidativo (Rueggsegger e Brunold, 1992; Yamaguchi et al., 1999; Nagalakshmi e Prasad, 2001). No caso do genótipo UFVM 100, as plantas tratadas com Al ao serem expostas ao doador exógeno de NO (SNP) exibiram atividade da GR menor do que do controle, indicando pequena regeneração do GSH com possíveis consequências sobre o equilíbrio de redox das células do ápice radicular. Evidentemente que esta é uma visão um tanto quanto simplista, uma vez que o teor de GSH no interior das células vegetais é dependente não apenas desta reação de regeneração, mas de um complexo balanço entre sua biossíntese e degradação, envolvendo outras enzimas como a sintetase da γ -glutamilcisteína (γ -GCS) e sintetase da glutathione (May et al., 1998; Noctor e Foyer, 1998; Noctor et al., 2002). De qualquer modo, fica implícito que a tolerância a estresses abióticos como o estabelecido sob concentrações tóxicas de Al, pode depender da capacidade da planta em manter o equilíbrio redox no interior das suas células (Noctor et al., 2002).

A peroxidase da glutathione (GPX) é, também, considerada importante componente do sistema enzimático antioxidativo, convertendo H₂O₂ em H₂O, pela utilização de glutathione reduzida (GSH) (Chaoui et al., 1997). O tratamento das plantas com Al aumentou a atividade desta enzima nos dois genótipos, principalmente no genótipo UFVM 200 (Fig. 8 B). Os resultados do presente trabalho corroboram os de Xu et al. (2011), que encontraram maior atividade da GPX em raízes de plantas de trigo tolerantes submetidas ao Al. A aplicação de SNP reduziu a atividade da GPX nos dois genótipos, principalmente no mais tolerante. A

sua adição às plantas já tratadas com Al, entretanto, resultou em aumento adicional na atividade desta enzima, nos dois genótipos. Como esta enzima faz parte do ciclo ascorbato-glutationa (Noctor e Foyer, 1998) o aumento de sua atividade deveria ter resultado em aumento proporcional na atividade da GR. Como a atividade da GR decresceu nas plantas tratadas com Al+SNP atingindo valores similares aos da GPX acredita-se que, nesta condição, atingiu-se um equilíbrio na interconversão GSH/GSSG.

O tratamento das plantas com Al resultou em redução da atividade das enzimas DHAR e a MDHAR (Fig. 10). A aplicação de SNP às plantas tratadas com Al aumentou a atividade da MDHAR nos dois genótipos e da DHAR apenas no genótipo UFVM 100. A ação combinada destas duas enzimas deve ter contribuído para a sustentação dos níveis de AA, importante metabólito antioxidante, servindo como substrato para a APX e, ou reagindo diretamente com H_2O_2 (Noctor e Foyer, 1998). Provavelmente, se estas enzimas não tivessem sido ativadas os decréscimos nos teores de AA teriam sido maiores, comprometendo o equilíbrio de redox celular (Noctor e Foyer, 1998). É interessante observar que o tratamento com Al resultou numa redução no teor total de AA+DHA, provavelmente através de uma redução na biossíntese do ascorbato, efeito este que não foi atenuado pela aplicação de SNP. Este doador de NO, também, não teve efeito benéfico sobre a relação AA/DHA. O genótipo UFVM 200, além de maior atividade destas duas enzimas, foi capaz de manter maiores teores de AA, tanto na presença de Al como da combinação Al+SNP, exibindo um mecanismo de defesa antioxidativo mais eficiente e pode ser parte da explicação de sua maior tolerância ao Al comparada ao genótipo UFVM 100.

5. CONCLUSÕES

A exposição de plantas de milho ao Al resultou em intensa absorção e acúmulo deste elemento nas raízes das plantas dos dois genótipos de milho estudados. O acúmulo de Al nos ápices radiculares resultou em aumento na produção de intermediários reativos de oxigênio (ROIs) gerando estresse oxidativo, caracterizado por aumento na peroxidação de lipídios e na atividade da LOX. Concomitante ao estabelecimento de um estresse oxidativo, observou-se aumento na atividade de várias enzimas (SOD, CAT, POX, GR e GPX) e na concentração de alguns metabólitos antioxidativos o ciclo do ascorbato, provavelmente componentes

de um mecanismo de tolerância destas plantas ao Al. A aplicação exógena de NO (SNP) mostrou que a manutenção da homeostase celular de NO é importante componente na atenuação do efeito inibitório do Al sobre o alongamento radicular. O efeito protetor da aplicação de SNP parece ser resultado de uma reação direta do NO com os ROIs ou de uma elevação da atividade de certas enzimas antioxidativas, que não apenas eliminam os ROIs produzidos, mas controlam os níveis de certos metabólitos antioxidativos fundamentais. O genótipo UFVM 200 exibiu melhores respostas bioquímicas ao estresse causado por Al, principalmente na presença de NO que, em conjunto, demonstram a razão dele possuir maior tolerância ao Al do que o UFVM 100.

6. CONCLUSÕES GERAIS

A exposição de plantas de milho ao Al resultou em intensa absorção e acúmulo de Al nas raízes das plantas dos genótipos de milho estudados. Os dois genótipos de milho submetidos a níveis tóxicos de Al sofreram reduções no alongamento radicular com maior intensidade no genótipo UFVM 100, considerado mais sensível a este elemento. Verificou-se por análise química, teste de hematoxilina e microscopia eletrônica de varredura com energia dispersiva de raios-X (EDS) que houve acúmulo de Al nos ápices radiculares. Este acúmulo de Al nos ápices radiculares causou alterações morfológicas na região meristemática nos dois genótipos, especialmente no UFVM 100. O acúmulo de Al foi acompanhado por elevação nos teores de P indicativo de uma possível precipitação de fosfato de Al no apoplasto dos ápices radiculares. O aumento dos teores de Al nos ápices radiculares induziu a produção de intermediários reativos de oxigênio (ROIs) resultando em estresse oxidativo, caracterizado por peroxidação de lipídios e aumento na atividade da LOX. Concomitante ao estabelecimento do estresse oxidativo, observou-se aumento na atividade de algumas enzimas (SOD, CAT, POX, GR e GPX) e na concentração de metabólitos antioxidativos indicativo de participação ativa destes componentes no mecanismo de tolerância ao Al. A aplicação exógena de NO (SNP) restabeleceu a homeostase celular de NO atenuando o efeito inibitório do Al sobre o alongamento radicular. O efeito protetor da aplicação de SNP parece ser resultado de reação direta do NO com os ROIs e de uma elevação da atividade de algumas enzimas antioxidativas, que não apenas eliminam os ROIs produzidos mas controlam

os níveis de certos metabólitos do ciclo do ascorbato. O genótipo UFVM 200 exibiu melhores respostas bioquímicas ao estresse causado por Al, principalmente na presença de NO que, em conjunto, demonstram ter ele maior tolerância ao Al do que o UFVM 100.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achary, V.M.M., Jena, S., Panda, K.K., Panda, B.B. Aluminium induced oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 70, 300–310, 2008.
- Ahn, S.J., Rengel, Z., Matsumoto, H. Aluminium-induced plasma membrane surface potential and H⁺-ATPase activity in near-isogenic wheat lines differing in tolerance to aluminum. **New Phytologist**. 162:71-79, 2004.
- Alscher, R.G. Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. **Physiol.Plant**, 77:457-464, 1989.
- Anderson, J.V., Davis, D.G. Abiotic stress alters transcript profiles and activity of glutathione S-transferase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in *Euphorbia esula*. **Physiologia Plantarum**, 120: 421-433, 2004.
- Anderson, M.D., Prasad, T.K., Stewart, C.R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. **Plant Physiology**, 109:1247-1257, 1995.
- Apel, K., Hirt, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, 55:373-399, 2004.
- Arasimowicz, M., Floryszak-Wieczorek, J. Nitric oxide as a bioactive signaling molecule in plant stress responses. **Plant Science**, 172:876-887, 2007.
- Aravind, P., Prasad, M.N.V. Modulation of cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* by zinc involves ascorbate-glutathione cycle and glutathione metabolism. **Plant Physiology and Biochemistry**, 43:107-116, 2005.
- Axelrod, B., Cheesbrough, T.M., Laasko, S. Lipoxygenases from soybeans. **Methods in Enzymology**, 71:441-451, 1981.
- Babourina, O., Ozturk, L., Cakmak, I., Rengel, Z. Reactive oxygen species production in wheat roots is not linked with changes in H⁺ fluxes during acidic and aluminum stresses, **Plant Signaling e Behavior**, 1 70–75, 2006.

- Barceló, J., Poschenrieder, C. Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. **Environmental and Experimental Botany**. 48:75-92, 2002.
- Beauchamp, C., Fridovich, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, 44:276-287, 1971.
- Beligni, M.V., Fath, A., Bethke, P.C., Lamattina, L., Jones, R.L. Nitric oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in barley aleurone layers. **Plant Physiology**. 129:1642-1650, 2002.
- Bethke, P.C., Badger, M.R., Jones, R.L. Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. **Plant Cell**, 16:332-341, 2004.
- Boscolo, P.R.S., Menossi, M., Jorge, R.A. Aluminum-induced oxidative stress in maize. **Phytochemistry**, 62:181-189, 2003.
- Boveris, A. Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. **Methods in Enzymology**. 105:429-435, 1984.
- Bradford, M.N. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72: 248-254, 1976.
- Brash, A.R. Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. **Journal of Biological Chemistry**, 274:23679-23682, 1999.
- Bright, J., Desikan, R., Hancock, J.T., Weir, I.S., Neill, S.J. ABA induced NO generation and stomatal closure in Arabidopsis are dependent on H₂O₂ synthesis. **Plant Journal**. 45:113-122, 2006.
- Cakmak, I., Horst, W.J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, 83:463-468, 1991.
- Carlberg, I., Mannervik, B. Glutathione reductase. **Methods in Enzymology**, 113: 484-495, 1985.
- Chance, B., Maehley, A.C. Assay of catalase and peroxidase. **Methods in Enzymology**, 2:764-775, 1955.
- Chaoui, A., Mazhoudi, S., Ghorbal, M.H., El Ferjani, E. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Science**, 127:139-147, 1997.
- Corpas, F.J., BarROIso, J.B., Carreras, A., QuiROIs, M., Leon, A.M., Romero-Puertas, M.C., Esteban, F.J., Valderrama, R., Palma, J.M., Sandalio, L.M.,

- Gomez, M., Del Rio, L.A. Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plant. **Plant Physiology**, 136:2722-273, 2004.
- Crawford, N.M. Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. **Journal of Experimental Botany**, 57:471–478, 2006
- Del Longo, O.T., González, A., Pastori, G.M., Trippi, V.S. Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant Cell Physiology**, 34:1023-1028, 1993.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R.A., Lamb, C. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. **Nature**, 394:585-588, 1998.
- Delhaize, E., Ryan, P.R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiology**. 107:315-321, 1995.
- Desikan, R., Cheung, M.K., Bright, J., Henson, D., Hancock, J.T., Neill, S.J. ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signaling in stomatal guard cells. **Journal of Experimental Botany**, 55: 205-212, 2004.
- Doncheva, S., Amenos, M., Poschenrieder, C., Barceló, J. Root cell patterning: a primary target for aluminium toxicity in maize. **Journal of Experimental Botany**, 56:1213-1220, 2005.
- Drazkiewicz, M., Skorznska-Polit, E., Krupa, Z. Response of the ascorbate-glutathione cycle to excess copper in *Arabidopsis thaliana* (L). **Plant Science**, 164:195-202, 2003.
- Durner, J., Wendehenne, D., Klessig, D.F. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP and cyclic ADP-ribose. **Plant Biology**. 95:10328-10333, 1998.
- Echart, C.L., Cavalli-Molina, S.C. Fitotoxicidade do alumínio: Efeitos, mecanismos de tolerância e seu controle genético. **Ciência Rural**, 31:531-541, 2001.
- Ezaki, B., Gardner, R.C., Ezaki, Y., Matsumoto, H. Expression of aluminium-induced genes in transgenic *Arabidopsis* plants can ameliorate Al stress and/or oxidative stress. **Plant Physiology**, 122: 657-665, 2000.
- Ferreira, D.F. SISVAR - Sistema de análises estatísticas. Versão 4.3. Lavras: UFLA. 1999.
- Foissner, I., Wendehenne, D., Langebartels, C., Durner, J. In vivo imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco. **Plant Journal**, 23:817-82, 2000.

- Foyer, C.H., Halliwell, B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. **Planta**, 133:21-25, 1976.
- Gardner, H.W. Recent investigation into the lipoxygenase pathway of plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1084:221-239, 1991.
- Gay, C., Gebicki, J.M. A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xyleneol orange hydroperoxide assay. **Analytical Biochemistry**, 284: 217-220, 2000.
- Giannakoula, A., Moustakas, M., Mylona, P., Papadakis, L., Yupsani, T. Aluminum tolerance in maize is correlated with increased levels of mineral nutrients, carbohydrates and proline, and decreased levels of lipid peroxidation and accumulation. **Journal of Plant Physiology**, 165:385-396. 2008.
- Giannakoula, A., Moustakasa, M., SyROIsb,T., Yupsanisb, 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**, 67:487-494. 2010.
- Giannopolitis, C.N., Ries, S.K. Superoxide dismutases: Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, 59:309-314, 1977.
- Gould, K.S., Klinguer, A., Pugin, A., Wendehenne, D. Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response. **Plant, Cell and Environment**, 26:1851-1862, 2003.
- Guo, T.R., Zhang, G.P., Zhou, M.X., Wu, F.B., Chen, J.X. Effects of aluminum and cadmium toxicity on growth and antioxidant enzyme activities of two barley genotypes with different Al resistance. **Plant and Soil**, 258:241-248, 2004.
- Guo, F.Q., Crawford, N.M. Arabidopsis Nitric Oxide Synthase1 Is Targeted to Mitochondria and Protects against Oxidative Damage and Dark-Induced Senescence. **Plant Cell**, 17:3436-3450, 2005.
- Gladwin, M.T., Schechter, A.N., Kim-Shapiro, D.B. The emerging biology of the nitrite anion. **Nature Chemical Biology**, 1:308-314, 2005.
- Hartwig, I., Oliveira, A.C., Carvalho, F.I.F., Bertan, I., Silva, J.A.G., Schmidt, D.A.M., Valério, I.P., Maia, L.C., Fonseca, D.A.R., Reis, C.E.S. Mecanismos associados à tolerância ao alumínio em plantas. **Semina: Ciências Agrárias**, 28:219-228, 2007.

- Havir, E.A., Mchale, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, 84:450-455, 1987.
- He, J.M., Bai, X.L., Wang, R.B., Cao, B., She, X.P. The involvement of nitric oxide in ultraviolet-B-inhibited pollen germination and tube growth of Paulownia. **Physiologia Plantarum**, 131:273-282, 2007.
- Heath, R.L., Packer, L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 125:189-198, 1968.
- Hong, J.K., Yun, B.W., Kang, J.G., Raja, M.U., Kwon, E., Sorhagen, K., Chu, C., Wang, Y., Loake, G.J. Nitric oxide function and signaling in plant disease resistance. **Journal of Experimental Botany**. 59:147-154, 2008.
- Igamberdiev, A.U., Hill, R.D. Nitrate, NO and haemoglobin in plant adaptation to hypoxia: an alternative to classic fermentation pathways. **Journal of Experimental Botany**, 55:2473-2482, 2004.
- Illés, P., Schlicht, M., Pavlovkin, J., Lichtscheidl, I., Baluska, F., Ovecka, M. Aluminium toxicity in plants: internalization of aluminium into cells of the transition zone in Arabidopsis root apices related to changes in plasma membrane potential, endosomal behaviour, and nitric oxide production. **Journal of Experimental Botany**. 15: 4201-4213, 2006.
- Jones, D.L., Blancaflor, E.B., Kochian, L.V., Gilroy, S. Spatial coordination of aluminium uptake, production of reactive oxygen species, callose production and wall rigidification in maize roots. **Plant, Cell and Environment**, 29: 1309–1318, 2006.
- Justino, G.C., Cambraia, J., Oliva, M.A., Oliveira, J.A. Absorção e redução de nitrato em duas cultivares de arroz na presença de alumínio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 41: 1285-1290, 2006.
- Kampfenkel, K., Montagu, M.V., Inzé, D. Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. **Analytical Biochemistry**, 225:165-167, 1995.
- Kar, M., Mishra, D. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, 57:315-319, 1976.
- Kobayashi, Y., Yamamoto, Y., Matsumoto, H. Studies on the mechanism of aluminum tolerance in pea (*Pisum sativum* L.) using aluminum-tolerant cultivar 'Alaska' and aluminum-sensitive cultivar 'Hyogo', **Soil Science and Plant Nutrition**. 50:197–204, 2004.

- Kochian, L. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 46:237-260, 1995.
- Kochian, L.V., Piñero, M.A., Hoekenga, O.A. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. **Plant and Soil**, 274:175-195, 2005.
- Kopyra, M., Gwózd, E.A. Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. **Plant Physiology Biochemistry**, 41:1011-1017, 2003.
- Koshihara, T. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedling and leaves of maize (*Zea mays*). **Plant Cell Physiology**, 34:713-721, 1993.
- Kuo, M.C. Kao, C.H. Aluminum effects in lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. **Biologia Plantarum**, 46:19-152, 2003.
- Lin, C.C., Kao, C.H. Regulation of ammonium-induced proline accumulation in detached rice leaves. **Plant Growth Regulation**. 35, 69–74, 2001.
- Liu, Y., Wang, X., Zeng, G., Qu, D., Gu, J., Zhou, M., Chai, L. Cadmium-induced oxidative stress and response of the ascorbate-glutathione cycle in *Beckmannia nivea* (L.) Gaud. **Chemosphere**, 69:99-107, 2007.
- Liu, Q.; Yang, J. L.; He, L. S.; Li, Y. Y.; Zheng, S. J. Effect of aluminum on cell wall, plasma membrane, antioxidants and root elongation in triticale. **Biologia Plantarum**, 52: 87-92, 2008.
- Lopes, A.S. 1984. Solos sob “Cerrado”: características, propriedades e manejo. 2ª Ed. POTAFOS, Piracicaba, 162 p.
- Ma, J.F., Furukawa, J. Recent progress in the research of external Al detoxification in higher plants: a minireview. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 97:46-51, 2003.
- Mackerness, S.A.H., John, C.F., Jordan, B., Thomas, B. **Early** signaling components in ultraviolet-B responses: distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide. **FEBS Letters**, 489:237-242, 2001.
- Matsumoto, H., Motoda, H. Aluminum toxicity recovery processes in root apices. Possible association with oxidative stress. **Plant Science**, 185-186:1-8, 2011.
- May, M.J., Vernoux, T., Leaver, C., Montagu, M.V., Inze, D. Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. **Journal of Experimental Botany**, 49:649-667, 1998.

- Meriga, B., Reddy, B.K., Rao, K.R., Reddy, L.A., Kishor, P.B.K. Aluminum-induced production of oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA damage in seedlings of rice (*Oryza sativa*). **Journal of Plant Physiology**, 161: 63-68, 2004.
- Miller, G, Shulaev, V., Mittler, R. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. **Physiologia Plantarum**, 133, 481–489, 2008.
- Misra, H.P., Fridovich, I. The generation of superoxide radical during the autoxidation of ferredoxins. **The Journal of Biological Chemistry**, 246:6886-6890, 1971.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Breusegem, F.V. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends Plant Sci.** 9:490-498, 2004.
- Mittler, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Science**, 7:405-409, 2002.
- Mohammadi, M., Karr, A.L. Superoxide anion generation in effective and ineffective soybean root nodules. **Journal Plant Physiology**, 158:1023-1029, 2001.
- Miyamoto, S. Hidroperóxidos de lipídios como fonte biológica de oxigênio singleto: estudos com marcação isotópica, espectrometria de massa e luminescência. USP, São Paulo, SP, 344p. (Tese de Doutorado) 2005.
- Murgia, I., Delledonne, M., Soave, C. Nitric oxide mediates iron-induced ferritin accumulation in Arabidopsis. **Plant Journal**, 30:521-528, 2002.
- Nagalakshmi, N., Prasad, M.N.V. Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. **Plant Science**, 160:291-299, 2001.
- Nakano, Y., Asada, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidases in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, 22:867-880, 1981.
- Neill, S.J., Desikan, R., Hancock, J.T. Nitric oxide signaling in plants. **New Phytologist**, 159:11-35, 2003.
- Neill, S., Bright, J., Desikan, R., Hancock, J., Harrison, J., Wilson, I. Nitric oxide evolution and perception. **Journal of Experimental Botany**, 59:25-35, 2008.
- Noctor, G., Foyer, C.H. Ascorbate and Glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 49:249-279, 1998.
- Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H., Foyer, C.H. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in control of glutathione homeostasis and signaling. **Journal of Experimental Botany**, 53:1283-1304, 2002.

- Panda, S.K., Matsumoto, H. Molecular physiology of aluminum toxicity and tolerance in plants. **Botanical Review**, 73:326-347, 2007.
- Peixoto, P.H.P.; Cambraia, J.; Sant'Anna, R.; Mosquim, P.R.; Moreira, M.A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 11:137-143, 1999.
- Pereira, J.M., Cambraia, J., Fonseca Junior, É.M., Ribeiro, C. Efeito do alumínio sobre a absorção, o acúmulo e o fracionamento do fósforo em sorgo. **Bragantia**, 67:961-967, 2008.
- Piñero, M.A., Shaff, J.E., Manslank, H.S., Carvalho, V.M., Kochian, L.V. Aluminum resistance in maize cannot be solely explained by root organic acid exudation. A comparative physiology study. **Plant Physiology**, 137: 231-41, 2005.
- Pintro, J., Barloy, J., Fallavier, P. Aluminium toxicity in corn plants cultivated in a low ionic strength nutrient solution discrimination of two corn cultivars. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**, 7:121-128, 1995.
- Resende, M.L.V., Salgado, S.M.L., Chaves, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, 28:123-130, 2003.
- Ribeiro, D.M., Desikan, R., Bright, J., Confraria, A., Harrison, J., Hancock, J.T., BarROIs, R.S., Neill, S.J., Wilson, I.D. Differential requirement for NO during ABA-induced stomatal closure in turgid and wilted leaves. **Plant, Cell and Environment**, 32: 46-57, 2009.
- ROIsiello, R.O.P., Netto, J.J. Toxidez de alumínio em plantas: novos enfoques para um velho problema. In: Fernandes M.S. (ed.). *Nutrição Mineral de Plantas*. Viçosa, MG, p. 375-418, 2006.
- Rueggsegger, A., Brunold, C. Effect of cadmium on γ -glutamylcysteine synthesis in maize seedlings. **Plant Physiology**, 99:428-433, 1992.
- Sang, J., Jiang, M., Lin, F., Xu, S., Zhang, A., Tan, M. Nitric oxide reduces hydrogen peroxide accumulation involved in water stress-induced subcellular anti-oxidant defense in maize plants. **Journal of Integrative Plant Biology**, 50:231-243, 2008.

- Singh, H.P., Batish, D.R., Kaur, G., Arora, K., Kohli, R.K. Nitric oxide (as sodium nitroprusside) supplementation ameliorates Cd toxicity in hydroponically grown wheat roots. **Environmental and Experimental Botany**, 63:158-167, 2008.
- Scandalios, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, 103:7-12, 1993.
- Shamsi, I.H., Wei, K., Zhang, G.P., Jilani, G.H., Hassan, M.J. Interactive effects of cadmium and aluminum on growth and antioxidative enzymes in soybean. **Biologia Plantarum**, 52:165-169, 2008.
- 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**, 26, 2027-2038, 2007.
- Shi, Q., Dinf, F., Wang, X., Wei, M. Exogenous nitric oxide protect cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, 45:542-550, 2007.
- Tabaldi, L.A., Cargnelutti, D., Goncalves, J.F., Pereira, L.B., Castro, G.Y., Maldaner, J., Rauber, R., ROIssato, L.V., Bisognin, D.A., Shetinger, M.R.C., Nicoloso, F.T. Oxidative stress is an early symptom triggered by aluminum in Al sensitive potato plantlets. **Chemosphere**, 76:1402-1409, 2009.
- Tamás, L., Hutt ova, J., Mistral, I., Simonovicova, M. Aluminium-induced drought and oxidative stress in barley roots. **Journal of Plant Physiology**, 162:781-784, 2006.
- Tian, Q.Y., Sun, D.H., Zhao, M.G., Zhang, W.H. Inhibition of nitric oxide synthase (NOS) underlies aluminum-induced inhibition of root elongation in Hibiscus moscheutos L. **New Phytologist**, 174:322–331, 2007.
- Tian, X., Lei, Y. Nitric oxide treatment alleviates drought stress in wheat seedlings. **Biologia Plantarum**, 50:775-778, 2006.
- Tuteja, N., Chandra, M., Tuteja, R., Misra M.K. Nitric oxide as a unique bioactive signaling messenger in physiology and pathophysiology. **Journal of Biomedicine Biotechnology**, 4: 227-237, 2004.
- Wang, H.H., Huang, J.J., Bi, Y.R. Nitrate reductase-dependent nitric oxide production is involved in aluminum tolerance in red kidney bean roots. **Plant Science**, 179:281–288, 2010.

- Wang, Y.S., Yang, Z.M. Nitric oxide reduces aluminum toxicity by preventing oxidative stress in the roots of *Cassia tora* L. **Plant Cell Physiology**, 46:1915-1923, 2005.
- Wendehenne, D., Pugin, A., Klessig, D.F., Durner, J. Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. **Trends in Plant Science**, 6:1360-1385, 2001.
- Wilson, I.D., Neill, S.J., John T. Hancock, J.T. Nitric oxide synthesis and signalling in plants. **Plant, Cell and Environment**, 31:622–631, 2008.
- Xu, F.J., Jin, C.W., Liu, W.J., Zhang, Y.S., Lin, X.Y. Pretreatment with H₂O₂ alleviates aluminum-induced oxidative stress in wheat seedlings. **Journal of Integrative Plant Biology**, 53:44–53, 2011.
- Xue, Y.J., Tao, L., Yang, Z.M. Aluminum-induced cell wall peroxidase activity and lignin synthesis are differentially regulated by jasmonate and nitric oxide. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 56:9676-9684, 2008.
- Yao, D., Vlessidis, A.G., Evmiridis, N.P. Determination of nitric oxide in biological samples. **Microchimica Acta**, 147:1-20, 2004.
- Yamaguchi, Y., Yamamoto, Y., Ikegawa, H., Matsumoto, H. Protective effect of glutathione on the cytotoxicity caused by a combination of aluminum and iron in suspension-cultured tobacco cells. **Physiologia Plantarum**, 105:417-422, 1999.
- Yamamoto, Y., Kobayashi, Y., Devi, S.R., Rikiishi, S., Matsumoto, H. Oxidative stress triggered by aluminum in plant roots. **Plant Soil**, 255:239–24, 2003.
- Yamamoto, Y., Kobayashi, Y., Devi, S. R., Rikiishi, S., Matsumoto, H. Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells. **Plant Physiology**, 128: 63–72, 2002.
- Yamamoto, Y., Kobayashi, Y., Matsumoto, H. Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots, **Plant Physiology**, 125:199–208, 2001.
- Yin, L.N., Mano, J., Wang, S.W., Tsuji, W., Tanaka, K. The involvement of lipid peroxide-derived aldehydes in aluminum toxicity of tobacco roots. **Plant Physiology**, 152:1406–1417, 2010a.
- Yin, L., Wang, S., Elsadig Eltayeb, E.A., Imtiaz Uddin, I., Yamamoto, Y., Tsuji, W., Takeuchi, Y., Tanaka, K. Overexpression of dehydroascorbate reductase, but not monodehydroascorbate reductase, confers tolerance to aluminum stress in transgenic tobacco. **Planta**, 231, 609–621, 2010b.

- Zhang, H., Lia, Y.H., Hua, L.Y., Wangb, S.H., Zhang, F.Q., Hu, K.D. Effects of exogenous nitric oxide donor on antioxidant metabolism in wheat leaves under aluminum stress. **Russian Journal of Plant Physiology**, 55:469-474, 2008.
- Zhang, Y.Y., Wang, L.L., Liu, Y.L., Zhang, Q., Wei, Q.P., Zhang, W.H. Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and Na^+/H^+ antiport in the tonoplast. **Planta**, 224: 545-555, 2006.
- Zhao, L., He, J., Wang, X., Zhang, L. Nitric oxide protects against polyethylene glycol-induced oxidative damage in two ecotypes of reed suspension cultures. **Journal of Plant Physiology**, 165:182-191, 2008.
- Zhao, M.G., Tian, Q.Y., Zhang, W.H. Nitric oxide synthase dependent nitric oxide production is associated with salt tolerance in Arabidopsis. **Plant Physiology**, 144:206-217, 2007b.
- Zheng, S.J., Yang, J.L., He, Y.F., Yu, X.H., Zhang, L., You, J.F., Shen, R.F., Matsumoto, H. Immobilization of Aluminum with Phosphorus in Roots Is Associated with High Aluminum Resistance in Buckwheat. **Plant Physiology**, 138:297–303, 2005.