

MARCIO ROCHA

**Respiração e atividade de enzimas do metabolismo
antioxidativo em raízes de plântulas de milho (*Zea mays* L.)
submetidas ao estresse por alumínio**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2006**

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

T

R672r
2006

Rocha, Marcio, 1979-

Respiração e atividade de enzimas do metabolismo antioxidativo em raízes de plântulas de milho (*Zea mays* L.) submetidas ao estresse por alumínio / Marcio Rocha. – Viçosa : UFV, 2006. xii, 55f. : il. ; 29cm.

Orientador: Marco Aurélio Pedron e Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 46-55.

1. Milho - Efeito do alumínio. 2. Stress oxidativo. 3. Enzimas. 4. Milho - Metabolismo.I. Universidade Federal de Viçosa. II.Título.

CDD 22.ed. 633.15891

MARCIO ROCHA

**Respiração e atividade de enzimas envolvidas do metabolismo
antioxidativo em raízes de plântulas de milho (*Zea mays* L.)
submetidas ao estresse por alumínio**

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

Aprovada em: 03 de fevereiro de 2006

Prof.^a Andréa Miyasaka de Almeida

Prof. Carlos Moacir Bonato

Prof. Fábio Murilo da Matta
(Conselheiro)

Prof. José Cambraia
(Conselheiro)

Prof. Marco Aurélio Pedron e Silva
(Orientador)

Aos meus pais,

Alicio Manoel Rocha e

Dimas Possamai Rocha,

pela confiança que sempre me depositaram.

Aos meus irmãos,

Isabel Rocha,

Luiz Carlos Rocha (in memoriam) e

Rosa Maria Rocha (in memoriam).

Aos meus sobrinhos,

Anderson José Milioli e

Letícia Rocha Alcantra.

Dedico e ofereço!

BIOGRAFIA

Marcio Rocha, filho de Alicio Manoel Rocha e de Dimas Possamai Rocha, natural de Foz do Iguaçu – PR, nasceu em 29 de outubro de 1979.

Em 13 de fevereiro de 1998 obteve o título de Técnico em Alimentos, pelo Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná, Medianeira - PR.

Em 07 de maio de 2004 recebeu o título de Engenheiro Agrônomo, pela Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR.

Em março do mesmo ano iniciou o curso de Mestrado em Fisiologia Vegetal, na Universidade Federal de Viçosa.

AGRADECIMENTOS

Aos professores José Carlos Pinto (*in memoriam*) e Rolf Puschmann, pela ajuda insistente em um início conturbado.

Ao Professor Marco Aurélio Pedron e Silva, pela orientação, dedicação e amizade oferecida durante a realização deste trabalho. Um exemplo profissional de conhecimento, honestidade e ética.

À Giselle Arruda Rodrigues, pelo conforto e ajuda nos momentos de dificuldade.

Aos Professores José Cambraia e Fabio Murilo da Matta pela ajuda, concessão de drogas e empréstimo de equipamentos, que foram fundamentais para a realização desse trabalho.

Aos meus colegas de trabalho, Abelardo, Daniel e Ricardo, que compartilharam o árduo caminho percorrido durante esse período.

Aos meus colegas de república, Paulo César, Rafael, Welison e Carlos Eduardo, pela ajuda e companheirismo em todos os momentos.

A todos os colegas e funcionários que, de alguma forma, contribuíram com paciência para a conclusão desse trabalho.

Aos meus primeiros orientadores, que despertaram em mim a vontade de seguir a carreira universitária, Carlos Moacir Bonato e Marcos Rafael Nanni.

A Deus, pela presença e proteção durante minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Biologia Vegetal, ao Programa de Mestrado em Fisiologia Vegetal e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela oportunidade e ajuda na realização deste trabalho.

CONTEÚDO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	8
3.1. Material vegetal e tratamentos	8
3.2. Avaliação dos parâmetros de crescimento	9
3.3. Avaliação da respiração em ápices radiculares.....	9
3.4. Avaliação de danos celulares	10
3.5. Determinação de ascorbato (Asc) e desidroascorbato (DHA)	11
3.6. Avaliações enzimáticas	12
3.6.1. Obtenção dos extratos enzimáticos	12
3.6.2. Peroxidases (POX, EC 1.11.1.7).....	12
3.6.3. Catalases (CAT, EC 1.11.1.6).....	13
3.6.4. Dismutases do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1).....	13
3.6.5. Peroxidases do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11).....	14
3.6.6. Redutase da glutatona (GR, EC 1.6.4.2).....	14
3.7. Isolamento mitocondrial.....	15
3.7.1. Dosagem de proteína.....	16
3.7.2. Avaliação da atividade respiratória em mitocôndrias isoladas	16

3.7.3. Avaliação do potencial elétrico de membrana	16
3.8. Delineamento experimental	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
4.1. Efeito do alumínio sobre o crescimento.....	18
4.2. Efeito do alumínio na respiração de ápices radiculares	23
4.3 Efeito do alumínio sobre danos celulares.....	26
4.4 Efeito do alumínio sobre a atividade enzimática	28
4.5 Efeito do alumínio sobre a atividade respiratória de mitocôndrias isoladas.....	35
4.6 Efeito do alumínio sobre a proteína desacopladora de plantas	39
5. CONCLUSÕES	45
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADP – Adenosina-5'-trifosfato
ADP/O – Razão ADP/oxigênio
AOX – Oxidase alternativa
APX - Peroxidases do ascorbato
Asc – Ascorbato
Asc total – Ascorbato + Desidroascorbato
ATP – Adenosina - 5' - trifosfato
BSA – Albumina de soro bovino
CAT – Catalases
CR – controle respiratório
DHA – Desidroascorbato
EDTA – Ácido Etileno-diamino-tetra-acético
GDP - Guanosina - 5' - difosfato
GR – Redutase da glutationa
GTP - Guanosina - 5' - trifosfato
H⁺-ATPase - Próton ATPase
HEPES – Ácido 4-(2-hidroetil)-1-piperazinoetano-sulfônico
Lino – Ácido linoléico
MDA - Aldeído malônico
MDA-TBA - Complexo aldeído malônico - ácido tiobarbitúrico
MF - Matéria fresca
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida
NBT - Azul de p-nitro tetrazólio

POX – Peroxidases

PUMP – Proteína desacopladora de mitocôndrias de plantas

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SHAM – Ácido salicil-hidroxiâmico

SOD - Dismutases do superóxido

TBA - Ácido tiobarbitúrico

TCA - Ácido tricloroacético

TRIS – Tris (hidroximetil) aminometano

UCP – Proteína desacopladora

RESUMO

ROCHA, Marcio, M.S. Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2006.
Respiração e atividade de enzimas do metabolismo antioxidativo em raízes de plântulas de milho (*Zea mays* L.) submetidas ao estresse por alumínio. Orientador: Marco Aurélio Pedron e Silva. Conselheiros: Fábio Murilo da Matta e José Cambraia.

Os efeitos do alumínio sobre o crescimento, a respiração e as atividades de algumas enzimas envolvidas na eliminação de espécies reativas de oxigênio foram avaliadas em plântulas de duas cultivares de milho, uma sensível (BR 106) e outra tolerante ao alumínio (BR 206), cultivadas em solução nutritiva, pH 4,0. O alumínio, nas concentrações de 50 e 100 μM , reduziu o crescimento da raiz principal das duas cultivares, especialmente da cultivar sensível. O alumínio reduziu o extravasamento de eletrólitos, apenas nas raízes da cultivar tolerante e aumentou a peroxidação de lipídios, apenas na cultivar sensível. O tratamento com alumínio resultou em aumentos significativos nas atividades da dismutase do superóxido (SOD) e da peroxidase do ascorbato (APX), apenas na cultivar tolerante. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas nas atividades da catalase (CAT), das peroxidases (POX) e da redutase da glutathione (GR), em ambas as cultivares. Os teores de ascorbato também não apresentaram variação significativa, mas foi observado aumento no estado redox (razão ascorbato/desidroascorbato), porém apenas na cultivar tolerante. No tratamento controle, as taxas respiratórias de mitocôndrias isoladas da cultivar tolerante se apresentaram mais elevadas, tanto no estado 3 como no

estado 4. Estas taxas foram reduzidas pelo alumínio na cultivar sensível, e aumentadas na cultivar tolerante. As razões ADP/O foram reduzidas pelo tratamento com alumínio, nas duas cultivares, na mesma proporção. A rota do citocromo c não foi alterada pelo alumínio, na cultivar tolerante, mas foi reduzida na cultivar sensível. Na ausência de alumínio, a cultivar sensível apresentou atividade da oxidase alternativa (AOX) mais elevada, que foi reduzida pela presença de alumínio. Ao contrário, o consumo de oxigênio pela rota alternativa foi aumentado, pelo alumínio, na cultivar tolerante. Nas duas cultivares, o alumínio promoveu acréscimos superiores a 120% no consumo residual de oxigênio. A atividade da proteína desacopladora de plantas (PUMP) foi diminuída pelo alumínio, na cultivar sensível, e aumentada, na tolerante. Estes resultados sugerem que a cultivar tolerante possua um mecanismo enzimático mais eficiente de remoção ou neutralização de espécies reativas de oxigênio que a cultivar sensível. Além disso, o parcial desacoplamento mitocondrial observado, resultante do aumento das atividades da oxidase alternativa e da proteína desacopladora, deve contribuir para a maior tolerância da cultivar BR 206 ao estresse por alumínio.

ABSTRACT

ROCHA, Marcio, M.S. Universidade Federal de Viçosa, February 2006.
Respiration and activity of antioxidant enzymes in roots of corn (*Zea mays* L.) seedlings submitted to aluminum. Adviser: Marco Aurélio Pedron e Silva. Committee members: Fábio Murilo da Matta and José Cambraia.

The effects of aluminum on growth, respiratory activities and on some enzymes related to reactive oxygen species (ROS) elimination were examined in roots of two corn seedlings cultivated in nutrient solution, by comparing a susceptible (BR 106) and a tolerant cultivar (BR 206). Growth of the main root decreased in both cultivars, mainly in the susceptible one, at aluminum concentration of 50 and 100 μM . Only in the tolerant cultivar aluminum induced a decrease in the leak of electrolytes. On the contrary, the susceptible cultivar showed significant increase in lipid peroxidation. Aluminum promoted higher activities of superoxide dismutase (SOD) and ascorbate peroxidase (APX), only in the tolerant cultivar. No difference was observed in the activities of catalase (CAT), peroxidases (POX) and glutathione reductase (GR) in both cultivars. Ascorbate content was not altered, but the ascorbate redox state (ratio ascorbate/dehydroascorbate) increased in the tolerant cultivar. In absence of aluminum, respiratory oxygen consumption was higher in the tolerant cultivar, both in states 3 and 4. These respiratory activities were decreased by aluminum in the susceptible cultivar, but were increased in the tolerant one. ADP/O ratios were decreased by aluminum, in both cultivars at a similar extent. The

cytochrome c pathway was not altered by aluminum in the tolerant cultivar, but decreased in the susceptible one. Without aluminum, the susceptible cultivar showed a higher alternative oxidase (AOX) activity than the tolerant one. Aluminum promoted a decrease in AOX activity in the susceptible cultivar, the opposite response being observed in the tolerant one. In both cultivars aluminum induced an increase above 120% in the residual oxygen consumption. Activity of the plant uncoupling mitochondrial protein (PUMP) was decreased by aluminum in the susceptible cultivar and enhanced in the tolerant one. These results suggest that the tolerant cultivar possesses a more efficient enzymatic system for ROS removal than the sensitive one. Furthermore, the partial mitochondrial uncoupling, resulting from higher AOX and PUMP activities should have contributed to the higher aluminum stress tolerance showed by cultivar BR 206.

1. INTRODUÇÃO

Aproximadamente 20% do território brasileiro caracterizam-se por apresentar solos com forte acidez, deficiência extrema de fósforo, cálcio, magnésio e níveis elevados de alumínio e manganês (EMBRAPA, 1978). A baixa produtividade e a baixa resposta desses solos à fertilização têm sido, em grande parte, atribuídas ao alumínio. A espécie fitotóxica do alumínio (Al^{+3}), predominante em solos ácidos, mostra-se extremamente danosa para as plantas, resultando em pobre desenvolvimento radicular e trazendo, como consequência, maior susceptibilidade à seca, ataque de patógenos e deficiência nutricional. (KINRAIDE & PARKER, 1990)

Um dos indicativos do estresse por alumínio em plantas, e também o mais prontamente visível é a redução do crescimento do sistema radicular (KINRAIDE, 1991). As causas da redução no alongamento radicular podem estar relacionadas a interações desse cátion com sítios específicos localizados nas paredes celulares (HORST, 1995) e no DNA nuclear, reduzindo a divisão celular (LIU & JIANG, 1991; CLARKSON, 1995), embora não estejam totalmente esclarecidas (MATSUMOTO, 2000).

O alumínio, também provoca a diminuição da permeabilidade da membrana plasmática (AHN et al., 2001) por meio da interação com fosfolipídios de membrana (JONES & KOCHIAN, 1997) e peroxidação de lipídios (PEIXOTO et al., 2001; YAMOTO et al., 2001). Recentemente, também foi observado aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (YAMAMOTO et al., 2002), como consequência da presença de alumínio. Em

experimentos feitos em células de tabaco e de raízes de ervilha, YAMAMOTO et al. (2002) observaram que o alumínio causa disfunção mitocondrial e produção de ROS, como os ânions superóxidos. Esses autores também verificaram que o alumínio acumulado nas células de tabaco causou redução da atividade mitocondrial, inibindo a respiração e reduzindo a produção de ATP, acarretando perda da capacidade de crescimento das células, fato atribuído ao aumento na produção de ROS.

Outros registros indicam que a exposição das plantas aos vários tipos de estresses ambientais pode intensificar a produção de ROS, resultando em aumento de oxidações danosas dos componentes celulares (FOYER et al., 1997; SCANDALIOS, 2002). As espécies mais comuns de ROS são formadas pela redução parcial do oxigênio molecular, destacando-se o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila. Elas podem iniciar reações em cadeia com várias moléculas orgânicas, levando à peroxidação lipídica, à inativação de enzimas e à degradação de ácidos nucleicos, dentre outras possíveis conseqüências (LAMB & DIXON, 1997). A formação de ROS pode ocorrer em algumas vias metabólicas normais do metabolismo, especialmente aquelas relacionadas com a fotossíntese e a respiração. Nesses casos, as ROS são consideradas como subprodutos inevitáveis do metabolismo aeróbico (MITTLER, 2002). Evidências mais recentes indicam uma possível participação de ROS na sinalização celular, atuando como mensageiros secundários, para a ativação de respostas a estresses e em mecanismos de defesa (KNIGHT & KNIGHT, 2001; MITTLER, 2002; MITTLER et al., 2004). Uma vez que as ROS são tóxicas, mas também participam de eventos de sinalização celular, as células vegetais devem possuir pelo menos dois mecanismos para regular a concentração intracelular de ROS: uma modulação fina dos baixos níveis de ROS e outra, que permita a destoxificação do seu excesso (MITTLER, 2002).

O aumento da tolerância aos estresses pode estar fortemente relacionado ao aumento da atividade de sistemas antioxidantes das plantas, com elevação no nível da expressão de proteínas como catalase (PRASAD, 1996) e transferase da glutathiona S (POLIDOROS & SCANDALIOS, 1999). Além disso, podem ser observados aumentos nos teores de algumas substâncias consideradas como anti-oxidantes, como o ácido ascórbico e a glutathiona (NOCTOR & FOYER, 1998).

A dismutase do superóxido (SOD) é a primeira enzima de defesa contra danos provocados pelas espécies reativas de oxigênio nas células, uma vez que ela transforma o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em O_2 e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), utilizando $2H^+$ (ALSCHER et al., 2002). O H_2O_2 produzido pode ser eliminado pela atuação da catalase, que o transforma em O_2 e H_2O , ou pela atuação da peroxidase do ascorbato, que, ao oxidar o ascorbato, transforma-o em mono-desidroascorbato. Caso os níveis de H_2O_2 não sejam reduzidos por essas duas enzimas, ele também pode reagir com outros ânions superóxido, pela reação de Haber-Weiss, resultando em O_2 , íons OH^- e radical hidroxila (OH^{\bullet}), aumentando o estresse oxidativo. Este último radical é mais uma forma de ROS, que pode contribuir, juntamente com as outras, para os diversos tipos de danos oxidativos celulares (RESENDE et al., 2003).

A respiração mitocondrial de plantas envolve a participação de duas principais rotas de transporte de elétrons. A primeira corresponde à rota da citocromo oxidase, sensível ao cianeto e acoplada a três sítios de conservação de energia. A segunda, a rota alternativa insensível ao cianeto, que envolve a AOX, ramifica-se da rota da citocromo oxidase, no “pool” de ubiquinonas, não havendo conservação de energia após esse ponto (DOUCE & NEUBURGER, 1989), uma vez que a AOX é capaz de oxidar diretamente o ubiquinol e reduzir o oxigênio a água (MOORE & SIEDOW, 1991).

Nas plantas, o excesso de energia mitocondrial, acumulada sob a forma do gradiente eletroquímico de prótons, pode ser minimizado pela atuação da oxidase alternativa (AOX) (MOORE & SIEDOW, 1991; VANLERBERGHE & MCINTOSH, 1997), do canal de potássio de mitocôndria de planta sensível ao ATP (PmitoKATP) (PASTORE et al., 1999), da proteína relacionada ao estresse pelo frio (CSP-310) (VOINIKOV et al., 1998), além da proteína desacopladora de mitocôndrias de planta (PUMP) (VERCESI et al., 1995). A presença de grande número de caminhos não fosforilativos relacionados com o transporte de elétrons em mitocôndrias de plantas permite supor que estes caminhos estariam relacionados com o processo de adaptação das mesmas aos estresses ambientais (GRABELNYCH et al., 2004).

A AOX foi o primeiro sistema dissipador de energia encontrado em plantas (MEEUSE, 1975). Atualmente, tem sido demonstrado estar presente não somente em plantas superiores, mas também em fungos, leveduras e

protozoários (VANLERBERGHE & McINTOSH, 1997; MEDENTSEV et al., 1999). Depende da atuação de uma proteína com massa molecular de aproximadamente 34 kDa, caracterizada como sendo uma enzima dímera, cujas subunidades são ligadas por ponte dissulfídica (VANLERBERGHE & McINTOSH, 1997). Além de ser insensível ao cianeto, à antimicina A, ao monóxido de carbono, à azida e ao mixotiazol (MOLLER & RASMUSSEN, 1998), a AOX é sensível ao ácido salicílico-hidroxiácido (SHAM) e ao ácido benzohidroxiácido (BHAM) (SCHONBAUM et al., 1971). Em alguns tecidos, pode ser estimulada por α -ceto ácidos, como o piruvato (MILLAR et al., 1993). A AOX é caracterizada como participante de um caminho não fosforilativo em plantas (CONSIDINE et al., 2001) e pode ter papel importante em plantas termogênicas da família Araceae, nas quais o aumento da temperatura promove a volatilização de aminas, cuja função está relacionada com a atração de insetos polinizadores (MEEUSE, 1975; DAY et al., 1980; ELTHON et al., 1989). Aumentos de temperatura, também são observados em frutos climatéricos em estágio de amadurecimento e isso, algumas vezes, tem sido atribuído à atividade da AOX (KUMAR & SINHA, 1992; CRUZ-HERNANDEZ & GOMEZ-LIMA, 1995).

Em plantas não termogênicas, a AOX possui papel fundamental no que se refere ao balanço energético da célula (SLUSE & JARMUSZKIEWICZ, 2000). Além disso, vários estudos independentes propõem ter a AOX capacidade de prevenir a produção de ROS, proveniente de várias formas de estresses biótico e abiótico (WAGNER, 1995; MILLAR & DAY, 1996; MAXWELL et al., 1999). Por exemplo, PASTORE et al. (2001) mostraram que, em trigo “durum”, a AOX pode atuar como sistema dissipador de energia, podendo controlar a geração de ROS. Experimentos realizados com suspensões celulares de tabaco transgênico, com super-expressão da AOX, mostraram diminuição na quantidade de ROS após a adição de antimicina A (MAXWELL et al., 1999). Outros experimentos têm mostrado que o estresse pelo frio é responsável pela ativação da AOX em batatas e outras plantas (VANLERBERGHE & McINTOSH, 1997; PINHEIRO, 2000; COSTA, 2003).

Outra forma de dissipação do excesso de energia mitocondrial envolve a participação da proteína desacopladora de mitocôndrias de plantas (PUMP). Essa proteína age de modo semelhante à ação das proteínas desacopladoras

presentes em mitocôndrias de tecidos animais (UCP), dissipando o gradiente de prótons da membrana mitocondrial, na presença de ácidos graxos livres, sendo fisiologicamente inibida por ATP, GDP e GTP (VERCESI et al., 1995; JEZEK et al., 1998). A PUMP foi caracterizada como uma proteína de massa molecular em torno de 32 KDa (SILVA, 1991; VERCESI et al., 1995), cuja função inicial supunha-se ser apenas termogênica. Posteriormente, foi verificado o seu envolvimento no amadurecimento e senescência de frutos de tomate (ALMEIDA et al., 1999). A PUMP tem sido identificada por imunodeteção, em vários órgãos e tecidos de mais ou menos 30 espécies de plantas, incluindo monocotiledôneas e dicotiledôneas; C3, C4 e plantas CAM; frutos climatéricos e não climatéricos; bem como em tecidos termogênicos e não termogênicos (JEZEK et al., 1998; JEZEK & URBÁNKOVÁ, 2000).

Estudos mais recentes indicam a participação da PUMP na defesa celular contra o estresse oxidativo mitocondrial (PASTORE et al., 2000; TRONO et al., 2004). Por exemplo, a produção de H₂O₂, em mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata, decresce após a adição de ácido linoléico e aumenta com a inibição da atividade da PUMP (KOWALTOWSKI et al., 1998). Além disso, resultados obtidos por PASTORE et al. (2000) sugerem que a PUMP seja ativada pela produção de ROS, em mitocôndrias de trigo “durum”. De modo semelhante, SKULACHEV (1998) observou que, à medida que a produção de ROS aumenta, o potencial de membrana mitocondrial tende a decrescer, indicando que a produção de ROS poderia estar sendo controlada pela PUMP.

Aumentos da expressão da PUMP, também foram observados na resposta a baixas temperaturas (LALOI et al., 1997; MAIA et al., 1998; NANTES et al., 1999), estresse que é normalmente associado com aumento na formação de ROS celular. Nesse mesmo sentido, plantas de tabaco com superexpressão da PUMP exibem um incremento na tolerância ao estresse oxidativo (BRANDALISE et al., 2003). Além disso, TRONO et al. (2004) mostraram que a condução de prótons através da membrana interna da mitocôndria, dependente da PUMP, é notavelmente ativada pelos estresses osmótico e salino. Também em mitocôndrias de tubérculos de batata, o desacoplamento dependente da PUMP, desencadeado por ácidos graxos livres, requer a presença de ROS para total atividade da proteína (CONSIDINE et al., 2003).

Diante dos numerosos registros de relação entre as atividades da AOX e da PUMP com estresses oxidativos e levando-se em conta a inexistência de trabalhos que relacionam a atividade dessas proteínas com estresse promovido por alumínio, procurou-se investigar o efeito do alumínio sobre as atividades respiratórias, envolvendo a AOX, a PUMP e sobre algumas enzimas do metabolismo antioxidativo, em plântulas de milho submetidas ao estresse por alumínio.

2. OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do estresse causado pelo excesso de alumínio (Al^{+3}) sobre a respiração, as atividades da oxidase alternativa (AOX) e da proteína desacopladora de mitocôndrias de plantas (PUMP), além das atividades de algumas enzimas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo, em raízes de plântulas de milho, comparando-se cultivares com tolerância diferencial àquele cátion.

Para isso, foram avaliadas as capacidades relativas da via do citocromo c, assim como a atividade da oxidase alternativa e a atuação da proteína desacopladora de mitocôndrias de plantas, em mitocôndrias isoladas das raízes destas plântulas.

Também foram avaliadas possíveis alterações nos conteúdos de ascorbato, e na peroxidação de lipídeos, relacionados com o estabelecimento de estresse oxidativo. Nesse mesmo sentido, ainda foram avaliadas as atividades das enzimas dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), redutase da glutathione (GR) e peroxidases (POX), em extratos radiculares.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal e tratamentos

Sementes de duas cultivares de milho (*Zea mays* L.), BR 106 e BR 206 adquiridas em lojas de produtos agrícolas de Viçosa (MG), foram tratadas com hipoclorito de sódio a 0,2%, durante 1 hora. Após serem lavadas e deixadas em embebição, em água destilada, por mais 1 hora, as sementes foram colocadas para germinar em cartuchos de papel toalha (pH neutro), imersos em solução nutritiva de CLARK (1975), com um quinto da força iônica original e pH ajustado para 4,0. Após três dias, as plântulas foram transferidas para frascos plásticos contendo 1,7 L da solução nutritiva de CLARK (1975) e aplicados, durante três dias, os seguintes tratamentos: controle (sem alumínio) e as concentrações de 50, 100, 150 e 200 μM de AlCl_3 . Essas soluções receberam arejamento contínuo, e o pH foi mantido em 4,0, com ajustes diários pela adição de HCl 0,1 M ou NaOH 0,1 M.

Durante os três dias de tratamento, as plântulas foram mantidas em câmara de crescimento com temperatura controlada (25°C), radiação fotossinteticamente ativa de $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas.

3.2. Avaliação dos parâmetros de crescimento

Plântulas de três dias, após medição do comprimento da raiz principal e da parte aérea, foram transferidas para as soluções nutritivas contendo as diferentes concentrações de alumínio. Após três dias de tratamento, o comprimento radicular e o comprimento da parte aérea foram novamente determinados. O crescimento durante os três dias de tratamento foi obtido, descontando-se da avaliação final o comprimento médio inicial.

Também foram determinados os pesos da matéria fresca e da matéria seca final das raízes e da parte aérea das plântulas de cada tratamento. Para a determinação da matéria seca, as partes cortadas foram mantidas em estufa com ventilação, a 65°C, até peso constante.

3.3. Avaliação da respiração em ápices radiculares

Após três dias de exposição ao Al, foram retirados 3 mm da porção terminal de 10 ápices radiculares da raiz principal de cada plântula, para a determinação de suas atividades respiratórias.

Os ápices foram lavados em água desmineralizada e secos em papel toalha. Aproximadamente 10 mg de ápices radiculares, foram colocados imediatamente em uma câmara específica, contendo 4,0 mL de solução nutritiva de CLARK (1975), com um quinto da força iônica original e pH ajustado para 4,0, na ausência de FeEDTA. O consumo de O₂ foi determinado polarograficamente, a 25 °C, utilizando-se de um eletrodo específico para O₂, do tipo Clark, inserido em uma câmara de vidro. Durante o acompanhamento do consumo de oxigênio, foram adicionados os inibidores: cianeto de potássio (KCN 6,0 mM), seguido de ácido salicil-hidroxâmico (SHAM 20,0 mM).

3.4. Avaliação de danos celulares

Danos celulares foram avaliados por meio da peroxidação de lipídeos, via acúmulo de aldeído malônico (MDA), conforme descrito por CAKMAK & HORST (1991). Para isso 0,2 g de tecidos radiculares, depois de fragmentados em nitrogênio líquido, foram macerados em almofariz em 4,0 mL da solução de extração contendo 1% (p/v) de ácido tricloroacético (TCA). O homogeneizado resultante foi centrifugado a 12.000 g, por 15 min. Todas as etapas necessárias ao processo de extração foram conduzidas a 4°C.

Em seguida, uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi coletada e adicionada a 1,5 mL da solução 0,5% (p/v) de ácido tiobarbitúrico (preparado em 20% (p/v) de TCA). As amostras e o branco foram incubados a 95 °C, por 2 horas, sob agitação. Após o aquecimento, a reação foi paralisada, em banho de gelo, seguindo-se de centrifugação a 9.000 g, por 10 min. A absorvância do sobrenadante foi lida a 532 nm, descontando-se a absorvância inespecífica a 600 nm. A concentração de MDA foi calculada, utilizando-se o coeficiente de absorvância de 155 mM⁻¹ cm⁻¹ (HEATH & PACKER, 1968).

Danos celulares também foram avaliados por meio do extravasamento de eletrólitos, conforme descrito por LIMA et al. (2002), com modificações. Para isso, 0,3 g de raízes previamente lavadas foram cortadas em pedaços de 3 cm, que foram colocados em 20 mL de água desmineralizada e deixados durante 6 horas a 25°C. O extravasamento de eletrólitos foi estimado, utilizando-se de um condutivímetro (Biosystems LTDA, São José dos Pinhais, PR, Brasil) e o resultado expresso em percentagem, em relação ao extravasamento total obtido após incubação a 90°C por 2 horas.

3.5. Determinação de ascorbato (Asc) e desidroascorbato (DHA)

Os teores de ascorbato (Asc) e desidroascorbato (DHA) foram determinados como descrito por ARAKAWA et al. (1981). Para isso 0,4 g de raízes, depois de fragmentados em almofariz, em nitrogênio líquido, foram macerados em 2,0 mL da solução de extração contendo 5% (p/v) de ácido tricloroacético (TCA). O homogenato resultante foi centrifugado a 15.000 g, por 15 min. Todas as etapas necessárias ao processo de extração foram conduzidas a 4°C.

Uma alíquota de 50 µL do sobrenadante foi coletada e diluída em 200 µL de TCA 5%. Ascorbato total (Asc + DHA) foi determinado após redução do DHA pelo ditioneitol (DTT). Para isso, aos 250 µL do extrato diluído foram adicionados 125 µL de DTT/etanol a 0,06% (p/v) e 125 µL de Na₂HPO₄ (0,2 M) + NaOH (1,2 M). A mistura foi incubada a 25°C, por 10 min. Subseqüentemente, acrescentaram-se à mistura os seguintes reagentes dissolvidos em etanol: 125 µL de N-etilmaleimida 0,24% (p/v), 125 µL de etanol absoluto, 125 µL de H₃PO₄ 4% (v/v), 250 µL de batofenantrolina 0,5% (p/v) e 150 µL de FeCl₃ 0,03% (p/v), perfazendo um volume final de 1,25 mL. Após agitação, vigorosa, a mistura foi incubada a 30°C, por 90 min. Após o aquecimento, a reação foi paralisada em banho de gelo e a absorvância da mistura lida a 534 nm.

Asc foi determinado como descrito acima, sendo apenas o DTT omitido e substituído por etanol absoluto. DHA foi calculado pela diferença entre o Asc total e o Asc. A concentração de Asc foi determinada por meio de uma curva de calibração, utilizando-se de concentrações conhecidas de ascorbato.

3.6. Avaliações enzimáticas

3.6.1. Obtenção dos extratos enzimáticos

Para a determinação da atividade das enzimas peroxidases (POX), catalases (CAT) e dismutases do superóxido (SOD), foram utilizados extratos enzimáticos obtidos por meio da homogeneização de 0,2 g de raízes, fragmentadas em almofariz, em nitrogênio líquido. Em seguida, foram adicionados 2 mL de solução de extração, constituída de EDTA 0,1 mM em tampão de fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, contendo 20 mg de PVPP (polivinil-poli-pirrolidona), procedendo-se a nova homogeneização. O homogeneizado foi então centrifugado por 15 minutos, a 12.000 *g* e o sobrenadante utilizado nas avaliações enzimáticas e nas dosagens de proteína. Todas as etapas necessárias ao processo foram executadas a 4°C.

Os extratos brutos para a determinação das atividades das peroxidases do ascorbato (APX) e das redutases da glutathiona (GR) foram obtidos de maneiras um pouco diferentes, que se encontram descritas nos itens correspondentes.

3.6.2. Peroxidases (POX, EC 1.11.1.7)

A atividade das POX foi determinada pela adição 100 μ L do extrato enzimático bruto, diluído para 1:25 (v/v) a 0,9 mL de uma mistura de reação, contendo tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, acrescida de pirogalol 20 mM e H₂O₂ 20 mM (KAR & MISHRA, 1976). O aumento na absorvância da solução, lida a 420 nm, foi registrado no intervalo de 20 a 40 segundos após o início da reação. A atividade das POX foi determinada pela formação de purpurogalina naquele intervalo, utilizando-se, para os cálculos, do coeficiente de extinção molar 2,47 mM⁻¹cm⁻¹ (CHANCE & MAEHLEY, 1955).

3.6.3. Catalases (CAT, EC 1.11.1.6)

A atividade das CAT foi determinada pela adição de 100 μL do extrato enzimático bruto a 0,9 mL de meio de reação, constituído de H_2O_2 12,5 mM em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, a 30°C (HAVIR & McHALE, 1987). A atividade da enzima foi determinada pelo decréscimo na absorvância a 240 nm, no intervalo de 20 a 40 segundos após o início da reação. A atividade da CAT foi calculada, utilizando-se, o coeficiente de extinção molar de $36 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (ANDERSON et al., 1995).

3.6.4. Dismutases do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1)

À mistura de reação, constituída de metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 μM , EDTA 100 nM e riboflavina 2 μM , em tampão de fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8 (Del LONGO et al., 1993), adicionaram-se 50 μL do extrato enzimático diluído (1:5; v/v). A reação foi conduzida a 25°C, numa câmara de reação, sob a iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W, mantida no interior de uma caixa recoberta com papel alumínio. A reação foi iniciada pela ligação da lâmpada fluorescente e, após 5 min, interrompida pelo desligamento da mesma (GIANNOPOLITIS & RIES, 1977). A produção de formazana azul, resultante da foto-redução do NBT, foi medida pela determinação do incremento na absorvância a 560 nm, que foi subtraída de um “branco”, no qual a mistura de reação foi mantida no escuro. Uma unidade da SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a foto-redução do NBT (BEAUCHAMP & FRIDOVICH, 1971).

3.6.5. Peroxidases do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11)

Neste caso, 0,2 g de raízes frescas, depois de fragmentadas em nitrogênio líquido, foram macerados num almofariz contendo 20 mg de PVPP, juntamente com 2 mL de solução de extração, constituída de ascorbato 1 mM e EDTA 0,1 mM em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 (NAKANO & ASADA, 1981). O homogeneizado foi, então, centrifugado por 15 min, a 12.000 g. O sobrenadante foi coletado e utilizado nos ensaios enzimáticos e dosagem de proteína. Estas etapas foram executadas a 4°C.

A atividade das APX foi determinada de acordo com o método de NAKANO & ASADA (1981), e modificado por KOSHIBA (1993). Aos 0,9 mL da mistura de reação constituída de ascorbato 0,8 mM e H₂O₂ 1,0 mM em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, adicionaram-se 100 µL do extrato enzimático bruto. O decréscimo na absorbância das amostras a 290 nm, no intervalo de 20 a 40 segundos, após o início da reação, foi utilizado para determinar a atividade da enzima, utilizando-se do coeficiente de extinção molar de 2,8 mM⁻¹cm⁻¹ (NAKANO & ASADA, 1981).

3.6.6. Redutase da glutatona (GR, EC 1.6.4.2)

O extrato enzimático bruto, para a determinação da atividade das GRs, foi obtido pela homogeneização de 0,2 g de raízes, depois de fragmentadas em nitrogênio líquido, em 2,0 mL de solução de extração, constituída de EDTA 1 mM, DTT 2 mM, em tampão de fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5, num almofariz de porcelana contendo 20 mg de PVPP. O homogeneizado foi centrifugado por 15 min, a 15.000 g. O sobrenadante foi coletado e utilizado nos ensaios enzimáticos e dosagem de proteína. Estas etapas foram executadas a 4°C.

A atividade das GR foi determinada pela adição de 100 µL do extrato bruto a 0,9 mL da mistura de reação constituída de glutatona oxidada 1 mM, NADPH 0,1 mM (preparado em tampão Tris-HCL 10 mM, pH 7,0), EDTA 1mM em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0 (CARLBERG & MANNERVIK,

1985). O decréscimo na absorvância das amostras a 340 nm, no intervalo de 20 a 40 segundos após o início da reação, foi utilizado para calcular a atividade da enzima utilizando-se do coeficiente de extinção molar para o NADPH de $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (FOYER & HALLIWELL, 1976)

3.7. Isolamento mitocondrial

O isolamento de mitocôndrias foi efetuado pelo método descrito por DAY & HANSON (1977), com modificações. Para isso, 50 a 100 g de raízes foram fragmentados, em 500 mL de meio de extração (4°C), constituído de sacarose 250 mM, Hepes (pH 7,2) 10 mM, EGTA 1 mM, cisteína 4 mM e albumina de soro bovino 0,1 % (p/v). Em seguida, foram rapidamente homogeneizados, utilizando-se de um Politron (Kinematica AG Littau), no nível 5, durante 3 segundos. O homogeneizado, após filtração através de 4 camadas de gaze e ajuste do pH para 7,2, foi submetido à centrifugação de 1.000 g, por 10 min. O sobrenadante foi novamente centrifugado a 15.000 g, por 15 min, e o sedimento resultante re-suspenso em 3 mL do meio de suspensão, constituído de sacarose 250 mM e tampão Hepes 10 mM (pH 7,2). Esta suspensão constituiu a fração de mitocôndrias não purificadas.

A purificação de mitocôndrias foi feita em gradiente descontínuo de Percoll[®], como descrito por JACKSON et al. (1979). As concentrações finais de Percoll[®] foram de 13,5; 21 e 45 % (v/v), cada uma contendo sacarose 250 mM, HEPES 10 mM e BSA 0,1%. O pH final de todas as soluções foi ajustado para 7,2. O extrato bruto de mitocôndrias foi depositado cuidadosamente no topo do tubo contendo as soluções de Percoll[®] e submetido à centrifugação a 7.500 g, por 30 min. A banda formada logo acima do Percoll[®] 45% foi coletada, lavada com o meio de suspensão e submetida à centrifugação a 15.000 g, por 10 min, sendo este procedimento repetido três vezes. O sedimento obtido na última centrifugação foi re-suspenso com duas ou três gotas do meio de suspensão anteriormente mencionado e constituiu a fração de mitocôndrias purificadas. Todos os procedimentos foram realizados entre 0 e 4°C.

3.7.1. Dosagem de proteína

As concentrações de proteína dos extratos brutos e das suspensões mitocôndrias foram determinadas por meio do método de BRADFORD (1976), utilizando-se de uma curva padrão de BSA.

3.7.2. Avaliação da atividade respiratória em mitocôndrias isoladas

As atividades respiratórias de mitocôndrias isoladas foram avaliadas, pela adição de 0,5 mg de proteína mitocondrial a 3 mL de meio de reação, a 25°C, contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, Hepes 10 mM (pH 7,2), BSA 0,1%, KH_2PO_4 2 mM, MgCl_2 2 mM, succinato 5 mM, rotenona 5 μM e ATP 100 μM , utilizando um eletrodo específico de oxigênio (tipo Clark). Duas adições de ADP (100 μM), foram feitas a fim de se poder avaliar as variações na velocidade de respiração nos estados 3 e 4, para cálculo do controle respiratório. Após este procedimento, as mitocôndrias eram desacopladas, pela adição de CCCP 2,0 μM (carbonil cianida m-cloro fenil-hidrazona).

A inibição da via de oxidação do citocromo c foi mensurada, por meio da adição de 5 μg de antimicina A/mg de proteína. Por outro lado, a inibição da via da oxidase alternativa foi mensurada, por meio da adição de SHAM (ácido salicilhidroxâmico) 5,0 mM, após a adição de antimicina A.

3.7.3. Avaliação do potencial elétrico de membrana

O potencial elétrico de membrana () foi determinado a partir da distribuição do cátion lipofílico tetrafenilfosfônio (TPP^+), entre o meio de reação e a matriz mitocondrial, utilizando-se de um eletrodo específico, montado de acordo com KAMO et al. (1979).

Os testes foram realizados por meio da adição de 0,5 mg de proteína mitocondrial em 1 mL de meio de reação, a 25°C, contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM, Hepes 10 mM (pH 7,2), BSA 0,1%, KH_2PO_4 2 mM, MgCl_2 2 mM,

succinato 5 mM, rotenona 5 μ M. Foram realizadas duas adições de ADP (100 μ M cada), seguidas de duas aplicações de ácido linoléico (7 μ M cada) e uma aplicação de BSA (0,1% p/v).

3.8. Delineamento experimental

Nos experimentos iniciais, envolvendo análise de crescimento e respiração nos ápices radiculares, os tratamentos foram dispostos num esquema fatorial com dez tratamentos, envolvendo duas cultivares de milho e cinco níveis de alumínio (zero, 50, 100, 150 e 200 μ M), com quatro repetições, no delineamento em blocos inteiramente casualizados. Cada unidade experimental constituíu-se de um vaso com 1,7 L de solução, contendo dez plantas.

Para as análises enzimáticas, os tratamentos foram dispostos num esquema fatorial, com quatro tratamentos, envolvendo duas cultivares de milho e dois níveis de alumínio (zero e 100 μ M), com quatro repetições, no delineamento em blocos inteiramente casualizados. Também nesse caso, cada unidade experimental constituíu-se de um vaso com 1,7 L de solução, contendo dez plantas.

Para os isolamentos mitocondriais, os tratamentos foram dispostos num esquema fatorial, com quatro tratamentos, envolvendo duas cultivares de milho e dois níveis de alumínio (zero e 100 μ M), com três repetições, no delineamento em blocos inteiramente casualizados. Nesse caso, cada unidade experimental constituíu-se de um vaso com 15 L e 300 plantas.

Os resultados foram discriminados pelo teste F ou pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa de computação SAEG (versão 5.0), da Central de Processamentos de Dados da Universidade Federal de Viçosa.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeito do alumínio sobre o crescimento

Inicialmente, com base na literatura disponível e em testes preliminares (não mostrados), foram selecionadas duas cultivares contrastantes quanto à sua tolerância ao alumínio. A cultivar BR 106 foi considerada, previamente, como sendo sensível (CAMBRAIA & CAMBRAIA, 1995), enquanto a cultivar BR 206, tolerante ao alumínio (EMBRAPA, 2005).

Nesta primeira etapa, as cultivares escolhidas foram comparadas avaliando-se o efeito de diferentes concentrações de alumínio sobre parâmetros de crescimento.

A cultivar sensível, no período de três dias de tratamento, apresentou maior crescimento da parte aérea do que a cultivar tolerante, mesmo na presença de alumínio (Quadro 1). O aumento da concentração de alumínio na solução nutritiva não resultou em efeito significativo sobre o crescimento da parte aérea, em nenhuma das cultivares estudadas. Ressalta-se que o coeficiente de variação deste conjunto de dados foi muito elevado (dados não mostrados), o que justifica a ausência de diferenças significativas referentes ao aumento da concentração de alumínio, apesar dos valores decrescentes observados no Quadro 1.

As duas cultivares, em geral, apresentaram pesos finais das matérias fresca e seca da parte aérea semelhantes, não diferindo significativamente uma da outra (Quadro 2). Considerando a matéria seca, o aumento na

concentração de alumínio, também não resultou em efeito significativo. Entretanto, as concentrações mais elevadas de alumínio utilizadas resultaram em reduções significativas e semelhantes na produção de matéria fresca da parte aérea das duas cultivares.

Quadro 1 – Aumento no comprimento da parte aérea de plântulas de duas cultivares de milho, submetidas a concentrações crescentes de alumínio, após três dias de tratamento.

<i>Concentração de Alumínio</i>	<i>Aumento no Comprimento (cm)</i>	
	BR – 106 (sensível)	BR – 206 (tolerante)
Controle	4,21 ± 0,36 Aa	2,37 ± 0,34 Ab
50 µM	3,34 ± 0,29 Aa	2,29 ± 0,69 Ab
100 µM	3,79 ± 0,59 Aa	2,35 ± 0,11 Ab
150 µM	2,97 ± 0,52 Aa	1,59 ± 0,40 Ab
200 µM	2,96 ± 0,07 Aa	1,54 ± 0,45 Ab

Médias (± erro padrão) seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade (n = 4).

Quadro 2 – Peso da matéria fresca e seca da parte aérea de plântulas de duas cultivares de milho, submetidas a concentrações crescentes de alumínio, após três dias de tratamento.

<i>Concentração de Alumínio</i>	<i>Matéria Fresca (mg)</i>		<i>Matéria Seca (mg)</i>	
	BR – 106 (sensível)	BR – 206 (tolerante)	BR – 106 (sensível)	BR – 206 (tolerante)
Controle	1609,00 ± 27,78 Aa	1457,23 ± 78,96 ABa	125,75 ± 4,23 Aa	109,00 ± 6,52 Ab
50 µM	1421,50 ± 74,28 ABa	1538,18 ± 83,53 Aa	115,5 ± 5,12 Aa	120,50 ± 7,24 Aa
100 µM	1508,35 ± 85,23 ABa	1481,75 ± 40,11 ABa	120,5 ± 6,24 Aa	119,5 ± 4,91 Aa
150 µM	1404,85 ± 126,02 Ba	1376,18 ± 27,77 ABa	116,25 ± 6,80 Aa	114,25 ± 2,36 Aa
200 µM	1329,80 ± 46,59 Ba	1285,90 ± 52,87 Ba	114,5 ± 6,01 Aa	110,00 ± 2,94 Aa

Médias (± erro padrão) seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade (n = 4).

A ausência de alterações, no comprimento e no peso da matéria fresca e seca, da parte aérea de plântulas tratadas com alumínio é bastante freqüente

na literatura (FAGERIA & ZIMMERMANN, 1979; RHUE & GROGAN, 1977; MASCARENHAS et al., 1984), especialmente nas condições utilizadas neste experimento, no qual o período de tratamento foi relativamente curto (três dias) e as concentrações de alumínio não foram muito elevadas (no máximo 200 M). O alumínio acumula-se principalmente no sistema radicular, sendo pequena a quantidade translocada para a parte aérea (KOLLMEIR et al., 2000; YAMAMOTO et al., 2001). Isso faz com que os efeitos do alumínio se pronunciem de forma mais intensa no sistema radicular do que na parte aérea, que é afetada mais tarde e de forma indireta.

Sem alumínio, a cultivar sensível apresentou maior desenvolvimento radicular, expresso tanto como matéria fresca como matéria seca, embora o alumínio não tenha resultado em respostas significativamente diferentes entre as cultivares (Quadro 3). Em maiores concentrações, o alumínio provocou redução, progressivamente maior, da produção de matéria fresca das raízes das duas cultivares. Na concentração mais elevada (200 M), observou-se redução de 30%, na produção de matéria fresca na cultivar sensível e de apenas 16%, na cultivar tolerante. Considerando-se a matéria seca, o alumínio não promoveu redução significativa nas raízes da cultivar tolerante, embora tenha reduzido progressivamente a produção na cultivar sensível, chegando a reduções de 20% e 15%, nas concentrações de 150 e 200 M de alumínio, respectivamente.

Quadro 3 – Peso final das matérias fresca e seca do sistema radicular de plântulas de duas cultivares de milho, submetidas a concentrações crescentes de alumínio, após três dias de tratamento.

<i>Concentração de Alumínio</i>	<i>Matéria Fresca (mg)</i>		<i>Matéria Seca (mg)</i>	
	BR – 106 <i>(sensível)</i>	BR – 206 <i>(tolerante)</i>	BR – 106 <i>(sensível)</i>	BR – 206 <i>(tolerante)</i>
Controle	1015,48 ± 42,45 Aa	730,58 ± 41,29 ABb	53,25 ± 0,75 Aa	44,50 ± 1,19 Ab
50 µM	904,55 ± 107,03 ABa	817,50 ± 68,00 Aa	47,75 ± 3,77 ABCa	46,75 ± 2,36 Aa
100 µM	860,15 ± 49,96 Ba	696,40 ± 26,84 ABb	49,75 ± 4,25 ABa	43,75 ± 2,25 Aa
150 µM	694,95 ± 52,36 Ca	592,28 ± 62,96 Ba	42,50 ± 3,97 Ca	44,73 ± 2,33 Aa
200 µM	715,53 ± 18,17 Ca	616,35 ± 41,15 Ba	45,50 ± 2,06 BCa	43,25 ± 2,43 Aa

Médias (± erro padrão) seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade (n = 4).

Nas duas cultivares, o alumínio reduziu progressivamente o crescimento da raiz principal (Quadro 4). Nas concentrações mais elevadas as reduções foram mais intensas, porém semelhantes nas duas cultivares. Nas concentrações de 50 μM e 100 μM de alumínio, a cultivar tolerante apresentou reduções diferencialmente menores no crescimento do que a sensível. A 100 μM de alumínio, houve reduções de 42% e 33% no aumento do comprimento da raiz principal da cultivar sensível e da tolerante, respectivamente. A 50 μM de alumínio, a redução foi de 31% na cultivar sensível, e de apenas 14%, na cultivar tolerante.

Quadro 4 – Aumento no comprimento da raiz principal em plântulas de duas cultivares de milho, submetidos a concentrações crescentes de alumínio, após três dias de tratamento.

<i>Concentração de Alumínio</i>	<i>Aumento no Comprimento (cm)</i>	
	BR – 106 <i>(sensível)</i>	BR – 206 <i>(tolerante)</i>
Controle	10,90 \pm 0,32 Aa	10,91 \pm 0,14 Aa
50 μM	7,55 \pm 0,28 Bb	9,34 \pm 0,49 Ba
100 μM	6,33 \pm 0,30 Cb	7,33 \pm 0,28 Ca
150 μM	4,27 \pm 0,19 Da	4,95 \pm 0,31 Da
200 μM	3,43 \pm 0,07 Ea	3,91 \pm 0,24 Ea

Médias (\pm erro padrão) seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade (n = 4).

De forma contrária ao observado nas concentrações mais elevadas desse experimento (150 e 200 μM), BONATO (2001) observou reduções contrastantes no crescimento radicular ao submeter duas cultivares de milho, uma tolerante (AG 5011) e outra sensível (AG122), a uma concentração de 185 μM de alumínio. A cultivar tolerante, nesse caso, apresentou menor inibição do crescimento radicular após 3 dias de tratamento. Por outro lado MASCARENHAS et al. (1984) observaram que, em concentrações elevadas de alumínio (> 185 μM), não havia diferenças significativas nos comprimentos das raízes de cultivares de soja (sensíveis e tolerantes). Segundo eles, esse resultado indica que o efeito do alumínio está sendo extremamente forte

ultrapassando a capacidade de tolerância da cultivar tolerante, eliminando as diferenças entre as cultivares. Da mesma forma, CAMBRAIA et al. (1991) observaram que as diferenças no aumento do comprimento radicular entre as cultivares de sorgo sensível e tolerante ao alumínio apresentavam tendência a desaparecer com o aumento do nível de alumínio. A capacidade de plantas tolerarem altas concentrações de alumínio em seus tecidos, no solo ou em solução nutritiva, varia entre espécies e entre variedades da mesma espécie (PETER et al., 1971; LONG et al., 1973; MOORE et al., 1976; RHUE & GROGAN, 1977; MASCARENHAS et al., 1984; CAMBRAIA et al., 1991).

A seleção de plantas tolerantes ao alumínio, em solução nutritiva, pode ser feita por avaliações do peso seco das duas partes da planta (FAGERIA & ZIMMERMANN, 1979), do peso fresco do sistema radicular (LAFEVER et al., 1977) e do número de raízes por planta (REID et al., 1971), dentre outros. Entretanto, o crescimento radicular, especialmente da raiz principal, parece ser um dos melhores indicativos, quando comparado a outros parâmetros de crescimento, para indicar tolerância diferencial ao alumínio, (REID et al., 1971; MOORE et al., 1976; RHUE & GROGAN, 1977; MASCARENHAS et al., 1984; CAMBRAIA et al., 1991). Desta forma, considerando-se o crescimento da raiz principal, destaca-se que as duas cultivares avaliadas neste experimento responderam de modo semelhante ao alumínio nas concentrações mais elevadas e que a maior inibição ocorreu na concentração de 50 μM . Entretanto, evitou-se utilizar esta concentração mais baixa de alumínio, que poderia não ser suficiente para resultar em alterações nos parâmetros a serem investigados, relacionados com possível estresse oxidativo promovido pelo alumínio. Assim, optou-se por utilizar a concentração de 100 μM nos experimentos envolvendo avaliações de atividade enzimática e naqueles em que foram utilizadas mitocôndrias isoladas.

4.2. Efeito do alumínio na respiração de ápices radiculares

A respiração total dos ápices radiculares sofreu redução progressiva com o aumento da concentração de alumínio na solução nutritiva, nas duas cultivares, mas não foram observadas diferenças significativas entre elas (Quadro 5). Na maior concentração utilizada (200 μM), a redução na respiração total chegou a 70%, na cultivar sensível.

Quadro 5 – Consumo de oxigênio total, de ápices radiculares de plântulas de duas cultivares de milho, submetidas a concentrações crescentes de alumínio, após três dias de tratamento.

<i>Concentração de Alumínio</i>	<i>Consumo de oxigênio total (nmol. min⁻¹. mg⁻¹ MF)</i>	
	BR – 106 (sensível)	BR – 206 (tolerante)
Controle	1,56 ± 0,18 Aa	1,59 ± 0,25 Aa
50 μM	1,21 ± 0,07 Aa	1,08 ± 0,17 Ba
100 μM	0,78 ± 0,10 Ba	0,89 ± 0,15 BCa
150 μM	0,75 ± 0,03 Ba	0,69 ± 0,10 Ca
200 μM	0,47 ± 0,04 Ba	0,56 ± 0,16 Ca

Médias (\pm erro padrão) seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade (n = 4).

Ao contrário dos resultados obtidos neste experimento, COLLIER et al. (1983) observaram que plântulas de trigo submetidas ao estresse por alumínio apresentavam respiração mais elevada. Eles atribuíram esse aumento a um provável mecanismo de manutenção do suprimento de esqueletos carbônicos e energia, o que manteria o crescimento radicular. Apenas em concentrações elevadas (>400 μM), aqueles autores encontraram um substancial declínio da respiração. Por outro lado, DE LIMA & COPELAND (1994), de modo similar ao observado nesse experimento, verificaram que o alumínio, mesmo em baixas concentrações (<75 μM), causou redução na respiração em plântulas de trigo,

tanto na cultivar tolerante quanto na cultivar sensível. Segundo TAYLOR (1989), sob condições de estresse, as plantas têm a capacidade de redirecionar a energia do crescimento para a manutenção de outros processos fisiológicos, mantendo, dessa forma, o metabolismo e acomodando o custo energético causado pelo estresse.

Acompanhando o que ocorreu com a respiração total, o consumo de oxigênio pela rota do citocromo c também sofreu redução com o aumento da concentração do alumínio, nas duas cultivares (Quadro 6). De modo semelhante, não foram observadas diferenças significativas entre as duas cultivares utilizadas. A maior redução foi observada na cultivar sensível, quando submetida à concentração de 200 μM de alumínio, chegando a valores 75% inferiores aos obtidos sem alumínio.

Quadro 6 – Consumo de oxigênio pela rota do citocromo c, em ápices radiculares de plântulas de duas cultivares de milho, submetidas a concentrações crescentes de alumínio, após três dias de tratamento.

<i>Concentração de Alumínio</i>	<i>Consumo de oxigênio (nmol. min⁻¹.mg⁻¹ MF)</i>	
	BR – 106 (sensível)	BR – 206 (tolerante)
Controle	0,92 ± 0,19 Aa	0,92 ± 0,22 Aa
50 μM	0,66 ± 0,03 ABa	0,50 ± 0,08 Ba
100 μM	0,41 ± 0,04 BCa	0,46 ± 0,10 Ba
150 μM	0,33 ± 0,03 Ca	0,31 ± 0,06 Ba
200 μM	0,23 ± 0,03 Ca	0,31 ± 0,11 Ba

Médias (\pm erro padrão) seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade (n = 4).

A respiração dos ápices radiculares pela rota alternativa também foi reduzida com o aumento da concentração do alumínio, nas duas cultivares, embora não se tenham encontrado diferenças significativas entre elas (Quadro 7). A maior redução na atividade da rota alternativa foi observada no nível mais elevado de alumínio (200 μM), com queda de 85% em relação ao controle, considerando-se a cultivar sensível.

Quadro 7 – Consumo de oxigênio pela rota alternativa, em ápices radiculares de plântulas de duas cultivares de milho, submetidas a concentrações crescentes de alumínio, após três dias de tratamento.

<i>Concentração de Alumínio</i>	<i>Consumo de oxigênio (nmol. min⁻¹.mg⁻¹ MF)</i>	
	BR – 106 (sensível)	BR – 206 (tolerante)
Controle	0,33 ± 0,02 Aa	0,39 ± 0,13 Aa
50 µM	0,29 ± 0,05 Aa	0,24 ± 0,04 Ba
100 µM	0,15 ± 0,01 Ba	0,19 ± 0,05 ABa
150 µM	0,09 ± 0,01 Ba	0,15 ± 0,04 Ba
200 µM	0,05 ± 0,02 Ba	0,09 ± 0,04 Ba

Médias (± erro padrão) seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade (n = 4).

DE LIMA & COPELAND (1994) também encontraram efeito inibitório sobre a rota alternativa, a partir de 48 horas de exposição de plantas de trigo, a baixas concentrações de alumínio (< 75 µM). Da mesma forma, BONATO (2001) encontrou diminuição no consumo de oxigênio pela rota alternativa, em plântulas de milho da cultivar sensível, a partir de 12 horas de exposição ao alumínio, na concentração de 185 µM. Este autor ainda sugere que o alumínio, devido à diminuição da respiração pela rota do citocromo, bem como pela rota alternativa, poderia estar atuando em uma etapa que fosse comum para ambas as vias, como na oxidação ou produção de substratos respiratórios, por exemplo.

Considerando-se o consumo residual de oxigênio, observado quando as rotas do citocromo c e a via alternativa estavam inibidas, não se conseguiu detectar diferenças significativas entre as cultivares estudadas (Quadro 8). Da mesma forma, o aumento das concentrações de alumínio não resultou em mudanças significativas, embora os valores correspondentes ao tratamento com 200 µM de alumínio tenham sido cerca de 40% menores que os da condição controle. De forma análoga ao ocorrido nos resultados do crescimento da parte aérea (Quadro 1), o coeficiente de variação deste conjunto de dados foi muito elevado (dado não mostrado), resultando na

ausência de diferenças significativas referentes ao aumento da concentração de alumínio, apesar dos valores decrescentes observados no Quadro 8.

Quadro 8 – Consumo de oxigênio residual, em ápices radiculares de plântulas de duas cultivares de milho, submetidas a concentrações crescentes de alumínio, após três dias de tratamento.

<i>Concentração de Alumínio</i>	<i>Consumo residual de oxigênio (nmol. min⁻¹.mg⁻¹ MF)</i>	
	BR – 106 (sensível)	BR – 206 (tolerante)
Controle	0,31 ± 0,11 Aa	0,29 ± 0,13 Aa
50 µM	0,27 ± 0,07 Aa	0,34 ± 0,08 Aa
100 µM	0,23 ± 0,08 Aa	0,24 ± 0,06 Aa
150 µM	0,34 ± 0,02 Aa	0,24 ± 0,06 Aa
200 µM	0,19 ± 0,02 Aa	0,16 ± 0,05 Aa

Médias (± erro padrão) seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade (n = 4).

Constata-se que, embora o alumínio tenha reduzido a respiração dos ápices radiculares, não houve resposta diferencial de uma cultivar em relação à outra. Desta forma, utilizou-se apenas os resultados obtidos na avaliação do alongamento radicular, para a escolha da concentração (100 µM) que resultou em resposta mais contrastante entre as duas cultivares, para prosseguir com o trabalho experimental.

4.3 Efeito do alumínio sobre danos celulares

Na ausência de alumínio, as duas cultivares apresentaram percentuais semelhantes de extravasamento de eletrólitos (Figura 1). Na presença de alumínio observou-se pequena redução (cerca de 24%) no extravasamento, apenas na cultivar tolerante. Esta redução pode ser resultante da capacidade do alumínio em diminuir a atividade da H⁺-ATPase da membrana plasmática (CAMBRAIA & CALBO, 1980; SASAKI et al., 1995; PEIXOTO, 1997). Segundo

considerações de LINDBERG & GRIFFITHS (1993), a inibição da atividade da H⁺-ATPase é, aparentemente, decorrente da ligação do alumínio ao complexo enzima-substrato pelos resíduos SH do sítio ativo e, também, aos fosfolipídios das membranas, o que provoca alterações no microambiente da enzima e, conseqüentemente, modificações na conformação e na atividade da H⁺-ATPase. A redução na atividade dessa enzima poderia ser então, uma estratégia utilizada pelas plantas para reduzir o conteúdo de alumínio acumulado no simplasto, o que poderia resultar numa menor peroxidação dos lipídios (CAKMAK & HORST, 1991).

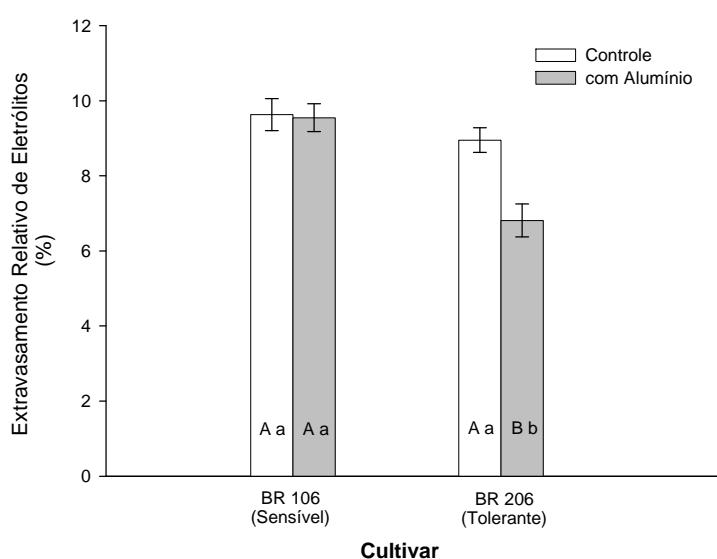


Figura 1 – Extravasamento de eletrólitos em raízes de plântulas de duas cultivares de milho, cultivadas em solução contendo 100 μ M de alumínio. Médias (\pm erro padrão) seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste F ($P > 0,05$). Letras maiúsculas comparam tratamentos da mesma cultivar e minúsculas as cultivares, num mesmo tratamento ($n = 4$).

Na condição controle, plântulas da cultivar sensível apresentaram uma produção do complexo MDA-TBA 48% mais elevada que a cultivar tolerante (Figura 2). O tratamento com alumínio resultou em aumento de cerca de 34% na peroxidação de lipídios na cultivar sensível, enquanto na cultivar tolerante não se observou efeito significativo.

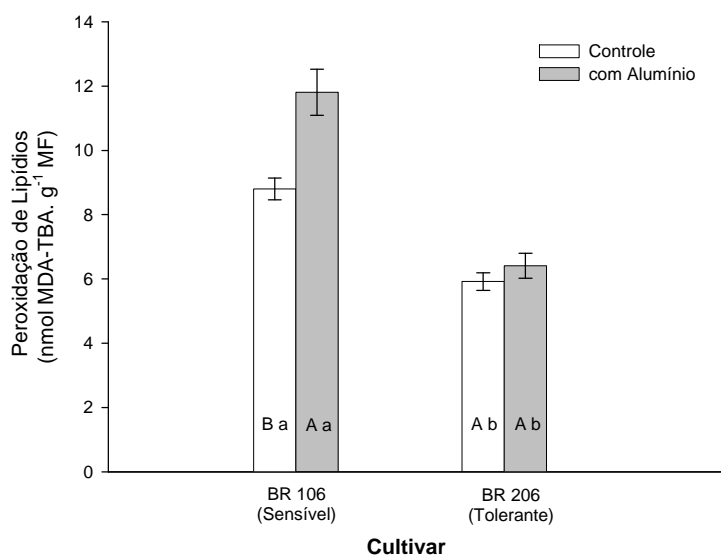


Figura 2 – Peroxidação de lipídios, através da produção do complexo MDA-TBA, em raízes de plântulas de duas cultivares de milho, cultivadas em solução contendo 100 μM de alumínio. Médias (\pm erro padrão) seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste F ($P>0,05$). Letras maiúsculas comparam tratamentos da mesma cultivar e minúsculas as cultivares, num mesmo tratamento ($n = 4$).

PEIXOTO (1999) detectou aumento na peroxidação de lipídios, em raízes inteiras de plantas de sorgo, após tratamentos prolongados com alumínio (10 dias). Resultados similares foram encontrados por CAKMAK & HORST (1991), estudando raízes de soja. Este aumento na peroxidação dos lipídios tem sido considerado como um sintoma da ocorrência de danos oxidativos nas células (GUTTERIDGE & HALLIWELL, 1990), e pode ser considerado como um indicador dos mesmos (AZEVEDO NETO et al., 2005). Neste mesmo sentido, existem registros de que o alumínio seja responsável pela produção de ROS, como os ânions superóxidos (YAMAMOTO et al., 2002).

4.4 Efeito do alumínio sobre a atividade enzimática

Sem alumínio, as duas cultivares apresentaram atividades semelhantes de SOD (Figura 3). O tratamento com alumínio, contudo, resultou em pequena redução (cerca de 15%) na atividade da SOD, na cultivar sensível, mas aumento (em cerca de 18%) na atividade da enzima na cultivar tolerante. Na

presença de alumínio, portanto, a cultivar tolerante passou a ter atividade da SOD 25% mais elevada que a sensível.

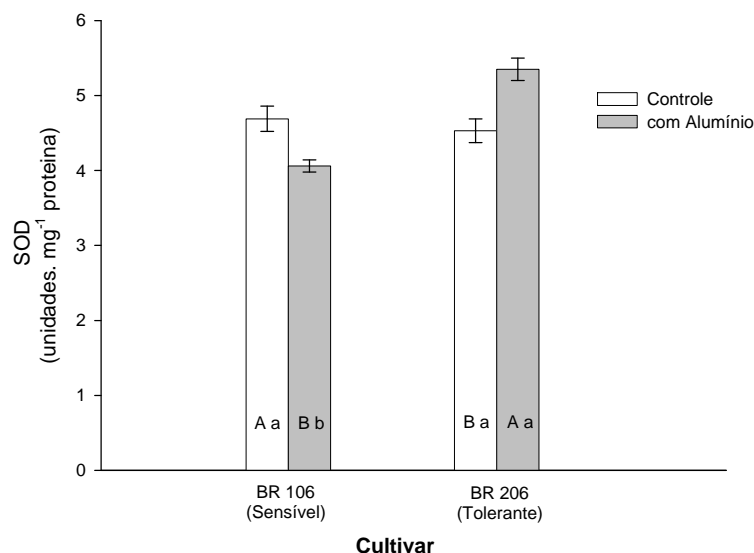


Figura 3 – Atividade da dismutase do superóxido (SOD) em raízes de plântulas de duas cultivares de milho, cultivadas em solução contendo 100 μ M de alumínio. Médias (\pm erro padrão) seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste F ($P > 0,05$). Letras maiúsculas comparam tratamentos da mesma cultivar e minúsculas as cultivares, num mesmo tratamento ($n = 4$).

Resultados semelhantes ao obtido nesse experimento foram observados em raízes de soja (CAKMAK & HORST, 1991), de trigo (DARKÓ et al., 2004) e de sorgo (PEIXOTO et al., 1999). No caso de sorgo a presença de alumínio promoveu aumento na atividade da SOD somente na cultivar tolerante.

O aumento da atividade da SOD nas raízes da cultivar tolerante, decorrente da exposição ao alumínio, provavelmente, contribuiu para a menor peroxidação de lipídios observada na cultivar tolerante (Figura 2). Segundo SCANDALIOS (1993), como o ânion superóxido e seus derivados são altamente tóxicos ao metabolismo, a ocorrência de uma atividade basal da SOD torna-se necessária à manutenção adequada dos mecanismos de proteção celular contra a peroxidação dos lipídios. Como conseqüência da maior atividade da SOD no sistema radicular da cultivar tolerante, na presença do alumínio, esperava-se aumento dos níveis de H_2O_2 . Entretanto, no presente

experimento, não foram avaliados os teores de H₂O₂ nas raízes das plântulas investigadas.

A atividade de catalase, além de ter sido estatisticamente igual nas duas cultivares, não foi afetada pelo alumínio (Figura 4). De forma contrária ao registrado nesse experimento, reduções na atividade de catalase foram observadas em raízes de duas cultivares de sorgo (PEIXOTO et al., 1999), após 10 dias de exposição ao alumínio. Entretanto, KUO & KAO (2003) não encontraram efeito do alumínio sobre a atividade dessa enzima em arroz, após três dias de tratamento. A manutenção da atividade da catalase no sistema radicular das plântulas das duas cultivares sugere uma participação limitada dessa enzima nos mecanismos de eliminação do H₂O₂ produzido como resposta à toxicidade pelo alumínio. RICE-EVANS et al. (1991), consideram que a atuação da catalase torna-se importante apenas quando a concentração de H₂O₂ é mais alta, o que poderia explicar a falta de resposta desta enzima sob as condições de tratamento aplicadas no presente experimento.

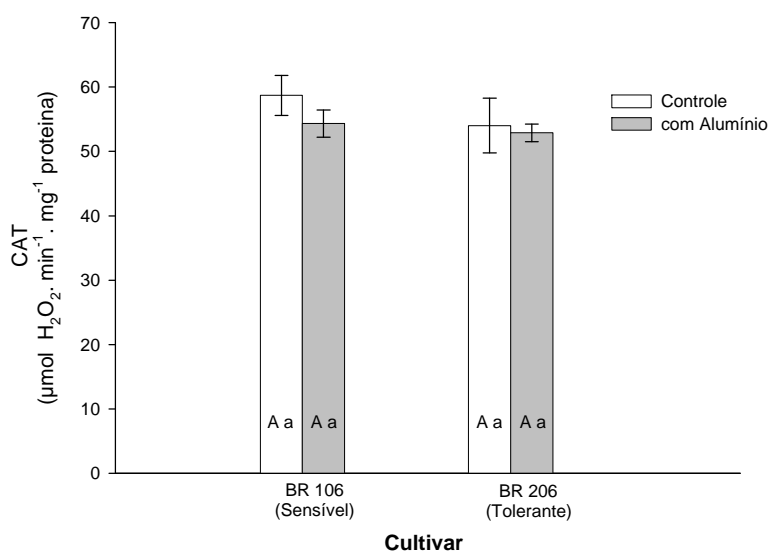


Figura 4 – Atividade da catalase (CAT) em raízes de plântulas de duas cultivares de milho, cultivadas em solução contendo 100 μM de alumínio. Médias (± erro padrão) seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste F (P>0,05). Letras maiúsculas comparam tratamentos da mesma cultivar e minúsculas as cultivares, num mesmo tratamento (n = 4).

As plantas controle das duas cultivares analisadas apresentaram atividades similares de APX (Figura 5). Nas plântulas tratadas com alumínio, a atividade não foi alterada na cultivar sensível, mas aumentou (em cerca de 48%) na cultivar tolerante. Estes resultados são semelhantes aos verificados por KUO & KAO (2003), em raízes de plantas de arroz, após três dias de tratamento.

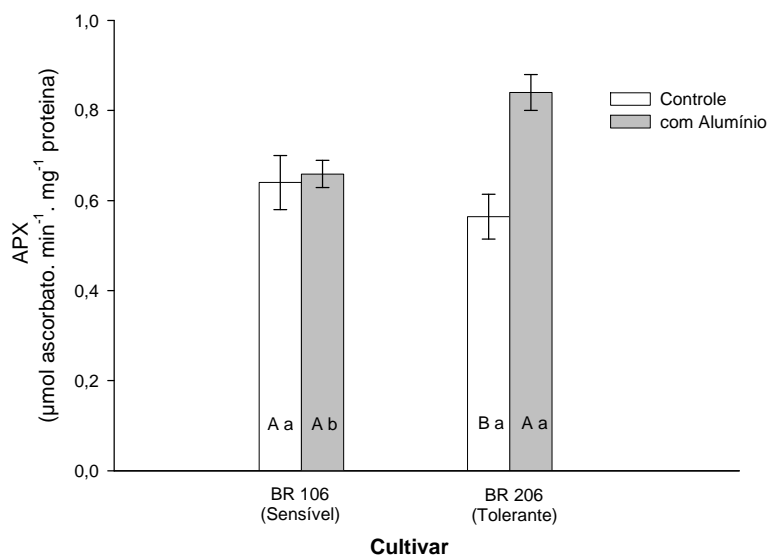


Figura 5 – Atividade da peroxidase do ascorbato (APX) em raízes de plântulas de duas cultivares de milho, cultivadas em solução contendo 100 μM de alumínio. Médias (± erro padrão) seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste F (P>0,05). Letras maiúsculas comparam tratamentos da mesma cultivar e minúsculas as cultivares, num mesmo tratamento (n = 4).

A manutenção da atividade da APX e a redução da atividade da SOD verificada na cultivar sensível, após tratamento com alumínio, podem estar relacionadas com um aumento na formação e, ou acúmulo de superóxidos, o que pode ter contribuído para a maior intensidade de peroxidação de lipídios (Figura 2). Por outro lado, a cultivar tolerante, na presença de alumínio, exibiu aumento na atividade da SOD, o que indica redução na quantidade de superóxidos. Nesta mesma cultivar também houve aumento da atividade da APX, que participa da eliminação do H₂O₂ produzido. Essa resposta diferencial sugere que a cultivar tolerante pode estar mais protegida da ação dessas espécies reativas de oxigênio do que a cultivar sensível, o que poderia ser um fator importante na determinação da tolerância da cultivar BR-206 ao alumínio.

O tratamento com alumínio não resultou em alteração na atividade das POX, em nenhuma das cultivares utilizadas, que não diferiram entre si (Figura 6). Em outras espécies como arroz (JAN et al., 2001) e sorgo (PEIXOTO et al., 1999), ao contrário do observado nesse experimento, foi verificado aumento na atividade das POX, após tratamento com alumínio. No caso do arroz, o aumento da atividade das POX foi observado somente na cultivar sensível, o que contribuiria para maior peroxidação dos lipídios nas membranas e nos tecidos.

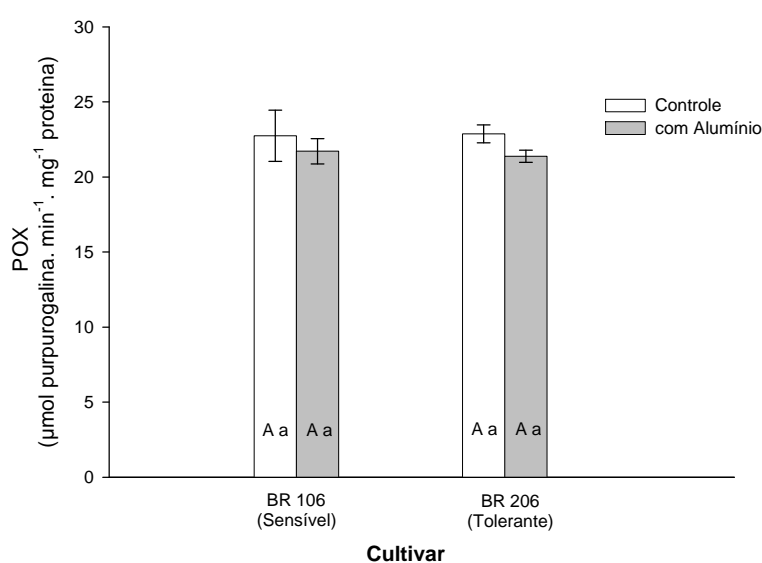


Figura 6 – Atividade das peroxidases (POX) em raízes de plântulas de duas cultivares de milho, cultivadas em solução contendo 100 μM de alumínio. Médias (\pm erro padrão) seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste F ($P > 0,05$). Letras maiúsculas comparam tratamentos da mesma cultivar e minúsculas as cultivares, num mesmo tratamento ($n = 4$).

No presente experimento, o aumento observado na atividade da APX (Figura 5) parece ter sido o principal mecanismo enzimático de eliminação do H_2O_2 formado nos tecidos radiculares da cultivar tolerante, na presença do alumínio.

Os teores de ascorbato, que já se encontravam em níveis similares nas duas cultivares, permaneceram sem alterações significativas quando as plântulas foram submetidas à solução com alumínio (Figura 7). Entretanto, a cultivar sensível apresentava inicialmente (na ausência de alumínio) maior razão ascorbato/desidroascorbato. Como esta relação aumentou (em cerca de 31%) na cultivar tolerante, na presença de alumínio, esta cultivar passou a

apresentar uma relação ascorbato/desidroascorbato 19% mais elevada que a sensível.

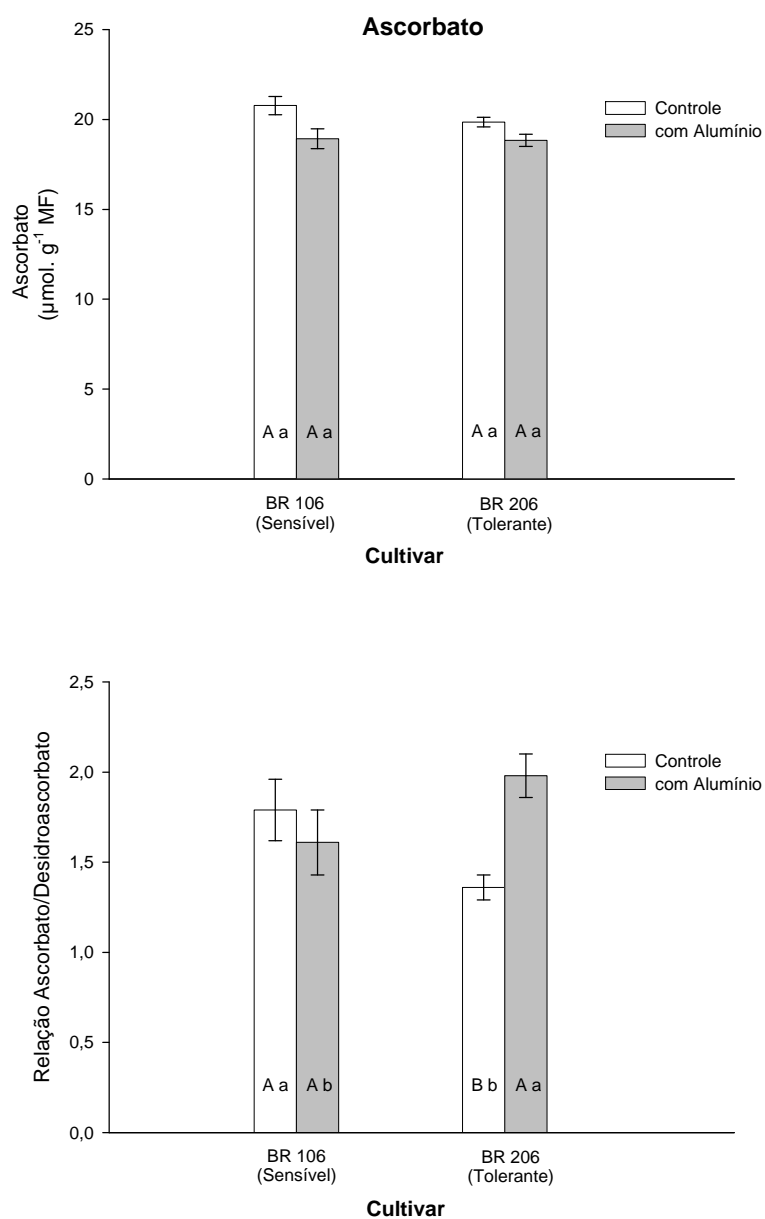


Figura 7 – Concentração de ascorbato e relação ascorbato/desidroascorbato em raízes de plântulas de duas cultivares de milho, cultivadas em solução contendo $100 \mu\text{M}$ de alumínio. Médias (\pm erro padrão) seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste F ($P>0,05$). Letras maiúsculas comparam tratamentos da mesma cultivar e minúsculas as cultivares, num mesmo tratamento ($n = 4$).

O aumento observado na relação ascorbato/desidroascorbato, na cultivar tolerante, indica aumento na proporção relativa de ascorbato, substrato para a APX, cuja atividade coincidentemente aumentou (Figura 5). Aparentemente, o aumento na atividade da APX mascarou um possível aumento da concentração de ascorbato, sendo também possível que a atividade de outros processos enzimáticos (NOCTOR & FOYER, 1998) tenha contribuído para reduzir a concentração de desidroascorbato.

A atividade da redutase da glutathiona (GR) foi mais elevada na cultivar sensível, tanto na ausência quanto na presença de alumínio. O tratamento com esse cátion não resultou em modificações significativas da atividade desta enzima, em nenhuma das duas cultivares (Figura 8).

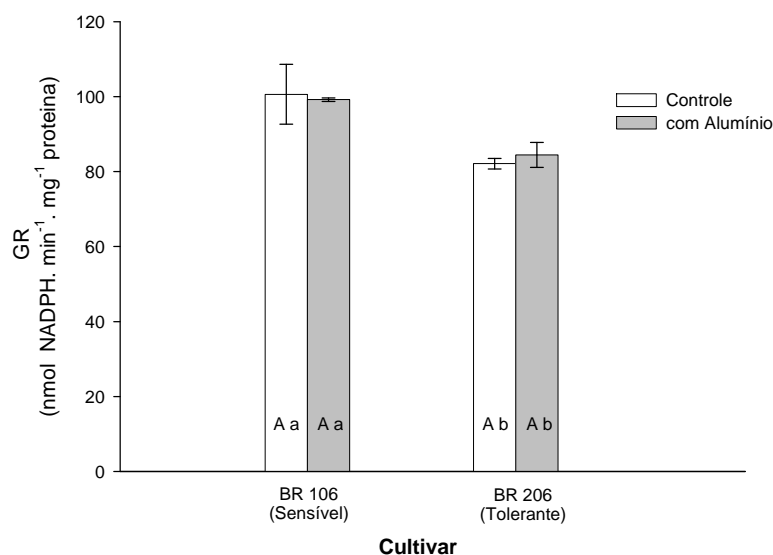


Figura 8 – Atividade da redutase da glutathiona (GR) em raízes de plântulas de duas cultivares de milho, cultivadas em solução contendo 100 μ M de alumínio. Médias (\pm erro padrão) seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste F ($P > 0,05$). Letras maiúsculas comparam tratamentos da mesma cultivar e minúsculas as cultivares, num mesmo tratamento ($n = 4$).

Semelhante ao observado neste experimento, KUO & KAO (2003) também não encontraram efeito do alumínio sobre a atividade da GR, em raízes de arroz e DARKÓ et al. (2004) não observaram alteração em raízes de trigo. Isto pode indicar que, pelo menos nestas espécies, e, ou nas condições utilizadas nestes experimentos, a GR não apresentaria importância direta na eliminação de ROS, sendo estes eliminados por outros processos enzimáticos.

Em resumo, no presente experimento, na ausência de alumínio, as duas cultivares apresentaram atividades similares de SOD, CAT, APX e POX, (Figura 3, 4, 5 e 6), diferindo apenas na atividade da GR (Figura 8), que se apresentou mais elevada na cultivar sensível. Além disso, ainda na condição controle, as duas cultivares apresentaram o mesmo teor de ascorbato e a mesma razão ascorbato/desidroascorbato (Figura 7). O tratamento com alumínio aumentou as atividades da SOD, da APX e a razão ascorbato/desidroascorbato (Figura 3, 5 e 7), porém apenas na cultivar tolerante.

4.5 Efeito do alumínio sobre a atividade respiratória de mitocôndrias isoladas

As taxas respiratórias de mitocôndrias isoladas de plântulas da cultivar sensível, mantidas na condição controle, foram mais elevadas, em comparação às da cultivar tolerante, tanto no estado 3 quanto no estado 4 (Figura 9). As duas cultivares também tiveram resposta contrastante ao tratamento com alumínio: enquanto a cultivar sensível apresentou reduções no consumo de oxigênio, nos dois estados em cerca de 37%, a cultivar tolerante apresentou aumentos em torno de 27%, como consequência da presença de alumínio.

De modo análogo ao observado na cultivar sensível, reduções no consumo de oxigênio, tanto no estado 3 como no estado 4, foram observados em mitocôndrias isoladas de raízes de plântulas de trigo, tratadas com 75 μM de alumínio, ao utilizar o succinato como substrato respiratório (CZUBA, 1985; DE LIMA & COPELAND, 1994). Por outro lado, BONATO (2001) somente encontrou redução da respiração, em mitocôndrias isoladas de plantas de milho submetidas a 185 μM de alumínio, no estado fosforilativo (estado 3), também na presença de succinato.

Como as velocidades de consumo de oxigênio nos estados 3 e 4 variaram de maneira proporcional, em cada cultivar, as razões de controle respiratório acabaram mantendo-se constantes, independente da presença ou não de alumínio e da cultivar (Figura 10). Embora os controles respiratórios tenham-se apresentado relativamente baixos (em geral 1,5) a literatura não tem mostrado

valores superior a 1,7, para raízes de plântulas de milho, quando se utiliza o succinato como substrato (DE LIMA & COPELAND, 1994; BONATO, 2001).

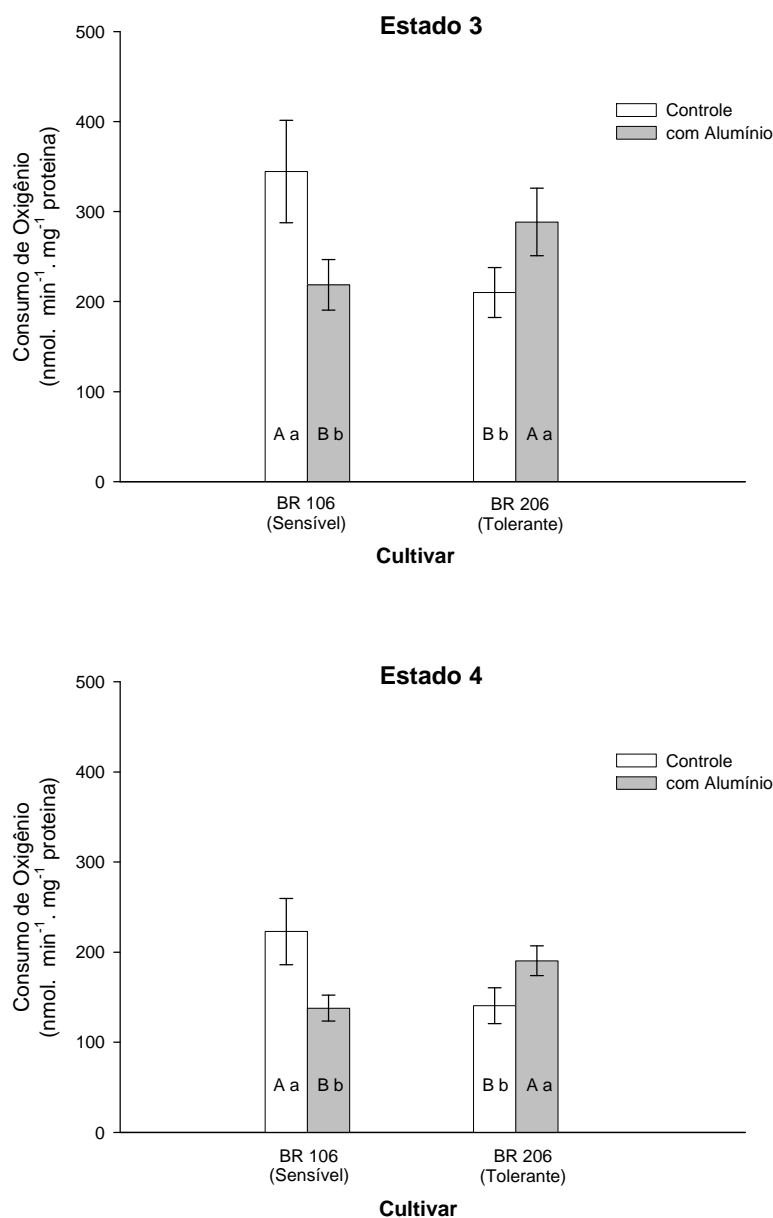


Figura 9 – Consumo de oxigênio nos estados 3 e 4 em mitocôndrias isoladas de raízes de plântulas de milho, cultivadas em solução contendo 100 μM de alumínio. Médias (\pm erro padrão) seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste F ($P>0,05$). Letras maiúsculas comparam tratamentos da mesma cultivar e minúsculas as cultivares, num mesmo tratamento ($n = 3$).

Apesar dos controles respiratórios terem sido os mesmos, as razões ADP/O apresentaram importantes variações. Sem alumínio, as mitocôndrias

isoladas da cultivar sensível apresentaram melhor grau de acoplamento (maior razão ADP/O) que aquelas da cultivar tolerante (Figura 10). Nas duas cultivares, foram observadas reduções significativas na razão ADP/O (em torno de 20%), em consequência da aplicação de alumínio. Isso indica que o alumínio promoveu reduções semelhantes no acoplamento das mitocôndrias isoladas das duas cultivares.

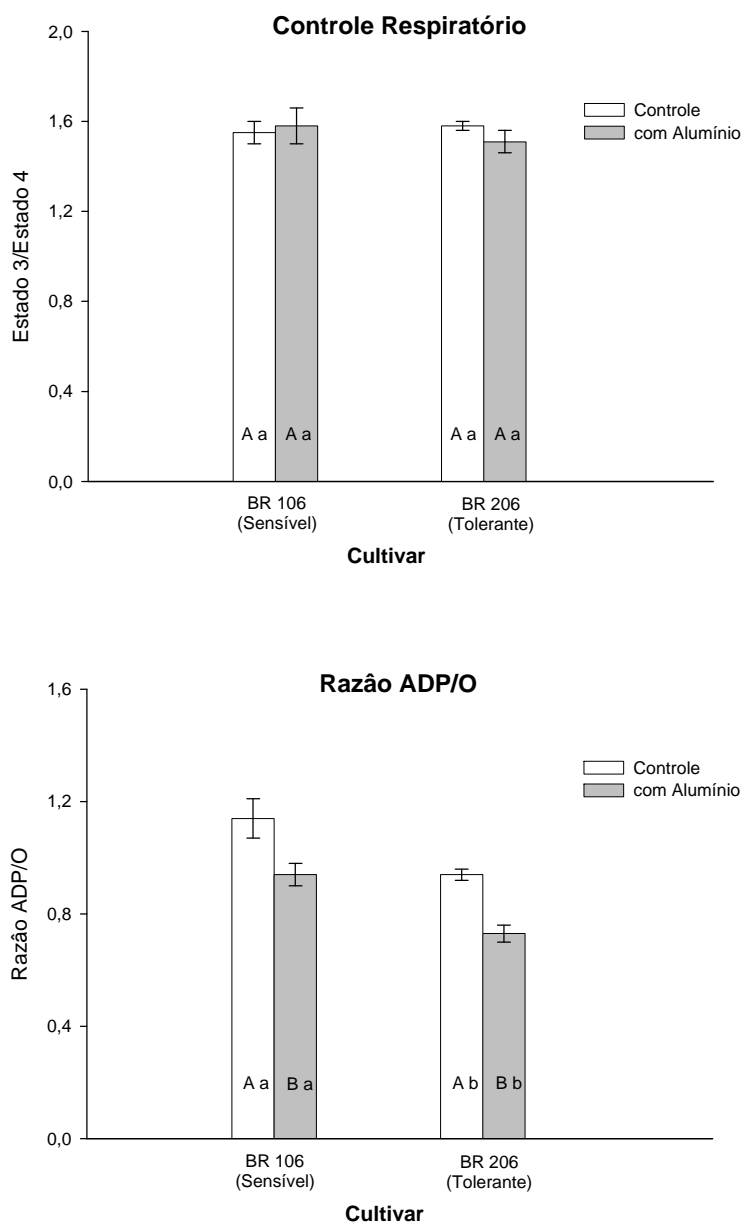


Figura 10 – Coeficiente de controle respiratório e relação ADP/O em mitocôndrias isoladas de raízes de plântulas de duas cultivares de milho, cultivadas em solução contendo 100 μM de alumínio. Médias (\pm erro padrão) seguidas de uma mesma letra não diferem entre si pelo teste F ($P > 0,05$). Letras maiúsculas comparam tratamentos da mesma cultivar e minúsculas as cultivares, num mesmo tratamento ($n = 3$).

No presente experimento, as mitocôndrias isoladas da cultivar tolerante, apresentaram um certo desacoplamento, evidenciado pelo aumento da respiração no estado 4 e redução na relação ADP/O. Esse desacoplamento também foi observado por DE LIMA & COPELAND (1994), utilizando NADH como substrato respiratório, em mitocôndrias isoladas de raízes de plantas de trigo submetidas ao alumínio, e tem sido atribuído ao aumento da atividade de enzimas como a AOX (AFFOURTIT et al., 2001).

Com relação ao consumo de oxigênio pela rota do citocromo c, por mitocôndrias isoladas de plântulas da cultivar sensível tratadas com alumínio, observou-se redução de cerca de 60 %, enquanto que a capacidade da rota da AOX foi reduzida em apenas 30%. A respiração residual aumentou em cerca de 120%, chegando a constituir 15% da respiração total. (Figura 11). Assim, a capacidade da rota da AOX nas mitocôndrias da cultivar sensível, que na ausência de alumínio, representava 50% da rota do citocromo c, passou a ser 90%, na presença daquele cátion. A resposta da cultivar tolerante foi relativamente diferente. Na ausência de alumínio, a rota da AOX representava 35% da capacidade da via do citocromo c (Figura 11). O alumínio elevou para 50% a participação percentual da via da AOX, sem ter alterado de forma significativa a atividade da rota do citocromo c. Nessa cultivar, o consumo residual de oxigênio foi elevado em cerca de 150%, em resposta ao alumínio. Esses resultados não refletem a verdadeira contribuição da rota alternativa na respiração total do estado 4, pois a inibição da rota do citocromo c pelo uso de antimicina A, inevitavelmente aumenta a concentração de ubiquinol, substrato da AOX, forçando o fluxo de elétrons através dessa via (JARMUSZKIEWICZ et al., 2000), superestimando sua verdadeira contribuição.

O acréscimo na velocidade de consumo de oxigênio, observado na cultivar tolerante, pela via da AOX é um indicativo de que a ejeção de prótons foi diminuída, uma vez que a AOX recebe elétrons diretamente do ubiquinol (SIEDOW & BERTHOLD, 1986). Dessa maneira, o aumento do desacoplamento mitocondrial, tanto pela oxidase alternativa quando pelas proteínas desacopladoras, pode representar formas de diminuir o gradiente eletroquímico de prótons, protegendo as mitocôndrias contra as espécies reativas de oxigênio (PASTORE et al., 2002).

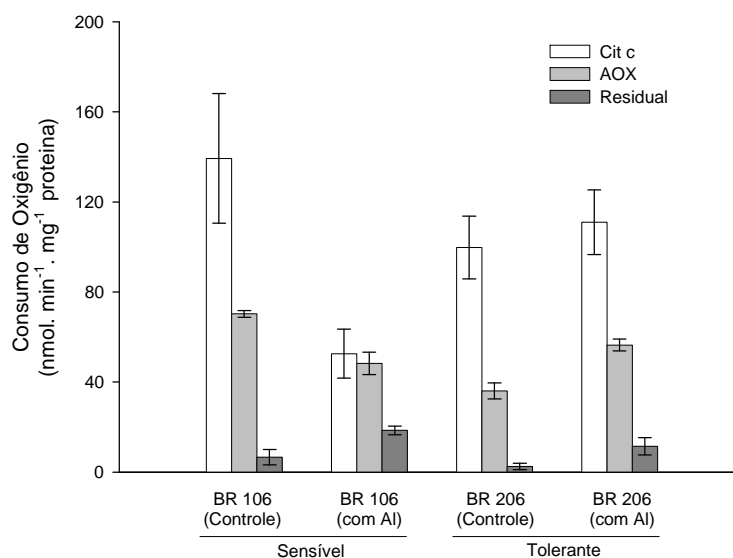


Figura 11 – Consumo de oxigênio (média \pm erro padrão) pelas rotas do citocromo c, alternativa (AOX) e residual em mitocôndrias isoladas de raízes de plântulas de duas cultivares de milho, cultivadas em solução contendo 100 μ M de alumínio (n = 3).

A redução do consumo de oxigênio na cultivar sensível pode estar relacionada com um possível efeito do alumínio sobre o transporte de elétrons pela rota do citocromo c, ou, então, sobre a fosforilação oxidativa (DE LIMA & COPELAND, 1994). Esta redução também poderia estar relacionada com um possível comprometimento da rota alternativa, que decaiu na cultivar sensível, sugerindo sua incapacidade em desviar o fluxo de elétrons. Dessa forma, é possível que o efeito do alumínio ocorra sobre mais de um sítio mitocondrial.

4.6 Efeito do alumínio sobre a proteína desacopladora de plantas

A diferença de potencial elétrico de membrana (), em mitocôndrias isoladas de plântulas de milho da cultivar sensível, estabelecida no início do experimento, foi ligeiramente mais elevada na condição controle (185 mV) que no tratamento com alumínio (180 mV) (Figura 12). Nas duas condições experimentais, as adições de ADP foram seguidas de queda no , indicando utilização do gradiente eletroquímico de prótons para a fosforilação do ADP.

Após a fosforilação de todo o ADP adicionado pela primeira vez, o potencial elétrico voltou a subir, atingindo um nível mais elevado que o inicial, indicando menor permeabilidade da membrana interna aos prótons, provavelmente pela redução na atividade da proteína desacopladora de mitocôndrias de plantas (PUMP) (VERCESI et al., 1995).

A primeira adição de ácido linoléico não resultou em nenhuma alteração em (Figura 12). Entretanto, após a segunda adição desse ácido graxo, decresceu progressivamente, mais rápida e acentuadamente na condição controle (queda aproximada de 10 mV) do que no tratamento com alumínio (queda de 4 mV). Essa queda é interpretada como sendo resultante da ativação da PUMP pelo ácido linoléico (VERCESI et al., 1995), e indica que o alumínio reduziu a atividade da PUMP na cultivar sensível utilizada. Provavelmente, por esse motivo o potencial elétrico estabelecido inicialmente, nas mitocôndrias isoladas de plântulas tratadas com alumínio, já tenha sido inferior ao atingido na condição controle.

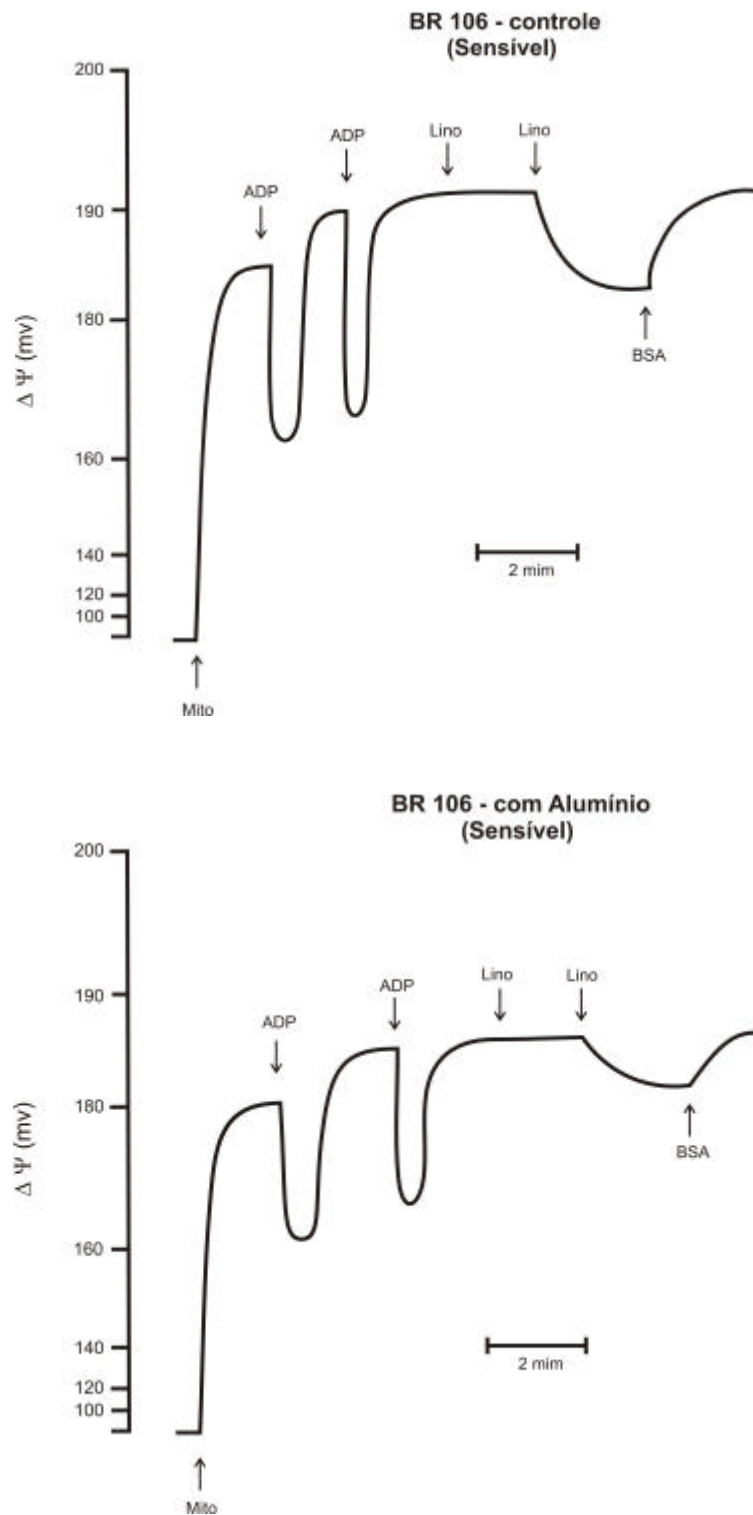


Figura 12 – Variações no potencial elétrico transmembrana (negativo internamente), em mitocôndrias isoladas de raízes de plântulas de milho da cultivar BR 106, cultivadas em solução contendo 100 μM de alumínio. As setas indicam adições de: ADP 0,1 mM; ácido linoléico 7 μM (Lino); BSA: albumina de soro bovino 0,1% (BSA). Os traçados são representativos de três repetições, obtidas a partir de, pelo menos, três isolamentos diferentes.

A resposta da cultivar tolerante foi parcialmente diferente (Figura 13). As variações referentes às adições de ADP foram similares, mas os potenciais elétricos alcançados foram sempre inferiores àqueles estabelecidos na cultivar sensível (Figuras 12 e 13). As adições de ácido linoléico também foram acompanhadas de queda no potencial de membrana, porém, ao contrário da cultivar sensível, a queda foi mais rápida e intensa no tratamento com alumínio (10 mV) do que na condição controle (6 mV) (Figura 13).

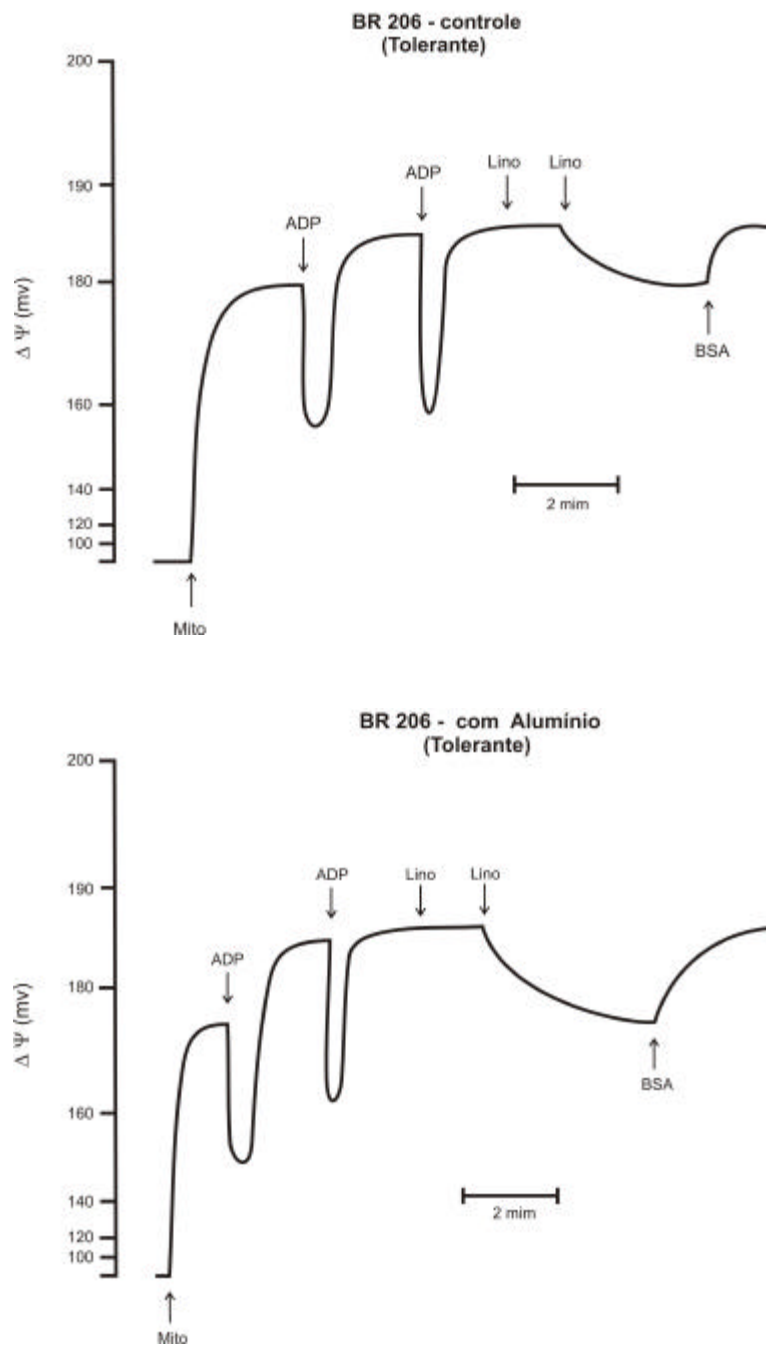


Figura 13 – Variações no potencial elétrico transmembrana (negativo internamente), em mitocôndrias isoladas de raízes de plântulas de milho da cultivar BR 206, cultivadas em solução contendo 100 μM de alumínio. As setas indicam adições de: ADP 0,1 mM; ácido linoléico 7 μM (Lino); BSA: albumina de soro bovino 0,1% (BSA). Os traçados são representativos de três repetições, obtidas a partir de, pelo menos, três isolamentos diferentes.

Não existem registros relacionando o efeito do alumínio e a atividade da PUMP, embora se tenham evidências de que a presença de caminhos não-fosforilativos, para o transporte de elétrons em mitocôndrias de plantas, possa estar relacionada com o processo de adaptação das mesmas aos estresses ambientais (GRABELNYCH et al., 2004). Outras evidências indicaram que o aumento do desacoplamento mitocondrial, promovido pela PUMP e pela AOX, pode representar uma forma de proteger as mitocôndrias contra a formação de espécies reativas de oxigênio (PASTORE et al., 2002).

O efeito denominado “desacoplador”, verificado por DE LIMA & COPELAND (1994), em mitocôndrias isoladas de plântulas de trigo tratadas com alumínio, ao observarem o aumento na respiração no estado 4 e redução na razão ADP/O, foi também observado neste experimento na cultivar tolerante e pode ser atribuído ao maior aumento na atividade da PUMP, bem como da AOX. Assim, é possível que a maior tolerância da cultivar BR 206 ao alumínio seja consequência da sua capacidade de promover o parcial desacoplamento mitocondrial, tanto pelo aumento na atividade da AOX quanto da atividade da PUMP, ambos observados apenas nessa cultivar.

O aumento no desacoplamento mitocondrial pode ter papel importante na redução na quantidade de ubiquinol, uma vez que o excesso de poder redutor é um dos fatores que contribuem para aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (AFFOURTIT et al., 2001). Dessa forma, aumentos nas atividades da AOX e da PUMP podem, também, estar contribuindo para a redução nos níveis de estresse oxidativo, pelo menos na cultivar tolerante analisada.

5. CONCLUSÕES

As duas cultivares estudadas apresentaram algumas respostas diferenciadas, ao alumínio. A cultivar BR 106, considerada como sensível, sofreu maior redução na produção de matéria fresca e seca do sistema radicular, além de maior redução no crescimento em comprimento da raiz principal. A maior redução no extravasamento de eletrólitos e a menor peroxidação de lipídios nos tecidos radiculares indicaram menores danos oxidativos nas células da cultivar tolerante. Em presença de alumínio, essa cultivar parece ter apresentado maior eficiência dos sistemas antioxidativos, exibindo maior atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD) e peroxidase do ascorbato (APX), além de aumento na razão ascorbato/dehidroascorbato. O aumento da respiração no estado 4, acompanhado de redução na razão ADP/O, encontrados em mitocôndrias isoladas da cultivar tolerante, evidenciaram um efeito “desacoplador”, como resposta ao tratamento com alumínio, na cultivar tolerante. Os aumentos nas atividades da oxidase alternativa (AOX) e da proteína desacopladora (PUMP), observados apenas na cultivar tolerante, parecem ser os responsáveis pelo desacoplamento parcial observado, representando uma forma de proteger as células contra a formação de espécies reativas de oxigênio. Assim, as maiores atividades da SOD, da APX, da AOX e da PUMP na cultivar BR 206 parecem ter sido fundamentais para a maior tolerância dessa cultivar ao alumínio, protegendo as suas células de um provável estresse oxidativo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFFOURTIT, C.; KRAB, K.; MOORE, A.L.** Control of plant mitochondrial respiration. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1504, p. 58-69, 2001.
- AHN, S.J.; SIVAGURU, M.; OSAWA, H.; CHUNG, G.P.; MATSUMOTO, H.** Aluminum inhibits the H⁺-ATPase activity by permanently altering the plasma membrane surface potentials in squash roots. **Plant Physiology**, v. 126, p. 1381-1390, 2001.
- ALMEIDA, A.M.; JARMUSZKIEWICZ, W.; KHOMSI, H.; ARRUDA, P.; VERCESI, A.E.; SLUSE, F.E.** Cyanide-resistant, ATP-synthesis-sustained, and uncoupling-protein sustained respiration during post-harvest ripening of tomato fruit. **Plant Physiology**, v. 119, p. 1323-1330, 1999.
- ALSCHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, L.S.** Role of superoxide dismutase (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1331-1341, 2002.
- 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**, v. 109, n. 4, p. 1247-1257, 1995.
- ARAKAWA N.; TSUTSUMI K.; SANCEDA N.G.; KURATA T.; INAGAKI C.** A rapid and sensitive method for the determination of ascorbic acid using 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline. **Agricultural Biology Chemistry**, v. 45, p. 1289-1290, 1981.
- AZEVEDO NETO, A.D.; PRISCO, J.T.; ENÉAS-FILHO, J.; ABREU, C.E.B.; GOMES-FILHO, E.** Effects of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. **Environmental and Experimental Botany**, available online 26 February 2005.

- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I.** Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, p. 276-287, 1971.
- BONATO, C.M.** Efeito do alumínio sobre a respiração redicular e mitocondrial em dois cultivares de milho. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, 98 p., 2001.
- BRADFORD, M. M.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRANDALISE, M.; MAIA, I.G.; BORECKY, J.; VERCESI, A.E.; ARRUDA, P.** Overexpression of plant uncoupling mitochondrial protein in transgenic tobacco increases tolerance to oxidative stress. **Journal of Bioenergetic and Biomembranes**, v. 35, p. 203-209, 2003.
- CAKMAK, I.; HORST, J.H.** Effects of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, v. 83, p. 463-468, 1991.
- CAMBRAIA, J.; CALBO, A.G.** Efeito do alumínio sobre a absorção e sobre o transporte de fósforo em dois cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench). **Revista Ceres**, v. 27, p. 615-625, 1980.
- CAMBRAIA, J.; CAMBRAIA, M.C.** Avaliação de híbridos de milho quanto à tolerância ao alumínio, em solução nutritiva. **Revista Ceres**, v. 42, p. 297-307, 1995.
- CAMBRAIA, J.; SILVA, M.A.; CANO, M.A.O.; SANT'ANNA, R.** Método simples para a avaliação de cultivares de sorgo quanto a tolerância ao alumínio. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 3, p. 87-95, 1991.
- CARLBERG, I.; MANNERVIK, B.** Glutathione Reductase. **Methods in Enzymology**, v.113, p.484-495, 1985.
- CHANCE, B.; MAEHLEY, A.C.** Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, v. 2, p. 764-775, 1955.
- CLARK, R.B.** Characterization of phosphatase of intact maize roots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 23, p. 458-460, 1975.
- CLARKSON, D.T.** The effect of aluminum and some other trivalent metal cations on cell division in the root apices of *Allium cepa*. **Analytical Botany**, v. 29, p. 309-315, 1995.

- COLLIER, D.E.; ACKERMANN, F.; SOMERS, D.J.; CUMMINS J.R.; ATKIN, O.K.** The effect of aluminium exposure on roots respiration in an aluminium-sensitive and aluminum-tolerant cultivar of *Triticum aestivum*. **Physiologia Plantarum**, v. 87, p. 447-452, 1983.
- CONSIDINE, M.J.; DALEY, D.O.; WHELAN, J.** The expression of alternative oxidase and uncoupling protein during fruit ripening in mango. **Plant Physiology**, v. 126, p. 1619-1629, 2001.
- CONSIDINE, M.J.; GOODMAN, M.; ECHTAY, K.S.; LALOI, M.; WHELAN, J.; BRAND, M.D.; SWEETLOVE, L.J.** Superoxide stimulates a proton leak in potato mitochondria that is related to the activity of uncoupling protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 22298–22302, 2003.
- COSTA, A.D.T.** Proteína desacopladora de plantas: efeito do estresse oxidativo na sua expressão e atividade e reconstituição funcional da isoforma de *Arabidopsis thaliana*. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas. 156 p., 2003.
- CRUZ-HERNÁNDEZ, A.; GOMEZ-LIMA, M.A.** Alternative oxidase from mango (*Mangifera indica* L.) is differentially regulated during fruit ripening. **Planta**, v. 197, p. 569-576, 1995.
- CZUBA, G.** Effect of aluminium on respiratory control of mitochondria from tips of Al-sensitive and Al-resistant wheat varieties. **Acta Physiologia Plantarum**, v. 7, p. 103-106, 1985.
- DARKÓ, E.; AMBRUS, H.; STEFANOVITS-BÁNYAI, E.; FODOR, J.; BAKOS, F.; BARNABÁS, B.** Aluminium toxicity, Al tolerance and oxidative stress in an Al-sensitive wheat genotype and in Al-tolerance lines developed by in vitro microspore selection. **Plant Science**, v. 166, p. 583-591, 2004.
- DAY, D. A.; HANSON, J. B.** On methods for the isolation of mitochondria from etiolated corn shoots. **Plant Science Letters**, v. 11, p. 99-104, 1977.
- DAY, D.A.; ARRON, G.P.; LATIES, G.G.** Nature and control of respiratory pathways in plants: the interaction of cyanide resistant respiration with cyanide-sensitive pathway. **Biochemistry of Plants**, v. 4, p. 197-241, 1980.
- DE LIMA, M.; COPELAND, L.** The effect of aluminium on respiration of wheat roots. **Physiologia Plantarum**, v. 90, p. 51-58, 1994.
- Del LONGO, O.T.; GONZÁLEZ, C.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 and Cell Physiology**, v. 34, p. 1023-1028, 1993.

- DOUCE, R.; NEUBURGER, M.** The uniqueness of plant mitochondria. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 40, p. 371-414, 1989.
- ELTHON, T.E.; NICKELS, R.L.; MCINTOSH, L.** Mitochondrial events during development of thermogenesis in *Sauromatum gluttatum*. **Planta**, v. 180, p. 82-89, 1989.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA.** Cultivares de milho safra 2004/2005. Disponível em <http://www.cnpms.embrapa.br/produtos/produtos/br206.html>, acesso em 15 janeiro de 2005.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA.** Relatório técnico anual, 1976/77. Brasília, DF, 183p., 1978.
- FAGERIA, N.K.; ZIMMERMANN, F.J.P.** Seleção de cultivares de arroz para tolerância a toxicidade de alumínio em solução nutritiva. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 14, p. 141-147, 1979.
- FOYER, C.H.; LOPEZ-DELGADO, H. DAT, J.F.; SCOTT, I.M.** Hydrogen peroxide and glutathione associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling. **Physiologia Plantarum**, v. 100, p. 241-254, 1997.
- FOYER, C.H; HALLIWELL, B.** The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbate acid metabolism. **Planta**, v. 133, p. 21-25, 1976.
- GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K.** Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.
- GRABELNYCH, O.I.; SUMINA, O.N.; FUNDERAT, S.P.; POBEZHIMOVA, T.P.; VOINIKOV, V.K.; KOLESNICHENKO, A.V.** The distribution of electron transport between the main cytochrome and alternative pathways in plant mitochondria during short-term cold stress and cold hardening. **Journal of Thermal Biology**, v. 29, p. 165–175, 2004.
- GUTTERIDGE, J.M.C.; HALLIWELL, B.** The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 15, p. 129-135, 1990.
- HAVIR, E.A.; McHALE, N.A.** Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v. 84, p. 450-455, 1987.
- HEATH, R.L.; PACKER, L.** Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 125, p. 189-198, 1968.

- HORST, W.J.** The role of the apoplast in aluminum toxicity and resistance of higher plants: a review. **ZPflanzenernähr Bodenk**, v. 158, p. 419–428, 1995.
- JACKSON, C.; DENCH, J. E.; HALL, D. O.; MOORE, A. L.** Separation of mitochondria from contaminating subcellular structures utilizing silica soil gradient centrifugation. **Plant Physiology**, v. 64, p. 150-153, 1979.
- JAN, F.; YAMASHITA, K.; MATSUMOTO, H.; MAEDA, M.** Protein and peroxidase changes in various root-cell fractions of two upland rice cultivars differing in Al tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 46, p. 141-146, 2001.
- JARMUSZKIEWICZ, W.; ALMEIDA, A.M.; VERCESI, A.E.; SLUSE, F.E.; SLUSE-GOFFART, C.M.** Proton re-uptake partitioning between uncoupling protein and ATP synthase during benzohydroxamic acid-resistant state 3 respiration in tomato fruit mitochondria. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 13315-13320, 2000.
- JEZEK, P.; ENGSTOVA, H.; ZACKOVA, M.; VERCESI, A.E.; COSTA, A.D.T.; ARRUDA, P.; GARLID, K.D.** Fatty acid cycling mechanism and mitochondrial uncoupling proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1365, p. 319-327, 1998.
- JEZEK, P.; URBÁNKOVÁ, E.** Specific sequence motifs of mitochondrial uncoupling proteins. **Iubmb Life**, v. 49, p. 63-70, 2000.
- JONES, D.L.; KOCHIAN, L.V.** Aluminum interaction with plasma membrane lipids and enzyme metal binding sites and its potential role in Al cytotoxicity. **FEBS Letters**, v. 400, p. 54-57, 1997.
- KAMO, N.; MURATSUGU, M.; HONGO, R.; KOBATAKE, J.** Membrane potential of mitochondria measured with of electrode sensitive to tetraphenil phosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. **Journal of Membrane Biology**, v. 49, p. 105-121, 1979.
- KAR, M.; MISHRA, D.** Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v. 57, p. 315-319, 1976.
- KINRAIDE T.B.; PARKER D.R.** Apparent phytotoxicity of mononuclear hydroxy aluminium to four dicotyledenous species. **Physiologia Plantarum**, v. 79, p. 283–288, 1990.
- KINRAIDE, T.B.** Identity of the rhizotoxic aluminum species. **Plant and Soil**, v. 134, p. 167-178, 1991.
- KNIGHT, H.; KNIGHT, M.R.** Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. **Trends in Plant Science**, v. 6, p. 262-267, 2001.

- KOLLMEIR, M.; FELLE, H.H.; HORST, W.J.** Genotypical differences in aluminum resistance of maize are expressed in distal part of the transition zone. Is reduced basipetal auxin flow involved in inhibition of root elongation by aluminum? **Plant Physiology**, v. 122, p. 945-956, 2000.
- KOSHIBA, T.** Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). **Plant and Cell Physiology**, v. 34, p. 713-721, 1993.
- KOWALTOWSKI, A.J.; COSTA, A.D.T.; VERCESI, A.E.** Activation of the potato plant uncoupling mitochondrial protein inhibits reactive oxygen species generation by the respiratory chain. **FEBS Letters**, v. 425, p. 213-216, 1998.
- KUMAR, S.; SINHA, S.K.** Alternative respiration and heat production in ripening banana fruits (*Musa paradisiaca* var. Mysore Kadali). **Journal of Experimental Botany**, v. 43, p. 1639-1642, 1992.
- KUO, M.C.; KAO, C.H.** Aluminum effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. **Biologia Plantarum**, v. 46, p. 149-152, 2003.
- LAFEVER, H.N.; CAMPBELL, L.G.; FOY, C.D.** Differential response of wheat cultivars to Al. **Agronomy Journal**, v. 69, p. 563-568, 1977.
- LALOI, M.; KLEIN, M.; RIESMEIER, J.W.; MULLER-ROBER, B.; FLEURY, C.; BOUILLAUD, F.; RICQUIER, D.** A plant cold-induced uncoupling protein. **Nature**, v. 389, p. 135-136, 1997.
- LAMB, C.; DIXON, R.A.** The oxidative burst in plant disease resistance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 251-275, 1997.
- LIMA A.L.S.; DAMATTA F.M.; PINHEIRO H.A.; TOTOLA M.R.; LOUREIRO M.E.** Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. **Environmental and Experimental Botany**, v. 47, p. 239-247, 2002.
- LINDBERG, S.; GRIFFITHS, G.** Aluminium effects on ATPase activity and lipid composition of plasma membranes in sugar beet roots. **Journal of Experimental Botany**, v. 44, p. 1543-1550, 1993.
- LIU, D.; JIANG, W.** Effects of Al³⁺ on the nucleolus in root tip cells of *Allium cepa*. **Hereditas**, v. 115, p. 213-219, 1991.
- LONG, F.L.; LANGDALE, G.W.; MYHERE, D.L.** Response of an Al-tolerant and Al-sensitive genotype to lime, P and K on three Atlantic coast flatworms soils. **Agronomy Journal**, v. 65, p. 30-34, 1973.

- MAIA, I.G.; BENEDETTI, C.E.; LEITE, A.; TURCINELLI, S.R.; VERCESI, A.E.; ARRUDA, P.** *AtPUMP*: an *Arabidopsis* gene encoding a plant uncoupling mitochondrial protein. **FEBS Letters**, v. 429, p. 403-406, 1998.
- MASCARENHAS, H.A.A.; CAMARGO, C.E.O.; FALIVENE, S.M.P.** Tolerância de cultivares de soja a dois níveis de alumínio em soluções nutritivas em diferentes concentrações salinas. **Bragantia**, v. 43, p. 459-466, 1984.
- MATSUMOTO, H.** Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. **International Review of Cytology**, v. 200, p. 1-46, 2000.
- MAXWELL, D.P.; WANG, Y.; MCINTOSH, L.** The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 96, p. 8271-8276, 1999.
- MEDENTSEV, A.G.; ARINBASAROVA, A.Y.; AKIMENKO, V.K.** Regulation and physiological role of cyanide-resistant oxidases in fungi and plants. **Biochemistry (Moscow)**, v. 64, p. 1457-1472, 1999.
- MEEUSE, B.J.D.** Thermogenic respiration in aroids. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 26, p. 117-126, 1975.
- MILLAR, A.H.; DAY, D.A.** Nitric oxide inhibits the cytochrome oxidase but not the alternative oxidase of plant mitochondria. **FEBS Letters**, v. 398, p. 155-158, 1996.
- MILLAR, A.H.; WISKICH, J.T.; WHELAN, J.; DAY, D.A.** Organic acid activation of the alternative oxidase of plant mitochondria. **FEBS Letters**, v. 329, p. 259-262, 1993.
- MITTLER, R.** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, p. 405-410, 2002.
- MITTLER, R.; VANDENAWERA, S.; GOLLERY, M.; VAN BREUSEGEM, F.** Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 490-498, 2004.
- MOLLER, I.M.; RASMUSSEN, A.G.** The role of NADH in the mitochondrial matrix. **Trends in Plant Science**, v. 3, p. 21-27, 1998.
- MOORE, A.L.; SIEDOW, J.N.** The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1059, p. 121-140, 1991.
- MOORE, D.P.; KRONSTAD, W.E.; METZGEH, R.J.** Screening wheat for aluminum tolerance. In: WRIGHT, M.T. (ed.) **Plant adaptation to mineral stress in problem soils**. New York: Cornell University, p. 287-295, 1976.

- NAKANO Y.; ASADA K.** Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, p. 867-880, 1981.
- NANTES, I.L.; FAGIAN, M.M.; CATISTI, R.; ARRUDA, P.; MAIA, I.G.; VERCESI, A.E.** Low temperature and aging-promoted expression of PUMP in potato tuber mitochondria. **FEBS Letters**, v. 457, p. 103–106, 1999.
- NOCTOR, G.; FOYER, C.** Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 249-279, 1998.
- PASTORE, D.; FRATIANNI, A.; DI PEDE, S.; PASSARELLA, S.** Effects of fatty acids, nucleotides and reactive oxygen species on durum wheat mitochondria. **FEBS Letters**, v. 470, p. 88–92, 2000.
- PASTORE, D.; LAUS, M.N.; DI FONZO, N.; PASSARELLA, S.** Reactive oxygen species inhibit the succinate oxidation-supported generation of membrane potential in wheat mitochondria. **FEBS Letters**, v. 516, p. 15-19, 2002.
- PASTORE, D.; TRONO, D.; LAUS, M.N.; DI FONZO, N.; PASSARELLA, S.** Alternative oxidase in durum wheat mitochondrial. Activation by pyruvate, hydroxypyruvate and glyoxylate and physiological role. **Plant and Cell Physiology**, v. 42, p. 1373-1382, 2001.
- PASTORE, D.; TRONO, D.; PASSARELLA, S.** Substrate oxidation and ADP/ATP exchange in coupled durum wheat (*Triticum durum* Desf.) mitochondria. **Plant Biosystems**, v. 133, p. 219–228, 1999.
- PEIXOTO, P.H.P.** Peroxidação de lipídeos em membranas e tecidos de dois cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) com tolerância diferencial ao alumínio. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, 112 p., 1997.
- PEIXOTO, P.H.P.; CAMBRAIA, J.; MOSQUIM, P.R.; MOREIRA, M.A.** Aluminum effects on fatty acid composition and lipid peroxidation of a purified plasma membrane fraction of root apices of two sorghum cultivars. **Journal of Plant Nutrition**, v. 24, p. 1061-1070, 2001.
- 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**, v. 11, p. 137-143, 1999.
- PETER, C.K.; DAWSON, M.D.; MOORE, D.P.** Separation of degrees of aluminum tolerance in wheat. **Agronomy Journal**, v. 63, p. 586-591, 1971.

- PINHEIRO, H.A.** Atividade da oxidase alternativa e da proteína desacopladora em mitocôndrias de tubérculos de batata submetidos à baixa temperatura. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa. 41 p., 2000.
- POLIDOROS, A.N.; SCANDALIOS, J.G.** Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione S-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.). **Physiologia Plantarum**, v. 106, p. 112-120, 1999.
- PRASAD, T.K.** Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings: changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids, and protease activities. **Plant Journal**, v. 10, p. 1017-1020, 1996.
- REID, R.D.; FLEMING, A.L.; FOY, C.D.** A method for determining aluminum response of barley in nutrient solution in comparison to response in Al-toxic soil. **Agronomy Journal**, v. 63, p. 600-603, 1971.
- 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**, v. 28, p. 123-130, 2003.
- RHUE, R.D.; GROGAN, C.O.** Screening corn for Al tolerance using different Ca and Mg concentration. **Agronomy Journal**, v. 69, p. 755-760, 1977.
- RICE-EVANS, C.A.; DIPLOCK, A.T.; SYMONS, M.C.R.** **Techniques in Free Radical Research**. Amsterdam: Elsevier, v. 22, p. 291, 1991.
- SASAKI, M.; KASAI, M.; YAMAMOTO, Y.; MATSUMOTO, H.** Involvement of plasma membrane potential in tolerance mechanism of plant roots to aluminium toxicity. **Plant and Soil**, v. 171, p. 119-124, 1995.
- SCANDALIOS, J.G.** Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, v. 101, p. 7-12, 1993
- SCANDALIOS, J.G.** The rise of ROS. **Trends in Biochemical Science**, v. 23, p. 483-486, 2002.
- SCHONBAUM, G.R.; BONNER, W.D.; STOREY, B.T.; BAHR, J.T.** Specific inhibition of the cyanide-insensitive respiratory pathway in plant mitochondria by hydroxamic acids. **Plant Physiology**, v. 47, p. 124-128, 1971.
- SIEDOW, J.N.; BERTHOLD, D.A.** The alternative oxidase: A cyanide-resistant respiratory pathway in higher plants. **Physiologia Plantarum**, v. 66, p. 569-573, 1986.

- SILVA, M.A.P.** Características do transporte de cálcio, fosfato e prótons em mitocôndrias de plantas. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas. 185 p., 1991.
- SKULACHEV, V.P.** Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1363, p. 100-124, 1998.
- SLUSE, F.E.; JARMUSZKIEWICZ, W.** Activity and functional interaction of alternative oxidase and uncoupling protein in mitochondria from tomato fruit. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 259-268, 2000.
- TAYLOR, G.J.** Maximum potential growth rate and allocation of respiratory energy as related to stress tolerance in plants. **Plant Physiology**, v. 27, p.605-611, 1989.
- TRONO, D.; FLAGELLA, Z.; LAUS, M.N.; DI FONZO, N.; PASTORE, D.** The uncoupling protein and the potassium channel are activated by hyperosmotic stress in mitochondria from durum wheat seedlings. **Plant, Cell and Environment**, v. 27, p. 437-448, 2004.
- VANLERBERGHE, G.C.; McINTOSH, L.** Alternative oxidase: From gene to function. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 703-734, 1997.
- VERCESI, A.E.; MARTINS, I.S.; SILVA, M.A.P.; LEITE, H.M.F.; CUCCOVIA, I.M.; CHAIMOVICH, H.** PUMPing plants. **Nature**, v. 375, p. 24-25, 1995.
- VOINIKOV, V.; POBEZHIMOVA, T.; KOLESNICHENKO, A.; VARAKINA, N.; BOROVSKII, G.** Stress protein 310 kDa affects the energetic activity of plant mitochondria under hypothermia. **Journal of Thermal Biology**, v. 23, p. 1-4, 1998.
- WAGNER, A.M.** A role for active oxygen species as second messengers in the induction of alternative oxidase gene expression in *Petunia hybrida* cells. **FEBS Letters**, v. 368, p. 339-342, 1995.
- 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**, v. 128, p. 63-72, 2002.
- YAMAMOTO, Y.; KOBAYASHI, Y.; MATSUMOTO, H.** Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminium, but not primary cause of elongation inhibition in pea roots. **Plant Physiology**, v. 125, p. 199-208, 2001.