

CARLOS MOACIR BONATO

EFEITO DO ALUMÍNIO SOBRE A RESPIRAÇÃO RADICULAR E
MITOCONDRIAL EM DOIS CULTIVARES DE MILHO

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2001

CARLOS MOACIR BONATO

EFEITO DO ALUMÍNIO SOBRE A RESPIRAÇÃO RADICULAR E
MITOCONDRIAL EM DOIS CULTIVARES DE MILHO

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

APROVADA : 14 de dezembro de 2001.

Prof. Marco Aurélio Pedron e Silva
(Conselheiro)

Prof. Paulo Roberto Mosquim
(Conselheiro)

Prof. Juraci Alves de Oliveira

Profa. Emy Luiza Ishii-Iwamoto

Prof. José Cambraia
(Orientador)

A Jéssica, minha filha.

A Nicolás e Lucas, meus filhos.

A minha esposa, Andréa.

A meus pais, Azênia e Gregório.

AGRADECIMENTO

A Deus, Ser Supremo, pela luz que me tem iluminado e pela oportunidade de existir.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Biologia Vegetal, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

À Empresa Monsanto, pelo fornecimento do material vegetal, permitindo assim, a realização dos experimentos da tese de Doutorado.

Aos professores que contribuíram para minha formação, especialmente ao Professor José Cambraia, meu orientador, mestre e exemplo de dedicação, a quem admiro profundamente.

A professora Emy Luiza Ishii-Iwamoto, pelo acompanhamento, amparo e pelas sugestões e críticas.

Aos funcionários do Laboratório de Fisiologia Vegetal e do Laboratório de Metabolismo Hepático, Cida, Irene, Nelson, Rose e Sílvia pela colaboração e pelo agradável convívio.

Aos professores do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Maringá, Elena e Valdovino pelo agradável convívio e troca de idéias.

Aos colegas e amigos com os quais tive o prazer e a felicidade de tê-los ao meu lado, em especial, a Denise e ao Marcelo, que sempre me estenderam o ombro amigo diante das dificuldades.

Aos meus irmãos, sogros, cunhados e sobrinhos, pelo carinho demonstrado nas horas mais difíceis.

BIOGRAFIA

CARLOS MOACIR BONATO, filho de Gregório Augusto Bonato e Azênia Pulh Bonato, nasceu em Espumoso, RS, em 14 de dezembro de 1965.

Em junho de 1987 ingressou na Universidade de Passo Fundo, em Passo Fundo, RS, diplomando-se Engenheiro-Agrônomo em agosto de 1992.

Em março de 1993 iniciou o Curso de Mestrado em Fisiologia Vegetal, na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, defendendo tese, em fevereiro de 1996.

Em março de 1996 iniciou o Curso de Doutorado em Fisiologia Vegetal, na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, defendendo tese, em dezembro de 2001.

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	. viii
ABSTRACT.....	.x
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	07
2.1. Obtenção do material vegetal.....	07
2.2. Solução de alumínio.....	07
2.3. Determinação dos teores de alumínio total.....	08
2.4. Determinação do crescimento radicular.....	08
2.5. Determinação da respiração de ápices radiculares destacados..	09
2.6. Determinação da atividade respiratória em mitocôndrias.....	10
2.6.1. Isolamento das mitocôndrias.....	10
2.6.2. Determinação do consumo de oxigênio.....	11
2.6.3. Medida do consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas de plântulas pré-tratadas ou não com alumínio...	11
2.6.4. Determinação dos efeitos da adição de alumínio sobre o consumo de oxigênio de mitocôndrias isoladas.....	12
2.7. Determinação da atividade de enzimas ligadas à cadeia respiratória.....	13

2.7.1. Obtenção das mitocôndrias rompidas.....	13
2.7.2. Determinação das atividades da NADH e da succinato citocromo c oxidoreductase.....	13
2.8. Determinação do transporte de Pi na membrana mitocondrial interna	13
2.9. Determinação da atividade de algumas enzimas envolvidas na respiração.....	14
2.9.1. Preparo do extrato enzimático.....	14
2.9.2. Determinação da atividade desidrogenase do malato.....	14
2.9.3. Determinação da atividade da fumarase.....	15
2.9.4. Determinação da atividade da desidrogenase do isocitrato...	15
2.10. Determinação da atividade da desidrogenase alcoólica.....	15
2.11. Delineamento experimental.....	16
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
3.1. Efeito do alumínio no crescimento radicular.....	17
3.2. Teor de alumínio total em plântulas crescidas na presença ou não de alumínio.....	21
3.3. Efeito do alumínio na respiração de ápices radiculares.....	22
3.4. Efeito do alumínio em mitocôndrias isoladas de plântulas pré- tratadas com alumínio.....	41
3.5. Efeito do alumínio em mitocôndrias isoladas de plântulas não tratadas com alumínio.....	53
3.6. Efeito do alumínio na atividade da NADH e da succinato citocromo c oxidoreductase.....	71
3.7. Efeito do alumínio sobre o inchamento mitocondrial.....	76
3.8. Efeito do alumínio sobre a atividade enzimática.....	79
3.8.1. Desidrogenase do malato	79
3.8.2. Desidrogenase do malato mitocondrial.....	79

3.8.3. Fumarase.....	82
3.8.4. Desidrogenase do isocitrato.....	83
3.8.5. Desidrogenase alcoólica.....	84
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

RESUMO

BONATO, Carlos Moacir, D. S., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2001. **Efeito do Alumínio sobre a Respiração Radicular e Mitocondrial em Dois Cultivares de Milho.** Professor Orientador: José Cambraia. Professores Conselheiros: Marco Aurélio Pedron e Silva e Paulo Roberto Mosquim.

Neste trabalho foram estudados os efeitos do Al sobre alguns aspectos da respiração e sobre a atividade de algumas enzimas do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e do processo fermentativo, em dois cultivares de milho, um sensível (AG 122) e outro tolerante (AG 5011) ao Al. As plântulas dos dois cultivares, cultivadas em solução nutritiva, pH 4,0, durante 3 dias, foram tratadas com Al (0 e 185 μ M) durante 0, 12, 24, 48 e 72 h. Determinaram-se, então, o crescimento radicular, o teor de Al, a taxa respiratória e a atividade da rota citocromo e da rota alternativa em ápices radiculares. Em mitocôndrias, isoladas de plântulas tratadas ou não com Al, durante 72 h, determinaram-se o consumo de oxigênio nos estados 3 e 4, a relação ADP/O e o coeficiente de controle respiratório, na presença ou não de Al adicionado ao meio de reação. Em mitocôndrias isoladas de plântulas crescidas na ausência de Al determinou-se, também, o efeito do Al sobre a atividade de algumas enzimas ligadas à cadeia transportadora de elétrons, ao ciclo dos ácidos tricarboxílicos e ao processo fermentativo. O tratamento com Al resultou em redução do crescimento radicular nos dois cultivares, principalmente no cultivar sensível, tendo a diferença entre eles aumentada com o tempo de exposição a este elemento. O Al acumulou-se, predominantemente, no sistema radicular, mas

os cultivares não diferiram entre si. A respiração total nos ápices radiculares destacados foi severamente reduzida na presença de Al e sua intensidade aumentou com o tempo de exposição das plantas, tendo o cultivar sensível sido, em geral, mais afetado. A atividade da rota citocromo nos ápices radiculares decresceu na presença de Al nos dois cultivares, especialmente no cultivar sensível. A atividade da rota alternativa decresceu, também, na presença de Al, mas apenas no cultivar sensível. O Al, de maneira geral, inibiu a respiração no estado 3 e o coeficiente de controle respiratório nas mitocôndrias isoladas de plântulas crescidas na presença de Al, tendo sido o cultivar sensível, em geral, mais afetado. O Al, aplicado apenas no meio de reação, praticamente não teve efeito significativo sobre a atividade mitocondrial. A única exceção ocorreu quando se utilizou o L-malato como substrato. Neste caso, na presença de Al, observou-se redução na atividade respiratória durante o estado 3 e da rota citocromo nos dois cultivares. Todas as variáveis de respiração analisadas, na presença de Al, foram mais elevadas no cultivar tolerante, exceto a relação ADP/O. As plântulas dos dois cultivares, crescidas na presença de Al, apresentaram as atividades das enzimas NADH e da succinato citocromo c oxidoredutase inibidas pelo Al. Sob esta condição, o cultivar tolerante apresentou maior atividade da NADH citocromo c oxidoredutase, mas não se observou diferença estatística entre os cultivares quanto à succinato citocromo c oxidoredutase. De modo geral, a absorção de fosfato por mitocôndrias, isoladas de plântulas crescidas na presença de Al ou naquelas preparações em que o Al foi adicionado apenas ao meio de reação, decresceu na presença de Al. A velocidade de inchamento mitocondrial reduziu com o aumento da concentração do Al no meio de reação, mas os dois cultivares não diferiram entre si. A atividade da desidrogenase do malato no extrato enzimático bruto decresceu na presença do Al, nos dois cultivares. Quando o Al foi adicionado apenas no meio de reação, a atividade da isoforma mitocondrial, contudo, não foi significativamente alterada nos dois cultivares. A atividade da fumarase aumentou na presença de Al, mas os cultivares não diferiram entre si. A atividade da desidrogenase alcoólica decresceu fortemente na presença de Al e o cultivar tolerante, independentemente da presença de Al, apresentou maior atividade do que o cultivar sensível.

ABSTRACT

BONATO, Carlos Moacir, D.S., Universidade Federal de Viçosa, december, 2001. **Aluminum effect on the root and mitochondrial respiration in two corn cultivars.** Adviser: José Cambraia. Committee members: Marco Aurélio Pedron e Silva e Paulo Roberto Mosquim.

The effects of Al on some aspects of the respiratory metabolism and on the activity of some enzymes of the tricarboxylic acid cycle and of the fermentative process in two corn cultivars, one Al-sensitive (AG 122) and other Al-tolerant (AG 5011) were studied. Seedlings of the two cultivars, grown in nutrient solution, pH 4,0, for 3 days, were exposed to Al (0 and 185 μ M) for 12, 24, 48 and 72 h and the root growth, the Al content, the respiratory rate and the activities of the cytochrome and of the alternative pathway were determined in root apices. In isolated mitochondria of previously Al treated seedlings for 72 h, the oxygen uptake in the coupled and uncoupled state, the ADP/O ratio and the respiratory control ratio, in the presence or not of added Al to the reaction medium were determined. In isolated mitochondria from seedlings grown in the absence of Al, the effect of this ion on the activity of some enzymes of the electron transfer chain of the tricarboxylic acid cycle and of the fermentative process was also determined. Aluminum reduced the root growth in both cultivars, mainly in Al-sensitive cultivar, and the difference among them increased with the time of exposition to this ion. Aluminum accumulated, predominantly in the root system, but there was no statistical difference

between cultivars. The total respiration in the root apices was severely reduced in the presence of Al and the reduction intensity increased with the time of exposition to Al and, generally, the Al-sensitive cultivar was more affected. The activity of the cytochrome pathway in the root apices decreased in the presence of Al in both cultivars, especially in Al-sensitive cultivar. The activity of the alternative pathway also decreased in the presence of Al, but only in the Al-sensitive cultivar. Generally, Al reduced the respiration rate in the coupled state and the respiratory control ratio in isolated mitochondria of seedlings grown in the presence of Al. The Al-sensitive cultivar, most of the time, was more affected than the Al-tolerant one. When added only to the reaction medium, Al practically did not have significant effect on the mitochondrial activity. The only exception occurred when the L-malate was used as substrate. In this case, it was observed a reduction on the respiration rate during the coupled state and on the activity of cytochrome pathway in both cultivars. In the presence of Al, all studied respiratory variables were higher in Al-tolerant cultivar, except the ADP/O ratio. When the seedlings were grown in the presence of Al, the activities of both NADH and succinate cytochrome c oxidoreductase were inhibited by Al. Under this condition, the Al-tolerant cultivar exhibited larger NADH cytochrome c oxidoreductase activity, but no statistical difference between cultivars was found with respect to succinate cytochrome c oxidoreductase activity. In general, the phosphate uptake by isolated mitochondria from seedlings previously treated with Al or just added to the reaction medium was reduced by Al. The mitochondrial swelling velocity reduced with the increase of Al concentration in the reaction medium, but the two cultivars did not show statistical difference. The malate dehydrogenase activity in the crude enzyme extract decreased in the presence of Al in both cultivars. The activity of the mitochondrial malate dehydrogenase isoform, however, in which Al was only added to the reaction medium, was not affected in both cultivars. The fumarase activity increased in the presence of Al, but there was no difference between cultivars. The alcoholic dehydrogenase activity was strongly reduced in presence of Al and the Al-tolerant cultivar, independent of the presence of Al, exhibited larger enzyme activity than the Al-sensitive cultivar.

1. INTRODUÇÃO

O efeito tóxico do Al nas plantas, especialmente em solos ácidos, tem sido há muito tempo reconhecido como um problema sério na agricultura (ROY et al., 1988; TAYLOR, 1988; KOCHIAN, 1995; PIÑEROS e KOCHIAN, 2001). O Al é o mais abundante metal da crosta terrestre e em solos ácidos ($\text{pH} < 5,5$) a espécie fitotóxica do Al (Al^{3+}) é solubilizada a nível que inibe o crescimento e a produtividade das culturas (KOCHIAN, 1995 e LARSEN et al., 1998). Estima-se que acima de 30% de todo o solo arável mundial seja ácido, portanto, sujeito à ação limitante deste cátion (VON UEXKULL e MUTERT, 1995; KOCHIAN, 1995; PIÑEROS e KOCHIAN, 2001). No Brasil, cerca de 1,8 milhão de km^2 desses solos ácidos está sob o cerrado, o que corresponde a 20% do território brasileiro (EMBRAPA, 1978).

O Al acumula-se, principalmente, no sistema radicular, sendo pequena a quantidade translocada para a parte aérea. A região do ápice das raízes (1 a 2 mm da coifa) parece ser o tecido alvo desse íon (KOLLMEIER et al., 2000; YAMAMOTO et al., 2001) refletindo seus efeitos sobre o sistema radicular das plantas (FOY, 1992; RINCÓN e GONZALES, 1992; DELHAIZE et. al., 1993; DELHAIZE e RYAN, 1995). Em consequência, ocorre rápida redução do crescimento do sistema radicular, considerado como indicativo do estresse de Al em plantas (PAVAN e BINGHAM, 1982 e KINRAIDE, 1991). A inibição do crescimento radicular pode ocorrer em menos de 1 h, após exposição das plantas ao Al (MIYASAKA e HAWES, 2001). Em geral, o Al interfere na absorção, no transporte e na utilização de vários nutrientes e, portanto, reduz os teores destes elementos nas plantas (FOY, 1974; FOY e FLEMING, 1978;

CALBO e CAMBRAIA, 1980; ROY et al., 1988). Em nível celular, o Al interfere com o metabolismo dos açúcares fosforilados, dos nucleotídeos e dos ácidos nucléicos, inclusive DNA (CLARKSON, 1966 e 1969; MATSUMOTO et al., 1976; MINOCHA et al., 1992; SILVA et al., 2000). O Al, forma complexos com o ATP e inibe as atividades das ATPases, inclusive a H⁺-ATPase (PAPERNIK e KOCHIAN, 1997; PEIXOTO et al., 2001; AHN et al., 2001) e outras fosfatases da membrana plasmática, dificultando ou impedindo a utilização da energia contida nas ligações do ATP pelas células (CALBO e CAMBRAIA, 1980). Recentemente tem-se verificado o efeito do Al na peroxidação de lipídios (PEIXOTO et al., 2001; YAMAMOTO et al., 2001), na organização do citoesqueleto (HORST et al., 1999; SIVAGURU et al., 1999 e KOLLMEIER et al., 2001) na permeabilidade da membrana plasmática (AHN et al., 2001), no fluxo de auxinas no ápice radicular (KOLLMEIER et al., 2000) e nos canais de Ca⁺² (HUANG et al., 1992; KINRAIDE, 1998).

Embora a toxicidade do Al tenha sido reconhecida por quase um século (MATSUMOTO, 2000; KOLLMEIER et al., 2001), apenas recentemente têm sido direcionados esforços para elucidar as modificações bioquímicas e/ou fisiológicas associadas ao mecanismo de tolerância das plantas ao Al (FOY e FLEMING, 1978; KOCHIAN, 1995), principalmente no que se refere ao mecanismo pelo qual o Al inibe o alongamento celular (LARSEN et al., 1998; MATSUMOTO, 2000; TAYLOR et al., 2000 e AHN et al., 2001).

Tem sido mostrado que muitas espécies de plantas exibem significativa variabilidade genética em sua capacidade para resistir à toxicidade do Al (DELHAIZE e RYAN, 1995; KOCHIAN, 1995; MA, 2000; MATSUMOTO, 2000). Embora esteja claro que certos genótipos apresentam mecanismos que conferem tolerância ao Al, as bases moleculares e celulares para a tolerância ao Al são ainda pobremente entendidas (LARSEN et al., 1998).

De maneira geral, há duas estratégias básicas que as plantas podem utilizar para resistir à toxicidade do Al: exclusão do Al do ápice radicular e/ou desenvolvimento de capacidade de tolerar a presença do Al no simplasma celular (RYAN e KOCHIAN, 1993; DELHAIZE e RYAN, 1995). No primeiro caso, a planta evita a penetração intracelular do Al, pela adsorção na parede celular; pelo aumento do pH da rizosfera (WENZL et al., 2001), com subsequente polimerização e precipitação do Al; pela formação de complexos

orgânicos com substâncias exsudadas pelas raízes e, finalmente, pela permeabilidade seletiva da membrana plasmática. No segundo caso, a desintoxicação do Al dentro da célula pode ser decorrente da formação de complexos no citoplasma, da combinação do Al com proteínas específicas, da compartimentalização do Al no vacúolo (TAYLOR et al., 2000) e também por um aumento na atividade de certas enzimas (TAYLOR, 1988, 1991; KOCHIAN, 1995 e MARSCHNER, 1997).

Em razão da interação entre o Al e a planta ser bastante complexa, é provável que a planta utilize diferentes mecanismos para alcançar resistência ao Al (LARSEN et al., 1998). Isto é comprovado por estudos genéticos de resistência, os quais mostram que a tolerância se deve a um ou poucos genes maiores, de caráter dominante, e muitos genes menores (ANIOL, 1990; CARVER e OWNBY, 1995; EZAKI et al., 2000; DELHAIZE et al., 2001). Em *Arabidopsis thaliana*, a mutação afeta no mínimo oito *locus* que conferem sensibilidade ao Al, indicando que o Al tem um comportamento complexo na planta (LARSEN et al., 1996 e 1998). Estudos recentes mostram fortes evidências de um mecanismo que resulta na exclusão do Al do ápice radicular pela formação de complexos estáveis do Al com os ácidos orgânicos e/ou fosfato (LARSEN et al., 1998; OSAWA e MATSUMOTO 2001; ZHANG et al., 2001), evitando assim, a ligação do Al com estruturas intra e extracelulares na raiz (LI et al., 2000). Em muitas espécies, incluindo milho (PELLET et al., 1995; KOLLMEIER et al., 2001), trigo (DELHAIZE et al., 1993; BASU et al., 1994), feijão-de-corda (MIYASAKA et al., 1991), Cassia (MA et al., 1997), trigo-mouro (MA et al., 1997), taro (MA e MIYASAKA, 1998) e sorgo (CAMBRAIA et al., 1983), o aumento da resistência ao Al está correlacionado com o aumento na concentração de ácidos orgânicos tais como: citrato, malato, oxaloacetato e o ácido trans-aconítico. Em linhagens isogênicas de milho, o aumento da resistência ao Al parece estar relacionado com a indução do efluxo de malato e de citrato para a rizosfera (DELHAIZE et al., 1993, 2001; ZHANG et al., 2001). Outros estudos têm mostrado que em grande número de genótipos de trigo, a resistência ao Al está fortemente correlacionada com a quantidade de malato liberado pelo ápice radicular, induzido pelo Al (RYAN et al., 1995). Um mecanismo similar tem sido descrito em cultivar de milho resistente ao Al, que mostrou liberar citrato em resposta ao Al (PELLET et al., 1995). Mais

recentemente foi demonstrado que fosfato orgânico excretado pelas raízes pode, ao lado de ácidos orgânicos, também, conferir maior tolerância ao Al a certos genótipos de trigo (PELLET et al., 1996; OSAWA e MATSUMOTO, 2001). Outro mecanismo de exclusão do Al, que tem sido freqüentemente proposto, é a elevação do pH na região adjacente ao ápice radicular (KOCHIAN, 1995). Uma vez que a solubilidade do Al é dependente do pH, o aumento no pH da rizosfera, reduz a atividade do Al e, portanto, sua absorção pelas raízes. Todavia, nenhuma evidência direta para este mecanismo de exclusão tem sido encontrada. Estas reações da planta parecem ser mais o resultado do estresse causado pelo Al, do que propriamente um mecanismo de tolerância (WENZL et al., 2001).

O efeito primário da toxicidade do Al manifesta-se por uma rápida inibição do crescimento radicular, o que parece resultar de uma interação complexa entre o Al e o ápice radicular (RYAN et al., 1993). Uma vez que a resposta é rápida (menos de 1 h), provavelmente, é o alongamento celular e não a divisão celular o primeiro processo a ser inibido nas raízes (SILVA et al., 2000). Todavia, com o aumento do tempo de exposição ao Al, a inibição do crescimento radicular deve incluir ambos os processos: bloqueio na divisão e inibição do alongamento celular (KOCHIAN, 1995). As bases bioquímicas e moleculares da toxicidade ao Al não são bem conhecidas, mas é provável que grande número de processos associados ao simplasto e ao apoplasto radicular sejam influenciados pelo Al.

Alguns trabalhos mostram que raízes de plântulas de trigo expostas ao Al apresentam também, em poucas horas, aumento na atividade de enzimas fermentativas tais como a desidrogenase alcoólica (COPELAND e DE LIMA, 1992). Esta enzima é induzida em tecidos de plantas sob condições de hipoxia (JOHN e GREENWAY, 1976; SACHS e HO, 1986; RIVOAL et al., 1989), o que sugere interferência no processo respiratório do sistema radicular (DE LIMA e COPELAND, 1994). Poucos trabalhos têm sido direcionados ao estudo do efeito do Al sobre a respiração de raízes, mesmo sabendo-se que este elemento tem seu efeito fitotóxico primário no ápice radicular (TAYLOR, 1988), tecido este que possui alta atividade respiratória (LAMBERS, 1985). Baixa taxa de consumo de O₂ foi observada em ápices de raízes de cevada, somente após 3 horas de exposição ao Al, o que sugere uma interferência na absorção

de Ca e outros íons (CLARKSON, 1969). Entretanto, SAMPSON et al. (1965) concluíram que a redução na taxa respiratória em plântulas de cevada tratadas com Al foi um efeito secundário, uma vez que a inibição na divisão celular precedeu ao decréscimo no consumo de O₂. Ápices de raízes de plântulas de sorgo e milho tratados com Al também apresentaram baixa atividade respiratória (BENNET et al., 1985; PFEFFER et al., 1986; KELTJENS, 1988), embora nenhuma alteração ultraestrutural tenha sido observada nas mitocôndrias de raízes de milho expostas ao Al (BENNET et al., 1985). Plântulas de *Phaseolus vulgaris* expostas ao Al alteraram a maneira pela qual a atividade respiratória foi alocada entre os processos de crescimento e de manutenção. Após a remoção do estresse com Al, as plântulas do cultivar tolerante recuperaram o crescimento e a respiração radicular. Já o cultivar sensível, além de não recuperar o crescimento apresentou redução na respiração (CUMMING et al., 1992). O Al parece inibir o consumo de O₂ por mitocôndrias isoladas de mesocarpo de abacate (STEWART e COPELAND, 1993). Concentrações sub-letais de Al reduziram a atividade de mitocôndrias isoladas, em cultivares sensíveis e tolerantes de trigo (CZUBA, 1985) e em raízes intactas de milho (PFEFFER et al., 1986), com significativa redução do nível de ATP (CUMMING et al., 1992). DE LIMA e COPELAND (1994), estudando o efeito do Al na respiração de raízes de trigo, verificaram que a adição de 75 µM de Al no meio de crescimento de plântulas de 4 dias, inibiu o consumo de O₂ de ápices radiculares. Este decréscimo na taxa de respiração foi inicialmente causado pela inibição da rota citocromo da cadeia transportadora de elétrons. A rota alternativa (insensível ao cianeto) foi inibida somente após maior tempo de exposição ao Al. Mitocôndrias isoladas de raízes de plântulas de trigo tratadas com Al tiveram baixa capacidade de oxidação de substratos que suprem elétrons para os complexos 1 e 2, comparadas com as mitocôndrias das raízes de plântulas não tratadas com Al (controle). O estado 3 e 4 de consumo de oxigênio, bem como a respiração desacoplada na presença desses substratos, foram também inibidas quando o Al foi aplicado diretamente no meio de reação contendo mitocôndrias isoladas de plantas não tratadas. Em contraste, quando o Al foi adicionado ao meio de reação contendo apenas NADH como substrato, o estado 4 de consumo de O₂ foi estimulado. Entretanto, nenhum efeito foi observado no estado 3 ou na respiração na

presença do desacoplador. Os resultados obtidos por estes autores sugerem que o Al inicialmente afeta o fluxo de elétrons através do complexo 1 e 2, e que, após maior tempo de exposição ao Al, o mesmo pode interagir com outros sítios na mitocôndria.

A respiração em plantas consiste de duas rotas de transporte de elétrons. A rota citocromo oxidase sensível ao cianeto é acoplada a três sítios de conservação de energia (DOUCE e NEUBURGER, 1989). A rota alternativa insensível ao cianeto ramifica-se da rota citocromo oxidase no *pool* de ubiquinona, e não há conservação de energia após este ponto (DOUCE e NEUBURGER, 1989). A avaliação destas diferentes rotas é possível com uso criterioso de inibidores da respiração tais como o ácido salicilhidroxâmico (SHAM) e o cianeto de potássio (KCN). O primeiro é inibidor da rota alternativa enquanto o segundo é inibidor da rota citocromo.

A maior parte das informações existentes sobre a influência do Al na respiração radicular atem-se a umas poucas espécies e os resultados além de incompletos são, às vezes, até conflitantes. Por esta razão resolveu-se realizar este estudo que tem por objetivo, avaliar o efeito do Al sobre a respiração de ápices radiculares destacados e mitocôndrias isoladas, utilizando dois cultivares de milho, com tolerância diferencial ao Al. Para melhor compreender a natureza das alterações bioquímicas e fisiológicas estudou-se a influência do Al sobre a atividade das rotas citocromo e alternativa e sobre algumas enzimas ligadas à cadeia de transporte de elétrons, do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e do processo fermentativo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Nos experimentos, foram utilizados dois cultivares de milho (**Zea mays** L.), com tolerância diferencial ao Al, sendo o AG 122 o cultivar sensível e o AG 5011 o cultivar tolerante ao Al, ambos fornecidos pela Empresa Monsanto.

2.1. Obtenção do material vegetal

As sementes selecionadas quanto ao tamanho e forma foram colocadas para germinar em cartuchos de papel toalha (pH neutro) imersos em vasos contendo solução nutritiva como descrita por COPELAND e DE LIMA (1992), constituída de: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 2 mM, KNO_3 2 mM, NH_4Cl 0,43 mM, MgSO_4 0,75 mM NaH_2PO_4 20 μM e FeCl_3 27 μM (pH 4,0) (LARKIN, 1987). Após 3 dias, as plântulas foram transferidas para bandejas contendo a mesma solução nutritiva modificada, de modo a conter a concentração de Al necessária para os diferentes experimentos. Todos os experimentos foram conduzidos em câmara de crescimento com temperatura controlada (25°C), fluxo de fótons de 230 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h. As bandejas receberam arejamento contínuo, e o pH da solução nutritiva foi mantido em 4,0 com ajustes diários pela adição de HCl 0,1 M ou KOH 0,1 M.

2.2. Solução de alumínio

O Al, em todas as soluções nutritivas, foi adicionado a partir de uma solução estoque de 0,1 M, na forma de $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ em 0,5 % (v/v) de HNO_3 (ácido nítrico). De acordo com o cálculo feito pelo programa GEOCHEM-PC

(Versão 2.0), aproximadamente 43,3 % do Al adicionado (185 μM) na solução nutritiva no pH 4,0, foi estimado estar presente como $\text{Al}^{3+} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 31,4 % com SO_4^{-2} , 22,5% na forma sólida com sulfato, 0,2% com H_2PO_4^- e 2,6% na forma de hidróxido.

2.3. Determinação dos teores de alumínio total

As plântulas, após exposição ou não a 185 μM de Al durante 72 h, foram removidas das bandejas, lavadas em água corrente e desmineralizada, secas em papel-toalha e divididas em parte aérea e sistema radicular. A matéria seca da parte aérea e do sistema radicular foi obtida após a secagem do material vegetal em estufa, a 75°C, até peso constante. Amostras de 100 mg de matéria seca de cada unidade experimental, previamente triturada em moinho elétrico (WIG-L-BUG AMALGAMATOR), foram submetidas à digestão nítrico-perclórica (ALLAN, 1969) e o Al determinado, no extrato nítrico-perclórico, pela técnica da aluminona (WANG e WOOD, 1973) a 525 nm em espectrofotômetro HITACHI modelo U-3000.

2.4. Determinação do crescimento radicular

Plântulas de 3 dias, obtidas como descrito no item 2.1, após medição do comprimento da raiz principal (CI) foram transferidas para a solução nutritiva contendo ou não 185 μM de Al. O comprimento da raiz principal foi, novamente, medido após 12, 24, 48 e 72 h de tratamento (CF) e o crescimento radicular (CR) avaliado pela fórmula:

$$\text{CR} = \text{CF} - \text{CI}$$

em que

CF= Comprimento da raiz principal ao final de cada tratamento (cm)

CI = Comprimento inicial (cm)

2.5. Determinação da respiração de ápices radiculares destacados

Ápices radiculares de 0,7 cm, a partir da porção terminal, obtidos de plântulas de 3 dias, expostas ou não ao Al (185 μ M), na forma de $KAl(SO_4)_2$, tiveram sua atividade respiratória determinada após 12, 24, 48 e 72 h de tratamento.

O consumo de O_2 foi determinado polarograficamente a 25 °C, utilizando-se eletrodo específico para O_2 do tipo clark inserido em uma câmara de acrílico. As raízes, após terem sido retiradas das bandejas, foram lavadas em água desmineralizada, e aproximadamente 30 mg de ápices radiculares (0,7 cm de comprimento), foram colocados imediatamente em uma câmara de acrílico contendo 2 ml de solução nutritiva (COPELAND e DE LIMA, 1992), na ausência de Al e de $FeCl_3$, com o pH previamente ajustado para 5,8. À solução nutritiva contendo os ápices radiculares foram adicionados os inibidores, ácido salicilhidroxâmico (SHAM 5,0 mM), diluído em 2-metoxietanol, e ou cianeto de potássio (KCN 0,2 mM), para se obter as seguintes variáveis estabelecidas por AZCON-BIETO et al. (1983):

- V_t – taxa de consumo de O_2 na ausência dos inibidores (SHAM e KCN);
- v_{cit} – atividade da rota citocromo, estimada pelo consumo de O_2 na presença de SHAM 5 mM;
- v_{alt} – atividade da rota alternativa, estimada pelo consumo de O_2 inibido por SHAM 5 mM;
- V_{alt} – capacidade da rota alternativa, estimada pela taxa de consumo de O_2 não inibida pelo uso de KCN 0,2 mM;
- p – grau de acoplamento da rota alternativa (v_{alt}/V_{alt});
- v_{res} – taxa residual de consumo de O_2 após uso de SHAM 5 mM e KCN 0,2 mM.

O consumo de O_2 foi determinado durante 8 a 12 minutos, e os ápices removidos da câmara de acrílico, secos em papel-toalha e imediatamente pesados em balança analítica.

2.6. Determinação da atividade respiratória em mitocôndrias

2.6.1. Isolamento das mitocôndrias

Dois protocolos experimentais foram utilizados para se avaliar os efeitos do Al sobre a respiração de mitocôndrias isoladas. No primeiro, as mitocôndrias foram isoladas de raízes de plântulas crescidas na ausência (controle) ou presença de Al (185 μ M) durante 72 h e avaliou-se a taxa de consumo de oxigênio dependente da oxidação de diferentes substratos. No segundo protocolo, as mitocôndrias foram isoladas de plântulas de 3 dias na ausência de Al, e avaliou-se a taxa de consumo de oxigênio das suspensões mitocondriais em meio de incubação, contendo concentrações variáveis de Al.

O isolamento foi feito essencialmente pelo método descrito por DAY e HANSON (1977). Vinte a 40 g de raízes foram fragmentados, em meio de extração (4°C) constituído de manitol 0,4 M, Tris-HCl (pH 7,2) 50 mM, EDTA 1 mM, $MgCl_2$ 1 mM, cisteína 0,1 % (p/v) e albumina bovina livre de ácidos graxos 0,5 % (p/v) e rapidamente homogeneizados. O homogeneizado, após ter sido filtrado através de 4 camadas de gaze e ter o pH ajustado para 7,2, foi submetido à centrifugação a 1.000 x g, por 10 min. O sobrenadante foi novamente centrifugado a 15.000 x g, por 10 min, e o sedimento resultante, ressuspenso em 2 ml do meio constituído de manitol 0,4 M, EDTA 1 mM, HEPES 20 mM (pH 7,2) e albumina bovina livre de ácidos graxos 0,2 % (p/v). Esta suspensão constituiu o extrato bruto de mitocôndrias.

Para os testes de inchamento (*swelling*) mitocondrial, o manitol foi substituído por sacarose 0,25 M.

A purificação de mitocôndrias foi feita em gradiente de Percoll®, essencialmente 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 0,25 M, HEPES 10 mM e albumina bovina livre de ácidos graxos 0,2 % (p/v). 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 x g, por 30 min. A banda formada logo acima do Percoll® 45 % foi coletada e ressuspensa numa solução, constituída de manitol 0,3 M, EDTA 1,0 mM, HEPES 20 mM e

albumina bovina livre de ácidos graxos 0,2 % (p/v) e submetida à centrifugação a 15. 000 x g, por 15 min. O sedimento obtido foi ressuspenso em cerca de 1,0 a 1,5 ml do meio de suspensão, anteriormente mencionado e constituiu a fração purificada de mitocôndrias. Todos os procedimentos foram realizados entre 0 e 4 °C.

2.6.2. Determinação do consumo de oxigênio

O consumo de O₂ foi medido polarograficamente, a 25 °C, através de um eletrodo de oxigênio do tipo clark inserido em uma câmara de incubação de acrílico termostatizada. As mitocôndrias foram incubadas em 1,5 ml do meio de reação contendo manitol 0,35 M, TES-KOH 10 mM (pH 7,2), albumina bovina livre de ácidos graxos 0,1% (p/v), KH₂PO₄ 5 mM e MgSO₄ 2 mM.

2.6.3. Medida do consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas de plântulas pré-tratadas ou não com alumínio

O consumo de O₂ de mitocôndrias obtidas de raízes de plântulas de milho pré-tratadas durante 72 h com Al na concentração de 185 µM, em solução nutritiva foi medido polarograficamente a 25 °C com um eletrodo de O₂ tipo clark inserido em uma câmara de acrílico termostatizada. As alíquotas de mitocôndrias (0,1 a 0,6 mg de proteínas) foram incubadas em 1,5 ml de meio de reação constituído de manitol 0,35 M, TES-KOH 10 mM (pH 7,2), KH₂PO₄ 5 mM, NaCl 10 mM, MgSO₄ 2 mM e albumina bovina livre de ácido graxo 0,1% (p/v). Como substratos foram utilizados uma mistura contendo succinato 10 mM, L-malato 10 mM, L-glutamato 10 mM e NADH 1 mM. Em outra série experimental utilizaram-se os mesmos substratos, entretanto, de modo individual. Neste caso, além dos substratos citados anteriormente utilizou-se ainda o piruvato. Utilizaram-se os cofatores NAD⁺ e TPP (tiamina pirofosfato) quando conveniente. A respiração acoplada foi iniciada pela adição de ADP na concentração final de 100 µM. A velocidade de consumo de O₂ foi expressa em nmol de O₂ min⁻¹ mg⁻¹ de proteína. O teor de proteína na suspensão mitocondrial, para todos os ensaios, foi determinado pelo método de LOWRY et al. (1951).

A respiração acoplada e desacoplada da mitocôndria foi calculada a partir dos registros obtidos durante o consumo de O_2 na presença de ADP e após todo o ADP ser fosforilado, respectivamente, para todos os substratos citados. A razão ADP/O foi calculada como sendo a razão entre o número de moles de ADP adicionados e o número de átomos grama de O_2 consumido no estado 3 (ESTABROOK, 1967). O coeficiente de controle respiratório (CR) foi calculado como sendo a razão entre a velocidade de consumo de oxigênio no estado 3 e no estado 4, de acordo com CHANCE e WILLIAMS (1955) .

2.6.4. Determinação dos efeitos da adição de alumínio sobre o consumo de oxigênio de mitocôndrias isoladas

Mitocôndrias isoladas do sistema radicular de plântulas de 3 dias não tratadas com Al foram incubadas por 10 min, a 25 °C, no meio de reação (item 2.6.3) contendo Al nas concentrações de 0 a 400 μM , na ausência de P_i . Após 10 min de incubação, 2,5 mM de KH_2PO_4 foi adicionado, e em seguida, a mistura dos substratos: L-malato 10 mM, L-glutamato 10 mM, succinato 10 mM e NADH 1mM. A partir dos registros polarográficos obtidos foram calculados o consumo de O_2 no estado 3 e 4, a razão ADP/O e o coeficiente de controle respiratório (CR).

Em outra série experimental, utilizou-se apenas uma concentração de Al (185 μM) e determinaram-se além dos parâmetros citados anteriormente a atividade da rota citocromo e a atividade da rota alternativa, pela adição de KCN 0,1 mM e de SHAM 2 mM, durante o estado 3 de consumo de O_2 . Para esta série experimental utilizaram-se todos os substratos separadamente conforme descrito no item 2.6.3.

2.7. Determinação da atividade de enzimas ligadas à cadeia respiratória

2.7.1. Obtenção das mitocôndrias rompidas

As mitocôndrias purificadas (item 2.6.1), foram rompidas por sonicação, utilizando-se 3 períodos de 10 s com intervalos de 1 min entre as sonicações, para se evitar a desnaturação protéica das enzimas. Em seguida congelou-se e descongelou-se a suspensão por uma vez, utilizando nitrogênio líquido. Este material foi utilizado como fonte de enzimas, sendo conservadas em banho de gelo.

2.7.2 Determinação das atividades da NADH e da succinato citocromo c oxidoreductase

Ao meio de reação, constituído de Tris-HCl 10 mM (pH 7,2), albumina bovina livre de ácidos graxos 1% (p/v), citocromo c 70 μ M e KCN 1,0 mM foram acrescentadas diferentes concentrações de Al (0 a 555 μ M) e, em seguida, as mitocôndrias rompidas (0,2 a 0,6 mg de proteína), obtidas como descrito anteriormente. Iniciou-se a reação pela adição de NADH 1,0 mM no caso da NADH citocromo c oxidoreductase e de succinato 10 mM no caso da succinato citocromo c oxidoreductase e mediu-se o decréscimo na absorvância a 550 nm (SINGER, 1974).

No ensaio em que as plântulas cresceram expostas ao Al (185 μ M) em solução nutritiva durante 72 h, não se adicionou o Al no meio de reação.

2.8. Determinação do transporte de Pi na membrana mitocondrial interna

O inchamento de mitocôndrias obtidas de ápices radiculares de plântulas tratadas ou não com Al (185 μ M), durante 72 h em solução nutritiva, ou de plântulas de 3 dias, foi produzido pela absorção de fosfato inorgânico conforme metodologia proposta por RAVANEL et al. (1981). Alíquotas do extrato bruto de mitocôndrias intactas (0,8 a 1,4 mg de proteína) foram incubadas em 1,0 ml do meio de reação, constituído de tampão TES 5,0 mM, pH 7,2 e EGTA 0,1 mM. A reação foi iniciada pela adição de fosfato de amônio (75 mM) após a adição de 0 (controle), 185 e 370 μ M de Al ao meio de reação, no caso de plântulas de 3

dias sem pré-tratamento com Al, e a variação na absorvância foi determinada a 546 nm, em espectrofotômetro HITACHI modelo U-3000.

2.9. Determinação da atividade de algumas enzimas envolvidas na respiração

2.9.1. Preparo do extrato enzimático

Amostras de 500 mg de raízes de milho foram homogeneizadas em almofariz (4°C) com 10 ml de meio de extração constituído de Tris-HCl 50 mM, EDTA 1,0 mM e DTT 2,0 mM (MANICOL e JACOBSEN, 1992). O homogeneizado foi centrifugado a 20.000 x g durante 20 min, e o sobrenadante utilizado como extrato bruto de todas as enzimas analisadas, com exceção da desidrogenase do malato mitocondrial.

2.9.2. Determinação da atividade da desidrogenase do malato

- Atividade da desidrogenase do malato no extrato bruto

Ao meio de reação, constituído de HEPES-KOH 50 mM (pH 7,5), EDTA 0,5 mM, NADH 0,2 mM e oxaloacetato 1,0 mM foram adicionados 10 µl do extrato enzimático. A atividade foi determinada pelo decréscimo na absorvância, a 340 nm, a 25°C.

- Atividade da desidrogenase do malato mitocondrial

As mitocôndrias foram isoladas das raízes de plântulas de milho segundo WEDDING et al. (1976). Amostras de 500 mg foram fragmentadas com tesoura e maceradas em 5 ml de meio constituído de manitol 0,5 M, tampão Tris-HCl 70 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM, cisteína 4 mM e albumina bovina 1 mg ml⁻¹, em almofariz de porcelana gelado. O homogeneizado após ter sido filtrado através de 4 camadas de gaze foi centrifugado a 8.000 x g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 3 ml de meio de lavagem, constituído de manitol 0,3 M, tampão Tris-HCl (pH 7,2) e soro albumina bovina 1 % (p/v) e centrifugado a 250 x g, por 10 min, para a

remoção de núcleos, amido, paredes celulares e outras estruturas de alto peso molecular. O sobrenadante resultante foi centrifugado a 12.000 x *g* por 5 min e o sedimento ressuspenso em 3 ml do meio de lavagem anterior e novamente centrifugado a 12.000 x *g* por 5 min. O sedimento contendo as organelas foi suspenso em um volume final de 1 ml do meio, constituído de manitol 0,25 M, Tris-HCl 50 mM (pH 7,2) e MgCl₂ 4 mM e congelado a -20 °C durante 24 h. A suspensão foi descongelada, congelada e descongelada novamente para romper as mitocôndrias. Foram, então, centrifugadas a 22.000 x *g* por 30 min e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático. O ensaio enzimático, neste caso, foi feito segundo KINGSTONSMITH et al. (1997), modificado por KUMAR et al. (2000). A mistura de reação era constituída de 1,5 ml Tris-HCl 100 mM (pH 7,8), MgCl₂ 20 mM, EDTA 1,0 mM, NADH 0,1 mM, oxaloacetato 0,5 mM e 0,1 ml do extrato enzimático para um volume final de 1,0 ml. A reação foi iniciada com a adição do extrato enzimático e a oxidação do NADH determinada em espectrofotômetro HITACHI modelo U-3000, a 340nm.

2.9.3. Determinação da atividade da fumarase

Ao meio de reação constituído de 1,0 ml de L-malato 50 mM, em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 foi adicionado 0,15 ml do extrato enzimático e a atividade enzimática determinada pela variação na absorbância a 240 nm (COPELAND e DE LIMA, 1992).

2.9.4. Determinação da atividade da desidrogenase do isocitrato

Uma alíquota de 0,1 ml do extrato enzimático foi adicionada a 1 ml do meio de reação constituído de tampão Tris-HCl 25 mM (pH 7,4), DL-isocitrato 0,6 mM, MnCl₂ 15 mM e NADP⁺ 1 mM e a atividade determinada pelo aumento da absorbância a 340 nm, a 25°C (COPELAND e DE LIMA, 1992).

2.10. Determinação da atividade da desidrogenase alcoólica

Uma alíquota de 0,1 ml do extrato enzimático foi adicionado ao meio de reação constituído de 1,0 ml de tampão Tris-HCl 50 mM, NAD⁺ 1mM e de n-

propanol 40 mM. A atividade enzimática foi determinada pelo acréscimo da absorvância a 340 nm (COPELAND e DE LIMA, 1992).

2.11. Delineamento experimental

Os tratamentos foram dispostos num esquema fatorial, no delineamento em blocos inteiramente casualizados com repetições variando de no mínimo 3 e no máximo 13. Todos os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e os resultados discriminados pelo teste F, a 5 % de probabilidade. Para a análise estatística utilizou-se o programa SAEG (versão 5.0).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Efeito do alumínio no crescimento radicular

As plantas dos dois cultivares crescidas na ausência de Al não apresentaram comportamento diferencial entre si quanto ao crescimento radicular, nos tempos de 12 e 24 h (Quadro 1). Entretanto, nos tempos de 48 e 72 h o cultivar tolerante apresentou crescimento de aproximadamente 14% maior do que o cultivar sensível.

Quadro 1 – Crescimento da raiz principal (cm) em dois cultivares de milho submetidos a diferentes tempos de exposição ao alumínio

Cultivar	Al (μ M)							
	0				185			
	Tempo (h)				Tempo (h)			
	12	24	48	72	12	24	48	72
Sensível	1,48A	3,52A	6,31B	9,09B	0,94A	2,36B	4,02B	4,55B
Tolerante	1,51A	3,72A	7,22A	10,36A	1,00A	2,75A	4,90A	6,03A

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade.

Na presença de Al os dois cultivares apresentaram diferenças significativas entre si, a partir de 24 h de exposição ao Al. Nos tempos de 24, 48 e 72 h o cultivar tolerante apresentou crescimento radicular 16,5, 21,9 e 32,5 % mais elevado que o cultivar sensível (Quadro 1). O crescimento

radicular parece ser o melhor indicativo, quando se compara a massa, para caracterizar a tolerância diferencial ao Al. As raízes submetidas ao estresse por Al apresentam-se geralmente disformes, necrosadas e principalmente engrossadas (ROY et al., 1988; FOY, 1992). O engrossamento radicular por sua vez pode repercutir em maior massa sem, contudo, representar tolerância diferencial. Assim, quando se tenta discriminar tolerância diferencial de cultivares ao Al, é preferível utilizar-se de variáveis ligadas ao crescimento radicular, principalmente da raiz principal.

Quadro 2 – Efeito do alumínio sobre o crescimento da raiz principal (cm) em dois cultivares de milho

Al (μ M)	Cultivar							
	Sensível				Tolerante			
	Tempo (h)				Tempo (h)			
	12	24	48	72	12	24	48	72
0	1,48A	3,52A	6,31A	9,04A	1,51A	3,72A	7,22A	10,36A
185	0,94B	2,36B	4,02B	4,55B	1,00B	2,75B	4,90B	6,03B

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade.

Quando se compara o efeito do Al dentro de cada cultivar (Quadro 2), observa-se que ambos os cultivares, independentemente do tempo de exposição ao Al, apresentaram redução no crescimento, embora em proporções diferenciadas. Um fato a ser considerado neste experimento foi a detecção do efeito fitotóxico do Al já em 12 h de exposição ao Al. Este resultado demonstra a precocidade dos efeitos fitotóxicos do Al sobre as etapas metabólicas que controlam o crescimento radicular. Conforme demonstrado por vários autores (WALLACE et al., 1982; BENNET e BREEN, 1991; RYAN et al., 1992; RYAN e KOCHIAN, 1993) o alongamento radicular é afetado rapidamente após exposição ao Al, ocorrendo inclusive na mesma hora de exposição a este elemento (JONES e KOCHIAN, 1995; SIVAGURU et al., 1999; SILVA et al., 2000).

As plantas cultivadas por 12 h na presença de Al, apresentaram 36 e 34% de inibição no crescimento radicular nos cultivares sensível e tolerante, respectivamente. Após 24, 48 e 72 h de exposição ao Al as reduções foram de

33, 36 e 50 % para o cultivar sensível e 26, 32 e 42 % para o cultivar tolerante, respectivamente. Observa-se que o Al sempre afetou menos o crescimento radicular do cultivar tolerante do que o cultivar sensível.

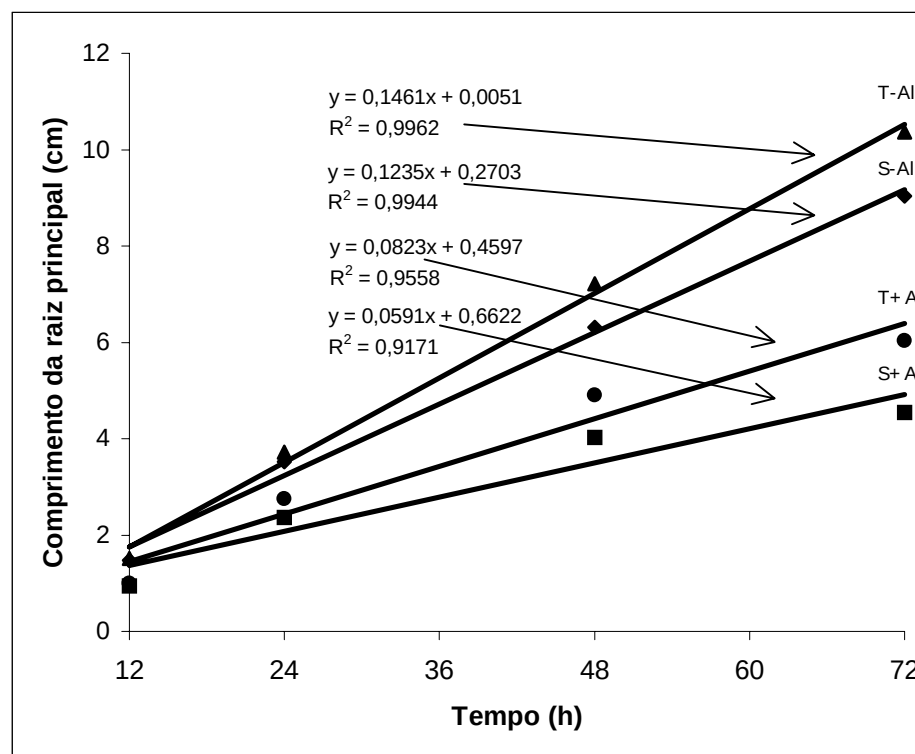


Figura 1 – Comprimento da raiz principal em dois cultivares de milho submetidos a diferentes tempos de exposição ao alumínio. (S=sensível; T= tolerante; Al= alumínio).

O crescimento radicular em função do tempo, avaliado com o uso de regressões (Figura 1), comprova os resultados já descritos. Tanto na ausência como na presença de Al, o cultivar tolerante apresentou maior coeficiente angular, indicando que este cultivar, independentemente da presença ou não de Al, apresenta maiores taxas de crescimento radicular, do que o cultivar sensível. Pelas curvas obtidas observa-se que a diferença entre os cultivares tende a aumentar com o tempo de exposição ao Al.

Há fortes evidências de que o ápice radicular das plantas é o sítio primário de toxicidade e inibição do crescimento radicular (BENNET e BREEN, 1991; RYAN et al., 1993; KOCHIAN, 1995; DELHAIZE e RYAN, 1995; CRAWFORD e WILKENS, 1997) uma vez que o alongamento pode não ser afetado se o Al é seletivamente aplicado à região diferenciada da raiz (RYAN et al., 1993; JONES e KOCHIAN, 1995; KOLLMEIER et al., 2000).

O Al afeta o crescimento radicular provavelmente paralisando a atividade mitótica (CLARKSON, 1969) e a divisão celular (MINOCHA et al., 1992). É fato que o Al inibe, também, a síntese de DNA (MORIMURA e MATSUMOTO, 1978 e WALLACE et al., 1982) mas, a inibição no crescimento radicular foi anterior ao declínio observado na divisão celular. Além disso, o ciclo celular no meristema radicular acontece em aproximadamente 18 a 24 h e, portanto, é pouco provável que o decréscimo na divisão celular esteja relacionado com o rápido decréscimo no alongamento radicular, que ocorre dentro da primeira hora de exposição ao Al (SIVAGURU et al., 1999; SILVA et al., 2000). Segundo KOCHIAN (1995) entre 1 a 2 h de exposição do ápice radicular ao Al, a divisão celular contribui com apenas 1 a 2 % do crescimento radicular total. Tudo indica, portanto, que a interação do Al no alongamento celular, propriamente dito, deve ser o evento primário da ação fitotóxica do Al. O efeito do Al sobre o crescimento diferencial de cultivares tolerante e sensível ao Al, como no caso deste experimento, ainda tem sido motivo de muita controvérsia. Aparentemente, as diferenças de crescimento radicular entre os cultivares testados neste experimento, resultam do cultivar tolerante apresentar maior capacidade de exclusão do Al do ápice radicular evitando sua absorção, uma vez que não houve diferença significativa no teor total de Al (item 3.2) entre os cultivares. Este mecanismo (TAYLOR, 1989 e 1991) poderia envolver a exclusão ativa de Al pela membrana plasmática, a ligação diferencial do Al pela parede celular e a secreção de ácidos orgânicos que complexariam o Al (LI et al, 2000; MA, 2000). O cultivar tolerante, portanto, deve ter mantido maior crescimento radicular mantendo níveis mais baixos do Al no citoplasma. Recentemente, utilizando modernas tecnologias de detecção de Al intracelular por fluorescência, observa-se que quantidade substancial de Al foi encontrado na periferia da célula. As imagens indicaram que o genótipo tolerante ao Al acumulou baixas quantidades de Al nas células meristemáticas e nas células em diferenciação no ápice radicular (SILVA et al., 2000). Estes autores, concluíram que o mecanismo de exclusão tem importante função na tolerância ao Al, o que parece ser o caso desse experimento.

3.2. Teor de alumínio total em plântulas crescidas na presença ou não de alumínio

O teor de Al na parte aérea, independentemente da presença ou não de Al no meio de cultivo e do cultivar testado, não variou significativamente (Quadro 3). É interessante notar, entretanto, que os teores de Al nesta parte da planta foram bem mais baixos do que no sistema radicular.

Quadro 3 - Teor de alumínio na parte aérea e no sistema radicular de dois cultivares de milho na ausência e na presença de alumínio

Teor de Al (mg kg ⁻¹ MS)						
Al (μM)	Parte aérea		Média	Sistema radicular		Média
	Sensível	Tolerante		Sensível	Tolerante	
0	196,1A	235,7A	215,9A	549,1B	696,9B	623,0B
185	175,5A	158,0A	166,8A	1205,1A	1408,2A	1306,6A
Média	185,8A	196,9A		877,1	1052,6	

As médias, seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas, para cada parte da planta, não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade.

O sistema radicular, na ausência de Al, acumulou 2,8 e 3,0 vezes mais Al do que a parte aérea no cultivar sensível e tolerante, respectivamente. Já com a adição de Al na solução nutritiva essa diferença aumentou para 6,9 vezes no cultivar sensível e 8,9 vezes no cultivar tolerante. Fica evidente que o Al é pouco transportado para a parte aérea da planta e, mesmo com o aumento de sua concentração na solução externa, não resulta em aumento proporcional nos teores deste elemento naquela parte. Isto se deve, provavelmente a uma forte interação deste cátion trivalente com várias estruturas no sistema radicular (CLARK, 1977; FOY et al., 1978; ROY, 1988; TAYLOR, 1991), principalmente no apoplasto (LEMOS FILHO et al., 1983; KOCHIAN, 1995), rico em cargas negativas. Em muitos casos, a imobilização do Al na planta tem sido relacionada à sua precipitação na forma de compostos insolúveis, como por exemplo, na forma de fosfato (KOCHIAN, 1995).

O teor de Al nas raízes de plantas expostas a este elemento aumentou significativamente nos dois cultivares (Quadro 3). O cultivar sensível apresentou aumento de aproximadamente 119% no teor de Al, enquanto que

no cultivar tolerante este aumento foi cerca de 102%. Apesar disto, não foram observadas diferenças significativas entre os cultivares. Embora o cultivar tolerante tenha apresentado essencialmente o mesmo teor de Al no sistema radicular, foi capaz de manter seu crescimento (Quadros 1, 2 e Figura 1), respiração (Quadros 4, 5 e Figura 2) e características morfológicas da raiz sempre em níveis mais elevados do que o cultivar sensível. Resultados semelhantes foram obtidos por GONÇALVES (1994) e BONATO (1996) utilizando dois cultivares de sorgo com comportamento diferencial ao Al e que mostraram que o efeito do Al sobre outras variáveis fisiológicas foi sempre menos intenso no cultivar tolerante. Diferenças ou não nos teores de Al em cultivares tolerantes e sensíveis têm sido relatadas (DELHAIZE et al., 1993; RINCÓN e GONZALES 1992). Aparentemente, grande parte destes resultados resulta da utilização de raízes de diferentes tamanhos (RINCÓN e GONZALES 1992) e a aplicação de diferentes tempos de exposição do sistema radicular ao Al (DELHAIZE et al., 1993). Outro fator que pode alterar estes resultados é a porção da raiz analisada. O Al parece se concentrar no ápice radicular (RINCÓN e GONZALES 1992). Por outro lado, pequena ou nenhuma diferença na absorção de Al entre os genótipos (WALLACE et al., 1982; ZHANG e TAYLOR, 1989) pode ser o resultado do uso de seções maiores da raiz, o que pode mascarar as diferenças que ocorreram no ápice radicular. Este parece ser o caso do presente experimento, em que o Al foi determinado em toda a raiz principal e, não somente no ápice radicular.

O teor de Al total, portanto, às vezes, pode não refletir os níveis de Al citotóxico, uma vez que grande parte dele poderia estar ligado no apoplasto sem atingir os sítios metabólicos na célula. O cultivar tolerante pode, portanto, acumular mais Al nesta região e/ou teria maior capacidade de excluir o Al da célula propriamente dita, ou teria ainda, maior capacidade de compartimentalizar o Al em locais de menor comprometimento para o metabolismo celular.

3.3. Efeito do alumínio na respiração de ápices radiculares

A taxa de consumo de oxigênio total (V_t) medida na ausência dos inibidores SHAM e KCN no meio de reação, representa a taxa de respiração total dos ápices radiculares do tecido vegetal analisado (BINGHAM e FARRAR,

1987). A respiração dos ápices radiculares de plântulas dos dois cultivares crescidas na ausência de Al não mostrou diferenças nos tempos considerados, com exceção para o tempo de 12 h, em que o cultivar sensível apresentou uma taxa de consumo de oxigênio 16% maior do que o cultivar tolerante (Quadro 4).

Quadro 4 – Consumo de oxigênio total ($\text{nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ MF}$) por ápices radiculares de dois cultivares de milho após diferentes tempos de exposição ao alumínio

Cultivar	Al (μM)							
	0				185			
	Tempo (h)				Tempo (h)			
	12	24	48	72	12	24	48	72
Sensível	0,87A	0,88A	0,86A	0,91A	0,68A	0,60A	0,45B	0,45B
Tolerante	0,75B	0,85A	0,82A	0,92A	0,58B	0,64A	0,53A	0,60A

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade.

Na presença de Al houve diferenças significativas entre cultivares para os diferentes tempos de exposição, com exceção para o tempo de 24 h (Quadro 4). O cultivar sensível exposto durante 12 h ao Al apresentou taxa de respiração de cerca de 17% maior do que o cultivar tolerante. É bom lembrar que este cultivar, neste tempo, já apresentava maior taxa de respiração na ausência de Al do que o cultivar tolerante. Observa-se que em 24 h de tratamento com Al, os cultivares passaram a não diferir entre si, porque no período de 12 h para 24 h de exposição ao Al, o cultivar sensível teve sua atividade respiratória inibida em 12%, enquanto que no tolerante sua atividade foi aumentada em 10 % (Quadro 4 e Figura 2). O cultivar tolerante no tempo de 24 h de tratamento passou a apresentar taxas respiratórias mais elevadas que o sensível, 18% em 48 h e 33% em 72 h.

O Al interferiu na taxa de consumo de oxigênio nos dois cultivares, independentemente do tempo considerado (Quadro 5). O cultivar sensível apresentou redução na taxa de respiração de cerca de 22, 32, 48 e 51% para os tempos de 12, 24, 48 e 72 h respectivamente, quando comparado com o controle. Já para o cultivar tolerante a inibição foi em média menor, ou seja 23, 25, 35 e 35% para os mesmos tempos considerados.

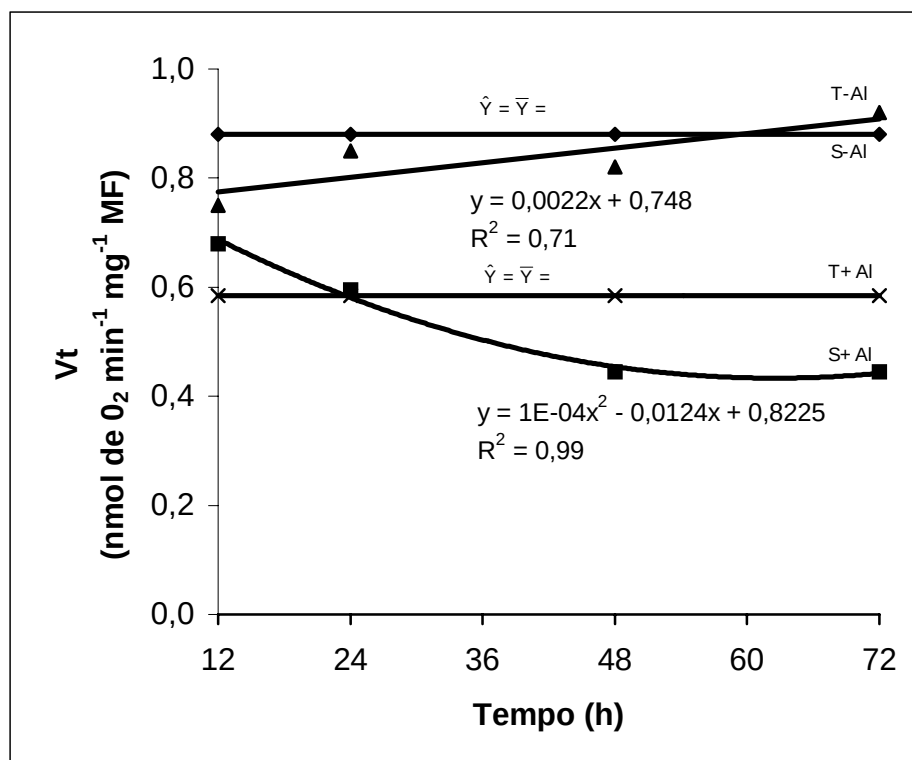


Figura 2 – Consumo de oxigênio (V_t) por ápices radiculares de dois cultivares de milho submetidos a diferentes tempos de exposição ao alumínio. (S= sensível; T= tolerante).

Este cultivar apresentou nos tempos de 24, 48 e 72 h, reduções no consumo total (V_t) de oxigênio 1,4, 1,7 e 1,9 vez menores que o cultivar sensível (Quadro 5). O consumo de oxigênio (V_t) por ápices radiculares no cultivar sensível na ausência de Al não apresentou variações significativas ao longo do tempo de tratamento (Figura 2). O cultivar tolerante, porém, sob as mesmas condições teve sua taxa de consumo de oxigênio aumentada linearmente com o tempo de tratamento. Na presença do Al, enquanto o V_t se manteve essencialmente constante no cultivar tolerante, caiu intensamente no cultivar sensível com o tempo de exposição.

Quadro 5 – Efeito do alumínio no consumo de oxigênio ($\text{nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ MF}$) por ápices radiculares de dois cultivares de milho após diferentes tempos de exposição ao alumínio

Al(μM)	Cultivar							
	Sensível				Tolerante			
	Tempo (h)				Tempo (h)			
	12	24	48	72	12	24	48	72
0	0,87A	0,88A	0,86A	0,91A	0,75A	0,85A	0,82A	0,92A
185	0,68B	0,60B	0,45B	0,45B	0,58B	0,64B	0,53B	0,60B

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade.

Os resultados obtidos em termos de crescimento radicular e de consumo de oxigênio demonstram tendências similares. O cultivar sensível foi, quase sempre, mais prejudicado com a exposição das plântulas ao Al do que o tolerante. Apesar disso, poucos são os trabalhos que relacionam os efeitos fitotóxicos do Al com a respiração e a paralisação e, ou redução do crescimento radicular. A região apical da raiz, mais precisamente a região meristemática, possui alta taxa respiratória (LAMBERS, 1985) e parece ser nesta região, que acontecem alguns dos efeitos da ação fitotóxica do íon Al.

Alguns trabalhos utilizando Al em concentrações baixas mostram redução na respiração, tanto no cultivar tolerante como no cultivar sensível ao Al (CZUBA, 1985; DE LIMA e COPELAND, 1994), inclusive diminuindo os níveis de ATP na planta (CUMMING et al., 1992). Outros experimentos, entretanto, mostram o Al aumentando a respiração radicular (COLLIER et al., 1983), sugerindo a existência de um mecanismo de manutenção do crescimento da planta. Em trigo, exposto a 50 μM de Al observou-se redução no crescimento radicular (50%) após 1 hora de exposição e a paralisação quase completa ocorreu após 6 h de exposição (JONES e KOCHIAN, 1995). Durante a primeira hora, a respiração do ápice radicular não variou, indicando que neste período o metabolismo das células não tenha sido afetado pela presença do Al. Observa-se desse modo, que em raízes de trigo e provavelmente no presente experimento os eventos iniciais que inibem o crescimento radicular não parecem estar diretamente vinculados a respiração do ápice radicular, quando se considera o efeito fitotóxico de Al. Entretanto, sabe-se que a respiração supre esqueletos carbônicos e energia para o

transporte e assimilação de íons necessários aos processos de manutenção e de crescimento. Sob condições de estresse, as plantas podem alterar a alocação de energia do crescimento para a manutenção, apenas mantendo assim, pelo menos parcialmente, o metabolismo e acomodando o custo energético causado pelo estresse (TAYLOR, 1989).

Experimentos com dois cultivares de feijão após tratamento com Al por um período de 72 h, mostraram uma taxa de alongamento radicular no cultivar tolerante similar ao do tratamento controle (COLLIER et al., 1983). No cultivar sensível, entretanto, não se observou recuperação. É interessante observar que no caso do cultivar tolerante, a recuperação do alongamento radicular foi acompanhada por aumento na taxa de respiração radicular, o que não aconteceu com o cultivar sensível. No presente experimento, ambos os cultivares analisados tiveram sua respiração total (V_t) e crescimento reduzidos após tratamento com Al. Os padrões de redução tanto da respiração como do crescimento radicular, entretanto, foram diferenciados entre os cultivares, pelo menos no contexto geral. O cultivar tolerante manteve taxas de crescimento radicular e de respiração sempre mais elevadas do que o cultivar sensível, inclusive sendo progressivo com o tempo (Quadros 4 e 5 e Figura 2). Acredita-se, pois, que o cultivar tolerante poderia, desta forma, manter níveis mais elevados de produção de energia e de esqueletos carbônicos para manter o crescimento em maiores taxas e, ou ter maior capacidade de alocar a energia metabólica para o processo de crescimento do que a cultivar sensível. Não resta dúvida que o cultivar sensível poderia também direcionar parte de seu suprimento metabólico de crescimento para o processo de manutenção e manter o custo energético causado pelo estresse do Al.

O consumo de oxigênio pela rota citocromo, na presença de SHAM (V_{cit}) na ausência do Al, foi muito semelhante nos dois cultivares, em todos os tempos analisados e, não diferiram estatisticamente, exceto em 72 h, quando o cultivar tolerante apresentou um consumo de oxigênio estatisticamente superior (Quadro 6). Na presença do Al os cultivares somente diferiram após 48 e 72 h, tendo o cultivar tolerante apresentado uma atividade da rota citocromo 24 e 36% maior do que o cultivar sensível, respectivamente.

Quando se compara o efeito do Al dentro de cada cultivar (Quadro 7) observa-se que houve grande redução no consumo de oxigênio pela rota

citocromo nas plantas dos dois cultivares crescidas sob estresse de Al. No cultivar tolerante a redução foi significativa apenas em 24 h, enquanto no cultivar sensível isto ocorreu já a partir de 12 h.

Quadro 6 – Consumo de oxigênio pela rota citocromo ($\text{nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ MF}$) por ápices radiculares de dois cultivares de milho submetidos a diferentes tempos de exposição ao alumínio

Cultivar	Al (μM)							
	0				185			
	Tempo (h)				Tempo (h)			
	12	24	48	72	12	24	48	72
Sensível	0,55A	0,62A	0,59A	0,61B	0,45A	0,43A	0,26B	0,25B
Tolerante	0,51A	0,60A	0,59A	0,69A	0,41A	0,43A	0,32A	0,34A

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade.

As reduções no consumo de oxigênio foram de 18, 31, 56 e 59% no cultivar sensível e de 20, 28, 46 e 51% no cultivar tolerante para os tempos 12, 24, 48 e 72 h, respectivamente (Quadro 7). Observa-se que embora os dois cultivares tenham apresentado reduções substanciais e progressivas, o cultivar tolerante apresentou sempre menor grau de inibição, com exceção para o tempo de 12 h.

Na ausência de Al, o *Vcit* aumentou linearmente com o tempo no cultivar tolerante mas não variou no cultivar sensível (Figura 3). Na presença do Al observou-se redução no *Vcit* nos dois cultivares tendo sido a redução mais acentuada no cultivar sensível.

Quadro 7 – Consumo de oxigênio pela da rota citocromo (nmol O₂ min⁻¹ mg⁻¹ MF) por ápices radiculares de dois cultivares de milho submetidos a diferentes tempos de exposição ao alumínio

Al (μM)	Cultivar							
	Sensível				Tolerante			
	Tempo (h)				Tempo (h)			
	12	24	48	72	12	24	48	72
0	0,55A	0,62A	0,59A	0,61A	0,51A	0,60A	0,59A	0,69A
185	0,45B	0,43B	0,26B	0,25B	0,41A	0,43B	0,32B	0,34B

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade.

Estes resultados indicam que o Al reduz o fluxo de elétrons da rota citocromo, e que, de algum modo, este fluxo é mais influenciado no cultivar sensível que no cultivar tolerante.

O fluxo de elétrons pela rota citocromo possibilita a formação do gradiente eletroquímico requerido para a produção de ATP a partir do ADP + Pi pelo complexo ATP sintase. A interferência progressiva do Al no fluxo de elétrons desta rota (Figura 3), sugere que este elemento esteja reduzindo o suprimento energético (ATP) (CUMMING et al., 1992) ou ainda, reduzindo o consumo de ATP do sistema radicular. O fato do cultivar tolerante ter sofrido menor inibição no fluxo de elétrons pelo Al, sugere ter esse cultivar maior suprimento energético para suportar a taxa de crescimento radicular em níveis mais elevados do que o cultivar sensível. Os resultados obtidos neste experimento são similares aos observados por DE LIMA e COPELAND (1994) em trigo, mas, bastante diferentes aos observados por COLLIER et al. (1993) em feijão. Neste último, os autores sugerem que a exposição das plântulas ao Al impõe um aumento na demanda de energia metabólica às plantas como uma forma de compensar as lesões impostas pelo Al.

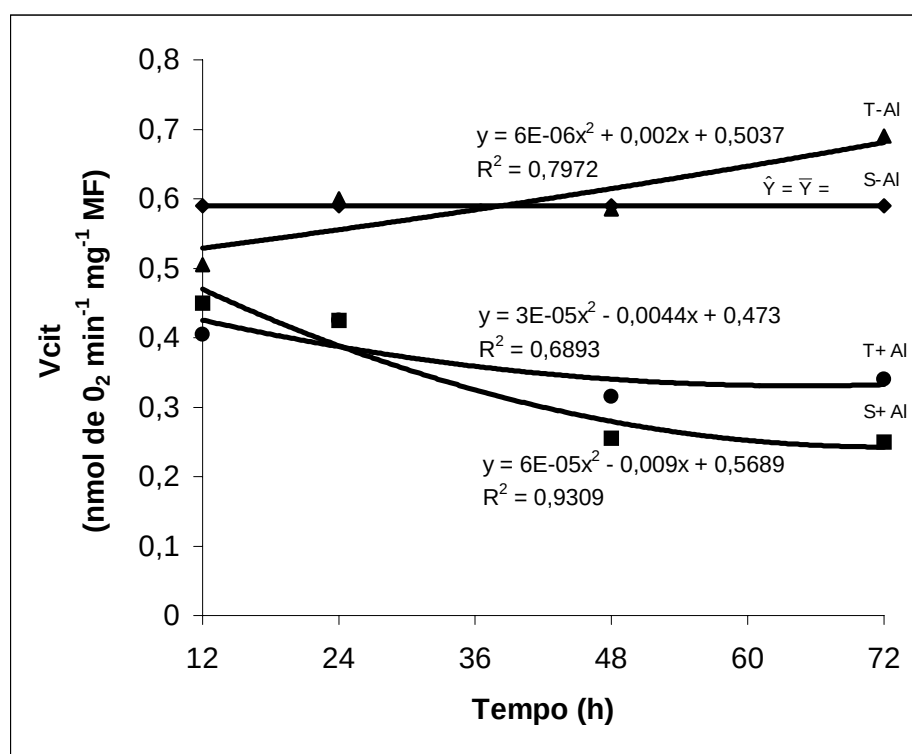


Figura 3 – Consumo de oxigênio pela da rota citocromo (*Vcit*) por ápices radiculares de dois cultivares de milho submetidos a diferentes tempos de exposição ao alumínio. (S=sensível; T= tolerante).

O consumo de oxigênio pela rota alternativa, na presença de SHAM, não foi diferente entre os dois cultivares, independentemente da presença ou não de Al (Quadro 8).

Quadro 8 – Consumo de oxigênio pela rota alternativa (nmol O₂ min⁻¹ mg⁻¹ MF) por ápices radiculares de dois cultivares de milho submetidos a diferentes tempos de exposição ao alumínio

Cultivar	Al (μM)							
	0				185			
	Tempo (h)				Tempo (h)			
	12	24	48	72	12	24	48	72
Sensível	0,18A	0,13A	0,10A	0,12A	0,10A	0,03A	0,06A	0,04A
Tolerante	0,08A	0,08A	0,06A	0,05A	0,04A	0,07A	0,06A	0,09A

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade.

O Al reduziu a *valt* apenas no cultivar sensível, em todos os tempos de tratamento, exceto após 48 h quando não chegou a ser significativo (Quadro 9). Nos tempos de 12, 24, 48 e 72 h, este cultivar teve o consumo de oxigênio pela rota alternativa reduzido em 1,8, 4,2, 1,6, e 3,4 vezes, respectivamente, em relação ao controle.

Quadro 9 – Consumo de oxigênio pela rota alternativa ($\text{nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ MF}$) por ápices radiculares submetidos a diferentes tempos de exposição ao alumínio, em dois cultivares de milho

Al(μM)	Cultivar							
	Sensível				Tolerante			
	Tempo (h)				Tempo (h)			
	12	24	48	72	12	24	48	72
0	0,18A	0,13A	0,10A	0,12A	0,08A	0,08A	0,06A	0,05A
185	0,10B	0,03B	0,06A	0,04B	0,04A	0,07A	0,06A	0,09A

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade.

O cultivar tolerante, independentemente da presença ou não de Al, não sofreu interferência significativa na *valt* com o aumento do tempo de exposição das raízes ao elemento estressante (Figura 4). Já o cultivar sensível, tanto na ausência como na presença de Al mostrou decréscimo com o tempo de exposição. Na presença de Al o decréscimo na *valt* foi sempre maior do que nas plantas controle (Figura 4).

DE LIMA e COPELAND (1994) encontraram, em plantas de trigo, efeito inibitório do Al sobre a *valt* a partir de 48 h de exposição. Já COLLIER et al. (1993), entretanto, não observaram efeito algum do Al no consumo de oxigênio pela rota alternativa em feijão. No presente experimento, o cultivar sensível teve o consumo de oxigênio pela rota alternativa afetado já com 12 h de exposição ao Al (Quadro 9). É provável que o aumento na inibição do consumo de oxigênio pela rota alternativa seja decorrente da ação do Al no fluxo de elétrons da rota citocromo. Todavia, o menor fluxo tanto para a rota citocromo quanto para a rota alternativa, em especial no cultivar sensível, sugere uma influência do Al na rota propriamente dita, ou então, em uma etapa comum para ambas as vias como a produção de substratos, ou ainda na oxidação destes substratos.

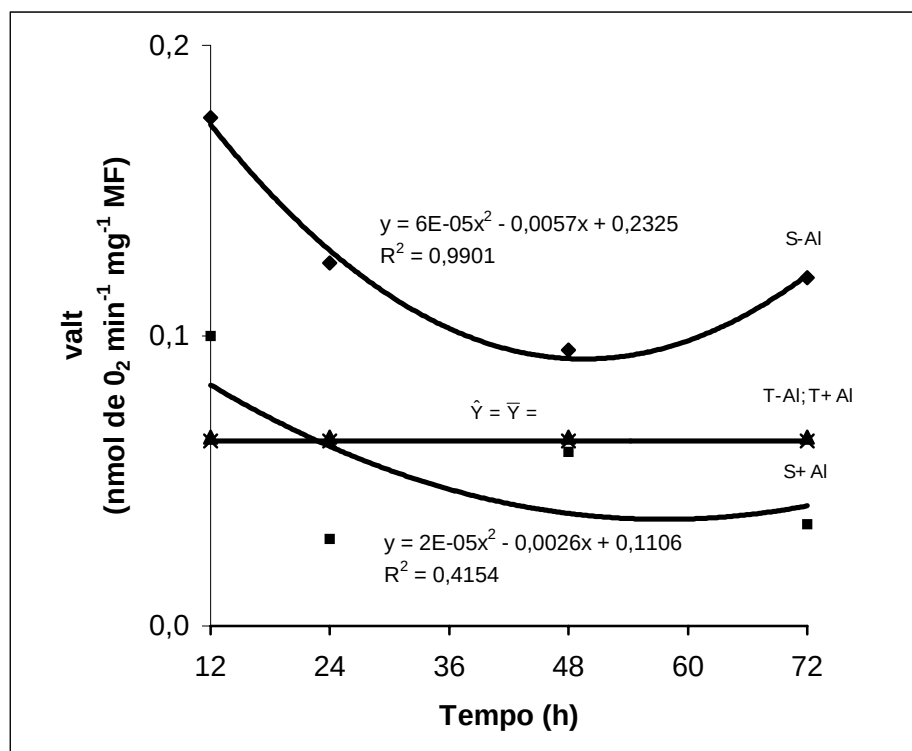


Figura 4 – Consumo de oxigênio pela rota alternativa (*valt*) por ápices radiculares de milho de dois cultivares de milho submetidos a diferentes tempos de exposição ao alumínio. (S= sensível; T= tolerante).

O consumo de oxigênio não inibido por KCN (*Valt*) foi insignificante entre os cultivares, exceto no período de 12 e 72 h em que o cultivar tolerante mostrou maior capacidade da rota alternativa do que o cultivar sensível (Quadro 10). Na presença de Al, os dois cultivares praticamente não diferiram entre si, exceto com 12 h de tratamento em que o cultivar sensível apresentou 33% maior capacidade da rota alternativa do que o cultivar tolerante.

Quadro 10 – Capacidade da rota alternativa ($\text{nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ MF}$) por ápices radiculares de dois cultivares de milho submetidos a diferentes tempos de exposição ao alumínio

Cultivar	Al (μM)							
	0				185			
	Tempo (h)				Tempo (h)			
	12	24	48	72	12	24	48	72
Sensível	0,11B	0,15A	0,12A	0,09B	0,20A	0,19A	0,13A	0,16A
Tolerante	0,15A	0,19A	0,11A	0,18A	0,15B	0,19A	0,11A	0,17A

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade.

O Al aumentou a capacidade da rota alternativa no cultivar sensível, apenas nos tempos de 12 h (82%) e de 72 h (78%) (Quadro 11).

Quadro 11 – Capacidade da rota alternativa ($\text{nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ MF}$) por ápices radiculares de dois cultivares de milho submetidos a diferentes tempos de exposição ao alumínio

Al (μM)	Cultivar							
	Sensível				Tolerante			
	Tempo (h)				Tempo (h)			
	12	24	48	72	12	24	48	72
0	0,11B	0,20A	0,12A	0,09B	0,15A	0,19A	0,11A	0,18A
185	0,20A	0,19A	0,13A	0,16A	0,15A	0,19A	0,11A	0,17A

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade.

O cultivar tolerante, independentemente da presença ou não de Al, não sofreu influência significativa do tempo de exposição (Figura 5). O cultivar sensível, todavia, mostrou tendências complexas. Na ausência de Al, a *Valt* decresceu exponencialmente com o tempo, mas na presença deste elemento, inicialmente houve aumento na capacidade da rota alternativa nos tempos de 12 para 24 h e um decréscimo acentuado a partir de 24 h.

Os resultados obtidos para os dois cultivares quanto a capacidade da rota alternativa foram complexos, tanto quando considerados individualmente, como também quando considerados em conjunto no tempo e, são de difícil interpretação. O cultivar tolerante, entretanto, apresentou maior estabilidade da

capacidade da rota alternativa do que o cultivar sensível, quando avaliadas no tempo.

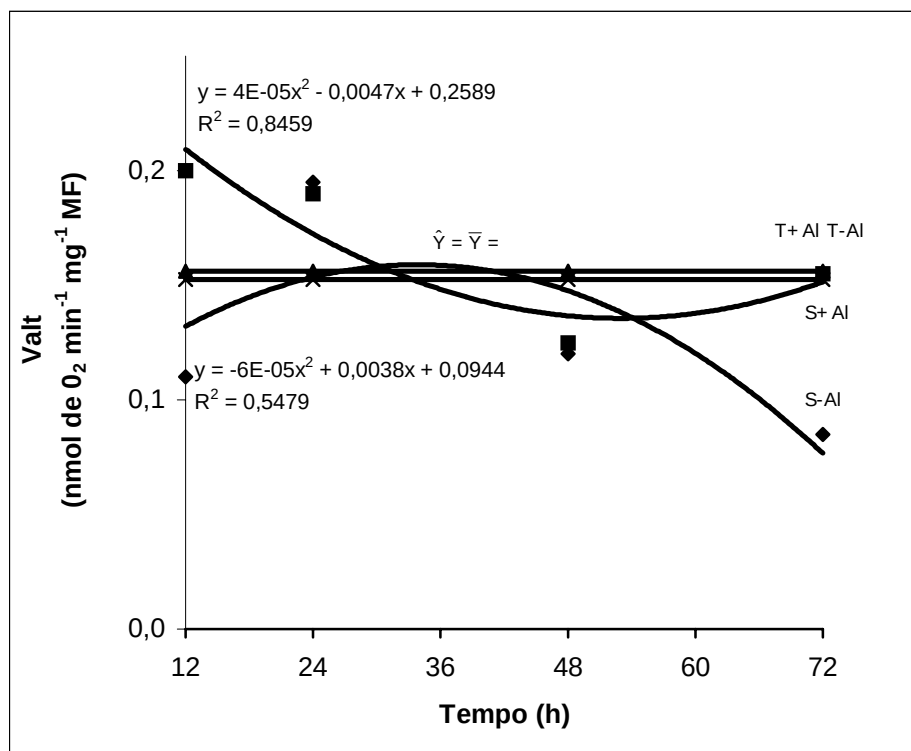


Figura 5 – Consumo de oxigênio pela da rota alternativa (*V_{alt}*) por ápices radiculares de dois cultivares de milho submetidos a diferentes tempos de exposição ao alumínio. (S= sensível; T= tolerante).

A presença de Al na solução nutritiva acarretou reduções substanciais na relação *V_{cit}/v_{alt}* nos dois cultivares (Quadro 12). O cultivar sensível apresentou reduções de 2,2, 1,5, 2,5 e 4,7 vezes nos tempos de 12, 24, 48 e 72 h, respectivamente, e apenas no tempo de 24 h a diferença não foi significativa. O cultivar tolerante apresentou reduções menores que o cultivar sensível que foram significativas apenas nos tempos de 48 (2,0 vezes) e 72 h (2,1 vezes).

Quadro 12 – Razão entre o consumo de oxigênio pela rota citocromo e a rota alternativa por ápices radiculares submetidos a diferentes tempos de exposição ao alumínio, em dois cultivares de milho

Al (μ M)	Cultivar							
	Sensível				Tolerante			
	Tempo (h)				Tempo (h)			
	12	24	48	72	12	24	48	72
0	5,13A	3,30A	5,22A	7,68A	4,26A	3,86A	5,74A	4,24A
185	2,33B	2,25A	2,10B	1,64B	2,99A	2,39A	2,89B	2,04B

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade.

Na ausência de Al, os dois cultivares não apresentaram diferença estatística quanto à razão V_{cit}/v_{alt} , exceto após 72 h de tratamento em que o cultivar sensível apresentou maior relação (Quadro 13). Na presença do Al o cultivar tolerante apresentou relação V_{cit}/v_{alt} 1,3, 1,4 e 1,2 vez maiores para os tempos 12, 48 e 72 h, respectivamente.

Quadro 13 – Razão entre o consumo de oxigênio pela rota citocromo e a rota alternativa por ápices radiculares de dois cultivares de milho submetidos a diferentes tempos de exposição ao alumínio

Cultivar	Al (μ M)							
	0				185			
	Tempo (h)				Tempo (h)			
	12	24	48	72	12	24	48	72
Sensível	5,13A	3,30A	5,22A	7,68A	2,33B	2,25A	2,10B	1,64B
Tolerante	4,26A	3,86A	5,74A	4,24B	2,99A	2,39A	2,89A	2,04A

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade.

No cultivar sensível, na ausência de Al, observou-se inicialmente redução e após 48 h, aumento até 72 h (Figura 6). O cultivar tolerante, sob as mesmas condições teve a razão V_{cit}/v_{alt} inalterada estatisticamente com o tempo. Na presença de Al, os dois cultivares sofreram ligeiro decréscimo na razão V_{cit}/v_{alt} com o tempo de tratamento. O decréscimo da relação V_{cit}/v_{alt} nos dois cultivares, neste caso, foi muito semelhante, quase paralelo, mas com intensidade maior no cultivar sensível. Na presença de Al o cultivar tolerante

apresentou em média valores de razão V_{cit}/v_{alt} maiores do que o cultivar sensível (Quadro 13 e Figura 6).

As variações observadas na razão V_{cit}/v_{alt} entre os cultivares, em função do tempo de exposição das plântulas ao Al, evidentemente se devem à combinação dos efeitos do Al sobre V_{cit} e v_{alt} . Embora o V_{cit} tenha sido afetado pelo Al nos dois cultivares, o efeito foi maior no cultivar sensível (Quadros 6, 7 e Figura 3) e, no caso da rota alternativa (v_{alt}), apenas o cultivar sensível apresentou declínio nesta rota. Isso explica o porquê dos valores da relação V_{cit}/v_{alt} serem mais afetados no cultivar sensível do que no cultivar tolerante.

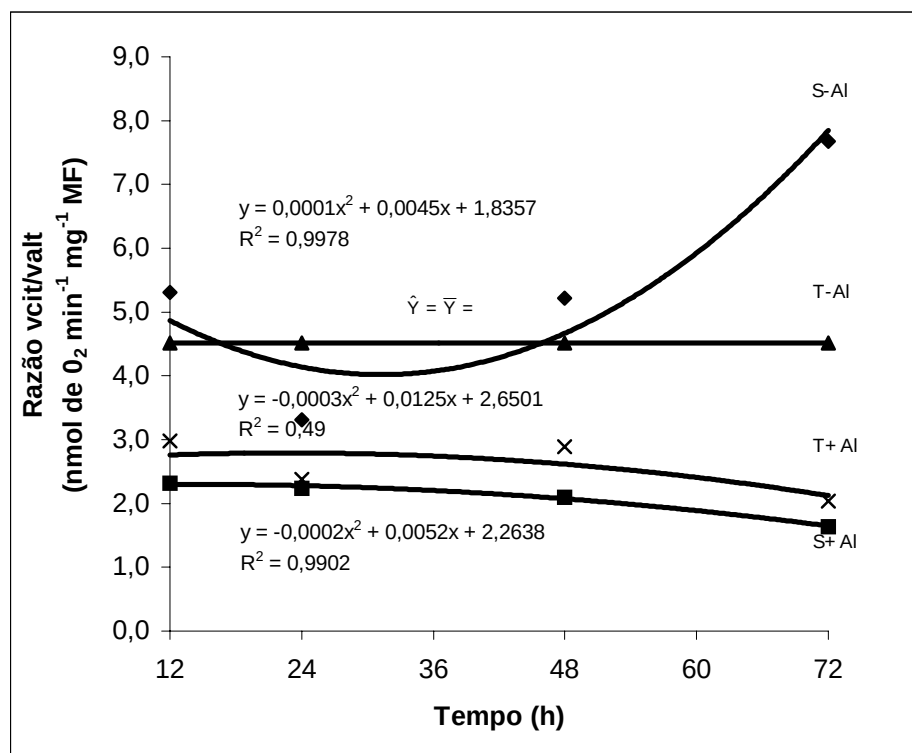


Figura 6 – Razão entre a atividade da rota citocromo e a rota alternativa em dois cultivares de milho submetidos a diferentes tempos de exposição ao alumínio. (S=sensível; T=tolerante).

A diferença entre o consumo de oxigênio em mitocôndrias isoladas e, em tecidos intactos é que a combinação de KCN e SHAM tende inibir completamente as mitocôndrias isoladas, enquanto que em tecidos intactos, há sempre um componente residual. O componente residual é geralmente pequeno (~10%), mas em batata, células de soja e folhas em senescência

pode chegar de 25 a 50% (MOLLER et al., 1988). A natureza bioquímica de V_{res} é desconhecida, mas provavelmente seja devido a processos de consumo de oxigênio extra-mitochondriais. Uma possibilidade parece ser a β -oxidação de ácidos graxos nos peroxissomos, que é insensível tanto ao SHAM como ao KCN (MOLLER et al., 1988), ou mesmo devido a polifenoloxidasas. O valor médio de V_{res} para o presente experimento foi próximo ao observado por DE LIMA e COPELAND (1994) em trigo.

Quadro 14 – Consumo de oxigênio residual ($\text{nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ MF}$) em ápices radiculares de dois cultivares de milho submetidos a diferentes tempos de exposição ao alumínio

Cultivar	Al (μM)							
	0				185			
	Tempo (h)				Tempo (h)			
	12	24	48	72	12	24	48	72
Sensível	0,16A	0,14A	0,17A	0,18A	0,13B	0,14A	0,13A	0,16A
Tolerante	0,18A	0,17A	0,18A	0,18A	0,18A	0,14A	0,15A	0,17A

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade.

O consumo de oxigênio residual (V_{res}), isto é, o consumo de oxigênio quando as rotas citocromo e alternativa estão inibidas por SHAM e KCN foi dentre as variáveis de respiração estudadas a menos influenciada pelo tempo de exposição ao Al, mantendo-se essencialmente constante, independentemente da presença de Al (Quadro 14, 15 e Figura 7). Não se observa nenhuma diferença entre os cultivares, independentemente da presença ou não de Al, com exceção no tempo de 12 h em que a presença do Al na solução nutritiva resultou em redução no V_{res} no cultivar sensível que ficou cerca de 35% menor do que no tolerante. O tratamento com Al, contudo, somente resultou em redução no V_{res} no cultivar sensível, em 48 h (Quadro 15).

Embora os valores de V_{res} , de modo geral, terem permanecido mais ou menos constante, mesmo nos tempos mais elevados de tratamento com Al, a contribuição da atividade residual como uma proporção do consumo total de oxigênio (V_t) aumentou em 04, 44, 58 e 80 % nos tempos de 12, 24, 48 e 72 h, respectivamente, no cultivar sensível e de 29, 10, 27 e 42 % no cultivar

tolerante para os mesmos tempos considerados. Observa-se que as diferenças cresceram com o tempo de exposição, tendo o cultivar sensível, apresentado maior proporção relativa de V_{res} do que o cultivar tolerante. A mesma tendência foi observada por DE LIMA e COPELAND (1994) em plantas de trigo submetidas a estresse por Al.

Quadro 15 – Consumo de oxigênio residual ($\text{nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ MF}$) em ápices radiculares de dois cultivares de milho submetidos a diferentes tempos de exposição ao alumínio

Al (μM)	Cultivar							
	Sensível				Tolerante			
	Tempo (h)				Tempo (h)			
	12	24	48	72	12	24	48	72
0	0,16A	0,14A	0,17A	0,18A	0,18A	0,17A	0,18A	0,18A
185	0,13A	0,14A	0,13B	0,16A	0,18A	0,14A	0,15A	0,17A

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade.

O consumo de oxigênio residual (v_{res}) em função do tempo (Figura 7) não foi influenciado pelo tempo de exposição ou não das plântulas ao Al. Apenas o cultivar sensível, na ausência de Al apresentou tendência quadrática em aumentar a V_{res} com o tempo de exposição, mas mesmo assim, o incremento no período foi pequeno.

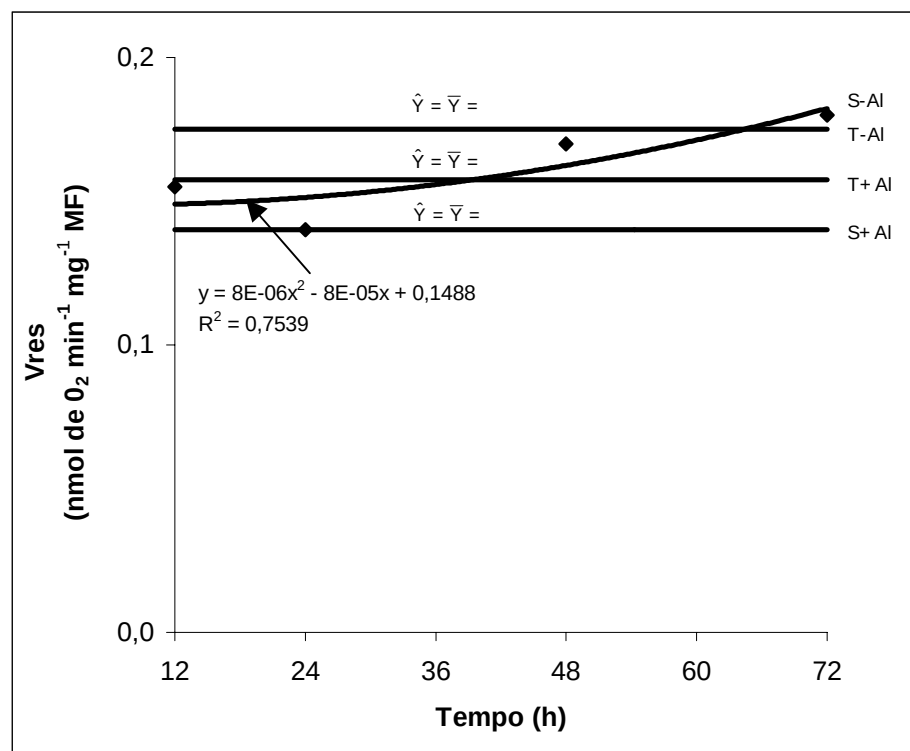


Figura 7 – Consumo de oxigênio residual (V_{res}) em ápicos radiculares de dois cultivares de milho submetidos a diferentes tempos de exposição ao alumínio. (S= sensível; T= tolerante).

O grau de acoplamento da rota alternativa ($\rho = \text{valt}/\text{Valt}$) devido à exposição das plantas ao Al reduziu significativamente apenas no cultivar sensível (Quadro 16). Neste cultivar a redução no grau de acoplamento foi de 3,3, 4,5, 2,0 e 6,6 vezes para os tempos de tratamento de 12, 24, 48 e 72 h, respectivamente.

Quadro 16 – Grau de acoplamento da rota alternativa ($\rho = \text{valt}/\text{Valt}$) em ápicos radiculares de dois cultivares de milho submetidos a diferentes tempos de exposição ao alumínio

Al (μM)	Cultivar							
	Sensível				Tolerante			
	Tempo (h)				Tempo (h)			
	12	24	48	72	12	24	48	72
0	1,63A	0,67A	1,01A	1,51A	0,60A	0,51A	0,77A	0,35A
185	0,49B	0,15B	0,51B	0,23B	0,26A	0,37A	0,51A	0,56A

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade.

O cultivar tolerante não mostrou qualquer diferença estatisticamente significativa, independentemente da presença ou não de Al, embora reduções relativamente elevadas tenham sido verificadas. Isto se deve, provavelmente à grande variabilidade nos valores individuais do grau de acoplamento que certamente, determinou elevado coeficiente de variação (CV). A redução no grau de acoplamento da rota alternativa no cultivar sensível, pelo tratamento com Al pode estar refletindo um efeito direto do Al sobre a rota alternativa. Uma vez que a atividade da rota citocromo foi também reduzida pelo Al, era de se esperar que parte dos elétrons fossem direcionados para a rota alternativa. Porém, isso parece não estar ocorrendo. Ao contrário, o Al também inibiu o fluxo de elétrons da rota alternativa do cultivar sensível. Aparentemente, o cultivar sensível teve tanto a rota citocromo como a rota alternativa mais comprometida pelo Al do que o cultivar tolerante. Isso pode explicar em parte, o menor desempenho no crescimento radicular e na atividade respiratória do cultivar sensível em relação ao cultivar tolerante, devido as injúrias causadas pelo Al. Deve-se destacar ainda que os efeitos supracitados do Al aumentaram com o tempo de exposição das plântulas ao Al, especialmente no cultivar sensível.

Quadro 17 – Grau de acoplamento da rota alternativa ($\rho = \text{valt}/\text{Valt}$) por ápices radiculares de dois cultivares de milho submetidos a diferentes tempos de exposição ao alumínio

Cultivar	Al (mM)							
	0				185			
	Tempo (h)				Tempo (h)			
	12	24	48	72	12	24	48	72
Sensível	1,63A	0,67A	1,01A	1,51A	0,49A	0,15A	0,51A	0,23B
Tolerante	0,60B	0,51A	0,77A	0,35B	0,26A	0,37A	0,51A	0,56A

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade.

Quando se comparam os dois cultivares observa-se que ambos apresentaram diferença significativa apenas em 12 e 72 h, em que o cultivar sensível apresentou grau de acoplamento 2,7 e 4,3 vezes mais elevado do que o cultivar tolerante, respectivamente (Quadro 17). Na presença de Al, o grau de acoplamento no cultivar sensível decresceu drasticamente no cultivar

sensível e aumentou no cultivar tolerante, chegando após 72 h de tratamento a ser 143% maior no cultivar tolerante do que no cultivar sensível.

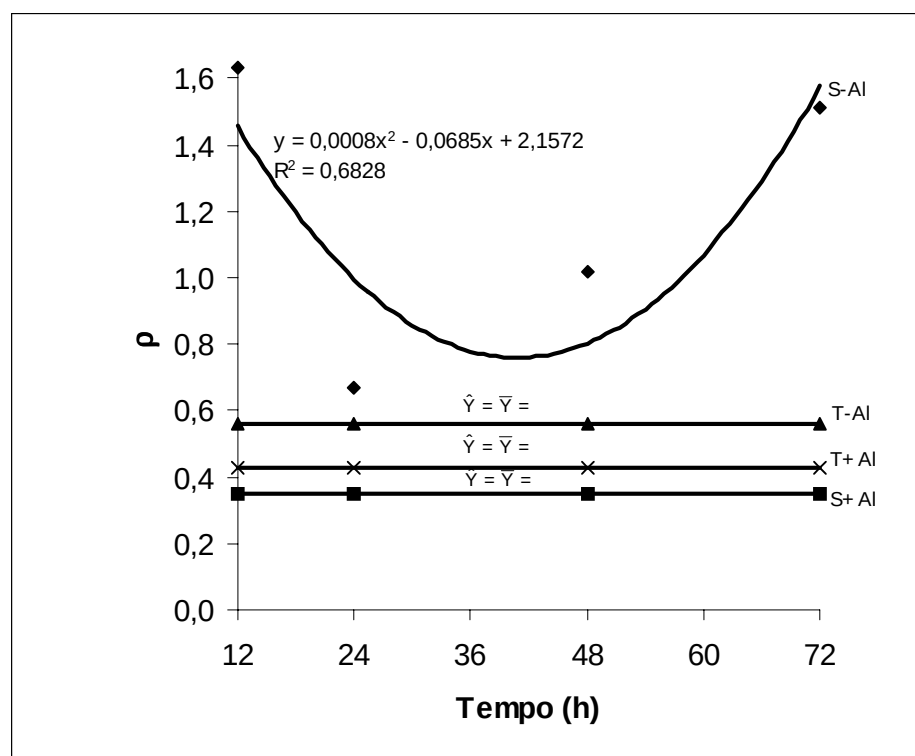


Figura 8 – Grau de acoplamento da rota alternativa (ρ) por ápices radiculares de dois cultivares de milho submetidos a diferentes tempos de exposição ao alumínio. (S=sensível; T=tolerante).

O grau de acoplamento da rota alternativa não se modificou com o tempo de exposição ao Al (Figura 8). Apenas no cultivar sensível e na ausência de Al observou-se variação significativa. Entre 12 e 24 h observou-se forte decréscimo e, depois, forte e progressivo aumento até 72 h.

3.4. Efeito do alumínio em mitocôndrias isoladas de plântulas pré-tratadas com alumínio

A respiração acoplada à fosforilação oxidativa do ADP, estado 3, na presença da mistura L-malato, L-glutamato, succinato e NADH foi reduzida, em média 25 % nas plântulas crescidas na presença de Al em solução nutritiva (Quadro 18). Tanto o cultivar sensível como o cultivar tolerante sofreram reduções na respiração durante o estado 3 em proporções muito semelhantes. O cultivar sensível apresentou 26 % de decréscimo no consumo de oxigênio, enquanto que o cultivar tolerante 25 %. Entretanto, não houve comportamento diferencial entre os cultivares.

A respiração no estado 4 (Quadro 18), bem como a relação ADP/O (Quadro 19), não sofreram alterações significativas com a adição de Al em nenhum cultivar e eles, também, não diferiram entre si.

Quadro 18 – Consumo de oxigênio ($\text{nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína) por mitocôndrias, nos estados 3 e 4, de plântulas de dois cultivares de milho, pré-tratadas com alumínio, utilizando a mistura de substratos contendo L-malato, L-glutamato, succinato e NADH

Estado 3		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	68,8 Aa	70,9 Aa
185	55,6 Ba	56,9 Ba

Estado 4		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	23,3 Aa	28,1 Aa
185	27,2 Aa	27,0 Aa

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade.

O coeficiente de controle respiratório modificou-se de modo semelhante ao consumo de oxigênio na presença de ADP (Quadro 19). Em média, o Al reduziu o coeficiente de controle respiratório em 31,5%. Neste caso, entretanto,

as reduções foram diferenciadas entre os cultivares. Enquanto o cultivar sensível apresentou 41%, o cultivar tolerante apresentou apenas 24% de redução.

Quadro 19 – Coeficiente de controle respiratório e relação ADP/O, em mitocôndrias isoladas de plântulas de dois cultivares de milho, pré-tratadas com alumínio, utilizando a mistura de substratos contendo L-malato, L-glutamato, succinato e NADH

Coeficiente de Controle Respiratório		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	2,72 Aa	2,87 Aa
185	1,93 Ba	2,32 Ba

Relação ADP/O		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	1,94 Aa	1,88 Aa
185	1,84 Aa	1,81 Aa

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade.

A utilização dos substratos L-malato + L-glutamato resultou em consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas nos estados 3 e 4 muito menor do que com a mistura completa (Quadro 20). O efeito do Al sobre o consumo de oxigênio, contudo, foi muito semelhante ao obtido com a mistura de substratos. O consumo de oxigênio no estado 3 foi inibido, em 70 e 40 % nos cultivares sensível e tolerante, respectivamente. Na presença de Al, o consumo de oxigênio no estado 3 foi cerca de 22 % maior no cultivar tolerante do que no cultivar sensível. O consumo de oxigênio no estado 4 não foi influenciado pelo Al e os cultivares não apresentaram diferenças significativas entre si.

Quadro 20 – Consumo de oxigênio (nmol O₂ min⁻¹ mg⁻¹ proteína) por mitocôndrias nos estados 3 e 4, de plântulas de dois cultivares de milho, pré-tratadas com alumínio, utilizando L-malato + L-glutamato como substratos

Estado 3		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	35,8 Aa	36,1 Aa
185	21,0 Ba	25,7 Ba

Estado 4		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	8,3 Aa	9,8 Aa
185	7,0 Aa	8,9 Aa

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade.

O Al reduziu o coeficiente de controle respiratório em 37 % no cultivar sensível e 21 % no cultivar tolerante (Quadro 21).

Não se observou nenhuma diferença estatística significativa na relação ADP/O, independentemente da presença de Al e do cultivar analisado (Quadro 21).

Quando o substrato utilizado foi apenas o L-malato, o consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas no estado 3 e 4, foi ainda menor e a presença do Al resultou em redução significativa no consumo de oxigênio durante a fosforilação do ADP (Quadro 22). As reduções devidas ao Al foram, em média, de 42 e 47% para os cultivares sensível e tolerante, respectivamente. Na presença de Al, o cultivar tolerante apresentou maior consumo de oxigênio durante o estado 3, em média 34,5 % maior do que o cultivar sensível, embora não tenha alcançado significância estatística.

Quadro 21 - Coeficiente de controle respiratório e a relação ADP/O, em mitocôndrias isoladas de plântulas de dois cultivares de milho, pré-tratadas com alumínio, utilizando L-malato + L-glutamato como substratos

Coeficiente de Controle Respiratório		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	3,96 Aa	3,70 Aa
185	2,50 Ba	2,91 Ba

Relação ADP/O		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	2,18 Aa	2,20 Aa
185	2,12 Aa	2,39 Aa

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade.

A respiração no estado 4 (Quadro 22) e a relação ADP/O (Quadro 23) mostraram-se insensíveis à presença de Al e os cultivares não diferiram entre si.

Mitocôndrias isoladas de sistemas radiculares pré-tratados com Al apresentaram novamente mitocôndrias com coeficientes de controle respiratório menores do que as plantas controle (Quadro 23). A redução causada por Al sobre o coeficiente de controle respiratório foi de 63 % no cultivar sensível e apenas de 46 % no cultivar tolerante.

Quadro 22 - Consumo de oxigênio (nmol O₂ min⁻¹ mg⁻¹ proteína) por mitocôndrias nos estados 3 e 4, de plântulas de dois cultivares de milho, pré-tratadas com alumínio, utilizando L-malato como substrato

Estado 3		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	20,9 Aa	28,5 Aa
185	14,8 Aa	19,4 Ba
Estado 4		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	6,9 Aa	7,7 Aa
185	7,6 Aa	6,8 Aa

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade.

Na presença de NADH como fonte de elétrons para a cadeia transportadora de elétrons, o consumo de oxigênio no estado 3 sofreu redução após tratamento com Al apenas nas mitocôndrias isoladas de plântulas pré-tratadas do cultivar sensível (Quadro 24). Neste caso, a respiração acoplada à fosforilação oxidativa do ADP reduziu em 39 % em relação às plantas controle.

A respiração mitocondrial no estado 4 (Quadro 24) do cultivar tolerante aumentou cerca de 29 % na presença de Al. Em mitocôndrias isoladas de plântulas de trigo tratadas com Al a taxa de respiração nos estados 3 e 4 durante a oxidação do NADH aumentou 55 e 33%, respectivamente (DE LIMA e COPELAND, 1994). Estes autores observaram, também, um efeito desacoplador uma vez que verificaram aumento na respiração no estado 4 e redução na relação ADP/O. No presente experimento, entretanto, não se detectou este efeito desacoplador, uma vez que a relação ADP/O permaneceu inalterada.

Quadro 23 - Coeficiente de controle respiratório e a relação ADP/O, em mitocôndrias isoladas de plântulas de dois cultivares de milho, pré-tratadas com alumínio, utilizando L-malato como substrato

Coeficiente de Controle Respiratório		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	2,91 Aa	3,67 Ba
185	1,79 Ba	2,52 Ba

Relação ADP/O		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	2,21 Aa	2,13 Aa
185	2,26 Aa	2,17 Aa

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade.

Independentemente da adição ou não de Al, as mitocôndrias do cultivar tolerante também apresentaram maior consumo de oxigênio na ausência de ADP (Quadro 24). Na ausência e na presença de Al as mitocôndrias deste cultivar mostraram atividade respiratória 20 e 67 % mais elevada, do que o cultivar sensível, respectivamente, durante o estado 4. A diferença média entre estes cultivares foi de 43 %.

O coeficiente de controle respiratório em mitocôndrias isoladas, tendo o NADH como substrato foi similar ao de outros substratos anteriormente mencionados e o Al reduziu esta relação em 36 e 22 % no cultivar sensível e tolerante, respectivamente (Quadro 25).

Quadro 24 - Consumo de oxigênio (nmol O₂ min⁻¹ mg⁻¹ proteína) por mitocôndrias nos estados 3 e 4, de plântulas de dois cultivares de milho, pré-tratadas com alumínio, utilizando NADH como substrato

Estado 3		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	53,3 Aa	51,4 Aa
185	38,5 Ba	44,9 Aa
Estado 4		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	15,5 Ab	18,5 Ba
185	14,3 Ab	23,9 Aa

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade.

A relação ADP/O, independentemente do cultivar e da presença de Al, não se modificou significativamente e os cultivares, também, não diferiram entre si (Quadro 25).

É importante ressaltar que a oxidação do NADH exógeno foi quase completamente inibida pela antimicina A (dados não apresentados) o que indica que a enzima NADH desidrogenase localizada na superfície externa da membrana mitocondrial interna é que doa os elétrons para o *pool* de ubiquinona, como também demonstrado por PALMER e WARD (1985) e MOLLER e LIN (1986).

Quadro 25 - Coeficiente de controle respiratório e relação ADP/O, em mitocôndrias isoladas de plântulas de dois cultivares de milho, pré-tratadas com alumínio, utilizando NADH como substrato

Coeficiente de Controle Respiratório		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	3,14 Aa	2,68 Aa
185	2,31 Ba	2,19 Ba

Relação ADP/O		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	1,53 Aa	1,68 Aa
185	1,61 Aa	1,82 Aa

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade.

O consumo de oxigênio utilizando o piruvato como substrato não sofreu mudança estatisticamente significativa com o tratamento (Quadro 26). Na presença de Al no meio de crescimento, não houve variação na respiração acoplada à fosforilação oxidativa, em ambos os cultivares (Quadro 26). As mitocôndrias do cultivar tolerante apresentaram taxas de consumo de oxigênio no estado 3, visivelmente maiores do que o cultivar sensível, tanto na ausência como na presença do elemento fitotóxico. Estas diferenças, entretanto não foram significativas.

Os efeitos do Al sobre o consumo de oxigênio por mitocôndrias no estado 4, foram mais complexos. A respiração permaneceu constante com a adição de Al no cultivar sensível e aumentou 27,1 % no cultivar tolerante (Quadro 26). Quando se compara o efeito do Al entre os cultivares, observam-se que os mesmos diferiram apenas na presença do Al. Nesta condição, o cultivar tolerante apresentou valor 48 % maior do que o cultivar sensível.

Quadro 26 - Consumo de oxigênio (nmol O₂ min⁻¹ mg⁻¹ proteína) por mitocôndrias nos estados 3 e 4, de plântulas de dois cultivares de milho, pré-tratadas com alumínio, utilizando piruvato como substrato

Estado 3		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	24,5 Aa	27,7 Aa
185	21,7 Aa	30,8 Aa
Estado 4		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	8,3 Aa	10,5 Ba
185	9,0 Ab	13,4 Aa

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade.

O coeficiente de controle respiratório, à semelhança do que aconteceu com outros substratos também analisados sofreu redução pelo tratamento com Al nos dois cultivares (Quadro 27). Todavia, em todos os outros casos, a redução ocorreu basicamente devido à redução da atividade respiratória no estado 3, o que não aconteceu neste caso. As reduções no coeficiente respiratório causadas pelo Al foram de 54 % no cultivar sensível e 39% no cultivar tolerante, embora eles não tenham diferido entre si.

A relação ADP/O mostrou-se insensível à presença de Al na solução nutritiva (Quadro 27). DE LIMA e COPELAND (1994) em experimento com mitocôndrias isoladas de plântulas de trigo, ao contrário, encontraram reduções significativas apenas na relação ADP/O.

O consumo de oxigênio, a relação ADP/O e o coeficiente de controle respiratório, quando se utilizou o succinato como substrato, apresentaram tendência típica da maioria dos substratos utilizados neste experimento (Quadros 28 e 29). Durante a respiração acoplada à fosforilação do ADP, as mitocôndrias de plantas pré-tratadas com Al apresentaram taxa de consumo de

oxigênio reduzida. O cultivar sensível apresentou queda de 44 % e o cultivar tolerante 34 % (Quadro 28).

Quadro 27 - Coeficiente de controle respiratório e relação ADP/O, de mitocôndrias isoladas de plântulas de dois cultivares de milho, pré-tratadas com alumínio, utilizando piruvato como substrato

Coeficiente de Controle Respiratório		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	2,99 Aa	3,04 Aa
185	1,94 Ba	2,19 Ba

Relação ADP/O		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	2,07 Aa	1,93 Aa
185	2,02 Aa	1,84 Aa

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade.

A respiração no estado 4 e a relação ADP/O, utilizando o succinato como substrato não foram influenciados pelo tratamento com Al e os cultivares não diferiram entre si, embora, o cultivar tolerante tenha apresentado valores visivelmente maiores do que o cultivar sensível, inclusive na média (Quadros 28 e 29).

O coeficiente de controle respiratório não foi diferente entre os cultivares, independentemente da presença do Al, mas este elemento, em média, reduziu esta relação em aproximadamente 16 % (Quadro 29).

As mitocôndrias obtidas de plântulas crescidas sob exposição de Al durante 72 h, em geral, apresentaram resultados muito semelhantes para os diferentes substratos respiratórios, e praticamente em todos os casos, com exceção para os dados onde se utilizou o piruvato como substrato, a adição exógena dos substratos separadamente simulou o que aconteceu quando se utilizou a mistura de substratos.

Quadro 28 - Consumo de oxigênio (nmol O₂ min⁻¹ mg⁻¹ proteína) por mitocôndrias nos estados 3 e 4, de plântulas de dois cultivares de milho, pré-tratadas com alumínio, utilizando succinato como substrato

Estado 3		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	33,2 Aa	34,6 Aa
185	23,1 Ba	25,9 Ba
Estado 4		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	17,2 Aa	19,7 Aa
185	16,2 Aa	16,7 Aa

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade.

De maneira geral, o Al inibiu a atividade respiratória acoplada (estado 3), o coeficiente de controle respiratório mas, praticamente, não teve efeito sobre o consumo de oxigênio no estado 4 e na relação ADP/O.

O Al parece não afetar a cadeia transportadora de elétrons, uma vez que a oxidação dos substratos durante a respiração no estado 4 e a relação ADP/O não variaram significativamente. Aparentemente ele interfere, de algum modo, na respiração acoplada à fosforilação oxidativa propriamente dita, podendo ser, dentre outros fatores, sobre o complexo ATP sintase e, ou no suprimento de adenilatos, como por exemplo na quantidade de ADP (PFEFFER et al., 1986; CUMMING et al., 1992) que chega até a matriz mitocondrial e que é capaz de ser fosforilado, ou ainda, na quantidade de esqueletos carbônicos que chegam ao interior mitocondrial (COLLIER et al., 1983). Além disso, pode-se deduzir que embora o Al tenha interferido no estado 3 e no coeficiente de controle respiratório nos dois cultivares, o cultivar tolerante, em geral, apresentou menor inibição.

Quadro 29 – Coeficiente de controle respiratório e a relação ADP/O, de mitocôndrias isoladas de plântulas de dois cultivares de milho, pré-tratadas com alumínio, utilizando succinato como substrato

Coeficiente de Controle Respiratório		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	1,59 Aa	1,68 Aa
185	1,39 Aa	1,45 Aa

Relação ADP/O		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	1,44 Aa	1,54 Aa
185	1,36 Aa	1,53 Aa

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade.

Os resultados deste experimento podem explicar, pelo menos em parte, o melhor desempenho do cultivar tolerante quanto ao crescimento radicular e à manutenção da respiração em níveis sempre mais elevados, devido às injúrias causadas pelo Al. Quando se comparam os dados obtidos com ápices radiculares e estes com mitocôndrias isoladas de plântulas crescidas também durante 72 h na presença do Al, observam-se resultados semelhantes. Naquele caso, o Al também parece estar interferindo com a síntese de ATP e, ou no suprimento de energia no sistema radicular, embora uma ação direta do Al na cadeia transportadora de elétrons não possa ser descartada. A exposição das plantas ao Al, por períodos mais prolongados (efeito crônico), deve interferir na respiração dos dois cultivares, mas, em magnitudes diferentes. O cultivar tolerante apresentou, tanto na respiração em ápices radiculares destacados, como na atividade de mitocôndrias pré-tratadas com Al, melhor desempenho do que o cultivar sensível.

3.5. Efeito do alumínio em mitocôndrias isoladas de plântulas não tratadas com alumínio

Ao contrário do experimento anterior em que as plantas foram pré-tratadas ou não com Al, neste experimento, o Al foi adicionado diretamente na mistura de reação contendo mitocôndrias isoladas de raízes de plântulas de dois cultivares de milho, não tratadas com Al (Quadros 30 a 33). Num primeiro experimento utilizaram-se como substratos mitocondrial uma mistura constituída de L-malato, L-glutamato, succinato e NADH e verificou-se não haver diferença estatisticamente significativa na respiração acoplada à fosforilação oxidativa do ADP, entre os cultivares, nas diferentes concentrações de Al (Quadro 30).

Quadro 30 – Efeito de diferentes concentrações de alumínio sobre a respiração mitocondrial nos estados 3, utilizando como substrato uma mistura constituída de L-malato, L-glutamato, succinato e NADH, em dois cultivares de milho

Cultivar	Concentração de Al (μM)							Média
	0,0	46,3	92,5	138,8	185,0	231,3	400,0	
	-----nmol de $\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$ -----							
Sensível	93,8 (100%)	89,5 (95%)	86,0 (92%)	88,5 (94%)	85,5 (91%)	81,5 (87%)	77,3 (82%)	86,0 A
Tolerante	75,8 (100%)	80,0 (106%)	72,0 (95%)	70,5 (93%)	69,8 (92%)	90,0 (118%)	68,8 (91%)	75,2 B

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúscula nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade. Os valores colocados entre parênteses referem-se a percentagem relativa ao controle.

Na média, entretanto, o cultivar sensível apresentou uma taxa de respiração no estado 3, cerca de 14 % maior do que o cultivar tolerante (Quadro 30). Todavia, esta diferença parece não estar relacionada com a presença de Al, uma vez que na ausência deste elemento, o cultivar sensível já possuía valores mais elevados de consumo de oxigênio no estado acoplado. Na concentração de Al mais elevada (400 μM) observou-se redução de 18 % no cultivar sensível e apenas 9 % no cultivar tolerante em relação ao controle.

O aumento da concentração de Al no meio de reação não afetou significativamente a respiração acoplada à fosforilação do ADP no cultivar tolerante, enquanto que no cultivar sensível observou-se queda gradativa.

(Figura 9). Isto indica que a respiração acoplada, no cultivar tolerante, é menos sensível às injúrias causadas pelo Al. Apesar de neste caso, o pH e outras condições do meio de ensaio serem bastante diferentes, os resultados observados com as mitocôndrias isoladas de plântulas pré-tratadas com Al e com os ápices radiculares destacados são compatíveis entre si, embora neste caso, não tenha havido redução no estado acoplado no cultivar tolerante.

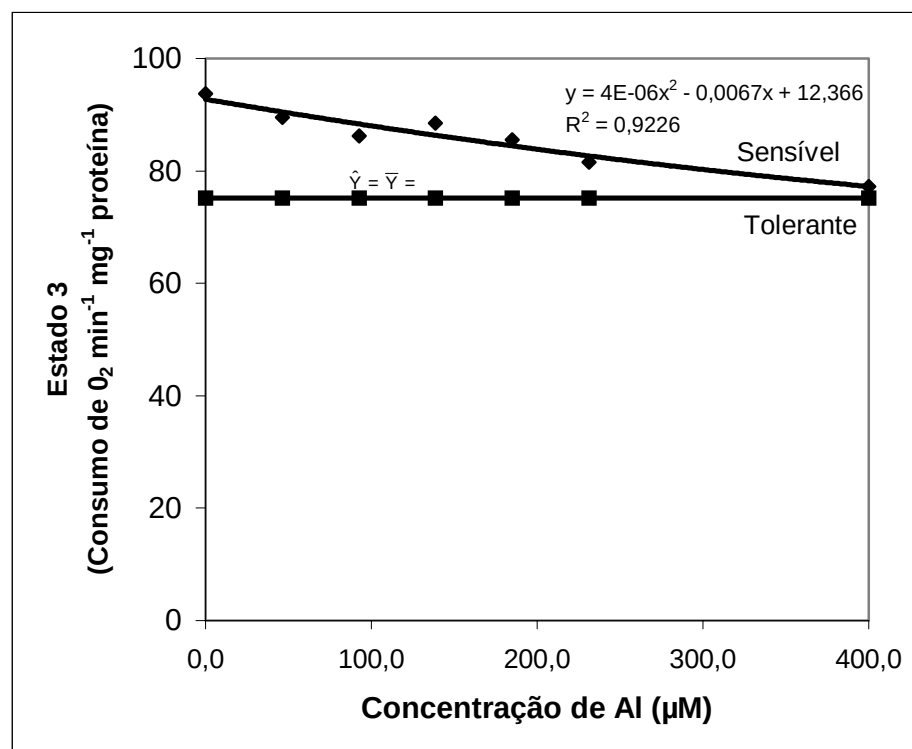


Figura 9 – Consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas de dois cultivares de milho no estado 3, submetidas a diferentes concentrações de alumínio, em meio contendo L-malato, L-glutamato, succinato e NADH como substratos.

A respiração durante a oxidação da mistura após a fosforilação oxidativa do ADP (estado 4) não variou significativamente com o aumento na concentração de Al e nem houve diferença significativa entre os cultivares (Quadro 31). Em média, entretanto, o cultivar sensível apresentou, consumo de oxigênio 18% maior do que o cultivar tolerante.

Aparentemente, poderia se atribuir ao Al um efeito desacoplador pelo fato de ter o cultivar sensível apresentado, em média, valores mais elevados de respiração no estado 4 e menores valores da relação ADP/O (Quadro 32).

Todavia, este cultivar, mesmo na ausência de Al, já apresentava maiores taxas de respiração no estado 4 e menores valores de relação ADP/O. Assim, os valores diferenciados devem-se mais a fatores intrínsecos, como potencial genético do que propriamente dito um efeito do Al.

Quadro 31 – Efeito de diferentes concentrações de alumínio sobre a respiração mitocondrial no estado 4, utilizando como substrato uma mistura constituída de L-malato, L-glutamato, succinato e NADH, em dois cultivares de milho

Cultivar	Concentração de Al (μM)							Média
	0,0	46,3	92,5	138,8	185,0	231,3	400,0	
	-----nmol de $\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$ -----							
Sensível	42,5 (100%)	46,2 (109%)	42,3 (100%)	42,9 (101%)	39,8 (94%)	41,0 (96%)	38,7 (91%)	36,5 A
Tolerante	32,0 (100%)	32,6 (102%)	33,3 (104%)	31,0 (97%)	28,1 (88%)	31,5 (98%)	29,2 (91%)	31,1 B

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade. Os valores colocados entre parênteses referem-se a percentagem relativa ao controle.

O coeficiente de controle respiratório, também, não se modificou com o aumento da concentração de Al no meio de reação e os cultivares não diferiram entre si (Quadro 32). O coeficiente de controle respiratório no cultivar tolerante, em média, foi 18 % maior do que no cultivar sensível.

Quadro 32 - Efeito de diferentes concentrações de alumínio sobre a relação ADP/O por mitocôndrias isoladas, utilizando como substrato uma mistura constituída de L-malato, L-glutamato, succinato e NADH, em dois cultivares de milho

Cultivar	Concentração de Al (μM)							Média
	0,0	46,3	92,5	138,8	185,0	231,3	400,0	
Sensível	1,77 (100%)	1,78 (101%)	1,83 (103%)	1,81 (102%)	1,73 (98%)	1,81 (102%)	1,71 (97%)	1,78 B
Tolerante	1,97 (100%)	1,94 (98%)	1,97 (100%)	2,04 (104%)	1,88 (95%)	1,94 (98%)	1,94 (98%)	1,95 A

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade. Os valores colocados entre parênteses referem-se a percentagem relativa ao controle.

Este era um resultado já esperado uma vez que as mitocôndrias do cultivar sensível apresentaram, em média, maiores taxas de respiração no estado 4, resultando em menor coeficiente de controle respiratório.

Quadro 33 - Efeito de diferentes concentrações de alumínio sobre o coeficiente de controle respiratório de mitocôndrias isoladas, utilizando como substrato uma mistura constituída de L-malato, L-glutamato, succinato e NADH, em dois cultivares de milho

Cultivar	Concentração de Al (μM)							Média
	0,0	46,3	92,5	138,8	185,0	231,3	400,0	
Sensível	2,22 (100%)	1,94 (87%)	1,97 (89%)	2,10 (95%)	2,14 (96)	2,00 (90%)	2,00 (90%)	2,05 B
Tolerante	2,55 (100%)	2,55 (100%)	2,21 (87%)	2,24 (88%)	2,67 (105%)	2,19 (86%)	2,45 (96%)	2,41 A

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade. Os valores colocados entre parênteses referem-se a percentagem relativa ao controle.

O Al adicionado ao meio de reação reduziu a atividade respiratória mitocondrial no estado 3, apenas no cultivar sensível, quando se utilizou o L-malato como substrato (Quadro 34). Além disso, independentemente da presença do Al, o cultivar tolerante apresentou maior taxa de consumo de oxigênio quando o ADP foi adicionado. Na ausência e na presença de Al, o cultivar tolerante apresentou atividade respiratória 51 e 59 % mais elevada do que o cultivar sensível, respectivamente, e a diferença entre os cultivares aumentou ao se adicionar Al ao meio de reação.

A respiração durante o estado 4, tendo como substrato o L-malato, foi influenciada, também, pela presença de Al e pelo cultivar testado (Quadro 34). O Al adicionado no meio de incubação resultou em aumento de 15 % no cultivar sensível e 28 % no cultivar tolerante, embora, a diferença tenha sido significativa apenas neste último. As mitocôndrias isoladas do cultivar tolerante apresentaram na presença de Al, taxas de respiração no estado desacoplado, 30 % maiores do que as mitocôndrias do cultivar sensível.

O coeficiente de controle respiratório das mitocôndrias tanto do cultivar sensível (18 %) como do cultivar tolerante (24 %), sofreu redução na presença de Al (Quadro 35). As mitocôndrias do cultivar tolerante apresentaram

coeficiente de controle respiratório mais elevado que o do sensível, apenas na presença de Al (18 %).

Quadro 34 – Consumo de oxigênio ($\text{nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína) nos estados 3 e 4, em mitocôndrias isoladas de raízes de dois cultivares de milho, na presença de alumínio no meio de reação, utilizando-se como substrato L-malato

Estado 3		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	47,0 Ab	70,8 Aa
185	42,8 Bb	68,0 Aa

Estado 4		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	9,1 Aa	10,6 Ba
185	10,4 Ab	13,6 Aa

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade.

Os valores da relação ADP/O não se modificaram na presença do Al e os cultivares não diferiram entre si (Quadro 35).

A atividade da rota citocromo, isto é, a diferença entre a taxa de consumo de oxigênio total no estado 3 e a taxa de consumo de oxigênio inibida por SHAM, sofreu redução de cerca de 24% no cultivar sensível e apenas 16 % no cultivar tolerante (Quadro 36). O cultivar tolerante apresentou sempre maior atividade respiratória do que o cultivar sensível, independentemente da adição (54%) ou não (44%) de Al ao meio de reação.

Quadro 35 – Coeficiente de controle respiratório e relação ADP/O em mitocôndrias isoladas de raízes de dois cultivares de milho, na presença de alumínio no meio de reação, utilizando-se L-malato como substrato

Coeficiente de Controle Respiratório		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	5,19 Aa	6,54 Ba
185	4,23 Ab	5,00 Aa

Relação ADP/O		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	2,15 Aa	1,92 Aa
185	1,96 Aa	1,82 Aa

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade.

A atividade da rota alternativa, isto é, a taxa de consumo de oxigênio inibida por SHAM não sofreu alteração significativa pela adição de Al (Quadro 36). O cultivar tolerante, entretanto, apresentou atividade da rota alternativa sempre maior do que o cultivar sensível, independentemente da presença (74%) ou não de Al (71%).

É interessante observar que na ausência de Al, a taxa de consumo de oxigênio pela rota alternativa em relação à taxa total de consumo de oxigênio (RC+RA) foi de 23% no cultivar sensível e 27% no cultivar tolerante (Quadro 36). Quando se adicionou Al ao meio, essas percentagens aumentaram para 32% no cultivar sensível e 34% no cultivar tolerante. Isto se deve basicamente à redução na atividade da rota citocromo e ao aumento visível na atividade da rota alternativa, em decorrência da adição de Al ao meio de reação. Aparentemente, o Al atua, pelo menos quando o substrato é o L-malato, inibindo principalmente a atividade da rota citocromo, o que provoca um deslocamento no fluxo de elétrons para a rota alternativa, em ambos os cultivares. Estudos que relacionam o efeito do Al em mitocôndrias isoladas são muito escassos e não foi encontrada na literatura consultada nenhuma

referência mostrando o efeito do Al sobre a cadeia transportadora de elétrons utilizando L-malato ou a mistura como substrato.

Quadro 36 – Atividade da rota citocromo e da rota alternativa (nmol O₂ min⁻¹ mg⁻¹ proteína) de mitocôndrias isoladas de raízes de dois cultivares de milho, na presença de alumínio no meio de reação, utilizando-se como substrato L-malato

Rota Citocromo (RC)		
Cultivar		
Al (μM)	Sensível	Tolerante
0	36,2 Ab	51,9 Aa
185	29,1 Bb	44,8 Ba
Rota Alternativa (RA)		
Cultivar		
Al (μM)	Sensível	Tolerante
0	10,8 b	18,8 a
185	13,6 b	23,2 a

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade.

Utilizando-se o L-malato + L-glutamato como substratos, não se observou nenhuma alteração na taxa de consumo de oxigênio no estado 3, independentemente da presença de Al e do cultivar testado (Quadro 37). DE LIMA e COPELAND (1994), entretanto, verificaram em mitocôndrias isoladas de trigo, que o Al (75 μM) no meio de reação reduziu em 54% o consumo de oxigênio durante o estado 3.

Quadro 37 – Consumo de oxigênio (nmol O₂ min⁻¹ mg⁻¹ proteína) nos estados 3 e 4 de mitocôndrias isoladas de raízes de dois cultivares de milho, na presença de alumínio no meio de reação, utilizando-se como substrato L-malato + L-glutamato

Estado 3		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	42,8 Aa	43,4 Aa
185	44,7 Aa	43,6 Aa
Estado 4		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	11,7 Ab	15,8 Aa
185	12,7 Ab	16,2 Aa

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade.

A respiração mitocondrial no estado 4, também, não foi alterada com a adição de Al ao meio de ensaio, mas o cultivar tolerante, independentemente da presença de Al apresentou sempre maiores valores do que o cultivar sensível. Esses valores no cultivar tolerante na ausência e na presença de Al, foram cerca de 35 e 28% superiores aos do cultivar sensível, respectivamente. STEWARD e COPELAND (1993) observaram em mitocôndrias isoladas de abacate que o Al inibiu a oxidação do L-malato+L-glutamato. DE LIMA e COPELAND (1994), em experimentos com mitocôndrias isoladas de plântulas de trigo, verificaram que o Al na concentração de 75 μM inibiu em 43% o consumo no estado 4 quanto se utilizaram os mesmos substratos.

O coeficiente de controle respiratório, para este substrato, não foi afetado pelo Al e as mitocôndrias do cultivar sensível apresentaram valores superiores ao do cultivar tolerante (Quadro 38). Estes valores no cultivar sensível foram, em média, cerca de 33% mais elevados do que no cultivar tolerante. Isto aconteceu obviamente porque o cultivar tolerante apresentou maiores taxas de consumo de oxigênio durante o estado 4 do que o cultivar sensível.

Quadro 38 – Coeficiente de controle respiratório e relação ADP/O de mitocôndrias isoladas de raízes de dois cultivares de milho, na presença de alumínio no meio de reação, utilizando-se L-malato + L-glutamato como substratos

Coeficiente de Controle Respiratório		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	3,7 Aa	2,7 Ab
185	3,5 Aa	2,7 Ab

Relação ADP/O		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	1,9 Aa	1,8 Aa
185	1,6 Ba	1,4 Bb

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade.

A relação ADP/O, determinada na presença de L-malato + L-glutamato como substratos, ao contrário do que aconteceu quando se utilizou L-malato como substrato, foi influenciada tanto pela adição do Al como pelo cultivar utilizado (Quadro 38). Na presença de Al no meio de reação observou-se redução na relação ADP/O em 18 % no cultivar sensível e 31 % no cultivar tolerante. O cultivar sensível na presença de Al apresentou relação ADP/O cerca de 16 % mais elevada do que no cultivar tolerante. Já DE LIMA e COPELAND (1994), em experimentos já descritos, não observaram variações significativas do efeito do Al na relação ADP/O.

A atividade da rota citocromo utilizando L-malato + L-glutamato como substratos não sofreu efeito estatisticamente significativo na presença do Al (Quadro 39). O cultivar tolerante, porém, apresentou, em média, uma atividade estatisticamente superior à do sensível.

A atividade da rota alternativa utilizando L-malato + L-glutamato como substratos (Quadro 39) foi bastante semelhante àquelas em que se utilizou apenas o L-malato (Quadro 36).

A atividade da rota alternativa na presença de Al aumentou cerca de 73 e 48 % no cultivar sensível e no cultivar tolerante, respectivamente. Apesar disto, o consumo de oxigênio por esta rota não diferiu estatisticamente entre os cultivares.

Na ausência de Al a atividade da rota alternativa representou 20 e 25% da respiração total nos cultivares sensível e tolerante, respectivamente. Já na presença de Al essa diferença aumentou para 34% no cultivar sensível e apenas para 28,7% no cultivar tolerante. É interessante lembrar que mesmo não havendo diferença no fluxo total de elétrons na respiração durante o estado acoplado, houve desvio do fluxo de elétrons da rota citocromo para a rota alternativa, nos dois cultivares. Este desvio no fluxo de elétrons para a rota alternativa foi maior no cultivar sensível do que no cultivar tolerante. Isto sugere que algo esteja impedindo o fluxo de elétrons pela rota citocromo, e em maior proporção no cultivar sensível do que no cultivar tolerante.

Quadro 39 – Atividade da rota citocromo e da rota alternativa ($\text{nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína) de mitocôndrias isoladas de raízes de dois cultivares de milho na presença de alumínio no meio de reação, utilizando-se como substrato L-malato + L-glutamato

Rota Citocromo (RC)		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	34,1 Aa	34,6 Aa
185	29,6 Aa	31,1 Aa
Rota Alternativa (RA)		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	8,7 Ba	8,8 Ba
185	15,1 Aa	12,5 Aa

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade.

A respiração de mitocôndrias no estado 3, tendo o piruvato como substrato, independentemente da presença ou não de Al ou do cultivar testado não variou significativamente (Quadro 40).

O consumo de oxigênio pelas mitocôndrias no estado 4, também não foi afetado pela adição do Al no meio de reação. Entretanto, o cultivar sensível apresentou, independentemente da presença do Al, taxa de respiração no estado acoplado, que, em média, foi cerca de 21% maior que no cultivar tolerante.

Quadro 40 - Consumo de oxigênio ($\text{nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína) nos estados 3 e 4 de mitocôndrias isoladas de raízes de dois cultivares de milho, na presença de alumínio no meio de reação, utilizando-se como substrato piruvato

Estado 3		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	52,3 Aa	54,8 Aa
185	53,2 Aa	55,0 Aa
Estado 4		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	19,7 Aa	15,5 Ab
185	20,2 Aa	17,4 Ab

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade.

O coeficiente de controle respiratório não foi influenciado pela presença do Al em nenhum dos dois cultivares analisados (Quadro 41). Todavia, o cultivar tolerante apresentou, na ausência e na presença de Al, valores 34 e 21% mais elevados do que o cultivar sensível.

A relação ADP/O, à semelhança do que se observou com mitocôndrias quando se utilizaram os substratos L-malato + L-glutamato, foi diferente mas, o Al reduziu esta relação apenas no cultivar tolerante (11%). Apesar disso, o cultivar tolerante apresentou sempre relação ADP/O mais elevada que o

cultivar sensível independentemente da presença de Al. Em média, a relação ADP/O foi cerca de 15% maior no cultivar tolerante do que no cultivar sensível. DE LIMA e COPELAND (1994) obtiveram redução no consumo de oxigênio durante o estado 3 de 19 e 30 %, na presença de 12,5 e 75 μM de Al, respectivamente. O estado 4 de consumo de oxigênio com este substrato foi também reduzido na presença de Al, conseqüentemente não houve alteração no coeficiente de controle respiratório. A relação ADP/O, neste caso, também não variou significativamente.

A atividade da rota citocromo tendo o piruvato como substrato, não foi influenciada pelo tratamento com Al e nem os cultivares foram diferentes entre si. (Quadro 42). A atividade da rota alternativa foi significativamente maior no cultivar sensível quando se adicionou Al no meio de reação. Neste caso, o Al induziu aumento de 115% na atividade da rota alternativa quando comparado ao controle.

Quadro 41 - Coeficiente de controle respiratório e relação ADP/O de mitocôndrias isoladas de raízes de dois cultivares de milho na presença de alumínio no meio de reação, utilizando-se como substrato piruvato

Coeficiente de Controle Respiratório		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	2,63 Ab	3,53 Aa
185	2,63 Ab	3,17 Aa
Relação ADP/O		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	2,01 Ab	2,42 Aa
185	2,00 Ab	2,18 Ba

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade.

A atividade da rota alternativa na ausência de Al representou 13 e 25% da atividade da cadeia transportadora de elétrons (RA+RC), nos cultivares

sensível e tolerante, respectivamente. Já com a adição do Al, essa rota representou 28 e 22 % da atividade total nos cultivares sensível e tolerante, respectivamente.

No caso do cultivar sensível, o aumento relativo na atividade da rota alternativa deu-se provavelmente pelo direcionamento do fluxo de elétrons da rota citocromo para a rota alternativa, devido às injúrias causadas pelo Al.

Quadro 42 - Atividade da rota citocromo e da rota alternativa ($\text{nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína) de mitocôndrias isoladas de raízes de dois cultivares de milho, na presença de alumínio no meio de reação, utilizando-se como substrato piruvato

Rota Citocromo (RC)		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	45,2 Aa	41,2 Aa
185	38,5 Aa	42,7 Aa
Rota Alternativa (RA)		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	6,8 Ba	13,7 Aa
185	14,7 Aa	12,4 Aa

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade.

A respiração mitocondrial no estado acoplado, quando se utilizou o succinato como substrato, não variou significativamente pela adição de Al no meio de reação (Quadro 43). O cultivar tolerante, independentemente da dose de Al, apresentou maior consumo de oxigênio no estado acoplado.

O consumo de oxigênio durante no estado 4 também não foi afetado pelo tratamento com Al e, também, não houve diferença significativa entre os cultivares, embora este elemento tendeu a reduzir (22,8%) os valores no cultivar sensível e aumentar (16,8%) no caso do cultivar tolerante.

Quadro 43 - Consumo de oxigênio ($\text{nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína) nos estados 3 e 4 de mitocôndrias isoladas de raízes de dois cultivares de milho, na presença de alumínio no meio de reação, utilizando-se succinato como substrato

Estado 3		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	52,1 Ab	67,1 Aa
185	50,0 Ab	62,6 Aa
Estado 4		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	33,9 Aa	37,1 Aa
185	27,6 Aa	43,4 Aa

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade.

Nem o coeficiente de controle respiratório e nem a relação ADP/O foram influenciados pela presença de Al no meio de reação e os dois cultivares testados, não apresentaram diferença significativa entre si (Quadro 44).

A atividade da rota citocromo mostrou-se insensível à adição de Al no meio de reação e os cultivares apresentaram diferença significativa entre si, apenas na média (Quadro 45). Neste caso, o cultivar tolerante apresentou uma atividade da rota citocromo 26% mais elevada, do que o cultivar sensível. Embora não tenha sido encontrada diferença entre os cultivares analisados, na ausência ou na presença de Al, quando considerados individualmente, observa-se que os valores de consumo de oxigênio pela rota citocromo no cultivar tolerante foram sempre mais elevados do que no cultivar sensível. Este cultivar apresentou uma atividade da rota citocromo na ausência e na presença de Al de 30 e 23 % mais elevada do que o cultivar sensível, respectivamente.

Quadro 44 - Coeficiente de controle respiratório e relação ADP/O de mitocôndrias isoladas de raízes de dois cultivares de milho, na presença de alumínio no meio de reação, utilizando-se succinato como substrato

Coeficiente de Controle Respiratório		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	1,64 Aa	1,54 Aa
185	1,73 Aa	1,60 Aa

Relação ADP/O		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	1,27 Aa	1,38 Aa
185	1,34 Aa	1,37 Aa

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade.

Tanto a atividade da rota alternativa como a atividade da rota citocromo não foram afetadas pelo tratamento com Al e os cultivares também não apresentaram diferenças entre si (Quadro 45). Diferentemente de todos os casos anteriores, a participação da rota alternativa na taxa de consumo de oxigênio total utilizando o succinato como substrato, não aumentou com a adição de Al no meio de reação. DE LIMA e COPELAND (1994) verificaram, em mitocôndrias isoladas de trigo submetidas a 75 μ M de Al no meio de reação, redução de 24 e 21 % nos estados 3 e 4 de consumo de oxigênio, respectivamente. A redução na atividade da rota citocromo foi de 23 % e da rota alternativa de 19%.

Em resumo quando se utilizou a mistura de substratos não se observou efeito do Al sobre a respiração no estado 3 (apenas no cultivar sensível), no estado 4, no coeficiente de controle respiratório e na relação ADP/O. Em média, o cultivar tolerante apresentou menor consumo de oxigênio no estado mitocondrial acoplado, mas o cultivar sensível teve seu consumo de oxigênio mais reduzido pelo aumento na concentração de Al no meio de reação (Figura 9). O cultivar tolerante também apresentou valores médios menores de

respiração no estado 4, porém, maiores do coeficiente de controle respiratório e de razão ADP/O. O Al reduziu a respiração no estado 3, a atividade da rota citocromo e tendeu reduzir o coeficiente de controle respiratório e a relação de ADP/O do cultivar sensível, quando se utilizou o L-malato como substrato.

Quadro 45 - Atividades da rota citocromo e da rota alternativa (nmol O₂ min⁻¹ mg⁻¹ proteína) de mitocôndrias isoladas de raízes de dois cultivares de milho na presença de alumínio no meio de reação, utilizando-se succinato como substrato

Rota Citocromo (RC)		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	42,1 Aa	54,6 Aa
185	39,9 Aa	49,1 Aa
Rota Alternativa (RA)		
Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	9,9 Aa	12,5 Aa
185	10,1 Aa	13,6 Aa

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade.

Por outro lado, o Al aumentou a atividade da rota alternativa e tendeu aumentar a respiração durante o estado 4. Este resultado sugere que o Al estaria desacoplando a fosforilação oxidativa do ADP nas mitocôndrias quando foi utilizado o L-malato como substrato. A queda na relação ADP/O pode ser devido ao desvio do fluxo de elétrons da rota citocromo para a rota alternativa, o que por consequência reduz a formação do gradiente eletroquímico. Já o cultivar tolerante, teve seu coeficiente de controle respiratório e a taxa de consumo de oxigênio pela rota citocromo reduzidos e apenas tendeu a diminuir a razão ADP/O. Já a respiração no estado 4 aumentou, devido as injúrias causadas pelo Al e tendeu aumentar também o consumo de oxigênio pela rota alternativa. Observa-se que, à semelhança do que aconteceu com o cultivar sensível, o Al tendeu desacoplar a mitocôndria. Isto sugere que pelo menos

quando o substrato utilizado foi o L-malato, o Al parece interferir na cadeia transportadora de elétrons do cultivar sensível e em menor grau no cultivar tolerante. Os resultados adicionalmente sugerem que o Al pode estar interferindo na atividade da ATP-sintase ou ainda no suprimento de adenilatos para a matriz mitocondrial. Em geral, as mitocôndrias do cultivar tolerante apresentaram maior consumo de oxigênio durante o estado 3, estado 4, no coeficiente de controle respiratório e nas atividades das rotas citocromo e alternativa.

Quando se utilizou L-malato + L-glutamato como substrato, a respiração no estado 3, estado 4 e o coeficiente de controle respiratório não sofreram interferência da adição de Al, nos dois cultivares. STEWART e COPELAND (1993) utilizando mitocôndrias isoladas de mesocarpo de abacate e DE LIMA e COPELAND (1994), utilizando plântulas de trigo obtiveram resultados diferentes dos aqui relatados. No primeiro caso, o Al reduziu a respiração apenas no estado 3, mas no segundo caso, os autores observaram redução da respiração apenas durante a oxidação do L-malato + L-glutamato (estado 4).

De maneira geral, no presente experimento, a presença de Al reduziu a relação ADP/O e aumentou a atividade da rota alternativa quando se utilizou o L-malato + L-glutamato como substratos, nos dois cultivares. A redução da relação ADP/O pode ser explicada pelo direcionamento do fluxo de elétrons da rota citocromo para a rota alternativa, causada pelo Al. O maior fluxo de elétrons para a rota alternativa em detrimento da rota citocromo, diminui a formação do gradiente eletroquímico mitocondrial, levando a uma perda na eficiência de produção de ATP.

A presença de Al praticamente não interferiu na respiração nem tampouco nas relações ADP/O e no coeficiente de controle respiratório quando os substratos utilizados foram o piruvato e o succinato.

O efeito direto do Al sobre mitocôndrias isoladas de plântulas tratadas com este elemento apenas no meio de reação, mostrou-se complexo e de difícil explicação. De maneira geral, o Al não afetou a respiração mitocondrial e os cultivares não mostraram tendências representativas, com exceção de quando se utilizou o L-malato como substrato. Na maior parte dos casos, a presença do Al levou a um aumento na atividade da rota alternativa, nos dois

cultivares. Isto se deu provavelmente pela redução na atividade da rota citocromo embora, esta redução, em alguns casos, não tenha sido significativa.

Os resultados observados dos efeitos do Al em relação aos cultivares testados, sobre mitocôndrias isoladas de plântulas não tratadas com Al, foram menos severos e nem sempre parecidos com aqueles observados em plântulas pré-tratadas com Al por um período de 72 h. É provável que o Al ao longo de um período prolongado de exposição das plântulas cause efeitos crônicos, ou seja, efeitos sobre outras moléculas, processos e estruturas celulares que indiretamente acabam afetando a atividade mitocondrial. Algumas possibilidades seriam os efeitos do Al sobre o metabolismo de açúcares fosforilados, nucleotídeos, ácidos nucléicos (MINOCHA et al., 1992), sobre a H^+ -ATPase (AHN et al., 2001; PEIXOTO et al., 2001), e inclusive sobre os processos da respiração (DE LIMA e COPELAND, 1994). A grande interação do Al com a célula e a constância da presença do Al no sistema radicular com o aumento do tempo de exposição, prejudica enormemente o metabolismo celular o que pode ter contribuído para as maiores injúrias causadas pelo Al na respiração quando comparado com os efeitos diretos do Al.

Dos resultados obtidos tanto de mitocôndrias isoladas de plântulas tratadas com Al como de tecidos intactos destacados sugere-se que o Al possa interferir no suprimento de adenilatos e, ou na ATP sintase e que os efeitos mais severos foram observados no cultivar sensível.

3.6. Efeito do alumínio na atividade da NADH e da succinato citocromo c oxidoreductase

De maneira geral, a exposição prolongada das plantas ao Al interferiu negativamente na atividade de ambas enzimas nos dois cultivares (Quadros 46 e 47). Tanto as mitocôndrias rompidas do cultivar sensível como as do cultivar tolerante, sofreram redução de 26 e 19 % na atividade da NADH citocromo c oxidoreductase, respectivamente, em relação às plantas controle (Quadro 46). As mitocôndrias rompidas do cultivar tolerante apresentaram, independentemente da presença de Al, maior capacidade de reduzir o citocromo c do que o cultivar sensível.

Quadro 46 - Taxa de redução do citocromo c ($\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$) resultante da atividade da NADH citocromo c oxidoreductase em plântulas de dois cultivares de milho crescidas na presença de alumínio

Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	2,59 Ab	2,73 Aa
185	1,92 Bb	2,21 Ba

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5 % de probabilidade

A atividade da succinato citocromo c oxidoreductase, à semelhança do que se observou para a NADH citocromo c oxidoreductase sofreu redução pela exposição das plântulas ao Al, nos dois cultivares (Quadro 47). Neste caso, o cultivar sensível apresentou redução de 33% e o cultivar tolerante de apenas 20%. O cultivar sensível apresentou atividade enzimática mais elevada que o cultivar tolerante apenas na ausência de Al. Em média, a diferença entre os cultivares foi de apenas 11%.

Quadro 47 - Taxa de redução do citocromo c ($\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$) resultante da atividade da succinato citocromo c oxidoreductase em plântulas de dois cultivares de milho crescidas na presença de alumínio

Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	0,36 Aa	0,30 Ab
185	0,24 Ba	0,24 Ba

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5 % de probabilidade

As enzimas foram afetadas não apenas com a exposição prévia das plântulas ao Al (Quadros 46 e 47) mas, também, pela adição do Al ao meio de reação. A atividade da NADH citocromo c oxidoreductase dos dois cultivares apresentou decréscimo linear com o aumento da concentração de Al ao meio de reação (Figura 10). A concentração de Al no meio de reação para provocar redução de 50 % na taxa de redução do citocromo c foi de 356 μM e de 292 μM para os cultivares sensível e tolerante, respectivamente.

O Al adicionado no meio de reação, portanto, reduz drasticamente a atividade da enzima NADH citocromo c oxidoreductase nos dois cultivares e em especial para o cultivar tolerante. O cultivar tolerante apresentou menor atividade desta enzima, mas o Al interferiu com maior intensidade sobre a enzima isolada do cultivar sensível, conforme indica os coeficientes angulares (Figura 10).

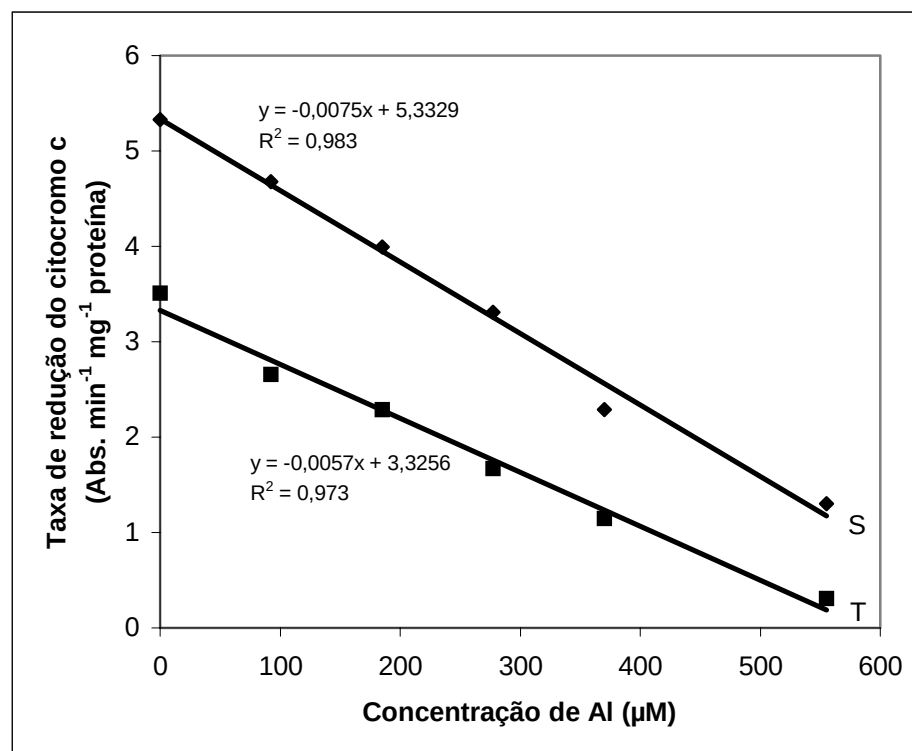


Figura 10 – Taxa de redução do citocromo c resultante da atividade da NADH citocromo c oxidoreductase em dois cultivares de milho submetidos a diferentes concentrações de alumínio no meio de reação. (S= sensível; T= tolerante).

Na faixa de concentração estudada o cultivar sensível apresentou atividade enzimática sempre mais elevada mas, à medida que a concentração de Al foi aumentada no meio de reação, eles tenderam para um ponto comum, de baixa atividade. Todavia, observa-se que nas plântulas tratadas com Al, o cultivar tolerante apresentou menor inibição da atividade da NADH citocromo c oxidoreductase.

A atividade da enzima succinato citocromo c oxidoreductase, também, sofreu redução com o aumento da concentração de Al no meio de reação, nos dois cultivares (Figura 11 e Quadro 48). As reduções na atividade desta enzima, entretanto, foram muito menores do que na NADH citocromo c oxidoreductase (Figura 10)

Os dois cultivares apresentaram a mesma tendência de variação da atividade enzimática com o aumento da concentração de Al no meio de reação, embora em magnitudes diferentes e o comportamento enzimático foi representado por duas linhas decrescente (Figura 11).

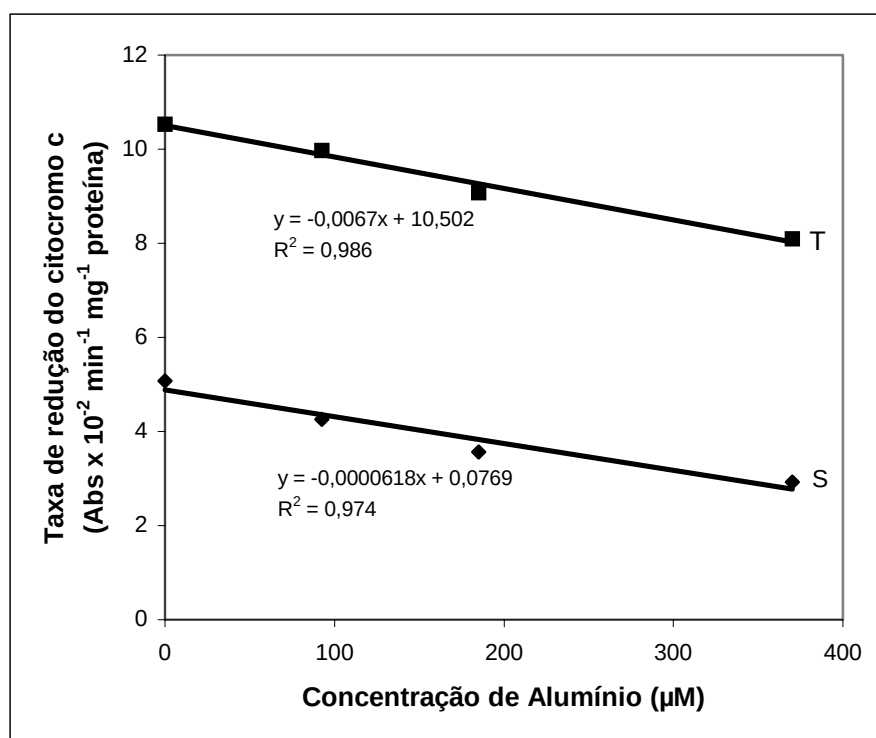


Figura 11 - Taxa de redução do citocromo c resultante da atividade da succinato citocromo c oxidoreductase de dois cultivares de milho, submetidos a diferentes concentrações de alumínio, no meio de reação. (S=sensível; T= Tolerante).

Em média, portanto, os dois cultivares (Figura 11), sofreram uma redução de 30 % na atividade da succinato citocromo c oxidoreductase na concentração mais elevada de Al testada, isto é, de 370 μM . Entretanto, quando se analisam estatisticamente as concentrações individualmente, observa-se que o cultivar tolerante, em média, teve a atividade enzimática sempre maior do que o cultivar sensível (Quadro 48).

Quadro 48 - Taxa de redução do citocromo c resultante da atividade da succinato citocromo c oxidoreductase em dois cultivares de milho submetidos a diferentes concentrações de alumínio no meio de reação

Cultivar	Concentração de Al (μM)				
	0,0	92,5	185,0	370,0	Média
	-----Δ A x 10 ⁻² min ⁻¹ mg ⁻¹ proteína-----				
Sensível	5,08 B	4,26 B	3,57 B	2,93 B	3,96 B
Tolerante	10,53 A	9,97 A	9,08 A	8,10 A	9,42 A

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5 % de probabilidade.

O Al, pois, tem um efeito inibitório sobre a atividade de enzimas ligadas a cadeia transportadora de elétrons tanto quando se considera seu efeito em função do tempo de exposição ao Al (efeito crônico) como seu efeito direto, isto é, aplicado diretamente ao meio de reação. De maneira geral, o Al afetou as atividades das enzimas NADH e a succinato citocromo c oxidoreductase nos dois cultivares, mas sempre com maior intensidade no cultivar sensível. Esperava-se, em função deste fato, que o Al tivesse efeito negativo sobre a respiração durante o estado 4, quando se utilizou o NADH ou o succinato como substrato. Entretanto, não se observou nenhum efeito do Al sobre o consumo de oxigênio neste estado quando se utilizaram estes dois substratos (Quadro 24 e 28). É evidente que não se pode destacar a possibilidade de terem ocorrido mudanças no comportamento destas enzimas em função do procedimento de isolamento, preparo e rompimento das mitocôndrias. No procedimento de rompimento das mitocôndrias, as enzimas ligadas à cadeia transportadora de elétrons podem ter ficado expostas diretamente a altas concentrações de Al, comparativamente àqueles casos em que as mitocôndrias permaneceram intactas. Assim, os resultados deste experimento podem não estar refletindo de modo correto a situação em que se utilizaram mitocôndrias intactas.

3.7. Efeito do alumínio sobre o inchamento mitocondrial

As mitocôndrias isoladas de plântulas submetidas ao tratamento com Al em solução nutritiva apresentaram, em média, nos dois cultivares uma velocidade de absorção de fosfato 22 % menor do que as plantas controle (Quadro 49). Entretanto, considerando-se os cultivares individualmente, observa-se que apenas o cultivar tolerante sofreu redução significativa (37%). Os cultivares diferiram entre si, quanto à absorção do fosfato, apenas na ausência de Al. Nesta situação, o cultivar tolerante apresentou uma velocidade inicial de inchamento mitocondrial, 37 % maior do que o cultivar sensível.

Quadro 49 - Velocidade inicial do inchamento mitocondrial ($\Delta A \times 10^{-3} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína) em dois cultivares de milho, crescidos na presença de alumínio

Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	18,9 Ab	26,2 Aa
185	18,8 Aa	16,5 Ba

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5% de probabilidade

Analisando através de regressão, verifica-se que o Al colocado no meio de reação tem ação inibitória na absorção do fosfato (Figura 12). Embora não houve interação significativa entre os cultivares, neste caso, a presença do Al no meio de reação, na média dos dois cultivares, reduziu a capacidade de captação do fosfato (Figura 12). Esta inibição foi proporcional à concentração de Al adicionado ao meio de reação. Nas concentrações de 185 e 370 μM a absorção de fosfato foi aproximadamente 21,1 e 54,4 % menor, respectivamente, do que nas mitocôndrias controle.

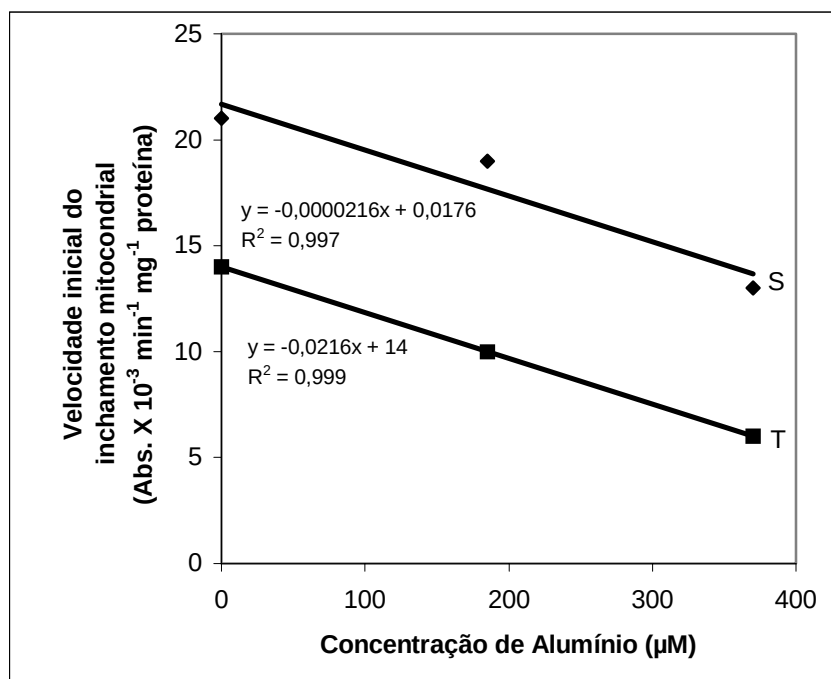


Figura 12 - Velocidade inicial do inchamento mitocondrial de dois cultivares de milho submetidos a diferentes concentrações de alumínio no meio de reação. (S= sensível; T= tolerante).

O Al, portanto, de modo geral, teve influência sobre a absorção de fosfato tanto em mitocôndrias de plântulas crescidas sob este elemento como nas mitocôndrias de plântulas não tratadas com Al. A velocidade inicial de inchamento mitocondrial no cultivar sensível foi, em média, 1,8 vez maior do que no cultivar tolerante.

Este efeito do Al sobre a absorção do Pi, que é fator fundamental para a produção de ATP na matriz mitocondrial (JUNG e BRIERLEY, 1979; CUMMING et al., 1992) fortalece a hipótese do Al estar interferindo no suprimento de adenilatos para a matriz mitocondrial (STEWART e COPELAND, 1993) como sugerido para os ápices radiculares destacados (item 3.3) e para as mitocôndrias de plântulas tratadas com Al (item 3.4). O fato do cultivar tolerante ter sofrido maior redução na captação de fosfato quando as plântulas foram crescidas sob Al, sugere que esta redução não ocasionou prejuízo no desempenho deste cultivar, principalmente quando se considera o crescimento radicular. O nível de Pi na matriz mitocondrial no cultivar tolerante, mesmo na presença de Al, poderia, desta forma, ser suficiente para a fosforilação do ADP, o que pode não acontecer no cultivar sensível.

A interpretação de resultados de captação de fosfato na presença de Al no meio de reação contendo mitocôndrias intactas, é ainda mais complexa. O Al pode formar compostos pouco solúveis com o fosfato (LARSEN et al., 1998; TAYLOR et al., 2000; ZHANG et al., 2001) reduzindo a sua concentração na forma livre que pode ser trocado pelo transportador. Assim, este efeito do Al, sobre a absorção de fosfato pode não ser um efeito direto sobre o transportador mas apenas uma redução na quantidade disponível de fosfato a ser trocado. Antes de uma conclusão mais definitiva, torna-se necessário a realização de outras pesquisas, principalmente envolvendo o trocador de Pi.

3.8. Efeito do alumínio sobre a atividade enzimática

3.8.1. Desidrogenase do malato

A atividade da desidrogenase do malato decresceu, em média 39% nos dois cultivares tratados com Al durante 72 h, mas os cultivares não diferiram entre si nem na ausência nem na presença de Al (Quadro 50). A desidrogenase do malato catalisa a interconversão do ácido oxaloacético a malato e existe em várias isoformas (KUMAR et al., 2000), sendo considerada enzima chave no metabolismo celular, e em particular no metabolismo mitocondrial. A expressão diferencial das isoformas da desidrogenase do malato e sua atividade têm sido reportadas em muitas espécies de plantas sob estresse abiótico (KINGSTONSMITH et al., 1997). Neste caso, o extrato enzimático bruto ou total tinha presente as diferentes isoformas. É possível que, dependendo da isoforma, possa ser encontrada diferença significativa entre cultivares.

Quadro 50 - Atividade da desidrogenase do malato ($\mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína) em plântulas de dois cultivares de milho crescidas na presença de alumínio

Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	1,05 Aa	1,08 Aa
185	0,78 Ba	0,76 Ba

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5 % de probabilidade.

3.8.2. Desidrogenase do malato mitocondrial

A atividade da desidrogenase do malato em mitocôndrias que foram isoladas de plântulas crescidas na presença de Al, durante 72 h, não foi influenciada pelo Al (Quadro 51). Neste caso, entretanto, o cultivar tolerante, apresentou, em média, 19% maior atividade do que o cultivar sensível. É bom lembrar, entretanto, que o pH do meio de reação era 7,5, o que deve ter reduzido ou eliminado em parte o efeito do Al. De acordo com o programa

GEOCHEM (Versão 2.0), estima-se que, sob as condições do ensaio, apenas pequena concentração de Al esteja na forma livre, ou seja, na forma de Al^{+3} . A maior atividade da enzima desidrogenase do malato mitocondrial do cultivar tolerante, pode estar contribuindo para o melhor desempenho deste cultivar quando se considera o crescimento radicular e os níveis superiores de manutenção na respiração total (V_t), obtidas pelos ápices radiculares destacados. RYAN et al. (1995), por outro lado, trabalhando com ápices radiculares de linhagens isogênicas de trigo, sensíveis e tolerantes, não observaram alteração na atividade da desidrogenase do malato. Estes autores acreditam que as linhagens sensíveis e tolerantes ao Al, têm capacidade semelhantes para oxidar o malato.

O efeito de concentrações crescentes de Al sobre a atividade da desidrogenase do malato mitocondrial, *in vitro*, ou seja, colocado no meio de reação, foi estatisticamente igual nos dois cultivares (Figura 13). As curvas representativas do efeito do Al nos dois cultivares mostram que a atividade enzimática decresceu progressivamente com o aumento na concentração de Al no meio de reação.

Quadro 51 - Atividade da desidrogenase do malato mitocondrial ($\mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) em plântulas de dois cultivares de milho crescidas na presença de alumínio

Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	1,25 Aa	1,57 Aa
185	1,23 Aa	1,39 Aa
Média	1,24 b	1,47 a

Médias seguidas pelas mesmas letras minúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5 % de probabilidade.

A atividade enzimática na presença de Al foi 14 % menor do que nas plantas controle. O grau de 50% de inibição da atividade enzimática só foi atingido a 327 μM de Al. Os cultivares diferiram estatisticamente entre si, apenas na média, tendo o cultivar sensível apresentado uma atividade enzimática 28 % mais elevada do que o cultivar tolerante.

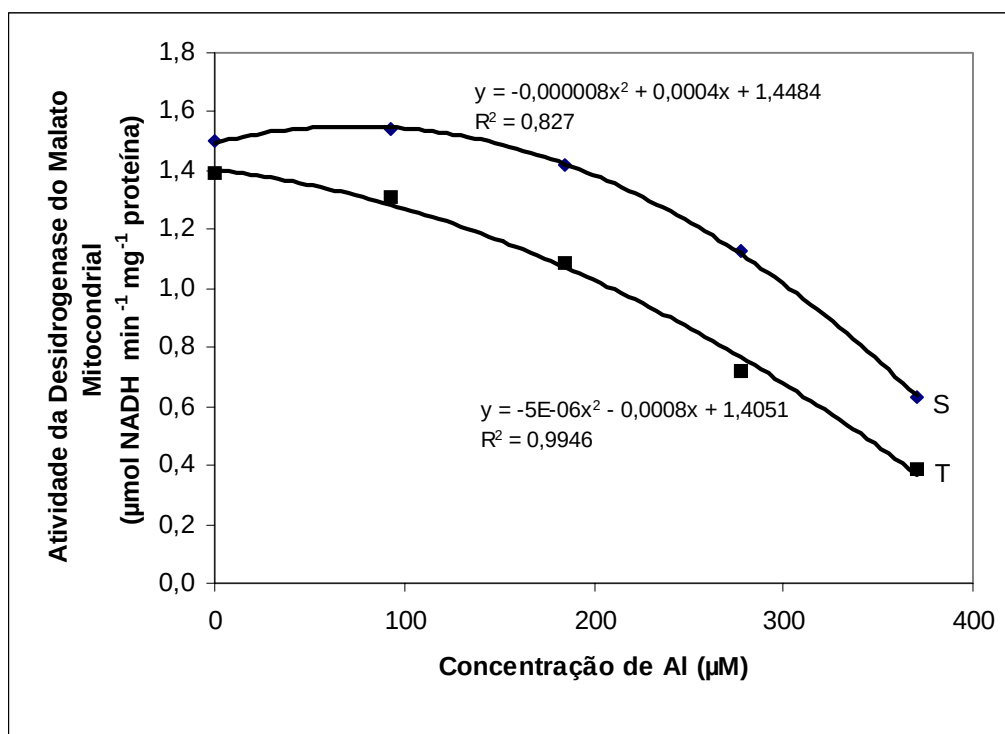


Figura 13 - Atividade da desidrogenase do malato mitocondrial de dois cultivares de milho submetidos a diferentes concentrações de alumínio no meio de reação. (S= sensível; T= tolerante).

O fato do Al inibir a atividade da desidrogenase do malato no extrato bruto mas não na fração de mitocôndrias purificadas de plantas crescidas sob exposição ao Al, sugere que uma ou mais isoenzimas extramitocondriais podem estar sendo influenciadas pelo Al. Como o Al não inibiu a atividade da enzima desidrogenase do malato mitocondrial nas plantas crescidas com este elemento, mas sim com a adição do Al diretamente no meio de reação, conclui-se que os níveis de Al intramitocondrial das plantas crescidas sob exposição deste elemento, podem não ter atingido níveis fitotóxicos, ao menos quando se refere às mitocôndrias.

O cultivar tolerante parece ter alguma estratégia para preservar melhor a atividade da desidrogenase do malato mitocondrial, quando submetida ao estresse causado pelo Al ao longo do tempo. Quando se avaliou o efeito direto do Al na atividade da desidrogenase do malato, a resposta dos dois cultivares foi diferente. Neste caso, o cultivar sensível apresentou, em média, maior atividade desta enzima nas mitocôndrias. Novamente, admite-se que quando o

Al é colocado diretamente no meio de reação, a enzima sofre os danos deste contato direto a este elemento, o que não deve acontecer quando apenas as plântulas são expostas ao Al em solução nutritiva. É provável, que neste caso, apenas pequena fração do Al colocado na solução nutritiva, realmente chega, a entrar em contato com a enzima propriamente dita. Aparentemente, a interferência do Al sobre a atividade destas enzimas, utilizando plântulas tratadas com Al, em solução nutritiva, expressam melhor a tolerância do que quando os ensaios são *in vitro*.

3.8.3. Fumarase

A atividade da fumarase em extratos brutos de plântulas expostas ao Al por 72 h, sofreu aumento de 78 e 104%, nos cultivares sensível e tolerante, respectivamente (Quadro 52). O cultivar tolerante parece reagir mais prontamente a interferência ocasionado pelo Al. COPELAND e DE LIMA (1992) também encontraram aumento na atividade desta enzima em plântulas de trigo expostas ao Al. Os aumentos encontrados foram de 52 e 22 % após 24 e 48h, respectivamente. Estes autores, entretanto, atribuíram este aumento na atividade desta enzima a um efeito secundário do Al, uma vez que este aumento foi antecedido pelo aumento da desidrogenase alcoólica.

Quadro 52 - Atividade da fumarase ($\mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) em plântulas de dois cultivares de milho crescidas na presença de alumínio

Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	3,98 Ba	4,28 Ba
185	7,12 Aa	8,74 Aa

Médias seguidas pelas mesmas letras minúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5 % de probabilidade.

À semelhança da atividade da desidrogenase do malato total, não houve comportamento diferencial entre os cultivares, independentemente da presença ou não de Al.

Os resultados aqui obtidos não permitem concluir se o efeito do Al sobre a atividade da fumarase foi direto ou indireto. É mais provável que seja um efeito indireto, uma vez que o Al não afetou a atividade da enzima desidrogenase do malato quando as plantas foram crescidas em meio contendo Al, mas sim, quando colocado apenas no meio de reação. Todavia, o mecanismo da ativação não é ainda conhecido e muitos fatores podem estar envolvidos neste evento (COPELAND e DE LIMA, 1992).

O aumento na atividade desta enzima em resposta ao Al pode contribuir positivamente para manter níveis mais altos de compostos redutores para o processo da respiração, principalmente no cultivar tolerante que apresentou 26% maior atividade desta enzima, quando comparado ao cultivar sensível. Além disso, o aumento expressivo na atividade da fumarase na presença de níveis tóxicos de Al, sugere que esta enzima pode ter grande importância na síntese do malato em plantas de milho sob estresse por Al, especialmente no cultivar tolerante.

3.8.4. Desidrogenase do isocitrato

A exposição das plântulas de milho durante 72 h na presença ou não de Al não provocou alteração na atividade da desidrogenase do isocitrato, independentemente do cultivar e da concentração do Al testados (Quadro 53). GONÇALVES (1998) trabalhando com dois cultivares de sorgo com tolerância diferencial ao Al, também não encontrou diferença significativa do efeito do Al na atividade da desidrogenase do isocitrato. Em plântulas de trigo, entretanto, a atividade desta enzima aumentou pela exposição ao Al (COPELAND e DE LIMA, 1992), o que estes autores consideram também um efeito secundário no que concerne ao mecanismo de tolerância ao Al. Embora a diferença não tenha sido significativa, no cultivar sensível esta enzima sofreu inibição devido ao Al de 28% em relação às plantas não tratadas com o cátion fitotóxico.

Quadro 53 - Atividade da desidrogenase do isocitrato ($\mu\text{mol NADPH min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) em plântulas de dois cultivares de milho crescidas na presença de alumínio

Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	6,01 Aa	4,82 Aa
185	4,99 Aa	4,71 Aa

Médias seguidas pelas mesmas letras minúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5 % de probabilidade.

3.8.5. Desidrogenase alcoólica

A presença de Al na solução nutritiva resultou em reduções de 47 e 51 na atividade enzimática da desidrogenase alcoólica no cultivar sensível e tolerante, respectivamente (Quadro 54). A atividade desta enzima foi, no cultivar tolerante, independentemente da presença do Al, sempre maior do que no cultivar sensível. Na ausência e na presença de Al, o cultivar tolerante apresentou uma atividade 49 e 37 %, mais elevada do que o cultivar sensível, respectivamente.

Esta enzima, que sob condições normais de oxigênio, apresenta baixa atividade, quando submetida a hipoxia ou anoxia tem a sua atividade grandemente aumentada, permitindo que o ciclo glicolítico continue pela utilização do NADH disponível (BUCHANAN et al., 2000). Poucos são os trabalhos que relacionam os efeitos do Al com esta enzima. COPELAND e DE LIMA (1992) verificaram que o Al pode induzir um aumento na atividade da desidrogenase alcoólica por produzir na planta modificações que se manifestam na forma de sintomas de hipoxia. Estes autores verificaram que plantas de trigo tratadas com Al, apresentaram 2,8 vezes maior atividade da desidrogenase alcoólica do que na ausência deste elemento. Com isso, concluíram que o Al estaria reduzindo as tensões de oxigênio na mitocôndria. Entretanto, os resultados do presente experimento foram completamente diferentes. A desidrogenase alcoólica de plântulas expostas ao Al durante 72 h apresentaram menor atividade enzimática nos dois cultivares e, inclusive com intensidade diferencial entre os cultivares (Quadro 54). A inibição da atividade

da desidrogenase alcoólica pelo Al pode explicar, pelo menos em parte, as reduções causadas pelo Al na respiração dos ápices radiculares destacados. A produção de NADH pela glicólise parece ter dois destinos principais. O NADH pode ser oxidado, doando seus elétrons diretamente para a cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, ou no caso de hipoxia, anoxia ou mesmo outro tipo de comprometimento no interior mitocondrial, ser oxidado no processo fermentativo (COPELAND e DE LIMA, 1992).

Quadro 54 - Atividade específica da desidrogenase alcoólica (nmol NADH min⁻¹ mg⁻¹ proteína) em plântulas de dois cultivares de milho crescidas em alumínio

Al (μM)	Cultivar	
	Sensível	Tolerante
0	52,37 Ab	78,22 Aa
185	27,79 Bb*	38,01 Ba*

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha não diferem estatisticamente pelo teste F, a 5 % e * 10% de probabilidade.

O NADH assim oxidado permite que o processo glicolítico continue operando. Como o Al interfere negativamente na respiração e, também, na atividade da desidrogenase alcoólica, o NADH formado durante a glicólise passa a ser oxidado em menor proporção. Em razão disso, o processo glicolítico passa a não operar de maneira plena, comprometendo a formação de produtos redutores na matriz mitocondrial e, conseqüentemente, a produção de ATP que será utilizado no metabolismo das plantas. Assim, parece que os efeitos do Al se somam, uma vez que o Al poderia causar injúrias tanto dentro como fora da mitocôndria.

As maiores atividades da desidrogenase do malato mitocondrial, fumarase e desidrogenase alcoólica observadas nas plântulas do cultivar tolerante, sem dúvida, refletem a maior tolerância deste cultivar. Em conseqüência, este cultivar apresentou maior crescimento radicular e maiores taxas de respiração, tanto dos ápices radiculares como de mitocôndrias isoladas de plântulas tratadas com Al. Aparentemente, como há maior produção de malato, principalmente devido ao aumento na atividade da

fumarase, especialmente no cultivar tolerante, que ultrapassa as necessidades do ciclo de Krebs, parte do malato produzido pode ser transferido para o citossol e, eventualmente, para o meio nutritivo externo onde complexaria o Al (DELHAIZE et al., 2001; ZHANG et al., 2001), evitando assim, sua ação fitotóxica no interior celular (OSAWA e MATSUMOTO, 2001).

4. RESUMO E CONCLUSÕES

Na tentativa de contribuir para o esclarecimento da ação tóxica do Al em plantas, resolveu-se estudar a influência deste elemento sobre alguns aspectos do metabolismo mitocondrial e de algumas enzimas ligadas à cadeia transportadora de elétrons, ao ciclo dos ácidos tricarboxílicos e do processo fermentativo em dois cultivares de milho, um sensível (AG 122) e outro tolerante (AG 5011) ao Al. As plântulas de milho foram cultivadas em solução nutritiva, pH 4,0, de modo a conter duas concentrações de Al (0 e 185 μM) por um período de 12 a 72 h. Com objetivo de se avaliar o efeito direto e imediato do Al utilizaram-se mitocôndrias isoladas de plântulas não tratadas com Al. Neste caso, o Al foi colocado apenas no meio de reação. Nestes experimentos foram determinados também os efeitos do Al sobre as seguintes variáveis: crescimento radicular; teor de Al na matéria seca; taxa de respiração em ápices radiculares destacados, bem como a participação da rota citocromo e da rota alternativa; o consumo de oxigênio durante os estados 3 e 4, o coeficiente de controle respiratório e a relação ADP/O em mitocôndrias pré-tratadas e em mitocôndrias de plântulas não tratadas com Al; a atividade de enzimas do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, da cadeia transportadora de elétrons e do processo fermentativo. A taxa de crescimento radicular foi maior no cultivar tolerante e as diferenças entre os cultivares aumentaram com o tempo de exposição das plantas ao Al, independentemente da presença de Al na solução nutritiva. O cultivar tolerante, na presença de Al, apresentou, também melhor desempenho no crescimento radicular do que o cultivar sensível. O Al acumulou com maior intensidade no sistema radicular do que na parte aérea, dos dois cultivares que

não diferiram estatisticamente entre si. A atividade respiratória total em ápices destacados foi grandemente inibida pela adição de Al na solução nutritiva. O consumo de oxigênio nos dois cultivares sofreu redução já com 12 h de exposição ao Al. O cultivar tolerante, em média, apresentou menor redução na taxa respiratória. Na presença de Al o cultivar sensível apresentou menor atividade da rota citocromo e da rota alternativa do que o cultivar tolerante. O Al, independentemente do substrato utilizado, reduziu a respiração durante à fosforilação do ADP (estado 3) e o coeficiente de controle respiratório de mitocôndrias isoladas de plântulas que foram tratadas com Al por 72 h. Esta redução, de maneira geral, foi maior no cultivar sensível. O Al adicionado diretamente ao meio de reação, contendo mitocôndrias isoladas de plântulas de 3 dias, praticamente não interferiu nas variáveis de respiração estudadas quando se utilizaram os substratos separadamente ou na mistura. A única exceção ocorreu com L-malato em que os resultados foram diferentes e complexos. O Al inibiu, também, as atividades das enzimas NADH e da succinato citocromo c oxidoredutase, tanto nas mitocôndrias isoladas de plântulas cultivadas em solução nutritiva contendo Al como nas mitocôndrias em que o Al estava presente apenas no meio de reação. No primeiro caso, o cultivar tolerante apresentou maior atividade da enzima NADH e menor atividade da succinato citocromo c oxidoredutase. No segundo caso, quando o Al foi adicionado ao meio de reação, a atividade das duas enzimas foi reduzida proporcionalmente a concentração de Al no meio. A absorção de fosfato pela membrana mitocondrial interna também foi inibida pelo Al, tanto nas mitocôndrias de plântulas crescidas com Al, como nas mitocôndrias de plântulas não tratadas com este elemento. A capacidade de absorção de fosfato na presença de Al foi menor no cultivar sensível do que no cultivar tolerante. O aumento na concentração do Al no meio de reação, reduziu a absorção de fosfato de maneira similar nos dois cultivares. A atividade da desidrogenase do malato no extrato bruto foi inibida nos dois cultivares, quando as plântulas foram tratadas com Al e os dois cultivares não diferiram entre si. A atividade desidrogenase do malato mitocondrial nas mesmas condições descritas, não foi influenciada pelo Al nem pelo cultivar testado. A adição de Al no meio de reação, entretanto, inibiu a atividade desta enzima nos dois cultivares e de modo proporcional a concentração de Al adicionada. A atividade

da desidrogenase do isocitrato foi insensível ao Al e não apresentou comportamento diferenciado entre os cultivares. A fumarase teve sua atividade aumentada nos dois cultivares quando as plantas foram tratadas com Al em solução nutritiva. A atividade da desidrogenase alcoólica foi suprimida, em ambos os cultivares, quando as plantas foram expostas ao Al. Neste caso, o cultivar tolerante apresentou maior atividade da desidrogenase alcoólica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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 Physiol.**, v. 126, p. 1381-1390, 2001.
- ALLAN, J.E. **The preparation of agricultural samples for analysis by atomic absorption spectroscopy**. [s.l.]: Varian Techtron, 1969. 15p. (Bulletin, 12/69).
- ANIOL, A. Genetics of tolerance to aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L. Thell). **Plant Soil**, v. 123, p. 223-227, 1990.
- AZCON-BIETO, J.; LAMBERS, H.; DAY, D. A. Respiratory properties of developing bean and pea leaves. **Austr. J. Plant Physiol.** v.10, p.237-245, 1983.
- BASU, U.; GODBOLD, D.; TAYLOR, G. J. Aluminum resistance in *Triticum aestivum* associated with enhanced exudation of malate. **J. Plant Physiol.**, v. 144, p. 747-753, 1994.
- BENNET, R. J.; BREEN, C. M. The recovery of the roots of *Zea mays* L. from various aluminum treatments: towards elucidating the regulatory processes that underlies root growth control. **Environ. Exp. Bot.**, v. 31, p. 153-163, 1991.
- BENNET, R. J.; BREEN, C. M.; FEY, M.V. The primary site of aluminum injury in the root of *Zea mays* L. **S. Afr. J. Plant Soil**, v 2, p. 8-17, 1985.
- BINGHAM, I. J.; FARRAR, J. F. Respiration of barley roots: Assessment of activity of the alternative path using SHAM. **Physiol. Plant.**, v. 70, p. 491-498, 1987.
- BONATO, C.M. **Absorção e Metabolismo do Enxofre Influenciados pelo Alumínio em Dois Cultivares de Sorgo**. Viçosa, MG, 44p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal – Universidade Federal de Viçosa. 1996.

- BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & molecular biology of plantas**. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland. 1367p. 2000.
- CALBO, A. G.; CAMBRAIA, J. Efeito do alumínio sobre a composição mineral de dois cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench.) **Rev. Ceres**. v.27, p. 368-378, 1980.
- CAMBRAIA, J.; GALVANI, F. R.; ESTEVÃO, M. D. M., et al.. Effects of aluminum on organic acid, sugar and amino acid composition of the root system of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench.). **J. Plant Nutr.** v. 6, p.313-322, 1983.
- CARVER, B. P.; OWNBY, J. D. Acid soil tolerance in wheat. **Adv. Agron.** v. 54, p. 117-173, 1995.
- CHANCE, B.; WILLIAMS, G.R. A simple and rapid assay of oxidative phosphorylation. **Nature**. v. 175, p. 1120-1121, 1955.
- CLARK, R. B. Effect of aluminium on growth and mineral elements of Al-tolerance and Al-intolerant corn. **Plant and Soil**, v.47, p.653-662, 1977.
- CLARKSON, D. T. Effect of aluminum on the uptake and metabolism of phosphorus by barley seedlings. **Plant Physiol.**, v.41, p.165-172, 1966.
- CLARKSON, D. T. Metabolic aspects of aluminum toxicity and some possible mechanisms for resistance. In: RORISON, I. H. (Ed.). **Ecological aspects of mineral nutrition of plants**. Oxford: Blackwell Scientific, 1969. p. 381-394.
- COLLIER, D. E.; ACKERMANN, F.; SOMERS, D. J.; CUMMINS J. R.; ATKIN, O. K. The effect of aluminum exposure on root respiration in an aluminum-sensitive and aluminum-tolerant cultivar of *Triticum aestivum*. **Physiol. Plant.**, v. 87, p. 447-452, 1983.
- COPELAND, L.; DE LIMA, M. L. The effect of aluminum on enzyme activities in wheat roots. **J. Plant Physiol.**, v. 140, p. 641-645, 1992.
- CRAWFORD, S. A.; WILKENS, S. Ultrastructural changes in root cap cells of two Australian native grass species following exposure to aluminum. **Aust. J. Plant Physiol.**, v. 24, p. 165-174, 1997.
- CUMMING, J. R.; CUMMING, A. B.; TAYLOR, G. F. Patterns of root respiration associated with the induction of aluminum tolerance in *Phaseolus vulgaris* L. **J. Exp. Bot.** v.43, p. 1075-1081, 1992.
- CZUBA, G. Effect of aluminium on respiratory control of mitochondria from tips of Al-sensitive and Al-resistant wheat varieties. **Acta Physiol. Plant.**, v. 7, p. 103-106, 1985.

- DAY, D. A.; HANSON, J. B.: On methods for the isolation of mitochondria from etiolated corn shoots. **Plant Sci. Lett.**, v. 11, p. 99-104, 1977.
- DE LIMA, M.; COPELAND, L. The effect of aluminum on respiration of wheat roots. **Physiol. Plant.**, v. 90, p. 51-58, 1994.
- DELHAIZE, E.; CRAIG, S.; BEATON C.D. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). I. Uptake and distribution of aluminum in root apices. **Plant Physiol.**, v.103, p.685-693, 1993.
- DELHAIZE, E.; HEBB, D. M. RYAN, P. R. Expression of a *Pseudomonas aeruginosa* citrate synthase gene in tobacco is not associated with either enhanced citrate accumulation or efflux. **Plant Physiol.**, v. 125, p. 2059-2067, 2001.
- DELHAIZE, E.; RYAN, P.R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiol.**, v.107, p.315-321, 1995.
- DOUCE, R.; NEUBURGER, M. The uniqueness of plant mitochondria. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 40, p. 371-414, 1989.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Relatório técnico anual**, 1976/77. Brasília, DF, 1978. 183p.
- ESTABROOK, R. W. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratios. **Methods Enzymol.**, v.10, p. 41-47, 1967.
- EZAKI, B.; GARDNER, R. C.; EZAKI, Y.; MATSUMOTO, H. Expression of aluminum-induced genes in transgenic Arabidopsis plants can ameliorate aluminum stress and/or oxidative stress. **Plant Physiol.**, v. 122, p. 657-665, 2000.
- FOY, C. D. Effects of aluminum on plant growth. In: Carson, E. W. (Ed.) **The plant root and its environment.**, 1974. p. 601-642.
- FOY, C. D. Soil Chemical factors limiting plant root growth. In: HATFIELD, J. L., STEWART, B. A. (Ed.). **Limitations to plant root growth**. New York, 1992. p. 97-149.
- FOY, C. D., FLEMING, A. L. The physiology of plant tolerance to excess available aluminum and manganese in acids soils. In: JUNG, G. A., (Ed.). **Crop tolerance to suboptimal land conditions.**, 1978. p. 301-328.
- FOY, C. D.; CHANEY, R. L.; WHITE, M. C. The physiology of metal toxicity in plants. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, v. 29, p. 511-516, 1978.

- GONÇALVES, J. F. C. **Efeito da interação Al e Zn sobre alguns aspectos do metabolismo do ácido indolil-acético e de ácido ribonucléico em dois cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench), com tolerância diferencial ao Al.** Viçosa, MG. 58p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal de Viçosa., 1994.
- GONÇALVES, J. F. C. **Produção de ácidos orgânicos e tolerância de sorgo à toxicidade do alumínio.** Viçosa, MG. 95 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- HORST, W. J.; SCHMOHL, N.; KOLLMEIER, M.; BALUSKA, F.; SIVAGURU, M. Does aluminum inhibit root growth of maize through interaction with the cell wall-plasma membrane-cytoskeleton continuum? **Plant soil**, v. 215, p.163-174, 1999.
- HUANG, J. W.; GRUNES, D. L.; KOCHIAN, L. V. Aluminum effects on the kinetics of calcium uptake into cells of the wheat root apex. **Planta**, v. 188, p. 414-421, 1992.
- JACKSON, C.; DENCH, J. E.; HALL, D. O.; MOORE, A. L. Separation of mitochondria from contaminating subcellular structures utilizing silica soil gradient centrifugation. **Plant Physiol.**, v. 64, p. 150-153, 1979.
- JONES, D. L.; KOCHIAN, L. V. Aluminum inhibition of the inositol 1,4,5-triphosphate signal transduction pathway in wheat roots: role in aluminum toxicity? **Plant Cell**, v. 7, p. 1913-1922, 1995.
- JOHN, C. D.; GREENWAY, H. Alcoholic fermentation and activity of some enzymes in rice roots under anaerobiosis. **Aust. J. Plant Physiol.**, v. 3, p. 325-336, 1976.
- JUNG, D. W.; BRIERLEY, G. P. Swelling and contraction of potato mitochondria. **Plant Physiol.**, v. 64, p. 948-953, 1979.
- KELTJENS, W. G. Short-term effects of Al on nutrient uptake, H⁺ efflux, root respiration and nitrate reductase activity of two sorghum genotypes differing in Al-sensitivity. **Commun. Soil Sci. Plant Anal.** v. 19, p.1155-1163, 1988.
- KINGSTONSMITH, A. H.; HARBINSON, WILLIAMS, J.; FOYER, C.H. Effect of chilling on carbon assimilation, enzyme activation and photosynthetic electron transport in the absence of photoinhibition in mayze leaves. **Plant Physiol.**, v. 114, p. 1039-1046, 1997.
- KINRAIDE, T. B. Identity of the rhizotoxic aluminium species. **Plant Soil**, v. 134, p. 167-178, 1991.
- KINRAIDE, T. B. Three mechanisms for the calcium alleviation of mineral toxicities. **Plant Physiol.**, v. 116, p. 513-520, 1998.

- KOCHIAN, L.V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.46, p.237-260,1995.
- KOLLMEIER, M.; DIETRICH, P.; BAUER, C. S.; HORST, W.; HEDRICH, R. Aluminum activates a citrate-permeable anion channel in the aluminum-sensitive zone of the maize root apex. A comparison between an aluminum-sensitive and aluminum-resistant cultivar. **Plant Physiol.**, v. 126, p. 397-410, 2001.
- KOLLMEIER, 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 Physiol.**, v. 122, p. 945-956, 2000.
- KUMAR, R. G.; SLAH, K.; DUBEY, R. S. Salinity induced behavioural changes in malate glutamate dehydrogenase activities in rice seedlings of differing salt tolerance. **Plant Sci.**, v. 156, p. 23-34, 2000.
- LAMBERS, H. Respiration in intact plants and tissues: Its regulation and dependence on environmental factors, metabolism and invaded organisms. **In: Enc. Plant Physiol.**, New Series, 1985, v. 18, p.418-473.
- LARKIN, P. J. Calmodulin levels are not responsible for aluminum tolerance in wheat. **Aust. J. Plant Physiol.**, v. 14, p.377-385, 1987.
- LARSEN, P. B.; DEGENHARDT, J. R.; TAI, C-Y.; STENZLER, L. M.; HOWELL, S. H.; KOCHIAN, L. V. Aluminum-resistant Arabidopsis mutants that exhibit altered patterns of aluminum accumulation and organic acid release from roots. **Plant Physiol.**, v. 117, p. 9-18, 1998.
- LARSEN, P. B.; TAI, C-Y.; KOCHIAN, L. V.; HOWELL, S. H. Arabidopsis mutants with increased sensitivity to aluminum. **Plant Physiol.**, v. 110, p. 743-751, 1996.
- LEMOES FILHO, J.P.; CAMBRAIA, J.; OLIVA, M.O. Efeito do Al sobre a fotossíntese em dois cultivares de sorgo. **Rev. Ceres**, v.30, p. 55-62, 1983.
- LI, X. F.; MA, J. F.; MATSUMOTO, H. Pattern of aluminum-induced secretion of organic acids differs between rye and wheat. **Plant Physiol.**, v. 123, p. 1537-1543, 2000.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. C.; RANDAL, R. J. Protein measurements with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MA, J. F.; ZHENG, S. J.; MATSUMOTO, H. Specific secretion of citric acid induced by Al stress in *Cassia tora* L. **Plant Cell Physiol.**, v. 38, p.1019-1025, 1997.

- MA, J. F. Role of organic acids in detoxification of aluminum in plants. **Plant Cell Physiol.**, v. 41, p. 383-390, 2000.
- MA, Z.; MIYASAKA, S. C. Oxalate exudation by taro in response to Al. **Plant Physiol.**, v. 118, p. 861-865, 1998.
- MANICOL, P. K.; JACOBSEN, J. V. Endosperm acidification and related metabolic changes in the developing barley grain. **Plant Physiol.**, v. 98, p. 1098-1104, 1992.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic Press, 1997. 889p.
- MATSUMOTO, H.; Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. **Int. Rev. Cytol.**, v. 200, p. 1-46, 2000.
- MATSUMOTO, H.; HIRSAWA, F.; MORIMURA, S. Localization of aluminum in tea leaves. **Plant Cell Physiol.**, v.17, p.890-895, 1976.
- MINOCHA, R.; MINOCHA, S.C.; STEPHANIE, L.L. Effects of aluminum on DNA synthesis, cellular polyamines, polyamine biosynthetic enzymes and inorganic ions in cell suspension cultures of a woody plant *Catharauthus roseus*. **Physiol. Plant.**, v.85, p.417-424, 1992.
- MIYASAKA, S. C.; BUTA, J. G.; HOWELL, R. K., et al.. Mechanisms of aluminum tolerance in snapbeans. Root exudation of citric acid. **Plant Physiol.**, v.96, p.737-743, 1991.
- MIYASAKA, S. C.; HAWES, M. C. Possible role of root border cells in detection and avoidance of aluminum toxicity. **Plant Physiol.**, v. 125, p. 1978-1987, 2001.
- MOLLER, I. M.; LIN, W. Membrane-bound NAD(P)H dehydrogenases in higher plant cells. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, v.37, p. 309-334, 1986.
- MOLLER, I. M.; BÉRCZI, A.; van der PLAS, I.; LAMBERS, H. Measurement of the activity and capacity of the alternative pathway in intact plant tissues: Identification of problems and possible solutions. **Physiol. Plant.**, v. 72, p. 642-649, 1988.
- MORIMURA, S.; MATSUMOTO, H. Effect of aluminium on some properties and template activity of purified DNA. **Plant Cell Physiol.**, v. 19, p. 429-436, 1978.
- OSAWA, H.; MATSUMOTO, H. Possible involvement of protein phosphorylation in aluminum-responsive malate efflux from wheat root apex. **Plant Physiol.**, v. 126, p. 411-420, 2001.
- PALMER, J. M.; WARD, J. A. The oxidation of NADH by plant mitochondria. In: **Enc. Plant Physiol.**, New Series, v. 18, p. 173-201, 1985.

- PAPERNIK, L. A.; KOCHIAN, L. V. Possible involvement of Al-induced electrical signals in Al tolerance in wheat. **Plant Physiol.**, v. 115, p. 657-667, 1997.
- PAVAM, M. A.; BINGHAN, F. T. Toxicity of aluminum to coffee seedlings grown in nutrient solution. **Soil Sci. Soc. Proc.**, v.46, p. 993-997, 1982.
- 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. **J. Plant Nutr.**, v. 24, p. 1061-1070, 2001.
- PELLET, D. M.; GRUNES, D. L.; KOCHIAN, L. V. Organic acid exudation as an aluminum tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). **Planta**. v. 196, p.788-795, 1995.
- PELLET, D. M.; PAPERNIK, L. A.; KOCHIAN, L. V. Multiple aluminum resistance mechanisms in wheat. The roles of root apical phosphate and malate exudation. **Plant Physiol.**, v. 112, p. 591-597, 1996.
- PFEFFER, P. E.; TU, S. I.; GERASIMOWICZ, W. V.; CAVANAUGH, J. R. In vivo ^{31}P NMR of corn root tissue and its uptake of toxic metals. **Plant Physiol.**, v. 80, p. 77-84, 1986.
- PIÑEROS, M. A.; KOCHIAN, L. V. A patch-clamp study on the physiology of aluminum toxicity and aluminum tolerance in maize. Identification and characterization of Al^{3+} -induced anion channels. **Plant Physiol.**, v. 125, p. 292-305, 2001.
- RAVANEL, P.; TISSUT, M.; DOUCE, R. Effects of flavone and flavonols on isolated plant mitochondria. **Phytochemistry**, v. 20, p. 2101-2103, 1981.
- RINCÓN, M.; GONZALES, R. A. Aluminum partitioning in intact roots of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. **Plant physiol.**, v. 99, p. 1021-1028, 1992.
- RIVOAL, J.; RICARD, B.; PRADET, A. Glycolytic and fermentative enzyme induction during anaerobiosis in rice seedlings. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 27, p. 43-52, 1989.
- ROY, K. A.; SHARMA, A.; TALUKTER, G. Some aspects of aluminum toxicity in plants. **Bot. Rev.**, v.54, p.145-78, 1988.
- RYAN, P. R.; DITOMASO, J. M.; KOCHIAN, L. V. Aluminum toxicity in roots: an investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. **J. Exp. Bot.**, v. 259, p. 437-446, 1993.
- RYAN, P. R.; DELHAIZE, E.; RANDALL, P. J. Characterization of Al-stimulated malate efflux from the apices of Al-tolerant wheat roots. **Planta**. v. 196, p. 103-110, 1995.

- RYAN, P. R.; KOCHIAN, L. V. Interaction between aluminum toxicity and calcium uptake at the root apex in near-isogenic lines of wheat (*Triticum aestivum* L.) differing in aluminum tolerance. **Plant Physiol.**, v. 102, p. 975-982, 1993.
- RYAN, P. R.; SHAFF, J.E.; KOCHIAN, L. V. Aluminum toxicity in roots. **Plant Physiol.**, v. 99, p. 193-200, 1992.
- SACHS, M. M.; HO, T. H. D. Alteration of gene expression during environmental stress in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, v. 37, p.363-376, 1986.
- SAMPSON, M.; CLARKSON, D.T.; DAVIS, D. D. DNA synthesis in aluminum-treated roots of barley. **Science**, v. 148, p. 1476-1477, 1965.
- SILVA, I. R.; SMYTH, T. J.; CARTER, T. E.; ALLEN, N. S.; RUFTY, T. W. Aluminum accumulation at nuclei of cells in the root tip. Fluorescence detection using lumogallion and confocal laser scanning microscopy. **Plant Physiol.**, v. 123, p. 543-552, 2000.
- SINGER, T. P. Determination of the activity of succinate, NADH, choline and α -glycerophosphate dehydrogenases. In: Glick, D., New York (ed): **Biochem. Anal.**, 1974, p. 123-175.
- SIVAGURU, M.; BALUSKA F.; VOLKMANN, D.; FELLE, H. H.; HORST, W. J. Impacts of aluminum on the cytoskeleton of the maize root apex: short-term effects on the distal part of the transition zone. **Plant Physiol.**, v. 119, p.1073-1082, 1999.
- STEWART, D. C.; COPELAND, L. Mitochondrial hexokinase of avocado mesocarp. **Phytochemistry**, v. 32, p. 27-30, 1993.
- TAYLOR, G. J.; McDONALD-STEPHENS, J. L.; HUNTER, D. B.; BERTSCH, P. M.; ELMORE, D.; RENGEL, Z.; REID, R. J. Direct measurement of aluminum uptake and distribution in single cells of *Chara corallina*. **Plant Physiol.**, v. 123, p. 987-996, 2000.
- TAYLOR, G. J. The physiology of aluminum phytotoxicity. in: **Metal Ions Biological Systems**. v. 24, p. 123-163, 1988.
- TAYLOR, G. J. Current views of the aluminum stress response; the physiological basis of tolerance. **Curr Top. Plant Biochem. Physiol.**, v.10, p. 57-93, 1991.
- TAYLOR, G. J. Maximum potential growth rate and allocation of respiratory energy as related to stress tolerance in plants. **Plant Physiol.**, v. 27, p. 605-611, 1989.
- VON UEXKULL, H. R.; MUTERT, E. Global extent, development and economic impact of acid soils. **Plant Soil**, v. 171, p. 1-15, 1995.

- YAMAMOTO, Y.; KOBAYASHI, Y.; MATSUMOTO, H. Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not primary cause of elongation inhibition in pea roots. **Plant Physiol.**, v. 125, p. 199-208, 2001.
- WALLACE, S.; HENNING, S. J.; ANDERSON, I. C. Elongation, Al concentration, and hemotoxin staining of aluminum-treated wheat roots. **Iowa State J. Res.** v.57, p. 97-106, 1982.
- WANG, C.; WOOD, F. A. A modified aluminon reagent for the determination of aluminum after $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{SO}_4$ digestion. **Can. J. Soil Sci.** v.53, p. 237-239, 1973.
- WEDDING, R. T.; BLACK, M. K.; PAP, D. Malate dehydrogenase and NAD malic enzyme in the oxidation of malate by sweet potato mitochondria. **Plant Physiol.**, v. 58, p. 740-743, 1976.
- WENZL, P.; PATIÑO, G. M.; CHAVES, A. L.; MAYER, J. E.; RAO, I. M. The high level of aluminum resistance in signalgrass is not associated with known mechanisms of external aluminum detoxification in root apices. **Plant Physiol.**, v. 125, p. 1473-1484, 2001.
- ZHANG, W-H.; RYAN, P. R.; TYERMAN, S. Malate-permeable channels and cation channels activated by aluminum in the apical cells of wheat roots. **Plant Physiol.**, v. 125, p. 1459-1472, 2001.
- ZHANG, G.; TAYLOR, G. J. Kinetics of aluminum uptake by excised root aluminum-tolerant and aluminum-sensitive cultivars of *Triticum aestivum* L. **Plant Physiol.**, v.91, p.1094-1099, 1989.