

TASSIA CAROLINE FERREIRA

**O ÓXIDO NÍTRICO, NA FORMA DE SNP, INDUZ MECANISMOS DE  
TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM RAÍZES DE MILHO?**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

F383o  
2017      Ferreira, Tassia Caroline, 1992-  
            O óxido nítrico, na forma de snp, induz mecanismos de  
            tolerância ao alumínio em raízes de milho? / Tassia Caroline  
            Ferreira. – Viçosa, MG, 2017.  
            v, 31f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Cleberson Ribeiro.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.20-31.

1. Milho - efeito do alumínio. 2. Milho - tolerância.  
3. metais pesados. 4. Estresse abiótico. I. Universidade Federal  
de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de  
Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22 ed. 633.15

TASSIA CAROLINE FERREIRA

**O ÓXIDO NÍTRICO, NA FORMA DE SNP, INDUZ MECANISMOS DE  
TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM RAÍZES DE MILHO?**

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

APROVADA: 21 de novembro de 2017.

---

Eduardo Euclides de Lima e  
Borges

---

Genaina Aparecida de Souza

---

Juraci Alves de Oliveira  
(Coorientador)

---

Cleberon Ribeiro  
(Orientador)

## SUMÁRIO

RESUMO .....	ii
ABSTRACT .....	iii
1-INRODUÇÃO .....	1
2-OBJETIVOS.....	3
2.1-OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
3-MATERIAL E MÉTODOS .....	4
3.1-OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO.....	4
3.2-EXPERIMENTO 1: EFEITO DO ALUMÍNIO SOBRE O ALONGAMENTO RADICULAR E MASSA SECA .....	5
3.3-EXPERIMENTO 2: EFEITO DO SNP SOBRE A O ALONGAMENTO RADICULAR E MASSA SECA .....	5
3.4-EXPERIMENTO 3: EFEITO DO AL E DO SNP SOBRE O ALONGAMENTO RADICULAR, MASSA SECA E ÍNDICE DE TOLERÂNCIA .....	5
3.5- EXPERIMENTO 4: LOCALIZAÇÃO DE ALUMÍNIO E ÓXIDO NITRICO NOS ÁPICES RADICULARES .....	6
3.5.1-Detecção do Al na superfície radicular .....	6
3.5.2- Detecção de NO .....	6
3.6- EXPERIMENTO 5: AVALIAÇÃO DO METABOLISMO ANTIOXIDATIVO APÓS TRATAMENTO COM AL E NO .....	6
3.6.1-Determinação do extravasamento de eletrólitos .....	7
3.6.2- Obtenção do extrato bruto enzimático.....	7
3.6.3- Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD) .....	7
3.6.4- Determinação da atividade da catalase (CAT).....	8
3.6.5- Determinação da atividade da peroxidase total (POX) .....	8
3.6.6- Determinação da atividade da peroxidase do ascorbato (APX).....	8
3.6.7-Quantificação de proteínas .....	9
4-ANÁLISES ESTÁTISTICAS .....	9
5-RESULTADOS .....	9
6-DISCUSSÃO.....	18
7-CONCLUSÃO.....	23
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	23

## RESUMO

FERREIRA, Tassia Caroline, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2017. **O óxido nítrico, na forma de SNP, induz mecanismos de tolerância ao alumínio em raízes de milho?** Orientador: Cleberson Ribeiro. Coorientador: Juraci Alves de Oliveira.

O papel regulador do óxido nítrico em resposta a estresses abióticos têm sido evidenciado em pesquisas, mas o conhecimento da ação NO na toxicidade do alumínio (Al), ainda é bastante limitado. Para avaliar os mecanismos de tolerância induzidos pelo NO, os híbridos de milho BRS 1010 e DKB 390 foram expostas as concentrações de 0, 100, 200 e 300  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$ . Assim, foram definidos a concentração de Al (200  $\mu\text{M}$ ) e o tempo (24 horas) para os próximos experimentos. Em seguida, os dois híbridos foram expostos por 24 horas as concentrações de 0, 50, 100, 150 e 200  $\mu\text{M}$  nitroprussiato de sódio (SNP) para avaliação do alongamento radicular. Para os experimentos seguintes, o híbrido DKB 390 foi exposto por 24 horas aos tratamentos: controle, Al 200  $\mu\text{M}$ , SNP 50  $\mu\text{M}$  e Al 200  $\mu\text{M}$ +SNP 50  $\mu\text{M}$ . Após exposição ao tratamento Al+SNP foi possível observar que o SNP não foi capaz de atenuar a inibição do crescimento da raiz principal. Para avaliar a localização (acúmulo) de Al nos ápices radiculares, foi realizado o teste com o corante hematoxilina. Não houve acúmulo de Al nos tratamentos controle e SNP. Contudo, após exposição a 200  $\mu\text{M}$  de Al por 24 horas foi observado intenso acúmulo desse metal nas células radiculares. Já no tratamento Al+SNP houve menor acúmulo de Al nas raízes, ficando restrito ao ápice radicular. Os tratamentos Al e Al+SNP mostraram maior intensidade de fluorescência do NO nas raízes, sendo possível localizar essa molécula por toda região do ápice radicular. Adicionalmente ao maior acúmulo de NO nas raízes tratadas com Al+SNP, foi possível observar ativação dos mecanismos de defesa antioxidativo enzimáticos. O tratamento Al+SNP foi importante para manter elevada a atividade das enzimas SOD (folha), CAT (folha), POX (raiz) e APX (folha e raiz). O SNP não foi capaz de reverter os efeitos do Al sobre o AR, entretanto promoveu menor acúmulo de Al na rizosfera, maior concentração de NO e ativação de mecanismos de defesa.

Palavras-chave: tolerância, metais pesados, estresse abiótico

## ABSTRACT

FERREIRA, Tassia Caroline, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2017. **Nitric oxide in the form of SNP induces aluminum tolerance mechanisms in maize roots?** Adviser: Cleberson Ribeiro. Co-adviser: Juraci Alves de Oliveira.

The regulatory role of nitric oxide in response to abiotic stresses has been evidenced in research, but knowledge of NO action on aluminum toxicity (Al) is still quite limited. To evaluate the tolerance mechanisms induced by NO, the BRS 1010 and DKB 390 maize hybrids were exposed to the concentrations of 0, 100, 200 and 300  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$ . Thus, the concentration of Al (200  $\mu\text{M}$ ) and the time (24 hours) for the next experiments were defined. Then the two hybrids were exposed by 24 hour concentrations of 0, 50, 100, 150 and 200  $\mu\text{M}$  sodium nitroprusside (SNP) for evaluation of root elongation. For the following experiments, the hybrid DKB 390 was exposed for 24 hours to the treatments: control, Al 200  $\mu\text{M}$ , SNP 50  $\mu\text{M}$  and Al 200  $\mu\text{M}$  + SNP 50  $\mu\text{M}$ . After exposure to Al + SNP treatment it was possible to observe that the SNP was not able to attenuate inhibition of the main root growth. To evaluate the location (accumulation) of Al in the root apices, the hematoxylin dye test was performed. There was no accumulation of Al in the control and SNP treatments. However, after exposure to 200  $\mu\text{M}$  of Al for 24 hours an intense accumulation of this metal was observed in the root cells. In the Al + SNP treatment, there was less accumulation of Al in the roots, being restricted to the root apex. The treatments Al and Al + SNP showed higher intensity of NO fluorescence in the roots, being possible to locate this molecule throughout the region of the root apex. In addition to the increased accumulation of NO in roots treated with Al + SNP, it was possible to observe the activation of enzymatic antioxidative defense mechanisms. Al + SNP treatment was important to maintain high activity of the enzymes SOD (leaf), CAT (leaf), POX (root) and APX (leaf and root). The SNP was not able to reverse the effects of Al on RE, however, it promoted a lower accumulation of Al in the rhizosphere, a higher concentration of NO and activation of defense mechanisms.

Key words: tolerance, heavy metals, abiotic stress

## 1-INTRODUÇÃO

O alumínio (Al) é o terceiro elemento químico mais comum na crosta terrestre. Em pH acima de 6,0, as formas químicas do alumínio se encontram pouco solúveis na rizosfera, porém, quando o pH do solo diminui, tornam-se solúveis podendo induzir alterações na morfologia e fisiologia das plantas (BIAN et al., 2013).

A presença de Al em solos ácidos afeta negativamente a produtividade de várias culturas agrícolas, particularmente as culturas de grãos. Cerca de 4 milhões de hectares (ha) de solos aráveis são afetados pela acidez do solo, representando 31% dos solos na América Latina, onde 1616 milhões de ha estão localizados principalmente na América do Sul (KOCHIAN, 2004; BIAN et al., 2013).

Um dos principais sintomas da toxicidade do Al para as plantas é a inibição do crescimento da raiz que se torna mensurável dentro de poucos minutos após exposição a concentrações micromolares desse metal (MATSUMOTO et al., 2015). Além disso, podem ocorrer danos na membrana plasmática, alterando sua permeabilidade, fluidez e integridade (MATSUMOTO et al., 2015). Uma vez que tenha atravessado a membrana plasmática, o Al pode se ligar fortemente ao núcleo e inibir a divisão celular (KOPITTKE et al., 2016)

Assim, raízes têm sido o foco de diversas pesquisas para entender os possíveis mecanismos envolvidos com a toxicidade e resistência em plantas (BOSE et al., 2015). Existem dois principais mecanismos de resistência de plantas ao Al: o Mecanismo de Exclusão, que visa a prevenção da entrada do alumínio no interior das células, baseado na exsudação de compostos quelantes orgânicos pela rizosfera (por exemplo, ácidos orgânicos ou fenóis); e o Mecanismo de Tolerância, que após entrada do Al nas células, este é sequestrado e desintoxicado em compartimentos subcelulares e/ou translocado para outros órgãos da planta (KOCHIAN et al., 2015). A exclusão ativa de Al através do ápice radicular, a partir da exsudação de citrato, é amplamente aceita como o principal mecanismo de resistência em raízes de milho (*Zea mays* L.) (KOCHIAN, 1995; JORGE; ARRUDA, 1997; MATONYEI et al., 2014). Contudo, esse não é o único mecanismo que atua em raízes (PINEROS et al., 2005).

Durante o ciclo de vida, as plantas são continuamente expostas a diferentes condições ambientais, que são fontes potenciais de estresse abióticos como seca, temperatura, salinidade, exposição a metais ou herbicidas que afetam o seu desenvolvimento e conseqüentemente sua produção (ROMERO-PUERTAS;

RODRÍGUEZ-SERRANO; SANDALIO, 2013). Os estresses abióticos podem induzir desequilíbrio entre a produção e a eliminação das espécies reativas de oxigênio (ROS), resultando em acúmulo dessas moléculas no interior das células (APEL; HIRT, 2004). Estas ROS podem oxidar compostos celulares, tais como lipídios, proteínas, enzimas e ácidos nucleicos, resultando na morte celular (MATSUMOTO; MOTODA, 2012).

Assim, uma resposta secundária da toxicidade do Al em plantas é o estresse oxidativo que pode ser evidenciado através da oxidação de lipídios nas membranas celulares (WAGATSUMA et al., 2015). Contudo, não é totalmente entendido como esse metal aumenta os níveis de ROS e de que maneira esse processo pode ativar a expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes (WANG; YANG, 2005). Diferentes enzimas e metabolitos podem atuar, isoladamente ou concomitantemente, para combater a ação das ROS. Assim, no interior das células, diferentes sistemas de defesa antioxidativos (enzimáticos e/ou não-enzimáticos) podem estar presentes, como as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), monodesidroascorbato redutase (MDHAR), desidroascorbato redutase (DHAR) e redutase da glutathione (GR), ou antioxidantes não-enzimáticos, como: glutathione (GSH), aminoácidos (aa), ascorbato (Asc), carotenoides e tocoferóis. É o equilíbrio entre a produção e a eliminação das ROS, pelos mecanismos antioxidativos, que determina a intensidade dos danos gerados pelas ROS e conseqüentemente a tolerância da planta frente ao agente estressor (GILL; TUTEJA, 2010; NAKABAYASHI; SAITO, 2015).

Algumas moléculas podem aumentar a tolerância de uma planta ao agente estressor, como é o caso da molécula de óxido nítrico (NO) (SIMONTACCHI et al., 2015). Aplicações de NO em plantas pode proteger e aliviar o efeito de diversos estresses bióticos e abióticos (CORPAS; BARROSO, 2015; FANCY; BAHLMANN; LOAKE, 2016; NATH et al., 2017). O NO é um gás solúvel que atua em importantes rotas de sinalização. A sua estrutura química permite sua rápida difusão e transmissão de sinal. Posteriormente sendo removido de forma eficiente, encerrando a mensagem que originalmente foi enviada para transmitir (NEILL; DESIKAN; HANCOCK, 2003). As principais rotas propostas para a síntese de NO em plantas são as vias de redução e oxidação. A primeira via é dependente de nitrito como substrato primário e apresenta redução pelas enzimas nitrato redutase (NR) e NO-nitrito redutase (NiNOR) ligadas à membrana plasmática e, posteriormente a redução de nitrito mitocondrial

(PLANCHET et al., 2005). Já nas rotas oxidativas, a produção de NO parece ocorrer a partir de L-arginina (L-Arg), poliaminas ou hidroxilaminas (YU et al., 2014).

O nitroprussiato de sódio (SNP) é uma molécula inorgânica capaz de liberar NO<sup>+</sup> que se difunde nas células funcionando como um poderoso ligante (FLORYSZAK-WIECZOREK et al., 2006). O mecanismo de liberação de NO pelo SNP ainda não está claro, embora pesquisas envolvendo essa molécula em plantas vem sendo estudada nos últimos anos (FOTOPOULOS et al., 2013; SAVVIDES et al., 2016; HU et al., 2017).

Estudos com diferentes espécies (WANG & YANG, 2005; SUN et al., 2014) têm buscado entender o papel do NO em resposta ao alumínio. Wang, Huang e Bi (2010) observaram em raízes de *Phaseolus vulgaris* que o aumento no nível de ROS induzido por alumínio contribuiu para aumentar o dano oxidativo, porém, a produção de NO mediada pela enzima nitrato redutase aliviou a inibição do alongamento da raiz.

Várias hipóteses têm sido sugeridas sobre a ação do NO nos tecidos vegetais durante o estresse gerado pelo Al, entre elas: (1) NO estaria ligado ao aumento da atividade de enzimas antioxidativas para controlar a produção das ROS induzida por Al; (2) NO poderia atuar diminuindo a concentração de Al no citoplasma, alterando componentes (compostos fenólicos e ácidos orgânicos) e aumentando o acúmulo de Al na parede celular das raízes; (3) NO estaria associado com a regulação da expressão de genes (AtALMT1, ATMATE, ALS3) para melhorar a tolerância ao Al em plantas (HE et al., 2011).

Nesse contexto, os mecanismos de tolerância e a atuação específica do NO na mitigação de danos causados pelo alumínio foram investigados. Para tanto, foi desenvolvida a hipótese que o fornecimento de NO mitigará o efeito negativo do alumínio nas raízes de milho atuando em conjunto com o sistema antioxidante, conferindo maior tolerância as plântulas.

## **2-OBJETIVOS**

Avaliar as respostas bioquímicas e fisiológicas induzidas pelo óxido nítrico em raízes de milho expostas a níveis tóxicos de alumínio.

### **2.1-OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar a concentração de alumínio que afete negativamente o crescimento radicular;
- Determinar a concentração de SNP que estimule o crescimento radicular;
- Avaliar os efeitos de diferentes concentrações de Al e NO sobre o crescimento das plantas;
- Avaliar a intensidade do acúmulo de Al nas raízes através da corante hematoxilina;
- Determinar os sítios de acúmulo de NO nas raízes por microscopia confocal;
- Avaliar a atividade das enzimas antioxidativas;
- Avaliar os danos às membranas biológicas através do extravasamento de eletrólitos.

### 3-MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1-OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

Para o experimento foram utilizados dois híbridos simples de milho (*Zea mays* L.) BRS 1010 e DKB 390 fornecidos pela Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.

As sementes foram selecionadas quanto ao tamanho e forma sendo desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio 3% (v/v) por 15 minutos e lavadas novamente em água corrente e água desmineralizada. A germinação ocorreu no escuro em papel “germiteste”, em solução de CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM, pH 4,5, sob aeração contínua e mantidas a 25 °C. Aproximadamente dez dias após a germinação, as plântulas em estágio fenológico V<sub>1</sub> foram selecionadas quanto à uniformidade de tamanho e forma e transplantadas para recipientes de polietileno de dois litros com três plântulas por vaso, contendo solução de CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM, pH 4,5. O cultivo das plantas foi inteiramente realizado em sala de crescimento com temperatura controlada (25 ± 1 °C), sob irradiância de 130 μmol de fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, fotoperíodo de 16 horas e aeração contínua.

O alumínio foi fornecido na forma de cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>) e o óxido nítrico fornecido na forma de nitroprussiato de sódio Na<sub>2</sub> [Fe (CN)<sub>5</sub>NO] (SNP). Todos os experimentos foram conduzidos com quatro repetições.

### 3.2-EXPERIMENTO 1: EFEITO DO ALUMÍNIO SOBRE O ALONGAMENTO RADICULAR E MASSA SECA

Para determinar a concentração tóxica do Al nas plântulas, o experimento seguiu o esquema fatorial em blocos casualizados com 2 híbridos de milho (BRS 1010 e DKB 390), 4 concentrações de Al (0,100, 200 e 300  $\mu\text{M}$ ) e 4 períodos de tempo (0, 24, 48 e 72 horas).

O comprimento da raiz principal foi mensurado utilizando régua milimétrica ao início do experimento e final de cada tempo.

O alongamento relativo ao controle foi estimado pela equação:

$$\text{AR (\% controle)} = (\text{Alongamento Al}_T / \text{Alongamento Al}_0) \times 100$$

Onde:

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

Al<sub>0</sub> = Alongamento da raiz principal de plântulas controle (sem Al)

Al<sub>T</sub> = Alongamento da raiz principal de plântulas submetidas ao tratamento com Al.

Ao final do experimento (72 horas), as plântulas foram secas a 70°C até obtenção de peso constante, sendo obtido o peso de massa seca das raízes e da parte aérea. A escolha do tempo e da concentração tóxica de Al foi baseada no resultado com redução de 50% no AR.

### 3.3-EXPERIMENTO 2: EFEITO DO SNP SOBRE A O ALONGAMENTO RADICULAR E MASSA SECA

Para determinação da concentração de SNP que não induz prejuízos ao crescimento das plântulas foi utilizado o esquema fatorial em blocos casualizados com 2 híbridos de milho (BRS1010 e DKB 390), 5 concentrações de SNP (0, 50, 100, 150 e 200  $\mu\text{M}$ ) por 24 horas (tempo selecionado após o item 3.2.).

O comprimento da raiz principal das plantas e massa seca foram mensurados conforme o item 3.2.

### 3.4-EXPERIMENTO 3: EFEITO DO AL E DO SNP SOBRE O ALONGAMENTO RADICULAR, MASSA SECA E ÍNDICE DE TOLERÂNCIA

Esse experimento foi conduzido no esquema fatorial em blocos casualizados com 1 híbrido de milho (DKB 390), 1 concentração de Al (200  $\mu$ M), 1 concentração de SNP (50  $\mu$ M) e a combinação de Al x SNP durante 24 horas.

O comprimento da raiz principal das plantas e massa seca foram mensurados conforme o item 3.2. O cálculo de índice de tolerância foi obtido utilizando a massa seca total, segundo Shi et al. (2011) onde:

$$IT (\%) = \text{Tratamento/Controle}$$

### 3.5- EXPERIMENTO 4: LOCALIZAÇÃO DE ALUMÍNIO E ÓXIDO NITRICO NOS ÁPICES RADICULARES

Para essas análises foi utilizado o delineamento experimental citado no item 3.4.

#### 3.5.1-Detecção do Al na superfície radicular

Ápices radiculares de aproximadamente 1 cm foram mergulhados em solução de hematoxilina férrica 0,2% (m/v) em  $KIO_3$  0,02% (m/v), durante 15 min (POLLE et al., 1978). Para eliminar o excesso de corante, as plântulas foram transferidas para recipientes contendo água desmineralizada, sob aeração, por 15 min. Por fim, as raízes foram fotografadas em estereomicroscópio (Olympus SZX7TR-ILA).

#### 3.5.2- Detecção de NO

Ápices radiculares de 2 cm de plântulas de milho foram incubados por 40 minutos em 10  $\mu$ M da sonda fluorescente 4,5-diaminofluoresceína diacetato (DAF-2 DA), em 20 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,5). Em seguida, as raízes foram lavadas três vezes durante 15 minutos com tampão e avaliadas em microscópio confocal (LSM 510; Zeiss) utilizando o comprimento de onda de 488 nm para excitação de 515 nm para emissão (Correa-Aragunde, Graziano e Lamattina, 2004).

As análises ocorreram no Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) na UFV.

### 3.6- EXPERIMENTO 5: AVALIAÇÃO DO METABOLISMO ANTIOXIDATIVO APÓS TRATAMENTO COM AL E NO

Para essas análises foi utilizado o delineamento experimental citado no item 3.4.

### 3.6.1-Determinação do extravasamento de eletrólitos

A metodologia utilizada para extravasamento de eletrólitos das raízes foi proposta por Wilner (1955). As raízes foram lavadas em água corrente e em seguida em água destilada. Aproximadamente 0,2 g de raízes com diâmetro menor a 2 mm foram retiradas e colocadas em tubos contendo 20 ml de água destilada, sendo mantidas a temperatura de 25°C por 24 h. Após esse período, a condutividade elétrica da solução (Ci) foi obtida com condutivímetro. Em seguida, as mesmas raízes foram autoclavadas a 100 °C por 10 min e recolocadas em água destilada. A condutividade final (Cf) foi mensurada da mesma maneira que a Ci. O valor do extravasamento de eletrólitos foi calculado de acordo com a equação abaixo:

$$ETR (\%) = Ci/Cf \times 100$$

### 3.6.2- Obtenção do extrato bruto enzimático

As amostras foram obtidas pela maceração de 0,2 g de folhas e raízes em N<sub>2</sub> líquido. Em seguida foram adicionados 2 ml do meio de homogeneização, constituído por tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, EDTA 0,1 mM, PMSF 1 mM e PVPP 1% (p/v) (PEIXOTO et al., 1999). Posteriormente, as amostras foram filtradas em gaze e centrifugadas a 12.000 g por 15 min, a 4°C e armazenadas, como extrato bruto, para a determinação das atividades enzimáticas.

As análises ocorreram no BIOAGRO-UFV.

### 3.6.3- Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

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

#### 3.6.4- Determinação da atividade da catalase (CAT)

A atividade da catalase foi determinada pela adição de 10  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático bruto a 190  $\mu\text{M}$  de um meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e  $\text{H}_2\text{O}_2$  12,5 mM (HAVIR e MCHALE, 1987). O decréscimo na absorbância a 240 nm, à temperatura de 25°C foi medido durante o primeiro minuto de reação, sendo a atividade da CAT determinada com base na inclinação da reta no intervalo de 1 minuto, após o início da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 36  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  (ANDERSON et al., 1995) e o resultado expresso em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína.

#### 3.6.5- Determinação da atividade da peroxidase total (POX)

A atividade da peroxidase total foi determinada pelo método de Kar e Mishra (1976). Alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático foram adicionadas 190  $\mu\text{L}$  de uma mistura de reação constituída de tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e  $\text{H}_2\text{O}_2$  20 mM. O acréscimo na absorbância a 420 nm, à temperatura de 25 °C, foi medido durante o primeiro minuto de reação pela produção de purpurogalina, sendo a atividade da POX determinada com base na inclinação da reta no intervalo de 1 min, após o início da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,47  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$  (CHANCE e MAEHLEY, 1955) e o resultado expresso em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína.

#### 3.6.6- Determinação da atividade da peroxidase do ascorbato (APX)

A atividade da peroxidase do ascorbato foi determinada de acordo com o método de Nakano e Asada (1981) modificado por Koshiba (1993). Alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático bruto foram adicionadas a 190  $\mu\text{l}$  de um meio de reação constituído de tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, ácido ascórbico 0,8 mM e  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM. O decréscimo na absorbância a 290 nm, à temperatura de 25 °C, foi medido durante o primeiro minuto de reação, sendo, a atividade da APX determinada com base na inclinação da reta no intervalo de 1 minuto, após o início da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,8  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$  (NAKANO e ASADA, 1981) e o resultado expresso em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína.

### 3.6.7-Quantificação de proteínas

As concentrações das proteínas nos extratos enzimáticos foram determinadas pelo método de Bradford et al. (1976), sendo adicionado 20  $\mu$ L da amostra em 180 $\mu$ L do reagente de Bradford. Após 40 minutos no escuro, a leitura foi realizada no comprimento de onda 595nm. Para a curva padrão foi utilizado BSA.

## 4-ANÁLISES ESTÁTISTICAS

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Todas as análises foram realizadas com o auxílio de softwares Sisvar versão 5.6 e R versão 3.3.1. Os gráficos foram realizados no software Excel.

Para a escolha dos híbridos e tempo de exposição a serem utilizados o agrupamento de Scott Knott 5% foi aplicado. Os demais experimentos foram analisados pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## 5-RESULTADOS

Entre os híbridos de milho, houve diferença no AR apenas após 48 horas de tratamento com Al na concentração de 200  $\mu$ M, sendo o menor AR observado na BRS 1010 (21,27%) em contraste a 102,20% de DKB 390 (Tabela 1). Já entre as diferentes concentrações de Al para um mesmo híbrido, observamos que após 24 horas de tratamento na concentração de 300  $\mu$ M houve aumento no AR em ambos os híbridos: BRS 1010 (141,87%) e DKB 390 (120,78%).

A concentração tóxica de Al e o tempo que inibiu o AR em 50% (WANG; HUANG; BI, 2010; SOUZA et., 2016) para o híbrido DKB 390 em 24 horas de exposição foi 200  $\mu$ M de Al, apresentou AR de 60,54%, contra 33,51% de BRS 1010 (Tabela 1). Assim, o híbrido selecionado foi DKB 390 nesta concentração e tempo, os quais foram utilizados nos outros experimentos desse trabalho.

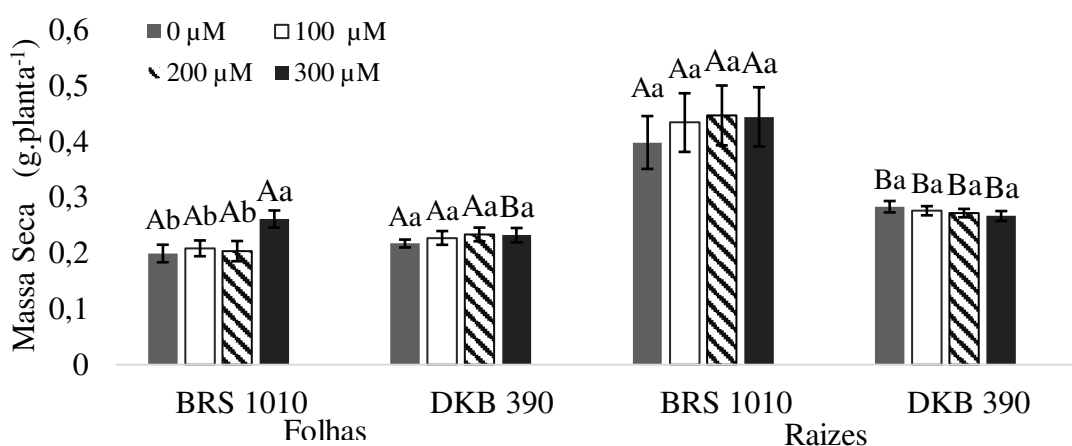
**Tabela 1-** Efeito do alumínio sobre o alongamento relativo radicular (AR%) em raízes de dois híbridos de milho, BRS 1010 e DKB 390, após 24, 48 e 72 horas de exposição a diferentes concentrações desse metal.

GENÓTIPO	Al ( $\mu\text{M}$ ) EM CaCl <sub>2</sub>	AR RAIZ 24 HORAS	AR RAIZ 48 HORAS	AR RAIZ 72 HORAS
BRS 1010	100	41,78±14,66 Ab	23,28±9,82 Aa	33,28±1,87 Aa
	200	33,51±18,42 Ab	21,27±2,74 Ba	20,98±11,28 Aa
	300	141,87±51,27 Aa	19,05±10,25 Aa	17,38±6,58 Aa
DKB 390	100	45,56 ±7,97 Ab	20,72±6,23 Ab	22,53±8,66 Aa
	200	60,54±23,98 Ab	102,2±39,24 Aa	29,32±13,52 Aa
	300	120,78±22,68 Aa	20,72±18,05 Ab	52,20±36,05 Aa

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre os híbridos para mesma concentração de Al e mesmo tempo, e médias seguidas pela mesma letra minúscula entre as concentrações de Al para o mesmo híbrido e mesmo tempo não apresentaram diferença pelo agrupamento Scott Knott (5% de probabilidade).  $\pm$  Erro padrão das médias.

Após 72 horas de exposição a 300  $\mu\text{M}$  de Al, observamos maior valor de massa seca de parte aérea no híbrido BRS 1010 (Figura 1). A massa seca radicular do híbrido BRS 1010 apresentou maior valor quando comparada ao híbrido DKB 390 em todos os tratamentos (Figura 1).

**Figura 1-** Produção de massa seca de folhas e raízes de dois híbridos de milho, BRS 1010 e DKB 390, após 72 horas de exposição a diferentes concentrações de alumínio.



Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre os híbridos para o mesmo tratamento e médias seguidas pela mesma letra minúscula entre os tratamentos para o mesmo híbrido não apresentaram diferença pelo agrupamento Scott Knott (5% de probabilidade). Barras representam o erro-padrão.

Após 24 horas de exposição a concentrações crescentes de SNP, o híbrido DKB 390 apresentou acréscimo no AR (137,71% e 123,07%) para as concentrações de 50 e

100  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Entretanto, na concentração de 200  $\mu\text{M}$ , houve redução no AR (79,12%) (Tabela 2). Para BRS 1010, todas as concentrações de SNP induziram reduções no AR, com valores abaixo de 70% em relação ao controle, entretanto, não houve diferenças significativas entre os tratamentos. Entre os híbridos, o valor de AR foi maior em DKB 390 em todas as concentrações, exceto 200  $\mu\text{M}$ . Com base nos resultados mostrados na figura 3, a concentração ideal de SNP que não causa inibição de AR para os experimentos posteriores é 50  $\mu\text{M}$  e o híbrido escolhido foi DKB 390, uma vez que esse apresentou melhor AR com aplicações de SNP até 150  $\mu\text{M}$ .

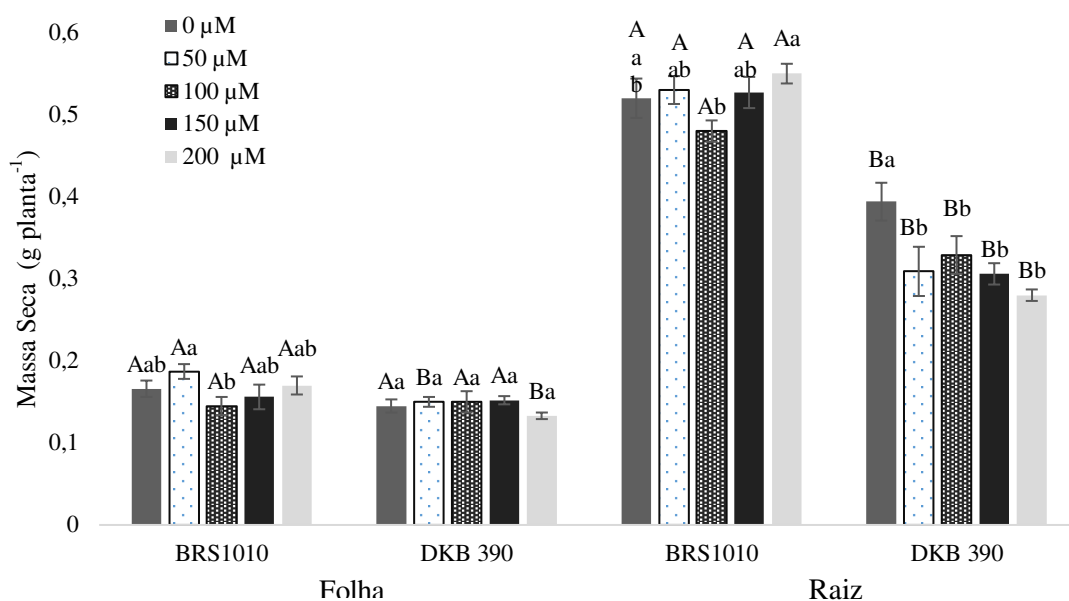
**Tabela 2-** Efeito de concentrações crescentes de SNP sobre o alongamento relativo da raiz (AR%) em dois híbridos de milho, BRS 1010 e DKB 390, após 24 horas de tratamento.

HÍBRIDO	SNP ( $\mu\text{M}$ )	AR RAIZ (% do controle)
BRS 1010	50	49,41 $\pm$ 12,22 Ba
	100	70,42 $\pm$ 10,75 Ba
	150	56,03 $\pm$ 11,06 Ba
	200	60,70 $\pm$ 12,45 Aa
DKB 390	50	137,71 $\pm$ 19,44 Aa
	100	123,07 $\pm$ 19,93 Aab
	150	97,80 $\pm$ 14,90 Aab
	200	79,12 $\pm$ 16,19 Ab

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre os híbridos para o mesmo tratamento e médias seguidas pela mesma letra minúscula entre os tratamentos para o mesmo híbrido não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey (5% de probabilidade).  $\pm$  Erro padrão da média.

O híbrido BRS 1010 apresentou maior acúmulo de massa seca da folha nos tratamentos com 50 e 200  $\mu\text{M}$  de SNP quando comparada a DKB 390. No caso das raízes, BRS 1010 apresentou maior acúmulo de massa seca em relação a DKB 390 em todos os tratamentos (Figura 2).

**Figura 2-** Efeito de concentrações crescentes de SNP sobre a produção de massa seca de folhas e raízes de dois híbrido de milho, BRS 1010 e DKB 390, após 24 horas de tratamento.



Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre os híbridos para o mesmo tratamento e médias seguidas pela mesma letra minúscula entre os tratamentos para o mesmo híbrido não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey (5% de probabilidade). Barras representam o erro padrão da média.

Após exposição do híbrido DKB 390 ao Al+SNP e Al isoladamente observamos que o alongamento relativo foi de 27,76% e 43,83%, respectivamente (Tabela 3). O tratamento com SNP apresentou AR de 107,38% sendo maior do que o AR entre os tratamentos. Para índice de tolerância não foi observado diferença entre os tratamentos.

**Tabela 3-** Efeito do Alumínio e SNP sobre o alongamento relativo da raiz (AR%) e Índice de Tolerância no híbrido de milho DKB 390 após 24h de tratamento.

HÍBRIDO	Al e SNP (µM)	AR (% DO CONTROLE)	ÍNDICE DE TOLERÂNCIA (%)
DKB 390	0 µM e 0 µM	100 ±0,00 A	100 ±0,00 <sup>NS</sup>
	0 µM e 50 µM	107,38 ±24,61 A	85,22 ±6,10 <sup>NS</sup>
	200 µM e 0 µM	43,83 ±6,44 B	82,60 ±3,95 <sup>NS</sup>
	200 µM e 50 µM	27,76 ±3,93 B	90,06 ±4,11 <sup>NS</sup>

Médias seguidas por letras diferentes apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey (5% de probabilidade). ± Erro padrão da média. NS: não significativo.

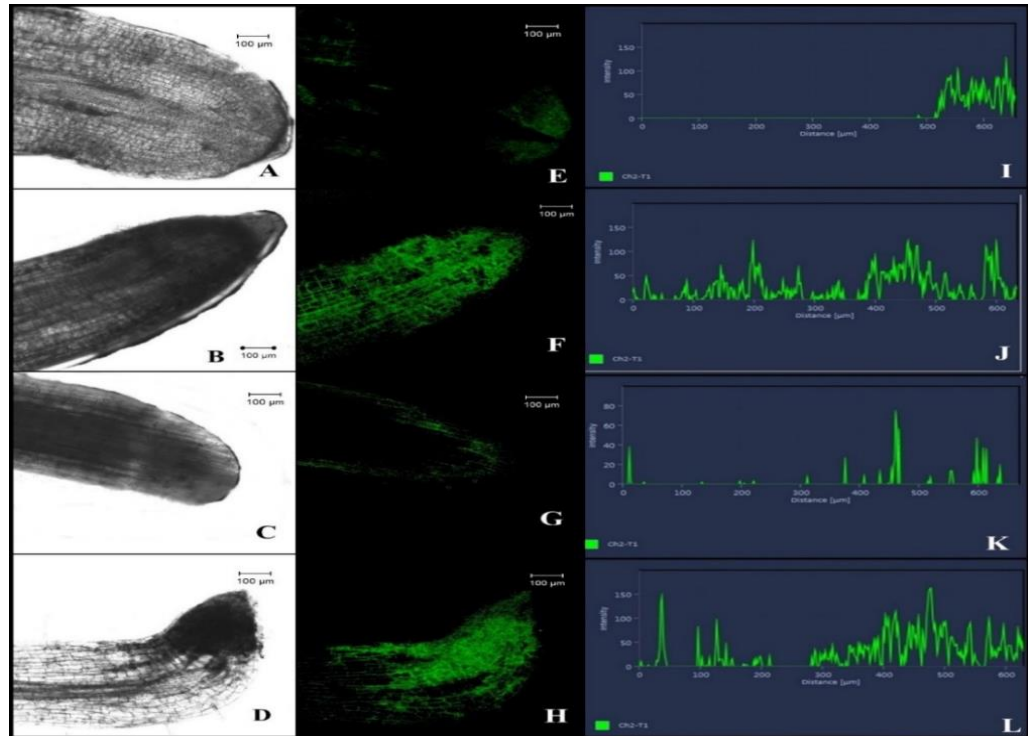
No controle e tratamento com SNP isoladamente (figura 3A e 3C, respectivamente), não observamos acúmulo de alumínio nas células radiculares. Contudo, após exposição a 200 µM de alumínio por 24 horas, um intenso acúmulo desse metal nas células radiculares (Figura 3B). Na figura 3B, o ápice radicular exposto a hematoxilina mostrou acúmulo de alumínio por toda região. No tratamento Al+SNP o padrão de acúmulo diferiu do tratamento apenas com alumínio ou SNP. Houve redução na intensidade de cor roxa, com maior acúmulo na região da coifa (Figura 3D).

**Figura 3-** Histolocalização de alumínio por corante hematoxilina em ápices radiculares do híbrido de milho DKB 390 após 24 horas de exposição à diferentes tratamentos. A= Controle; B= 200 µM Alumínio, C= 50 µM SNP; D= 200 µM Alumínio + 50 µM SNP.



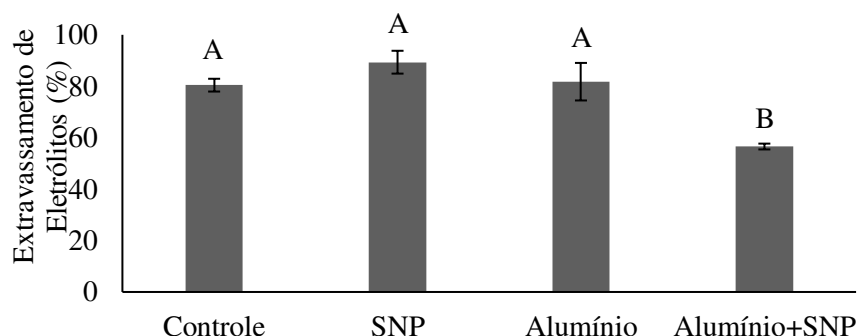
O acúmulo de óxido nítrico no controle negativo (Figura 4E) ocorreu apenas em uma pequena região da coifa, demonstrando baixa produção/acúmulo dessa molécula no ápice radicular mesmo sem aplicação exógena de SNP. No tratamento com aplicação de SNP (Figura 4G), a detecção de NO ocorreu na região mais externa do ápice, próximo a epiderme e ao córtex radicular demonstrando que não necessariamente a planta acumula NO quando é fornecido via nitroprussiato de sódio. Para o tratamento com alumínio (Figura 4F), o NO foi detectado com alta intensidade (próximo a 100) (Figura 4J) por toda região do ápice radicular, demonstrando que a presença de Al induziu aumento na produção/acúmulo de NO nessas raízes. No tratamento com aplicação de Al+SNP (Figura 4H) observamos maior intensidade de NO (próximo a 150) (Figura 4L), principalmente na região do ápice radicular. As plântulas apresentaram pequena quantidade de NO em seu ápice quando nenhum fluoróforo foi aplicado, e não houve acúmulo de NO quando SNP foi aplicado isoladamente. Entretanto, os tratamentos no quais o Al esteve presente, o NO apresentou alta intensidade evidenciando que a presença desse metal aumenta o acúmulo desse composto ao longo do ápice radicular (Figura 4).

**Figura 4-** Localização de NO por Microscopia Confocal pela sonda fluorescente 4,5-diaminofluoresceína diacetato (DAF-2 DA) em ápices radiculares do híbrido de milho DKB 390 após 24 horas de exposição a diferentes tratamentos. A, E, I= Controle; B, F, J= Al 200  $\mu$ M; C, G, K= SNP 50  $\mu$ M; D, H, L= Al 200  $\mu$ M + SNP 50 $\mu$ M. A, B, C e D: luz transmitida; E, F, G e H: emissão de fluorescência; I, J, K e L: intensidade de fluorescência da amostra vegetal.



Para o extravasamento de eletrólitos (Figura 5), após o tratamento com Al+SNP houve redução no extravasamento de eletrólitos com relação aos outros tratamentos.

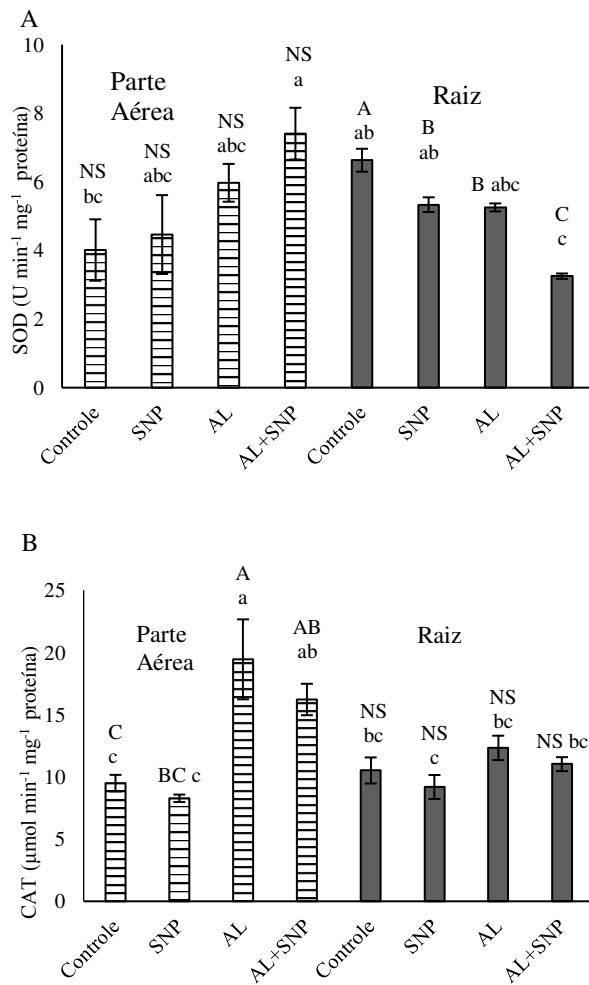
**Figura 5-** Porcentagem de extravasamento de eletrólitos em raízes do híbrido de milho DKB 390 após 24 horas de exposição aos tratamentos controle; SNP 50  $\mu$ M; Al 200  $\mu$ M e Al 200  $\mu$ M + SNP 50  $\mu$ M.

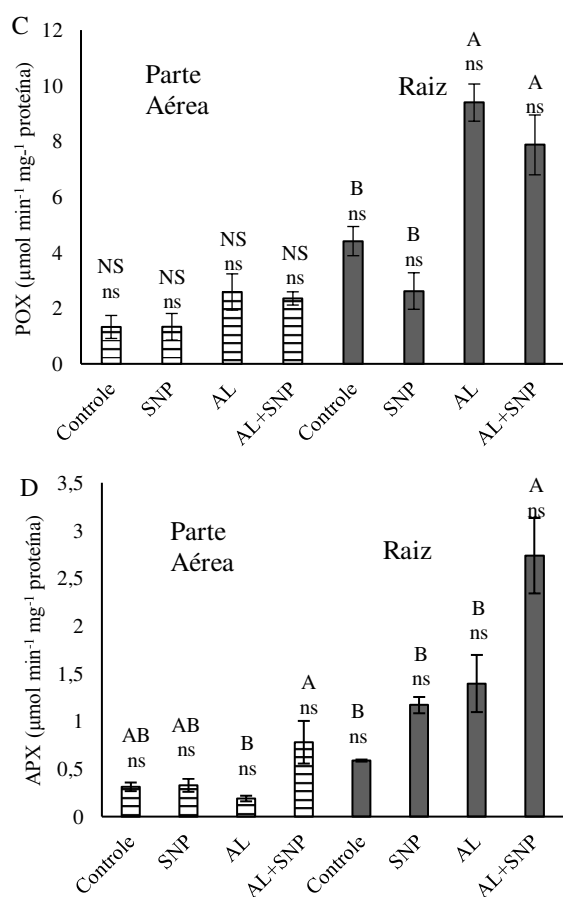


Médias seguidas por letras diferentes entre tratamentos apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey (5% de probabilidade). Barras representam o erro padrão da média.

Na parte aérea de DKB 390 não houve diferença para a atividade da SOD entre os tratamentos. Entretanto, nas raízes maior atividade da SOD foi observada no tratamento controle, com redução de atividade nos outros tratamentos, principalmente na combinação Al+SNP (Figura 6A). A atividade da CAT (Figura 6B) não apresentou diferença entre os tratamentos para as raízes. Já na parte aérea, maior atividade da CAT foi observada no tratamento com Al, seguido da combinação Al+SNP e por último SNP isolado. A atividade da POX (Figura 6C) não apresentou diferença para os tratamentos na parte aérea. Nas raízes, as maiores atividades da POX foram observadas após exposição ao Al e Al+SNP. Na parte aérea e nas raízes, a atividade da APX (Figura 6D) foi maior no tratamento Al+SNP.

**Figura 6** - Atividade das enzimas Superóxido dismutase (A), Catalase (B), Peroxidase Total (C) e Peroxidase do Ascorbato (D) na parte aérea e nas raízes do híbrido de milho DKB 390 após 24 horas de exposição a diferentes tratamentos.





Médias seguidas por letra maiúscula compara os tratamentos para o mesmo órgão vegetal e médias seguidas por letra minúscula compara todos os tratamentos de todos os órgãos. Letras diferentes entre tratamentos apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey (5% de probabilidade). Barras representam o erro padrão da média. NS: não significativo.

## 6-DISCUSSÃO

A redução do alongamento radicular afetando os ápices das raízes e o desenvolvimento reduzido de pelos radiculares, são sintomas reconhecidos da toxicidade de Al, observados nos híbridos BRS 1010 e DKB 390. Quando o Al é absorvido, grande parte se acumula no ápice da raiz enquanto outra parte de Al passa através da epiderme e do córtex e interage com elementos do apoplasto (SADE et al., 2016; SINGH et al., 2017).

Os alongamentos radiculares das linhagens de milho utilizadas no presente trabalho mostraram respostas diferentes ao tratamento com SNP. Com a aplicação de diferentes concentrações de SNP, a BRS 1010 apresentou reduções no AR. Entretanto, a DKB 390, aumento no AR (137,71%) nos tratamentos de 50 até 150 µM de SNP. A

aplicação de SNP em tomate foi capaz de induzir a formação da raiz lateral da mesma forma que o tratamento com auxina. O NO modulou a expressão de genes reguladores do ciclo celular em tomate e conduziu a formação de raízes laterais nessa cultura (CORREA-ARAGUNDE et al., 2006).

O NO medeia na resposta da auxina que conduz a formação de raízes adventícias e o aumento concentração de NO foi necessário como parte dos eventos moleculares envolvidos no desenvolvimento de raízes induzida por ácido indolacético (AIA) (PAGNUSSAT et al., 2002). Além disso, SNP e AIA se mostraram eficazes em melhorar crescimento, biossíntese de pigmentos fotossintéticos e prolina em tomateiros sob condições de estresse (SIDDIQUI et al., 2017).

Entretanto, a aplicação de SNP, não foi capaz de mitigar os efeitos tóxicos do Al nas raízes do híbrido DKB 390. Uma das hipóteses é que o metal inibe o transporte de auxina nos ápices radiculares, uma vez que seu acúmulo ocorre no ápice radicular, alterando o transporte desse hormônio. Essa alteração da distribuição de AIA leva à diminuição do alongamento radicular sob tratamento com alumínio (HE; HE; GU, 2012; KOLLMEIER; FELLE; HORST, 2000).

Após exposição ao Al, o AR desse híbrido foi reduzido para 43%, e na combinação de Al+SNP reduziu para 27,76%. A redução no AR no tratamento Al+SNP pode estar relacionado com a vida útil do SNP no interior da célula, e adicionalmente o Al pode interromper a homeostase do NO, alterando seu metabolismo, formando peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) e inibindo o alongamento da raiz (TIAN et al., 2007).

De forma semelhante a esse estudo Kaur et al. (2015) observaram que a aplicação de NO não conseguiu restaurar o crescimento radicular de trigo exposto ao chumbo, entretanto NO ajudou a melhorar o estresse oxidativo. Ainda é necessário elucidar como as mudanças em nível molecular e as isoenzimas / proteínas específicas estão envolvidas na mediação da resposta do NO ao estresse abiótico.

A libertação de NO geralmente é reforçada por tióis, mas a cinética não é direta. À medida que a redução do SNP ocorre e a subsequente decomposição do complexo nitrosílico acontece é acompanhada pela liberação de cianeto (FEELISCH, 1998). A atividade de metabolização do cianeto e o potencial de ácido cianídrico (HCN) em plantas superiores possui uma correlação: quanto maior o potencial de HCN, em geral, maior a atividade de metabolização do cianeto. O cianeto é um inibidor da respiração celular (MILLER; CONN, 1980).

A antimicina (AA) e o cianeto de potássio (KCN) promovem o acúmulo de radical semiquinona no complexo III, levando à produção de ânion superóxido  $O_2^{\cdot-}$  no espaço da membrana interna das mitocôndrias. O superóxido é dismutado a  $H_2O_2$  que pode atravessar a membrana mitocondrial para ser liberado no citosol (PUCCIARIELLO; PERATA, 2016).

O óxido nítrico pode atuar como antioxidante interrompendo a cadeia de peroxidação lipídica limitando dano as membranas ou em alta concentração pode atuar como uma espécie reativa de nitrogênio desencadeando reações que causam lesões na membrana (WANG; YANG, 2005). Em tabaco, NO é indispensável para a ativação da oxidase alternativa, uma proteína com um papel fundamental na eliminação de ROS mitocondriais e pode regular a produção de  $H_2O_2$  (EDERLI et al., 2009).

A maioria das informações sobre a função do NO em plantas vem de abordagens farmacológicas usando doadores de NO, sendo difícil distinguir entre o efeito fisiológico e o farmacológico obtido por tratamento químico. Um dos desafios a seguir é desenvolver doadores com maior estabilidade e vida útil mais longa, com uma taxa de liberação de NO controlada e doadores com alta especificidade de tecido ou células (ARASIMOWICZ; FLORYSZAK-WIECZOREK, 2007).

O tratamento com Al mostrou acúmulo desse elemento por toda região da raiz. Um dos mecanismos de resistência ao Al é a exclusão do elemento a partir do ápice da raiz, o principal local de toxicidade envolvendo a liberação regulada de compostos orgânicos que quelam íons  $Al^{+3}$ , formando compostos não tóxicos (KOCHIAN et al., 2015). Na presença de Al, genótipos resistentes de milho, exsudam os compostos fenólicos catecol, catequina e quercetina. Assim, a exsudação fenólica da raiz pode desempenhar papel importante na exclusão de Al da raiz do milho, concomitante a liberação de citrato (KOCHIAN et al., 2015). Já no tratamento Al+SNP, foi possível observar uma diferença no padrão de acúmulo desse metal, com menor acúmulo de Al ao longo da raiz, ficando localizado principalmente no ápice da raiz. Essa redução no acúmulo de Al no tratamento com SNP pode ser explicado pela ativação de mecanismos de resistências no qual o NO pode atuar como mediador de resposta ao estresse, sinalizando processos fisiológicos envolvidos com a desintoxicação do Al das células radiculares (TREVISAN; MANOLI; QUAGGIOTTI, 2014; ARORA; BHATLA, 2015).

No tratamento controle negativo (sem adição de SNP), foi observado baixo sinal de fluorescência, mostrando a elevada especificidade do comprimento de onda

utilizado para a molécula de NO. As diaminofluoresceínas (DAFs) estão entre as sondas fluorescentes mais sensíveis para a detecção do NO, devido a reatividade de diaminas vicinais aromáticas com o NO, em presença de O<sub>2</sub>. A N-nitrosilação de DAFs resulta na formação de um triazol, DAF-2T, que emite fluorescência esverdeada (KOJIMA et al., 1998). Adicionalmente, não houve acúmulo de NO quando SNP foi aplicado isoladamente. Ao tratar o órgão com um composto doador de NO, se deve levar em consideração o mecanismo e a cinética da liberação de NO, dependendo de fatores externos e toxicidade de produtos acumulados (MODOLO et al, 2002).

Os tratamentos nos quais o Al esteve presente, o NO apresentou alta intensidade de sinal, evidenciando que a presença desse metal induz aumento para o acúmulo desse composto ao longo do ápice radicular. Além de apresentar comprimentos de onda de excitações visíveis, semelhantes à da fluoresceína, sua forma derivada (DAF-2 DA) permite uma absorção eficiente pelas células, uma vez que é permeável à membrana e possui alta sensibilidade, sendo utilizado para a bioimagem em tempo real de NO com resolução temporal e espacial (KOJIMA et al., 1998; PLANCHET; KAISER, 2006; HETRICK; SCHOENFISCH, 2009).

O NO parece estar ligado ao nível e à toxicidade das ROS, tanto direta quanto indiretamente, controlando a expressão de genes envolvidos em diferentes processos funcionais como transdução de sinal, defesa e morte celular. A presença dessa molécula, possivelmente está envolvida na regulação de enzimas antioxidativas, eliminação direta de ânions superóxido e na peroxidação lipídica (EZAKI et al., 2013).

O desequilíbrio sistêmico induzido por alumínio produz ROS e a altera as propriedades da parede celular sendo dois fatores intrínsecos responsáveis pela toxicidade do Al em plantas. O próprio alumínio não é um elemento de transição, mas atua como catalisador na geração de ROS que também leva ao estresse oxidativo em plantas (SINGH et al., 2017)

Um importante mecanismos de tolerância de plantas aos danos induzidos pelo Al é a ativação de agentes antioxidantes. A atividade da SOD em raízes diminuiu quando outros compostos foram adicionados, principalmente SNP+Al (Fig. 6A). Esse resultado também foi observado por Silveira (2012) expondo alface ao arsênio. O NO pode remover o radical superóxido O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, reduzindo assim a concentração do substrato para essa enzima (SINGH et al., 2009), e conseqüentemente sua atividade.

A atividade da CAT (folha), POX (raiz) e APX (folha e raiz) aumentou nos outros tratamentos em relação ao controle, principalmente no tratamento SNP+Al.

Dois mecanismos explicam a relação entre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO e CAT. Um deles envolve a inibição na atividade desta enzima, após o NO se ligar à porção heme férrica da enzima e resultar na formação de um composto que impede a ligação do peróxido de hidrogênio ao íon metálico. O outro mecanismo seria uma regulação na atividade enzimática através do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Peróxido de hidrogênio pode promover a ligação do NO com sítios específicos na estrutura molecular da CAT, formando um complexo com cada tetrâmero dessa enzima. Após a remoção das moléculas de NO dos locais de ligação da CAT, a atividade enzimática pode ser restaurada (ARORA et al., 2016).

Durante as respostas das plantas a vários estresses, o aumento da geração de NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode ocorrer paralela ou alternativamente. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode induzir o aumento da produção de NO por ativação de enzimas de síntese de NO, no entanto, tem sido relatado resultados opostos, por exemplo, a produção de NO foi anterior ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em culturas de suspensão de *Arabidopsis* sob tratamento com CdCl<sub>2</sub> (CUI et al., 2010; MICHELE et al., 2009; SUN et al., 2018).

NO pode modular a atividade da POX dependendo da espécie e severidade do estresse. NO também interage diretamente com o átomo de ferro na fração heme da POX, formando um complexo, inibindo de modo reversível a atividade enzimática (ARORA et al., 2016). Já a enzima ascorbato peroxidase (APX), que faz parte do Ciclo Ascorbato-Glutationa, é componente essencial no controle do metabolismo redox das plantas (MITTLER, 2002). Várias modificações pós-traducionais mediadas por NO alteram a atividade da APX. Níveis excessivos de ROS causam a carbonilação de resíduos na APX ou formam compostos metálicos. Algumas formas oxidativas de resíduos de cisteína na APX são reversíveis e podem ser reduzidas pelo sistema ferredoxina-tiorredoxina (CORREA-ARAGUNDE; FORESI; LAMATTINA, 2015).

Ezaki et al. (2013) estudando *A. virginicus* observaram que a tolerância ao Al é uma combinação de diversos mecanismos (supressão da absorção de Al na raiz do solo, alta taxa de translocação, indução de atividade enzimática e polifenóis e produção de NO) cada um deles já foi relatado como estratégia efetiva de defesa ao Al. Assim, as combinações dos mecanismos de tolerância podem ser absolutamente necessárias para conferir alta tolerância ao Al em uma única espécie de planta.

Os efeitos do conteúdo de Al e NO sobre o ápice radicular são ocasionalmente controversos, o que pode estar associado a diferentes fontes de produção de NO, diferentes concentrações de Al, espécies de plantas e tempo de tratamento utilizado. Os mecanismos envolvidos na rota de sinalização do NO que aliviam a toxicidade do

Al podem ser principalmente explicados pela melhoria da capacidade antioxidante, que impede a geração de estresse oxidativo reduzindo os danos internos nas células, principalmente os danos sobre as membranas celulares (HE et al., 2011).

## 7-CONCLUSÃO

- As concentrações de 100 e 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  afetam negativamente o alongamento radicular de BRS 1010 e DKB 390.

- A concentração de 50  $\mu\text{M}$  de SNP estimula o alongamento radicular de DKB 390, porém quando combinado ao Al não é capaz de mitigar os efeitos tóxicos do metal.

- A coloração com hematoxilina mostra que SNP é capaz de reduzir o acúmulo de Al nas células das raízes.

- Um dos mecanismos de tolerância ao Al é a produção de NO, que foi observada em raízes que receberam tratamento com Al isoladamente e combinado ao SNP. O maior acúmulo de NO ocorre em raízes tratadas com Al+SNP.

- O tratamento Al+SNP aumenta a atividade das enzimas SOD (folha), CAT (folha), POX (raiz) e APX (folha e raiz).

- O SNP não foi capaz de reverter o efeito negativo do Al sobre o AR, entretanto promoveu menor acúmulo de Al em ápices radiculares, maior intensidade de NO e ativação de mecanismos de defesa.

## 8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, M.D., PRASAD, T.K., STEWART, C.R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. **Plant Physiology**, 109:1247-1257, 1995.

APEL, K.; HIRT, H. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. **Annual Review of Plant Biology**, [s.l], v. 55, n. 1,

p.373-399, 2 jun. 2004. Annual Reviews.  
<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>.

ARASIMOWICZ, M.; FLORYSZAK-WIECZOREK, J. Nitric oxide as a bioactive signaling molecule in plant stress responses. **Plant Science**, [s.l], v. 172, n. 5, p.876-887, maio 2007. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.02.005>.

ARASIMOWICZ-JELONEK, M.; FLORYSZAK-WIECZOREK, J.; KOSMALA, A. Are nitric oxide donors a valuable tool to study the functional role of nitric oxide in plant metabolism? **Plant Biology**, [s.l], v. 13, n. 5, p.747-756, 5 fev. 2011. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1438-8677.2010.00430.x>.

ARORA, D.; BHATLA, S. C. Nitric oxide triggers a concentration-dependent differential modulation of superoxide dismutase (FeSOD and Cu/ZnSOD) activity in sunflower seedling roots and cotyledons as an early and long distance signaling response to NaCl stress. **Plant Signaling & Behavior**, [s.l], v. 10, n. 10, p.1-11, 4 set. 2015. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/15592324.2015.1071753>.

ARORA, D. et al. Mechanisms of nitric oxide crosstalk with reactive oxygen species scavenging enzymes during abiotic stress tolerance in plants. **Free Radical Research**, [s.l], v. 50, n. 3, p.291-303, 14 jan. 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/10715762.2015.1118473>.

BAJJI, M.; KINET, J.; LUTTS, S. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. **Plant Growth Regulation**, [s.l], v. 36, n. 1, p.61-70, 2002. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1014732714549>.

BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Plant water relations as affected by heavy metal stress: A review. *Journal of Plant Nutrition*, [s.l], v. 13, n. 1, p.1-37, Jan. 1990. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/01904169009364057>.

BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant And Soil**, [s.l], v. 39, n. 1, p.205-207, ago. 1973. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00018060>.

BEAUCHAMP, C., and FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, 44:276-287, 1971.

BIAN, M. et al. Molecular approaches unravel the mechanism of acid soil tolerance in plants. **The Crop Journal**, [s.l.], v. 1, n. 2, p.91-104, dez. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cj.2013.08.002>.

BOSCOLO, P; MENOSSIB, Marcelo; JORGE, Renato A. Aluminum-induced oxidative stress in maize. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 62, n. 2, p.181-189, jan. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422\(02\)00491-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422(02)00491-0).

BOSE, J. et al. Specificity of Ion Uptake and Homeostasis Maintenance During Acid and Aluminium Stresses. **Aluminum Stress Adaptation in Plants**, [s.l.], p.229-251, 2015. Springer Science + Business Media. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-19968-9\\_12](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-19968-9_12).

BRACCINI, M. C. L. et al. **Crescimento da planta e coloração das raízes com hematoxilina como critérios de avaliação de genótipos de café quanto à tolerância à toxidez de alumínio.** *Rev. Bras. Ciênc. Solo*[online]. 2000, vol.24, n.1, pp.59-68. ISSN 1806-9657. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832000000100008>.

BRADFORD, M.N. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72: 248-254, 1976.

CAI, M.et al. Response and tolerance of root border cells to aluminum toxicity in soybean seedlings. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [s.l.], v. 105, n. 7, p.966-971, Jul. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.04.004>.

CHANCE, B., MAEHLEY, A.C. Assay of catalase and peroxidase. **Methods in Enzymology**, 2:764-775, 1955.

CORPAS, F. J.; BARROSO, J. B. Nitric oxide from a “green” perspective. **Nitric Oxide**, [s.l.], v. 45, p.15-19, fev. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2015.01.007>.

CORPAS, F.; BARROSO, J. Functions of Nitric Oxide (NO) in Roots during Development and under Adverse Stress Conditions. **Plants**, [s.l.], v. 4, n. 2, p.240-252, 22 maio 2015. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/plants4020240>.

CORREA-ARAGUNDE, N. et al. Nitric oxide modulates the expression of cell cycle regulatory genes during lateral root formation in tomato. *Journal of Experimental Botany*, [s.l.], v. 57, n. 3, p.581-588, 5 Jan. 2006. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erj045>.

CORREA-ARAGUNDE, N.; FORESI, N.; LAMATTINA, L. Nitric oxide is a ubiquitous signal for maintaining redox balance in plant cells: regulation of ascorbate peroxidase as a case study. *Journal of Experimental Botany*, [s.l.], v. 66, n. 10, p.2913-2921, 7 mar. 2015. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erv073>.

CORREA-ARAGUNDE, N.; GRAZIANO, M.; LAMATTINA, L. Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. **Planta**, [s.l.], v. 218, n. 6, p.900-905, 1 abr. 2004. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s00425-003-1172-7>.

CUI, J. et al. Role of nitric oxide in hydrogen peroxide-dependent induction of abiotic stress tolerance by brassinosteroids in cucumber. **Plant, Cell & Environment**, [s.l.], v. 34, n. 2, p.347-358, 15 dez. 2010. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02248.x>.

EDERLI, L. et al. NO release by nitric oxide donors in vitro and in planta. **Plant Physiology And Biochemistry**, [s.l.], v. 47, n. 1, p.42-48, jan. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.09.008>.

EZAKI, B. et al. A combination of five mechanisms confers a high tolerance for aluminum to a wild species of Poaceae, *Andropogon virginicus* L. **Environmental and Experimental Botany**, [s.l.], v. 93, p.35-44, set. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.05.002>.

FANCY, N. N.; BAHLMANN, A.; LOAKE, G. J. Nitric oxide function in plant abiotic stress. **Plant, Cell & Environment**, [s.l.], v. 40, n. 4, p.462-472, 1 mar. 2016. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/pce.12707>.

FEELISCH, M.. The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. **Naunyn-schmiedeberg's Archives Of Pharmacology**, [s.l.], v. 358, n. 1, p.113-122, 20 jul. 1998. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/pl00005231>.

FERREIRA, D. F. **Sisvar: a computer statistical analysis system**. *Ciência e Agrotecnologia (UFLA)*, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

FERREIRA, L. C. **AÇÃO PROTETORA DO ÓXIDO NÍTRICO EM PLANTAS DE SOJA (*Glycine max* L. Merril) SUBMETIDAS AO LACTOFEN**. 2007. 171 f. Tese (Doutorado) - Curso de Fisiologia Vegetal, Instituto de Biociências, Unesp, Botucatu, 2007.

FERREIRA, R. P.; MOREIRA, A.; RASSINI, J. B. **Toxidez de alumínio em culturas anuais**. São Carlos: Online, 2006. Embrapa Pecuária Sudeste. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPPE/16821/1/Documentos-63.pdf>>. Acesso em: 18 mar. 2016.

FLORYSZAK-WIECZOREK, J. et al. Do nitric oxide donors mimic endogenous NO-related response in plants? **Planta**, [s.l.], v. 224, n. 6, p.1363-1372, 14 jun. 2006. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00425-006-0321-1>.

FOTOPOULOS, V. et al. Application of sodium nitroprusside results in distinct antioxidant gene expression patterns in leaves of mature and senescing *Medicago truncatula* plants. **Protoplasma**, [s.l.], v. 251, n. 4, p.973-978, 15 Nov. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00709-013-0573-0>.

FOYER, C.H., HALLIWELL, B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. **Planta**, 133:21-25, 1976.

GAY, C., GEBICKI, J.M. A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xylene orange hydroperoxide assay. **Analytical Biochemistry**, 284: 217-220, 2000.

GIANNAKOULA, A. et al. Aluminum stress induces up-regulation of an efficient antioxidant system in the Al-tolerant maize line but not in the Al-sensitive line. **Environmental And Experimental Botany**, [s.l], v. 67, n. 3, p.487-494, Jan. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.07.010>.

GIANNOPOLITIS, C.N., RIES, S.K. Superoxide dismutases: Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, 59:309-314, 1977.

HAVIR, E.A., MCHALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, 84:450-455, 1987.

HE, H.; HE, L.; GU, M. Interactions between nitric oxide and plant hormones in aluminum tolerance. **Plant Signaling & Behavior**, [s.l], v. 7, n. 4, p.469-471, abr. 2012. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/psb.19312>.

HEATH, R.L., PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 125:189-198, 1968.

HETRICK, E. M.; SCHOENFISCH, M. H. Analytical Chemistry of Nitric Oxide. **Annual Review of Analytical Chemistry**, [s.l], v. 2, n. 1, p.409-433, 19 Jul. 2009. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-anchem-060908-155146>.

HU, J. et al. Nitric Oxide Regulates Protein Methylation during Stress Responses in Plants. **Molecular Cell**, [s.l], v. 67, n. 4, p.535-537, ago. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2017.06.031>.

JAISWAL, A.; SRIVASTAVA, J. Nitric oxide mitigates waterlogging stress by regulating antioxidative defense mechanism in maize (*Zea mays* L.) roots. **Bangladesh Journal of Botany**, Varanasi, v. 3, n. 45, p.517-524, Jan. 2016.

JORGE, R. A.; ARRUDA, P. Aluminum-induced organic acids exudation by roots of an aluminum-tolerant tropical maize. **Phytochemistry**, [s.l], v. 45, n. 4, p.675-681, jun. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422\(97\)00044-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9422(97)00044-7).

KAR, M., MISHRA, D. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, 57:315-319, 1976.

KAUR, G. et al. Exogenous Nitric Oxide (NO) Interferes with Lead (Pb)-Induced Toxicity by Detoxifying Reactive Oxygen Species in Hydroponically Grown Wheat (*Triticum aestivum*) Roots. **Plos One**, [s.l], v. 10, n. 9, p.1-19, 24 set. 2015. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0138713>.

KOCHIAN, L V. Cellular Mechanisms of Aluminum Toxicity and Resistance in Plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, [s.l], v. 46, n. 1, p.237-260, jun. 1995. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pp.46.060195.001321>.

KOCHIAN, L. V. et al. Plant Adaptation to Acid Soils: The Molecular Basis for Crop Aluminum Resistance. **Annual Review of Plant Biology**, [s.l], v. 66, n. 1, p.571-598, 29 abr. 2015. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-114822>.

KOJIMA, H. et al. Detection and Imaging of Nitric Oxide with Novel Fluorescent Indicators: Diaminofluoresceins. **Analytical Chemistry**, [s.l], v. 70, n. 13, p.2446-2453, Jul. 1998. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ac9801723>.

KOLBERT, Z. Implication of nitric oxide (NO) in excess element-induced morphogenic responses of the root system. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s.l], v. 101, p.149-161, abr. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.02.003>.

KOPITTKKE, P. M. et al. Kinetics and nature of aluminium rhizotoxic effects: a review. *Exbotj*, [s.l], v. 67, n. 15, p.4451-4467, 14 jun. 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erw233>.

KOSHIBA, T. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedling and leaves of maize (*Zea mays*). **Plant Cell Physiology**, 34:713-721, 1993.

KUO, M.C. KAO, C.H. Aluminum effects in lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. **Biologia Plantarum**, 46:19-152, 2003.

LI, Guowei; SANTONI, Véronique; MAUREL, Christophe. Plant aquaporins: Roles in plant physiology. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - General Subjects**, [s.l.], v. 1840, n. 5, p.1574-1582, maio 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.11.004>.

LI, Y.N et al. In Site Bioimaging of Hydrogen Sulfide Uncovers Its Pivotal Role in Regulating Nitric Oxide-Induced Lateral Root Formation. **Plos One**, [s.l.], v. 9, n. 2, p.1-10, 27 fev. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0090340>.

LIU, H. et al. The role of water channel proteins and nitric oxide signaling in rice seed germination. **Cell Research**, [s.l.], v. 17, n. 7, p.638-649, 24 abr. 2007. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2007.34>.

MARCIANO, D.P. R.O, et al. Nitric oxide reduces the stress effects of aluminum on the process of germination and early root growth of rice. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, [s.l.], v. 173, n. 6, p.885-891, 13 out. 2010. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/jpln.200900312>.

MATONYEI, T. K. et al. Physiological and molecular analysis of aluminum tolerance in selected Kenyan maize lines. **Plant And Soil**, [s.l.], v. 377, n. 1-2, p.357-367, 7 Jan. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-013-1976-6>.

MATSUMOTO, H.; MOTODA, H. Aluminum toxicity recovery processes in root apices. Possible association with oxidative stress. **Plant Science**, [s.l.], v. 185-186, p.1-8, abr. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.07.019>.

MICHELE, R. de et al. Nitric Oxide Is Involved in Cadmium-Induced Programmed Cell Death in Arabidopsis Suspension Cultures. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 150, n. 1, p.217-228, 4 mar. 2009. American Society of Plant Biologists (ASPB). <http://dx.doi.org/10.1104/pp.108.133397>.

MIGUEL, P.S.B. et al. Efeitos tóxicos do alumínio no crescimento das plantas: mecanismos de tolerância, sintomas, efeitos fisiológicos, bioquímicos e controles genéticos. **Ces Revista**, Juiz de Fora, v. 24, p.14-30, 12 maio 2010. Disponível em: <[http://www.cesjf.br/revistas/cesrevista/edicoes/2010/01\\_BIOLOGIA\\_efeitodoaluminio.pdf](http://www.cesjf.br/revistas/cesrevista/edicoes/2010/01_BIOLOGIA_efeitodoaluminio.pdf)>. Acesso em: 08 ago. 2017.

MILLER, J.; CONN, E. Metabolism of Hydrogen Cyanide by Higher Plants1. **Plant Physiol**, [s.l.], n. 65, p.1199-1202, fev. 1980.

MOHAMMADI, M., KARR, A.L. Superoxide anion generation in effective and ineffective soybean root nodules. **Journal of Plant Physiology**, 158:1023-1029, 2001.

NAKABAYASHI, R.; SAITO, K. Integrated metabolomics for abiotic stress responses in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, [s.l.], v. 24, p.10-16, abr. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2015.01.003>.

NAKANO, Y., ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidases in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, 22:867-880, 1981.

NATH, M. et al. Reactive Oxygen Species (ROS) Metabolism and Signaling in Plant-Mycorrhizal Association Under Biotic and Abiotic Stress Conditions. **Mycorrhiza - Eco-physiology, Secondary Metabolites, Nanomaterials**, [s.l.], p.223-232, 2017. Springer International Publishing. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-57849-1\\_12](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-57849-1_12).

NEILL, S. J.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J. T. Nitric oxide signalling in plants. **New Phytologist**, [s.l.], v. 159, n. 1, p.11-35, Jul. 2003. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00804.x>.

PANDA, S. K.; BALUŁKA, F.; MATSUMOTO, H. Aluminum stress signaling in plants. **Plant Signaling & Behavior**, [s.l.], v. 4, n. 7, p.592-597, Jul. 2009. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/psb.4.7.8903>.

PINEROS, M. A. et al. Root Organic Acid Exudation Cannot Solely explain aluminum Resistance in Maize. A Comparative Physiological Study. **Plant**

**Physiology**, [s.l.], v. 137, n. 1, p.231-241, 1 Jan. 2005. American Society of Plant Biologists (ASPB). <http://dx.doi.org/10.1104/pp.104.047357>.

PLANCHET, E.; KAISER, W.M. Nitric oxide (NO) detection by DAF fluorescence and chemiluminescence: a comparison using abiotic and biotic NO sources. **Journal of Experimental Botany**, [s.l.], v. 57, n. 12, p.3043-3055, 7 ago. 2006. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erl070>.

PLANCHET, E. et al. Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. **The Plant Journal**, [s.l.], v. 41, n. 5, p.732-743, 2 fev. 2005. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3113x.2005.02335.x>.

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

PUCCIARIELLO, C.; PERATA, P. New insights into reactive oxygen species and nitric oxide signalling under low oxygen in plants. **Plant, Cell & Environment**, [s.l.], v. 40, n. 4, p.473-482, 13 abr. 2016. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/pce.12715>.

R Core Team (2016). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RAO, I. M. et al. Root adaptations to soils with low fertility and aluminium toxicity. **Annals of Botany**, [s.l.], v. 118, n. 4, p.593-605, 1 jun. 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcw073>.

RIO, L. A. del. ROS and RNS in plant physiology: an overview. **Journal of Experimental Botany**, [s.l.], v. 66, n. 10, p.2827-2837, 7 abr. 2015. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erv099>.

ROUT G. R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. Aluminium toxicity in plants: a review. **Agronomie**, [s.l.], v. 21, n. 1, p.3-21, jan. 2001. EDP Sciences. <http://dx.doi.org/10.1051/agro:2001105>.

SIDDIQUI, Manzer H. et al. Sodium nitroprusside and indole acetic acid improve the tolerance of tomato plants to heat stress by protecting against DNA damage. **Journal Of Plant Interactions**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.177-186, jan. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/17429145.2017.1310941>.

SILVA, K.S. et al. Electrolyte Leakage and the Protective Effect of Nitric Oxide on Leaves of Flooded Rice Exposed to Herbicides. **Planta Daninha**, [s.l.], v. 34, n. 4, p.777-786, dez. 2016. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-83582016340400018>.

SILVEIRA, N. M. **TOXICIDADE DO ARSÊNIO E MEDIAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NAS RESPOSTAS CELULARES EM ALFACE (*Lactuca sativa* L.)**. 2012. 45 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Fisiologia Vegetal, Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

SIMONTACCHI, M. et al. Plant Survival in a Changing Environment: The Role of Nitric Oxide in Plant Responses to Abiotic Stress. **Frontiers in Plant Science**, [s.l.], v. 6, p.1-19, 9 Nov. 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2015.00977>.

SINGH, H. P. et al. Nitric oxide (as sodium nitroprusside) supplementation ameliorates Cd toxicity in hydroponically grown wheat roots. **Environmental And Experimental Botany**, [s.l.], v. 63, n. 1-3, p.158-167, maio 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.12.005>.

SINGH, S. et al. Toxicity of aluminium on various levels of plant cells and organism: A review. **Environmental And Experimental Botany**, [s.l.], v. 137, p.177-193, maio 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.01.005>.

SOUZA, L. T. de et al. Effects of aluminum on the elongation and external morphology of root tips in two maize genotypes. **Bragantia**, [s.l.], v. 75, n. 1, p.19-25, mar. 2016. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4499.142>.

SOUZA, L. T. de. **PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NA TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM DOIS GENÓTIPOS DE MILHO**. 2012. 80 f. Tese (Doutorado) - Curso de Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

SUN, C. et al. Decreasing methylation of pectin caused by nitric oxide leads to higher aluminium binding in cell walls and greater aluminium sensitivity of wheat roots. **Journal of Experimental Botany**, [s.l.], v. 67, n. 3, p.979-989, 9 dez. 2015. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erv514>.

SUN, C. et al. Nitric oxide acts downstream of hydrogen peroxide in regulating aluminum-induced antioxidant defense that enhances aluminum resistance in wheat seedlings. **Environmental And Experimental Botany**, [s.l.], v. 145, p.95-103, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.10.020>.

TIAN, Q. et al. Inhibition of nitric oxide synthase (NOS) underlies aluminum-induced inhibition of root elongation in *Hibiscus moscheutos*. **New Phytologist**, [s.l.], v. 174, n. 2, p.322-331, abr. 2007. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02005.x>.

TREVISAN, S.; MANOLI, Al.; QUAGGIOTTI, S. NO signaling is a key component of the root growth response to nitrate in *Zea mays* L. **Plant Signaling & Behavior**, [s.l.], v. 9, n. 6, p.1-7, 10 mar. 2014. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/psb.28290>.

WANG, H.; HUANG, J.; BI, Y. Nitrate reductase-dependent nitric oxide production is involved in aluminum tolerance in red kidney bean roots. **Plant Science**, [s.l.], v. 179, n. 3, p.281-288, set. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.05.014>.

WANG, Y.S., YANG, Z.M. Nitric oxide reduces aluminum toxicity by preventing oxidative stress in the roots of *Cassia tora* L. **Plant Cell Physiology**, 46: 1915-1923, 2005.

WILNER, J. Results of laboratory tests for winter hardiness of woody plants by electrolyte methods. **Proceedings of the American Horticultural Society**, Ann Arbor, v. 66, p. 93-99, 1955.

WINK, David A. et al. The Effect of Various Nitric Oxide-Donor Agents on Hydrogen Peroxide-Mediated Toxicity: A Direct Correlation between Nitric Oxide Formation and Protection. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s.l.], v. 331, n. 2, p.241-248, Jul. 1996. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/abbi.1996.0304>.

YU, M. et al. Nitric oxide function in plant biology: a redox cue in deconvolution. **New Phytologist**, [s.l.], v. 202, n. 4, p.1142-1156, 10 mar. 2014. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/nph.12739>.