

**ÉLCIO MEIRA DA FONSECA JÚNIOR**

**PRODUÇÃO DE INTERMEDIÁRIOS REATIVOS DE  
OXIGÊNIO EM ARROZ, NA PRESENÇA DE ALUMÍNIO**

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**  
**2007**

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

T

F676p  
2007

Fonseca Júnior, Élcio Meira da, 1981-  
Produção de intermediários reativos de oxigênio em  
arroz, na presença de alumínio / Élcio Meira da Fonseca  
Júnior. – Viçosa, MG, 2007.  
ix, 44f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui apêndice.  
Orientador: José Cambraia.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 32-38.

1. Fisiologia vegetal. 2. Stress (Fisiologia). 3. Arroz -  
Efeito do stress. 4. Arroz - Efeito do alumínio. 5. Estresse  
oxidativo. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 571.2

**ÉLCIO MEIRA DA FONSECA JÚNIOR**

**PRODUÇÃO DE INTERMEDIÁRIOS REATIVOS DE  
OXIGÊNIO EM ARROZ, NA PRESENÇA DE ALUMÍNIO**

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*.

APROVADA: 12 de março de 2007

---

Prof. Marco Aurélio Pedron e Silva

---

Prof. Paulo Cezar Rezende Fontes

---

Prof. Marco Antônio Oliva Cano  
(Co-Orientador)

---

Prof. Juraci Alves de Oliveira  
(Co-Orientador)

---

Prof. José Cambraia  
(Orientador)

Aos meus pais, Élcio (*in memoriam*) e Socorro. Exemplos de vida, honestidade e discernimento. Abriram as portas do meu futuro, iluminando meu caminho com a luz mais brilhante que puderam encontrar: o estudo. Meus primeiros e eternos professores.

## **MINHA HOMENAGEM**

*“É melhor tentar, que preocupar-se e ver a vida passar. É melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final”.*

Martin Luther King

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão, EMBRAPA-CNPAP, Goiânia, pelo fornecimento das sementes de arroz.

Ao Professor José Cambraia, pela orientação, dedicação, o conhecimento transmitido, a compreensão nos momentos de dificuldade, mas, sobretudo, pelo exemplo, profissionalismo e competência a ser seguido.

Aos Professores Marco Oliva e Juraci pelas sugestões e contribuição para realização do trabalho, aos demais professores do curso de Fisiologia Vegetal pelos ensinamentos e conhecimentos transmitidos e a professora Marília.

Ao Bhering pela grande contribuição prestada na realização deste trabalho.

A todos os colegas do curso de Fisiologia Vegetal pela amizade e convívio, em especial Carol Müller, Paulo César, Kelly, Marcelo Guimarães, Gabriela, Elaine, Otávia, Valdir, Rony, Rafaela, Ana Maria Mapelli, Ricardo, Alan e Fernanda.

Aos amigos Eduardo e Cláudio pelo companheirismo, os momentos de descontração, pela ajuda substancial e o incentivo nos momentos de dificuldade.

Ao grande amigo Cleberson Ribeiro pelo apoio incondicional em todos os momentos; o convívio, os momentos de dificuldade e incerteza que enfrentamos juntos sem contar as longas horas de estudo.

Aos amigos Felipe, Flávio, Patrick e Wagner, pela convivência diária, incentivo e entendimento nos momentos de dificuldade e, em especial, à Sandrinha.

A todos de minha família, pelo apoio incondicional, os conselhos, a ajuda que sempre me deram, o entendimento na ausência, e, sobretudo a torcida e o amor, que nos torna verdadeiramente uma família.

Finalmente, a DEUS, por me proporcionar mais este desafio, dando-me coragem e força constantes.

## **BIOGRAFIA**

ÉLCIO MEIRA DA FONSECA JÚNIOR, filho de Élcio Meira da Fonseca (*in memoriam*) e Maria do Socorro da Cruz Fonseca, nasceu na cidade de Montes Claros-MG, no dia 13 de janeiro de 1981.

Em Março de 2001, ingressou na Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES), diplomando-se Biólogo em Janeiro de 2005.

Em março de 2005, iniciou na pós-graduação em Fisiologia Vegetal, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa (UFV).

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	viii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	8
2.1. Obtenção do material vegetal.....	8
2.2. Alumínio e determinação do crescimento das plantas .....	9
2.3. Determinação do teor de ânion superóxido.....	9
2.3.1. Avaliação histoquímica do ânion superóxido .....	9
2.4. Determinação do teor de peróxido de hidrogênio .....	10
2.5. Alumínio e a atividade fotossintética.....	10
2.5.1. Determinação de trocas gasosas e fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	11
2.5.2. Avaliação dos teores de pigmentos fotossintéticos.....	12
2.6. Avaliação da peroxidação de lipídios .....	12
2.7. Delineamento Experimental .....	12
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	13
3.1. Crescimento de plantas de arroz .....	13
3.2. Teores de ânion superóxido .....	15
3.2.1. Avaliação histoquímica da presença de ânion superóxido em ápices radiculares .....	17
3.3. Teores de peróxido de hidrogênio.....	20
3.4. Peroxidação de lipídios .....	23
3.5. Atividade fotossintética de plantas expostas ao Al.....	24
3.5.1. Teores de pigmentos fotossintéticos .....	24
3.5.2. Trocas gasosas e parâmetros de fluorescência da clorofila.....	26
<b>4. RESUMO E CONCLUSÕES</b> .....	31
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	32
<b>APÊNDICE</b> .....	39

## RESUMO

FONSECA JÚNIOR, Élcio Meira da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Março de 2007. **Produção de intermediários reativos de oxigênio em arroz, na presença de alumínio.** Orientador: José Cambraia. Co-Orientadores: Juraci Alves de Oliveira e Marco Antônio Oliva Cano.

Neste trabalho, avaliou-se a produção de intermediários reativos de oxigênio em plantas de dois cultivares de arroz, Fernandes (CNA-1158) e Maravilha (CNA-6843-1), na presença de alumínio. Plântulas de arroz de nove dias de idade foram expostas ao Al nas concentrações de 0 e 1 mM, durante dez dias e, então, determinou-se o crescimento, os teores de superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e de pigmentos cloroplastídicos, a peroxidação de lipídios e parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*. O crescimento do cultivar Fernandes não foi modificado pelo Al, enquanto o do cultivar Maravilha sofreu redução desta variável tanto nas raízes quanto na parte aérea. As plantas controle dos dois cultivares apresentaram os mesmos teores de  $O_2^{\bullet-}$  nas duas partes das plantas. O tratamento com Al provocou redução no teor de  $O_2^{\bullet-}$  nas raízes apenas no cultivar Fernandes, enquanto nas folhas a redução ocorreu nos dois cultivares, mas com maior intensidade no cultivar Fernandes. A presença de  $O_2^{\bullet-}$  foi demonstrada histoquimicamente nos ápices radiculares dos dois cultivares, independente do tratamento com alumínio. O acúmulo desta espécie reativa ocorreu, principalmente, nas células epidérmicas e corticais mais externas. O teor de  $H_2O_2$  nas raízes das plantas controle do cultivar Fernandes foi mais elevado que no cultivar Maravilha. Após exposição ao Al, observou-se redução no teor desta espécie reativa apenas no cultivar Fernandes, que passou a ter a mesma concentração do cultivar Maravilha. Nas folhas, o tratamento com Al causou redução no teor de  $H_2O_2$  apenas no cultivar Maravilha, que passou a ter o mesmo teor do cultivar Fernandes. A peroxidação de lipídios nas raízes aumentou com o tratamento com Al apenas no

cultivar Maravilha, passando a ser significativamente maior que no cultivar Fernandes. Nas folhas, o tratamento com Al não teve efeito, mas o cultivar Fernandes apresentou maior peroxidação de lipídios que o cultivar Maravilha. Os teores de clorofila *a*, *b*, clorofila total e carotenóides aumentaram no cultivar Fernandes, mas não se modificaram no cultivar Maravilha após exposição das plantas ao alumínio. Apesar disso, os parâmetros de trocas gasosas e de fluorescência da clorofila *a* não foram modificados pelo tratamento com Al em nenhum dos cultivares. Na presença de Al, o cultivar Fernandes apresentou menores teores de superóxido e de peróxido de hidrogênio, que explicam, pelo menos em parte, a menor peroxidação dos lipídios de suas membranas e, conseqüentemente seu maior crescimento.

## ABSTRACT

FONSECA JÚNIOR, Élcio Meira da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March of 2007. **The reactive oxygen intermediates (ROIs) production in rice, in the presence of aluminum.** Adviser: José Cambraia. Co-advisers: Juraci Alves de Oliveira and Marco Antônio Oliva Cano.

The reactive oxygen intermediates (ROIs) production was studied in plants of two rice cultivars, Fernandes (CNA-1158) and Maravilha (CNA-6843-1), in the presence of aluminum. Nine days-old rice seedlings were exposed to 0 and 1 mM Al for ten days and, then, plant growth, superoxide ( $O_2^{\bullet-}$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and chloroplastidic pigment contents, lipid peroxidation, gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence parameters were determined. The Fernandes cultivar growth did not change with Al treatment, while in Maravilha cultivar reductions were observed in both roots and shoot. The control plants of the two cultivars showed the same content of  $O_2^{\bullet-}$  in the two parts of the plants. Aluminum treatment caused reduction in the  $O_2^{\bullet-}$  contents only in the roots of the Fernandes cultivar, while in the leaves the reduction occurred in both cultivars, but with higher intensity in the Fernandes cultivar. The presence of  $O_2^{\bullet-}$  was histochemically shown in the root apices of the two rice cultivar, independent of Al treatment. This oxygen reactive species accumulated mainly in the epidermis and external cortical cells of the root apices. The  $H_2O_2$  content in the roots of control plants of the Fernandes cultivar were higher than in the Maravilha cultivar. After exposure to Al, a reduction in this reactive oxygen species content was observed only in the Fernandes cultivar, which became statistically similar to that of the Maravilha cultivar. In the leaves, Al treatment reduced the  $H_2O_2$  content only in the Maravilha cultivar, which became similar to that of the Fernandes cultivar. Lipid peroxidation in the roots increased with the Al treatment only in the Maravilha cultivar, becoming significantly higher than in the Fernandes cultivar. In the leaves, Al treatment did not have any effect, but

the Fernandes cultivar showed larger lipid peroxidation than the Maravilha cultivar. Chlorophyll a, b, total chlorophyll and carotenoids contents increased in Fernandes cultivar, but they did not change in the Maravilha cultivar after plants exposure to aluminum. In spite of that, gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence parameters were not modified by Al treatment in none of the cultivars. In the presence of Al, Fernandes cultivar showed lower superoxide and hydrogen peroxide contents, which could explain, at least partly, the smallest lipid peroxidation of its membranes and, consequently its larger growth.

## 1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é produzido há mais de 7.000 anos (IZAWA & SHIMAMOTO, 1996), constituindo num dos mais importantes cereais cultivados, sendo alimento diário para mais de 70% da população mundial (KOCHIAN et al., 2004). No Brasil, também representa importante fonte alimentar, principalmente para as classes de baixa renda.

Com o crescimento populacional e, em consequência, aumento do consumo deste cereal, a intensificação da produção torna-se fundamental. No entanto, a escassez cada vez maior de solos indicados para seu cultivo constitui fator limitante para o aumento da produção (JAN e PETERSON, 1995). Assim, solos com características adversas, como as terras ácidas, altamente esgotadas em sais minerais e, ou, com níveis tóxicos de alumínio (JAN e PETERSSON, 1995), têm sido utilizados como alternativa para aumentar a produção de arroz.

Solos ácidos compreendem aproximadamente 50% das terras potencialmente aráveis do mundo e utilizáveis para produção de alimentos; a maioria destes solos, que apresenta características topográficas adequadas para mecanização, no entanto, está sujeita à toxicidade por manganês (Mn) e, principalmente alumínio (Al) (KOCHIAN et al., 2004). O Al é apontado como um dos principais fatores que limitam o crescimento e a produtividade das culturas em solos ácidos (KOCHIAN *et al.*, 2004). No Brasil, a área de Cerrado cobre 2 milhões de km<sup>2</sup>, representando 23% da área do país (RATTER et al., 1997), apresentando não apenas elevada acidez, mas também baixa disponibilidade de P, Ca, Mg, K e níveis tóxicos de Al (LOPES, 1984). Assim, alternativas que visam aumentar a produtividade de cereais nestas áreas devem ser priorizadas. Uma destas possibilidades é a seleção de cultivares tolerantes a estas condições, que, poderão resultar em benefícios para produção de cereais nestas áreas.

Um dos primeiros e mais importantes efeitos da toxicidade do Al parece ser a inibição do crescimento radicular (KOCHIAN, 1995; KOLLMEIER et al., 2000), efeito

que se manifesta após poucos minutos de exposição de cultivares sensíveis de milho (LLUGANY et al., 1995). Por acumular-se preferencialmente no ápice radicular, (KOCHIAN, 1995), esta região da raiz é apontada como sítio primário da ação inibitória do Al (DELHAIZE et al., 1993). Após exposições mais prolongadas do sistema radicular das plantas ao Al, a toxidez se manifesta por meio de um conjunto de sintomas, que expressam o efeito contínuo deste íon sobre o crescimento do sistema radicular e da parte aérea e na absorção e utilização de nutrientes (FAGERIA et al., 1989). Tais sintomas incluem reduções na produção de matéria seca, no número e no comprimento das raízes, freqüentemente associados ao aumento no raio médio e no volume radicular (SIVAGURU e PALIWAL, 1993), redução na absorção de água e de nutrientes minerais (CALBO e CAMBRAIA, 1980; MENDONÇA et al., 2003), redução nas taxas de fotossíntese (OHKI, 1986) e de respiração celular (YAMAMOTO et al., 2002), resultando em severas perdas em crescimento e produtividade.

Devido à intensidade de sua carga elétrica positiva, o Al reage com inúmeros sítios nas células, alvos potenciais de injúria, como a parede celular, o citoesqueleto, o núcleo e, principalmente, a membrana plasmática (KOCHIAN et al., 2004). Apesar da extensa literatura existente e das inúmeras hipóteses, não há ainda consenso sobre os mecanismos fisiológicos de toxicidade do Al (VITORELLO, 2005). Vários trabalhos apontam a membrana plasmática como um dos alvos primários do Al em nível celular (OTEIZA, 1994; WAGATSUMA et al., 1995; MERIGA et al., 2004). Na superfície da membrana o Al interage com os fosfolipídios causando perda de fluidez da bicamada, promove a peroxidação de lipídios e altera diversas funções fundamentais da membrana plasmática. Evidências crescentes sugerem que, pelo menos parte dos efeitos tóxicos do Al sobre a membrana deve-se à indução de estresse oxidativo. A peroxidação de lipídios induzida por Al, entretanto, é considerada um evento secundário e posterior à ação do Al (YAMAMOTO et al., 2001) que seria, inicialmente, a indução de processos que resultariam na produção de intermediários reativos de oxigênio (ROIs).

Intermediários reativos de oxigênio (ROIs) são formas reduzidas do oxigênio molecular ( $O_2$ ), extremamente reativas e que podem causar danos oxidativos a diversos componentes celulares (MITTLER, 2002). Eles incluem o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxílico ( $\bullet OH$ ) e oxigênio “singleto” ( $^1O_2$ ) (MITTLER, 2002). Em plantas, os ROIs podem ser produzidos em diferentes compartimentos celulares (CAMP et al., 2004), incluindo cloroplastos, mitocôndrias, membrana plasmática, peroxissomos, parede celular e apoplasto (MITTLER, 2002). São

considerados “subprodutos inevitáveis” do metabolismo aeróbico sendo continuamente produzidos e removidos das células por mecanismos antioxidativos enzimáticos ou não enzimáticos (MITLER, 2002). No entanto, várias perturbações ambientais como: temperaturas altas e, ou baixas, alta intensidade luminosa, deficiência hídrica, salinidade, metais pesados e outros, podem aumentar enormemente a produção destes ROIs (SCANDALIOS, 1993), resultando em estresse oxidativo e conseqüente oxidação de biomoléculas (lipídios, proteínas e DNA, por exemplo), levando à redução na produtividade das plantas.

A formação de oxigênio singleto ( $^1O_2$ ) ocorre na fotossíntese durante o processo de dissipação do excesso de energia de moléculas de clorofila excitadas associadas ao fotossistema II (MÜLLER et al., 2001). A absorção de luz, de determinado comprimento de onda, resulta na excitação de moléculas de clorofila para o estado singleto, e o excesso de energia deste estado excitado pode ser dissipado pela emissão de calor, fluorescência, processo fotoquímico, ou então, pela formação de clorofila no estado tripleto ( $^3Chl^*$ ) (MÜLLER et al., 2001). O estado tripleto da clorofila pode transferir energia para o oxigênio molecular ( $O_2$ ), gerando o oxigênio “singleto” ( $^1O_2$ ), um intermediário reativo de oxigênio extremamente prejudicial à planta (MÜLLER et al., 2001).

Os radicais superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) podem ser produzidos espontaneamente durante a etapa fotoquímica da fotossíntese, por meio da transferência direta de um elétron de moléculas associadas ao fotossistema I (PSI) para o oxigênio molecular, sob condições de alta relação NADPH/NADP (APEL e HIRT, 2004). Os radicais superóxido gerados pelo PSI podem originar, em seqüência, peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) espontaneamente, ou então, em uma reação catalisada pela superóxido dismutase (SOD) (ARORA et al., 2002). O  $H_2O_2$  também pode ser produzido durante o ciclo fotorrespiratório, com envolvimento da Rubisco (ribulose bífosfato carboxilase/oxigenase) nos cloroplastos e a oxidase do glicolato nos peroxissomos (APEL e HIRT, 2004). A Rubisco, sob baixa concentração de  $CO_2$ , catalisa uma reação competitiva em que o  $O_2$  é favorecido como substrato em relação ao  $CO_2$ , produzindo glicolato que é translocado dos cloroplastos para os peroxissomos, onde é oxidado a glioxilato e peróxido de hidrogênio, mediante catálise pela enzima glicolato oxidase (APEL e HIRT, 2004).

O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e os radicais superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), por si só, são comparativamente menos danosos que outros ROIs, mas podem gerar espécies

extremamente reativas, como os radicais hidroxílicos ( $\bullet\text{OH}$ ), que danificam componentes celulares essenciais (ARORA et al., 2002). Os radicais hidroxílicos podem ser formados pela combinação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  com o  $\text{Fe}^{+2}$ , na reação denominada de “reação de Fenton” (BECANA et al., 1998). O  $\text{Fe}^{+3}$ , resultante desta reação, pode ser reduzido novamente pelo radical superóxido, provendo substrato para que a “reação de Fenton” continue. O conjunto destas duas reações é conhecido como reação de “Haber-Weiss” (BECANA et al., 1998). Os radicais hidroxílicos ( $\bullet\text{OH}$ ), por serem extremamente reativos, iniciam reações oxidativas que resultam na peroxidação de lipídios da membrana, em danos ao DNA, proteínas e pequenas moléculas (ARORA et al., 2002), podendo resultar até em morte celular.

O estresse por Al, assim como por outros fatores, resulta na produção de ROIs e, provavelmente, na ativação de sistemas de defesa antioxidativo enzimático e não enzimático. Evidências que suportam esta hipótese apóiam-se em correlações entre o aumento na produção de ROIs, sob algum tipo de estresse, com o aumento na atividade de certas enzimas e, ou na concentração de certos metabólitos, principalmente em espécies e, ou cultivares tolerantes. No entanto, ainda não é perfeitamente compreendido o mecanismo pelo qual o Al e outros fatores de estresse atuam na intensificação da formação de ROIs (DARKÓ et al., 2004).

Embora não se saiba exatamente como o  $\text{Al}^{+3}$  age na célula para induzir a produção de ROIs, seu envolvimento direto em reações redox parece pouco provável, pois não é um metal de transição, com número de oxidação 3 (GUTTERIDGE et al., 1985). No entanto, sabe-se que o  $\text{Al}^{+3}$ , em função da grande afinidade por biomembranas, pode causar modificações na estrutura da membrana, estimulando a formação de ROIs (CAKMARK e HORST, 1991). Além disso, a afinidade de íons  $\text{Al}^{+3}$  por biomembranas pode causar enrijecimento e facilitar reações em cadeia, mediadas por íons  $\text{Fe}^{+2}$ , com aumento na peroxidação de lipídios (YAMAMOTO et al., 2003). O Al aumentou a peroxidação de lipídios em soja (*Glycine max*) (CAKMARK & HORST, 1991), arroz (*Oryza sativa* L. cv. Taichung Native 1) (KUO & KAO, 2003), em células de cultura de tabaco (*Nicotina tabacum*) (YAMAMOTO et al., 1997), e em cultivar sensível de sorgo (PEIXOTO et al., 2002). No entanto, em cultivar sensível de milho (BOSCOLO et al., 2003) o Al não aumentou a peroxidação de lipídios, apesar de ter causado severos danos em diversos componentes celulares, inclusive com a morte de células no ápice radicular (BOSCOLO et al., 2003).

MERIGA et al. (2004) estudaram o efeito do  $Al^{+3}$  sobre a atividade de enzimas antioxidativas em arroz. Verificaram que as atividades enzimáticas aumentaram principalmente no cultivar tolerante, que, segundo os autores, teria um sistema de remoção de ROIs mais eficiente que o sensível. Já KUO e KAO (2003), estudando o efeito do Al na peroxidação de lipídios e na atividade de enzimas antioxidativas em folhas destacadas de arroz cv. Taichung Nature 1, encontraram aumento na concentração de malonaldeído, sem contudo ter havido acúmulo de  $H_2O_2$ . Eles admitiram que, como a atividade da enzima dismutase do superóxido (SOD) decresceu, deve ter ocorrido acúmulo de radicais  $O_2^{\bullet-}$  os quais teriam reagido com  $H_2O_2$ , resultando na formação de radicais hidroxílicos e, conseqüentemente, na peroxidação de lipídios.

O acúmulo de ROIs em resposta a condições estressantes ocorre pela falta de capacidade de desintoxicação inata ou pela inibição de enzimas de desintoxicação, como por exemplo, catalase (JONES et al., 2006). A primeira hipótese tem sido mais aceita, em razão das crescentes evidências de aumento na expressão de genes que codificam o sistema de defesa antioxidante por estresse de alumínio (EZAKI et al., 2000). Alguns destes genes codificam enzimas tais como glutathione-S-transferase (GST), peroxidase do ascorbato (APX), CAT e SOD, que protegem as plantas contra danos oxidativos.

O acúmulo de ROIs parece variar com o tempo de exposição e a concentração deste íon. Em sementes germinadas de cevada, TAMÁS et al. (2004) observaram diminuição no teor de peróxido de hidrogênio e do ânion superóxido com o aumento na concentração de Al de 0 a 8 mM. O aumento no tempo de exposição ao Al, contudo causou redução apenas nos teores de  $H_2O_2$ . Já DIPIERRO et al. (2005) encontraram aumento na concentração de peróxido de hidrogênio em plântulas de abóbora com o aumento do tempo de exposição ao Al na concentração de 50  $\mu$ M até 48h, seguido por decréscimo significativo após 72h. Este decréscimo foi interpretado por eles como significando a reação da planta à produção de ROIs, pela expressão de enzimas antioxidantes como a ascorbato peroxidase.

Como o Al acumula-se preferencialmente nas raízes, seus mais importantes efeitos ocorrem nesta região, acreditando-se que na parte aérea eles são indiretos, principalmente por afetar a translocação de nutrientes (LIDON et al., 1999). Na parte aérea, no entanto, o  $Al^{+3}$  pode, também, causar estresse oxidativo aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio e ativação de sistema de defesa. Dentre as

espécies reativas possivelmente produzidas nesta parte da planta, destacam-se o oxigênio singlete e radical hidroxílico (LIDON et al., 1999).

A produção de ROIs durante o processo fotossintético tem sido estimada, indiretamente, pela avaliação de parâmetros de fluorescência e de trocas gasosas (LIDON et al., 1999). Os defensores dessa metodologia acreditam que a emissão de fluorescência é inversamente proporcional à taxa de fotossíntese e que a fluorescência da clorofila *a*, sendo dependente do microambiente no tilacóide, capta alterações estruturais dessas membranas que estejam sendo induzidas por intermediários reativos de oxigênio (LIDON et al., 1999). Como o Al pode diminuir a taxa de assimilação de CO<sub>2</sub>, seja por interferir na condutância estomática ( $g_s$ ), ou então, por inibir certas enzimas do “Ciclo de Calvin” (KONRAD et al., 2005), haverá excesso de energia de excitação, que pode ser utilizada na formação de espécies reativas de oxigênio. Diminuição no rendimento quântico máximo ( $F_v/F_m$ ) e aumento da fluorescência inicial ( $F_0$ ) são reconhecidos como reflexo de alterações da estrutura dos tilacóides e bloqueio do fluxo de elétrons (KONRAD et al., 2005). LIDON et al. (1999), estudando o efeito do Al sobre a fotossíntese em plantas de milho não detectaram diferenças significativas para os parâmetros  $F_0$  e a relação  $F_v/F_m$ , indicando que nenhuma mudança ocorreu na transferência de energia do complexo antena. Eles observaram, no entanto, inibição da SOD e CAT em cloroplastos de plântulas de milho tratadas com Al, sugerindo potencial acúmulo de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, uma vez que os sistemas de remoção estavam inibidos. O ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, em seqüência, podem reagir pela reação de “Haber-Weiss”, originando radicais hidroxílicos nos cloroplastos. A produção de radicais hidroxílicos induzida por estresse de Al<sup>+3</sup>, principalmente em função da elevada reatividade desta espécie reativa, tem sido admitida com base na peroxidação de lipídios e na degradação de membrana cloroplastídicas (LIDON et al., 1999). Por outro lado, KONRAD et al. (2005), avaliando fluorescência da clorofila *a* em cultivares de cafeeiro sob estresse de Al, observaram aumento significativo de  $F_0$ , queda de  $F_v/F_m$  e diminuição das trocas gasosas, sugerindo, neste caso, a ocorrência de injúrias à estrutura dos tilacóides provavelmente pela ação dos ROIs.

Apesar destas informações, a produção de ROIs em plantas em resposta a estresse, incluindo por Al, não é bem conhecida (BOSCOLO et al., 2003) e poucas evidências são disponíveis (EZAKI et al., 2000). Geralmente, a geração de ROIs decorrente de fatores estressantes, incluindo por Al, é mensurada indiretamente, com

base na atividade de enzimas antioxidantes (BOSCOLO et al., 2003), mas poucos estudos foram realizados envolvendo a quantificação das principais ROIs, ou a localização histoquímica destes intermediários. Poucos trabalhos têm procurado entender os fatores bioquímicos e biofísicos que resultam na produção destes intermediários em arroz. Tanto quanto se sabe, pela literatura consultada, esta é a primeira pesquisa realizada com cultivares nacionais de arroz com o intuito de avaliar a produção de ROIs sob condições de toxidez de Al.

Este trabalho teve, pois, como objetivo avaliar a produção de intermediários reativos de oxigênio em plantas de dois cultivares de arroz, Fernandes (CNA-1158) e Maravilha (CNA-6843-1), na presença de alumínio.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Obtenção do material vegetal

Nos experimentos foram utilizados dois cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) com tolerância diferencial ao Al: Fernandes (CNA-1158) e Maravilha (CNA-6843-1), considerados tolerante e sensível ao Al, respectivamente, fornecidos pelo Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão de Goiânia, GO.

As sementes, selecionadas quanto ao tamanho e forma, foram tratadas com ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) concentrado por 1 minuto, lavadas em água de torneira e esterilizadas superficialmente com hipoclorito de sódio 2% (v/v) por 15 minutos, sendo lavadas novamente, em água corrente e em água desmineralizada. Posteriormente, foram colocadas para germinar em cartuchos de papel “germiteste”, em vasos contendo solução nutritiva de Clark (CLARK, 1975), pH 4,0, com um terço da força iônica original, sob aeração contínua e cobertos com sacos plástico preto para criar uma câmara úmida. Após cinco dias, os sacos plásticos foram retirados, permanecendo as plântulas por mais quatro dias na luz.

Nove dias após a semeadura, as plântulas foram selecionadas quanto à uniformidade de tamanho e forma e transplantadas para vasos de polietileno, contendo 1,8 L de solução nutritiva de Clark (CLARK, 1975), pH 4,0 e submetidas aos tratamentos com Al nas concentrações de 0 e 1,0 mM, aplicado na forma de AlCl<sub>3</sub> anidro, durante dez dias. O pH das soluções nutritivas, mantidas sob arejamento contínuo, foi ajustado diariamente para 4,0, utilizando-se NaOH 0,1 N ou HCl 0,1 N.

O cultivo das plantas, tanto na fase preliminar quanto durante a aplicação dos tratamentos, foi sempre realizado em sala de crescimento com temperatura controlada para  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , sob irradiância de  $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 h.

## **2.2. Alumínio e determinação do crescimento das plantas**

Dez dias após a aplicação dos tratamentos, conforme descrito no item 2.1, as plantas foram removidas e o sistema radicular lavado em HCl 0,1 N, em água corrente e, finalmente, em água desmineralizada. Determinou-se o comprimento da maior raiz e da parte aérea, além do peso da matéria seca das duas partes da plantas, após secagem em estufa a 80°C, até atingir peso constante.

## **2.3. Determinação do teor de ânion superóxido**

Amostras de 50 mg de ápices radiculares, de aproximadamente 1 cm, e de folhas, cortados em pequenos segmentos, foram incubadas em 2 mL de meio de reação constituído do sal dissódico do ácido etilenodiamino tetracético (Na<sub>2</sub>EDTA) 100 µM, β-nicotinamida adenina nucleótido reduzida (NADH) 20 µM e tampão de fosfato de sódio 20 mM, pH 7,8 (MOHAMMADI e KARR, 2001). Os tubos, tipo “penicilina”, foram hermeticamente fechados e a reação iniciada pela introdução de 100 µL de epinefrina 25,2 mM em HCl 0,1 N, usando-se seringa cromatográfica. As amostras foram incubadas a 28°C, sob agitação, por 5 min, os segmentos tissulares foram removidos e, a partir do sétimo minuto, iniciou-se a leitura da absorbância a 480 nm, durante 5 minutos. O branco foi realizado sob as mesmas condições, mas sem tecido vegetal. A produção de ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) foi avaliada pela determinação da quantidade de adenocromo acumulado (MISRA & FRIDDOOVICH, 1971), utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar de 4,0 x 10<sup>3</sup> (mol/L)<sup>-1</sup> (BOVERIS, 1984).

### **2.3.1. Avaliação histoquímica do ânion superóxido**

A formação de ânion superóxido em raízes foi visualizada “*in vivo*” pela incubação de ápices radiculares, de aproximadamente 1 cm, em 2 mL de tampão de citrato de potássio 10 mM (pH 6,0) contendo NBT 0,5 mM, a 25°C, sob agitação, por 25 min (FRAHRY e SCHOPFER, 2001; LISZKAY et al., 2004). Decorrido este tempo, os ápices radiculares foram removidos e fotografados por meio de câmera digital, acoplada a uma lupa Stemi 2000-C (Zeiss).

Os ápices radiculares, após a reação de coloração descrita anteriormente, foram cortados transversalmente à mão-livre e os cortes frescos, montados entre lâmina e lamínula em glicerina 50%. A documentação fotográfica referente à microscopia de luz foi realizada em fotomicroscópio Olympus AX 70 com sistema U-Photo.

## **2.4. Determinação do teor de peróxido de hidrogênio**

Amostras de 200 mg de tecido radicular e de folhas, separadamente, foram trituradas em nitrogênio líquido e, então, homogeneizadas em 2,0 mL de tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 6,5, contendo hidroxilamina 1 mM. Após filtração através de 4 camadas de gaze, o homogeneizado foi centrifugado a 10.000 xg, por 15 min, a 4°C, coletando-se o sobrenadante (KUROKI e KATO, 2003).

Alíquotas de 50 µl do sobrenadante foram adicionadas a um meio de reação constituído de FeNH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>) 100 µM, ácido sulfúrico 25 mM, laranja de xilenol 250 µM e sorbitol 100 mM, em volume final de 2 mL (GAY e GEBICKI, 2000). As amostras foram mantidas no escuro por 30 minutos e a absorbância determinada a 560 nm. Brancos para as cores dos reagentes e dos extratos vegetais foram preparados em paralelo e subtraídos da amostra. As concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas amostras foram estimadas com base em curva de calibração preparada com padrões de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## **2.5. ALUMÍNIO E ATIVIDADE FOTOSSINTÉTICA**

### **2.5.1. Determinação de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a***

A condutância estomática ( $g_s$ ), a taxa de transpiração ( $E$ ), a concentração interna de CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ) e a taxa de assimilação líquida de carbono ( $A$ ) foram determinadas em folhas intactas, na parte da manhã (8:30-9:30h), usando analisador de gás no infravermelho (LI-6400, Li-Cor Inc., Lincoln, Nebraska, EUA). Para a estimativa destes parâmetros, cada repetição foi constituída de uma única folha por planta, utilizando uma radiação fotossinteticamente ativa de 800 µmol (fótons) m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, em temperatura e concentração de CO<sub>2</sub> ambiente.

A cinética de indução de fluorescência da clorofila *a* foi acompanhada na mesma folha, paralelamente às medições de trocas gasosas, com o uso de um fluorômetro modulado portátil MINI-PAM (Heinz WALZ, Effeltrich, Alemanha). Após período de adaptação ao escuro por 30 min, os tecidos foliares foram inicialmente expostos a um pulso fraco de luz vermelho-distante ( $0,15 \mu\text{mol (fótons)} \text{ m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) e mediu-se a fluorescência inicial ( $F_0$ ). Seguiu-se a aplicação de um pulso de luz saturante superior a  $3000 \mu\text{mol (fótons)} \text{ m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , durante 0,8 s e mediu-se a fluorescência máxima emitida ( $F_m$ ). Com estes dados, estimou-se a eficiência quântica máxima do PSII  $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ . Após período de exposição das folhas por 30 segundos sob irradiância de aproximadamente  $800 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , foi determinada a fluorescência transiente (steady-state;  $F$ ). A fluorescência máxima das amostras nessa condição luminosa ( $F_m'$ ) foi determinada com nova exposição do tecido vegetal ao pulso de luz saturante. De posse desses parâmetros, foram calculados o  $F_0'$  (fluorescência inicial das plantas adaptadas à luz):  $F_0' = F_0 / (F_v/F_m + F_0/F_m')$  e rendimento quântico efetivo do PSII:  $\Delta F/F_m' = (F_m' - F) / F_m'$ . Foram estimados, ainda, os coeficientes de extinção fotoquímica:  $q_P = (F_m' - F) / (F_m' - F_0')$  e os coeficientes de extinção não fotoquímica:  $q_N = (F_m - F_m') / (F_m - F_0)$  e NPQ =  $(F_m - F_m') / F_m'$  e a taxa de transporte aparente de elétrons:  $\text{ETR} = \Delta F/F_m' \times \text{PAR} \times 0.5 \times 0.84$ .

### 2.5.2. Avaliação do teor de pigmentos fotossintéticos

Amostras de 100 mg de folhas foram trituradas em nitrogênio líquido, após adição de uma pitada de  $\text{CaCO}_3$  e, em seguida, homogeneizadas em 2 mL de acetona 80% (v/v), por 1 min, sob luz verde. A suspensão resultante foi filtrada através de papel de filtro Whatman # 1, sendo o resíduo lavado por três vezes com acetona 80% e o volume final completado em balão volumétrico de 25 mL com o mesmo solvente. As absorvâncias dos extratos foram lidas em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 470, 646,8 e 663,2 nm e os teores de pigmentos fotossintéticos (clorofilas *a* e *b*; e carotenóides) estimados conforme sugerido por LICHTENTHALER (1987).

## **2.6. Avaliação da peroxidação de lipídios**

Amostras de 200 mg de raízes e folhas foram trituradas, separadamente, em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 1% (p/v). Os homogeneizados foram filtrados através de quatro camadas de gaze e centrifugados a 12.000 xg por 15 min. Todas as etapas necessárias ao processo de extração foram conduzidas a 4°C. Alíquotas de 0,5 mL dos sobrenadantes foram adicionadas a 1,5 mL de uma solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (p/v) em TCA 20% (p/v), os tubos de ensaio foram fechados e incubados em banho-maria a 95° C. Após 2 h, a reação foi paralisada transferindo-se os tubos de ensaio para banho de gelo. Posteriormente, foram centrifugados a 9.000 xg por 10 min e a absorbância dos sobrenadantes determinadas a 532 nm. A absorvância inespecífica a 600 nm foi medida e subtraída das amostras. A concentração do complexo aldeído malônico-TBA foi calculada usando o coeficiente de absorvância molar de 155 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (HEATH & PACKER, 1968).

## **2.7. Delineamento experimental**

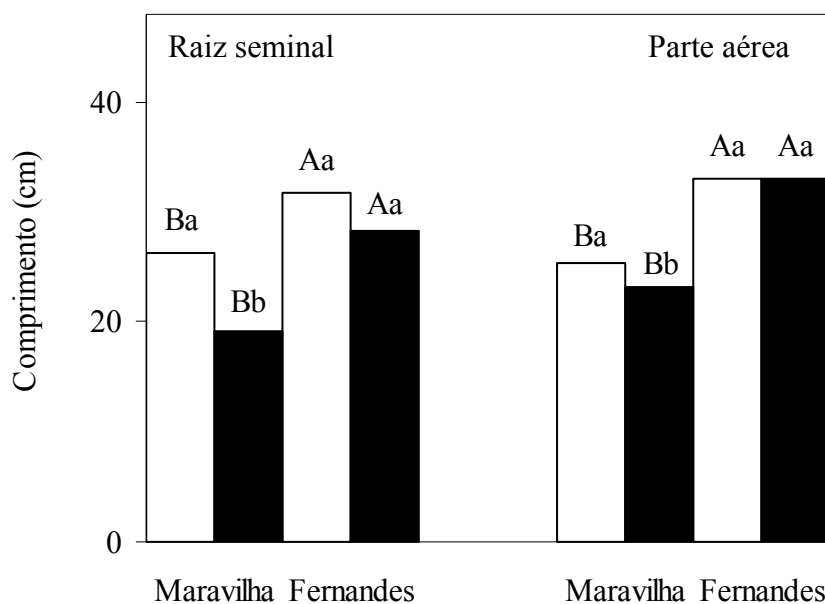
Os tratamentos foram dispostos no delineamento de blocos casualizados em esquema fatorial (2x2): dois cultivares de arroz (Maravilha e Fernandes) e dois níveis de Al (0 e 1 mM), com três repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Crescimento de plantas de arroz

A aplicação de Al à solução nutritiva causou redução de 28 % no comprimento da raiz seminal e de 9 % na parte aérea das plantas, apenas do cultivar Maravilha (Figura 1). No cultivar Fernandes, por outro lado, não foram observados efeitos significativos em nenhuma das partes da planta. Independente da presença de Al, este cultivar apresentou maior crescimento, tanto da parte aérea quanto das raízes, em relação ao cultivar Maravilha (Figura 1). Como o Al causou redução no crescimento do cultivar Maravilha, mas não do cultivar Fernandes, as diferenças entre os cultivares aumentaram na presença deste íon, ficando o comprimento médio das plantas deste cultivar aproximadamente 30 % maior do que no Maravilha.

Com cultivares asiáticos de arroz, MERIGA et al. (2004) também observaram redução mais intensa do crescimento radicular do cultivar sensível enquanto o cultivar tolerante exibiu apenas leve redução. No cultivar sensível, a redução foi de 45 % e 20 % para raiz e parte aérea, respectivamente, ao passo que no tolerante, a redução foi de 13% e 10 %, respectivamente, após 40 horas de exposição a 80  $\mu\text{M}$  de Al. VASCONCELOS et al. (2002) submeteram cultivares brasileiros de arroz a concentrações entre 80 e 320  $\mu\text{M}$  de Al, observando maior inibição do crescimento radicular no cultivar sensível, com efeitos mais intensos na maior concentração utilizada. No cultivar sensível, a redução após 9 e 12 dias de tratamento foi de 67 % e 82 %, respectivamente, enquanto no tolerante a redução foi de 27 % e 29 %, respectivamente. Além disso, estes autores avaliaram diferentes parâmetros indicativos da tolerância ao Al, tanto na parte aérea quanto no sistema radicular, concluindo que os parâmetros morfológicos ligados ao sistema radicular foram os que permitiram reconhecer melhor a tolerância entre cultivares ao Al.

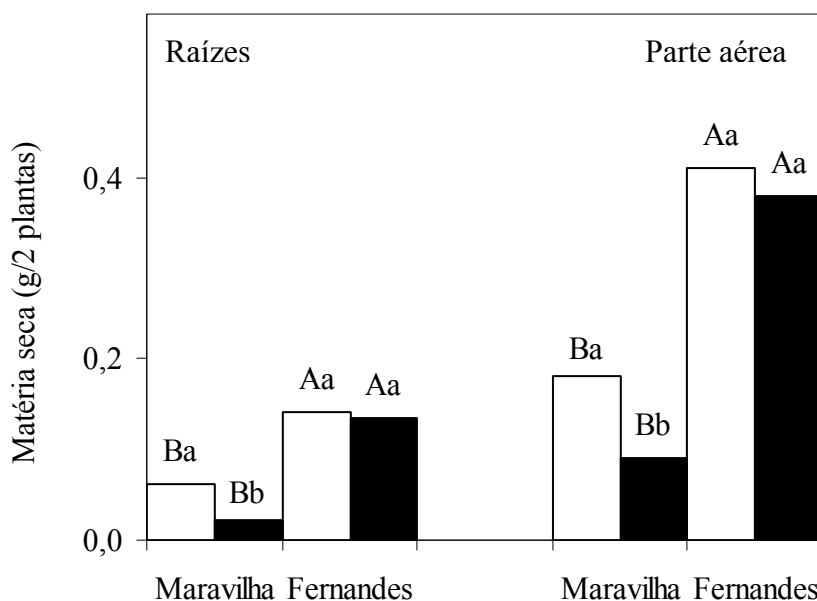


**Figura 1:** Efeito do alumínio sobre o comprimento da raiz seminal e da parte aérea de dois cultivares de arroz, em solução nutritiva. □ 0 mM e ■ 1 mM de Al. Médias seguidas por letras iguais, maiúsculas entre os cultivares e minúsculas entre níveis de Al, não diferem entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

O Al, também, causou redução na produção de massa seca, tanto das raízes quanto da parte aérea, apenas do cultivar Maravilha (Figura 2). Este cultivar sofreu redução de 62 e 50 % na produção de massa seca de raízes e parte aérea, respectivamente. Semelhante ao observado neste estudo, utilizando os mesmos cultivares de arroz, JUSTINO (2004) também encontrou diminuição da matéria seca no cultivar Maravilha, porém, em intensidade menor para a raiz, provavelmente, por ter utilizado apenas 500  $\mu$ M de Al durante 21 dias. Resultados como estes mostram a importância da definição correta de fatores como tempo de tratamento e níveis de Al aplicado na busca de parâmetros de crescimento que possam ser usados na discriminação de cultivares quanto à tolerância a este cátion.

Semelhante ao observado com relação aos efeitos do Al sobre o crescimento em tamanho, não se verificou efeito deste íon sobre a produção de massa seca no cultivar Fernandes (Figura 2). Assim, a diferença na produção de massa seca, superior nas plantas controle do cultivar Fernandes, tornou-se ainda maior na presença de Al. Resultados semelhantes a estes foram observados por MENDONÇA (2001) e JUSTINO (2004) para estes mesmos cultivares de arroz, apesar de terem usado concentrações e tempos de exposição diferentes dos utilizados neste estudo.

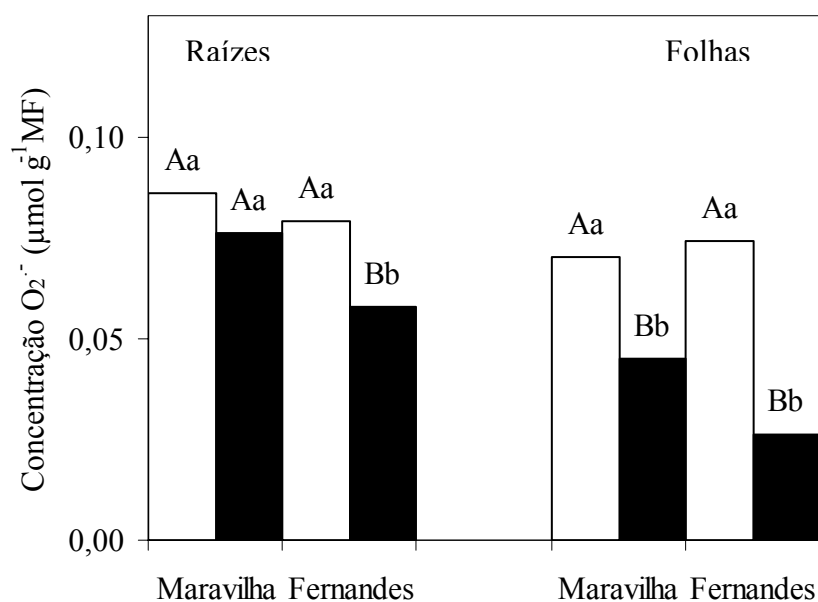
Avaliando a produção de massa fresca em dois cultivares de arroz, BG35 (tolerante) e IR45 (sensível), JAN et al. (2001) encontraram resultados semelhantes aos obtidos neste experimento. Eles encontraram diminuição de 50 % na produção de massa fresca apenas no genótipo sensível exposto por 24 horas ao nível de Al de 600  $\mu$ M. O cultivar tolerante não sofreu qualquer alteração.



**Figura 2:** Efeito do alumínio sobre massa seca das raízes e da parte aérea de dois cultivares de arroz, em solução nutritiva. □ 0 mM e ■ 1 mM de Al. Médias seguidas por letras iguais, maiúsculas entre os cultivares e minúsculas entre níveis de Al, não diferem entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

### 3.2. Teores de ânion superóxido

As plantas controles dos dois cultivares apresentaram em suas raízes teores do ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) estatisticamente iguais (Figura 3). O tratamento das plantas com Al causou redução de cerca de 27 % nos teores de  $O_2^{\bullet-}$  apenas no cultivar Fernandes. Este efeito do Al sobre os teores de  $O_2^{\bullet-}$  não foi significativo nas raízes do cultivar Maravilha. Na parte aérea, também, as plantas controles apresentaram teores de  $O_2^{\bullet-}$  similares, mas o tratamento com Al causou diminuição nos teores deste ânion nos dois cultivares. A redução no teor deste intermediário reativo de oxigênio foi de 65% e de 36% nos cultivares Fernandes e Maravilha, respectivamente.



**Figura 3:** Efeito do alumínio sobre a produção de ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) em raízes e folhas de dois cultivares de arroz em solução nutritiva. □ 0 mM e ■ 1 mM de Al.

Médias seguidas pelas mesmas letras, maiúsculas entre os cultivares e minúsculas entre níveis de Al, não diferem estatisticamente, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Estudos recentes mostram que o Al pode induzir a expressão de genes protetores contra sua toxicidade envolvendo diversas enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD) (RICHARDS et al., 1998; EZAKI et al., 2000). A diminuição nos teores de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, verificada neste estudo, pode ser o resultado do aumento na expressão destes genes para a biossíntese de SOD. Como esta enzima catalisa a dismutação de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e oxigênio molecular, as reduções nos teores de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> observadas após tratamento com Al, sugerem estar ocorrendo aumento na atividade da SOD.

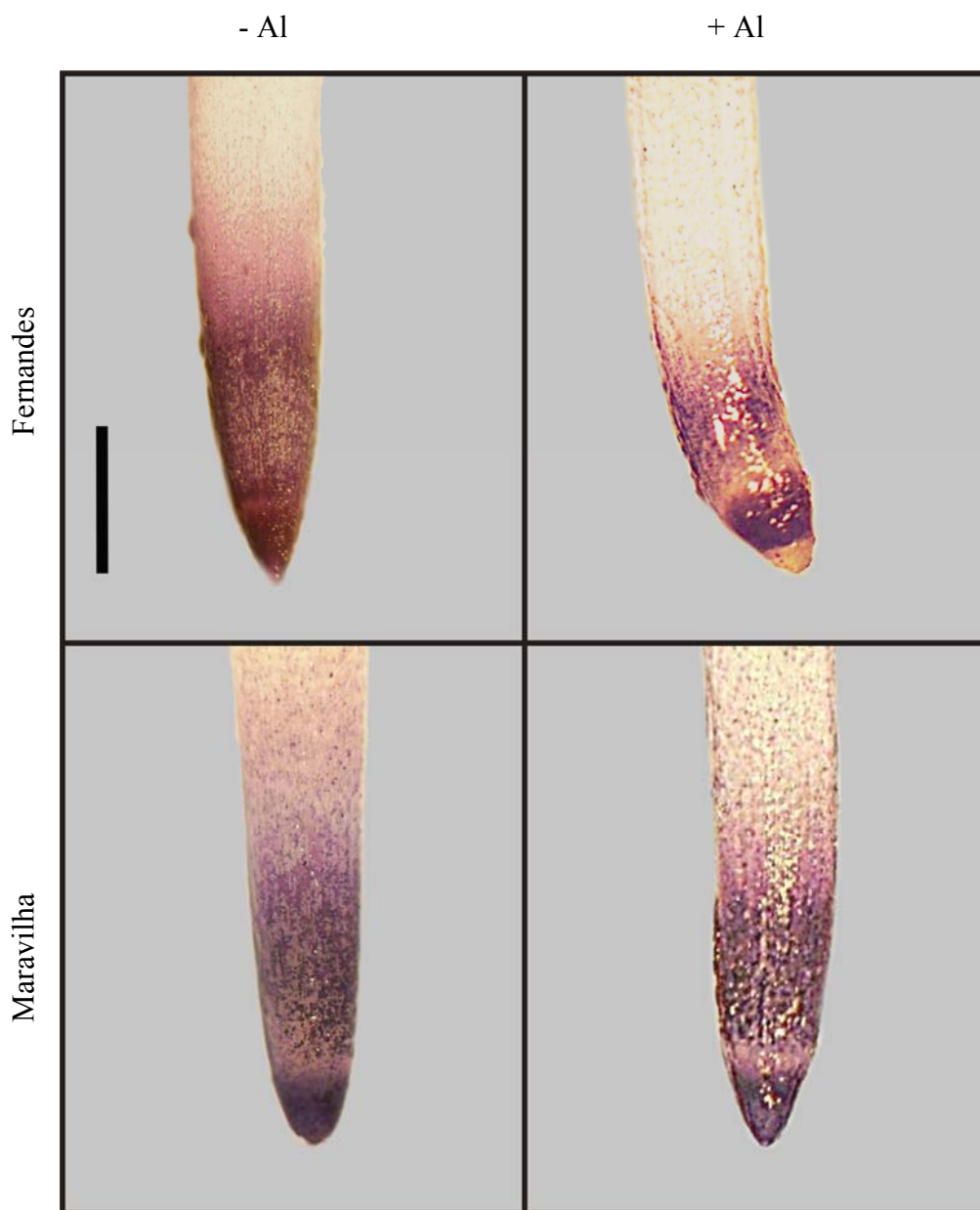
Em raízes de plantas de cevada tratadas com Al, TAMÁS et al. (2004), ao contrário do esperado, encontraram redução da atividade de SOD. O aumento esperado na concentração de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> com a inibição de SOD, no entanto, não foi encontrado. A diminuição nos teores desta espécie reativa, conforme sugestão dos autores, pode ter sido causada pela sua reação com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), formando o radical hidroxílico, na presença de Fe<sup>+2</sup>, via “reação de Haber-Weiss” (CHEN & SCHOPFER, 1999). Em concordância com esta hipótese, MERIGA et al. (2004), trabalhando com cultivares asiáticos de arroz, verificaram aumento nas atividades da SOD e da

peroxidase até 24 horas de exposição ao Al. Depois de 24 h, observaram que as atividades da SOD e da peroxidase permaneciam elevadas no cultivar tolerante, enquanto caíam no cultivar sensível. Como verificaram, também, maior peroxidação de lipídios no cultivar sensível, concluíram que teria sido o radical hidroxílico a espécie reativa responsável pela peroxidação de lipídios. A relação entre causa e efeito, entretanto, é indireta dado à dificuldade de quantificar o radical hidroxílico.

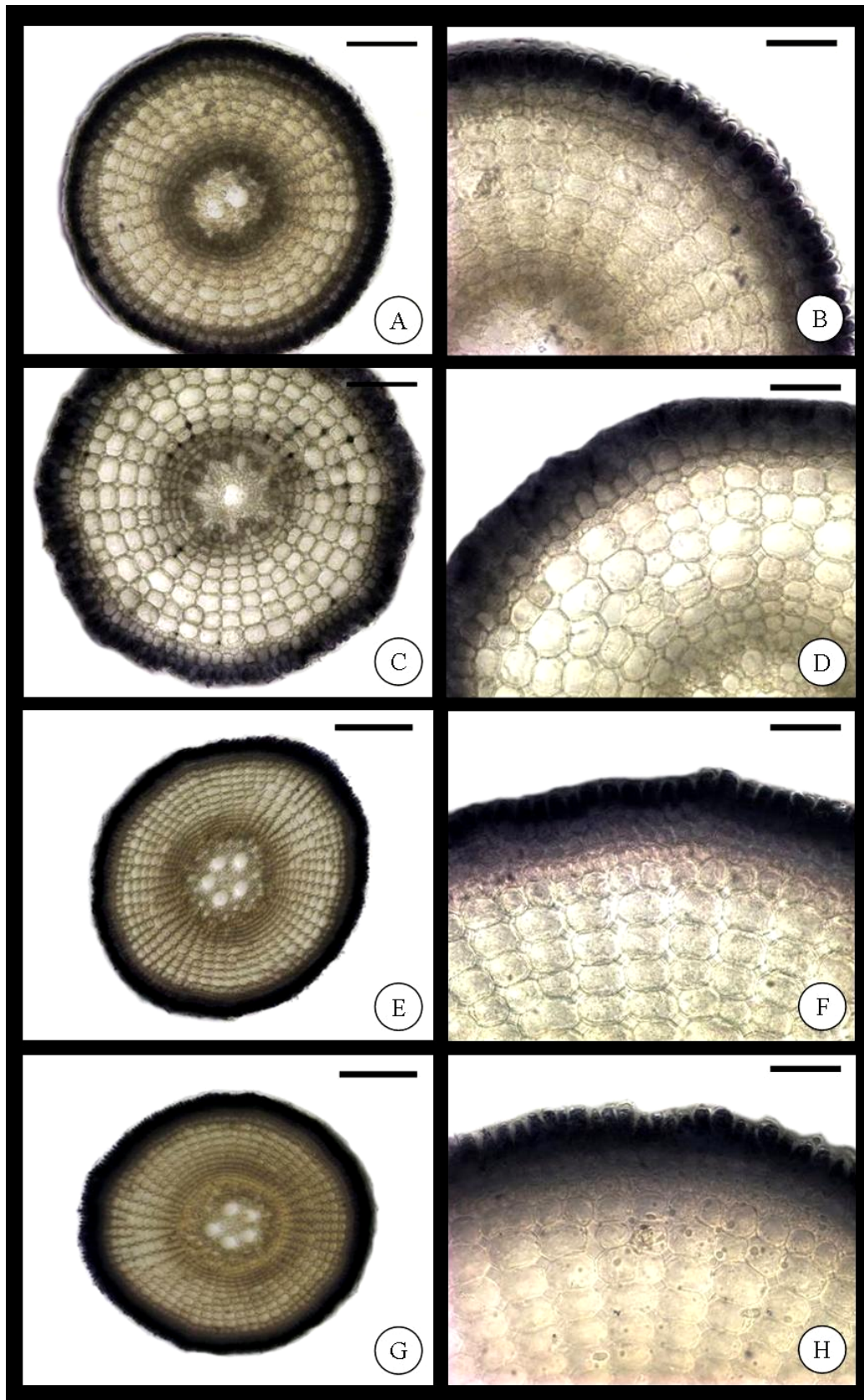
Na parte aérea, a diminuição no teor do  $O_2^{\bullet-}$  em presença de Al foi ainda maior do que nas raízes, provavelmente associado com maior atividade das SOD e, ou pelo consumo deste intermediário pela reação com o  $H_2O_2$  formando radical hidroxílico, pela reação “Haber-Weiss” (CHEN e SCHOPFER, 1999).

### **3.2.1. Avaliação histoquímica da presença de ânion superóxido em ápices radiculares**

Ápices radiculares dos dois cultivares, de aproximadamente 1 cm, corados com azul de p-nitro tetrazolium (NBT), exibiram a presença de formazana, composto azul insolúvel, formado pela reação com  $O_2^{\bullet-}$  (Figura 4). A intensidade da reação foi maior nos ápices sem tratamento com Al, mas, aparentemente, não houve diferença entre cultivares. A formação de formazana, indicadora da presença de  $O_2^{\bullet-}$ , foi detectada na região denominada por KOLLMEIER et al. (2000), de zona de transição distal, entre 1 e 2 mm do ápice da raiz. Embora as raízes das plantas, independente da presença de Al, tenham apresentado o mesmo perfil de localização de  $O_2^{\bullet-}$ , esta espécie reativa foi detectada na mesma região em que o Al se acumula, ou seja, na zona de transição distal (SIVAGURU e HORST, 1998). Os cortes transversais mostram que a produção de ânion superóxido está ocorrendo principalmente nas células da epiderme e, talvez um pouco, nas camadas mais externas de células corticais (Figura 5). JONES et al. (2006), observaram acúmulo de Al na região da epiderme e na camada cortical externa, sem penetrar no córtex interno, em raízes de um cultivar de milho (*Zea mays* L.) sensível ao Al, mesma região em que o  $O_2^{\bullet-}$  foi detectado neste estudo.



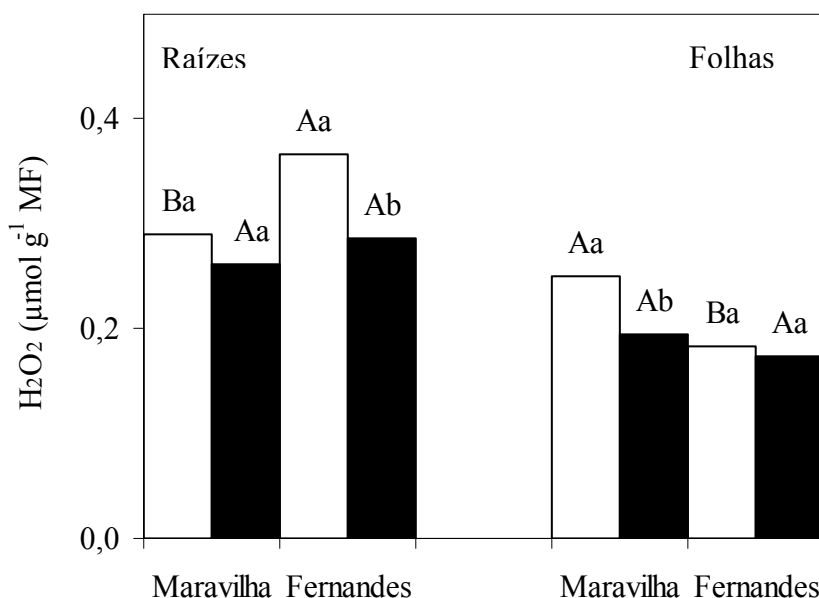
**Figura 4:** Detecção histoquímica do ânion superóxido em ápices radiculares de dois cultivares de arroz tratados com Al 0 mM e 1 mM. Barra: 1 mm.



**Figura 5:** Cortes transversais de ápice radiculares mostrando a produção de ânion superóxido em dois cultivares de arroz tratados com Al. A e B: Maravilha 0 mM; C e D: Maravilha 1 mM; E e F: Fernandes 0 mM; G e H: Fernandes 1 mM. Barras: A e C: 100  $\mu$ m; B, D, F e H: 50  $\mu$ m; E e G: 200  $\mu$ m.

### 3.3. Teores de peróxido de hidrogênio

Os teores de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) nas raízes das plantas controle do cultivar Fernandes foram mais elevados do que no cultivar Maravilha (Figura 6). O tratamento com Al reduziu os teores de peróxido de hidrogênio apenas no cultivar Fernandes, que passou a ter teores desta espécie reativa estatisticamente iguais aos do cultivar Maravilha.



**Figura 6:** Efeito do alumínio sobre a produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em raízes e folhas de dois cultivares de arroz, em solução nutritiva. □ 0 mM e ■ 1 mM de Al.

Médias seguidas pelas mesmas letras, maiúsculas entre os cultivares e minúsculas entre níveis de Al, não diferem estatisticamente, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Na literatura há relatos de que o Al pode causar diminuição no teor de  $H_2O_2$ . No entanto, parece que a diminuição deste tipo de ROIs, depende do tempo de exposição e da concentração deste metal tóxico. Assim, TAMÁS et al. (2004) observaram que o teor de  $H_2O_2$  decresceu com o tempo de exposição ao Al, mas aumentou com a concentração deste íon, em sementes germinadas de cevada (*Hordeum vulgare* L.). Em raízes de abóbora (*Curcubita pepo* L. var. Butternut) o teor de  $H_2O_2$  aumentou com o tempo de exposição a 50  $\mu\text{M}$  de Al até 48h, decrescendo em seguida (DIPIERRO, 2005). Já em tecidos foliares de arroz (*Oryza sativa* L. cv. Taichung Native 1) tratados com Al foi

observada diminuição no teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> proporcional ao aumento do tempo de exposição (KURO e KAO, 2003).

Diminuição no teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, também foi observada em folhas de arroz submetidas a estresse salino (LIN e KAO, 2000), níveis tóxicos de ferro (FANG et al., 2001) e de cádmio (CHIEN et al., 2001) além de estresse hídrico em folhas e raízes de arroz (SHARMA et al., 2005). Provavelmente, a diminuição nos teores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> deve-se ao aumento da atividade de enzimas responsáveis pela eliminação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. CHO e SEO (2005), ao contrário, observaram acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em folhas de *Arabidopsis thaliana* submetidas aos níveis de 0 a 500 µM de cádmio (Cd) durante 21 dias. O acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi proporcional ao aumento na concentração do metal tóxico, principalmente no cultivar sensível. Eles admitem que isto ocorreu em razão da menor atividade da dismutase do superóxido (SOD) e de enzimas envolvidas diretamente na eliminação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tais como, peroxidase (POX), ascorbato peroxidase (APX) e glutatona redutase (GR).

Parece evidente que a produção e acúmulo de espécies reativas de oxigênio, tais como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, depende da atividade de várias enzimas antioxidativas, funcionalmente interrelacionadas, envolvidas na remoção destes ROIs (LEE e LEE, 2000). Provavelmente, os níveis de ROIs estão sob rigorosos controles enzimáticos e não enzimáticos. Assim, quando ocorre aumento transitório dos teores de determinado intermediário reativo de oxigênio, como, por exemplo, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pode ocorrer aumento na atividade de alguma enzima, como a APX e, ou aumento de algum metabólito como ascorbato (DIPIERRO et al., 2005), seguindo-se uma conseqüente diminuição no teor destes ROIs.

A diminuição no teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas raízes do cultivar Fernandes é sugestiva de ter este cultivar um sistema de defesa antioxidativo mais eficiente do que o Maravilha. Provavelmente, o cultivar Fernandes, à semelhança do sugerido por DIPIERRO et al. (2005), apresenta uma APX ou outra enzima antioxidante mais ativa que a similar no cultivar Maravilha. O modo pelo qual isto acontece em cultivares tolerantes, mas não em sensíveis não é ainda conhecido. EZAKI et al. (2000), entretanto, observaram que estresse por Al resulta em aumento na expressão de certos genes que codificam enzimas antioxidantes. No estudo que realizaram, foi verificado que a expressão de mRNA da peroxidase aniônica de tabaco (*NtPox*) e glutatona S-transferase (*parB*) aumentou, resultando no aumento da atividade destas enzimas associadas à remoção de espécies reativas de oxigênio.

Aparentemente, portanto, para ocorrer acúmulo de peróxido de hidrogênio é necessário que o sistema de defesa da planta seja inibido pelo metal tóxico, ou então, seja insuficiente para remover o excesso de intermediários reativos de oxigênio. Corroborando esta idéia, CHO e SHEO (2005) relatam diminuição proporcional na atividade de enzimas antioxidantes e um concomitante aumento nos teores de peróxido de hidrogênio, com o aumento na concentração de cádmio (0 a 500  $\mu\text{M}$ ), em plantas de *Arabidopsis thaliana* expostas por vinte e um dias.

Nas folhas de plantas controles, os teores de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foram maiores no cultivar Maravilha que no cultivar Fernandes (Figura 6). O tratamento com Al causou diminuição significativa na concentração desta espécie reativa apenas no cultivar Maravilha. Mesmo assim, na presença de Al, os teores de peróxido de hidrogênio ficaram estatisticamente iguais nos dois cultivares.

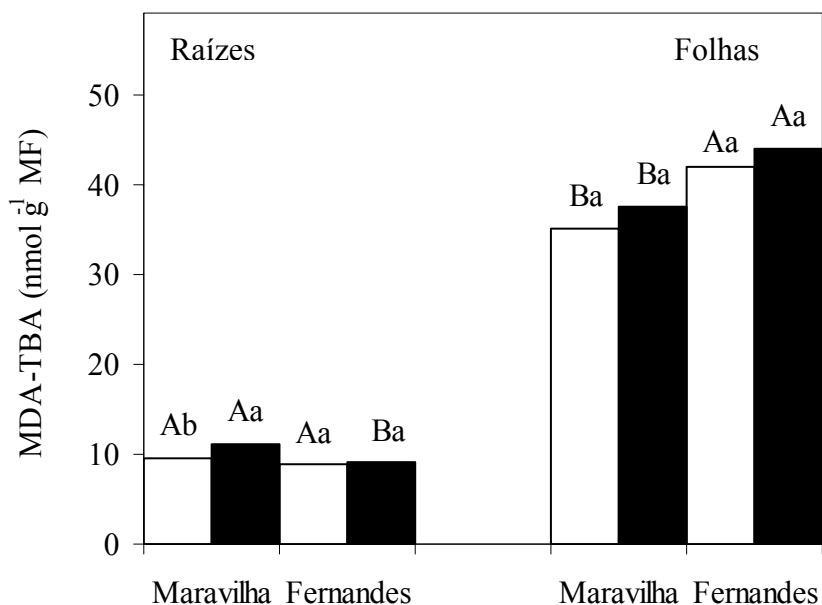
De qualquer forma, a concentração desta espécie reativa nas folhas, independente da presença de Al, foi menor que no sistema radicular (Figura 6). Isto indica que a parte aérea apresenta elevada atividade enzimática, tanto de SOD quanto de peroxidases, responsáveis pela remoção destes ROIS ou, então, o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  estão reagindo via reação do tipo “Haber-Weiss” para produzir radicais hidroxilas.

A primeira hipótese parece pouco provável já que o Al acumula-se preferencialmente nas raízes, sendo pouco translocado para a parte aérea (MOSSOR-PIETRASZEWSKA, 2001). Isto leva a crer que a ativação de genes ligados ao sistema de defesa antioxidativo enzimático induzida por Al provavelmente deve ter sido menor. Além disso, o Al provocou maior redução na produção de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  na parte aérea do que nas raízes (Figura 3), o que teoricamente deveria ter resultado em aumento no teor de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Como não ocorreu acúmulo deste intermediário reativo fica fortificada, ainda mais, a segunda hipótese. Corroborando esta idéia, trabalho de KUO & KAO (2003) com folhas de cultivares asiáticos de arroz (*Oryza sativa* L. cv. Taichung Native 1) mostrou que o tratamento com Al resultava em diminuição no teor de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , inibição da atividade da SOD, aumento das atividades de POX e APX e da peroxidação de lipídios. Para eles a diminuição no teor de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e o aumento na peroxidação de lipídios são indicativos da ocorrência de reações tipo “Haber-Weiss”. No entanto, como verificaram aumento na atividade de enzimas eliminadoras de  $\text{H}_2\text{O}_2$  salientam que a redução nos teores desta espécie reativa pela ação de enzimas peroxidativas não pode ser descartada.

### 3.4. Peroxidação de lipídios

O grau de peroxidação de lipídios nas raízes das plantas controle foi similar nos dois cultivares (Figura 7). O tratamento das plantas com Al aumentou a peroxidação de lipídios em 17 % no cultivar Maravilha, enquanto no cultivar Fernandes não se observou efeito significativo. Sob tratamento com Al, o cultivar Maravilha apresentou uma peroxidação de lipídios 23 % maior que o cultivar Fernandes.

Com cultivares asiáticos de arroz, MERIGA et al. (2004) encontraram aumentos de 82 e de 43% na peroxidação de lipídios de raízes dos cultivares sensível e tolerante, respectivamente, após 56 h de tratamento com Al 80  $\mu$ M. Já, PEIXOTO et al. (2001) observaram aumentos de 200 e de 126% na peroxidação de lipídios de cultivares sensível e tolerante de sorgo. Estes resultados evidenciam ser o arroz uma das culturas de valor econômico mais tolerantes ao Al (MA et al., 2002) e serem os cultivares de arroz nacionais, utilizados nesta pesquisa, muito mais tolerantes ao Al que asiáticos utilizados por MERIGA et al. (2004).



**Figura 7:** Efeito do alumínio sobre a peroxidação de lipídios em raízes e folhas de dois cultivares de arroz em solução nutritiva. □ 0 mM e ■ 1 mM de Al. Médias seguidas pelas mesmas letras, maiúsculas entre os cultivares e minúsculas entre níveis de Al, não diferem estatisticamente, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

A maior peroxidação de lipídios nas raízes do cultivar Maravilha na presença de Al já era esperada uma vez que, embora os teores de  $H_2O_2$  tenham sido similares nos dois cultivares (Figura 6), o teor de  $O_2^{\bullet-}$  foi maior (Figura 3). Embora uma redução nos teores de  $H_2O_2$  não tenha sido estatisticamente confirmada, aparentemente o excesso de  $O_2^{\bullet-}$  estaria forçando o deslocamento da reação de “Haber-Weiss” no sentido de produzir mais radicais hidroxílicos neste cultivar. Adicionalmente, o cultivar Fernandes, considerado tolerante ao Al, parece possuir enzimas antioxidantes mais ativas e eficientes na eliminação de ROIs como acontece com outros cultivares de arroz tolerantes ao Al, especialmente em tratamentos mais longa duração (MERIGA et al., 2004).

Em folhas, o Al não alterou a peroxidação de lipídios em nenhum dos cultivares, mas a produção MDA-TBA foi sempre maior no cultivar Fernandes, independente da presença de Al (Figura 6). Embora o tratamento com Al não tenha causado aumento na peroxidação de lipídios na parte aérea, o acúmulo de malonaldeído foi maior que nas raízes. Como os teores de  $O_2^{\bullet-}$  (Figura 3) e de  $H_2O_2$  (Figura 6) foram sempre menores na parte aérea isto pode significar menor atividade enzimática antioxidante nesta região, ou reação entre eles para formar radicais hidroxílicos, os verdadeiros agentes causais da peroxidação.

A menor intensidade de peroxidação de lipídios observada em raízes e folhas dos dois cultivares estudados, comparativamente à encontrada em outros materiais vegetais (PEIXOTO et al., 2001; MERIGA et al., 2004), é indicativo da maior tolerância do arroz ao Al. Dentre os cultivares estudados, apenas no Maravilha se observou aumento na peroxidação de lipídios após tratamento com Al, o que sugere estar o cultivar Fernandes suportando com maior eficiência o estresse causado pelo Al.

## **4. ATIVIDADE FOTOSSINTÉTICA DE PLANTAS EXPOSTAS AO Al**

### **4.1. Teores de pigmentos fotossintéticos**

Na ausência de Al os dois cultivares não apresentaram diferenças significativas quanto aos teores de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total, razão clorofila *a/b* e carotenóides (Figura 7). O tratamento das plantas com Al resultou em aumento nos teores de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofilas totais e carotenóides apenas no cultivar

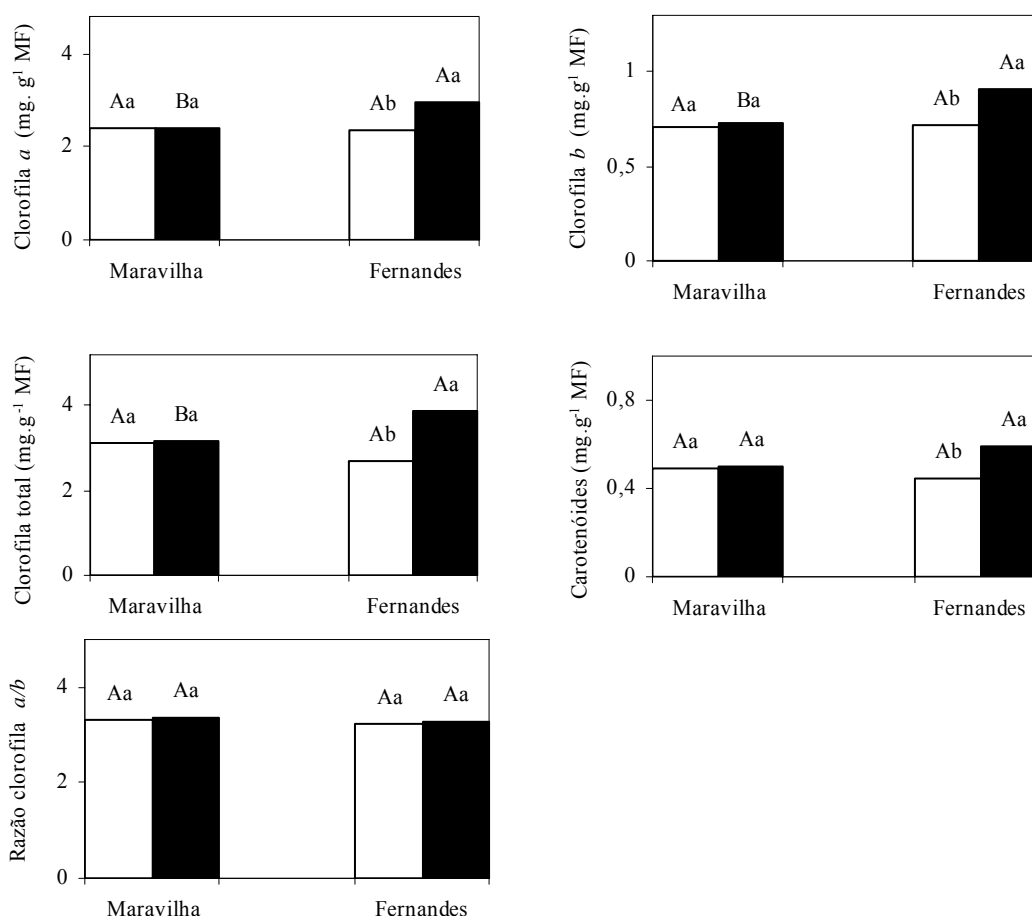
Fernandes. A razão clorofila *a/b* não foi alterada significativamente em nenhum dos cultivares. Na presença de Al, portanto, o cultivar Fernandes apresentou teores mais elevados de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total e carotenóides que o cultivar Maravilha.

A redução nos teores de pigmentos fotossintéticos tem sido observada em diversos tipos de estresse, como o salino (LIMA et al., 2004) e efeito de níveis tóxicos de metais pesados como cádmio, cobre e chumbo (BURZYNSKI et al., 2004) e manganês (Mn) (LIDON et al., 2004). Tratamento com Al, também, promoveu redução nos teores de pigmentos fotossintéticos em milho (*Zea mays* cv. XL-72.3) (LIDON et al., 1999), soja (*Glycine max* Merrill. cv. ZP S 015) (MILIVOJEVIC et al., 2000) além de cultivares tolerante e sensíveis de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) (OHKI, 1986; PEIXOTO et al., 2002). Isto, contudo, nem sempre acontece. Em cultivares de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. “Mountain Pride” e “Floramerica”), o teor de clorofilas não foi afetado pelo Al (SIMON et al., 1994). Por outro lado, semelhante ao verificado neste estudo, LIDON et al. (1997) encontraram aumento na concentração de clorofila *a*, clorofila *b* e diminuição na concentração de caroteno e zeaxantina em plantas de milho (*Zea mays*) submetidas a 81 g m<sup>-3</sup> de Al por 20 dias.

O aumento e a manutenção de teores mais elevados de pigmentos fotossintéticos no cultivar Fernandes podem estar associados com sua maior capacidade em absorver e utilizar diferentes formas de nitrogênio, elemento este diretamente relacionado com a síntese de pigmentos fotossintéticos (LOPEZ-CANTARERO et al., 1994). Corroborando esta idéia, JUSTINO (2004) trabalhando com os mesmos cultivares de arroz, mostrou que o Al reduziu não apenas a absorção e redução do nitrato no cultivar Maravilha, mas, também, aumentou o teor de N-total na parte aérea do cultivar Fernandes, o que pode lhe ter permitido manter teores mais elevados de pigmentos fotossintéticos.

A biossíntese de clorofilas e outros pigmentos cloroplastídicos, entretanto, é influenciada não apenas por N, mas também por diversos elementos minerais (CALBO, 1980), que têm os seus teores modificados por níveis tóxicos de Al (LIDON et al., 1999). LIDON et al. (1999) observaram redução na translocação de nitrogênio, fósforo e ferro para a parte aérea em plantas de milho tratadas com Al, onde são requeridos para a biossíntese de pigmentos (LIDON et al., 1999). Corroborando esta idéia, MENDONÇA et al. (2003), estudando o efeito do Al nos mesmos cultivares de arroz utilizados neste estudo, verificaram eficiência mais elevada na utilização de

macronutrientes pelo cultivar Fernandes, o que pode ter permitido manter níveis mais elevados dos pigmentos cloroplásticos.

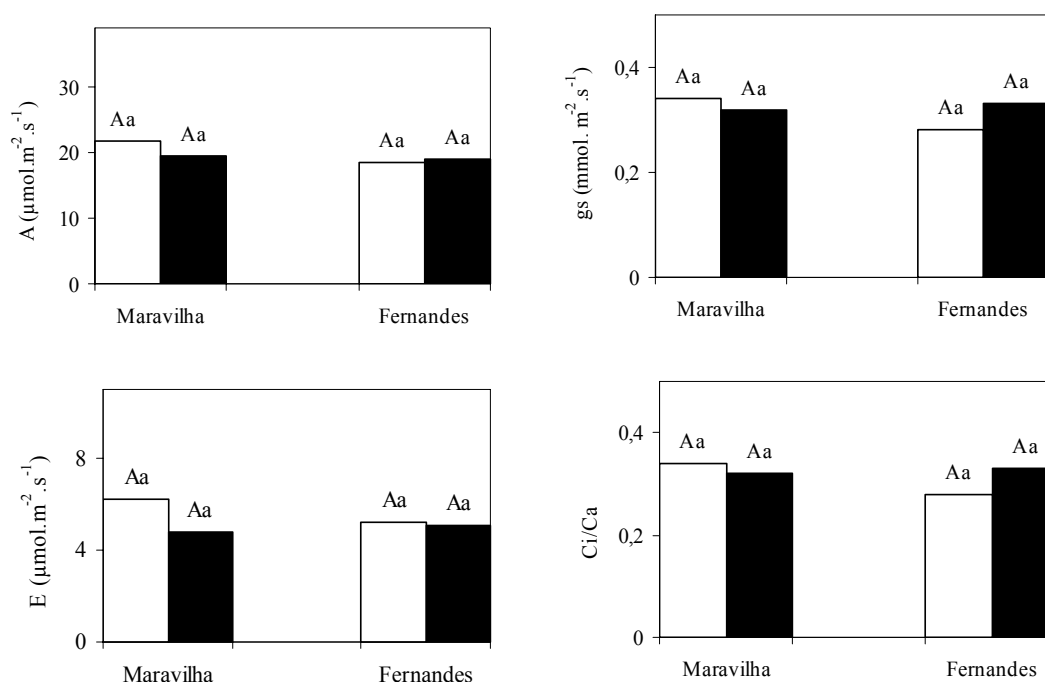


**Figura 7:** Efeito do Al sobre os teores de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total, razão clorofila *a/b* e carotenóides em dois cultivares de arroz, em solução nutritiva. □ 0 mM e ■ 1 mM de Al. Médias seguidas pelas mesmas letras, maiúsculas entre os cultivares e minúsculas entre níveis de Al, não diferem estatisticamente, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

#### 4.2. Trocas gasosas e parâmetros de fluorescência da clorofila

Tanto na ausência como na presença de Al não foram observadas diferenças significativas entre os cultivares e, ou tratamentos quanto a todas as medidas de trocas gasosas: taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> (*A*), condutância estomática (*g<sub>s</sub>*), transpiração (*E*) e a razão *C<sub>i</sub>/C<sub>a</sub>* (Figura 8). O experimento foi repetido duas vezes, mas mesmo assim foram verificadas apenas algumas tendências de variação que não se concretizaram em efeitos significativos. Outros trabalhos mostram o Al diminuindo as trocas gasosas em

tomate (SIMON et al., 1994), café (KONRAD et al., 2005), sorgo e trigo (OHKI, 1986), causando redução na taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> (A) e na condutância estomática (g<sub>s</sub>). A diminuição da taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> pode resultar em acúmulo de energia de fótons. Como apenas pequena parcela desta energia é usada no transporte de elétrons, parte da energia no centro de reação do PSII pode provocar a formação de espécies reativas de oxigênio, danificando assim o aparelho fotossintético (DEMMIG-ADAMS e ADAMS, 1992; CHEN et al., 2004; CHEN et al., 2005).



**Figura 8:** Efeito do alumínio sobre a taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> (A), a condutância estomática (g<sub>s</sub>), a transpiração (E) e a razão Ci/Ca em dois cultivares de arroz, em solução nutritiva. □ 0 mM e ■ 1 mM de Al. Médias seguidas pelas mesmas letras, maiúsculas entre os cultivares e minúsculas entre níveis de Al, não diferem estatisticamente, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Além de o arroz ser considerado um dos cereais mais tolerantes ao Al (MA et al., 2002), os cultivares utilizados neste experimento mostraram tolerância bem maior que outros cultivares da mesma espécie, como por exemplo, os cultivares asiáticos utilizados por MERIGA et al. (2004). Isto pode justificar, pelo menos em parte, o fato de o Al não ter afetado os parâmetros de trocas gasosas avaliados, o que pode estar indicando que a intensidade do estresse não foi suficientemente elevada para modificar estes parâmetros. Parte desta tolerância manifestada pelos cultivares, em termos de trocas gasosas e fluorescência da clorofila, pode estar correlacionada com a capacidade

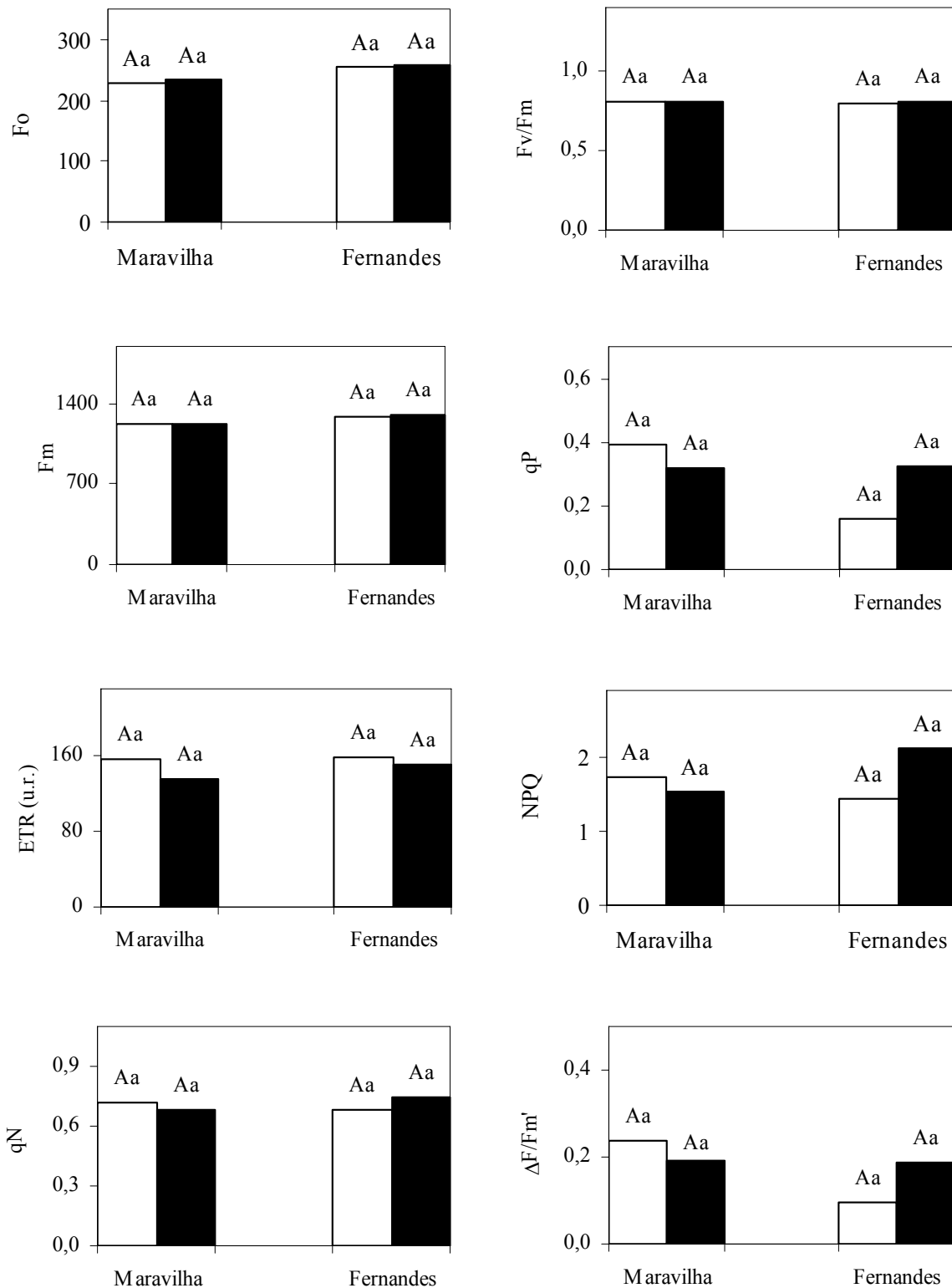
de eles manterem e, no caso do cultivar Fernandes, até aumentar os teores de pigmentos fotossintéticos (Figura 7). Aparentemente, com esta capacidade, puderam manter em funcionamento o aparelho fotossintético e, em consequência, as trocas gasosas.

De modo semelhante ao observado para as trocas gasosas, os cultivares não diferiram entre si e o Al não modificou nenhum dos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* (Figura 9). A relação  $F_v/F_m$  (rendimento quântico máximo do PSII) e  $F_o$  (fluorescência inicial) são indicativos de alterações no aparelho fotossintético, de modo que, o aumento de  $F_o$  associado com diminuição da relação  $F_v/F_m$  indica inativação do PSII e, portanto, da atividade fotoquímica (BAKER & ROSENQVST, 2004). Assim, portanto, dentro das condições impostas nos tratamentos do presente experimento, parece não ter havido efeito do Al sobre a relação  $F_v/F_m$  e  $F_o$ . Por outro lado, a relação  $F_v/F_m$  encontrada neste estudo apresentou valores em torno de 0,8, que indicam elevada atividade do PSII, independente da presença de Al.

O complexo coletor de luz do fotossistema II (PSII), portanto, parece não ter sofrido danos causados pelo estresse do Al e, ou de intermediários reativos de oxigênio produzidos após tratamento com Al. LIDON et al. (1999), estudando o efeito de quatro doses de Al sobre os parâmetros de fluorescência  $F_o$  e  $F_v/F_m$ , em milho (*Zea mays* cv. XL-72.3), também, não detectaram diferença estatística significativa. Eles, porém, constataram peroxidação de lipídios associada com inibição da “reação de Mehler” e, em consequência, aumento de radicais hidroxílicos, provavelmente, responsáveis pela peroxidação de lipídios. No presente experimento não se observou aumento na peroxidação de lipídios na parte aérea pelo tratamento com Al, indicativo de não ter havido aumento da produção de ROIs que viesse a modificar os parâmetros de fluorescência da clorofila *a*.

Além de o Al não ter afetado os parâmetros de fluorescência, não modificou a extinção fotoquímica ( $q_P$ ) e não fotoquímica (NPQ e  $q_N$ ), o rendimento quântico efetivo do PS II ( $\Delta F/F_m'$ ), nem no transporte de elétrons (ETR). Estes fatores são bastante interligados de modo que a alteração em um corresponde à variação no outro.

Diminuição em  $q_P$  é acompanhada por aumento de  $q_N$ , variando de 0 a 1 (KRUPA et al., 1993). Neste estudo, independente da presença de Al, os valores do coeficiente de extinção fotoquímica ( $q_P$ ) foram menores do que de  $q_N$ , indicando que os mecanismos dissipadores de energia, mesmo na ausência de Al, parecem atuar eficientemente.



**Figura 9:** Efeito do alumínio sobre a fluorescência da clorofila *a*: Fo (fluorescência inicial), Fm (fluorescência máxima), Fv/Fm (rendimento quântico máximo do PSII), qP (coeficiente de extinção fotoquímica), qN e NPQ (coeficiente de extinção não fotoquímica), ETR (taxa de transporte aparente de elétrons) e  $\Delta F/Fm'$  (rendimento quântico efetivo do PSII), em dois cultivares de arroz, em solução nutritiva. □ 0 mM e ■ 1 mM de Al.

Médias seguidas pelas mesmas letras, maiúsculas entre os cultivares e minúsculas entre níveis de Al, não diferem estatisticamente, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

O Al não provocou alteração no transporte aparente de elétrons (ETR) nem na eficiência quântica efetiva ( $\Delta F/F_m'$ ), resultados estes coerentes com os obtidos para trocas gasosas uma vez que não houve alteração na condutância estomática (gs) e, principalmente, na taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> (A), indicando o bom funcionamento do processo fotossintético. O transporte aparente de elétrons (ETR) e a eficiência quântica efetiva ( $\Delta F/F_m'$ ), de modo geral, indicam a quantidade de elétrons transportados e utilizados para formar poder redutor na forma de ATP e NADPH, estando, portanto, diretamente relacionados com o consumo destas formas reduzidas na etapa de carboxilação da fotossíntese (KONRAD et al., 2005). Caso não haja consumo destas espécies redutoras, o transporte de elétrons é prejudicado. Isto foi observado por KONRAD et al. (2005) em café (*Coffea arabica*), em que o Al causou redução em ETR,  $\Delta F/F_m'$ , justificando este fato com o menor consumo de poder redutor pela fase de carboxilação da fotossíntese, já que também houve diminuição na taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> (A), com conseqüente queda no transporte de elétrons.

Como o Al não modificou a extinção não fotoquímica (NPQ), a ação deste mecanismo protetor na dissipação do excesso de energia provavelmente desempenhou menor importância em comparação ao ciclo água-água (ASADA, 1999). Este ciclo consiste em uma série de reações envolvendo diferentes enzimas antioxidativas, em que o oxigênio atmosférico é reduzido a água, consumindo O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no PSI, utilizando os elétrons originados da fotooxidação da água no PSII (ASADA, 1999). Desta forma, O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seriam consumidos evitando danos ao aparelho fotossintético e ao mesmo tempo, dissipando o excesso de energia produzido. CHEN et al. (2005) salienta que as atividades de enzimas envolvidas no ciclo água-água tais como SOD, APX, GR, monoaldeidroascorbato redutase (MDHAR) e dehidroascorbato redutase (DHAR) e as concentrações dos metabólitos ascorbato (AA) e glutathiona reduzida (GSH) podem aumentar na parte aérea de plantas tratadas com Al, amenizando os danos fotooxidativos.

Como o Al não afetou os parâmetros de fluorescência, as trocas gasosas e nem os teores de pigmentos fotossintéticos é possível que enzimas do ciclo água-água tenham contribuído para a liberação do excesso de energia. Se isto for comprovado ser verdade, estas enzimas teriam importante papel na tolerância ao Al e ao estresse oxidativo induzido, principalmente em cultivares tolerantes como o Fernandes.

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

Neste trabalho, avaliou-se a produção de intermediários reativos de oxigênio em plantas de dois cultivares de arroz, Fernandes (CNA-1158) e Maravilha (CNA-6843-1), na presença de alumínio.

O crescimento do cultivar Fernandes não foi modificado pelo Al, enquanto o do cultivar Maravilha sofreu redução desta variável tanto nas raízes quanto na parte aérea. As plantas controle dos dois cultivares apresentaram os mesmos teores de  $O_2^{\bullet-}$  nas duas partes das plantas. O tratamento com Al provocou redução no teor de  $O_2^{\bullet-}$  nas raízes apenas no cultivar Fernandes, enquanto nas folhas a redução ocorreu nos dois cultivares, mas com maior intensidade no cultivar Fernandes. A presença de  $O_2^{\bullet-}$  foi demonstrada histoquimicamente nos ápices radiculares dos dois cultivares, independente do tratamento com alumínio. O acúmulo desta espécie reativa ocorreu, principalmente, nas células epidérmicas e corticais mais externas. O teor de  $H_2O_2$  nas raízes das plantas controle do cultivar Fernandes foi mais elevado que no cultivar Maravilha. Após exposição ao Al, observou-se redução no teor desta espécie reativa apenas no cultivar Fernandes, que passou a ter a mesma concentração do cultivar Maravilha. Nas folhas, o tratamento com Al causou redução no teor de  $H_2O_2$  apenas no cultivar Maravilha, que passou a ter o mesmo teor do cultivar Fernandes. A peroxidação de lipídios nas raízes aumentou com o tratamento com Al apenas no cultivar Maravilha, passando a ser significativamente maior que no cultivar Fernandes. Nas folhas, o tratamento com Al não teve efeito, mas o cultivar Fernandes apresentou maior peroxidação de lipídios que o cultivar Maravilha. Os teores de clorofila *a*, *b*, clorofila total e carotenóides aumentaram no cultivar Fernandes, mas não se modificaram no cultivar Maravilha após exposição das plantas ao alumínio. Apesar disso, os parâmetros de trocas gasosas e de fluorescência da clorofila *a* não foram modificados pelo tratamento com Al em nenhum dos cultivares. Na presença de Al, o cultivar Fernandes apresentou menores teores de superóxido e de peróxido de hidrogênio, que explicam, pelo menos em parte, a menor peroxidação dos lipídios de suas membranas e, conseqüentemente seu maior crescimento.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review Plant Biology**, 55: 373-399. 2004.
- ARORA, A.; SAIRAM, R.K.; SRIVASTAVA, G.C. Oxidative stress and antioxidative system in plants. **Current Science**, 82:1227-1238. 2002.
- ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review Plant Physiology and Molecular Biology**, 50: 601-639, 1999.
- BAKER, N. R.; ROSENQVST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, 55: 1607-1621, 2004.
- BECANA, M.; MORAN, J. F.; ITURBE-ORMAETXE, I. Iron-dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: toxicity and antioxidant protection. **Plant and Soil**, 201: 137-147, 1998.
- BOSCOLO, P. R.S.; MENOSSI, M.; JORGE, R. A. Aluminum induced oxidative stress in maize. **Phytochemistry**, 62: 181-189, 2003.
- BOVERIS. **Methods in Enzymology**, 105:429-435. 1984.
- BURZYNSKI, M.; KLOBUS, G. Changes of photosynthetic parameters in cucumber leaves under Cu, Cd, and Pb stress. **Photosynthetica**, 42: 505-510, 2004.
- CAKMAK, I.; HORST, W. J. Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, 83: 463-468, 1991.
- CALBO, A.G.; CAMBRAIA, J. Efeito do alumínio sobre a composição mineral de dois cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench). **Revista Ceres**, 27:369-378. 1980.
- CAMP, R. G. L. op den; PRZYBYLA, D.; OCHSENBEIN, C.; LALOI, C.; KIM, C.; CHEN, H.X.; GAO, H.Y.; AN, S. Z.; LI, W. J. Dissipation of excess energy in Mehler-peroxidase reaction in *Rumex* leaves during salt shock. **Photosynthetica**, 42: 117-122, 2004.
- CHEN, S.-X.; CHOPFER, P. Hydroxyl-radical production in physiological reactions: a novel function of peroxidase. **European Journal Biochemistry**, 260:726-735. 1999.

- CHEN, H.-X.; GAO, H.-Y.; AN, S. -Z.; LI, W. – J. Dissipation of excess energy in Mehler-peroxidase reaction in *Rumex* leaves during salt shock. **Photosynthetica**, 42: 117-122, 2004.
- CHEN, L.-S. ; QI, Y-P. ; LIU, X-H. Effects of aluminum on light energy utilization and photoprotective systems in citrus leaves. **Annals of Botany**, 96: 35 – 41, 2005.
- CHIEN, H.-F.; WANG, J-W.; LIN, C. C.; KAO, C. H. Cadmium toxicity of rice leaves is mediated through lipid peroxidation. **Plant Growth Regulation**, 33: 205-213, 2001.
- CHO, U.-H.; SEO, N.-H. Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. **Plant Science**, 168: 113-120, 2005.
- DARKÓ, E.; AMBRUS, H.; STEFANOVITS-BÁNYAI, E.; FODOR, J.; BAKOS, F.; BARNABÁS, B. Aluminum toxicity, Al tolerance and oxidative stress in Al-sensitive wheat genotype and in Al-tolerant lines developed by in vitro microspore selection. **Plant Science**, 166: 583-591, 2004.
- DELHAIZE, E.; CRAIG, S.; BEATON, C. D.; BENNET R. J.; JAGADISH, V. C.; RANDALL, P. J. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L) I. Uptake and distribution of aluminum in root apices. **Plant Physiology**, 103:685-693. 1993.
- DEMMIG-ADAMS, B.; ADAMS, W. W. III: Photoprotection and other response of plants to high light stress. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, 43: 599-626, 1992.
- DIPIERRO, N.; MONDELLI, D.; PACIOLLA, C.; BRUNETTI, G.; DIPIERRO, S. Changes in the ascorbate system in the response of pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) roots to aluminum stress. **Journal of Plant Physiology**, 162: 529-536, 2005.
- 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 Physiology**, 122: 657-665, 2000.
- FAGERIA, N.K., BALIGAR, V.C., WRIGHT, R. J. The effects of aluminum on growth and uptake of Al and P by rice. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 24: 677-682. 1989.
- FANG, W.-C., WANG, J.-W.; LIN, C. C.; KAO, C. H. Iron induction of lipid peroxidation and effects on antioxidative enzyme activities in rice leaves. **Plant Growth Regulation**, 35: 75-80, 2001.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: [http://www.fao.org/rice2004/index\\_en.htm](http://www.fao.org/rice2004/index_en.htm). Acesso: 15 de janeiro de 2007.
- FRAHRY, G.; SCHOPFER, P. NADH-stimulated, cyanide-resistant superoxide production in maize coleoptiles analyzed with a tetrazolium-based assay. **Planta**, 212: 175-183, 2000.

- 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.
- GUTTERIDGE, J. M. C.; QUINLAN, G. J.; CLARK, I.; MATTICK, R. Aluminum salts accelerate peroxidation of membrane lipids stimulated by iron salts. **Biochemistry Biophysical Acta**, 835: 441-447, 1985.
- HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archieve Biochemistry and Biophysics**, 125: 189-198, 1968.
- IZAWA, T.; SHIMAMOTO, K. Becoming a model plant: the importance of rice to plant science. **Trends in plant Science**, 1: 95-99, 1996.
- JAN, F.; PETERSON, S. Effects of low Al levels on growth and nutrient relations in 3 rice cultivars with different tolerance to Al. **Journal of Plant Nutrition**, 16: 359-372, 1993.
- JAN, F.; YAMASHITA, K.; MATSUMOTO, H.; MAEDA, M. Protein and peroxidase changes in various root-cell fraction of two upland rice cultivars differing in Al tolerance. **Environmental Experimental Botany**, 46: 141-146, 2001.
- JONES, D. L.; BLANCAFLOR, E. B.; KOCHIAN, L. V.; GILROY, S. Spatial coordination of aluminum uptake, production of reactive oxygen species, callose production and wall rigidification in maize roots. **Plant, Cell and Environment**, 29: 1309-1318, 2006.
- JUSTINO, G. C. **Efeito do alumínio sobre a absorção e a redução de nitrato em dois cultivares de arroz**. Viçosa, MG: UFV. 2004. 34 p. Tese (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, 2004.
- KOCHIAN, L. V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, 46:237-260, 1995.
- KOCHIAN, L. V.; HOEKENGA, O. A.; PIÑEROS, M. A. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, 55: 459-493, 2004.
- KOLLMEIER, M.; FELLE, H. H.; HORST, W. J. Genotypical differences in aluminum resistance of maize are expressed in the distal part of the transition zone. Is reduced basipetal auxina flow involved in inhibition of root elongation by aluminum? **Plant Physiology**, 122: 945-956, 2000.
- KONRAD, M. L.; SILVA, J. A. B.; FURLANI, P. R.; MACHADO, E. C. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila em seis cultivares de cafeeiro sob estresse de alumínio. **Bragantia**, 64: 339-347, 2005.
- KRUPTA, Z.; OQUIST, N. G.; HUNER, N. The influence of cadmium on primary photosystem II photochemistry in bean as revealed by chlorophyll *a* fluorescence – a preliminary study. **Acta Physiologia Plantarum**, 14: 71-76, 1992.

- KUO, M.C.; KAO, C.H. Aluminum effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. **Biologia Plantarum**, 46:149-152. 2003.
- LEE, D. H.; LEE, C. B. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. **Plant Science**, 159: 75-85, 2000.
- LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, 148:350-382. 1987.
- LIDON, F. C.; BARREIRO, M. G.; RAMALHO, J. C. Manganese accumulation in rice: implications for photosynthetic functioning. **Journal of Plant Physiology**, 161: 1235-1244, 2004.
- LIDON, F. C.; BARREIRO, M. G.; RAMALHO, J. C.; LAURIANO, J. A. Effects of aluminum toxicity on nutrient accumulation in maize shoots: implications on photosynthesis. **Journal of Plant Nutrition**, 22: 397-416, 1999.
- LIDON, F. C.; RAMALHO, J. C.; BARREIRO, M. G.; LAURIANO, J. A. Modulation of photosystem 2 reactions mediated by aluminum toxicity in *Zea mays*. **Photosynthetica**, 34: 151-156, 1997.
- LIMA, M. G. S.; LOPES, N. F.; BACARIN, M. A.; MENDES, C. R. Efeito do estresse salino sobre a concentração de pigmentos e prolina em folhas de arroz. **Bragantia**, 63: 335-340, 2004.
- LIN, C. C.; KAO, C. H. Effect of NaCl stress on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> metabolism in rice leaves. **Plant Growth Regulation**, 30: 151-155, 2000.
- LISKAY, A.; ZALM, E.; SCHOPFER, P. Production of reactive oxygen intermediates (O<sub>2</sub>·-, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and ·OH) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. **Plant Physiology**, 136: 3114-3123, 2004.
- LLUGANY, M.; POSCHENRIEDER, C.; BARCELÓ, J. Monitoring of aluminum-induced inhibition of root elongation in four maize cultivars differing in tolerance of aluminum and proton toxicity. **Physiologia Plantarum**, 93: 265-271, 1995.
- LOPES, A. S. **Solos sob “cerrado”: características, propriedades e manejo**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fósforo, 1984. 162 p.
- LOPES-CANTARERO, I.; LORENTE, F. A.; ROMERO, L. Are chlorophylls good indicators of nitrogen and phosphorus levels. **Journal of Plant Nutrition**, 17: 979-990, 1994.
- MA, J. F.; SHEN, R.; ZHAO, Z.; WISSUWA, M.; TAKEUCHI, Y. Response of rice to Al stress and identification of quantitative trait loci for Al tolerance. **Plant Cell Physiology**, 43: 652-659, 2002.
- MENDONÇA, R. J. **Efeito do alumínio e de diferentes proporções de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> sobre o crescimento e os teores de P, K, Ca e Mg em dois cultivares de arroz**.

- Viçosa, MG: UFV. 2001. 47 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- MENDONÇA, R.J.; CAMBRAIA, J.; OLIVEIRA, J.A.; OLIVA, M.A. Efeito do alumínio na absorção e na utilização de macronutrientes em duas cultivares de arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 38:843-848. 2003.
- MERIGA, B; REDDY, K.; RAO, K.R.; REDDY, L. A.; KISHOR, P.B.K. Aluminum-induced production of oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA damage in seedlings of rice (*Oryza sativa*). **Journal of Plant Physiology**, 161:63-68. 2004.
- MILIVOJEVIC, D. B.; STOJANOVIC, D. D.; DRINIC, S. D. Effects of aluminum on pigments and pigment-protein complexes of soybean. **Biologia Plantarum**, 43: 595-597, 2000.
- MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The generation of superoxide radical during the autoxidation of ferredoxins. **The Journal of Biological Chemistry**, 246: 6886-6890, 1971.
- MITLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, 7: 405-410. 2002.
- MOHAMMADI, M. & KARR, A. L. Superoxide anion generation in effective and ineffective soybean root nodules. **Journal of Plant Physiology**, 158: 1023-1029, 2001.
- MOSSOR-PIETRASZEWSKA, T. Effect of aluminum on plant growth and metabolism. **Acta Biochimica Polonica**, 48: 673-683, 2001.
- MÜLLER, P.; LI, X.-P.; NIYOGI, K. K. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. **Plant Physiology**, 125: 1558-1566, 2001.
- OHKI, K. Photosynthesis, chlorophyll, and transpiration responses in aluminum stressed wheat and sorghum. **Crop Science**, 26:572-575. 1986.
- OTEIZA, P. L. A mechanism for the stimulatory effect of aluminum on iron-induced lipid peroxidation. **Archives Biochemistry and Biophysics**, 308: 374-379, 1994.
- PEIXOTO, P. H. P.; CAMBRAIA, J.; MOSQUIM, P. R.; MOREIRA, M. A. Aluminum effects on fatty acid composition and lipid peroxidation of a purified plasma membrane fraction of root apices of two sorghum cultivars. **Journal of Plant Nutrition**, 24: 1061-1070, 2001.
- PEIXOTO, P. H. P.; Da MATA, F. M.; CAMBRAIA, J. Responses of the photosynthetic apparatus to aluminum stress in two sorghum cultivars. **Journal of Plant Nutrition**, 25: 821-832, 2002.
- RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F.; BRIDGEWATER, S. The brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany**, 80: 223-230, 1997.

- RICHARDS, K. D.; SCHOTT, E.J.; SHARMA, Y. K.; DAVIS, K. R.; GARDNER, R. Aluminum induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, 116: 409-418, 1998.
- SCANDALIOS, J. G. Oxygen stress and superoxide dismutase. **Plant Physiology**, 101: 7-12, 1993.
- SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. **Plant Growth Regulation**, 46: 209-221, 2005.
- SIMON, L.; KIEGER, M.; SUNG, S. S.; SMALLEY, T. J. Aluminum toxicity in tomato: leaf gas exchange, chlorophyll content, and invertase activity. **Journal of Plant Nutrition**, 17: 307-317, 1994.
- SIVAGURU, M., PALIWAL, K. Differential aluminum tolerance in some tropical rice cultivars. II. Mechanism of aluminum tolerance. **Journal Plant Nutrition**, 16: 1717-1732. 1993.
- SIVAGURU, M.; HORST, W. J. The distal part of the transition zones is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize. **Plant Physiology**, 116:155-163, 1998.
- TAMÁS, L.; HUTTOVÁ, J.; MISTRÍK, I.; SIMONOVICOVÁ, M.; SIROKÁ, B. Aluminum-induced drought and oxidative stress in barley roots. **Journal of Plant Physiology**, 163: 781-784, 2006.
- TAMÁS, L.; ŠIMONOVIČOVÁ, M.; HUTTOVÁ, J. MISTRÍK, I. Aluminium stimulated hydrogen peroxide production of germinating barley seeds. **Environmental and Experimental Botany**, 51:281-288, 2004.
- VASCONCELOS, S. S.; ROSSIELLO, R. O. P.; NETO, J. J. Parâmetros morfológicos para estabelecer tolerância diferencial à toxicidade de alumínio em cultivares de arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 37: 357-363, 2002.
- VITORELLO, V.A.; CAPALDI, F.R.; STEFANUTO, V. A. Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 17:129-143, 2005.
- WAGATSUMA, T.; JUJU, K.; ISHIKAWA, S.; NAKASHIMA, T. Aluminum – tolerant protoplasts from roots can be collected with positively charged sílica microbeads: A method based on differences in surface negativity. **Plant Cell Physiology**, 36: 1493-1502, 1995.
- YAMAMOTO, Y.; HACHIYA, Y.; MATSUMOTO, H. Oxidative damage to membranes by a combination of aluminum and iron in suspension cultured tobacco cells. **Plant Cell Physiology**, 38: 1333-1339, 1997.

YAMAMOTO, Y.; KOBAYASHI, Y.; MATSUMOTO, H. Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. **Plant Physiology**, 125: 199-208, 2001.

YAMAMOTO, Y.; KOBAYASHI, Y.; DEVI, S. R.; RIKIISHI, S.; MATSUMOTO, H. Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells. **Plant Physiology**, 128: 63-72, 2002.

YAMAMOTO, Y.; KOBAYASHI, Y.; DEVI, S. R.; RIKIISHI, S.; MATSUMOTO, H. Oxidative stress triggered by aluminum in plant roots. **Plant and Soil**, 255: 239-243, 2003.

## **APÊNDICE**

**Quadro 1A:** Análise de variância sumarizada do comprimento de raízes em dois cultivares de arroz tratados com Al 0 mM e 1 mM.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		F	
		Raízes	Parte aérea	Raízes	Parte aérea
Níveis de Al	1	87,43**	3,54**	24,2	7,79
Cultivares	1	157,32**	226,03*	43,55	496,97
Al * Cultivar	1	10,10 <sup>ns</sup>	3,50*	2,8	7,69
Resíduo	6	3,61	0,45		
CV (%)		7,21	2,35		

\*\* (P< 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

\* (P<0,05) Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

<sup>ns</sup> Não significativo

**Quadro 2A:** Análise de variância sumarizada da produção de matéria seca em dois cultivares de arroz tratados com Al 0 mM e 1 mM.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		F	
		Raízes	Parte aérea	Raízes	Parte aérea
Níveis de Al	1	$1,5 \times 10^{-3}$ *	$1,15 \times 10^{-2}$ **	60,94	11,82
Cultivares	1	$2,8 \times 10^{-2}$ *	0,20*	1141,63	206,13
Al * Cultivar	1	$7,68 \times 10^{-4}$ *	$2,21 \times 10^{-3}$ <sup>ns</sup>	31,28	2,28
Resíduo	6	$2,45 \times 10^{-5}$	$9,7 \times 10^{-4}$		
CV (%)		5,50	11,8		

\*\* (P< 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

\* (P<0,05) Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

<sup>ns</sup> Não significativo

**Quadro 3A:** Análise de variância sumarizada dos teores de ânion superóxido em dois cultivares de arroz tratados com Al 0 mM e 1 mM.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		F	
		Raízes	Folhas	Raízes	Folhas
Níveis de Al	1	$7,27 \times 10^{-4}$ *	$3,51 \times 10^{-3}$ *	15,88	72,83
Cultivares	1	$4,53 \times 10^{-4}$ **	$1,35 \times 10^{-4}$ <sup>ns</sup>	9,89	2,81
Al * Cultivar	1	$7,2 \times 10^{-5}$ <sup>ns</sup>	$3,33 \times 10^{-4}$ **	1,57	6,91
Resíduo	6				
CV (%)		9,04	13,60		

\*\* (P< 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

\* (P<0,05) Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

<sup>ns</sup> Não significativo

**Quadro 4A:** Análise de variância sumarizada dos teores de peróxido de hidrogênio em dois cultivares de arroz tratados com Al 0 mM e 1 mM.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		F	
		Raízes	Folhas	Raízes	Folhas
Níveis de Al	1	1,09 x 10 <sup>-2**</sup>	3,30 x 10 <sup>-3ns</sup>	11,78	4,54
Cultivares	1	1,13 x 10 <sup>-2**</sup>	5,69 x 10 <sup>-3**</sup>	12,20	7,84
Al * Cultivar	1	1,23 x 10 <sup>-3ns</sup>	1,63 x 10 <sup>-3ns</sup>	1,32	2,25
Resíduo	6				
CV (%)		10,32	13,45		

\*\* (P< 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

\* (P<0,05) Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

<sup>ns</sup> Não significativo

**Quadro 5A:** Análise de variância sumarizada da peroxidação de lipídios em dois cultivares de arroz tratados com Al 0 mM e 1 mM.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		F	
		Raízes	Folhas	Raízes	Folhas
Níveis de Al	1	2,32*	13,93 <sup>ns</sup>	10,54	4,79
Cultivares	1	3,72*	132,49**	12,56	45,50
Al * Cultivar	1	0,94 <sup>ns</sup>	8,39 x 10 <sup>-2**</sup>	3,17	0,03
Resíduo	6		2,91		
CV (%)		5,74	4,31		

\*\* (P< 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

\* (P<0,05) Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

<sup>ns</sup> Não significativo

**Quadro 6A:** Análise de variância sumarizada para o teor de clorofila *a* (Cl *a*), clorofila *b* (Cl *b*) e clorofila total (Cl *t*) em dois cultivares de arroz tratados com Al 0 mM e 1 mM.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio			F		
		Cl <i>a</i>	Cl <i>b</i>	Cl <i>t</i>	Cl <i>a</i>	Cl <i>b</i>	Cl <i>t</i>
Níveis de Al	1	0,61**	3,2 x 10 <sup>-2*</sup>	1,08**	18,4	6,23	23,24
Cultivares	1	3,8 x 10 <sup>-2*</sup>	2,8 x 10 <sup>-2ns</sup>	7,1 x 10 <sup>-2ns</sup>	1,15	5,46	1,54
Al * Cultivar	1	0,57**	2 x 10 <sup>-2ns</sup>	0,98**	17,25	3,46	21,21
Resíduo	6	3,3 x 10 <sup>-2</sup>	5,2 x 10 <sup>-3</sup>	4,6 x 10 <sup>-2</sup>			
CV (%)		9,86	9,38	6,73			

\*\* (P< 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

\* (P<0,05) Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

<sup>ns</sup> Não significativo

**Quadro 6B:** Análise de variância sumarizada para o teor de carotenóides e a razão clorofila *a/b* em dois cultivares de arroz tratados com Al 0 mM e 1 mM.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		F	
		Carotenóide	Razão <i>a/b</i>	Carotenóides	Razão <i>a/b</i>
Níveis de Al	1	1,6 x 10 <sup>-2*</sup>	3,48 x 10 <sup>-4ns</sup>	6,04	0,03
Cultivares	1	1,7 x 10 <sup>-3ns</sup>	2,57 x 10 <sup>-2ns</sup>	0,62	2,54
Al * Cultivar	1	1,3 x 10 <sup>-2ns</sup>	1,53 x 10 <sup>-3ns</sup>	4,99	0,15
Resíduo	6	2,7 x 10 <sup>-3</sup>	1,01 x 10 <sup>-2</sup>		
CV (%)		10,27			

\*\* (P< 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

\* (P<0,05) Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

<sup>ns</sup> Não significativo

**Quadro 7A:** Análise de variância sumarizada da taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> (A) e condutância estomática (*gs*) em dois cultivares de arroz tratados com Al 0 mM e 1 mM.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		F	
		A	<i>gs</i>	A	<i>gs</i>
Níveis de Al	1	1,72 <sup>ns</sup>	9,9 x 10 <sup>-4ns</sup>	0,30	0,16
Cultivares	1	10,64 <sup>ns</sup>	1,7 x 10 <sup>-3ns</sup>	1,88	0,28
Al * Cultivar	1	6,05 <sup>ns</sup>	3,5 x 10 <sup>-3ns</sup>	1,07	0,58
Resíduo	6	5,67	6,07 x 10 <sup>-3ns</sup>		
CV (%)		12,08	24,34		

\*\* (P< 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

\* (P<0,05) Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

<sup>ns</sup> Não significativo

**Quadro 7B:** Análise de variância resumida da transpiração (E) e a razão Ci/Ca em dois cultivares de arroz tratados com Al 0 mM e 1 mM.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		F	
		E	Ci/Ca	E	Ci/Ca
Níveis de Al	1	1,86 <sup>ns</sup>	1,45 x 10 <sup>-5ns</sup>	1,71	0,02
Cultivares	1	0,43 <sup>ns</sup>	4,76 x 10 <sup>-4 ns</sup>	0,40	0,58
Al * Cultivar	1	1,45 <sup>ns</sup>	3,12 x 10 <sup>-3ns</sup>	1,33	3,82
Resíduo	6	1,09	8,15 x 10 <sup>-4</sup>		
CV (%)		19,60	4,14		

\*\* (P< 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

\* (P<0,05) Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

<sup>ns</sup> Não significativo

**Quadro 8A:** Análise de variância sumarizada dos parâmetros de fluorescência: fluorescência inicial (Fo) e fluorescência máxima (Fm) em dois cultivares de arroz tratados com Al 0 mM e 1 mM.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		F	
		Fo	Fm	Fo	Fm
Níveis de Al	1	27 <sup>ns</sup>	432 <sup>ns</sup>	0,09	0,17
Cultivares	1	1875 <sup>ns</sup>	17480,33 <sup>*</sup>	6,18	6,89
Al * Cultivar	1	5,33 <sup>*</sup>	192 <sup>ns</sup>	0,02	0,08
Resíduo	6	303,53	2538,03		
CV (%)		7,16	4,00		

\*\* (P< 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

\* (P<0,05) Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

<sup>ns</sup> Não significativo

**Quadro 8B:** Análise de variância sumarizada dos parâmetros de fluorescência: eficiência quântica máxima do PS II (Fv/Fm) e rendimento quântico efetivo do PS II ( $\Delta F/Fm'$ ) em dois cultivares de arroz tratados com Al 0 mM e 1 mM.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		F	
		Fv/Fm	$\Delta F/Fm'$	Fv/Fm	$\Delta F/Fm'$
Níveis de Al	1	$1,33 \times 10^{-6ns}$	$1,45 \times 10^{-3ns}$	0,02	0,18
Cultivares	1	$1,92 \times 10^{-4ns}$	$1,57 \times 10^{-2ns}$	3,12	1,90
Al * Cultivar	1	$1,63 \times 10^{-5ns}$	$1,36 \times 10^{-2ns}$	0,27	1,65
Resíduo	6	$6,1 \times 10^{-5}$	$8,25 \times 10^{-3}$		
CV (%)		0,97	51,08		

\*\* (P< 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

\* (P<0,05) Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

<sup>ns</sup> Não significativo

**Quadro 8C:** Análise de variância sumarizada do coeficiente de extinção fotoquímica (qP) e não fotoquímica (qN) em dois cultivares de arroz tratados com Al 0 mM e 1 mM.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		F	
		qP	qN	qP	qN
Níveis de Al	1	$7,47 \times 10^{-3ns}$	$1,07 \times 10^{-3ns}$	0,26	0,19
Cultivares	1	$3,90 \times 10^{-2ns}$	$8,05 \times 10^{-4ns}$	1,34	0,15
Al * Cultivar	1	$4,35 \times 10^{-2ns}$	$8,32 \times 10^{-3ns}$	1,50	1,50
Resíduo	6	$2,9 \times 10^{-2}$	$5,53 \times 10^{-3}$		
CV (%)		57,03	10,54		

\*\* (P< 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

\* (P<0,05) Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

<sup>ns</sup> Não significativo

**Quadro 8D:** Análise de variância sumarizada do coeficiente de extinção não fotoquímica (NPQ) e a taxa de transporte aparente de elétrons (ETR) em dois cultivares de arroz tratados com Al 0 mM e 1 mM.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		F	
		NPQ	ETR	NPQ	ETR
Níveis de Al	1	0,16 <sup>ns</sup>	522,72 <sup>ns</sup>	0,41	0,58
Cultivares	1	0,56 <sup>ns</sup>	246,61 <sup>ns</sup>	0,14	0,27
Al * Cultivar	1	0,60 <sup>ns</sup>	122,88 <sup>ns</sup>	1,51	0,14
Resíduo	6	0,40	907,45		
CV (%)		37,04	20,10		

\*\* (P< 0,01) Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

\* (P<0,05) Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

<sup>ns</sup> Não significativo