

CLEBERSON RIBEIRO

**CRESCIMENTO, MORFOLOGIA E MUDANÇAS NO SISTEMA
ANTIOXIDATIVO EM RAÍZES DE ARROZ, SUBMETIDAS AO
ALUMÍNIO**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2011**

CLEBERSON RIBEIRO

**CRESCIMENTO, MORFOLOGIA E MUDANÇAS NO SISTEMA
ANTIOXIDATIVO EM RAÍZES DE ARROZ, SUBMETIDAS AO
ALUMÍNIO**

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

APROVADA: 28 de abril de 2011

Prof. Paulo Henrique Pereira Peixoto

Prof.^a Aristéa Alves Azevedo

Prof. Marco Aurélio P. e Silva
(Co-Orientador)

Prof. Marco A. Oliva Cano
(Co-Orientador)

Prof. José Cambraia
(Orientador)

**Aos meus queridos pais Cleber e Marilda
e aos meus irmãos Cleber Jr. e Keila:**

MINHA HOMENAGEM

**A minha amada esposa Karla e a
minha querida filha Ana Júlia:**

OFEREÇO E DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por mais essa conquista.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Biologia Vegetal (DBV) - Programa de Fisiologia Vegetal - por proporcionarem condições para o desenvolvimento desse trabalho e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

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

Ao Professor, Orientador e Amigo José Cambraia pelo exemplo de profissionalismo e competência.

Ao Professor e Amigo Paulo Henrique Pereira Peixoto pelos conselhos, ensinamentos e amizade. Agradeço por ter sido o motivador da minha vida acadêmica desde a graduação.

À banca examinadora pela disponibilidade e importantes considerações.

Aos Professores do Curso de Fisiologia Vegetal e às Professoras Marília Ventrella e Luzimar Campos pelos ensinamentos.

Ao técnico do Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) Gilmar Valente e à Patrícia pela amizade e torcida.

Aos amigos do laboratório, Élcio, Gládis, Leandro, Flávio, Daniela, Heloísa e Neidiquele pelos momentos de descontração, ajuda e incentivo.

Ao Bhering pela ajuda imprescindível em todas as etapas do trabalho.

À amiga Ana Carolina e a todos os amigos do curso de Fisiologia Vegetal em especial a Caroline Müller, pela ajuda e amizade.

Às minhas cunhadas Karine, Kamila e Flávia e aos meus concunhados e amigos Talles e Fred pela grande torcida e pela divertida convivência.

Ao meu sogro Lilico e a minha sogra Dorinha, meu sincero agradecimento.

Aos demais amigos e familiares que contribuíram para realização desse trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. Objetivo Geral.....	3
2.2. Objetivos Específicos.....	4
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	4
4. CONCLUSÕES GERAIS.....	73

CAPÍTULO I

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

Resumo.....	7
1. Introdução.....	8
2. Material e métodos.....	9
3. Resultados.....	11
4. Discussão.....	15
5. Referências Bibliográficas.....	19

CAPÍTULO II

ALTERAÇÕES NO SISTEMA ASCORBATO EM RESPOSTA AO ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO PELO ALUMÍNIO EM RAÍZES DE ARROZ

Resumo.....	23
1. Introdução.....	24
2. Material e métodos.....	26
3. Resultados.....	32
4. Discussão.....	39
5. Referências Bibliográficas.....	46

CAPÍTULO III

ALTERAÇÕES NO METABOLISMO DA GLUTATIONA EM RESPOSTA AO ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO PELO ALUMÍNIO EM RAÍZES DE ARROZ

Resumo.....	53
1. Introdução.....	54
2. Material e métodos.....	56
3. Resultados.....	60
4. Discussão.....	64
5. Referências Bibliográficas.....	69

RESUMO

RIBEIRO, Cleberson. D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, abril de 2011.
Crescimento, morfologia e mudanças no sistema antioxidativo em raízes de arroz, submetidas ao alumínio. Orientador: José Cambraia, Co-orientadores: Marco Aurélio Pedron e Silva e Marco Antônio Oliva Cano.

Em solos ácidos, a toxicidade do alumínio (Al) é um dos principais fatores que limita o crescimento e o desenvolvimento das plantas. A exposição de plantas a níveis tóxicos desse elemento pode elevar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e, conseqüentemente, induzir estresse oxidativo. Para evitar o acúmulo excessivo de ROS, as plantas utilizam sistemas de defesa antioxidativo envolvendo certos metabólitos e diversas enzimas antioxidativas. O presente trabalho objetivou avaliar alguns danos causados pelo Al sobre o crescimento e a morfologia das raízes e as respostas do sistema ascorbato/glutationa em dois cultivares de arroz: Fernandes (CNA-1158) e Maravilha (CNA-6843-1), considerados tolerante e sensível ao Al, respectivamente. Após nove dias de tratamento das plantas com Al nas concentrações de 0 e 1 mM foram avaliados os efeitos desse metal sobre o crescimento e morfologia das raízes, sobre os teores das ROS, ascorbato (AA), desidroascorbato (DHA), glutathione reduzida (GSH) e glutathione oxidada (GSSG) e sobre as atividades das enzimas dismutase do superóxido (SOD), peroxidase do ascorbato (APX), catalase (CAT), peroxidase (POX), peroxidase da glutathione (GPX), redutase da glutathione (GR), γ -glutamylcysteinil sintase (γ -GCS), glutathione S-transferase (GST), redutase do monodesidroascorbato (MDHAR) e redutase do desidroascorbato (DHAR). O cultivar Maravilha apresentou maior acúmulo de Al e menor crescimento de suas raízes do que o cultivar Fernandes. O Al acumulou-se especialmente nos ápices radiculares dos dois cultivares, mas as raízes do cultivar Maravilha, tornaram-se mais grossas do que as do cultivar Fernandes. O acúmulo de Al provocou danos estruturais, com ruptura das células da coifa, alterando a morfologia externa dos ápices radiculares dos dois cultivares de arroz, principalmente no cultivar Maravilha. O cultivar Fernandes apresentou menor teor de ROS e menor grau de peroxidação de lipídios do que o cultivar Maravilha, caracterizando sua maior tolerância ao Al. O cultivar Fernandes apresentou, também, maior atividade das enzimas SOD, APX, CAT e POX e maior regeneração do AA em suas raízes, indicativo de um mecanismo mais eficiente na eliminação do excesso

de ROS produzido durante o estresse oxidativo causado por Al. As atividades das enzimas γ -GCS e GR, envolvidas na síntese e regeneração da glutathiona, respectivamente, aumentaram nas raízes do cultivar Fernandes, enquanto no cultivar Maravilha, apenas a enzima γ -GCS apresentou aumento em sua atividade no 9º dia de tratamento com Al. A atividade da GPX aumentou nas raízes dos dois cultivares tratados com Al, mas no cultivar Maravilha o efeito do Al foi menos intenso e mais tardio. O cultivar Fernandes, na presença de Al, foi capaz de manter teores de GSH e da relação GSH/GSSG mais elevados e, portanto, compatíveis com a operação de melhor tampão de redox do que no cultivar Maravilha. Portanto, a maior parte da capacidade do arroz tolerar o estresse oxidativo causado por Al parece ser resultado da operação sincronizada de sistemas enzimáticos e não-enzimáticos relacionados com o metabolismo do ascorbato e da glutathiona. Tanto a atividade das enzimas quanto os teores de ascorbato e, ou de glutathiona indicam maior eficiência do sistema ascorbato/glutathiona no cultivar Fernandes do que no cultivar Maravilha.

ABSTRACT

RIBEIRO, Cleberson. D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, April de 2011.
Growth, morphology and changes in the antioxidative system in roots of rice, submitted to the aluminum. Adviser: José Cambraia, Co-advisers: Marco Aurélio Pedron e Silva and Marco Antônio Oliva Cano.

In acid soils, aluminum (Al) toxicity is one of the main factors limiting plant growth and development. The exposure of plants to toxic levels of this element can increase the reactive oxygen species (ROS) production and, consequently, to induce oxidative stress. To avoid excessive accumulation of ROS, plants make use of antioxidative defense systems involving metabolites and several antioxidative enzymes. The present work aimed to evaluate some damages caused by Al on root growth and morphology and on ascorbate/glutathione system responses in two rice cultivars: Fernandes (CNA-1158) and Maravilha (CNA-6843-1), considered tolerant and sensitive to Al, respectively. Nine days after plant treatment with Al 0 and 1 mM, the effects of Al on root growth and morphology, on ROS, ascorbate (AA), dehydroascorbate (DHA), reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) contents and on the activities of the enzymes superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT), peroxidase (POX), glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase (GR), γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS), glutathione S-transferase (GST) monodehydroascorbate reductase (MDHAR) and dehydroascorbate reductase (DHAR) were evaluated. Maravilha cultivar showed higher Al accumulation and lower root growth than Fernandes cultivar. Aluminum accumulated especially in root tips in both cultivars, but the root of Maravilha cultivar became thicker than those of Fernandes cultivar. The accumulation of Al caused structural root damages, with rupture of the cells of the root cap, changing the external morphology of the roots tips in both rice cultivars, mainly in Maravilha cultivar. Fernandes cultivar showed lower ROS content and lower degree of lipid peroxidation than Maravilha cultivar, characterizing its higher tolerance to Al. Fernandes cultivar showed, also, larger activity of the SOD, APX, CAT and POX enzymes and larger regeneration of AA in its roots, indicative of a more efficient mechanism in the elimination of the excess of ROS produced during the oxidative stress caused by Al. The activities of the enzymes γ -GCS and GR, involved with the synthesis and regeneration of the glutathione, respectively, increased in the roots of

the Fernandes cultivar, while in Maravilha cultivar only γ -GCS showed an increase in activity in the 9th day of treatment with Al. The activity of GPX increased in the roots of both cultivars treated with Al, but in the Maravilha cultivar Al effect was less intense and occurred later. Fernandes cultivar, in Al presence, was capable to maintain a GSH content and GSH/GSSG ratio higher and, therefore, a better buffer redox than the Maravilha cultivar. Therefore, most of the rice tolerance capacity to tolerate the oxidative stress caused by Al seems to be result of a synchronized operation of enzymatic and non-enzymatic systems associated with the metabolism of ascorbate and glutathione. The antioxidative enzyme activities as well as ascorbate and, or glutathione contents indicate a higher efficiency of the ascorbate/glutathione system in Fernandes cultivar than in Maravilha cultivar.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Al é o metal mais abundante e o terceiro elemento mais comum na superfície da terra (Kochian, 1995), correspondendo a aproximadamente 7% da massa total do planeta (Delhaize e Ryan, 1995). Em solos ácidos, a toxidez por Al constitui um dos principais fatores que limita o crescimento e o desenvolvimento das plantas (Kochian, 1995; Tahara et al., 2008). Em função de sua carga elétrica positiva, o Al pode reagir com inúmeros sítios nas células, alvos potenciais da sua injúria, incluindo a parede celular, a membrana plasmática, o citoesqueleto e o núcleo (Kochian et al., 2004; Zheng e Yang, 2005).

Dentre as culturas vegetais de grande importância econômica, o arroz (*Oryza sativa* L.) se destaca por apresentar cultivares com ampla variação de tolerância ao alumínio (Al) (Fageria et al., 1988; Ma et al., 2002). A utilização de técnicas bioquímicas, moleculares e anatômicas torna possível a avaliação e a visualização da intensidade dos danos gerados pelo Al ao metabolismo das plantas, que, conseqüentemente, podem auxiliar a identificação de possíveis mecanismos de tolerância.

Por estar em contato direto com esse metal, a raiz é a parte da planta que sofre maior intensidade dos efeitos fitotóxicos do Al, (Delhaize e Ryan, 1995). Portanto, ao entrarem em contato com níveis tóxicos de Al, as plantas podem apresentar alterações na arquitetura de suas raízes. Os danos mais frequentes gerados pelo Al nos sistemas radiculares são a redução na formação de raízes laterais e pêlos radiculares, alteração na cor, engrossamento, atrofia e curvatura das raízes (Ciamporova, 2002).

O Al também pode induzir alterações no metabolismo das plantas sendo capaz de induzir o estresse oxidativo, alterando o estado de oxi-redução de certos componentes celulares, resultando no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Richards et al., 1998; Ezaki et al., 2000; Tamás et al., 2006). As ROS podem se acumular nos tecidos vegetais, atingindo níveis tóxicos capazes de levar as células à morte (Mittler, 2002). As plantas podem ativar sistemas de defesa antioxidativos (Boscolo et al., 2003; Kuo e Kao, 2003; Darkó et al., 2004; Simonovicová et al., 2004) para evitar a formação e/ou acúmulo de ROS. Esses sistemas de defesa parecem envolver mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos para eliminação das ROS produzidas sob condições de estresse oxidativo

(Scandalios, 1993; Mittler, 2002). As principais enzimas envolvidas no controle homeostático das ROS são a superóxido dismutase (SOD), a peroxidase do ascorbato (APX), a catalase (CAT) e a peroxidase (POX). Já os principais sistemas de defesa não enzimático são os metabólitos ascorbato (AA) e glutathiona (GSH) (Noctor e Foyer, 1998).

O ascorbato, considerado importante metabólito na manutenção do estado redox das plantas, está presente em praticamente todos os compartimentos celulares (Smirnoff, 2000). Esse metabólito desempenha diversas funções no interior das células, especialmente como molécula antioxidativa, promovendo a eliminação das ROS (Horemans et al., 2000; Ishikawa et al., 2006). O ascorbato, juntamente com as enzimas peroxidase do ascorbato (APX), redutase do monodesidroascorbato (MDHAR) e redutase do desidroascorbato (DHAR) faz parte do sistema ascorbato, mecanismo extremamente eficiente na remoção de ROS e na manutenção do estado redox das células (Dipierro et al., 2005).

Assim como o ascorbato, a glutathiona apresenta papel crucial na defesa contra danos oxidativos gerados durante estresses bióticos e abióticos (Noctor et al., 1998). A glutathiona é um tripeptídeo formado pelas moléculas de glutamato, cisteína e glicina sendo, por isso, denominada gama-glutamil-cisteinil-glicina (γ -Glu-Cis-Gli) (Foyer et al., 2001). A glutathiona é amplamente distribuída em plantas, podendo ser encontrada tanto na forma reduzida (GSH) quanto na forma oxidada (GSSG) (Meister, 1988). Considerada como o tiol não-protéico mais abundante no interior das células, a GSH atua como fonte endógena de enxofre (S), sendo a principal forma de armazenamento e translocação desse elemento em plantas.

Devido a grande importância da GSH para o metabolismo vegetal, vários estudos têm sido realizados e numerosas funções fisiológicas têm sido atribuídas a esse metabólito em plantas. Uma delas está relacionada a sua capacidade de atuar como antioxidante celular (Ascher, 1989), função esta dependente do grupamento -SH do resíduo de cisteína (May et al., 1998). Assim, a GSH protege as células contra os possíveis danos causados pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), formadas durante o estabelecimento de um estresse oxidativo (Rüeggsegger e Brunold, 1992; Yamaguchi et al., 1999; Nagalakshmi e Prasad, 2001). Para eliminar o excesso das ROS produzidas sob condições estressantes, a GSH pode reagir diretamente com as ROS ou, indiretamente, servindo como substrato da enzima peroxidase da glutathiona (GPX) (Eshdat et al., 1997; Noctor et al., 1998).

O teor da forma reduzida da glutathione (GSH) no interior das células vegetais é determinado pelo balanço entre sua biossíntese e degradação, bem como da atividade de enzimas relacionadas a sua regeneração. As enzimas sintetase da γ -glutamilcisteína (γ -GCS) e sintetase da glutathione (GSH-S) catalisam reações de síntese da glutathione (May et al., 1998; Noctor e Foyer, 1998; Noctor et al., 2002). Já a enzima redutase da glutathione (GR) catalisa a reação de regeneração da GSH a partir da GSSG (Noctor e Foyer, 1998; Mittler, 2002). Por sua vez, as enzimas glutathione S-transferase (GST), sintetase da fitoquelatina e peroxidase da glutathione catalisam reações de degradação da GSH (Marrs, 1996; Eshdat et al., 1997; Semane et al., 2007). Portanto, o desempenho das funções da glutathione no metabolismo vegetal depende da capacidade da planta em manter seu teor homeostático no interior das células (Noctor et al., 2002).

Entre as culturas de importância econômica, o arroz tem sido considerado uma das mais tolerantes a níveis tóxicos de alumínio. Portanto, um estudo aprofundado de algumas rotas metabólicas, como é o caso do sistema ascorbato e do metabolismo da glutathione, são extremamente importante para se conhecer os possíveis mecanismos que conferem a essa espécie maior tolerância ao Al.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos do sistema ascorbato e do metabolismo da glutathione sobre a ação oxidativa das ROS produzidas sob condições de níveis tóxicos de alumínio em dois cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.).

2.2. Objetivos específicos

Avaliar, em dois cultivares de arroz, submetidos ao alumínio, os efeitos desse elemento sobre:

- a) o crescimento e a morfologia externa das raízes;
- b) os teores das ROS produzidas durante o estresse;
- c) as atividades brutas de enzimas antioxidativas e as atividades específicas de suas isoformas;
- d) as atividades e os teores dos constituintes do sistema ascorbato;
- e) as atividades das enzimas envolvidas no metabolismo da glutatona.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alscher, R.G. Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. **Physiol. Plant.** 77:457-464, 1989.
- Boscolo, P.R.S., Menossi, M., Jorge, R.A. Aluminum-induced oxidative stress in maize. **Phytochem.** 62:181-189, 2003.
- Čiamporová, M. Morphological and structural responses of plant roots to aluminium at organ, tissue and cellular levels. **Biol. Plant.** 45:161-171, 2002.
- Darkó, É., Ambrus, H., Stefanovits-Bányai, É., Fodor, J., Bakos, F., Barnabás, B. Aluminium toxicity, Al tolerance and oxidative stress in an Al-sensitive wheat genotype and in Al-tolerant lines developed by *in vitro* microspore selection. **Plant Sci.** 166:583–591, 2004.
- Delhaize, E., Ryan, P.R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiol.** 107:315-321, 1995.
- 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 aluminium stress. **J. Plant Physiol.** 162:529-536, 2005.
- Eshdat, Y., Holland, D., Faltin, Z., Bem-Hayyim, G. Plant glutathione peroxidases. **Physiol. Plant.** 100:234-240, 1997.
- Ezaki, B., Gardner, R.C., Ezaki, Y., Matsumoto, H. Expression of aluminum-induced genes in transgenic *Arabidopsis* plants can ameliorate aluminum stress and/or oxidative stress. **Plant Physiol.** 122:657-665, 2000.

- Fageria, N.K., Wright, R.J., Baligar, V.C. Rice cultivars response to aluminum in nutrient solution. **Comm. Soil Sci. Plant Anal.** 19:1133-1142, 1988.
- Foyer, C.H., Theodoulou, F., Delrot, S. The functions of inter- and intracellular glutathione transport systems in plants. **Trends Plant Sci.** 10:486-492, 2001.
- Horemans, N., Foyer, C.F., Potters, G., Asard, H. Ascorbate function and associated transport systems in plants. **Plant Physiol. Biochem.** 38:531-540, 2000.
- Ishikawa, T., Dowdle, J., Smirnoff, N. Progress in manipulating ascorbic acid biosynthesis and accumulation in plants. **Physiol. Plant.** 126:343-355, 2006.
- Kochian, L.V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 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. **Annu. Rev. Plant Biol.** 55:459-493, 2004.
- Kuo, M.C., Kao, C.H. Aluminum effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. **Biol. Plant.** 46:149-152, 2003.
- 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 Physiol.** 43:652-659, 2002.
- Marrs, K.A. The functions and regulation of glutathione s-transferase in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 47:127-158, 1996.
- May, M.J., Vernoux, T., Leaver, C., Montagu, M.V., Inzé, D. Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. **J. Exp. Bot.** 49:649-667, 1998.
- Meister, A. Glutathione metabolism and its selective modification. **J. Biol. Chem.** 263:17205-17208, 1988.
- Mittler, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Sci.** 7:405-409, 2002.
- Nagalakshmi, N., Prasad, M.N.V. Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. **Plant Sci.** 160:291-299, 2001.
- Noctor, G., Arisi, A.C.M., Jouanin, L., Kunert, K.J., Rennenberg, H. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. **J. Exp. Bot.** 49:623-647, 1998.
- Noctor, G., Foyer, C.H. Ascorbate and Glutathione: keeping active oxygen under control. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 49:249-279, 1998.

- Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H., Foyer, C.H. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in control of glutathione homeostasis and signaling. **J. Exp. Bot.** 53:1283-1304, 2002.
- Richards, K.D., Schott, E.J., Sharma, Y.K., Davis, K.R., Gardner, R.C. Aluminum induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiol.** 116:409-418, 1998.
- Ruegsegger, A., Brunold, C. Effect of cadmium on γ -glutamylcysteine synthesis in maize seedlings. **Plant Physiol.** 99:428-433, 1992.
- Scandalios, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiol.** 103:7-12, 1993.
- Semane, B., Cuypers, A., Smeets, K., Belleghem, F.V., Horemens, N., Schat, H., Vangronsveld, J. Cadmium responses in *Arabidopsis thaliana*: glutathione metabolism and antioxidative defence system. **Physiol. Plant.** 129:519-529, 2007.
- Simonovicová, M., Tamás, L., Hüttová, J., Mistrík, I. Effect of aluminium on oxidative stress related enzymes activities in barley roots. **Biol. Plant.** 48:261-266, 2004.
- Smirnoff, N. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. **Curr. Opin. Plant Biol.** 3:229-235, 2000.
- Tahara, K., Yamanoshita, T., Norisada, M., Hasegawa, I., Kashima, H., Sasaki, S., Kojima, K. Aluminum distribution and reactive oxygen species accumulation in root tips of two *Melaleuca* trees differing in aluminum resistance. **Plant Soil.** 307:167-178, 2008.
- Tamás, L., Hüttová, J., Mistrík, I., Simonovicová, M. Aluminium-induced drought and oxidative stress in barley roots. **J. Plant Physiol.** 162:781-784, 2006.
- Yamaguchi, Y., Yamamoto, Y., Ikegawa, H., Matsumoto, H. Protective effect of glutathione on the cytotoxicity caused by a combination of aluminum and iron in suspension-cultured tobacco cells. **Physiol. Plant.** 105:417-422, 1999.
- Zheng, S.J., Yang, J.L. Target sites of aluminum phytotoxicity. **Biol. Plant.** 49:321-331, 2005.

CAPÍTULO I

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

Resumo

Em solos ácidos, a toxicidade do alumínio (Al) é um dos principais fatores que limita o crescimento e o desenvolvimento das plantas. Os danos gerados pelo Al às plantas são observados inicialmente nas raízes, principalmente nos ápices radiculares, onde ocorrem os maiores acúmulos desse elemento. Inibição do crescimento radicular, redução na massa seca e alterações estruturais na morfologia das raízes são alguns dos danos mais frequentes causados por níveis tóxicos de Al. O objetivo do presente trabalho foi avaliar os danos causados pelo Al nas raízes de dois cultivares de arroz: Fernandes (CNA-1158) e Maravilha (CNA-6843-1), considerados tolerante e sensível ao Al, respectivamente. Após nove dias de tratamento das plantas com Al nas concentrações de 0 e 1 mM, pH 4,0, foram avaliados o acúmulo de Al, o comprimento e a morfologia das raízes. O teor de Al foi maior nos tecidos radiculares do cultivar Maravilha, resultado que pode ter contribuído para a redução do crescimento radicular e da massa seca neste cultivar. Os maiores acúmulos de Al foram observados nos ápices radiculares, fato evidenciado pela reação com hematoxilina. Com o aumento no tempo de exposição ao Al, a coloração se tornou mais intensa, evidenciando maior absorção e acúmulo de Al nos tecidos radiculares. O cultivar Maravilha, além de apresentar maior intensidade na coloração das raízes, também apresentou engrossamento radicular após exposição ao Al, resultados não observados para o cultivar Fernandes. Os acúmulos de Al nos ápices radiculares dos dois cultivares de arroz causaram danos às células da coifa que, aparentemente, foram caracterizados pela ruptura das células da epiderme, o que resultou em alterações na morfologia externa das raízes. O cultivar Fernandes, foi capaz de crescer e se desenvolver mesmo após exposição ao Al, evidenciando maior tolerância a esse metal.

Palavras-chave: toxicidade do alumínio, ápice radicular, *Oryza sativa* L., crescimento radicular, morfologia da raiz

1. Introdução

O alumínio (Al) é o metal mais abundante e o terceiro elemento mais comum na superfície da terra (Kochian, 1995), correspondendo a aproximadamente 7% da massa total do planeta (Delhaize e Ryan, 1995). Em solos ácidos, a toxidez causada pelo Al constitui um dos principais fatores que limita o crescimento e o desenvolvimento das plantas (Kochian, 1995; Tahara et al., 2008).

A forma de octaedro hexahidratado, $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6$, mais conhecida como Al^{3+} , é predominante em soluções com pH abaixo de 5,0, sendo considerada a forma mais tóxica para as plantas (Delhaize e Ryan, 1995). Após ser absorvido pelas células radiculares, o Al tende a acumular, preferencialmente no ápice das raízes, promovendo inibição do alongamento e, também, da divisão celular (Kochian, 1995). Dependendo da espécie em estudo, os sintomas de toxicidade ao Al podem aparecer em poucos minutos após exposição a concentrações tóxicas desse metal (Doncheva et al., 2005). Os danos mais frequentes da toxicidade do Al em plantas são a redução no crescimento radicular, formação de calose e deposição de lignina (Ryan et al., 1992; Tahara et al., 2008). Dentre esses danos, a redução no crescimento radicular é o sintoma mais notável da fitotoxicidade do Al, o que pode resultar em decréscimo na absorção de água e nutrientes minerais e, conseqüentemente, limitar o crescimento de toda a planta (Kochian, 1995).

Em função de sua carga elétrica positiva, o Al pode reagir com inúmeros sítios nas células, alvos potenciais de sua injúria, incluindo a parede celular, membrana plasmática, citoesqueleto e núcleo (Kochian et al., 2004; Zheng e Yang, 2005). Plantas expostas a níveis tóxicos de Al podem apresentar alterações na arquitetura de suas raízes. Redução na formação de raízes laterais e pêlos radiculares, alteração na cor, engrossamento, atrofia e curvatura das raízes são as principais modificações externas que caracterizam o estresse gerado pelo Al ao sistema radicular (Ciamporova, 2002).

De forma geral, a intensidade dos danos gerados pelo Al é dependente do estágio de desenvolvimento da planta, da concentração desse metal e do nível de tolerância da planta (Ma et al., 2004; Meriga et al., 2004; Tahara et al., 2008). A tolerância ao Al pode variar dentro ou entre espécies, sendo que as tolerantes, geralmente, apresentam mecanismos que permitem o crescimento e desenvolvimento normal da planta após exposição ao Al (Giannakoula et al., 2010). A tolerância das

plantas ao Al parece ser resultado da operação concomitante ou não de mecanismos de exclusão e de desintoxicação interna (Kochian et al., 2004).

Dentre as culturas vegetais de grande importância econômica, o arroz (*Oryza sativa* L.) se destaca por apresentar cultivares com elevada tolerância ao Al (Fageria et al., 1988; Ma et al., 2002). Dessa forma, é extremamente interessante identificar cultivares mais tolerantes ao Al, e se conhecer seus possíveis mecanismos de tolerância. A utilização de técnicas bioquímicas, moleculares e anatômicas torna possível a avaliação e visualização da intensidade dos danos causados pelo Al ao metabolismo das plantas bem como a identificação de possíveis mecanismos de tolerância a esse elemento.

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos do acúmulo de Al sobre o crescimento e morfologia externa das raízes de dois cultivares de arroz com tolerância diferencial ao Al.

2. Material e métodos

2.1. Material vegetal e condições de crescimento

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 pela Embrapa - Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão.

As sementes dos dois cultivares, selecionadas quanto ao tamanho e forma, foram tratadas com ácido sulfúrico 98% (v/v), por 1 minuto. Em seguida, foram lavadas em água corrente e esterilizadas superficialmente com hipoclorito de sódio 3% (v/v) por 15 minutos, e então, lavadas novamente em água corrente e enxaguadas em água desionizada. As sementes foram germinadas em rolos de papel germitest mergulhados em solução nutritiva de Clark (Clark, 1975), pH 4,0, com um terço da força iônica original, sob aeração contínua.

Plântulas com 12 dias de idade 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 AlCl₃, durante 3, 6 e 9 dias. O experimento foi conduzido em sala de crescimento com temperatura

controlada ($25\pm 3^{\circ}\text{C}$), fluxo de radiação fotossinteticamente ativa de $230\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h. As soluções nutritivas foram continuamente aeradas, os pHs ajustados diariamente para 4,0 e renovadas a cada 3 dias.

A cada 3 dias, após início do experimento, as raízes foram colhidas, lavadas em água corrente e enxaguadas em água desionizada e, então, amostras foram retiradas para as diversas análises químicas e morfológicas.

2.2. Determinação do efeito do Al sobre o comprimento e peso seco das raízes

Após exposição das plantas dos dois cultivares de arroz ao nível tóxico de Al, o comprimento da raiz foi medido com o uso de paquímetro digital. O sistema radicular foi, então, lavado em água corrente e desionizada e colocado para secar em estufa convencional, a 80°C , até obtenção de peso constante.

2.3. Determinação dos teores de Al nos ápices radiculares

O Al dos ápices radiculares com aproximadamente 1 cm e 50 mg de massa fresca, foi extraído com 1 mL de HCl 2N durante 48 h (Wang e Yang, 2005) e determinado por espectrofotometria de absorção atômica em forno de grafite (Shimadzu AA-6701F).

2.4. Coloração das raízes por hematoxilina

A intensidade de acúmulo de Al nas raízes foi analisada pela coloração com hematoxilina férrica (Polle et al., 1978). Após exposição das plantas ao tratamento com Al, as raízes foram mergulhadas em solução de hematoxilina férrica 0,2% (p/v) em NaIO_3 0,02% (p/v), durante 15 minutos. Para eliminar o excesso de corante, as plantas foram removidas e transferidas para recipientes contendo água deionizada, sob aeração, por 30 min. Finalmente, as raízes foram coletadas e fotografadas em estereomicroscópio (Zeiss Stemi, modelo DV4).

2.5. Análise da micromorfologia dos ápices radiculares

A micromorfologia dos ápices radiculares foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura. Ápices radiculares, de aproximadamente 1 cm, obtidos a partir das raízes principais dos dois cultivares de arroz, após 9 dias de tratamentos com Al, foram coletados e fixados em glutaraldeído 2,5%. Em seguida, foram desidratados em série etílica, secos com CO₂ em equipamento de ponto crítico (Baltec, modelo CPD 030, Liechtenstein), afixados com fita dupla face em suporte de alumínio e cobertos com ouro em metalizador (Sputter Coater, marca Balzers, modelo FDU 010, Liechtenstein). A documentação fotográfica foi realizada em microscópio eletrônico de varredura (Leo, modelo 1430VP, Cambridge, Inglaterra) do Núcleo de Microscopia e Microanálise, da UFV.

2.6. Delineamento experimental e análise estatística

Os tratamentos foram dispostos no delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2x3: dois cultivares de arroz (Fernandes e Maravilha), dois níveis de Al (0 e 1 mM) e três tempos de exposição (3, 6 e 9 dias), com três repetições.

Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. As análises foram efetuadas utilizando o programa estatístico “SAEG”, da Fundação Arthur Bernardes, da Universidade Federal de Viçosa, versão 9.0.

3. Resultados

O Al não modificou o comprimento radicular para o cultivar Fernandes mesmo após 9 dias de exposição a esse elemento (Fig. 1A). Entretanto, no cultivar Maravilha, os efeitos do Al foram significativos a partir do 6º dia, observando-se inibições de 11,3 e de 17,7% no 6º e 9º dias, respectivamente. Independente da presença do Al, o cultivar Fernandes sempre apresentou maior comprimento radicular do que o cultivar Maravilha.

Os efeitos do Al sobre a produção de massa seca (Fig. 1B) foram similares aos observados para o comprimento das raízes. Independente da presença do Al, não

foram observadas modificações significativas na massa seca radicular do cultivar Fernandes. Contudo, no 6º e 9º dias de estresse, a presença do Al reduziu significativamente os valores de massa seca no cultivar Maravilha, em 19 e 30%, respectivamente. No 6º e 9º dias de tratamento, os pesos de massa seca radicular para o cultivar Fernandes foram maiores do que para o cultivar Maravilha, independente da presença de Al.

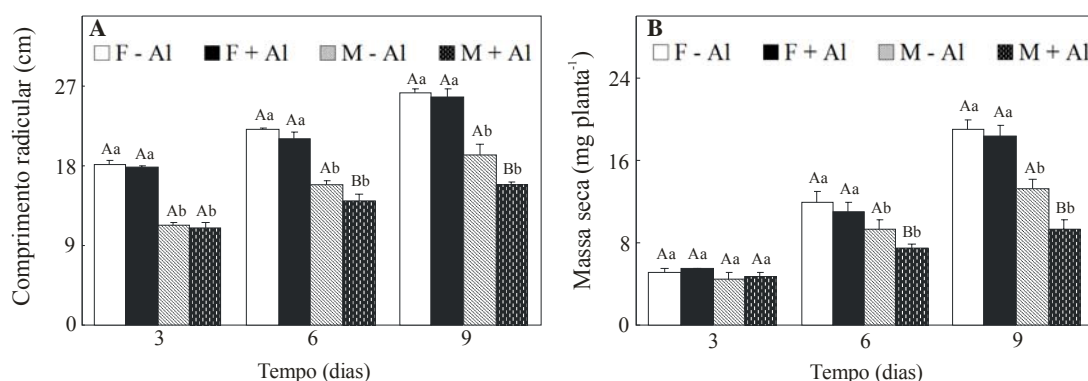


Figura 1: Efeitos do alumínio sobre o comprimento radicular (A) e sobre a produção de massa seca (B) em dois cultivares de arroz, Fernandes (F) e Maravilha (M), após 3, 6 e 9 dias de tratamento com Al. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre os níveis de Al para o mesmo cultivar e pela mesma letra minúscula entre cultivares para o mesmo nível de Al não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barras representam o desvio padrão.

Os teores de Al aumentaram nos ápices das raízes dos dois cultivares após exposição ao Al (Fig. 2). Os acúmulos de Al nos tecidos radiculares diferiram entre os dois cultivares de arroz após tratamento com esse elemento. Os maiores teores de Al foram encontrados nas raízes do cultivar Maravilha, chegando a 21%, 20% e 18% maiores do que os observados para o cultivar Fernandes, após 3, 6 e 9 dias de tratamento com Al, respectivamente.

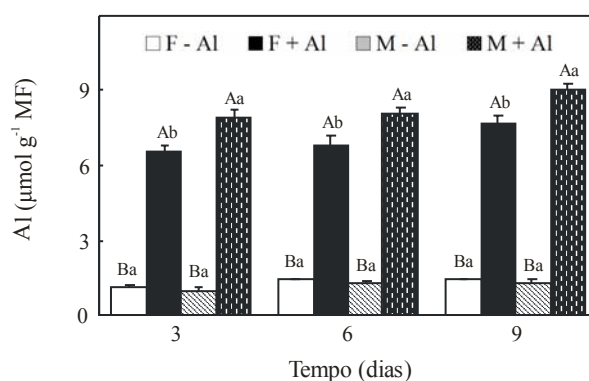


Figura 2: Teores de alumínio em ápices radiculares de dois cultivares de arroz, Fernandes (F) e Maravilha (M), após 3, 6 e 9 dias de tratamento com Al. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre os níveis de Al para o mesmo cultivar e pela mesma letra minúscula entre cultivares para o mesmo nível de Al não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barras representam o desvio padrão.

O tratamento das raízes com hematoxilina resultou na formação de coloração azul, característica da reação desse corante com o Al (Fig. 3). Os controles mostraram reação negativa ao corante indicando a ausência de Al. Na presença de Al, a reação foi positiva nos três períodos de tempo estudados. No 3º dia, a reação se restringiu ao ápice radicular, mas se intensificou e atingiu outras regiões das raízes no 6º e 9º dias de exposição ao Al (Fig. 3A, B e C). De forma geral, a coloração com a hematoxilina foi mais intensa nas raízes do cultivar Maravilha do que nas do cultivar Fernandes, principalmente no 9º dia de tratamento (Fig. 3C).

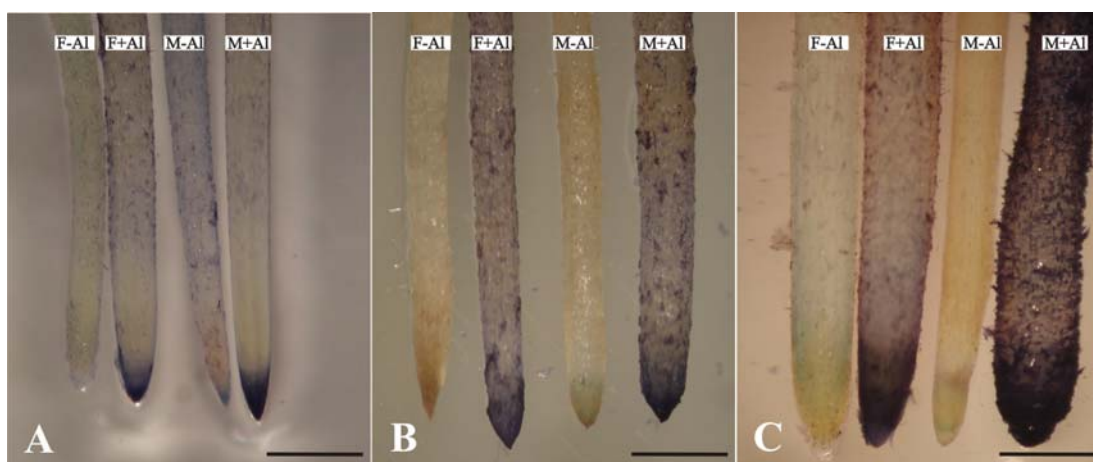


Figura 3: Detecção de Al em ápices radiculares, após coloração com hematoxilina em dois cultivares de arroz, Fernandes (F) e Maravilha (M), após 3 (A), 6 (B) e 9 dias (C) de exposição a esse metal. Barra = 1000 μ m.

Aumentos em espessura das raízes foram observados após tratamento com Al (Fig. 3). No 9º dia, quando essas diferenças foram mais notáveis, as raízes do cultivar Maravilha tratadas com Al, apresentaram diâmetro cerca de 2 vezes maiores do que as do controle. As raízes do cultivar Fernandes, contudo, mesmo após tratamento com Al por 9 dias, não apresentaram aumentos no seu diâmetro (Fig. 3C).

Utilizando microscopia eletrônica de varredura foi possível observar os danos gerados pelo Al sobre a micromorfologia das raízes do cultivar Fernandes (Fig. 4) e do cultivar Maravilha (Fig. 5). As figuras 4 (A e B) e 5 (A e B) mostram a micromorfologia, das raízes do cultivar Fernandes e Maravilha, respectivamente, aparentemente sem alterações. No 9º dia de exposição ao Al, alterações na morfologia das raízes, principalmente, na região do ápice radicular foram evidentes, tanto para o cultivar Fernandes (Fig. 4C e D), quanto para o cultivar Maravilha (Fig. 5C e D). Os danos gerados pelo Al às células dos ápices das raízes foram

caracterizados, aparentemente, pela ruptura das células da coifa e aparecimento de fendas na superfície. Pela análise das figuras 4 e 5 é possível observar que na raiz do cultivar Maravilha estes danos foram mais intensos, caracterizando sua maior sensibilidade ao Al.

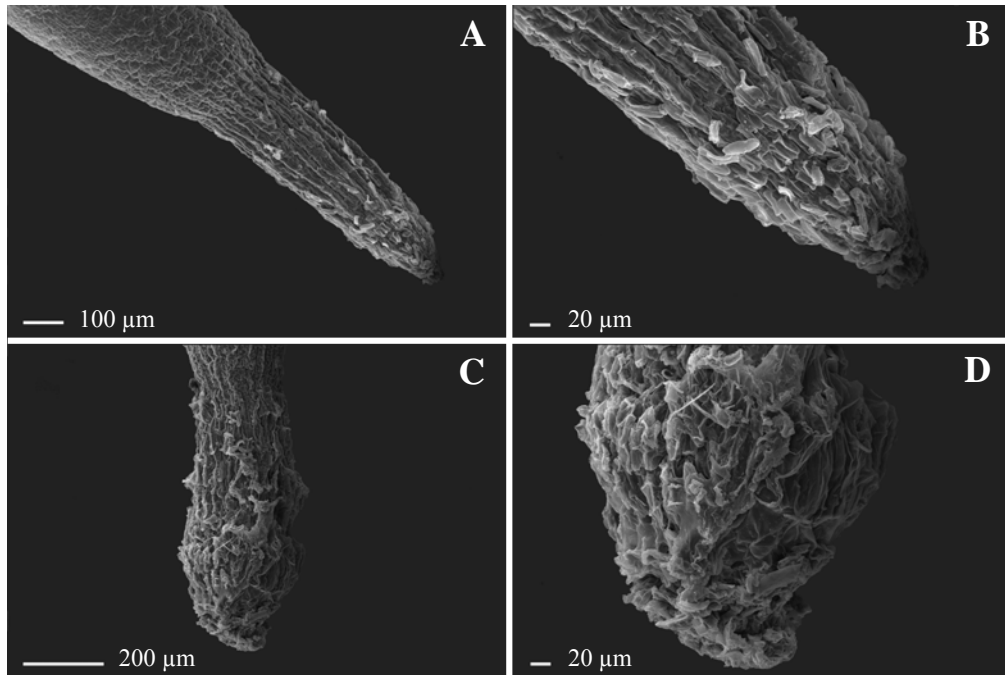


Figura 4: Micromorfologia das raízes do cultivar Fernandes após 9 dias de exposição ao Al. (A) controle em aumento de 200x; (B) controle em aumento de 500x; (C) tratamento com Al 1 mM em aumento de 200x e (D) tratamento com Al 1 mM em aumento de 500x.

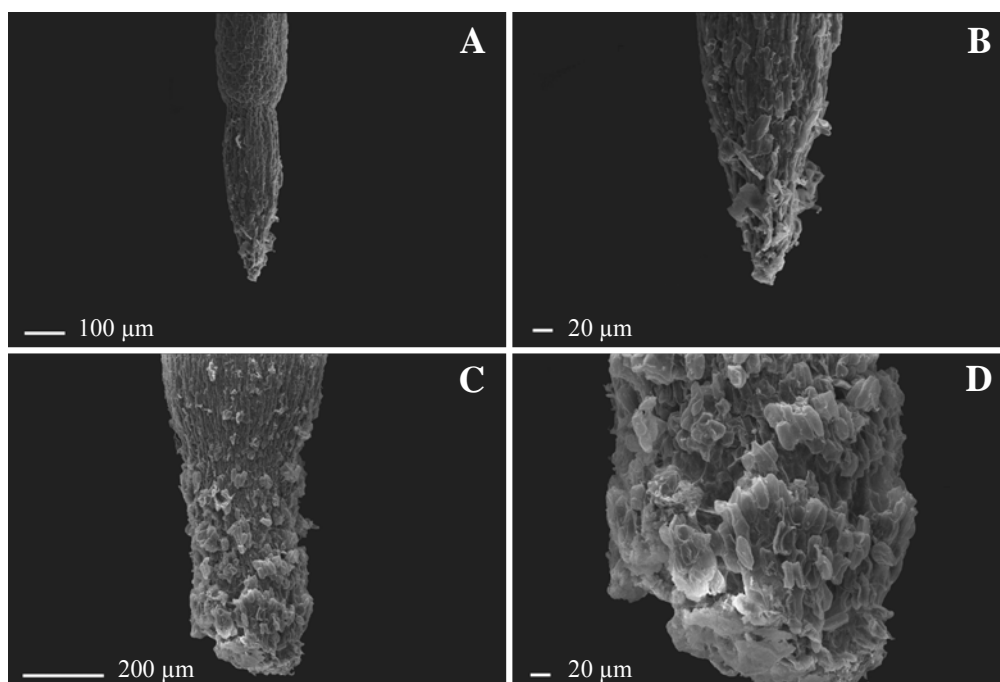


Figura 5: Micromorfologia das raízes do cultivar Maravilha após 9 dias de exposição ao Al. (A) controle em aumento de 200x; (B) controle em aumento de 500x; (C) tratamento com Al 1 mM em aumento de 200x e (D) tratamento com Al 1 mM em aumento de 500x.

4. Discussão

A toxidez por alumínio (Al) é considerada um dos principais fatores que limitam a produtividade das plantas em solos ácidos (Kochian, 1995; Tahara et al., 2008). Há, pois, grande interesse em se utilizar técnicas que minimizam os efeitos desse elemento e, ou, encontrar ou transformar cultivares com elevada tolerância ao Al, possibilitando o aumento na produtividade agrícola (Ma et al., 2004; Meriga et al., 2004; Doncheva et al., 2005; Tahara et al., 2008; Giannakoula et al., 2010).

Por estarem em contato direto com o Al, as raízes sofrem com maior intensidade os efeitos fitotóxicos desse metal (Delhaize e Ryan, 1995). Uma característica comum associada à toxicidade do Al em diferentes culturas vegetais é a redução no comprimento radicular, fato que pode ocorrer após poucas horas de exposição da planta a esse metal (Le Van et al., 1994; Goh e Lee, 1999). Contudo, o tempo para a ocorrência da inibição radicular é dependente de fatores, como: espécie vegetal, concentração de Al e tempo de exposição das plantas a esse metal (Goh e Lee, 1999, Ma et al., 2004). Neste trabalho, observou-se inibição no comprimento

radicular apenas no cultivar Maravilha, inibição esta intensificada com o aumento do tempo de exposição ao Al (Fig. 1A). A inibição radicular é uma característica amplamente utilizada para diferenciar genótipos, dentro de uma mesma espécie, quanto à tolerância ao Al (Ma et al., 2004; Doncheva et al., 2005). De modo geral, quanto maior a sensibilidade do cultivar ao Al, maior será a inibição radicular. Estas observações corroboram resultados anteriormente obtidos com esses dois cultivares que indicaram maior sensibilidade do cultivar Maravilha ao Al em relação ao Fernandes (Mendonça et al., 2005; Justino et al., 2006).

A região meristemática, localizada no ápice radicular, geralmente apresenta teores elevados de Al sendo, alvo primário da toxicidade desse metal com capacidade de inibir o crescimento radicular (Delhaize e Ryan, 1995). De maneira geral, a inibição do crescimento da raiz promovida pelo Al se deve, em parte, à sua interação com os componentes estruturais da parede celular, membrana plasmática, citoesqueleto e núcleo (Kochian et al., 2004; Miftahudin et al., 2007).

É importante ressaltar, que os processos de divisão e expansão celular estão diretamente envolvidos no crescimento das raízes (Ciamporova, 2002; Doncheva et al., 2005). A inibição do crescimento radicular induzida pelo Al se faz, primeiramente, pela inibição da expansão das células das raízes (Goh e Lee, 1999) e, posteriormente, pela inibição da divisão celular (Kochian, 1995; Matsumoto, 2000). Os efeitos do Al sobre a divisão celular parecem estar associados a sua capacidade de ligação aos grupos fosfatos do DNA, formando o complexo DNA-Al, danificando a dupla hélice e dificultando a replicação do DNA (Matsumoto, 1991; Rincón e Gonzales, 1992). Aparentemente, o Al é capaz de fragmentar as moléculas de DNA, principalmente em cultivares sensíveis (Meriga et al., 2004). Já o efeito do Al sobre alongamento celular parece ser resultado de sua capacidade de reduzir a plasticidade e elasticidade da parede celular (Ma et al., 2004). O Al^{3+} é capaz de deslocar os íons Ca^{2+} ligados aos grupos carboxílicos das moléculas de pectina (Delhaize e Ryan, 1995), provocando mudanças nas propriedades químicas e mecânicas da parede celular, resultando na sua desestabilização e aumento da rigidez (Kochian, et al., 2005). Geralmente, todas essas alterações são mais intensas em cultivares sensíveis ao Al, o que induz reduções significativas no crescimento das raízes após exposição a níveis tóxicos desse metal.

Além de reduzir o alongamento, o Al também pode reduzir a produção de massa seca das raízes (Sivaguru e Paliwal, 1993; Pereira et al., 2006; Naik et al.,

2009). No presente trabalho, apenas o cultivar Maravilha, considerado sensível ao Al, apresentou reduções significativas nos valores de massa seca radicular com o aumento no tempo de exposição ao Al (Fig. 1B). Pintro et al. (1995), de modo similar, trabalhando com dois cultivares de milho, C525-M (tolerante) e HS7777 (sensível), relataram redução expressiva na massa seca apenas para o genótipo sensível. Como o tratamento com Al resultou em aumento no diâmetro das raízes do cultivar Maravilha (Fig. 3C), a redução de massa seca observada nesse cultivar pode ser atribuída à redução no comprimento de suas raízes (Fig. 1A).

O Al pode induzir alterações morfológicas no crescimento e desenvolvimento das raízes tornando-as mais espessas (Delhaize e Ryan, 1995; Ciamporova, 2002; Zheng e Yang, 2005). Como observado, o cultivar Maravilha, no 9º dia de exposição ao Al, apresentou acentuado engrossamento em suas raízes (Fig. 3C). Este engrossamento das raízes, também observado por outros autores (Sasaki et al., 1996; Konarska, 2005), pode ser resultado do aumento em espessura das paredes celulares (Vázquez et al., 1999) após deposição de novos compostos químicos, como hemicelulose e lignina (Le Van et al., 1994; Konarska, 2005). Adicionalmente, o Al pode causar alterações no plano de divisão celular, modificando a organização dos microtúbulos e microfilamentos, resultando em divisão celular no plano radial das raízes (Blancaflor et al., 1998; Horst et al., 1999).

O Al absorvido acumula-se principalmente no ápice radicular (Delhaize e Ryan, 1995; Yamamoto et al., 2001; Pereira et al., 2010) fato confirmado, no presente trabalho, pelo teste com hematoxilina (Fig. 3). Vários trabalhos na literatura têm sugerido a existência de uma relação entre o acúmulo de Al e a intensidade de coloração com hematoxilina nos ápices radiculares (Vázquez et al., 1999; Doncheva et al., 2005; Miftahudin et al., 2007). De forma geral, quanto maior a sensibilidade da planta ao Al, maior acúmulo desse metal nos ápices radiculares e, por consequência, mais intensa a coloração por hematoxilina (Miftahudin et al., 2007). No presente estudo, o cultivar Maravilha apresentou teores mais elevados de Al nos ápices radiculares e, também, coloração mais intensa por hematoxilina do que o cultivar Fernandes, principalmente no 9º dia de exposição ao Al (Fig. 3C). Apesar dos resultados obtidos pelo teste com hematoxilina ratificarem tolerância diferencial ao Al entre os cultivares de arroz testados, Ryan e colaboradores (1993) ressaltaram que esse teste não deve ser aplicado isoladamente com esta finalidade.

Após exposição ao Al, os ápices radiculares dos dois cultivares de arroz apresentaram aumentos significativos nos teores desse metal (Fig. 2). Entre os dois cultivares, o Maravilha foi o que acumulou maiores teores de Al nos ápices radiculares, resultado que pode estar diretamente relacionado à redução no comprimento radicular e no teor de massa seca (Fig. 1A e 1B). Apesar do cultivar Fernandes apresentar aumentos nos teores de Al em suas raízes após tratamento com esse metal, os parâmetros de crescimento analisados para esse cultivar não foram significativamente alterados. Pesquisas adicionais envolvendo o cultivar Fernandes devem ser realizadas objetivando a identificação dos mecanismos de tolerância presentes nesse cultivar que conferem a ele resistência a níveis tóxicos de Al.

O Al se liga aos componentes da parede celular aumentando sua rigidez e, eventualmente, dependendo da intensidade de seus efeitos, causando a ruptura de células da rizoderme e do córtex exterior na zona de alongamento. Esses efeitos do Al sobre a morfologia das raízes foram observados nos ápices radiculares dos dois cultivares de arroz, após 9 dias de tratamento (Figs. 4 e 5). As células mais externas das raízes, por estarem em contato direto com o Al, foram os alvos primários das injúrias desse elemento, conforme observado por vários autores (Delhaize e Ryan, 1995; Ciamporova, 2002; Zheng e Yang, 2005). Dependendo da espécie vegetal e da intensidade dos efeitos do Al, as células das camadas mais externas das raízes podem se romper e, ou, se desprender do tecido (Yamamoto et al., 2001; Blamey et al., 2004; Jones et al., 2006). No presente trabalho, embora a espécie estudada seja considerada tolerante ao Al, em função da concentração (1 mM) e do tempo de exposição (9 dias), ficou evidente a ruptura das células radiculares mais externas, principalmente no cultivar Maravilha (Fig. 4C e D). Segundo Ciamporova, (2002), a interação do Al com os componentes das paredes celulares pode resultar em expansão desigual das células dentro dos tecidos radiculares gerando estresse mecânico capaz de causar destruição nos tecidos periféricos da raiz. Os resultados obtidos no presente trabalho, são semelhantes aos encontrados por Kopittke et al., (2008), que observaram ruptura nas células da rizoderme (células da epiderme e do córtex externo) em raízes de feijão, após exposição ao Al. Segundo esses autores, as células mais externas da raiz acumulam mais Al em suas paredes do que as células localizadas mais internamente. Esse fato resulta em rigidez mais acentuada nas paredes das células mais externas, reduzindo, significativamente, a taxa de expansão nessas células. Por outro lado, as células mais internas continuam a se expandir,

gerando força mecânica suficiente para romper as camadas mais externas das células da raiz, conforme é possível observar nas Figs. 4 e 5.

Os resultados encontrados no presente trabalho indicam que a maior tolerância ao Al apresentada pelo cultivar Fernandes, evidenciada em termos de maior comprimento radicular e maior produção de massa seca, pode ser atribuída ao menor acúmulo de Al nos ápices de suas raízes e, conseqüentemente, ao menor efeito desse elemento sobre a micromorfologia de suas raízes.

5. Referências bibliográficas

- Blamey, F.P.C., Nishizawa, N.K., Yoshimura, E. Timing, magnitude, and location of initial soluble aluminium injuries to mungbean roots. **Soil Sci. Plant Nutr.** 50:67–76, 2004.
- Blancaflor, E.B., Jones, D.E., Gilroy, S. Alterations in the cytoskeleton accompany aluminum- induced growth inhibition and morphological changes in primary roots of maize. **Plant Physiol.** 118:159–172, 1998.
- Čiamporová, M. Morphological and structural responses of plant roots to aluminium at organ, tissue and cellular levels. **Biol. Plant.** 45:161-171, 2002.
- Clark, R.B. Characterization of phosphatase of intact maize roots. **J. Agric. Food Chem.** 23:458-460, 1975.
- Delhaize, E., Ryan, P.R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiol.** 107:315-321, 1995.
- Doncheva, S., Amenós, M., Poschenrieder, C., Barceló, J. Roots cell patterning: a primary target for aluminium toxicity in maize. **J. Exp. Bot.** 56:1213-1220, 2005.
- Fageria, N.K., Wright, R.J., Baligar, V.C. Rice cultivars response to aluminum in nutrient solution. **Comm. Soil Sci. Plant Anal.** 19:1133-1142, 1988.
- Giannakoula, A., Moustakas, M., Syros, T., Yupsanis, T. Aluminum stress induces up-regulation of an efficient antioxidant system in the Al-tolerant maize line but not in the Al-sensitive line. **Environ. Exp. Bot.** 67:487-494, 2010.
- Goh, C-H., Lee, Y., Aluminum uptake and aluminum-induced rapid root growth inhibition of rice seedlings. **J. Plant Biol.** 42:151-158, 1999.
- Horst, W.J., Schmohl, N., Kollmeier, M., BaluLska, F., Sivaguru, M. Does aluminium affect root growth of maize through interaction with the cell wall – plasma membrane – cytoskeleton continuum? **Plant and Soil** 215:163–174, 1999.

- Jones, D.L., Blancaflor, E.B., Kochian, L.V., Gilroy, S. Spatial coordination of aluminium uptake, production of reactive oxygen species, callose production and wall rigidification in maize roots. **Plant Cell Environ.** 29:1309–1318, 2006.
- Justino, G.C., Cambraia, J., Oliva, M.A., Oliveira, J.A. Absorção e redução de nitrato em duas cultivares de arroz na presença de alumínio. **Pesq. Agropec. Bras.**, 41:1285-1290, 2006.
- Kochian, L.V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 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. **Annu. Rev. Plant Biol.** 55:459-493, 2004.
- Kochian, L.V., Piñeros, M.A., Hoekenga, O.A. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. **Plant Soil.** 274:175-195, 2005.
- Konarska, A. Changes in the development and structure of *Raphanus sativus* L. var. *radicula Pers.* Root under aluminum stress conditions. **Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus**, 4:85-97, 2005.
- Kopittke, P.M., Blamey, F.P.C., Menzies, N.W. Toxicities of soluble Al, Cu, and La include ruptures to rhizodermal and root cortical cells of cowpea. **Plant Soil**, 303:217–227, 2008.
- Le Van, H., Kuraishi, S., Sakurai, N. Aluminum-induced rapid root inhibition and changes in cell-wall components of squash seedlings. **Plant Physiol.** 106:971-976, 1994.
- Ma, J.F., Ryan, P.R., Delhaize, E. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. **Trends Plant Sci.** 6: 273–278, 2001.
- Ma, J.F., Shen, R., Nagao, S., Tanimoto, E. Aluminium targets elongating cells by reducing cell wall extensibility in wheat roots. **Plant Cell Physiol.** 45:583-589, 2004.
- 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 Physiol.** 43:652–659, 2002.
- Matsumoto, M. Biochemical mechanism of the toxicity of aluminium and the sequestration of aluminium in plant cells. In: Wright RJ, Baligar VC, Murrmann RP (eds) **Plant-Soil Interactions at Low pH**. Kluwer, Dordrecht 825–838, 1991.
- Matsumoto H. Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. **Int. Rev. Cytol.** 200:1-46, 2000.

- Mendonça, R.J., Cambraia, J., Oliva, M.A., Oliveira, J.A. Capacidade de cultivares de arroz de modificar o pH de soluções nutritivas na presença de alumínio. **Pesq. Agropec. Bras.**, 40:447-452, 2005.
- 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*). **J. Plant Physiol.** 161, 63-68, 2004.
- Miftahudin., Nurlaela., Juliarni. Uptake and distribution of aluminum in root apices of two rice varieties under aluminum stress. **J. Bioscience.** 14:110-114, 2007.
- Naik, D., Smith, E., Cumming, J.R. Rhizosphere carbon deposition, oxidative stress and nutritional changes in two poplar species exposed to aluminum. **Tree Physiology** 29:423–436, 2009.
- Pereira, L.B., Mazzanti, C.M., Gonçalves, J.F., Cargnelutti, D., Tabaldi, L.A., Becker, A.G., Calgaroto, N.S., Farias, J.G., Battisti, V., Bohrer, D., Nicoloso, F.T., Morsch, V.M., Schetinger, M.R.C. Aluminum-induced oxidative stress in cucumber. **Plant Physiol. Biochem.** 48:683-689, 2010.
- Pereira, L.B., Tabaldi, L.A., Gonçalves, J.F., Jucoski, G.O., Pauletto, M.M., Weis, S.M., Nicoloso, F.T., Borher, D., Rocha, J.B.T., Schetinger, M.R.C. Effect of aluminum on d-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) and the development of cucumber (*Cucumis sativus* L). **Environ. Exp. Bot.** 57:106-115, 2006.
- Pintro, J., Barloy, J., Fallavier, P. Aluminium toxicity in corn plants cultivated in a low ionic strength nutrient solution. I. Discrimination of two corn cultivars. **R. Bras. Fisiol. Veg.** 7: 121-128, 1995.
- Polle, E., Konzak, C.F., Kittrick, J.A. Visual detection of aluminum tolerance leaves in wheat by hematoxylin staining of seedling roots. **Crop Science.** 18: 823-827, 1978.
- Rincón, M., Gonzáles, A. Aluminum partitioning in intact roots of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. **Plant Physiol.** 99: 1021-1028, 1992.
- Ryan, P.R., Ditomaso, J.M., Kochian, L.V. Aluminium toxicity in roots: an investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. **J. Experimental Botany** 44:437-446, 1993.
- Ryan, P.R., Shaff, J.E., Kochian, L.V. Aluminum toxicity in roots: correlation among ionic currents, ion fluxes, and root elongation in aluminum-sensitive and aluminum-tolerant cultivars. **Plant Physiol.** 99:1193-1200, 1992.
- Sasaki, M., Yamamoto, Y., Matsumoto, H. Lignin deposition induced by aluminium in wheat (*Triticum aestivum*) roots. **Physiol. Plant.** 96:193-198, 1996.
- Sivaguru, M., Paliwal, K. Differential aluminum tolerance in some tropical rice cultivars. I. Growth-performance. **J. Plant Nutr.** 16:1705-1716, 1993.

- Sivaguru, M., Paliwal, K. Differential aluminum tolerance in some tropical rice cultivars. II. Mechanism of aluminum tolerance. **J. Plant Nutr.** 16: 1717-1732. 1993.
- Tahara, K., Yamanoshita, T., Norisada, M., Hasegawa, I., Kashima, H., Sasaki, S., Kojima, K. Aluminum distribution and reactive oxygen species accumulation in root tips of two *Melaleuca* trees differing in aluminum resistance. **Plant Soil.** 307:167-178, 2008.
- Vázquez, M.D., Poschenrieder, C., Corrales, I., Barceló, J. Change in apoplastic aluminum during the initial growth response to aluminum by roots of a tolerant maize variety. **Plant Physiol.** 119:435-444, 1999.
- Wang, Y-S., Yang, Z-M. Nitric oxide reduces aluminum toxicity by preventing oxidative stress in the roots of *Cassia tora* L. **Plant Cell Physiol.** 46: 1915-1923, 2005.
- Yamamoto, Y., Kobayashi, Y., Matsumoto, H. Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminium, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. **Plant Physiol.** 125:199–208, 2001.
- Zheng, S.J., Yang, J.L. Target sites of aluminum phytotoxicity. **Biol. Plant.** 49:321-331, 2005.

CAPÍTULO II

ALTERAÇÕES NO SISTEMA ASCORBATO EM RESPOSTA AO ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO PELO ALUMÍNIO EM RAÍZES DE ARROZ

Resumo

A exposição de plantas a níveis tóxicos de Al pode elevar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e, conseqüentemente, induzir estresse oxidativo. No presente trabalho, analisou-se a relação entre toxicidade do Al, o estresse oxidativo e os sistemas de defesa antioxidativos nas raízes de dois cultivares de arroz: Fernandes (CNA-1158) e Maravilha (CNA-6843-1), considerados tolerante e sensível ao Al, respectivamente. O teor de ROS, a peroxidação de lipídios, a atividade das enzimas e o teor de ascorbato foram modificados nas raízes desses dois cultivares de arroz após exposição a níveis tóxicos de Al durante 9 dias. Nas raízes do cultivar Maravilha, observou-se maior acúmulo de ROS e, conseqüentemente, maior peroxidação de lipídios. No cultivar Fernandes, os níveis de ROS e de peroxidação de lipídios foram menores, caracterizando maior tolerância desse cultivar ao Al. A tolerância do cultivar Fernandes ao Al deve estar relacionada com a maior atividade das enzimas antioxidativas e à melhor utilização do ascorbato como molécula de defesa. De forma geral, as enzimas SOD, APX, CAT e POX apresentaram maiores atividades nas raízes desse cultivar resultando em danos oxidativos menos intensos. A melhor utilização do ascorbato como molécula antioxidativa pelo cultivar Fernandes foi evidenciada pela maior taxa de regeneração de ascorbato reduzido (AA), pela redução no teor de desidroascorbato (DHA) e pelo aumento na razão AA/DHA após o tratamento das raízes com Al. Os resultados encontrados indicam que a atuação mais eficiente desses mecanismos de defesa antioxidativos nas raízes do cultivar Fernandes na presença de Al resulta em menor acúmulo de ROS e, conseqüentemente, em menor dano oxidativo imposto pelas espécies reativas.

Palavras-chave: enzimas antioxidativas, ascorbato, peróxido de hidrogênio, radical ânion superóxido, estresse oxidativo, *Oryza sativa*

1. Introdução

O alumínio (Al) é um elemento capaz de induzir estresse oxidativo nas plantas, modificando o metabolismo vegetal devido sua interferência no estado de oxido-redução de certos componentes celulares, resultando no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Richards et al., 1998; Ezaki et al., 2000; Tamás et al., 2006).

As ROS podem acumular nos tecidos vegetais atingindo níveis tóxicos capazes de levar as células à morte (Mittler, 2002). Apesar de não se conhecer com precisão o modo de ação das ROS sobre as estruturas celulares e as diversas rotas metabólicas envolvidas, sabe-se que as plantas podem ativar sistemas de defesa capazes de reduzir e, ou, eliminar esses radicais (Boscolo et al., 2003; Kuo e Kao, 2003; Darkó et al., 2004; Simonovicová et al., 2004).

Os sistemas de defesa envolvidos na eliminação das ROS produzidas em respostas aos estresses oxidativos parecem envolver mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos (Scandalios, 1993; Mittler, 2002). As principais enzimas envolvidas no controle homeostático das ROS são: superóxido dismutase (SOD), peroxidase do ascorbato (APX), catalase (CAT) e peroxidase (POX). A SOD é considerada enzima antioxidativa da primeira linha de defesa no combate às ROS, transmutando os radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$) à forma de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Alscher et al., 2002). As enzimas APX, CAT e POX, por sua vez, complementam o processo de eliminação das ROS transformando o H_2O_2 em água (Mittler, 2002). Segundo Ezaki et al. (2000), níveis tóxicos de Al embora resultem no aumento da produção das ROS, também induzem a superexpressão de genes que codificam a síntese ou a ativação de enzimas relacionadas ao sistema de defesa antioxidativo das plantas. A ativação desses sistemas resulta na redução dos níveis das ROS (Simonovicová et al., 2004), minimizando ou evitando seus danos sobre o metabolismo celular (Breusegem et al., 2001).

O sistema de defesa não-enzimático é representado, principalmente, pelos metabólitos ascorbato (AA) e glutathiona (GSH) que atuam como importantes antioxidantes celulares (Noctor e Foyer, 1998). O ascorbato promove a manutenção do estado redox, estando presente em praticamente todos os compartimentos celulares (Smirnoff, 2000). Esse metabólito desempenha várias funções no interior das células, com destaque para a sua atuação como molécula antioxidativa,

promovendo a eliminação das ROS (Horemans et al., 2000; Dipierro et al., 2005; Ishikawa et al., 2006). Certas ROS, como o oxigênio “singlete” ($^1\text{O}_2$) e os radicais superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e hidroxila ($^{\bullet}\text{OH}$) podem ser eliminadas por reação direta com o ascorbato, no chamado mecanismo de defesa não-enzimático (Noctor e Foyer, 1998). Já o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), pode ser eliminado por meio da reação catalisada pela enzima peroxidase do ascorbato (APX), na qual, o ascorbato, é utilizado como doador de elétrons (Potters et al., 2002).

O ascorbato, junto com as enzimas peroxidase do ascorbato (APX), redutase do monodesidroascorbato (MDHAR) e redutase do desidroascorbato (DHAR) participam do sistema ascorbato (Dipierro et al., 2005). O sistema ascorbato parece estar interligado à molécula de glutathione, formando um mecanismo de defesa antioxidativo integrado conhecido como ciclo ascorbato-glutathione (Kuzniak e Sklodowska, 2004; Aravind e Prasad, 2005). Segundo Drazkiewicz et al. (2003), este mecanismo de defesa exerce papel crucial na remoção das ROS, permitindo a manutenção da homeostase celular.

A primeira etapa do sistema ascorbato envolve reação catalisada pela enzima peroxidase do ascorbato (APX) que utiliza ascorbato para transformar o H_2O_2 em água e monodesidroascorbato (MDHA). A regeneração do ascorbato pode ocorrer pela reação não-enzimática do MDHA ou pela ação de duas outras enzimas: redutase do monodesidroascorbato (MDHAR) e redutase do desidroascorbato (DHAR). A MDHAR utiliza NADPH para reduzir o MDHA a AA, enquanto a DHAR utiliza o poder redutor da GSH na recuperação do AA (Noctor e Foyer, 1998). Aumento na taxa de regeneração do AA resulta em aumento na razão AA/DHA, sendo considerado importante indicador da eficiência do sistema ascorbato como mecanismo de defesa antioxidativo (Mittler, 2002).

O Al pode interferir sobre os componentes do sistema ascorbato, através de mudanças na atividade das enzimas e no teor de ascorbato (Dipierro et al., 2005). Determinadas alterações impostas por níveis tóxicos de Al sobre os componentes do sistema ascorbato já foram relatadas em algumas espécies vegetais (Devi et al., 2003; Dipierro et al., 2005; Sharma e Dubey, 2007; Tabaldi et al., 2009). Algumas dessas espécies podem utilizar concomitantemente ao sistema ascorbato outros tipos de mecanismos de defesa para combater os possíveis danos gerados por esse metal (Aravind e Prasad, 2005; Sharma e Dubey, 2007). Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivos avaliar os efeitos do Al sobre o sistema ascorbato e o

sistema de defesa antioxidativo enzimático que controlam os níveis das ROS, em dois cultivares de arroz com tolerância diferencial ao Al.

2. Material e métodos

2.1. Material vegetal e condições de crescimento

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 pela Embrapa - Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão.

As sementes dos dois cultivares, selecionadas quanto ao tamanho e forma, foram tratadas com ácido sulfúrico 98% (v/v), por 1 minuto. Em seguida, foram lavadas em água corrente e esterilizadas superficialmente com hipoclorito de sódio 3% (v/v) por 15 minutos, e então, lavadas novamente em água corrente e enxaguadas em água desionizada. As sementes foram germinadas em rolos de papel germitest mergulhados em solução nutritiva de Clark (Clark, 1975), pH 4,0, com um terço da força iônica original, sob aeração contínua.

Plântulas com 12 dias de idade 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_3 , durante 3, 6 e 9 dias. O experimento foi conduzido em sala de crescimento com temperatura controlada ($25 \pm 3^\circ\text{C}$), fluxo de radiação fotossinteticamente ativa de $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h. As soluções nutritivas foram continuamente aeradas, os pHs ajustados diariamente para 4,0 e renovadas a cada 3 dias.

A cada 3 dias, após início do experimento, as raízes foram colhidas, lavadas em água corrente e enxaguadas em água desionizada e, então, amostras foram retiradas para as diversas análises químicas.

2.2. Determinação do efeito do Al sobre a produção de ROS

Para a determinação do teor de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), aproximadamente 0,2 g de tecidos radiculares foram macerados em nitrogênio

líquido e homogêneo em 2 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,5, contendo hidroxilamina 1 mM. Após filtração, o homogêneo foi centrifugado a 10.000 g por 15 min, a 4°C. Alíquotas de 100 µL do sobrenadante foram adicionadas a 1,9 mL de um meio de reação constituído de FeNH₄(SO₄) 250 µM, ácido sulfúrico 25 mM, laranja de xilenol 250 µM e sorbitol 100 mM. Após 30 min no escuro, as absorvâncias das amostras foram determinadas a 560 nm (Gay e Gebicki, 2000). Brancos dos reagentes e dos extratos vegetais foram preparados em paralelo e subtraídos da amostra. Os teores de H₂O₂ foram estimados com base em curva de calibração preparada com padrões autênticos de H₂O₂.

Para a determinação do teor de ânion superóxido (O₂^{•-}) amostras de 50 mg de ápices radiculares de aproximadamente 1 cm foram incubadas em 2 mL de um meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,8, Na₂EDTA 0,1 mM e NADH 20 µM (Mohammadi e Karr, 2001). A reação foi iniciada pela adição de 100 µL de epinefrina 25,2 mM (recém-preparada em HCl 0,1N). As amostras foram agitadas por 5 min a 28°C. O tecido foi, então, removido e o slope/min medido a 480 nm durante 5 min. O branco foi realizado sob as mesmas condições, mas sem tecido vegetal. A quantidade de adenocromo formado foi estimada usando-se o coeficiente de extinção molar de 4.0 10³ M⁻¹ cm⁻¹ (Boveris, 1984).

2.3. Determinação do efeito do Al sobre a peroxidação de lipídios

A intensidade da peroxidação de lipídios nas raízes foi estimada pela concentração de malonaldeído (MDA) produzido após reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) (Cakmak e Horst, 1991). Aproximadamente 0,2 g de tecidos radiculares foram macerados em nitrogênio líquido, homogêneo em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 1% (p/v) e centrifugado a 12.000 g por 15 min, a 4°C. Alíquotas de 0,5 mL dos sobrenadantes foram adicionadas a 1,5 mL de uma solução de TBA 0,5% (p/v) em TCA 20% (p/v) e incubadas em banho-maria a 95°C. Após 30 min, a reação foi paralisada, os tubos foram centrifugados a 10.000 g por 10 min e as absorvâncias dos sobrenadantes determinadas a 532 e 600 nm. A concentração do complexo aldeído malônico-TBA foi estimada usando-se o coeficiente de extinção molar de 155 mM⁻¹ cm⁻¹ (Heath e Packer, 1968).

2.4. Ensaio enzimáticos

2.4.1. Extração das enzimas

Para a determinação das atividades enzimáticas, 0,3 g de tecidos radiculares foram macerados em N₂ líquido, seguido da adição de 2 mL de meio de homogeneização constituído de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, EDTA 0,1 mM, PMSF 1 mM e PVPP 1% (p/v) para as enzimas SOD, APX, CAT e POX (Peixoto et al., 1999); tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8 e ascorbato 1 mM para a enzima MDHAR (Eltayeb et al., 2007) e tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM, EDTA 2 mM e MgCl₂ 1 mM para a enzima DHAR (Chen e Gallie, 2006). Em todos os casos, o homogeneizado foi filtrado e centrifugado a 12.000 g por 15 min a 4°C e os sobrenadantes usados como fonte bruta de enzima.

2.4.2. Superóxido dismutase (SOD – EC 1.15.1.1)

A atividade da SOD foi determinada pela adição de 30 µL do extrato enzimático bruto a um meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, contendo metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 µM, EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 µM (Del Longo et al., 1993). A reação foi conduzida a 25°C numa câmara de reação sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W. Após 5 min de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul produzida pela fotorredução do NBT medida a 560 nm (Giannopolitis e Ries, 1977). Um meio de reação exatamente igual ao anterior, mas mantido no escuro, por igual tempo, serviu de branco e foi subtraído das leituras das amostras que receberam iluminação. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade da enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT.

2.4.3. Peroxidase do ascorbato (APX – EC 1.11.1.11)

A atividade da APX foi determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto a 2,9 mL de um meio de reação consistindo de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, ácido ascórbico 0,8 mM e H₂O₂ 1 mM (Peixoto et al., 1999). O meio de reação foi incubado a 30°C e a variação na absorvância medida a

290 nm durante o primeiro minuto de reação. A atividade enzimática foi estimada usando-se o coeficiente de extinção molar $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.4.4. *Catalase (CAT – EC 1.11.1.6)*

A atividade da CAT foi determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto a 2,9 mL de um meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H_2O_2 12,5 mM (Peixoto et al., 1999). O meio de reação foi incubado a 30°C e a variação na absorvância medida a 240 nm durante o primeiro minuto de reação. A atividade enzimática foi estimada usando-se o coeficiente de extinção molar $36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.4.5. *Peroxidase (POX – EC 1.11.1.7)*

A atividade da POX foi determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto a 2,9 mL de um meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e H_2O_2 20 mM (Peixoto et al., 1999). O meio de reação foi incubado a 30°C e a variação na absorvância medida a 420 nm durante o primeiro minuto de reação. A atividade enzimática foi estimada usando-se o coeficiente de extinção molar $2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.4.6. *Monodesidroascorbato redutase (MDHAR – EC 1.6.5.4)*

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

2.4.7. *Desidroascorbato redutase (DHAR – EC 1.8.5.1)*

A atividade da DHAR foi determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto a 0,9 mL de um meio de reação constituído de tampão fosfato de

potássio 50 mM, pH 7,0, DHA 2 mM e GSH 5 mM (Nakano e Asada 1981). O meio de reação foi incubado a 30°C e a variação na absorvância medida a 265 nm durante o primeiro minuto de reação. A atividade enzimática foi estimada usando-se o coeficiente de extinção molar $14 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.5. Determinação das atividades das enzimas antioxidativas em PAGE não desnaturante

Extratos enzimáticos, obtidos conforme descrito no item 2.4.1. foram aplicados em placas contendo géis de poliacrilamida, constituídos de gel de separação 9% e gel de empilhamento 4%, preparados conforme descrito por Laemmli (1970), e submetidos a uma corrente constante de 30 mA/gel por 8 h para APX e 7 h para CAT, sob condição não desnaturante, à 4°C. Os tampões de eletroforese foram preparados, também, conforme descrito por Laemmli (1970).

Decorridos os tempos de separação eletroforética, os géis foram revelados para atividade da APX e CAT conforme descrição a seguir.

2.5.1. Peroxidase do Ascorbato

O gel, após a corrida eletroforética, foi equilibrado em solução constituída de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0 e ascorbato 2 mM, durante 30 min. Em seguida, o gel foi incubado em solução constituída de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0, ascorbato 4 mM e H_2O_2 2 mM por um período de 20 min. Subsequentemente, o gel foi lavado em água deionizada e submergido em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, TEMED 28 mM e NBT 2,45 mM, com leve agitação, durante, aproximadamente 10 min (Lee e Lee, 2000).

2.5.2. Catalase

Após corrida eletroforética, o gel foi incubado por 10 min em H_2O_2 0,003% (v/v) à temperatura ambiente. Em seguida, o gel foi lavado e introduzido por 10 min na solução de revelação, constituída de cloreto férrico 1% (p/v) e ferricianeto de potássio 1% (p/v), conforme descrito por (Srivalli et al., 2003).

2.5.3. Fotodocumentação dos géis

Em todos os casos, após revelação de cada enzima, os géis foram analisados pelo programa Alpha Digi Doc 1201 e fotografados com máquina fotográfica digital (Olympus C-4000).

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

Para a determinação dos teores de ascorbato (AA) e desidroascorbato (DHA), amostras de tecidos radiculares foram homogeneizadas em 2 mL de TCA 6% (p/v), filtradas e centrifugadas a 15.000 g por 5 min a 4°C (Kampfenkel et al., 1995). O teor total de ascorbato (AA + DHA) foi determinado em alíquotas dos extratos tratadas com DTT 0,5 mM e tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,4, na temperatura de 42°C, por 15 min. Adicionou-se, então, N-etilmaleimida 0,025% (p/v), TCA 2,5% (p/v), H₃PO₄ 8,4% (v/v), 2,2'-dipiridil 0,8% (p/v) e FeCl₃ 0,3% (p/v) e incubou-se novamente a 42°C, por 40 min. Após paralisação da reação em banho de gelo, a absorvância foi determinada a 525 nm. O teor de ascorbato (AA) foi determinado, conforme descrito anteriormente, mas omitindo-se o DTT e o N-etilmaleimida. O teor de DHA foi calculado pela diferença entre o teor total (AA + DHA) e o teor da forma reduzida (AA). Os teores de AA, DHA e ascorbato total foram estimados com base em curva de calibração preparada com padrões autênticos de ascorbato.

2.7. Determinação de proteína

Os teores de proteínas dos extratos enzimáticos foram determinados pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando BSA como padrão.

2.8. Delineamento experimental e análise estatística

Os tratamentos foram dispostos no delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2x3: dois cultivares de arroz (Fernandes e Maravilha), dois níveis de Al (0 e 1 mM) e três tempos de tratamento com Al (3, 6 e 9 dias), com três repetições. Exclusivamente para a determinação dos teores de ascorbato (AA) e

desidroascorbato (DHA), foram utilizados quatro tempos de tratamento com Al (0, 3, 6 e 9 dias).

Os resultados foram submetidos a análises de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. As análises foram efetuadas utilizando o programa estatístico “SAEG”, da Fundação Arthur Bernardes, da Universidade Federal de Viçosa, versão 9.0.

3. Resultados

Nas raízes do cultivar Fernandes observou-se aumento nos teores de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ao longo do tempo, contudo na presença de Al esses valores foram sempre menores que o controle (Fig. 1a). Já para o cultivar Maravilha, valores menores que os dos controles foram observados apenas no 9º dia de estresse com Al (Fig. 1b).

No 3º dia de tratamento com Al, não houve diferença significativa nos teores de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) nas raízes dos dois cultivares de arroz (Fig. 1c e 1d). Entretanto, após esse tempo, o tratamento das plantas com Al provocou redução nos teores do ânion superóxido nas raízes do cultivar Fernandes e aumento nas raízes do cultivar Maravilha. Dessa forma, os teores de ânion superóxido nas raízes do cultivar Maravilha foram mais elevados, com valores 47% e 59% maiores que no cultivar Fernandes, após 6 e 9 dias de tratamento com Al, respectivamente.

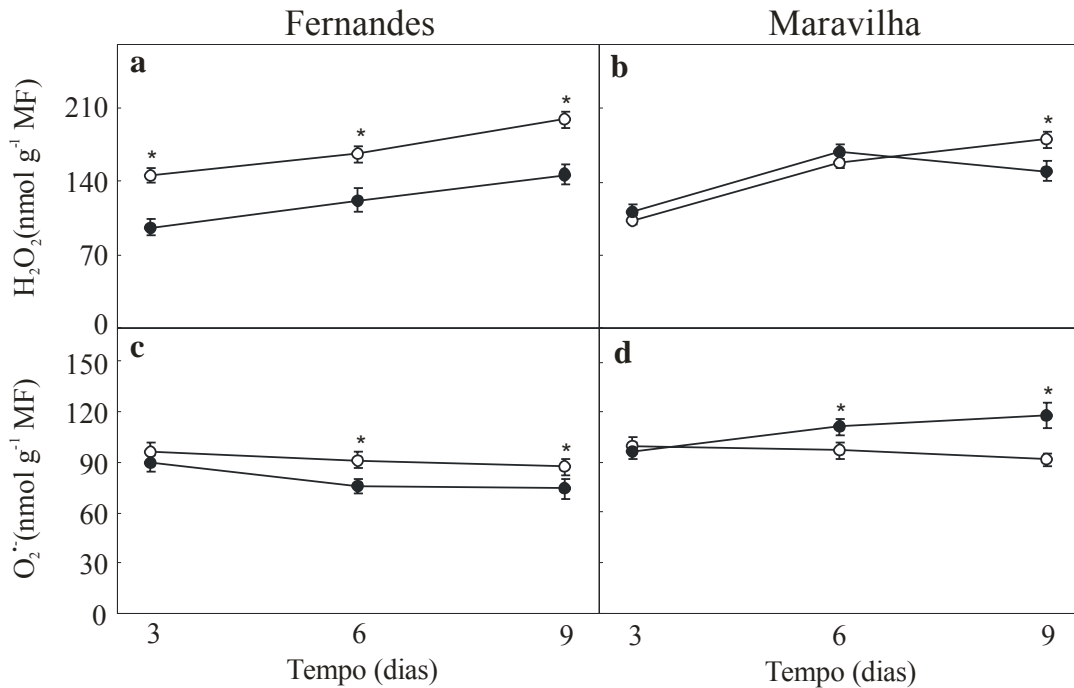


Figura 1: Teores de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em raízes dos cultivares de arroz Fernandes e Maravilha após 3, 6 e 9 dias de exposição a 0 mM (○) ou 1 mM (●) de Al. Asterisco denota diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo cultivar ($p \leq 0.05$). Barras representam o desvio padrão.

A peroxidação de lipídios não foi modificada nas raízes do cultivar Fernandes após o tratamento com Al (Fig. 2a). Na presença de Al, a taxa de peroxidação de lipídios foi maior nas raízes do cultivar Maravilha, que apresentou, em relação aos controles, índices de peroxidação de lipídios 22% e 29% maiores após 6 e 9 dias de tratamento com esse metal, respectivamente (Fig. 2b).

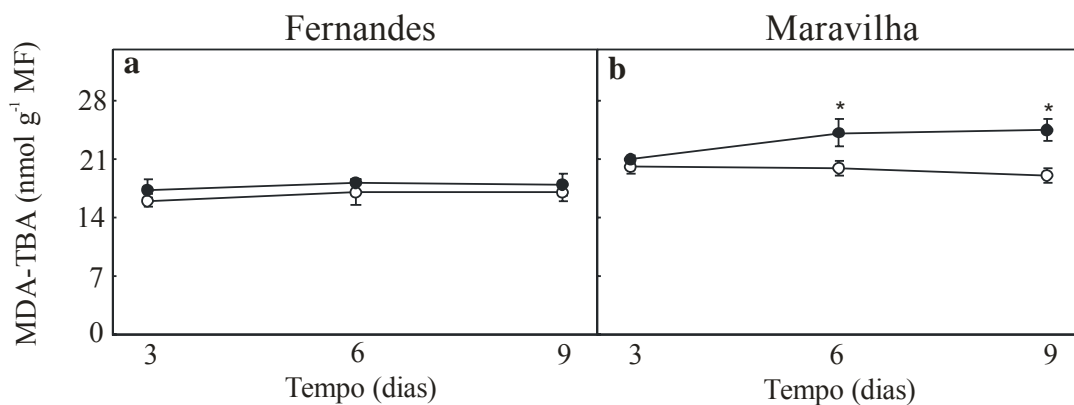


Figura 2: Peroxidação de lipídios em raízes dos cultivares de arroz Fernandes e Maravilha após 3, 6 e 9 dias de exposição a 0 mM (○) ou 1 mM (●) de Al. Asterisco denota diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo cultivar ($p \leq 0.05$). Barras representam o desvio padrão.

Nas raízes do cultivar Fernandes, após exposição ao Al, a atividade da superóxido dismutase (SOD) foi sempre maior que nos controles, com aumentos de 20%, 19% e 11% após 3, 6 e 9 dias, respectivamente (Fig. 3a). Já nas raízes do cultivar Maravilha, a atividade da SOD foi 6% menor que no controle, durante o 3º dia de exposição ao Al, não sendo modificada após esse tempo (Fig. 3b).

A atividade da peroxidase do ascorbato (APX) nas raízes do cultivar Fernandes foi 20%, 35% e 57% maior que nos respectivos controles, após 3, 6 e 9 dias de tratamento com Al (Fig. 3c). No caso do cultivar Maravilha, observou-se atividade da APX maior que no controle (54%) apenas no 9º dia de tratamento com Al (Fig. 3d). Após a exposição ao Al, a atividade da APX foi sempre maior nas raízes do cultivar Fernandes. Para os dois cultivares de arroz, a eletroforese em PAGE não-desnaturante do extrato enzimático da APX mostrou a presença de apenas quatro isoformas dessa enzima, independente do tratamento com Al (Fig. 4A e 4B). As isoformas 1 e 2 foram as que apresentaram as maiores atividades em gel. Nos dois cultivares, a atividade da isoforma 2 decresceu com o tempo nas plantas-controle, mas cresceu com o tempo de exposição ao Al.

A atividade da enzima catalase (CAT) aumentou com o tempo de tratamento nos dois cultivares de arroz, independente da presença de Al (Fig. 3e e 3f). Os aumentos na atividade da CAT após exposição das plantas ao Al foram maiores nas raízes do cultivar Fernandes. Nesse cultivar, as atividades da CAT foram 78%, 68% e 79% maiores que nos respectivos controles, após 3, 6 e 9 dias de exposição ao Al. Por sua vez, no cultivar Maravilha, as atividades enzimáticas foram 28%, 25% e 43% maiores que nos controles após os mesmos intervalos de exposição ao Al. A eletroforese em PAGE não-desnaturante do extrato enzimático da CAT mostrou o aparecimento de novas isoformas nas raízes dos dois cultivares de arroz, independente da presença de Al (Fig 5A e 5B). Foram observadas de 3 a 5 isoformas da CAT, dependendo do tempo e da presença de Al. A isoforma 1 foi a que apresentou a maior atividade, principalmente após o tratamento das plantas com Al. No 9º dia, foram observadas apenas as isoformas 1, 2 e 4 nas raízes das plantas tratadas com Al, enquanto no tratamento controle foram constatadas 4 isoformas no cultivar Fernandes e 5 isoformas no cultivar Maravilha.

A atividade da peroxidase (POX) aumentou do 3º para o 6-9º dia, independente da presença de Al (Fig. 3g e 3h). Na presença de Al, observou-se aumentos na atividade dessa enzima a partir do 6º dia no cultivar Fernandes e apenas

no 9º dia no cultivar Maravilha. No 9º dia, as atividades da POX foram 41% e 14% maiores que nos respectivos controles dos cultivares Fernandes e Maravilha após tratamento com Al.

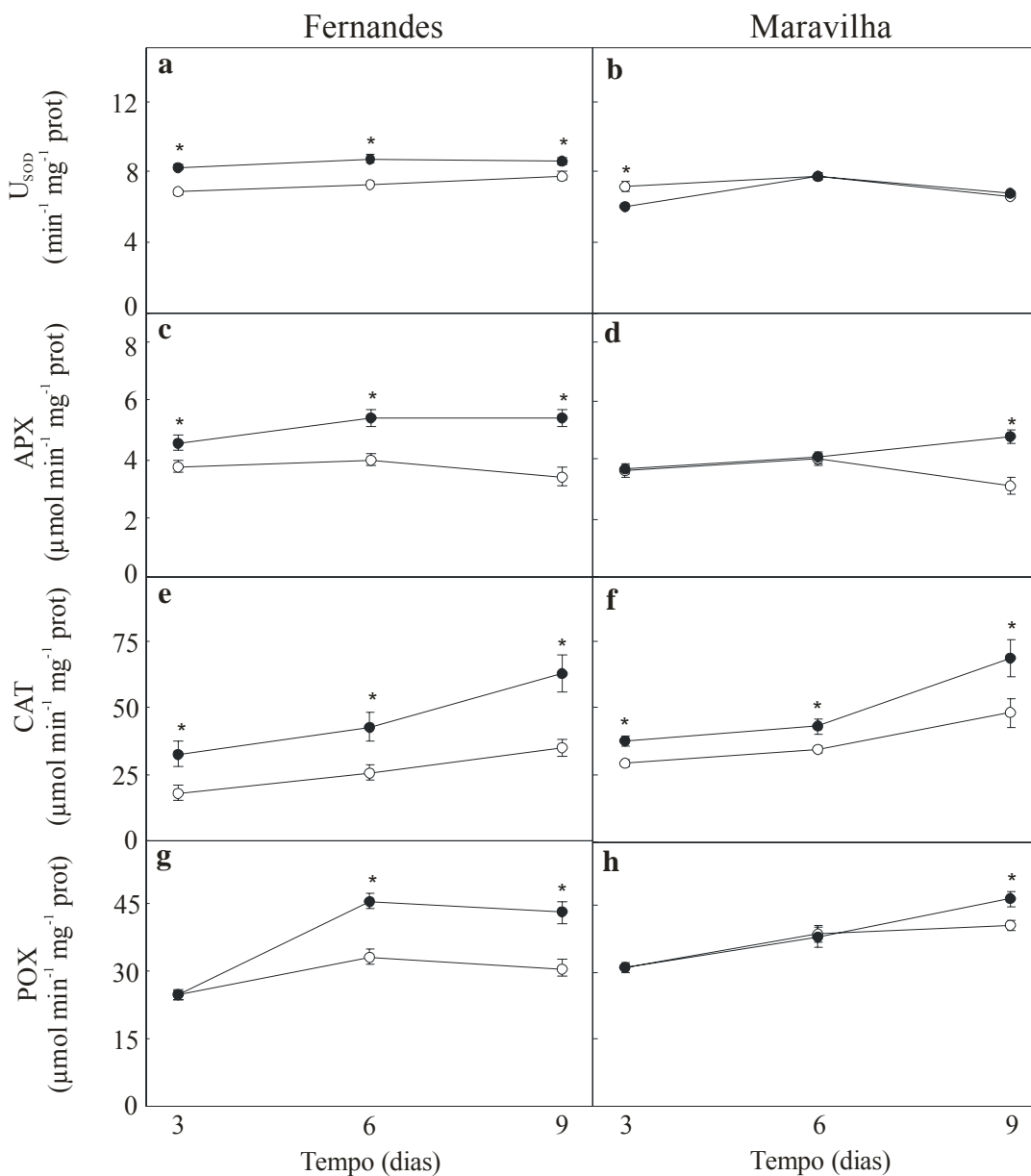


Figura 3: Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), peroxidase do ascorbato (APX), catalase (CAT) e peroxidase (POX) em raízes dos cultivares de arroz Fernandes e Maravilha após 3, 6 e 9 dias de exposição a 0 mM (○) ou 1 mM (●) de Al. Asterisco denota diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo cultivar ($p \leq 0.05$). Barras representam o desvio padrão.

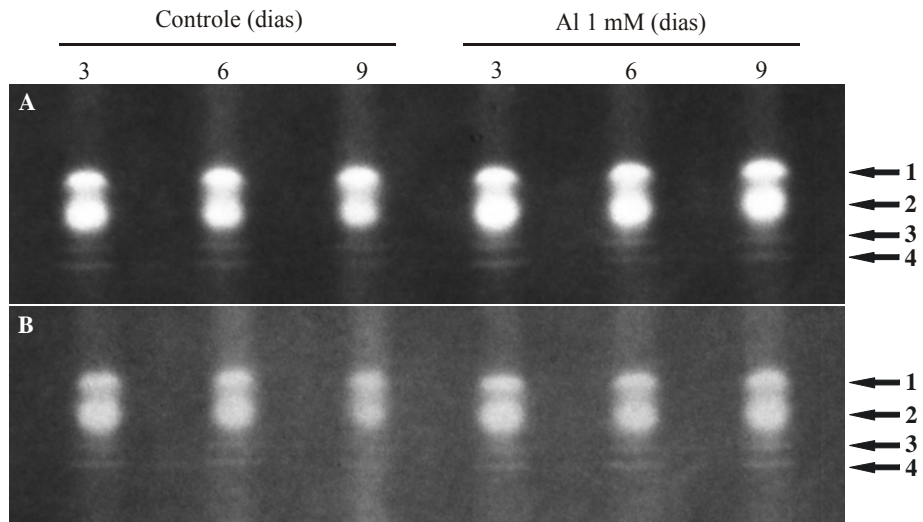


Figura 4: Atividade da APX em PAGE não-desnaturante em raízes dos cultivares de arroz Fernandes (A) e Maravilha (B) após 3, 6 e 9 dias de tratamento com alumínio. Setas representam as isoformas da enzima.

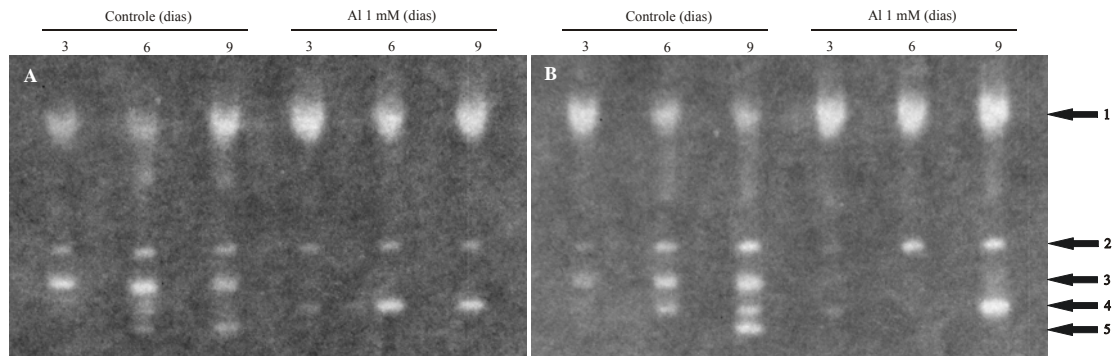


Figura 5: Atividade da CAT em PAGE não-desnaturante em raízes dos cultivares de arroz Fernandes (A) e Maravilha (B) após 3, 6 e 9 dias de tratamento com alumínio. Setas representam as isoformas da enzima.

Após 3 e 6 dias de tratamento com Al as atividades da monodesidroascorbato redutase (MDHAR) foram 15% e 18% maiores nos respectivos controles nas raízes do cultivar Fernandes (Fig. 6a). No cultivar Maravilha, a atividade dessa enzima foi maior que no controle apenas no 6º dia de tratamento com Al (Fig. 6b). Após esse tempo, não houve alteração significativa na atividade dessa enzima em nenhum dos cultivares analisados.

Após exposição das raízes do cultivar Maravilha ao Al, a atividade da desidroascorbato redutase (DHAR) no 3º dia foi menor que no controle, no 6º dia não apresentou diferenças significativas, mas foi cerca de 11% maior que no controle no 9º dia de exposição a esse metal (Fig. 6d). No cultivar Fernandes, observou-se maior

atividade dessa enzima em relação ao controle (14%) apenas no 9º dia de tratamento com Al (Fig. 6c).

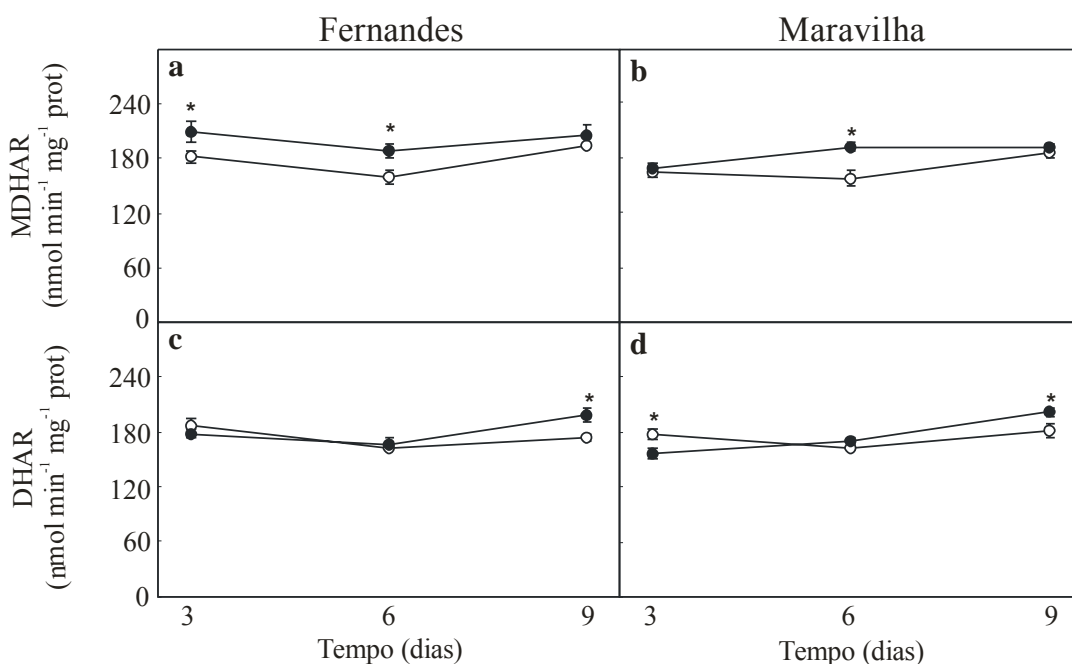


Figura 6: Atividade das enzimas monodesidroascorbato redutase (MDHAR) e desidroascorbato redutase (DHAR) em raízes dos cultivares de arroz Fernandes e Maravilha após 3, 6 e 9 dias de exposição a 0 mM (○) ou 1 mM (●) de Al. Asterisco denota diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo cultivar ($p \leq 0.05$). Barras representam o desvio padrão.

Os teores totais de ascorbato (AA + DHA) após o tratamento das plantas com Al foram menores que nos controles nas raízes dos dois cultivares de arroz, (Fig. 7a e 7b). Após 3, 6 e 9 dias de exposição ao Al os teores totais de ascorbato reduziram 41%, 38% e 27% para o cultivar Fernandes e 41%, 36% e 42% para o cultivar Maravilha, em relação aos seus respectivos controles. O teor de ascorbato total foi sempre maior nas raízes do cultivar Fernandes após tratamento com Al.

As plantas-controle do cultivar Maravilha no 3º dia de tratamento apresentaram teores de ascorbato (AA) 54% mais elevado que as do cultivar Fernandes, mas essa diferença desapareceu no 6º dia e se inverteu no 9º dia de tratamento (Fig. 7c e 7d). Nas raízes do cultivar Fernandes, os teores de AA foram 53%, 17% e 12% maiores que nos respectivos controles após o 3º, 6º e 9º dias de exposição ao Al. O cultivar Maravilha, por outro lado, apresentou, em relação aos controles, teores de AA 39% menores no 3º dia, 11% maiores no 9º dia e sem diferença no 6º dia de exposição ao Al.

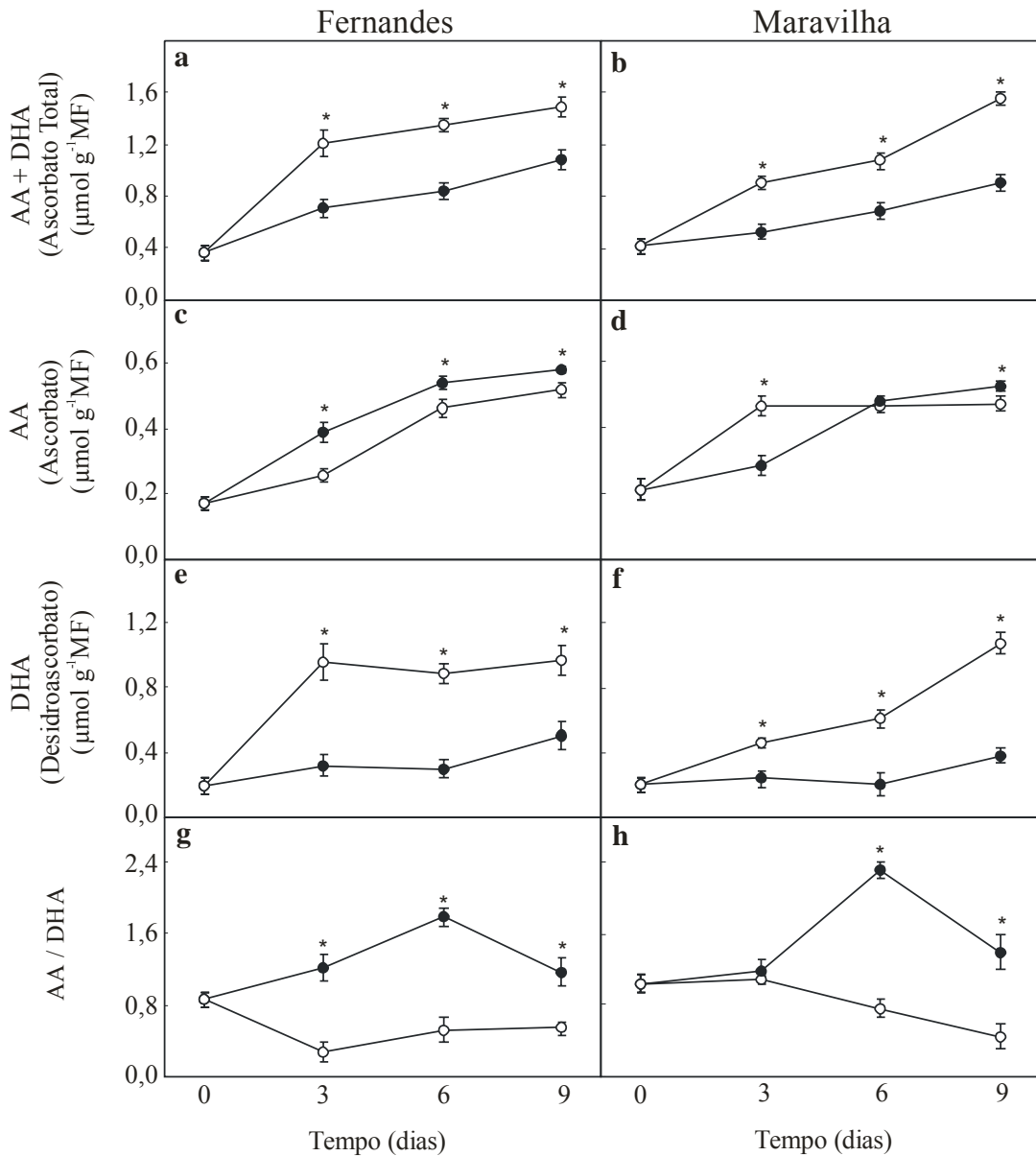


Figura 7: Teores de ascorbato total, ascorbato, desidroascorbato e razão ascorbato/desidroascorbato em raízes dos cultivares de arroz Fernandes e Maravilha após 3, 6 e 9 dias de exposição a 0 mM (○) ou 1 mM (●) de Al. Asterisco denota diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo cultivar ($p \leq 0.05$). Barras representam o desvio padrão.

As plantas-controle do cultivar Fernandes apresentaram no 3º e 6º dia teores de desidroascorbato (DHA) muito mais elevados que os do cultivar Maravilha (Fig. 7e e 7f), mas não houve diferenças entre eles no 9º dia. O tratamento das plantas com Al resultou em menores teores de DHA, em relação aos controles, nas raízes dos dois cultivares de arroz. Os menores teores foram observados nas raízes do cultivar Fernandes, com valores 67%, 66% e 48% menores que nos respectivos controles no 3º, 6º e 9º dias de exposição ao Al.

As razões AA/DHA foram 4,5; 3,4 e 2 vezes maiores que nos respectivos controles no cultivar Fernandes após 3, 6 e 9 dias de tratamento com Al (Fig. 7g). No cultivar Maravilha, observou-se valores 3 vezes maiores em relação aos respectivos controles na razão AA/DHA após 6 e 9 dias de exposição ao Al (Fig. 7h).

4. Discussão

Plantas expostas a diversas condições estressantes de natureza biótica e abiótica, incluindo a toxidez por Al, podem elevar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) alterando o estado de oxi-redução dos sistemas metabólicos e induzindo, conseqüentemente, o estresse oxidativo (Yamamoto et al., 2002; Tamás et al., 2006; Achary et al., 2008; Giannakoula et al., 2010). No presente trabalho, analisou-se a relação entre toxicidade ao Al, o estresse oxidativo e os sistemas de defesa antioxidativo em raízes de dois cultivares de arroz com tolerância diferencial a esse metal.

O estresse causado por níveis tóxicos de Al pode gerar danos a diversos processos fisiológicos e bioquímicos das plantas, alterando, conseqüentemente, seu crescimento e desenvolvimento (Tabaldi et al., 2009). Entre os dois cultivares de arroz estudados, apenas o Maravilha apresentou redução no crescimento radicular após exposição ao Al, sendo significativa no 6º e 9º dia de estresse (Cap. I). Os efeitos do Al são dependentes de vários fatores como concentração e tempo de exposição a esse metal e, principalmente, da sensibilidade da planta. A redução no crescimento radicular é uma característica comum associada à toxicidade do Al em muitas plantas, principalmente nas mais sensíveis a esse metal (Ma et al., 2004; Tahara et al., 2008; Tabaldi et al., 2009).

Várias hipóteses têm sido sugeridas para explicar os danos gerados pelo Al no crescimento das raízes. Dentre elas, a indução do estresse oxidativo pelo Al levando a um aumento e acúmulo de ROS, tem recebido a atenção de diversos pesquisadores (Jones et al., 2006; Tahara et al., 2008). Acúmulos de ROS resultantes da exposição das plantas a níveis tóxicos de alumínio foram observados em milho (Boscolo et al., 2003), *Allium cepa* L. (Achary et al., 2008), batata (Tabaldi et al., 2009), abóbora (Pereira et al., 2010) e arroz (Sharma e Dubey, 2007). As ROS, no interior das células, pode causar peroxidação de lipídios (Cakmak e Horst, 1991), oxidação de

proteínas (Boscolo et al., 2003) e danos ao DNA (Meriga et al. 2004; Achary et al., 2008), resultando em inibição do crescimento radicular.

No presente trabalho, os maiores acúmulos de ROS, principalmente do $O_2^{\cdot-}$, após tratamento com Al, ocorreram nas raízes do cultivar sensível (Fig. 1b e 1d), esses resultados corroboram com os obtidos por Tahara et al. (2008) e Giannakoula et al. (2010). É interessante observar que no cultivar Maravilha, considerado sensível à presença de níveis tóxicos de Al, observou-se maior acúmulo de ROS e maior redução no crescimento radicular, enquanto no Fernandes, considerado tolerante, exatamente o contrário, sugerindo uma relação de causa e efeito.

O acúmulo de ROS induzido pelo Al resulta na oxidação de biomoléculas, como os lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (Mittler, 2002; Sharma e Dubey, 2007). Dentre essas biomoléculas, os lipídios têm sido considerados importantes alvos da ação fitotóxica do Al (Cakmak e Host, 1991; Tabaldi et al., 2009). Yamamoto et al. (2001) sugerem que, em ervilha, a peroxidação de lipídios não é a causa primária da inibição do alongamento radicular, mas é pelo menos um sintoma precoce da toxidez do Al. No presente trabalho, concomitante ao aumento nos teores de ROS nas raízes do cultivar Maravilha (Fig. 1b e 1d), verificou-se elevação nas taxas de peroxidação de lipídios (Fig. 2b) e reduções no crescimento radicular (Cap. I). À semelhança dos resultados obtidos no presente trabalho, Giannakoula et al. (2010), trabalhando com cultivares de milho com tolerância diferencial ao Al, também observaram aumentos mais expressivos na produção das ROS e na taxa da peroxidação de lipídios nas raízes do cultivar sensível. Geralmente, os genótipos sensíveis apresentam sistemas de defesa antioxidativos menos eficientes e, portanto, menor proteção contra os danos oxidativos causados pelo Al. Diferentes espécies vegetais sofrem peroxidação de lipídios com diferentes graus de intensidade após exposição ao Al como verificado em soja (Cakmak e Horst, 1991), sorgo (Peixoto et al., 2001), arroz (Kuo e Kao, 2003) e batata (Tabaldi et al., 2009). Entretanto, em um cultivar sensível de milho Boscolo et al. (2003), observaram expressivo aumento na oxidação das proteínas sugerindo que o alvo primário do estresse oxidativo gerado pelo Al pode, também, variar entre as diferentes espécies de planta.

Vários estudos têm mostrado que o estresse causado pelo Al em plantas pode ativar genes que codificam a biossíntese e, ou, a ativação das enzimas do sistema de defesa antioxidativos (Richards et al., 1998; Ezaki et al., 2004; Tamás et al., 2006). Diversas enzimas, como a SOD, APX, CAT e POX, quando sob estresse por Al,

podem apresentar aumentos em suas atividades, atuando na eliminação das ROS (Achary et al., 2008). A capacidade das plantas em ativar mecanismos enzimáticos e, ou, não-enzimáticos capazes de diminuir e, ou, eliminar as ROS do metabolismo celular pode ser um fator chave para a tolerância dessas plantas ao estresse de Al (Giannakoula et al., 2010).

Resultados obtidos no presente trabalho mostraram que após o tratamento com Al, a atividade da SOD foi maior que nos controles apenas nas raízes do cultivar Fernandes, considerado tolerante, mas não nas do cultivar Maravilha, considerado sensível (Fig. 3a e 3b). A maior atividade da SOD nas raízes do cultivar tolerante é, pois, forte indício dessa enzima estar envolvida na tolerância ao estresse gerado pelo Al. Atividades mais elevada da SOD também foram reportados por outros autores trabalhando com estresse por Al em raízes de soja (Cakmak e Horst, 1991), arroz (Meriga et al., 2004; Sharma e Dubey, 2007), alho (Achary et al., 2008) e milho (Boscolo et al., 2003) e para outros tipos de estresse em cultivares de arroz expostos a salinidade (Lee et al., 2001) e à toxidez por cádmio (Hsu e Kao, 2004). A SOD, portanto, parece ser uma importante enzima na tolerância de diversas espécies de plantas a variados tipos de estresses abióticos.

A SOD é considerada enzima da primeira linha de defesa contra estresses oxidativos, eliminando o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) do metabolismo celular (Alscher et al., 2002). A importância dessa enzima foi evidenciada no presente trabalho, observando-se aumentos na atividade da SOD concomitante com decréscimos nos teores de $O_2^{\cdot-}$ após o tratamento das raízes do cultivar Fernandes com Al (Fig. 1c). No cultivar Maravilha, por outro lado, a atividade da SOD não foi capaz de manter os níveis homeostáticos do $O_2^{\cdot-}$ ocasionando danos celulares, conforme evidenciado pelo aumento na peroxidação de lipídios (Fig. 2b). Uma incompleta eliminação do radical superóxido pela SOD torna possível a ocorrência da reação “Haber-Weiss” responsável pela formação do radical hidroxila (HO^{\cdot}). Este radical, considerado o mais potente oxidante celular é, provavelmente, o principal responsável pelo aumento na peroxidação de lipídios nas membranas celulares e pela destruição de várias macromoléculas, causando sérios danos aos componentes celulares (Scandalios, 1993).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) formado pela dismutação do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) pela SOD (Lee et al., 2001) ou pela exposição a alguma condição estressante, pode se difundir para vários compartimentos, causando sérios danos

celulares (Mittler et al., 2004). Espécies tolerantes possuem enzimas antioxidativas como a APX, CAT e POX capazes de manter baixos os teores de H_2O_2 . Acréscimos nos teores de H_2O_2 têm sido observados principalmente em genótipos sensíveis ou nos casos em que a toxicidade do metal ultrapassa a tolerância da espécie (Dipierro et al., 2005; Achary et al., 2008; Giannakoula et al., 2010; Pereira et al., 2010). No presente trabalho, verificou-se maiores atividades das enzimas APX, CAT e POX (Fig. 3c, 3e e 3g) e menores teores de H_2O_2 nas raízes do cultivar Fernandes após tratamento com Al (Fig. 1a). Resultados semelhantes a estes, obtidos por Kuo e Kao (2003) em folhas de arroz expostas ao Al, são sugestivos de estarem essas enzimas atuando na eliminação do H_2O_2 e, portanto, participando diretamente dos mecanismos de tolerância ao Al (Mittler, 2002). No cultivar Maravilha, considerado sensível, a atividade da CAT foi maior que nos controles desde o 3º dia de exposição ao Al, enquanto as atividades da APX e da POX só aumentaram no 9º dia de tratamento (Fig 3d, 3f e 3h). Nesse cultivar, portanto, os aumentos nas atividades dessas enzimas foram insuficientes para evitar os danos oxidativos impostos às raízes. Resultados semelhantes foram observados em raízes de um cultivar sensível de batata após 7 dias de tratamento com Al (Tabaldi et al., 2009).

Para verificar se os aumentos nas atividades das enzimas APX e CAT induzidos pelo Al tinham sido acompanhados por alguma mudança no padrão das isoformas, foram realizadas eletroforeses em gel nativo dos extratos enzimáticos. Os resultados mostraram que Al não induziu a biossíntese de novas isoformas da APX, evidenciado a presença de quatro isoformas, conforme observado também por Sharma e Dubey (2007) em outros cultivares de arroz. Os aumentos das isoformas 1 e 2, principalmente após 9 dias de tratamento com Al nas raízes dos dois cultivares de arroz, é sugestivo da ocorrência da síntese *de novo* dessas duas isoformas.

O número de isoformas da CAT nas plantas-controle aumentou com o tempo de tratamento, chegando a cinco após 9 dias de tratamento nos dois cultivares de arroz (Fig. 5). O tratamento com Al resultou em redução ou supressão das isoformas 3 e 5, mas aumento na atividade da isoforma 4 e, principalmente, da isoforma 1, indicativos de serem essas isoformas as responsáveis pelos aumentos na atividade da CAT (Fig. 5). Em raízes de *Cassia tora*, o Al também aumentou a atividade da enzima CAT resultado que foi acompanhado pelo aumento na densidade da banda do gel (Wang e Yang, 2005). Em concordância com o trabalho de Wang e Yang (2005),

os resultados do presente trabalho deixam claro que o estresse causado por níveis tóxicos Al é capaz de induzir a síntese *de novo* de isoformas da CAT.

Diferentes afinidades da APX (μM) e CAT (mM) pelo H_2O_2 sugerem que elas pertençam a duas diferentes classes de enzimas relacionadas à remoção dessa ROS. A CAT seria responsável pela remoção da maior parte do H_2O_2 , enquanto a APX pelo ajuste fino dos níveis dessa ROS produzida durante o estresse (Mittler, 2002). Em concordância com essa observação, constatou-se, no presente experimento, atividades da CAT entre 20 e 70 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína (Fig. 3e e 3f) e da APX entre 4 e 6 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína (Fig. 3c e 3d). Portanto, a CAT se destaca como enzima chave, efetivamente eliminando níveis elevados dessa ROS, e posteriormente, regulando a atividade de outras enzimas, como, por exemplo, a APX, mantendo estáveis os níveis de H_2O_2 no interior das células (Ghanati et al., 2005).

Outra diferença fundamental entre as enzimas CAT e APX resulta da localização espacial delas no interior das células. Enquanto a CAT é encontrada apenas nos peroxissomos, a APX está presente em vários compartimentos celulares como citosol, cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomos e apoplasto (Mittler, 2002). Assim, as maiores atividades apresentadas pela CAT são sugestivas da difusão do H_2O_2 de diferentes compartimentos celulares para o interior dos peroxissomos (Mittler et al., 2004; Sharma e Dubey, 2007). Para os dois cultivares de arroz, a difusão dessa ROS pode ter sido intensificada durante a exposição ao Al, refletindo em acréscimos significativos na atividade da CAT.

Além do sistema de defesa enzimático, as plantas também podem utilizar vários metabólitos antioxidativos, como por exemplo, ascorbato, glutatona e α -tocoferol na proteção das células contra os danos gerados durante o estresse oxidativo (Shalata e Neumann, 2001; Millar et al., 2003; Dipierro et al., 2005; Wang e Kao, 2007). O ascorbato, na sua forma reduzida (AA), atua como um dos mais importantes metabólitos utilizados pelas plantas para a manutenção do estado redox das células na eliminação das ROS (Horemans et al., 2000; Dipierro et al., 2005; Ishikawa et al., 2006). O ascorbato pode reagir diretamente com as ROS (mecanismo de defesa não-enzimático) (Noctor e Foyer, 1998) ou ser utilizado como substrato da enzima APX, sendo parte inicial do ciclo ascorbato-glutatona (Potters et al., 2002).

O ciclo ascorbato-glutatona parece estar relacionado a diversos estresses oxidativos ocasionados por fatores bióticos (Kuzniak e Sklodowska, 2005) ou abióticos como o estresse salino (Huang et al., 2005; Hoque et al., 2007), estresse por

alumínio (Devi et al., 2003; Nguyen et al., 2005; Wang e Kao, 2007) e estresse por metais pesados (Liu et al., 2007, Kaklewski et al., 2008). Segundo Drazkiewicz et al. (2003), plantas expostas a concentrações tóxicas de metais estão sujeitas ao desenvolvimento de estresse oxidativo, com alterações nas atividades dos componentes do ciclo ascorbato-glutationa. No presente trabalho, verificou-se que o estresse gerado por níveis tóxicos de Al modificou os teores de ascorbato (AA) e de desidroascorbato (DHA) e a atividade de algumas enzimas envolvidas com o ciclo ascorbato-glutationa, como por exemplo, a APX, MDHAR e DHAR.

A exposição das plantas ao Al, principalmente nas raízes do cultivar Fernandes, resultou em maior atividade da enzima APX (Fig. 3c) acompanhado de menores níveis de H_2O_2 (Fig. 1a). Contudo, não foi observada uma redução no teor de AA, mas sim maiores teores desse metabólito (Fig. 7c). Esse maior acúmulo de AA no interior das células pode ter sido resultado de um aumento na atividade das enzimas monodesidroascorbato redutase (MDHAR) e desidroascorbato redutase (DHAR) (Apel e Hirt, 2004), sobrepondo a sua utilização pela APX. Nie et al. (2007), trabalhando com plantas expostas a níveis elevados de molibdênio também observaram aumentos nos teores de AA, apesar de ocorrido aumento na atividade da APX. Esses autores admitiram também ter ocorrido aumento nas atividades das enzimas MDHAR e DHAR. Estas duas enzimas atuam na regeneração do ascorbato reduzido (AA) a partir dos subprodutos da utilização do AA, ou seja, MDHA e DHA (Noctor e Foyer, 1998). Os resultados do presente trabalho indicam que a regeneração do AA, via atividade das enzimas MDHAR e DHAR, ocorreu nos dois cultivares, mas foi mais efetiva nas raízes do cultivar Fernandes. A maior remoção de H_2O_2 resultante da ação dos componentes desse ciclo no cultivar Fernandes, pode explicar as menores taxas de peroxidação de lipídios nas raízes desse cultivar em comparação ao cultivar Maravilha. Dipierro et al. (2005) também observaram em raízes de abóbora tratadas com Al redução no teor de H_2O_2 acompanhado de aumento na regeneração de AA no interior das células. Já Devi et al. (2003) e Tabaldi et al. (2009) trabalhando, respectivamente, com cultivares de tabaco e batata com tolerância diferencial ao Al evidenciaram, apenas para o cultivar tolerante, aumentos no teor de AA e, conseqüentemente, manutenção na taxa da peroxidação de lipídios, sugestivo da atuação do AA no combate às ROS proporcionando a esses cultivares maior tolerância ao estresse.

A MDHAR, uma das enzimas responsáveis pela regeneração do AA (Noctor e Foyer, 1998), apresentou maior atividade no cultivar Fernandes já no 3º dia de exposição ao Al, enquanto no cultivar Maravilha isso somente foi observado no 6º dia de tratamento ao Al (Fig. 6a e 6b). Já a atividade da DHAR, outra enzima responsável pela regeneração do AA, apresentou maior atividade em relação ao controle nos dois cultivares apenas no 9º dia de exposição ao estresse por Al (Fig. 6c e 6d). Os resultados indicam que o cultivar Fernandes pode estar utilizando a enzima MDHAR para a regeneração do AA na fase inicial da exposição ao Al, regeneração esta que mais tarde é complementada pela DHAR. Aparentemente, em função das atividades dessas duas enzimas, o cultivar Fernandes foi capaz de elevar os teores de AA durante todo o tempo de exposição ao Al. No caso do cultivar Maravilha, o teor de AA foi fortemente reduzido após o 3º dia de tratamento com Al e a enzima MDHAR somente iniciou a regeneração no 6º dia, sendo complementada pela ação da DHAR já no 9º dia, momento em que o teor de AA se tornou maior que no controle. Aparentemente, o cultivar Fernandes leva vantagem sobre o cultivar Maravilha principalmente no início do estresse, vantagem esta que se expressa pela sua maior tolerância ao Al. Drazkiewicz et al. (2003), trabalhando com *Arabidopsis thaliana* (L.) submetida a níveis tóxicos de cobre, concluíram que a regeneração do AA foi obtida pelas atividades complementares das enzimas MDHAR e DHAR. Por outro lado, outros autores verificaram que a regeneração do AA durante estresse por cádmio (Aravind e Prasad, 2005) e estresse salino (Mittova et al., 2000) foi promovida, quase que exclusivamente, pela enzima MDHAR.

O aumento observado no teor de ascorbato reduzido (AA) pode ser resultado tanto das enzimas MDHAR e DHAR, quanto da ativação de enzimas da biossíntese deste metabólito (Nie et al., 2007; Wang e Kao 2007). Sharma e Dubey (2007) trabalhando com raízes de plantas de arroz tratadas com Al, à semelhança do observado neste trabalho, encontraram aumentos na atividade das enzimas MDHAR e DHAR, sem concomitante aumento no teor de AA. Esses autores admitem ter havido inibição na taxa biossintética de AA concorrendo para o decréscimo no teor desse metabólito. Por outro lado, Mittova et al. (2004) constataram que o aumento no teor de AA não foi acompanhado por acréscimos nas atividades das enzimas MDHAR e DHAR. Os autores sugeriram que o estresse salino imposto às raízes de tomate ativou a enzima L-galactono-1,4-lactona desidrogenase (GLDH), presente na membrana interna das mitocôndrias, envolvida com a síntese de ascorbato em plantas

(Noctor et al., 2002; Ishikawa et al., 2006). Apesar das atividades das enzimas MDHAR e DHAR terem mostrado boa correlação com os teores de AA, não se pode descartar a possibilidade de participação da GLDH. Entretanto, a atividade dessa enzima não foi avaliada no presente trabalho.

A redução no teor de DHA nas raízes dos dois cultivares de arroz após tratamento com Al foi sempre maior do que o aumento no teor de AA. Em função disto, o teor de ascorbato total (AA + DHA), também, decresceu. Isso indica que o DHA, além de estar sendo utilizado para a regeneração de AA, pela ação das enzimas MDHAR e DHAR, pode estar sendo hidrolisado irreversivelmente a 2,3-diceto-1-gulonato, devido à toxidez de Al (Linster e Van Schaftingen, 2007; Sharma e Dubey, 2007).

A redução no teor de DHA e o aumento no teor de AA nas raízes dos dois cultivares de arroz após exposição ao Al contribuíram para aumentar a razão AA/DHA. Esse aumento, considerado forte indicador da manutenção do estado de oxidação-redução das células, permite que níveis elevados de AA estejam disponíveis para eliminar as ROS do metabolismo vegetal (Potters et al., 2002).

A maior tolerância ao Al do cultivar Fernandes em relação ao cultivar Maravilha, portanto, pode ser resultado das maiores atividades das enzimas antioxidativas, principalmente da SOD, e pela melhor utilização/regeneração do ascorbato. A atuação desse eficiente mecanismo de defesa antioxidativo presente nas raízes desse cultivar resulta em menor acúmulo de ROS e, conseqüentemente, em menor peroxidação de seus lipídios.

5. Referências bibliográficas

- Achary, V.M., Jena, S., Panda, K.K., Panda, B.B. Aluminium induced oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. **Ecotox. Environ. Safe.** 70:300-310, 2008.
- Alscher, R.G., Erturk, N., Heath, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **J. Exp. Bot.**, 53:1331-1341, 2002.
- Amako, K., Chen, G-X., Asada, K. Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. **Plant Cell Physiol.** 35:497-504, 1994.
- Apel, K., Hirt, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annu. Rev. Plant Biol.** 55:373-399, 2004.

- Aravind, P., Prasad, M.N.V. Modulation of cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* by zinc involves ascorbate-glutathione cycle and glutathione metabolism. **Plant Physiol. Biochem.** 43:107-116, 2005.
- Boscolo, P.R.S., Menossi, M., Jorge, R.A. Aluminum-induced oxidative stress in maize. **Phytochem.** 62:181-189, 2003.
- Boveris, A. Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. **Methods Enzymol.** 105:429-435, 1984.
- Breusegem, F.V., Vranová, E., Dat, J.F., Inzé, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Sci.** 161:405-414, 2001.
- Cakmak, I., Horst, W.J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiol. Plant.,** 83:463-468, 1991.
- Chen, Z., Gallie, D.R. Dehydroascorbate reductase affects leaf growth, development, and function. **Plant Physiol.** 142:775-787, 2006.
- Clark, R.B. Characterization of phosphatase of intact maize roots. **J. Agric. Food Chem.** 23:458-460, 1975.
- Darkó, É., Ambrus, H., Stefanovits-Bányai, É., Fodor, J., Bakos, F., Barnabás, B. Aluminium toxicity, Al tolerance and oxidative stress in an Al-sensitive wheat genotype and in Al-tolerant lines developed by in vitro microspore selection. **Plant Sci.** 166:583–591, 2004.
- De Gara, L., Paciolla, C., De Tullio, M.C., Motto, M., Arrigoni, O. Ascorbate-dependent hydrogen peroxide detoxification and ascorbate regeneration during germination of a highly productive maize hybrid: Evidence of an improved detoxification mechanism against reactive oxygen species. **Physiol. Plant.** 109:7-13, 2000.
- Del Longo, O.T., González, A., Pastori, G.M., Trippi, V.S. Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant Cell Physiol.** 34:1023-1028, 1993.
- Devi, S.R., Yamamoto, Y., Matsumoto, H. An intracellular mechanism of aluminum tolerance associated with high antioxidant status in cultured tobacco cells. **J. Inorg. Biochem.** 97:59-68, 2003.
- 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 aluminium stress. **J. Plant Physiol.** 162:529-536, 2005.
- Drazkiewicz, M., Skórznska-Polit, E., Krupa, Z. Response of the ascorbate-glutathione cycle to excess copper in *Arabidopsis thaliana* (L). **Plant Sci.** 164:195-202, 2003.

- Edreva, A. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. **Agr. Ecosyst. Environ.** 30:119-133, 2005.
- Eltayeb, A.E., Kawano, N., Badawi, G.H., Kaminaka, H., Sanekata, T., Shibahara, T., Inanaga, S., Tamaka, K. Overexpression of monodehydroascorbate reductase in transgenic tobacco confer enhanced tolerance to ozone, salt and polyethylene glycol stresses. **Planta.** 225:1255-1264, 2007.
- Ezaki, B., Gardner, R.C., Ezaki, Y., Matsumoto, H. Expression of aluminum-induced genes in transgenic *Arabidopsis* plants can ameliorate aluminum stress and/or oxidative stress. **Plant Physiol.** 122:657-665, 2000.
- Gay, C., Gebicki, J.M. A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferricytlenol orange hydroperoxide assay. **Anal. Biochem.** 284: 217-220, 2000.
- Ghanati, F., Morita, A., Yokota, H. Effects of aluminum on the growth of tea plant and activation of antioxidant system. **Plant Soil** 276:133-141, 2005.
- Giannakoula, A., Moustakas, M., Syros, T., Yupsanis, T. Aluminum stress induces up-regulation of an efficient antioxidant system in the Al-tolerant maize line but not in the Al-sensitive line. **Environ. Exp. Bot.** 67:487-494, 2010.
- Giannopolitis, C.N., Ries, S.K. Superoxide dismutases: Occurrence in higher plants. **Plant Physiol.** 59:309–314, 1977.
- Heath, R.L., Packer, L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Arch. Biochem. Biophys.** 125:189-198, 1968.
- Hoque, A., Banu, N.A., Okuma, E. Amako, K., Nakamura, Y., Shimoishi, Y., Murata, Y. Exogenous proline and glycinebetaine increase NaCl-induced ascorbate-glutathione cycle enzyme activities, and proline improves salt tolerance more than glycinebetaine in tobacco Bright Yellow-2 suspension-cultured cells. **J. Plant Physiol.** 164:1457-1468, 2007.
- Horemans, N., Foyer, C.F., Potters, G., Asard, H. Ascorbate function and associated transport systems in plants. **Plant Physiol. Biochem.** 38:531-540, 2000.
- Hossain, M.A., Nakano, Y., Asada, K. Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide. **Plant Cell Physiol.** 25:385-395, 1984.
- Hsu, Y.T., Kao, C.H. Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. **Plant Growth Regul.** 42:227-238, 2004.
- Huang, C., He, W., Guo, J., Chang, X., Su, P., Zhang, L. Increased sensitivity to salt stress in an ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant. **J. Exp. Bot.** 56:3041-3049, 2005.

- Ishikawa, T., Dowdle, J., Smirnoff, N. Progress in manipulating ascorbic acid biosynthesis and accumulation in plants. **Physiol. Plant.** 126:343-355, 2006.
- Jones, D.L., Blancaflor, E.B., Kochian, L.V., Gilroy, S. Spatial coordination of aluminium uptake, production of reactive oxygen species, callose production and wall rigidification in maize roots. **Plant Cell Environ.** 29:1309-1318, 2006.
- Justino, G.C., Cambraia, J., Oliva, M.A., Oliveira, J.A. Absorção e redução de nitrato em duas cultivares de arroz na presença de alumínio. **Pesq. Agropec. Bras.** 41:1285-1290, 2006.
- Kaklewski, K., Nowak, J., Ligocki, M. Effects of selenium content in green parts of plants on the amount of ATP and ascorbate-glutathione cycle enzymes activity at various growth stages of wheat and oilseed rape. **J. Plant Physiol.** 165:1011-1022, 2008.
- Kampfenkel, K., Montagu, M.V., Inzé, D. Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. **Anal. Biochem.** 225:165-167, 1995.
- Kuo, M.C., Kao, C.H. Aluminum effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. **Biol. Plant.** 46:149-152, 2003.
- Kuzniak, E., Sktodowska, M. Comparison of two methods for preparing mitochondria from tomato leaves to study the ascorbate-glutathione cycle activity. **Biol. Plant.** 48:537-542, 2004.
- Kuzniak, E., Sktodowska, M. Compartment-specific role of the ascorbate-glutathione cycle in the response of tomato leaf cells to *Botrytis cinerea* infection. **J. Exp. Bot.** 413:921-933, 2005.
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227:680-685, 1970.
- Lee, D.H., Kim, Y.S., Lee, C.B. The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.). **J. Plant Physiol.**, 158:737-745, 2001.
- Lee, D.H., Lee, C.B. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzymes activity assays. **Plant Sci.** 159:75-85, 2000.
- Lin, J-N., Kao, C.H. Involvement of lipid peroxidation in water stress-promoted senescence of detached rice leaves. **Biol. Plant.**, 43:141-145, 2000.
- Linster, C.L., Van Schaftingen, E. Vitamin C: Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. **FEBS J.**, 274:1-22, 2007
- Liu, Y., Wang, X., Zeng, G., Qu, D., Gu, J., Zhou, M., Chai, L. Cadmium-induced oxidative stress and response of the ascorbate-glutathione cycle in *Beckmeria nivea* (L.) Gaud. **Chemosphere.** 69:99-107, 2007.

- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.L. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193:265-275, 1951.
- Ma, J.F., Shen, R., Nagao, S., Tanimoto, E. Aluminium targets elongating cells by reducing cell wall extensibility in wheat roots. **Plant Cell Physiol.** 45:583-589, 2004.
- Mendonça, R.J., Cambraia, J., Oliva, M.A., Oliveira, J.A. Capacidade de cultivares de arroz de modificar o pH de soluções nutritivas na presença de alumínio. **Pesq. Agropec. Bras.** 40:447-452, 2005.
- 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*). **J. Plant Physiol.** 161:63-68, 2004.
- Millar, A.H., Mittova, V., Kiddle, G., Heazlewood, J.L., Bartoli, C.G., Theodoulou, F.L., Foyer, C.H. Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses. **Plant Physiol.** 133:443-447, 2003.
- Mittler, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Sci.** 7:405-409, 2002.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Breusegem, F.V. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends Plant Sci.** 9:490-498, 2004.
- Mittova, V., Guy, M., Tal, M., Volokita, M. Salinity up-regulates the antioxidative system in root mitochondria and peroxisomes of the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. **J. Exp. Bot.** 55:1105-1113, 2004.
- Mohammadi, M., Karr, A.L. Superoxide anion generation in effective and ineffective soybean root nodules. **J. Plant Physiol.** 158:1023-1029, 2001.
- Nakano, Y., Asada, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidases in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiol.** 22:867-880, 1981.
- Nguyen, N.T., Hiep, N.D., Fujita, K. Iron enhances aluminum-induced leaf necrosis and plant growth inhibition in *Eucalyptus camaldulensis*. **Plant Soil.** 277:139-152, 2005.
- Nie, Z.J., Hu, C.X., Sun, X.C., Tan, Q.L., Liu, H.E. Effects of molybdenum on ascorbate-glutathione cycle metabolism in Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*). **Plant Soil.** 295:13-21, 2007.
- Noctor, G., Gomes, L., Vanacker, H., Foyer, C.H. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in control of glutathione homeostasis and signaling. **J. Exp. Bot.** 53:1283-1304, 2002.
- Noctor, G., Foyer, C.H. Ascorbate and Glutathione: keeping active oxygen under control. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 49:249-279, 1998.

- Noctor, G. Metabolic signaling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. **Plant Cell and Environ.** 29:409-425, 2006.
- Peixoto, P.H.P., Cambraia, J., Sant'Anna, R., Mosquim, P.R., Moreira, M.A. Aluminum effects on fatty acid composition and lipid peroxidation of a purified plasma membrane fraction of root apices of two sorghum cultivars. **J. Plant Nutr.** 27:1061-1070, 2001.
- Peixoto, P.H.P., Cambraia, J., Sant'Anna, R., Mosquim, P.R., Moreira, M.A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **R. Bras. Fisiol. Veg.** 11:137-143, 1999.
- Pereira, L.B., Mazzanti, C.M., Gonçalves, J.F., Cargnelutti, D., Tabaldi, L.A., Becker, A.G., Calgaroto, N.S., Farias, J.G., Battisti, V., Bohrer, D., Nicoloso, F.T., Morsch, V.M., Schetinger, M.R.C. Aluminum-induced oxidative stress in cucumber. **Plant Physiol. Biochem.** 48:683-689, 2010.
- Potters, G., De Gara, L., Asard, H., Horemans, N. Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? **Plant Physiol. Biochem.** 40:537-548, 2002.
- Richards, K.D., Schott, E.J., Sharma, Y.K., Davis, K.R., Gardner, R.C. Aluminum induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiol.** 116:409-418, 1998.
- Scandalios, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiol.** 103:7-12, 1993.
- Shalata, A., Neumann, P.M. Exogenous ascorbic acid (vitamin C) increases resistance to salt stress and reduces lipid peroxidation. **J. Exp. Bot.** 52:2207-2211, 2001.
- Sharma, P., Dubey, R.S. Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum. **Plant Cell Rep.** 26, 2027-2038, 2007.
- Simonovicová, M., Tamás, L., Huittová, J., Mistrík, I. Effect of aluminium on oxidative stress related enzymes activities in barley roots. **Biol. Plant.** 48:261-266, 2004.
- Smirnoff, N. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. **Curr. Opin. Plant Biol.** 3:229-235, 2000.
- Srivalli, B., Sharma, G., Khanna-Chopra, R. Antioxidative defense system in an upland rice cultivar subjected to increasing intensity of water stress followed by recovery. **Physiol. Plant.** 119:503-512, 2003
- Tabaldi, L.A., Cargnelutti, D., Gonçalves, J.F., Pereira, L.B., Castro, G.Y., Maldaner, J., Rauber, R., Rossato, L.V., Bisognin, D.A., Shetinger, M.R.C.,

- Nicoloso, F.T. Oxidative stress is an early symptom triggered by aluminum in Al-sensitive potato plantlets. **Chemosphere** 76:1402-1409, 2009.
- Tahara, K., Yamanoshita, T., Norisada, M., Hasegawa, I., Kashima, H., Sasaki, S., Kojima, K. Aluminum distribution and reactive oxygen species accumulation in root tips of two *Melaleuca* trees differing in aluminum resistance. **Plant Soil**. 307:167-178, 2008.
- Tamás, L., Huttová, J., Mistrík, I., Simonovicová, M. Aluminium-induced drought and oxidative stress in barley roots. **J. Plant Physiol.** 162:781-784, 2006.
- Wang, J.W., Kao, C.H. Protective effect of ascorbic acid and glutathione on AlCl₃-inhibited growth of rice roots. **Biol. Plant.** 51:493-500, 2007.
- Wang, Y-S., Yang, Z-M. Nitric oxide reduces aluminum toxicity by preventing oxidative stress in the roots of *Cassia tora* L. **Plant Cell Physiol.** 46:1915-1923, 2005.
- 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 Physiol.** 128:63-72, 2002.
- Yamamoto, Y., Kobayashi, Y., Matsumoto, H. Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminium, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. **Plant Physiol.** 125:199–208, 2001.

CAPÍTULO III

ALTERAÇÕES NO METABOLISMO DA GLUTATIONA EM RESPOSTA AO ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO PELO ALUMÍNIO EM RAÍZES DE ARROZ

Resumo

A molécula de glutathione atua no sistema de defesa não-enzimático das plantas, apresentando papel crucial na defesa contra danos oxidativos gerados durante a ocorrência de estresses. O controle dos níveis homeostáticos da glutathione envolve diversas enzimas relacionadas a sua biossíntese, regeneração e degradação. No presente trabalho, analisou-se a atividade das enzimas glutathione S-transferase (GST), sintetase da γ -glutamylcysteine (γ -GCS), peroxidase da glutathione (GPX) e redutase da glutathione (GR) sobre o metabolismo de glutathione nas raízes de dois cultivares de arroz: Fernandes (CNA-1158) e Maravilha (CNA-6843-1), considerados tolerante e sensível ao Al, respectivamente. Os cultivares foram expostos por 3, 6 e 9 dias ao estresse por Al. A atividade das enzimas γ -GCS e GR, envolvidas na síntese e regeneração da glutathione, respectivamente, aumentou nas raízes do cultivar Fernandes após diferentes tempos de estresse por Al. Já para o cultivar Maravilha, apenas a enzima γ -GCS apresentou aumento em atividade sendo observado somente no 9º dia de tratamento com Al. A atividade da GPX foi maior nas raízes dos dois cultivares tratados com Al do que nos controles, contudo no cultivar Fernandes o aumento envolveu maior tempo de exposição. Por outro lado, a enzima GST apresentou menor atividade que nos controles na presença do Al. Esses resultados indicam que no cultivar Fernandes, essas enzimas foram positivamente estimuladas em resposta ao Al, promovendo melhor utilização da glutathione como molécula antioxidativa e adicionalmente, elevando o teor da GSH no interior das células, permitindo aumentos na razão GSH/GSSG. Aparentemente, o cultivar Fernandes utiliza de modo mais eficiente a rota metabólica da glutathione durante o estresse induzido pelo Al.

Palavras-chave: glutathione reduzida (GSH), glutathione oxidada (GSSG), glutathione S-transferase (GST), sintetase da γ -glutamylcysteine (γ -GCS), peroxidase da glutathione (GPX) e redutase da glutathione (GR)

1. Introdução

Dentre os metabólitos constituintes do sistema de defesa não-enzimático das plantas, a glutathiona apresenta papel crucial na defesa contra danos oxidativos gerados durante estresses bióticos e abióticos (Noctor et al., 1998). A GSH é um tripeptídeo, formado pelas moléculas de glutamato, cisteína e glicina e, por isso, conhecida por gama-glutamil-cisteinil-glicina (γ -Glu-Cis-Gli) (Foyer et al., 2001).

A glutathiona é amplamente distribuída em plantas, podendo ser encontrada tanto na forma reduzida (GSH) quanto na forma oxidada (GSSG), sendo que, 90% da glutathiona presente nos tecidos encontra-se na forma reduzida (Meister, 1988). Esse metabólito está presente em quase todos os compartimentos celulares, em concentrações variando entre 1 a 5 mM (Mittler, 2002). Considerada como o tiol não-protéico mais abundante no interior das células, a GSH atua como fonte endógena de enxofre (S), sendo a principal forma de armazenamento e translocação desse elemento em plantas. Adicionalmente, ao lado do ascorbato, a glutathiona é um dos principais metabólitos antioxidativos e tampão de redox celular (Noctor e Foyer, 1998).

Devido à grande importância da GSH para o metabolismo vegetal, vários estudos têm sido realizados e numerosas funções fisiológicas têm sido atribuídas a esse metabólito. Uma delas está relacionada com a regulação da divisão celular e do crescimento de células vegetais (May et al., 1998; Noctor et al., 2002). Outra importante função da GSH está associada a sua capacidade de atuar como antioxidante celular (Ascher, 1989), função esta dependente do grupamento -SH do resíduo de cisteína (May et al., 1998). Assim, a GSH protege as células contra os possíveis danos causados pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), formadas durante o estabelecimento de um estresse oxidativo (Rüeggsegger e Brunold, 1992; Yamaguchi et al., 1999; Nagalakshmi e Prasad, 2001). Trabalhando com Al, Devi et al. (2003) observaram que o estresse oxidativo imposto por esse metal foi o responsável por manter elevado o teor de glutathiona, contribuindo com um eficiente mecanismo de defesa antioxidativo. Para eliminar o excesso das ROS produzidas sob condições estressantes, a GSH pode reagir diretamente com essas espécies reativas, usualmente, com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ou servir como substrato da enzima peroxidase da glutathiona (GPX) ou, ainda, participar do ciclo ascorbato-glutathiona (Eshdat et al., 1997; Noctor et al., 1998).

Adicionalmente, a GSH também pode atuar como substrato de outras duas importantes enzimas, a glutathione S-transferase (GST) e a sintetase da fitoquelatina (Semane et al., 2007). A GST catalisa a conjugação da GSH a diversos tipos de compostos xenobióticos, formando substâncias de baixa toxicidade que são transportadas para dentro do vacúolo (Marrs, 1996). A sintetase da fitoquelatina, por outro lado, catalisa a polimerização da fitoquelatina, um peptídeo ($[\gamma\text{-glutamil-cisteína}]_{2-12}\text{-glicina}$) com elevada capacidade para complexar metais, eliminando seus efeitos fitotóxicos (Inouhe, 2005).

O desempenho das funções da glutathione no metabolismo vegetal depende da capacidade da planta em manter seu teor homeostático no interior das células (Noctor et al., 2002). A concentração celular da glutathione pode ser extremamente variável, dependendo de vários fatores, como a atividade das enzimas associadas com sua biossíntese, a ativação de mecanismos associados a sua degradação, transporte, utilização como substrato para a síntese de fitoquelatina, disponibilidade de cisteína e a presença de condições estressantes (Kocsy et al., 2000; Noctor et al., 2002; Tausz et al., 2004).

A rota biossintética da glutathione está bem estabelecida e parece ser semelhante em plantas, animais e microrganismos (Noctor et al., 2002). Em plantas, a biossíntese de glutathione pode ocorrer tanto nos cloroplastos quanto no citossol (Klapheck et al., 1987). Para que ocorra a síntese de glutathione, duas reações são extremamente importantes envolvendo a participação de duas enzimas dependentes de ATP. Inicialmente, a enzima sintetase da $\gamma\text{-glutamilcisteína}$ ($\gamma\text{-GCS}$) catalisa a reação entre o glutamato e a cisteína formando a molécula $\gamma\text{-glutamilcisteína}$ ($\gamma\text{-GC}$). Em seguida, a enzima sintetase da glutathione (GSH-S) catalisa a reação de inserção de uma glicina ao $\gamma\text{-glutamilcisteína}$, formando a glutathione (GSH) (May et al., 1998; Noctor e Foyer, 1998; Noctor et al., 2002). Dois fatores são considerados fundamentais no controle das taxas de síntese da GSH: a concentração do aminoácido cisteína e a atividade da enzima $\gamma\text{-GCS}$ (Noctor et al., 1996). A enzima $\gamma\text{-GCS}$ controla a síntese de GSH através de um mecanismo de retro-alimentação negativa, no qual, a reação catalisada por essa enzima pode ser inibida pela GSH (Nagalakshmi e Prasad, 2001; Aravind e Prasad, 2005).

O teor da forma reduzida da glutathione (GSH) no interior das células vegetais é determinado pelo balanço entre sua biossíntese e degradação, bem como da atividade de enzimas relacionadas a sua regeneração. A redutase da glutathione (GR)

(Mittler, 2002) é uma dessas enzimas, catalisando a redução da forma oxidada (GSSG), utilizando NAD(P)H como molécula doadora de elétrons (Noctor e Foyer, 1998; Mittler, 2002).

Na literatura, vários trabalhos têm reportado variações no teor da glutatona após exposição das plantas ao estresse por cádmio (Aravind e Prasad, 2005; Semane et al., 2007), cobre (Nagalakshmi e Prasad, 2001) e boro (Ruiz et al., 2003). Entretanto, em relação ao estresse gerado pelo Al, pouco se conhece sobre seu efeito na rota metabólica da glutatona (Corrales et al., 2008; Panda e Matsumoto, 2010; Xu et al., 2011). A semelhança de outros metais, o estresse por Al pode atuar sobre a atividade das enzimas envolvidas na síntese, conjugação e/ou degradação da glutatona.

Portanto, o presente trabalho teve como objetivos avaliar os efeitos do Al sobre o teor de GSH e GSSG e sobre a atividade de enzimas envolvidas na síntese ou degradação da glutatona em raízes de dois cultivares de arroz com tolerância diferencial ao Al.

2. Material e métodos

2.1. Material vegetal e condições de crescimento

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 pela Embrapa - Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão.

As sementes dos dois cultivares, selecionadas quanto ao tamanho e forma, foram tratadas com ácido sulfúrico 98% (v/v), por 1 minuto. Em seguida, foram lavadas em água corrente e esterilizadas superficialmente com hipoclorito de sódio 3% (v/v) por 15 minutos, e então, lavadas novamente em água corrente e enxaguadas em água desionizada. As sementes foram germinadas em rolos de papel germitest mergulhados em solução nutritiva de Clark (Clark, 1975), pH 4,0, com um terço da força iônica original, sob aeração contínua.

Plântulas com 12 dias de idade 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_3 , durante 3, 6 e 9 dias. O experimento foi conduzido em sala de crescimento com temperatura controlada ($25\pm 3^\circ\text{C}$), fluxo de radiação fotossinteticamente ativa de $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h. As soluções nutritivas foram continuamente aeradas, os pHs ajustados diariamente para 4,0 e renovadas a cada 3 dias.

A cada 3 dias, após início do experimento, as raízes foram colhidas, lavadas em água corrente e enxaguadas em água desionizada e, então, amostras foram retiradas para as diversas análises químicas.

2.2. Determinação dos teores de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG)

Os teores de GSH e GSSG foram determinados de acordo como o método descrito por Griffith (1980). Para isso, foram utilizadas amostras de 0,3 g de massa fresca de raízes, que foram trituradas em N_2 líquido, seguido da adição de 2 mL de meio de homogeneização constituído de HCl 0,1 M e EDTA 1 mM. Depois de filtrado através de quatro camadas de gaze, o homogeneizado foi centrifugado a 12.000 g por 10 min a 4°C .

Para a determinação do teor de glutathiona total (GSH+GSSG), 100 μL do sobrenadante foram adicionados a um meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,5, NADPH 30 μM e DTNB 0,6 mM [ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzóico)]. Após incubação a 30°C , por 5 min, foram adicionados 10 μL da enzima redutase da glutathiona (50 U mL^{-1}) sendo a absorvância monitorada durante o primeiro minuto de reação a 412 nm.

Para a determinação do teor de glutathiona oxidada (GSSG) uma alíquota de 200 μL do sobrenadante foi tratada com 10 μL de 2-vinilpiridina (2-VP) durante 60 min a 30°C . Após derivatização da GSH com 2-VP, o teor de GSSG foi determinado conforme descrito anteriormente para glutathiona total.

O teor de glutathiona reduzida (GSH) foi calculado pela diferença entre os teores de glutathiona total (GSH+GSSG) e de glutathiona oxidada (GSSG). As concentrações de GSH e GSSG foram determinadas por meio de curva de calibração, utilizando-se padrões autênticos de glutathiona.

2.3. Ensaio enzimáticos

2.3.1. Sintetase da γ -glutamilcisteína (γ -GCS, EC 6.3.2.2)

Amostras de 0,3 g de massa fresca de raízes foram maceradas em N₂ líquido e, então, adicionou-se meio de homogeneização constituído de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 e EDTA 5 mM, conforme metodologia recomendada por Rügsegger e Brunold (1992). O homogeneizado, depois de filtrado através de quatro camadas de gaze, foi centrifugado a 30.000 g por 10 min, a 4°C e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático bruto.

A atividade enzimática foi determinada pela adição de 100 μ L do extrato enzimático bruto a 900 μ L de um meio de reação constituído por glutamato de sódio 10 mM, L-aminobutirato 10 mM, Na₂EDTA 2 mM, BSA 0,02% (p/v), MgCl₂ 20 mM, sal dissódico de ATP 5 mM e tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,2. A mistura foi incubada em banho-maria, a 37°C, durante 30 min e, então, a reação foi paralisada pela adição de 100 μ L de TCA 50% (Nagalakshmi e Prasad, 2001).

A mistura foi centrifugada a 10.000 g por 10 min e o teor de fosfato inorgânico no sobrenadante foi estimado a 720 nm pelo método do fosfo-molibdato (Lindeman, 1958).

2.3.2. Glutathione redutase (GR – EC 1.6.4.2)

Amostras de 0,2 g de tecidos radiculares foram macerados em N₂ líquido, seguido pela adição de 2 mL de meio de homogeneização constituído de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5, EDTA 1 mM, DTT 2 mM, PMSF 1 mM e PVPP 1% (Carlberg e Mannervik, 1985).

A atividade da GR foi determinada pela adição de 100 μ L do extrato enzimático bruto a 0,9 mL de um meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5, EDTA 1 mM, glutathione oxidada (GSSG) 1 mM e NADPH 0,1 mM (Carlberg e Mannervik 1985). O meio de reação foi incubado a 30°C e a variação na absorvância medida a 340 nm durante o primeiro minuto de reação. A atividade enzimática foi estimada usando-se o coeficiente de extinção molar 6,22 mM⁻¹ cm⁻¹.

2.3.3. *Glutathione peroxidase (GPX – EC 1.11.1.9)*

Amostras de 0,3 g de tecido radicular foram maceradas em N₂ líquido e homogeneizadas em 2 mL de meio de extração constituído de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, EDTA 1 mM e MgCl₂ 10 mM (Nagalakshmi e Prasad, 2001).

A atividade da GPX foi determinada pela adição de 100 µL do extrato enzimático bruto a 0,9 mL de um meio de reação consistindo de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, EDTA 1 mM, NaCl 0,1 mM, GSH 1 mM, NADPH 0,2 mM, H₂O₂ 0,25 mM e 1 unidade de glutathione redutase (Nagalakshmi e Prasad 2001). O meio de reação foi incubado a 30°C e a variação na absorvância medida a 340 nm durante o primeiro minuto de reação. A atividade enzimática foi estimada usando-se coeficiente de extinção molar 9,6 mM⁻¹ cm⁻¹.

2.3.4. *Sulfotransferase da glutathione (GST, EC 2.5.1.18)*

Amostras de 0,3 g de massa fresca de raízes foram maceradas em N₂ líquido e, então, adicionadas a um meio de homogeneização constituído de tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 7,8, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, PMSF 0,1 mM e PVPP 1% (Habig e Jakoby, 1981). O homogeneizado, depois de filtrado através de quatro camadas de gaze, foi centrifugado a 12.000 g por 15 minutos, a 4°C e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático bruto.

A atividade da sulfotransferase da glutathione foi determinada após adição de 100 µL do extrato enzimático bruto a 0,9 mL de um meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0, glutathione reduzida (GSH) 1 mM e 1-cloro 2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 1 mM (Nagalakshmi e Prasad, 2001). O aumento na absorvância a 340 nm foi medido no primeiro minuto de reação a 30°C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 9,6 mM⁻¹ cm⁻¹.

2.3.5. *Determinação de proteína*

Os teores de proteínas dos extratos enzimáticos foram determinados pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando BSA como padrão.

2.4. Delineamento Experimental e Análise Estatística

Os tratamentos foram dispostos no delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2x3: dois cultivares de arroz (Fernandes e Maravilha), dois níveis de Al (0 e 1 mM) e três tempos (3, 6 e 9 dias), com três repetições. Exclusivamente para a determinação dos teores de glutatona reduzida (GSH) e glutatona oxidada (GSSG) foram utilizados quatro tempos de tratamento com Al (0, 3, 6 e 9 dias).

Os resultados foram submetidos à análises de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. As análises foram efetuadas utilizando o programa estatístico “SAEG”, da Fundação Arthur Bernardes, da Universidade Federal de Viçosa, versão 9.0.

3. Resultados

Os teores de glutatona total (GSH + GSSG) nas raízes das plantas-controle do cultivar Fernandes foram sempre maiores do que no cultivar Maravilha (Fig 1a e 1b). Na presença de Al, o teor de glutatona total no cultivar Fernandes reduziu com o tempo de exposição ao estresse, mas foi sempre maior do que nas plantas-controle. No 3º, 6º e 9º dias as diferenças em relação aos respectivos controles foram de 42%, 18% e 10% (Fig. 1a). No cultivar Maravilha, o teor de glutatona total após tratamento com Al foi maior do que no controle apenas no 9º dia do período experimental (Fig. 1b).

Os teores de glutatona reduzida (GSH) seguiram aproximadamente a mesma tendência de resposta observada quanto aos teores de glutatona total (Fig. 1c e 1d). Nas plantas tratadas com Al, o teor de GSH nas raízes do cultivar Fernandes foi maior do que nas plantas-controle, após o 3º e o 6º dia de tratamento (Fig. 1c). Neste cultivar, entretanto, nas plantas tratadas com Al, observou-se decréscimo contínuo no teor de GSH do 3º ao 9º dia. No cultivar Maravilha, observou-se ligeiro aumento no teor de GSH entre o 6º e o 9º dia, mas não foi observado nenhum aumento significativo após tratamento com Al (Fig. 1d).

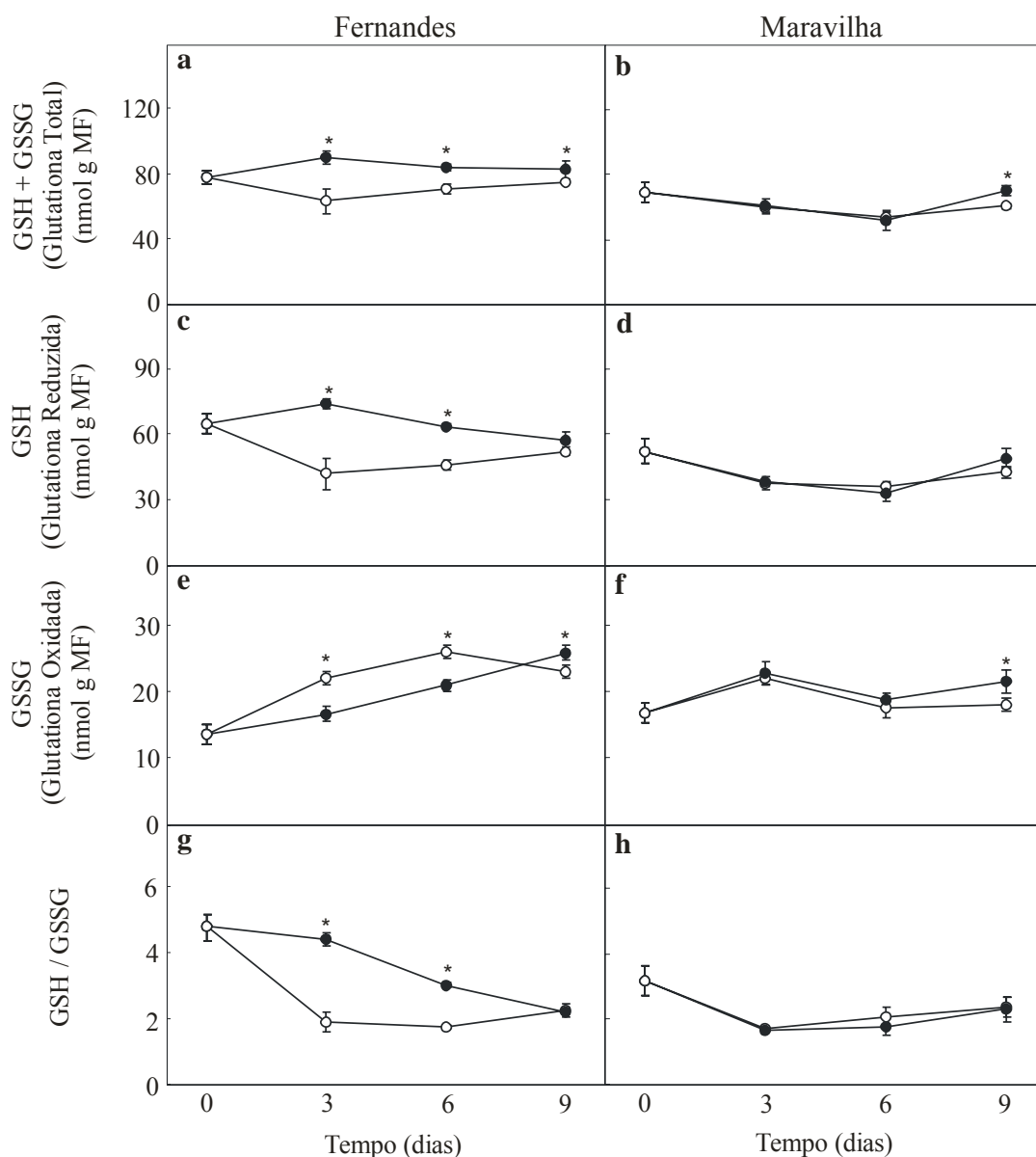


Figura 1: Teores de glutationa total, GSH, GSSG e razão GSH/GSSG em raízes de dois cultivares de arroz Fernandes e Maravilha após 0, 3, 6 e 9 dias de exposição a 0 mM (○) ou 1 mM (●) de Al. Asterisco denota diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo cultivar ($p \leq 0.05$). Barras representam o desvio padrão.

Os teores de glutationa oxidada (GSSG) nas plantas-controle do cultivar Fernandes aumentaram no 3º e 6º dia, declinando a seguir no 9º dia (Fig. 1e). Já nas plantas tratadas com Al os teores de GSSG aumentaram linearmente com o tempo. Na presença de Al, o teor de GSSG foi sempre menor do que nas plantas-controle, exceto no 9º dia de tratamento. No cultivar Maravilha, o teor de GSSG decresceu ligeiramente no 3º e 6º dia, independente do tratamento com Al. No 9º dia, à semelhança do observado no cultivar Fernandes, o teor de GSSG nas raízes do

cultivar Maravilha tratadas com Al tornou-se 17% maior do que nas plantas-controle (Fig. 1f). No 9º dia, na presença de Al, o teor de GSSG no cultivar Fernandes foi 16% maior do que no cultivar Maravilha.

A razão GSH/GSSG nas raízes do cultivar Fernandes tratadas com Al decresceu com o tempo de tratamento, entretanto no 3º e 6º dia, essa razão foi 131% e 66% maior que nas plantas-controle, respectivamente (Fig. 1g). A razão GSH/GSSG nas raízes do cultivar Maravilha aumentou ligeiramente com o tempo a partir do 3º dia de análise, mas não foi influenciada pelo tratamento com Al (Fig. 1h).

A atividade da sintetase da γ -glutamilcisteína (γ -GCS) nas raízes das plantas-controle não se modificou ao longo do período experimental em nenhum dos cultivares de arroz (Fig. 2a e 2b). Na presença de Al, a atividade da γ -GCS nas raízes do cultivar Fernandes, também, não se modificou com o tempo de tratamento, mas foi em média 34% mais elevada que no controle. No cultivar Maravilha, a atividade da enzima γ -GCS só aumentou no 9º dia de tratamento com Al, sendo 26% maior que a atividade do controle. A atividade dessa enzima no cultivar Fernandes foi 33% e 28% maior que no cultivar Maravilha no 3º e 6º dias de tratamento com Al. No 9º dia de tratamento com Al os dois cultivares passaram a não diferir estatisticamente.

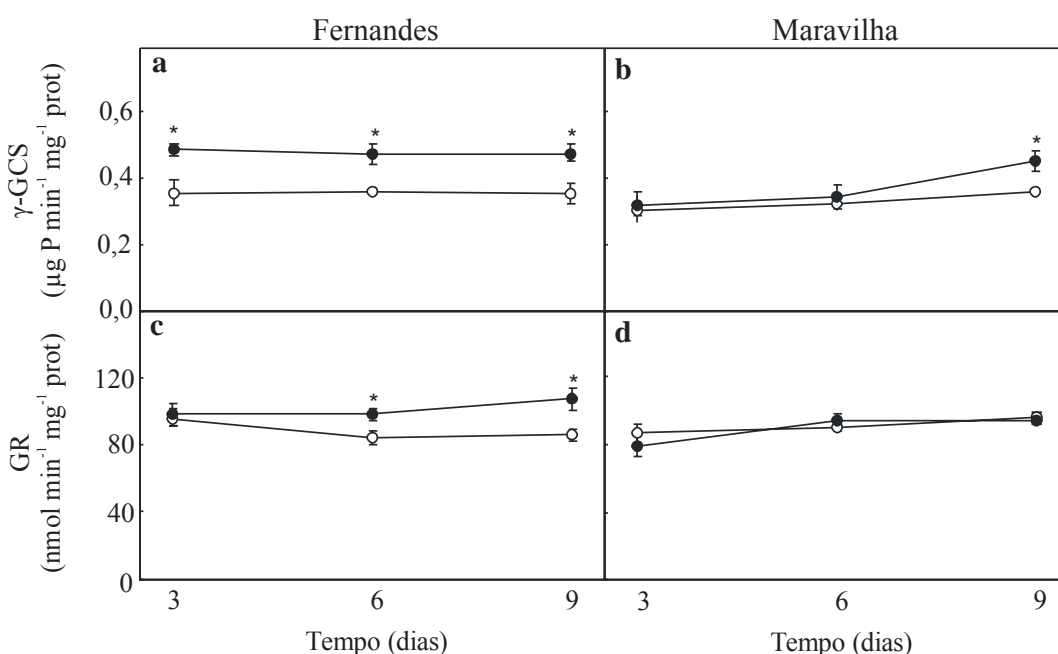


Figura 2: Atividade das enzimas sintetase da γ -glutamilcisteína (γ -GCS), e redutase da glutatona (GR) em raízes dos cultivares de arroz Fernandes e Maravilha após 3, 6 e 9 dias de exposição a 0 mM (○) ou 1 mM (●) de Al. Asterisco denota diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo cultivar ($p \leq 0.05$). Barras representam o desvio padrão.

A atividade da enzima redutase da glutatona (GR) nas raízes do cultivar Fernandes aumentou a partir do 3º dia de tratamento com o Al ficando 16% e 24% maior do que no controle após 6 e 9 dias de tratamento (Fig. 2c). No cultivar Maravilha não se observou efeitos significativos do Al, em relação ao controle, mesmo com o prolongamento do experimento (Fig. 2d).

Em relação as plantas-controle, a atividade da peroxidase da glutatona (GPX) não alterou nos dois cultivares de arroz no 3º dia de exposição ao Al (Fig. 3a e 3b). A partir do 6º dia, nas plantas tratadas com Al, observou-se aumento na atividade dessa enzima no cultivar Fernandes, enquanto ela se manteve essencialmente constante no cultivar Maravilha. Nas raízes do cultivar Fernandes, a atividade dessa enzima na presença de Al foi aproximadamente 28% mais elevada que nas plantas-controle no 6º e 9º dias de tratamento. No cultivar Maravilha, a atividade da enzima GPX nas plantas tratadas com Al foi cerca de 30% mais elevada que nas plantas-controle no 9º dia de tratamento com esse metal.

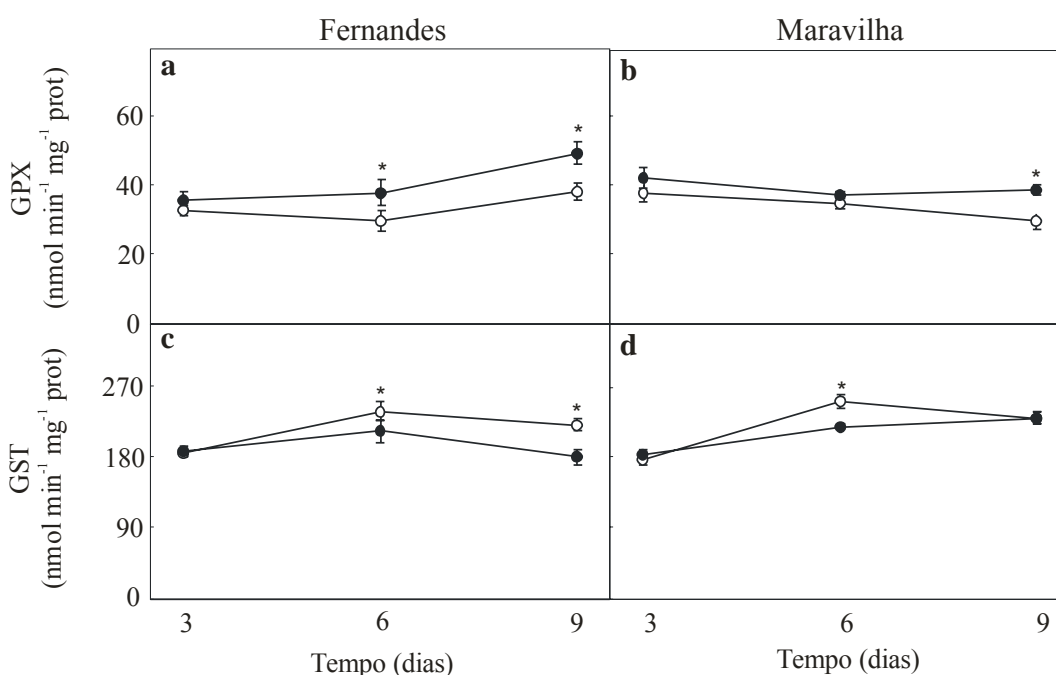


Figura 3: Atividade das enzimas peroxidase da glutatona (GPX), e sulfotransferase da glutatona (GST) em raízes dos cultivares de arroz Fernandes e Maravilha após 3, 6 e 9 dias de exposição a 0 mM (○) ou 1 mM (●) de Al. Asterisco denota diferença significativa entre os tratamentos para o mesmo cultivar ($p \leq 0.05$). Barras representam o desvio padrão.

A atividade da sulfotransferase da glutatona (GST), no 3º dia de tratamento, foi muito próxima nos dois cultivares, independente da presença de Al (Fig. 3c e 3d). No 6º dia, para os dois cultivares de arroz, as plantas que foram expostas ao Al

apresentaram menor atividade enzimática do que as plantas-controle. Já no 9º dia do período experimental, apenas nas raízes do cultivar Fernandes, foi observado, em relação ao controle, redução na atividade enzimática após tratamento com Al.

4. Discussão

A glutathiona reduzida (GSH) é um dos mais importantes metabólitos na defesa das plantas contra danos oxidativos gerados por estresses bióticos e abióticos (Noctor et al., 1998). Ela pode ser utilizada diretamente como antioxidante celular (Ascher, 1989) ou ser substrato para enzimas antioxidativas (Noctor et al., 1998).

O controle dos níveis homeostáticos da glutathiona, portanto, é de fundamental importância para plantas submetidas a condições ambientais que resultam em estresse oxidativo, como, por exemplo, o Al. A manutenção de níveis celulares da glutathiona depende de várias rotas metabólicas como, por exemplo, dos ciclos peroxidase da glutathiona e ascorbato-glutathiona (Mittler, 2002; Apel e Hirt, 2004) e, ou de processos relacionados à degradação/síntese de GSH (Noctor et al., 2002; Tausz et al., 2004; Aravind e Prasad, 2005).

A glutathiona reduzida (GSH), em geral, corresponde a cerca de 90% da glutathiona total (Meister, 1988). No presente trabalho, a participação da GSH nas raízes do cultivar Fernandes, contribuiu, em média, com 75% do teor total de glutathiona. No 3º dia de exposição ao Al, a participação da GSH no teor de glutathiona total das raízes do cultivar Fernandes chegou a 82%, mas à medida que o tempo de tratamento aumentou, sua contribuição relativa foi diminuindo, chegando a 76% e 69%, para o 6º e 9º dia, respectivamente. Trabalho de Sharma e Dubey, (2007), com outros cultivares de arroz, chegou a valores similares aos obtidos no presente trabalho (cerca de 80% da glutathiona total). Esses resultados evidenciam que o balanço entre a biossíntese e, ou, regeneração e os processos de consumo de GSH na presença de Al foram negativos. O Al é reconhecidamente um indutor de estresse oxidativo (Richards et al., 1998; Ezaki et al., 2000), resultando em elevado consumo de GSH para manter o estado de redox celular ou para ativar enzimas antioxidativas que a utilizam como substrato. No caso do cultivar Maravilha, considerado sensível ao Al, a contribuição da GSH no teor de glutathiona total foi praticamente constante, em torno de 67%, independente do tempo e da presença de Al, indicando pequena participação desse metabólito nos mecanismos de tolerância deste cultivar.

A molécula de glutathione pode exercer forte proteção para as células contra danos oxidativos gerados durante o estresse por Al (Devi et al., 2003), principalmente em cultivares tolerantes a esse metal (Dong et al., 2002). Entretanto, para a realização dessa função antioxidativa, a molécula de glutathione, obrigatoriamente, deve estar na forma reduzida (GSH). No presente trabalho, apesar de o teor de GSH ter diminuído nas raízes do cultivar Fernandes durante o período de imposição do estresse por Al, mesmo assim, seu teor foi sempre maior nesse cultivar do que no Maravilha (Fig. 1c e 1d), indicando uma possível correlação entre os níveis de GSH e a tolerância ao estresse oxidativo induzido pelo Al. Resultados semelhantes foram encontrados por Dong et al. (2002) e Xu et al. (2011), trabalhando com cultivares de trigos com tolerância diferencial ao Al. Para esses autores, esses resultados são indícios de que a molécula de glutathione atuaria como um eficiente mecanismo de defesa antioxidativo, conferindo tolerância contra os possíveis danos gerados pelo Al.

Os teores de glutathione oxidada (GSSG) dependem basicamente da sua formação pela reação da GSH com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), catalisada pela peroxidase da glutathione (GPX) e de sua utilização na reação catalisada pela redutase da glutathione (GR) durante a regeneração da GSH (Noctor e Foyer, 1998; Mittler, 2002). No cultivar Fernandes, do 3º ao 6º dia de tratamento, os teores de GSSG foram mais baixos nas raízes das plantas cultivadas em presença de Al (Fig. 1e). Isso indica que na fase inicial do estresse, ocorre maior consumo de GSSG. Já no 9º dia, o teor de GSSG nas plantas tratadas com Al alcançou valores mais elevados do que nos controles dos dois cultivares, indicando estar ocorrendo, nesse momento, maior consumo de GSH do que sua regeneração via GR.

Os níveis homeostáticos de GSH e GSSG são dependentes da ação de diversas enzimas relacionadas a sua biossíntese, regeneração e degradação (Noctor et al., 2002; Tausz et al., 2004; Aravind e Prasad, 2005). No presente trabalho, procurou-se relacionar as atividades de algumas das principais enzimas associadas ao metabolismo da glutathione com os teores de GSH e GSSG nas raízes de dois cultivares de arroz submetidos ao tratamento com Al. De maneira geral, os resultados obtidos no presente estudo mostraram existir uma relação entre o metabolismo da glutathione e as respostas diferenciais de tolerância ao Al entre esses dois cultivares de arroz.

Uma alta relação GSH/GSSG é considerada indicativo de um estado redox adequado das células visando a eliminação do excesso das ROS produzidas durante o estresse oxidativo (Mittler, 2002). Valores elevados para essa relação são resultado de um balanço positivo entre as atividade das enzimas GR (Apel e Hirt, 2004), γ -GCS e GSH-S (Ishikawa et al., 2006) em relação à atividade de enzimas consumidoras, como a GPX. No presente trabalho, a razão GSH/GSSG nas raízes do cultivar Fernandes tratadas com Al foi sempre maior do que no controle (Fig. 1g). Já para o cultivar Maravilha, isto não foi observado (Fig. 1h). Sharma e Dubey, (2007), também verificaram maior razão GSH/GSSG em raízes de arroz tratadas com Al. Após estresse por Al, um cultivar de trigo tolerante a este metal apresentou maior razão GSH/GSSG em suas raízes que o cultivar sensível (Xu et al., 2011). A relação GSH/GSSG mais elevada pode ser considerada um forte indicativo da existência de um mecanismo eficiente de defesa antioxidativo nas raízes do cultivar Fernandes, mas pouco significativo no cultivar Maravilha. No presente trabalho, a razão GSH/GSSG reduziu entre o 3º e o 9º dia de tratamento com Al nas raízes do cultivar Fernandes (Fig. 1g). Esta é uma forte evidencia da utilização da GSH no combate aos danos oxidativos gerados pelo Al, principalmente no 9º dia de tratamento, no qual o estresse por este metal é mais intenso, refletindo em redução no teor de GSH (Fig. 1c) e, conseqüentemente, em menor razão GSH/GSSG.

As enzimas γ -GCS e GR estão diretamente envolvidas na manutenção do teor de GSH no interior das células, catalisando reações da rota biossintética e regenerativa desse metabólito, respectivamente (Noctor e Foyer, 1998; Aravind e Prasad, 2005). As atividades dessas duas enzimas, na presença de Al, foram sempre maiores do que nas plantas-controle, exceto a GR, no 3º dia de tratamento (Fig. 2a e 2c). A γ -GCS atua conjuntamente com a sintetase da glutationa (GSH-S), participando diretamente da síntese desse metabólito (Noctor e Foyer, 1998; Noctor et al., 2002). Paralelamente ao aumento nas atividades dessas enzimas, observou-se aumento nos teores de GSH. De modo semelhante, Ruiz e Blumwald, (2002) trabalhando com plantas expostas ao estresse salino, observaram aumentos na atividade das enzimas γ -GCS, GR e da GSH-S, resultando em aumentos nos teores de GSH. As enzimas γ -GCS e GR, juntamente com a GSH-S, são importantes componentes do sistema de manutenção dos níveis homeostáticos da GSH (Noctor et al., 2002). A atividade da GSH-S não foi determinada no presente trabalho, porém

acredita-se que ela siga a mesma tendência da γ -GCS, uma vez que elas atuam em série na rota de biossíntese da GSH (Noctor e Foyer, 1998; Noctor et al., 2002).

A GR catalisa a regeneração da GSH a partir da GSSG, reduzindo, conseqüentemente, o teor de GSSG (Drazkiewicz et al., 2003). Nagalakshmi e Prasad, (2001) trabalhando com plantas submetidas ao estresse por cobre observaram aumentos na atividade da γ -GCS, mas reduções na atividade da GR, resultando em decréscimos nos teores de GSH. Segundo esses autores, a atividade da GR pode ser fator limitante na reciclagem da GSH, pois atuaria diretamente na regeneração dessa molécula.

No presente trabalho, durante o 3º e o 6º dia de estresse por Al, foi possível observar correlação entre as atividades das enzimas γ -GCS e GR e o teor de GSH apenas para o cultivar Fernandes. As maiores atividades dessas duas enzimas durante o período de tratamento com Al contribuiu positivamente para a manutenção de maiores teores de GSH nos tecidos desse cultivar. Por outro lado, no 9º dia de tratamento com Al, mesmo as duas enzimas tendo apresentado acréscimos em suas atividades, não foi observado aumento em relação ao controle no teor de GSH, o que pode ser explicado pelo maior consumo da GSH em comparação a sua taxa de síntese e/ou regeneração (Wang e Kao, 2007). O consumo de GSH por outras rotas, como por exemplo, pela enzima GPX, também pode ter contribuído para este resultado.

A peroxidase da glutathiona (GPX) é um importante componente do sistema enzimático antioxidativo, protegendo as células de um possível acúmulo de H_2O_2 durante os estresses oxidativos (Chaoui et al., 1997). Essa enzima apresentou maior atividade nas plantas tratadas com o Al a partir do 6º dia no cultivar Fernandes, enquanto no cultivar Maravilha apenas no 9º dia. Além disso, o aumento na atividade da GPX no cultivar Fernandes foi sempre maior do que no cultivar Maravilha. Maior atividade e o estímulo mais precoce dessa enzima no cultivar Fernandes, considerado tolerante ao Al, indicam que esse cultivar se beneficia dessa resposta mais rápida ao estresse oxidativo durante a imposição do estresse por Al. Maior atividade da GPX também foi observada em raízes de plantas de trigo tolerantes ao Al (Xu et al., 2011). Para a eliminação do H_2O_2 pela enzima GPX, entretanto, torna-se necessária a utilização da GSH como substrato da reação tendo, conseqüentemente, a forma GSSG como produto da reação (Eshdat et al., 1997). O aumento na atividade da GPX,

conforme observado no presente trabalho, além de resultar em redução no teor de GSH, levou ao aumento no teor de GSSG nas células.

Nas raízes do cultivar Fernandes, no 6º e no 9º dia de estresse por Al, as atividades das enzimas GR (Fig. 2c) e GPX (Fig. 3a) foram fortemente ativadas pela presença desse metal. Inicialmente, a GR pode ter contribuído para o aumento na concentração da GSH, que conseqüentemente levaria ao aumento na atividade da GPX. Xu et al. (2011), trabalhando com cultivares de trigo com tolerância diferencial ao Al, observaram que, após exposição das plantas a este metal, houve, nas raízes do cultivar tolerante, maior atividade das enzimas GR e GPX, fato que refletiu em menor teor de ROS e, conseqüentemente, em menor peroxidação de lipídios em relação ao cultivar sensível. Portanto, um controle fino entre a regeneração e o consumo de GSH por essas duas enzimas, pode contribuir para a remoção de ROS do interior das células. Por outro lado, nas raízes do cultivar Maravilha, não foi observada qualquer relação entre a atividade das enzimas GPX e GR.

A GST é uma enzima importante na rota do metabolismo da glutathiona com papel ativo na desintoxicação das plantas a xenobióticos, como herbicidas, por exemplo, utilizando como substrato a glutathiona (Marrs, 1996). Além disso, essa enzima também pode exercer papel na proteção das plantas contra danos oxidativos gerados pelas espécies reativas de oxigênio (Pascal et al., 1998). Em *Scenedesmus bijugatus*, observou-se aumentos significativos na atividade dessa enzima na presença de cobre, sugerindo ter havido aumentos em produtos da degradação oxidativa de lipídios e ácidos nucléicos (Nagalakshmi e Prasad, 2001). Em *Euphorbia esula*, também se observou pequeno aumento de 10 a 20% na atividade da GST após 48 horas de exposição ao cobre (Davis e Swanson, 2001). Além disso, Ezaki et al. (2004) verificaram que, em *Arabidopsis*, após tratamento com Al, houve super-expressão de dois genes relacionados com a síntese da enzima GST. No presente trabalho, embora a atividade da GST tenha aumentado ligeiramente com o prolongamento do estresse na presença de Al sua atividade foi sempre igual ou menor do que nas plantas-controle dos dois cultivares (Fig. 3c e 3d). Esse resultado indica que, pelo menos para essa espécie e sob as condições experimentais, essa enzima não contribuiu para a proteção dos danos causados pelo Al.

Os resultados do presente trabalho indicam que o metabolismo de glutathiona está diretamente relacionado com a tolerância ao Al nos cultivares de arroz estudados. As concentrações da GSH e da GSSG e as atividades das enzimas γ -GCS,

GR, GPX e GST, na presença do Al, modificaram-se coerentemente com o que se conhecia a respeito da tolerância dos dois cultivares de arroz a esse elemento tóxico. No cultivar Fernandes, na presença de Al, os teores de GSH e a relação GSH/GSSG foram mais elevados proporcionando melhor capacidade de manutenção do estado redox do que no cultivar Maravilha. As atividades das enzimas γ -GCS e GR, que catalisam a produção de GSH, e da GPX, que catalisa a eliminação de peróxido de hidrogênio, produzindo substrato para a GR, foram coerentes com o melhor aproveitamento da GSH no controle do estresse oxidativo induzido por Al no cultivar Fernandes. Conseqüentemente, esse cultivar demonstra ter um metabolismo da glutathiona mais eficiente, o que contribui para a sua tolerância ao estresse induzido pelo Al.

5. Referências bibliográficas

- Alscher, R.G. Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. **Physiol. Plant.** 77:457-464, 1989.
- Apel, K., Hirt, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annu. Rev. Plant Biol.** 55:373-399, 2004.
- Aravind, P., Prasad, M.N.V. Modulation of cadmium-induced oxidative stress in *ceratophyllum demersum* by zinc involves ascorbate-glutathione cycle and glutathione metabolism. **Plant Physiol. Biochem.** 43:107-116, 2005.
- Carlberg, I., Mannervik, B. Glutathione reductase. **Methods Enzymol.** 113: 484-495, 1985.
- Chaoui, A., Mazhoudi, S., Ghorbal, M.H., El Ferjani, E. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Sci.** 127:139-147, 1997.
- Clark, R.B. Characterization of phosphatase of intact maize roots. **J. Agric. Food Chem.** 23:458-460, 1975.
- Corrales, I., Poschenrieder, C., Barcelo, J. Boron-induced amelioration of aluminium toxicity in a monocot and a dicot species. **J. Plant Physiol.** 165:504-513, 2008.
- Devi, S.R., Yamamoto, Y., Matsumoto, H. An intracellular mechanism of aluminum tolerance associated with high antioxidant status in cultured tobacco cells. **J. Inorg. Biochem.** 97:59-68, 2003.
- Dong, B., Sang, W.L., Jiang, X., Zhou, J.M., Kong, F.X., Hu, W., Wang, L.S. Effects of aluminum on physiological metabolism and antioxidant system of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Chemosphere**, 47:87-92.2002.

- Drazkiewicz, M., Skorznska-Polit, E., Krupa, Z. Response of the ascorbate-glutathione cycle to excess copper in *Arabidopsis thaliana* (L). **Plant Sci.** 164:195-202, 2003.
- Eshdat, Y., Holland, D., Faltin, Z., Bem-Hayyim, G. Plant glutathione peroxidases. **Physiol. Plant.** 100:234-240, 1997.
- Ezaki, B., Gardner, R.C., Ezaki, Y., Matsumoto, H. Expression of aluminum-induced genes in transgenic *Arabidopsis* plants can ameliorate aluminum stress and/or oxidative stress. **Plant Physiol.** 122:657-665, 2000.
- Ezaki, B., Suzuki, M., Motoda, H., Kawamura, M., Nakashima, S., Matsumoto, H. Mechanism of gene expression of *Arabidopsis* glutathione S-transferase, AtGST1, and AtGST11 in response to aluminum stress. **Plant Physiol.** 134: 1672–1682, 2004.
- Foyer, C.H., Theodoulou, F., Delrot, S. The functions of inter- and intracellular glutathione transport systems in plants. **Trends Plant Sci.** 10:486-492, 2001.
- Griffith, O.W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. **Anal. Biochem.** 106:207-212, 1980.
- Habig, W.H., Jakoby, W.B. Assay for differentiation of glutathione S-transferases. In: JAKOBY, W.B. (Ed.). **Methods in Enzymology**, New York, Academic Press, 77:398-405, 1981.
- Inouhe, M. Phytochelatins. **Braz. J. Plant Physiol.** 17:65-78, 2005.
- Ishikawa, T., Dowdle, J., Smirnoff, N. Progress in manipulating ascorbic acid biosynthesis and accumulation in plants. **Physiol. Plant.** 126:343-355, 2006.
- Klapheck, S., Latus, C., Bergmann, G. Localization of glutathione synthetase and distribution of glutathione in leaf cells of *Pisum sativum* L. **J. Plant Physiol.** 131:123-131, 1987.
- Kocsy, G., Ballmoos, P. V., Suter, M., Ruegsegger, A., Galli, U., Szalai, G., Galiba, G., Brunold, C. Inhibition of glutathione synthesis reduces chilling tolerance in maize. **Planta.** 211:528-536, 2000.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.L. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193:265-275, 1951.
- Marrs, K.A. The functions and regulation of glutathione s-transferase in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 47:127-158, 1996.
- May, M.J., Vernoux, T., Leaver, C., Montagu, M.V., Inzé, D. Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. **J. Exp. Bot.** 49:649-667, 1998.

- Meister, A. Glutathione metabolism and its selective modification. **J. Biol. Chem.** 263:17205-17208, 1988.
- Mittler, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Sci.** 7:405-409, 2002.
- Nagalakshmi, N., Prasad, M.N.V. Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. **Plant Sci.** 160:291-299, 2001.
- Noctor, G., Arisi, A.C.M., Jouanin, L., Kunert, K.J., Rennenberg, H. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. **J. Exp. Bot.** 49:623-647, 1998.
- Noctor, G., Foyer, C.H. Ascorbate and Glutathione: keeping active oxygen under control. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 49:249-279, 1998.
- Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H., Foyer, C.H. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in control of glutathione homeostasis and signaling. **J. Exp. Bot.** 53:1283-1304, 2002.
- Noctor, G., Strohm, M., Jouanin, L., Kunert, K.J., Foyer, C.H., Rennenberg, H. Synthesis of glutathione in leaves of transgenic poplar overexpressing γ -glutamylcysteine synthetase. **Plant Physiol.** 112:1071-1078, 1996.
- Panda, S.K., Matsumoto, H. Changes in antioxidant gene expression and induction of oxidative stress in pea (*Pisum sativum* L.) under Al stress. **Biomaterials** 23:753-762, 2010.
- Richards, K.D., Schott, E.J., Sharma, Y.K., Davis, K.R., Gardner, R.C. Aluminum induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiol.** 116:409-418, 1998.
- Ruegsegger, A., Brunold, C. Effect of cadmium on γ -glutamylcysteine synthesis in maize seedlings. **Plant Physiol.** 99:428-433, 1992.
- Ruiz, J.M., Blumwald, E. Salinity-induced glutathione synthesis in *Brassica napus*. **Planta** 214:965-969, 2002.
- Ruiz, J.M., Rivero, R.M., Romero, L. Preliminary studies on the involvement of biosynthesis of cysteine and glutathione concentration in the resistance to B toxicity in sunflower plants. **Plant Sci.** 165:811-817, 2003.
- Semane, B., Cuypers, A., Smeets, K., Belleghem, F.V., Horemans, N., Schat, H., Vangronsveld, J. Cadmium responses in *Arabidopsis thaliana*: glutathione metabolism and antioxidative defence system. **Physiol. Plant.** 129:519-529, 2007.

- Sharma, P., Dubey, R.S. Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum. **Plant Cell Rep.** 26, 2027-2038, 2007.
- Tausz, M., Sircelj, H., Grill, D. The glutathione system as a stress maker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid? **J. Exp. Bot.** 55:1955-1962, 2004.
- Wang, J.W., Kao, C.H. Protective effect of ascorbic acid and glutathione on AlCl₃-inhibited growth of rice roots. **Biol. Plant.** 51:493-500, 2007.
- Xu, F.J., Jin, C.W., Liu, W.J., Zhang, Y.S., Lin, X.Y. Pretreatment with H₂O₂ alleviates aluminum-induced oxidative stress in wheat seedlings. **J. Integr. Plant Biol.** 53:44–53, 2011.
- Yamaguchi, Y., Yamamoto, Y., Ikegawa, H., Matsumoto, H. Protective effect of glutathione on the cytotoxicity caused by a combination of aluminum and iron in suspension-cultured tobacco cells. **Physiol. Plant.** 105:417-422, 1999.

4. CONCLUSÕES GERAIS

Após exposição das plantas dos dois cultivares de arroz a níveis tóxicos de Al foi possível concluir que, parte da maior tolerância apresentada pelo cultivar Fernandes em relação ao Maravilha está relacionada:

- ao maior crescimento das raízes e a maior produção de massa seca radicular;
- ao menor acúmulo de Al nos ápices radiculares;
- aos menores efeitos do Al sobre a morfologia externa das raízes;
- às maiores atividades das enzimas antioxidativas, principalmente da SOD;
- à melhor utilização/regeneração do ascorbato pelas enzimas APX, MDHAR e DHAR;
- ao menor acúmulo de ROS e à menor taxa de peroxidação de lipídios;
- à melhor utilização dos teores de GSH e GSSG e
- à maior atividade das enzimas γ -GCS, GR e GPX, envolvidas na biossíntese, regeneração e degradação da glutathiona.