

CLEBERSON RIBEIRO

**SISTEMAS DE DEFESA CONTRA ESTRESSES OXIDATIVOS
EM DOIS CULTIVARES DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) COM
TOLERÂNCIA DIFERENCIAL AO ALUMÍNIO**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2007**

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

T

R484s
2007

Ribeiro, Cleberson, 1980-

Sistemas de defesa contra estresses oxidativos em dois cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) com tolerância diferencial ao alumínio / Cleberson Ribeiro. – Viçosa, MG, 2007.

x, 49f. : il. ; 29cm.

Inclui apêndice.

Orientador: José Cambraia.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 33-43.

1. Fisiologia vegetal. 2. Stress (Fisiologia). 3. Arroz - Efeito do alumínio. 4. Indução enzimática. 5. Antioxidantes. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 571.2

CLEBERSON RIBEIRO

**SISTEMAS DE DEFESA CONTRA ESTRESSES OXIDATIVOS
EM DOIS CULTIVARES DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) COM
TOLERÂNCIA DIFERENCIAL AO ALUMÍNIO**

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

Aprovada: 8 de março de 2007

Prof. Paulo Henrique P. Peixoto
(Co-Orientador)

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

Prof. Marco Aurélio P. e Silva

Prof. Juraci Alves de Oliveira

Prof. José Cambraia
(Orientador)

*Aos meus queridos pais, Cleber Ribeiro e
Marilda de Fátima Gomes Ribeiro e aos
meus irmãos Cleber Junior e Keila:*

MINHA HOMENAGEM

*A minha amada esposa Karla
Veloso Gonçalves Ribeiro:*

OFEREÇO E DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por mais esta oportunidade.

À Universidade Federal de Viçosa - UFV e ao Departamento de Biologia Vegetal por proporcionarem condições para o desenvolvimento deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Ao Professor José Cambraia pela orientação, pelos ensinamentos e pela amizade, e por seu exemplo de profissionalismo e competência.

Aos Professores Paulo Henrique Pereira Peixoto e Marco Antonio Oliva Cano pelo aconselhamento e incentivo.

Aos Professores Juraci Alves de Oliveira, Marco Aurélio Pedron e Silva, Rolf Pushmann, Raimundo Santos Barros e Fábio Murilo da Matta pela colaboração.

Ao amigo e companheiro de bancada, Élcio com quem compartilhei buscas, dúvidas e descobertas e que tanto me ajudou.

Aos funcionários, Monteiro, Carlos (Charles), Carlos Raimundo, Geraldo (Marreco), José Antonio, Reginaldo, Oswaldo, Maria Mercês, e Cássia, e em especial, ao Beringh, pela enorme demonstração de boa vontade e pela ajuda imprescindível em todas as etapas do trabalho.

Aos amigos de curso Carol Müller, Elaine, Gabriela, Kelly, Otávia, Raphaela, Alan, Bráulio, Cláudio, Eduardo, Ricardo Montanari, Ana Maria Mapelli, Matheus, Marcelo Guimarães, Rony e Valdir pela ajuda e amizade.

Às minhas cunhadas Karine, Kamila e Flávia e aos meus amigos Talles, Hugo e Ricardinho pela grande torcida.

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

E aos demais amigos e familiares que contribuíram para realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Cleberson Ribeiro, filho de Cleber Ribeiro e Marilda de Fátima Gomes Ribeiro, nasceu na cidade de Juiz de Fora, MG, no dia 13 de julho de 1980.

Em janeiro de 2005, graduou-se em Ciências Biológicas na Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF.

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

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1 – INTRODUÇÃO	1
2 – MATERIAL E MÉTODOS	9
2.1 – Obtenção das Plantas e Aplicação dos Tratamentos com Alumínio	9
2.2 – Avaliação do Efeito do Alumínio Sobre o Crescimento.....	9
2.3 – Avaliação do Efeito do Al Sobre os Sistemas de Defesa Antioxidativos das Plantas	10
2.3.1 – Avaliação do Efeito do Al Sobre a Atividade de Enzimas do Sistema Antioxidativo das Plantas	10
2.3.1.1 – Obtenção dos Extratos Enzimáticos brutos.....	10
2.3.1.2 – Determinação da Atividade das Superóxido Dismutases (SODs).....	11
2.3.1.3 – Determinação da Atividade das Catalases (CATs).....	11
2.3.1.4 – Determinação da Atividade das Peroxidasas (POXs).....	11
2.3.1.5 – Determinação da Atividade das Peroxidasas do Ascorbato (APXs).....	12
2.3.1.6 – Determinação da Atividade das Redutases da Glutathione (GRs).....	12
2.3.1.7 – Determinação da Atividade das Peroxidasas da Glutathione (GPXs).....	13
2.3.2 – Avaliação do Efeito do Al Sobre a Concentração de Metabólitos do Sistema Antioxidativo das Plantas	13
2.3.2.1 – Determinação das Concentrações de Ascorbato e Desidroascorbato	13
2.3.2.2 – Determinação da Concentração de Glutathione Total.....	14
2.4 – Determinação de Proteínas.....	15
2.5 – Delineamento Experimental e Análise Estatística.....	15
3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
3.1 – Efeito do Alumínio Sobre o Crescimento em Comprimento e sobre a Produção de Massa Seca.....	16
3.2 – Efeito do Alumínio sobre os Sistemas de Defesa Antioxidativos.....	18
3.2.1 – Efeito do Alumínio Sobre o Sistema de Defesa Enzimático.....	18
3.2.2 – Efeito do Alumínio Sobre o Sistema de Defesa Não-Enzimático.....	27
4 – CONCLUSÕES	32
5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
6 – APÊNDICE	44

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1.** Efeito do alumínio sobre o crescimento da raiz seminal e das folhas de dois cultivares de arroz, tratados com Al 0 e 1 mM durante dez dias..... **16**
- Figura 2.** Efeito do alumínio sobre a produção de massa seca nas raízes e nas folhas de dois cultivares de arroz, tratados com Al 0 e 1 mM durante dez dias..... **18**
- Figura 3.** Atividade das superóxido dismutases (SODs) nas raízes e nas folhas de dois cultivares de arroz, tratados com Al 0 e 1 mM durante dez dias..... **19**
- Figura 4.** Atividade das catalases (CATs) nas raízes e nas folhas de dois cultivares de arroz, tratados com Al 0 e 1 mM durante dez dias **20**
- Figura 5.** Atividade das peroxidases (POXs) nas raízes e nas folhas de dois cultivares de arroz, tratados com Al 0 e 1 mM durante dez dias. **22**
- Figura 6.** Atividade das peroxidases do ascorbato (APXs) nas raízes e nas folhas de dois cultivares de arroz, tratados com Al 0 e 1 mM durante dez dias..... **23**
- Figura 7.** Atividade das redutases da glutathiona (GRs) nas raízes e nas folhas de dois cultivares de arroz, tratados com Al 0 e 1 mM durante dez dias..... **25**
- Figura 8.** Atividade das peroxidases da glutathiona (GPXs) nas raízes e nas folhas de dois cultivares de arroz, tratados com Al 0 e 1 mM durante dez dias..... **26**
- Figura 9.** Concentração de ascorbato total, ascorbato reduzido, desidroascorbato e razão ascorbato reduzido/desidroascorbato nas raízes e nas folhas de dois cultivares de arroz, tratados com Al 0 e 1 mM durante dez dias..... **28**
- Figura 10.** Concentração de glutathiona total (GSH+GSSG) nas raízes e nas folhas de dois cultivares de arroz, tratados com Al 0 e 1 mM durante dez dias..... **30**

RESUMO

RIBEIRO, Cleberson, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2007.
Sistemas de defesa contra estresses oxidativos em dois cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) com tolerância diferencial ao alumínio. Orientador: José Cambraia. Co-Orientadores: Marco Antônio Oliva Cano e Paulo Henrique Pereira Peixoto.

Os efeitos do alumínio (Al) sobre o crescimento e sobre os sistemas de defesa antioxidativos enzimáticos e não-enzimáticos envolvidos na eliminação dos intermediários reativos de oxigênio (ROIs) foram avaliados em dois cultivares de arroz: Fernandes (CNA-1158) e Maravilha (CNA-6843-1) com tolerância diferencial ao Al. As plantas, cultivadas em solução nutritiva, pH 4,0, foram tratadas com Al nas concentrações de 0 e 1 mM, durante dez dias. A exposição das plantas ao Al não afetou o crescimento no cultivar Fernandes, enquanto, no Maravilha, reduções significativas foram observadas nos parâmetros de crescimento avaliados. Nas raízes dos dois cultivares, a presença do Al aumentou a atividade das enzimas catalases (CATs), peroxidases (POXs), redutases da glutatona (GRs) e peroxidases da glutatona (GPXs). A atividade das superóxido dismutases (SODs) aumentou apenas nas raízes do cultivar Fernandes, não sendo modificada para o cultivar Maravilha. Independente do tratamento aplicado e da parte da planta analisada, a atividade das peroxidases do ascorbato (APXs) foi sempre maior no cultivar Fernandes. Nas folhas, o Al não alterou a atividade de nenhuma das enzimas no cultivar Fernandes, exceto a das POXs que sofreu redução. No cultivar Maravilha, por outro lado, as atividades das SODs, POXs e GPXs foram reduzidas na presença de Al. Dentre as enzimas estudadas, as SODs, APXs e GPXs nas raízes e as CATs, POXs, APXs nas folhas, exibiram resposta consistente com a tolerância diferencial ao Al apresentada pelos dois cultivares de arroz estudados. Nos dois cultivares, o teor de ascorbato (AA) aumentou nas folhas e o de desidroascorbato (DHA) reduziu nas raízes, em resposta ao tratamento com Al. O teor da forma reduzida (AA) foi muito mais elevado nas folhas, na qual a relação AA/DHA atingiu valores 30 vezes maiores que nas raízes. Nas raízes, o cultivar Fernandes apresentou menores teores de AA, porém maior atividade das APXs, enquanto no cultivar Maravilha foi observado o oposto,

demonstrando o importante papel desse metabólito como substrato para a reação catalisada pelas APXs. A concentração de glutathiona total, também, parece ser importante no sistema de defesa não enzimático, mas provavelmente seria necessário discriminar entre as suas formas, reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), para entender seu papel como substrato das enzimas antioxidativas. De modo geral, as atividades dos sistemas de defesa antioxidativos enzimático e não-enzimático, tanto nas raízes como nas folhas dos dois cultivares, indicaram ter o cultivar Fernandes mecanismos de defesa mais eficientes no combate aos ROIs produzidos durante o tratamento com Al.

ABSTRACT

RIBEIRO, Cleberson, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March of 2007.
Defense systems against oxidative stresses in two rice cultivars (*Oryza sativa* L.) with differential tolerance to aluminum. Adviser: José Cambraia. Co-Advisers: Marco Antônio Oliva Cano and Paulo Henrique Pereira Peixoto.

Aluminum (Al) effects on the growth and enzymatic and non-enzymatic antioxidative mechanisms involved in the scavenging of reactive oxygen species (ROIs) in two rice cultivars: Fernandes (CNA-1158) and Maravilha (CNA-6843-1) with differential tolerance to Al were studied. The plants, grown in pH 4.0 nutrient solution, for ten days in nutrient solution, pH 4,0, were treated with Al 0 and 1 mM for ten days. Exposure to Al did not affect growth in Fernandes cultivar, while in Maravilha cultivar significant reductions were observed in the evaluated growth parameters. Aluminum increased the activities of the enzymes, catalases (CATs), peroxidases (POXs), glutathione reductases (GRs) and glutathione peroxidases (GPXs) in the roots of both cultivars. The activity of superoxide dismutases (SODs), however, increased only in the roots of the Fernandes cultivar, while in Maravilha cultivar it remained unchanged. Independent of the applied treatment and of the plant analyzed, the activity of the ascorbate peroxidases (APXs) was always larger in Fernandes cultivar. In the leaves, Al did not change any enzyme activity in Fernandes cultivar, except the POXs activity which reduced. In Maravilha cultivar, on the other hand, SODs, POXs and GPXs activities reduced in the presence of Al. Among the studied enzymes, SODs, APXs and GPXs in the roots and of CATs, POXs and APXs in the leaves, showed responses to Al treatment consistent with the differential tolerance to Al of these two rice cultivars. Ascorbate (AA) contents increased in the leaves and dehydroascorbate (DHA) decreased in the roots, in response to the Al treatment in both cultivars. The reduced form (AA) content was much higher in the leaves, where the AA/DHA ratio reached values thirty times larger times than in the roots. In the roots, Fernandes cultivar showed lower AA contents, but higher APXs activity and the Maravilha cultivar the opposite, indicating an important role of this metabolite as substrate for the reaction catalyzed by APXs.

Total glutathione contents, also, seem be important to the non-enzymatic defense system of both cultivars, but probably will be necessary to discriminate between reduced (GSH) and oxidized (GSSG) form to understand the role of this substance in sustaining antioxidative enzyme activities. In general, the activity of the antioxidative system, enzymatic and non-enzymatic, both in roots and leaves, were suggestive of having Fernandes cultivar a more efficient defense mechanism to the ROIs produced by Al treatments.

1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa*) é um dos mais importantes cereais, sendo o principal alimento para mais de 2 bilhões de pessoas na Ásia, África e América Latina (DEMIRAL & TÜRKAN, 2005). Entre as culturas de importância econômica, o arroz tem sido considerado uma das mais tolerantes a níveis tóxicos de alumínio (FERREIRA et al., 1995). Segundo SIVAGURU et al. (1992), existe entre os cultivares de arroz ampla variação quanto à tolerância ao alumínio, sendo que alguns são seriamente afetados por altas concentrações deste metal (FAGERIA & CARVALHO, 1982). A compreensão do mecanismo de tolerância do arroz ao Al poderá resultar na identificação dos genes ligados à tolerância e, possivelmente, de genótipos ainda mais tolerantes (NGUYEN et al., 2001).

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 & RYAN, 1995). A toxidez do alumínio em plantas é considerada um dos principais fatores que limitam a produtividade das plantas em solos ácidos (GONÇALVES et al., 2000; BARCELÓ & POSCHENRIEDER, 2002). As regiões tropicais e subtropicais contam com cerca de 60% dos solos ácidos do mundo (KOCHIAN et al., 2004). Apenas no Brasil, mais de 500 milhões de hectares são cobertos por solos ácidos que ocupam aproximadamente 2/3 da área total do país (VITORELLO et al., 2005).

Em solos com valores de pH próximos à neutralidade, o Al pode ser encontrado em formas insolúveis, geralmente não tóxicas às plantas. Porém, em solos mais ácidos (pH<5,0) o Al se solubiliza, podendo atingir níveis tóxicos que afetam o crescimento das plantas (KOCHIAN, 1995). Nestes solos, o Al se apresenta na forma de octaedro hexahidratado, $Al(H_2O)_6^{3+}$, mais conhecida como Al^{3+} , considerada a forma mais tóxica de Al no solo (KOCHIAN, 1995; DELHAIZE & RYAN, 1995; ECHART & CAVALLI-MOLINA, 2001; VITORELLO et al., 2005). À medida que o pH se eleva o Al passa a formas menos tóxicas às plantas. Na prática, a correção do pH do solo, pela aplicação de calcário, pode resolver o problema de toxidez do Al. No entanto, a aplicação de calcário corrige a acidez apenas nas camadas superficiais do solo sendo ineficaz nas camadas inferiores. A aplicação de calcário, além disso, implica em aumentos significativos dos custos de

produção (ECHART & CAVALLI-MOLINA, 2001; FREITAS et al., 2006). Por estas razões, a obtenção de cultivares tolerantes ou resistentes a níveis tóxicos de Al torna-se uma estratégia altamente desejável para a produção de culturas economicamente importantes em solos ácidos (FAGERIA & CARVALHO, 1982; FERREIRA et al., 1999; FREITAS et al., 2006).

Apesar dos numerosos trabalhos, os mecanismos fisiológicos da tolerância das plantas ao Al ainda não estão totalmente conhecidos. Porém, sabe-se que a região do ápice radicular é o alvo primário da ação fitotóxica do Al (RYAN et al., 1992). Este metal, ao ser absorvido, tende a se acumular, preferencialmente, no ápice da raiz, promovendo a inibição da divisão celular e, conseqüentemente, do alongamento radicular (KOCHIAN, 1995). Outros sintomas causados ao sistema radicular pelo estresse do Al incluem reduções no peso de massa seca, no número e no comprimento das raízes, freqüentemente associados ao aumento no raio médio e no volume radicular (SIVAGURU & PALIWAL, 1993). Isso resulta em redução na absorção de água e nutrientes minerais (CALBO & CAMBRAIA, 1980; MENDONÇA et al., 2003), com efeitos nas taxas fotossintéticas e respiratórias (OHKI, 1986), promovendo severas perdas em crescimento e produtividade.

Poucos trabalhos têm relacionado os efeitos do Al sobre a parte aérea das plantas. Segundo RYAN et al. (1993), na parte aérea, as plantas demonstram os danos causados pelo Al somente após maior tempo sob estresse, danos esses que parecem ser conseqüência daqueles que ocorrem nas raízes (MATSUMOTO et al., 1976). O estresse causado pelo Al pode modificar a translocação de nutrientes para a parte aérea das plantas, provocando o aparecimento de clorose (CHANG et al., 1998) e necrose foliar (NGUYEN et al., 2003). Em alguns casos, estes sintomas assemelham-se aos das deficiências de fósforo, cálcio ou nitrogênio (ROUT et al., 2001). Esses fatos foram observados por MENDONÇA et al. (2003) e por FREITAS et al. (2006) que, trabalhando com diferentes cultivares de arroz submetidos ao estresse de Al, evidenciaram alterações nas concentrações dos macronutrientes na parte aérea das plantas.

A carga elétrica positiva permite que o Al^{3+} reaja com numerosos sítios nas células, alvos potenciais de injúria, incluindo a parede celular, o citoesqueleto, o núcleo e a membrana plasmática (KOCHIAN et al., 2004). Segundo WAGATSUMA et al. (1995), a membrana plasmática parece ser o alvo primário dos danos

provocados pelo Al. Na parede celular o Al pode se ligar aos grupos carboxílicos das pectinas e das proteínas diminuindo a extensibilidade (DELHAIZE & RYAN, 1995). Já na membrana plasmática, a ligação do Al aos lipídios e às proteínas atua inibindo o transporte de nutrientes e acarretando distúrbios no metabolismo celular (EMMANUEL & PETER, 1995). Além disso, o Al pode alterar a permeabilidade das membranas em decorrência de modificações na fluidez e na densidade da bicamada lipídica (ZHAO et al., 1987) assim como no aumento da síntese de calose (WISSEMEIER et al., 1992).

A peroxidação de lipídios é outro processo induzido nas membranas celulares pelo Al. Os danos peroxidativos decorrem principalmente da deterioração oxidativa de ácidos graxos insaturados das membranas pela ação de intermediários reativos de oxigênio (ROIs) presentes no interior das células (SCANDALIOS, 1993). Esses ROIs são considerados “subprodutos inevitáveis” do metabolismo aeróbico e, nas plantas, são produzidos principalmente nas mitocôndrias (MØLLER, 2001), nos cloroplastos (FOYER & NOCTOR, 2000) e, em peroxissomos (DEL RIO et al., 2002). Os intermediários reativos de oxigênio incluem oxigênio “singlete” ($^1\text{O}_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$) e radical hidroxila (HO^\bullet) (SCANDALIOS, 1993; MITTLER, 2002). Alguns autores acreditam que o acúmulo de Al nos tecidos vegetais, por si só, não cause a peroxidação de lipídios (BOSCOLO et al., 2003). No entanto, este processo é intensamente acelerado em presença de Fe^{2+} (CAKMAK & HORST, 1991; YAMAMOTO et al., 2001). A explicação para esse fenômeno está relacionada à ocorrência da reação “Harber-Weiss”, na qual íons Fe^{2+} interagem com radicais superóxido e com o peróxido de hidrogênio, dando origem ao radical hidroxila, considerado o mais potente oxidante celular, o que provocaria aumento da peroxidação dos lipídios nas membranas celulares (SCANDALIOS, 1993).

Embora muitos dos efeitos tóxicos do Al sobre o funcionamento e o crescimento das plantas tenham sido descritos, pouco se conhece sobre os mecanismos de resistência das plantas a este metal. Segundo KOCHIAN (1995), os mecanismos de tolerância ao Al podem ser classificados em dois grupos: os de tolerância externa e os de tolerância interna. Nos mecanismos de tolerância externa, o Al seria excluído do ápice radicular por diferentes processos, incluindo a sua imobilização nas paredes celulares, a permeabilidade seletiva das membranas, a

formação de barreira de pH induzida pela planta na rizosfera, bem como pela liberação de ácidos orgânicos para o apoplasto e rizosfera. Neste último caso, os principais ácidos exsudados seriam o cítrico e o málico, os quais se ligariam ao Al formando complexos estáveis que dificultariam a absorção deste metal pela planta (DELHAIZE & RYAN, 1995; MA et al., 2001). Dentre os mecanismos de tolerância interna são citados a complexação do Al por várias substâncias quelantes, como por exemplo, ácidos orgânicos, seguido de sua compartimentalização nos vacúolos e a ligação do Al a certas proteínas (KASAI et al., 1992; TAYOR et al., 1997).

Outra hipótese, que tem sido recentemente testada, é a possibilidade da tolerância ao Al estar relacionada à capacidade das plantas suportarem o estresse oxidativo induzido pelo Al. Níveis tóxicos deste elemento podem induzir a produção de ROIs (YAMAMOTO et al., 2002) ativando genes que codificam a síntese ou a ativação de enzimas relacionadas ao sistema de defesa antioxidativo das plantas (EZAKI et al., 2000). Alguns desses genes, induzidos pelo Al, podem codificar enzimas como a glutatona S-transferase, a peroxidase e a superóxido dismutase, sugerindo forte relação entre o estresse causado pelo Al e o metabolismo antioxidativo (CAKMAK & HORST, 1991; RICHARDS et al., 1998). Essas enzimas antioxidativas atuam sobre os ROIs produzidos durante o estresse (SIMONOVICOVÁ et al., 2004), minimizando ou evitando seus danos sobre a atividade celular (BREUSEGEM et al., 2001).

As plantas, em maior ou menor grau, estão adaptadas a conviverem com certos níveis de ROIs. Quando, porém, os ROIs se acumulam nos tecidos, tornam-se tóxicos, podendo levar as células à morte (RESENDE et al., 2003). Em função disso, as plantas desenvolveram estratégias para manter constantes os níveis destes ROIs no interior das células (APEL & HIRT, 2004), utilizando para isso mecanismos de defesa enzimáticos e, ou não enzimáticos (SCANDALIOS, 1993). Dentre as enzimas que participam dos sistemas de defesa das plantas destacam-se as catalases (CATs), as superóxido dismutases (SODs), as peroxidases (POXs), as peroxidases do ascorbato (APXs), as peroxidases da glutatona (GPXs) e as redutases da glutatona (GRs). Dentre os metabólitos que podem ser importantes nos sistemas de defesa não-enzimáticos destacam-se o ascorbato (AA), o monodesidroascorbato (MDHA), a glutatona reduzida (GSH), o α -tocoferol e os carotenóides (MITTLER, 2002).

As enzimas SODs e CATs formam um dos mais importantes sistemas de defesa das plantas contra os ROIs, removendo, respectivamente, os radicais superóxido ($O_2^{\bullet -}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), evitando, desta forma, a produção do radical hidroxila (HO^{\bullet}), gerado pelas reações “Haber-Weiss” (CAKMAK & HORST, 1991; ASADA, 1992; SCANDALIOS, 1993).

As SODs são metaloenzimas responsáveis pela dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular (ASADA et al., 1974; GIANNOPOLITIS & RIES, 1977). Em plantas superiores as SODs apresentam-se na forma de três isoenzimas, classificadas de acordo com o íon metálico presente no grupo prostético: Mn-SOD, Cu/Zn-SOD e Fe-SOD (SCANDALIOS, 1993; ASADA, 1999; ARORA et al., 2002). Essas isoenzimas estão distribuídas em diferentes compartimentos celulares: a Fe-SOD é encontrada principalmente nos cloroplastos, a Mn-SOD nas mitocôndrias e peroxissomos e a Cu/Zn-SOD nos cloroplastos, citossol e, possivelmente, no espaço extracelular (ALSCHER et al., 2002).

O H_2O_2 , formado espontaneamente pela dismutação do radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$) ou pela reação catalisada pelas SODs, é eliminado do metabolismo celular por ação das enzimas CATs, APXs e POXs (ARORA et al., 2002). Assim, o balanço entre as atividades das SODs, APXs, CATs e POXs no metabolismo celular é crucial para a manutenção dos níveis de “steady state” do radical $O_2^{\bullet -}$ e H_2O_2 (MITLER, 2002).

As CATs são enzimas tetrâmeras, contendo um grupo heme-protéico em cada subunidade (HORVÁTH et al., 2002), que convertem o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular (MØLLER, 2001). As CATs estão, predominantemente, localizadas nos peroxissomos, não sendo encontradas nos cloroplastos (HAVIR & McHALE, 1987; RESENDE et al., 2003). O H_2O_2 produzido nos cloroplastos, por essa razão, é eliminado por reações peroxidativas envolvendo as enzimas APXs (NAKANO & ASADA, 1981; ASADA, 1992; ARORA et al., 2002). Segundo MITTLER (2002), as diferentes afinidades das APXs (alta afinidade, μM) e das CATs (baixa afinidade, mM) pelo H_2O_2 sugerem a existência de duas classes de enzimas eliminadoras de H_2O_2 do interior das células. As APXs seriam responsáveis pela modulação fina dos ROIs, ao passo que as CATs seriam responsáveis pela remoção do excesso de ROIs durante o estresse.

As POXs são enzimas capazes de oxidar vários substratos na presença de H_2O_2 ou de hidroperóxidos orgânicos (ASADA, 1992). As peroxidases estão amplamente distribuídas nas células, sendo encontradas não apenas associadas às paredes celulares, mas, também, às membranas celulares, organelas, vacúolos e citoplasma (SIEGEL, 1993). Pouco se conhece sobre os mecanismos indutivos das POXs causados por metais, mas sabe-se que o aumento na atividade dessas enzimas é uma resposta de defesa à maioria dos metais que podem causar danos ou apenas perturbar o metabolismo normal dos vegetais (FANG & KAO, 2000). A atividade das POXs, como parte do sistema antioxidativo das plantas, depende do tipo de metal causador do estresse, da espécie analisada, do órgão envolvido e do estágio de desenvolvimento das plantas (HEGEDŰS et al., 2001). Além de uma distribuição mais ampla nas células do que as CATs, as POXs apresentam menor massa molecular (35 kDa), permitindo mobilidade mais rápida dentro dos diversos compartimentos celulares onde a sua ação é requerida (SIEGEL, 1993).

Dois importantes compostos no processo antioxidativo, o ascorbato e a glutathione, são requeridos como doadores de elétrons para que alguns sistemas de defesa enzimáticos possam atuar eliminando os ROIs do interior das células. A síntese de ascorbato ocorre em mitocôndrias, enquanto a de glutathione pode ocorrer nos cloroplastos e, ou no citossol (NOCTOR & FOYER, 1998). Estes metabólitos encontram-se em alta concentração no interior das células, estando distribuídos no citossol, mitocôndria, peroxissomos, apoplasto e, principalmente, no interior dos cloroplastos (MITTLER, 2002). Enzimas do sistema antioxidativo das plantas, ao interagirem com as formas reduzidas destes dois compostos, proporcionam excelente mecanismo de eliminação dos ROIs (CREISSEN et al., 1999). Segundo SMIRNOFF et al. (2001) e DIPIERRO et al. (2005), o ascorbato tem sido classificado como componente chave do sistema antioxidativo das plantas, estando relacionado aos estresses biótico e abiótico. Para ARORA et al. (2002), a glutathione, por atuar na regeneração do ascorbato e, também, por combater os ROIs, é de fundamental importância para as plantas. A manutenção da concentração de ascorbato e de glutathione, em plantas submetidas à determinada condição de estresse, envolve complexa interação entre síntese, degradação, transporte e armazenamento no interior das células (FOYER & NOCTOR, 2000).

As APXs utilizam especificamente o ascorbato como doador de elétrons na reação de eliminação de H_2O_2 , protegendo as células contra os danos oxidativos e fotooxidativos deste tipo de ROI (ASADA, 1992). Estas enzimas são encontradas, principalmente, nos cloroplastos e no citossol (ARORA et al., 2002), podendo, também, estar associadas às mitocôndrias, peroxissomos e ao apoplasto (MITTLER, 2002).

As GRs são enzimas dependentes de NAD(P)H que catalisam a redução da glutathiona oxidada (GSSG), formando duas moléculas de glutathiona reduzida (GSH) (SCHAEDLE & BASSHAM, 1977; CARLBERG & MANNERVIK, 1985). Portanto, estas enzimas apresentam importante função na proteção contra o estresse oxidativo, pois sustentam níveis elevados de GSH no interior das células (FOYER et al., 1994). As GRs podem participar do Ciclo Ascorbato-Glutathiona, o qual já foi identificado em cloroplastos (FOYER & HALLIWELL, 1976), citossol (NOCTOR & FOYER, 1998), peroxissomos e mitocôndrias (JIMENEZ et al., 1997; MITTOVA et al., 2004). Neste ciclo, participam quatro enzimas: as APXs, as GRs, a redutase do desidroascorbato (DHAR) e a redutase do monodesidroascorbato (MDHAR). As GRs fornecem GSH que será utilizada como substrato pela enzima DHAR para regeneração do ascorbato. Esse composto, também, pode ser regenerado pela MDHAR utilizando NAD(P)H como agente redutor da reação. Desta forma, na presença de ascorbato, as APXs podem eliminar o H_2O_2 do interior das células. Portanto, este ciclo é considerado um importante mecanismo de defesa contra os ROIs (HUANG et al., 2005b).

As GPXs utilizam GSH como substrato da reação, podendo catalisar a redução de peróxido de hidrogênio, hidroperóxidos orgânicos ou hidroperóxidos lipídicos (ASADA, 1992; ESHDAT et al., 1997). A GSH utilizada nesta reação pode ser fornecida pelas GRs, fechando assim o Ciclo Glutathiona-Peroxidase (APEL & HIRT, 2004).

Alguns autores sugerem que o aumento na razão entre as formas reduzidas e oxidadas destes compostos, ascorbato/desidroascorbato (AA/DHA) (KAMPFENKEL et al., 1995) e glutathiona reduzida/glutathiona oxidada (GSH/GSSG) (FOYER & NOCTOR, 2005) são bons indicadores para se analisar a capacidade de eliminação dos ROIs. As enzimas DHAR, MDHAR e GRs são importantes para a regeneração das formas reduzidas do ascorbato e da glutathiona, resultando no

aumento nas razões (AA/DHA) e (GSH/GSSG), permitindo a formação de um eficiente mecanismo de remoção dos ROIs do interior das células (CAKMAK, 1994).

A ação de vários agentes estressantes, bióticos e abióticos, resulta na produção e no acúmulo de ROIs. As plantas possuem sistemas de defesa antioxidativos necessários à proteção de suas células contra os danos causados por esses ROIs. Atualmente, sabe-se que o Al é um elemento que produz estresse oxidativo nas plantas, modificando o metabolismo vegetal através da alteração no estado de oxido-redução dos componentes celulares, tendo como consequência o aumento na produção de ROIs (TAMÁS et al., 2006). Pouco se conhece sobre o efeito do Al na produção de ROIs, mas sabe-se que este metal pode ativar os sistemas de defesa das plantas no combate aos radicais livres. CAKMAK & HOST (1991) e MERIGA et al. (2004) observaram que o aumento na produção dos ROIs, induzido pelo Al, proporcionou mudanças nas atividades de determinadas enzimas, como, por exemplo, as SODs e POXs. Estes autores sugerem que o acréscimo na atividade destas enzimas pode minimizar os efeitos adversos dos ROIs sobre a peroxidação de lipídios, contribuindo, assim, para a manutenção da integridade das membranas. DIPIERRO et al. (2005), encontraram elevada atividade das APXs em tecidos vegetais tratados com Al, o que seria induzido em resposta ao incremento nos níveis de H₂O₂ no interior das células. NGUYEN et al. (2005), analisando o sistema de defesa não-enzimático das plantas, sugerem que a interação entre o ascorbato e a glutathiona constitui importante mecanismo de defesa antioxidativo no combate ao H₂O₂ formado durante o estresse com Al. Recentemente TAMÁS et al. (2006) observaram que o Al induziu a expressão de genes relacionados à síntese das enzimas GPXs, POXs, GRs e DHAR.

Os resultados da literatura sugerem que os mecanismos de atuação dos sistemas de defesa enzimáticos e não-enzimáticos, bem como as interações entre eles, são fundamentais para melhor entendimento da tolerância diferencial das plantas ao Al. Em função disso, o presente trabalho teve como objetivo estudar os efeitos do alumínio sobre o crescimento e sobre os sistemas de defesa antioxidativos, enzimáticos e não-enzimáticos, em plantas de dois cultivares de arroz com tolerância diferencial a este metal.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. OBTENÇÃO DAS PLANTAS E APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS COM ALUMÍNIO

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 (FAGERIA & CARVALHO, 1982; FAGERIA et al., 1988), fornecidos pelo Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão, de Goiânia, GO.

As sementes, selecionadas quanto ao tamanho e forma, foram tratadas com ácido sulfúrico (H₂SO₄) 98% (v/v), por 1 minuto. Em seguida foram lavadas em água de torneira e esterilizadas superficialmente com hipoclorito de sódio 3% (v/v) por 15 minutos, sendo lavadas, novamente, em água corrente e em água desmineralizada. A seguir, foram colocadas para germinar em cartuchos de papel “germiteste”, acomodados em vasos de 1,6 L contendo solução nutritiva de Clark (CLARK, 1975), pH 4,0, com um terço da força iônica original, sob aeração contínua.

Nove dias após a semeadura, as plântulas foram selecionadas quanto à uniformidade de tamanho e forma e transplantadas para vasos opacos, 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, aplicados na forma de AlCl₃, durante dez dias. O pH da solução nutritiva foi ajustado diariamente para 4,0, pela adição de HCl 0,1 N ou NaOH 0,1 N, sendo as soluções nutritivas renovadas a cada 5 dias.

O cultivo das plantas, tanto na fase preliminar quanto durante a aplicação dos tratamentos, foi sempre realizado em sala de crescimento com temperatura controlada para 25 ± 1°C, sob irradiância de cerca de 230 μmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas.

2.2. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ALUMÍNIO SOBRE O CRESCIMENTO

Plântulas dos dois cultivares de arroz, obtidas conforme descrito no item 2.1, foram colhidas, lavadas em água corrente e enxaguadas em água desmineralizada. Depois de medido o comprimento da maior raiz e das folhas, o material vegetal foi

colocado para secar em estufa convencional, a 80°C até obtenção de peso constante, para avaliação da massa seca.

2.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ALUMÍNIO SOBRE OS SISTEMAS DE DEFESA ANTIOXIDATIVOS DAS PLANTAS

2.3.1. Avaliação do efeito do alumínio sobre a atividade de enzimas do sistema antioxidativo das plantas

Plântulas dos dois cultivares de arroz, obtidas conforme descrito no item 2.1, foram colhidas, lavadas em água corrente e enxaguadas em água desmineralizada. Amostras de raízes e de folhas foram retiradas para o preparo dos extratos enzimáticos brutos.

2.3.1.1. Obtenção dos extratos enzimáticos brutos

Os extratos enzimáticos brutos para as determinações das atividades das catalases (CATs), das peroxidases (POXs), das peroxidases do ascorbato (APXs), das superóxidos dismutases (SODs) e das peroxidases da glutathiona (GPXs), foram obtidos pela maceração de 0,3 g de tecido vegetal em N₂ líquido, seguida da adição de 2 mL de meio de homogeneização, da filtração através de quatro camadas de gaze e da centrifugação a 12.000 *xg* por 15 minutos, a 4°C. No caso das redutases da glutathiona (GRs) utilizou-se apenas 0,2 g de tecido vegetal por 2 mL de meio de homogeneização. Os meios de homogeneização foram: 1) Tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1% (p/v) (PEIXOTO et al., 1999), para as enzimas CATs, POXs, APXs e SODs; 2) Tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, EDTA 1 mM e MgCl₂ 10 mM (NAGALAKSHMI & PRASAD, 2001) para as GPXs; 3) Tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5, EDTA 1 mM, DTT 2 mM, PMSF 1 mM e PVPP 1%, para as GRs (CARLBERG & MANNERVIK, 1985).

2.3.1.2. Determinação da atividade das superóxido dismutases (SODs, EC 1.15.1.1)

A atividade das superóxido dismutases foi determinada pela adição de 30 µL do extrato enzimático bruto foliar e de raiz a 2,97 mL de um meio de reação constituído de tampão de 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, mantida no interior de uma caixa fechada. Após 5 min de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul produzida pela fotorredução do NBT foi medida a 560 nm (GIANNOPOLITIS & RIES, 1977). A absorbância a 560 nm, de um meio de reação exatamente igual ao anterior, mas mantido no escuro, por igual tempo, serviu de “branco” e foi subtraído da leitura da amostra que recebeu iluminação. Uma unidade das SODs foi definida como a quantidade da enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (BEAUCHAMP & FRIDOVICH, 1971).

2.3.1.3. Determinação da atividade das catalases (CATs, EC 1.11.1.6)

A atividade das catalases foi determinada pela adição de 100 µL do extrato enzimático bruto de raiz e de 100 µL do extrato enzimático foliar diluído 1:5, a 2,9 mL de um meio de reação constituído de tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H₂O₂ 12,5 mM (HAVIR & McHALE, 1987). O decréscimo na absorbância a 240 nm, à temperatura de 25°C, foi medido durante o primeiro minuto de reação, sendo, a atividade das CATs determinada com base na inclinação da reta no intervalo de 0,2 a 0,4 minuto, após o início da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 36 M⁻¹ cm⁻¹ (ANDERSON et al., 1995) e o resultado expresso em µmol min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

2.3.1.4. Determinação da atividade das peroxidases (POXs, EC 1.11.1.7)

A atividade das peroxidases nos tecidos do sistema radicular e foliar foi determinada pelo método de KAR & MISHRA (1976). Aliquotas de 100 µL do

extrato enzimático diluído 1:20, tanto de raiz quanto de folhas, foram adicionados a 2,9 mL de uma mistura de reação constituída de tampão de fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e H₂O₂ 20 mM. O acréscimo na absorvância a 420 nm, à temperatura de 25°C, foi medido durante o primeiro minuto de reação pela produção de purpurogalina, sendo, a atividade das POXs determinada com base na inclinação da reta no intervalo de 0,2 a 0,4 minuto, após o início da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹ (CHANCE & MAEHLEY, 1955) e o resultado expresso em μmol min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

2.3.1.5. Determinação da atividade das peroxidases do ascorbato (APXs, EC 1.11.1.11)

A atividade das peroxidases do ascorbato foi determinada de acordo com o método de NAKANO & ASADA (1981), porém modificado por KOSHIBA (1993). Alíquotas de 100 μL do extrato enzimático bruto de raiz e de 100 μL do extrato enzimático foliar diluído 1:5, foram adicionados a 2,9 mL de um meio de reação constituído de tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, ácido ascórbico 0,8 mM e H₂O₂ 1 mM. O decréscimo na absorvância a 290 nm, à temperatura de 25°C, foi medido durante o primeiro minuto de reação, sendo, a atividade das APXs determinada com base na inclinação da reta no intervalo de 0,2 a 0,4 minuto, após o início da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹ (NAKANO & ASADA, 1981) e o resultado expresso em μmol min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

2.3.1.6. Determinação da atividade das redutases da glutathiona (GRs; EC 1.6.4.2)

A atividade das redutases da glutathiona foi determinada pela adição de 100 μL de extrato enzimático bruto de raiz e de folhas a 0,9 mL de um meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5, EDTA 1 mM, GSSG 1 mM e NADPH 0,1 mM (em tampão TRIS-HCl 0,5 mM, pH 7,5), segundo CARLBERG & MANNERVIK (1985). O decréscimo na absorvância a 340 nm, à temperatura de 30°C, foi medido no primeiro minuto sendo, a atividade das GRs determinada com

base na inclinação da reta no intervalo de 0,2 a 0,8 minuto, após o início da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (FOYER & HALLIWELL, 1976) e o resultado expresso em $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

2.3.1.7. Determinação da atividade das peroxidases da glutathiona (GPXs, EC 1.11.1.9)

A atividade das peroxidases da glutathiona foi determinada pela adição de 100 μL do extrato enzimático bruto de raiz e de 100 μL extrato enzimático foliar diluído 1:5, a 0,9 mL de um meio de reação constituído de tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, EDTA 1 mM, NaCl 0,114 M, GSH 1 mM, NADPH 0,2 mM, H_2O_2 0,25 mM e 1 unidade de redutase da glutathiona (NAGALAKSHMI & PRASAD, 2001). O decréscimo na absorvância a 340 nm, à temperatura de 30°C, foi medido no primeiro minuto de reação sendo, a atividade das GPXs determinada com base na inclinação da reta no intervalo de 0,3 a 0,6 minuto, após o início da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (ANDERSON & DAVIS, 2004) e o resultado expresso em $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

2.3.2. Avaliação do efeito do alumínio sobre a concentração de metabólitos do sistema antioxidativo das plantas

2.3.2.1. Determinação das concentrações de ascorbato (AA) e desidroascorbato (DHA)

Os teores de ascorbato reduzido (AA) e desidroascorbato (DHA) foram determinados como descrito por KAMPFENKEL et al. (1995). Para isso, 0,4 g de tecido radicular e 0,3 g de tecido foliar foram homogeneizados em 2,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) 6% (p/v), e centrifugado a 15.000 g, por 5 min. Todas as etapas necessárias ao processo de extração foram conduzidas a 4°C.

Alíquotas de 900 μL do extrato bruto de raiz e de 200 μL do extrato bruto foliar foram utilizadas nas análises. O teor de ascorbato total (AA + DHA) foi determinado após redução do DHA pelo ditioneitol (DTT). Para isso, aos extratos brutos foram adicionados 200 μL de DTT 10 mM (dissolvido em tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 7,4) e 400 μL de tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 7,4. A mistura foi incubada a 42°C, por 15 min. Subseqüentemente, acrescentaram-se à mistura 200 μL de N-etilmaleimida 0,5% (p/v) e 1,0 mL de TCA 10% (p/v), para o extrato foliar e 200 μL de TCA 50% (p/v) para o extrato da raiz, 800 μL de H_3PO_4 42% (v/v), 800 μL de 2,2'-dipiridil 4% (p/v) (dissolvido em etanol 70 %) e 400 μL de FeCl_3 3% (p/v), perfazendo volume final de 4 mL. Após agitação vigorosa, a mistura foi incubada a 42°C, por 40 min. Em seguida a reação foi paralisada em banho de gelo e a absorvância da mistura determinada a 525 nm.

O ascorbato reduzido (AA) foi determinado como descrito anteriormente, sendo o DTT e o N-etilmaleimida omitidos e substituídos por 600 μL de tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 7,4. O DHA foi calculado pela diferença entre o ascorbato total e o ascorbato reduzido. A concentração de AA foi determinada por meio de curva de calibração utilizando-se padrões autênticos de ácido ascórbico, sendo o resultado expresso em $\mu\text{mol g}^{-1}$ massa fresca.

2.3.2.2. Determinação da concentração de glutathiona total (GSH+GSSG)

Amostras de 0,3 g de massa fresca de raízes ou folhas foram trituradas em N_2 líquido, seguido da adição de 2 mL de meio de homogeneização constituído de HCl 0,1M contendo EDTA 1 mM (ANDERSON, 1985). Depois de filtrado através de quatro camadas de gaze, o homogeneizado foi centrifugado a 12.000xg por 15 minutos a 4°C.

A alíquotas de 200 μL do extrato bruto de raiz e do extrato foliar diluído 1:5, foram adicionados 200 μL de tampão de fosfato de sódio 125 mM, contendo EDTA 6,3 mM, pH 7,5, 500 μL de NADPH 0,3 mM e 100 μL de DTNB [ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzóico)] 6 mM. Após incubação a 30°C, por 5 minutos, adicionaram-se 10 μL de redutase da glutathiona (50 U mL^{-1}) e determinou-se a absorvância a 412 nm durante 1 minuto. A inclinação da reta foi tomada no intervalo de 0,2 a 0,8 minuto, após o início da reação e a concentração de glutathiona determinada por meio de curva

de calibração, utilizando-se padrões autênticos de glutatona reduzida. Os resultados foram expressos em nmol g^{-1} massa fresca.

2.4. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

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

2.5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os tratamentos foram dispostos no delineamento de blocos casualizados, em esquema fatorial (2x2): dois cultivares de arroz (Fernandes e Maravilha) e dois níveis de Al (0 e 1 mM), com três repetições.

Os resultados foram submetidos à 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. Os resumos da análise de variância são mostrados no apêndice.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito do Alumínio sobre o crescimento em comprimento e sobre a produção de massa seca.

A exposição das plântulas ao Al resultou em reduções significativas tanto no comprimento da maior raiz (raiz seminal) quanto no comprimento das folhas, apenas no cultivar Maravilha, considerado sensível a este íon (Figura 1). Já o cultivar Fernandes, considerado tolerante ao Al, não sofreu qualquer alteração no crescimento das duas partes da planta.

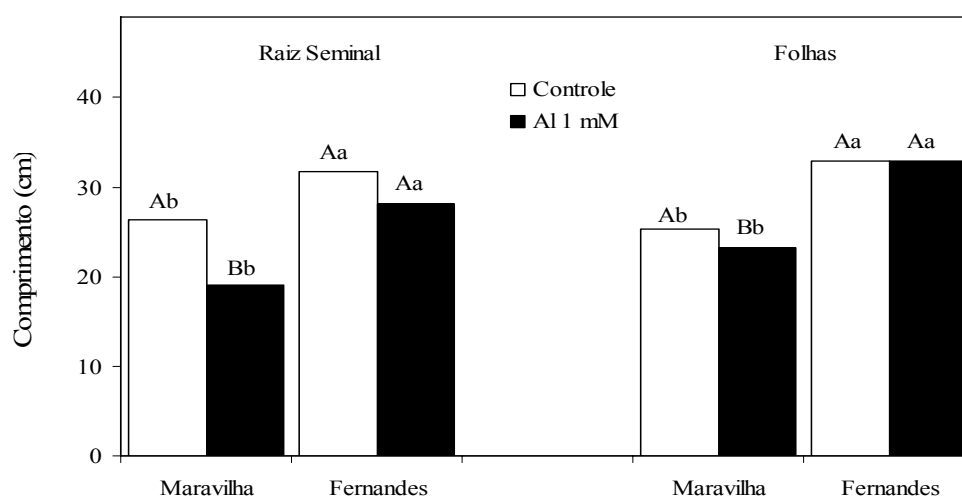


Figura 1: Efeito do alumínio sobre o crescimento da raiz seminal e das folhas de dois cultivares de arroz, tratados com Al 0 e 1 mM, durante dez dias. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, entre os níveis de Al para o mesmo cultivar, e pela mesma letra minúscula, entre cultivares para o mesmo nível de Al, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

As reduções no comprimento da raiz seminal e das folhas do cultivar Maravilha em resposta ao tratamento com Al foram de 27% e 9%, respectivamente. JUSTINO et al. (2006) trabalhando com estes mesmos cultivares, mas utilizando concentração de 0,5 mM de Al durante 21 dias, obtiveram resultados praticamente idênticos. Naquele trabalho, o cultivar Maravilha sofreu redução de 26% no comprimento da maior raiz e 10% nas folhas, enquanto o cultivar Fernandes não sofreu nenhum efeito significativo do Al. Aparentemente, a menor concentração utilizada por JUSTINO et al. (2006) foi compensada pelo aumento no tempo de exposição ao Al.

MERIGA et al. (2004) trabalhando com dois cultivares de arroz, Pusa Basmati (tolerante) e Vikas (sensível), diferentemente dos resultados observados neste trabalho, observaram reduções tanto no comprimento das folhas como das raízes nos dois cultivares tratados com alumínio. Todavia, as reduções no cultivar sensível foram sempre maiores do que no tolerante. Vários autores, trabalhando com estresse de alumínio em outras espécies, como trigo (RYAN et al. 1992), abóbora (DIPIERRO et al. 2005), sorgo (OHKI 1987) e cevada (SIMONOVICOVÁ et al. 2004), também encontraram efeitos diferenciais do Al em cultivares mais sensíveis e, ou mais tolerantes ao Al. Eles, também, relatam, à semelhança do que se observou neste experimento, ter ocorrido maior inibição no crescimento das raízes em relação ao das folhas.

Independente da presença de Al e da parte da planta analisada, o crescimento do cultivar Fernandes foi sempre maior do que o do cultivar Maravilha (Figura 1). Na ausência de Al, os comprimentos da raiz seminal e das folhas do cultivar Fernandes foram cerca de 17% e de 23% maiores que do cultivar Maravilha, respectivamente. Como na presença de Al os crescimentos das raízes e das folhas foram reduzidos apenas no cultivar Maravilha esta diferença se ampliou ainda mais, chegando a 32% e a 29%, respectivamente. Dados como estes justificam a maior tolerância do cultivar Fernandes ao Al, fato já demonstrado em solução nutritiva (FAGERIA & CARVALHO, 1982).

A exposição ao Al também provocou reduções significativas na massa seca das duas partes da planta apenas no cultivar Maravilha (Figura 2). Na presença de Al, este cultivar apresentou redução de massa seca de 63% e 50% nas raízes e nas folhas, respectivamente. As massas secas, tanto de raízes como de folhas, à semelhança do observado em termos de comprimento, foram sempre maiores no cultivar Fernandes do que no Maravilha. Neste caso, entretanto, as diferenças foram ainda maiores, atingindo valores de 83% para as raízes e de 76% para as folhas.

Trabalhando com os mesmos cultivares de arroz, MENDONÇA et al., (2005), JUSTINO et al., (2006) e ALVES (2005) obtiveram resultados semelhantes aos apresentados acima, ainda que, cada autor tenha trabalhado com diferentes concentrações de Al e, ou com diferentes tempos de exposição ao estresse.

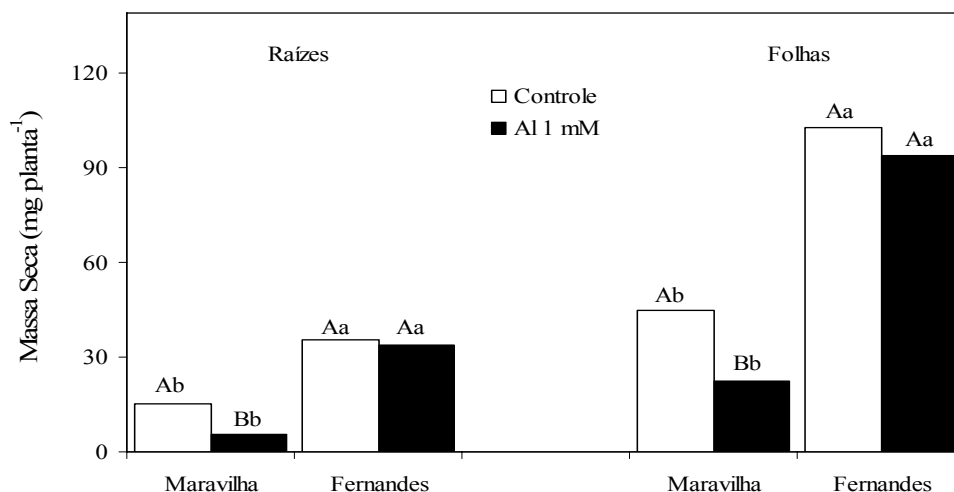


Figura 2: Efeito do alumínio sobre a produção de massa seca nas raízes e nas folhas de dois cultivares de arroz, tratados com Al 0 e 1 mM durante dez dias.

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 significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.2. EFEITO DO ALUMÍNIO SOBRE OS SISTEMAS DE DEFESA ANTIOXIDATIVOS

3.2.1. Efeito do alumínio sobre o sistema de defesa enzimático

A atividade das superóxido dismutases (SODs) nas raízes não foi estatisticamente modificada no cultivar Maravilha, mas aumentou cerca de 15% no Fernandes em resposta ao Al (Figura 3). Nas folhas, o cultivar Maravilha, quando tratado com Al, apresentou decréscimo de 11% na atividade das SODs, enquanto para o cultivar Fernandes não se observou diferença estatística entre os tratamentos.

Vários autores, trabalhando com estresse de Al, observaram aumentos na atividade das SODs em raízes de outras espécies vegetais, como em soja (CAKMAK & HORST, 1991), sorgo (PEIXOTO et al., 1999), cevada (SIMONOVICOVÁ et al., 2004) e, em outros cultivares de arroz (MERIGA et al., 2004). Segundo estes autores, os aumentos na atividade das SODs minimizam os efeitos adversos dos radicais superóxidos sobre as membranas, contribuindo assim, para a manutenção da integridade celular. Segundo LIN & KAO (2000), as SODs podem ter papel importante na redução da peroxidação de lipídios, atuando de forma a preservar o metabolismo celular da ação dos radicais $O_2^{\bullet-}$.

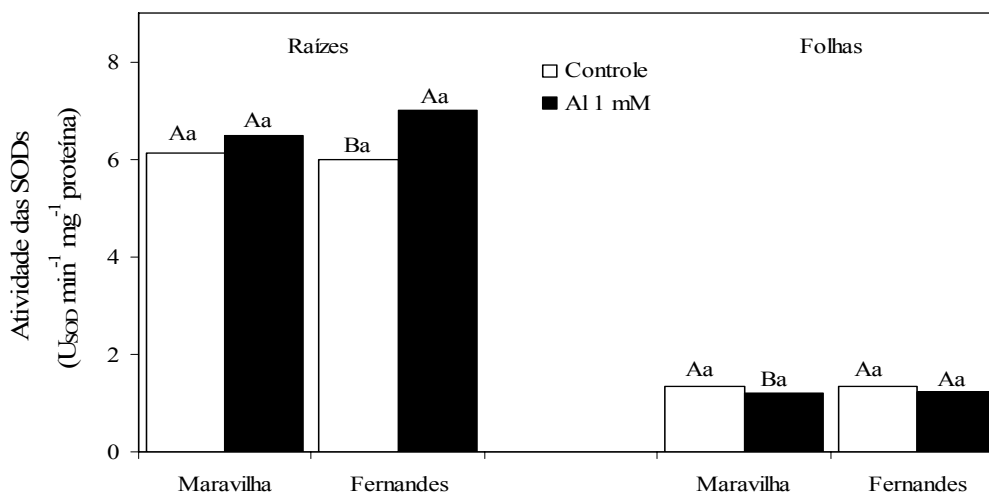


Figura 3: Atividade das superóxido dismutases (SODs) nas raízes e nas folhas de dois cultivares de arroz, tratados com Al 0 e 1 mM durante dez dias.

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 significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

As SODs fazem parte da primeira linha de defesa contra os intermediários reativos de oxigênio (ROIs), eliminando o radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$) do metabolismo celular (ALSCHER et al., 2002). Todavia, quando a sua eliminação não é total, parte das moléculas do radical superóxido pode ser utilizada como substrato em reações “Haber-Weiss” para, juntamente com o H_2O_2 , originar o radical hidroxila (HO^{\bullet}). Este radical é considerado o mais potente oxidante celular sendo, provavelmente, o responsável pela peroxidação de lipídios nas membranas e pela destruição de várias macromoléculas, causando sérios danos aos componentes celulares (SCANDALIOS, 1993). A atividade das SODs é, portanto, fundamental para a manutenção da concentração do radical $O_2^{\bullet -}$ em níveis que não causem danos ao metabolismo celular. DIONISIO-SESE & TOBITA (1998) e HUANG & GUO (2005a), trabalhando com cultivares de arroz apresentando tolerância diferencial ao estresse salino e ao frio, respectivamente, observaram decréscimo na atividade das SODs nas folhas dos cultivares sensíveis. Eles concluíram que a redução na atividade dessa enzima teve como conseqüência o aumento da peroxidação de lipídios, provocando sérios danos à integridade das membranas.

O cultivar Fernandes mostrou melhor resposta frente ao Al em termos de atividade das SODs, não só porque aumentou a atividade dessa enzima nas raízes, mas, também, porque não sofreu efeito do Al nas folhas. O aumento na atividade das

SODs observado nas raízes do cultivar Fernandes, na presença do Al, pode representar, portanto, um mecanismo de defesa antioxidativo mais eficiente neste cultivar. Todavia, esse aumento na atividade das SODs, também resulta em incremento nos níveis de H₂O₂ (LEE et al., 2001), que podem se difundir para vários compartimentos onde outras enzimas eliminadoras de H₂O₂ são ativadas e passam a atuar (MITTLER et al., 2004).

A atividade das catalases (CATs) aumentou significativamente nas raízes dos dois cultivares de arroz tratados com Al (Figura 4). O aumento na atividade dessa enzima no cultivar Maravilha foi de 30%, enquanto no cultivar Fernandes foi de 19% em relação ao tratamento controle. Apesar disso, tal como observado para as SODs, os cultivares também não diferiram quanto à atividade dessa enzima nem na ausência e nem na presença de Al.

A atividade das CATs nas folhas não foi influenciada significativamente pelo Al em nenhum dos cultivares (Figura 4). A atividade dessa enzima no cultivar Fernandes, entretanto, foi, em média, 29% maior que no cultivar Maravilha.

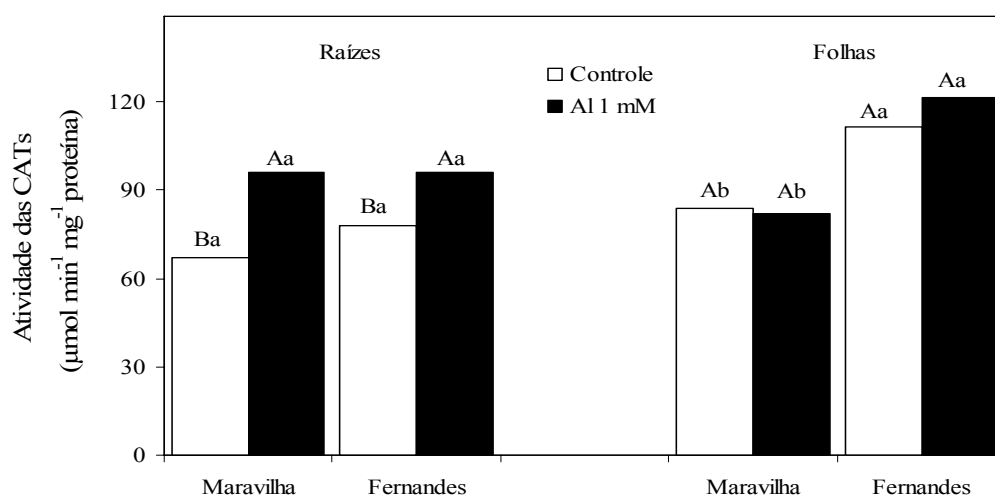


Figura 4: Atividade das catalases (CATs) nas raízes e nas folhas de dois cultivares de arroz, tratados com Al 0 e 1 mM durante dez dias.

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 significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

As CATs apresentam baixa afinidade por H₂O₂ (MITTLER, 2002). Em função disso, o aumento na atividade das CATs tem sido relacionado à produção de H₂O₂ em condições de estresse oxidativo, quando a capacidade de eliminação de

H₂O₂ pela ação de outras enzimas, como as POXs e APXs, é superada (FOYER et al., 1994 e MITTLER, 2002). Os aumentos na atividade das CATs, observados nas raízes dos dois cultivares tratados com Al, indicam que tal fato pode ter ocorrido nessa parte da planta. KUO & KAO (2003), trabalhando com arroz submetido ao estresse por Al também encontraram aumento na atividade das CATs em resposta ao acréscimo nos níveis de H₂O₂, mostrando, de modo direto, que esta resposta realmente pode acontecer.

Nas folhas, apesar do cultivar Fernandes ter apresentado maior atividade das CATs, a atividade dessa enzima não foi significativamente aumentada pelo Al. Esse resultado sugere que o cultivar Fernandes, mesmo na ausência de Al, pode suportar em seus tecidos níveis mais elevados de H₂O₂ e, ou está bioquimicamente melhor equipado para eliminar este tipo de intermediário reativo de oxigênio.

A atividade combinada das CATs e das SODs, pode ter contribuído para remoção do excesso de ROIs produzidos durante o estresse causado pelo Al nas raízes dos dois cultivares. Para alguns autores, essas duas enzimas consistem na primeira linha de defesa no combate aos ROIs (SCANDALIOS, 1993; MITTLER, 2002). GHANATI et al. (2005) trabalhando com raízes de *Camellia sinensis* submetidas ao Al, também encontraram aumento nas atividades das SODs e das CATs. Segundo esses autores, o H₂O₂ formado como produto da reação catalisada pelas SODs pode ter aumentado a atividade das CATs. Entretanto, alguns autores não encontraram relação entre a atividade dessas enzimas (CAKMAK & HORST, 1991; LIN & KAO, 2000).

Na ausência de Al, a atividade das peroxidases (POXs) foi similar nas raízes dos dois cultivares (Figura 5). O tratamento das plantas com Al, aumentou a atividade das POXs nos dois cultivares. No cultivar Maravilha o aumento foi de 31% e no cultivar Fernandes de 25%, passando o primeiro a ter atividade enzimática 13% maior que o segundo.

A atividade das POXs nas folhas foi cerca de 10 vezes menor que nas raízes (Figura 5). Na ausência de Al, a atividade enzimática no cultivar Fernandes foi 26% superior à encontrada no cultivar Maravilha (Figura 5). Como os dois cultivares sofreram redução similar na atividade das POXs com o tratamento das plantas com Al, a atividade dessas enzimas permaneceu mais elevada nas folhas do cultivar Fernandes.

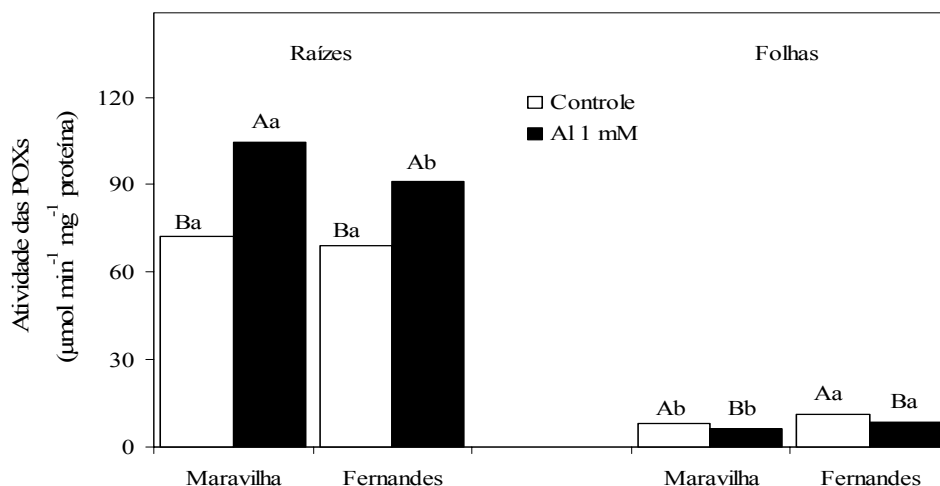


Figura 5: Atividade das peroxidases (POXs) nas raízes e nas folhas de dois cultivares de arroz, tratados com Al 0 e 1 mM durante dez dias.

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 significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Em raízes de soja tratadas com Al foi observado aumento na atividade das POXs, principalmente após exposição prolongada das plantas a este metal e sob concentrações mais elevadas de Al (CAKMAK & HORST, 1991). O mesmo aconteceu nas raízes de dois cultivares de arroz, um sensível e outro tolerante, após exposição a 80 μM de Al, durante 24 h (MERIGA et al., 2004). Todavia, após este período, o estresse excedeu a capacidade das plantas tolerarem aos ROIs produzidos. Os autores sugeriram que as POXs atuam como eficiente mecanismo de combate aos ROIs, podendo minimizar os efeitos adversos dessas moléculas sobre a peroxidação de lipídios e, desta forma, contribuir para a manutenção da integridade das membranas. No presente experimento, mesmo com dez dias de exposição ao Al, a atividade das POXs, nas raízes, foi maior nas plantas que receberam tratamento do que nas plantas dos controles, mostrando que os dois cultivares eram muito mais tolerantes que os utilizados por MERIGA et al. (2004). A resposta das POXs, também não indicou ter havido produção de ROIs além das capacidades das células dos dois cultivares de destruí-los enzimática, reduzindo, assim, os possíveis danos causados às membranas celulares.

Dentre as enzimas analisadas por SIMONOVICOVÁ et al. (2004), as POXs foram as que apresentaram maior atividade durante o estresse com Al. Segundo estes autores, isto se deve à grande importância das POXs para o sistema de defesa

antioxidativo das plantas no combate a peroxidação de lipídios. No presente trabalho, as POXs, juntamente com as CATs, foram às enzimas que apresentaram as maiores atividades. Estas duas enzimas, aparentemente, contribuíram de modo mais eficiente para a remoção de maiores quantidades de H₂O₂ do interior das células. Para SIEGEL (1993), as POXs apresentam maior importância na remoção do H₂O₂ do que as CATs. Segundo este autor, as POXs, em função de sua menor massa molecular, apresentariam maior mobilidade difusional que as CATs, o que as tornariam mais eficientes na destruição dos peróxidos formados. Resultados que corroboram esta idéia foram obtidos por BOSCOLO et al. (2003) que, em raízes de milho tratadas com Al, encontraram maior degradação do H₂O₂ pelas POXs do que pelas CATs.

Nas raízes a atividade das ascorbato peroxidases (APXs) não foi modificada pelo tratamento com Al em nenhum dos cultivares (Figura 6). A atividade das APXs, entretanto, foi cerca de 18% mais elevada no cultivar Fernandes nessa parte da planta, independente da presença de Al. A atividade das APXs nas folhas, foi cerca de 4 vezes menor que nas raízes e, também, não foi modificada pela presença de Al (Figura 6). Nas folhas, a atividade dessa enzima foi 13% mais elevada no cultivar Fernandes, independente do tratamento com Al.

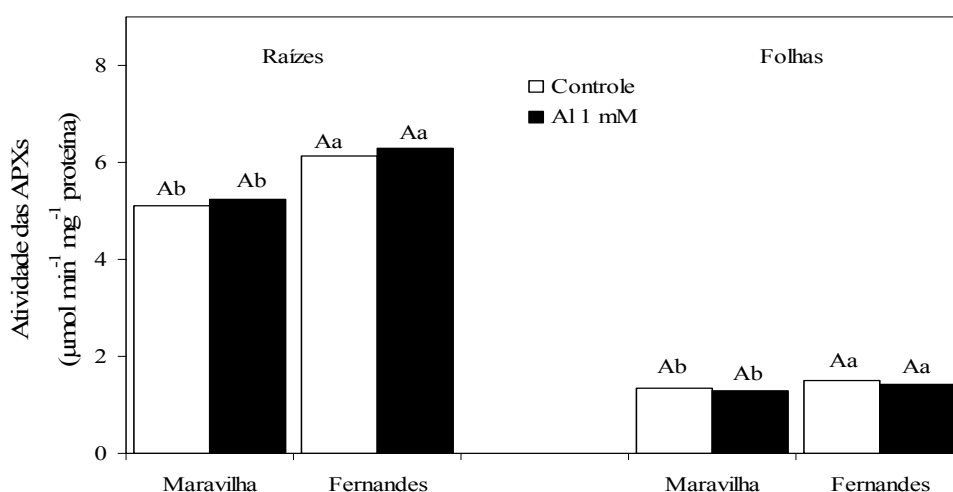


Figura 6: Atividade das peroxidases do ascorbato (APXs) nas raízes e nas folhas de dois cultivares de arroz, tratados com Al 0 e 1 mM durante dez dias.

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 significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Apesar do conteúdo de H_2O_2 não ter sido avaliado no presente trabalho, a maior atividade apresentada pelas APXs no cultivar Fernandes pode indicar que este cultivar possui maior potencial para a remoção do H_2O_2 do interior das células do que o cultivar Maravilha. O maior consumo do H_2O_2 nos tecidos do cultivar Fernandes pelas APXs, deve estar contribuindo para menor formação do radical hidroxila e, assim, reduzir os danos causados ao metabolismo deste cultivar. WANG et al. (1999) sugeriram que a maior expressão dos genes responsáveis pela ativação das APXs, pode aumentar a proteção das plantas contra o estresse oxidativo.

Segundo MIZUNO et al. (1998), o acúmulo de níveis tóxicos de H_2O_2 em tecidos vegetais, causados por diferentes tipos de estresses pode resultar em ação combinada das CATs e das APXs, no sentido de proteger as células das plantas da ação dos peróxidos. No entanto, estas duas enzimas apresentam diferentes afinidades por H_2O_2 . As APXs apresentam alta afinidade por este radical (faixa de μM), sendo, provavelmente, responsáveis pela modulação fina nos níveis dos ROIs (MITTLER, 2002). Embora a atividade das APXs não tenha sido alterada significativamente em resposta ao tratamento das plantas com Al, essas enzimas podem ter contribuído com a eliminação do H_2O_2 do interior das células, principalmente nas raízes, nas quais maiores atividades destas enzimas foram encontradas.

Nas raízes, a atividade das GRs foi estatisticamente similar nas plantas controles dos dois cultivares de arroz (Figura 7). Na presença de Al, a atividade destas enzimas aumentou na mesma intensidade nos dois cultivares. Nas folhas, a atividade das GRs não apresentou alterações significativas entre os tratamentos e os cultivares não diferiram entre si.

Em folhas de arroz estressadas por ferro, FANG et al. (2001) observaram aumento na atividade das GRs. Em raízes de arroz, contudo, DEMÍRAL et al. (2005) encontraram redução na atividade destas enzimas durante o estresse salino. Portanto, a atividade das GRs depende não apenas do tipo de estresse mas, também, do órgão analisado, do tempo de exposição ao estresse e do estágio de desenvolvimento das plantas, conforme sugere CARDOSO et al. (2002).

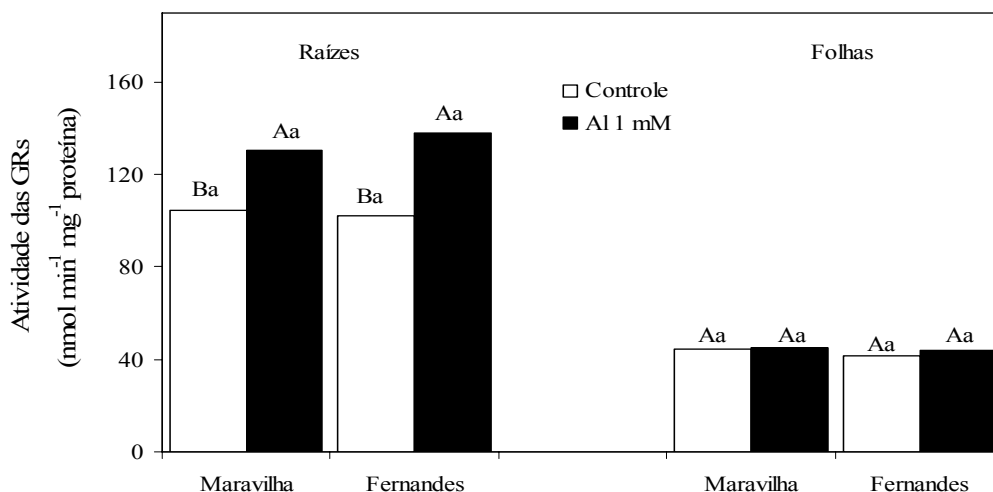


Figura 7: Atividade das redutases da glutationa (GRs) nas raízes e nas folhas de dois cultivares de arroz, tratados com Al 0 e 1 mM durante dez dias.

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 significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Aumentos na atividade das GRs também foram encontrados durante os estresses com cobre (CUYPERS et al., 2000), hídrico (SRIVALLI et al., 2003) e salino (HUANG et al., 2005). Segundo estes autores, os aumentos na atividade das GRs resultam em incrementos no teor de GSH e em decréscimos no teor de GSSG no interior das células. Estes autores ainda evidenciaram que a GSH, produzida na reação catalisada pelas GRs, pode ser utilizada na regeneração do ascorbato. DIPIERRO et al. (2005), trabalhando com Al, verificaram aumentos na atividade das GRs, seguido por aumentos no teor de ascorbato, o que estes autores sugeriram ter ocorrido pela ação das enzimas participantes do ciclo ascorbato-glutationa. Portanto, as GRs apresentam importante função no metabolismo antioxidativo das plantas, pois além de auxiliarem na manutenção de níveis constantes de GSH no interior das células, as GRs também podem participar da regeneração do ascorbato pela ação das enzimas presentes no ciclo ascorbato-glutationa.

Apesar dos níveis de GSH e GSSG não terem sido avaliados isoladamente no presente trabalho, alguns autores sugerem que as GRs são responsáveis pelo aumento na razão GSH/GSSG durante os estresses (FOYER & NOCTOR, 2005). Aumentos nessa razão foram evidenciados em plantas sob estresse em baixa temperatura (ANDERSON et al., 1992) e por metal pesado (CUYPERS et al., 2000).

Nas raízes, a atividade das GPXs, que era muito próxima nas plantas controle dos dois cultivares, aumentou 12% no cultivar Maravilha e 28% no cultivar Fernandes. Na presença de Al, portanto, a atividade das GPXs no cultivar Fernandes ficou cerca de 24% maior do que no cultivar Maravilha, discriminando os cultivares quanto à resposta ao Al. Nas folhas, as plantas do controle exibiram atividade das GPXs similares, mas após tratamento com Al observou-se redução de 10% na atividade enzimática, apenas para o cultivar Maravilha. Apesar disso, os cultivares não diferiram entre si na presença ou na ausência de Al (Figura 8).

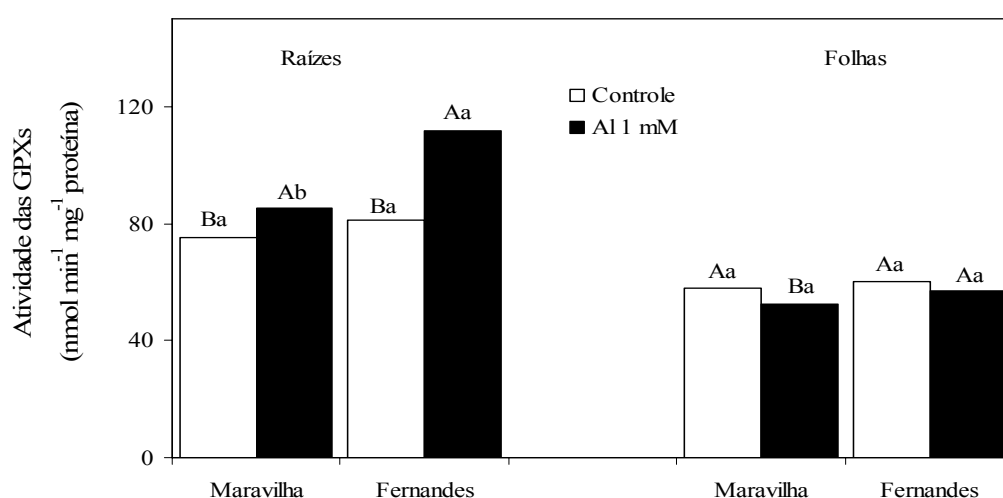


Figura 8: Atividade das peroxidases da glutathiona (GPXs) nas raízes e nas folhas de dois cultivares de arroz, tratados com Al 0 e 1 mM durante dez dias.

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 significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A atividade das GPXs também aumentou na raiz de *Scenedesmus bijugatus* durante a indução de estresse com cobre (NAGALAKSHMI & PRASAD, 2001). Segundo estes autores, as GPXs fazem parte do grupo de enzimas que combatem o H₂O₂ formado durante o estresse oxidativo. No entanto, assim como foi verificado no presente trabalho, em função de sua baixa atividade enzimática (nmol) em comparação as atividades das CATs e POXs (μmol), as GPXs provavelmente contribuíram apenas para a eliminação de pequena fração do H₂O₂ do interior das células. Portanto, as GPXs parecem não ser as principais enzimas responsáveis pela eliminação do H₂O₂ do metabolismo das plantas, sendo, neste caso, as CATs e

POXs as enzimas mais eficientes nesse processo, conforme sugerido por FOYER & NOCTOR (2005).

Todavia, as GPXs podem participar do ciclo glutationa-peroxidase, no qual elas são capazes de eliminar o H_2O_2 utilizando GSH como substrato da reação. A reação catalisada pelas GRs pode regenerar a GSH que será novamente utilizada pelas GPXs (APEL & HIRT, 2004). No presente trabalho foi verificado que, na presença de Al, as raízes dos dois cultivares apresentaram aumentos na atividade das GPXs e das GRs, portanto, esse ciclo pode ser importante no combate aos ROIs produzidos em plantas de arroz.

3.2.2. Efeito do alumínio sobre o sistema de defesa não enzimático

As folhas apresentaram uma concentração de ascorbato total cerca de 11 vezes mais elevada do que nas raízes (Figura 9). Nesta parte da planta, a forma reduzida do ascorbato (AA) correspondeu, em média, a 96% do ascorbato total. Já nas raízes, esta forma do ascorbato contribuiu com cerca de 40%, enquanto a forma oxidada (DHA) correspondeu a 60% do ascorbato total.

Nas raízes, o tratamento com Al não modificou a concentração de AA, mas reduziu a concentração de DHA, provocando, por consequência, redução na concentração de ascorbato total e aumento na relação AA/DHA nos dois cultivares (Figura 9). Nas folhas, diferentemente das raízes, o tratamento com Al não modificou a concentração de DHA, mas aumentou a concentração de AA, provocando, por consequência, aumento na concentração de ascorbato total e também aumento na relação AA/DHA nos dois cultivares.

A concentração de AA nos tecidos vegetais depende de enzimas do ciclo ascorbato-glutationa (NOCTOR & FOYER, 1998). No presente trabalho, a concentração de AA mostrou, como esperado, relação inversa com a atividade das enzimas APXs (Figura 6). Assim, na raiz do cultivar Fernandes, a atividade das APXs foi cerca de 18% maior, enquanto a concentração de AA foi em média 50% menor em comparação ao cultivar Maravilha. Nas folhas, em que a concentração de AA foi 27 vezes maior que nas raízes, a atividade das APXs foi relativamente baixa e apesar do tratamento com Al ter aumentado a concentração de AA, ela não foi estatisticamente diferente entre os cultivares (Figura 9).

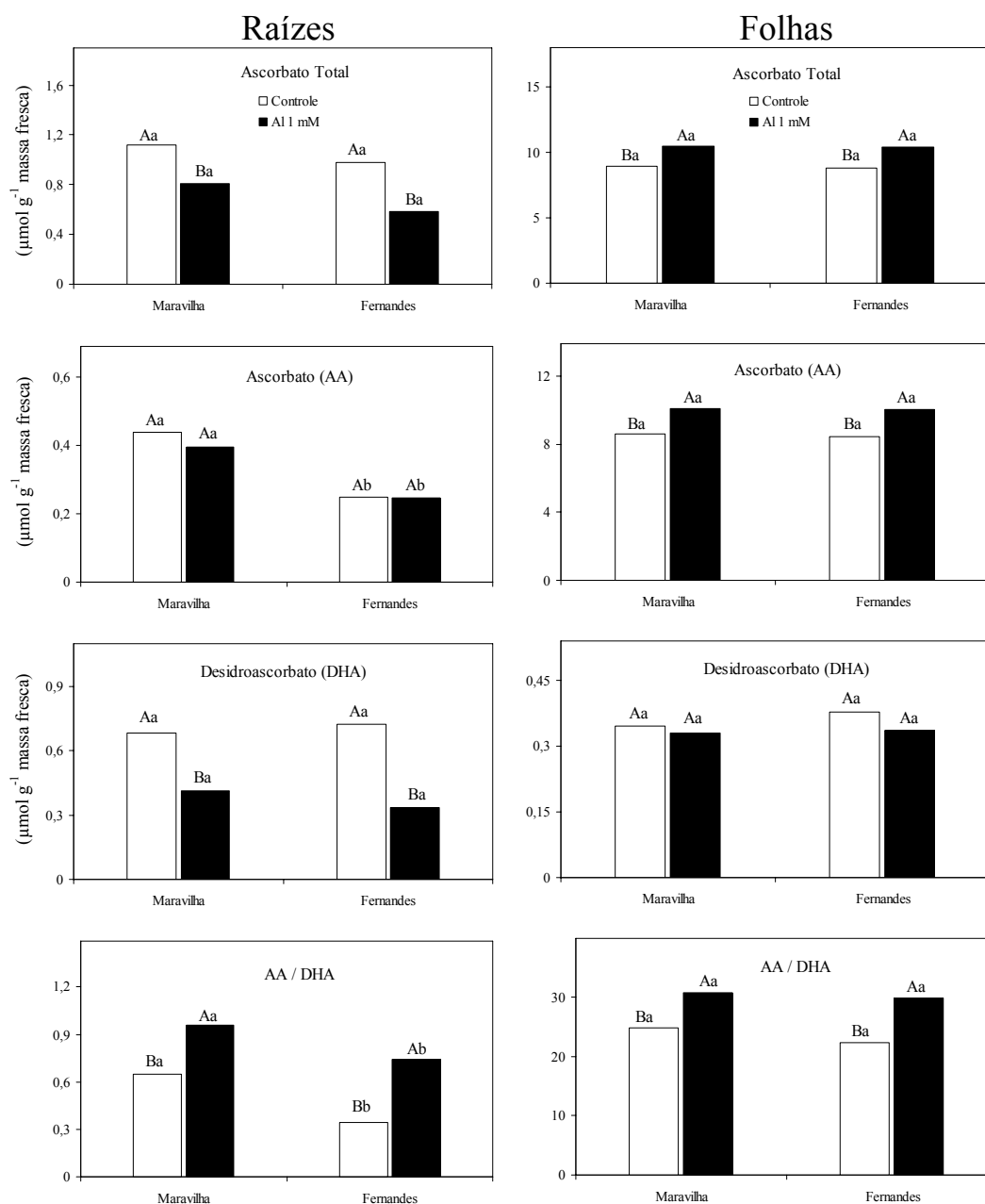


Figura 9: Concentração de ascorbato total, ascorbato reduzido, desidroascorbato e razão ascorbato reduzido/desidroascorbato nas raízes e nas folhas de dois cultivares de arroz, tratados com Al 0 e 1 mM durante dez dias.

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 significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A reação catalisada pelas APXs tem como produto o radical monodesidroascorbato (MDHA), o qual pode sofrer dismutação espontânea originando o radical desidroascorbato (DHA) (NOCTOR & FOYER, 1998). O fato

de o nível de DHA no sistema radicular de ambos cultivares submetidos ao estresse com Al ter diminuído significativamente em relação ao controle indica que a redutase do desidroascorbato (DHAR) está ativa, recuperando o AA e transformando a glutathiona reduzida (GSH) em glutathiona oxidada (GSSG). Outro indicativo de que isto pode estar acontecendo foi o aumento na atividade das GRs observado no sistema radicular do dois cultivares submetidos ao estresse com Al (Figura 7). Este aumento na atividade das GRs indica que o sistema opera no sentido de recuperar um dos substratos da DHAR, que é o GSH. Outra explicação plausível para a redução nos níveis de DHA seria pela reação catalisada pela enzima redutase do monodesidroascorbato (MDHAR) dependente de NAD(P)H, que utiliza diretamente o MDHA como substrato da reação (NOCTOR & FOYER, 1998). A confirmação destas hipóteses teria sido possível pela determinação das atividades das enzimas DHAR e MDHAR o que, todavia, não foi feito neste experimento. MITTOVA et al. (2004) trabalhando com raízes de tomate submetidos ao estresse salino, encontraram aumentos na atividade da enzima MDHAR e decréscimos na concentração de DHA. Segundo estes autores, reduções na atividade da MDHAR podem ser responsáveis por baixa capacidade na regeneração dos níveis de ascorbato. Trabalhando com cobre, CUYBERS et al. (2000) observaram aumento na regeneração de ascorbato e no consumo de DHA. Segundo estes autores, o estresse causado pelo cobre induziu aumento na atividade das enzimas MDHAR e DHAR seguido por aumento na atividade das GRs. Para FOYER et al. (1994), a redução do MDHA pela enzima MDHAR representa o principal mecanismo de regeneração do ascorbato em células vegetais. Com relação às folhas, a concentração de DHA, nos dois cultivares, não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 9).

A razão entre a forma reduzida (AA) e a forma oxidada (DHA) do ascorbato fornece excelente relação para o entendimento dos processos de eliminação dos ROIs (MITTLER, 2002). O aumento nesta razão foi evidenciado na raiz e nas folhas dos dois cultivares submetidos ao estresse com Al (Figura 9). NGUYEN et al. (2005) trabalhando com eucalipto submetido ao estresse com Al observaram decréscimo nessa razão, que segundo os autores, foi ocasionado pelo aumento na concentração de DHA. No entanto, no presente trabalho, os aumentos na relação AA/DHA resultaram da redução na concentração de DHA nas raízes e do aumento na concentração de AA nas folhas.

Com base nos resultados, verificou-se que o cultivar Fernandes apresentou maior eficiência na utilização do ascorbato do que o cultivar Maravilha. Os resultados evidenciaram que nas raízes do cultivar Fernandes ocorreu forte integração entre a enzima APXs e a concentração de AA. Portanto, esse cultivar apresenta um eficiente mecanismo de defesa contra os ROIs, o que pode conferir maior tolerância ao Al.

Na ausência de Al, a concentração de glutathiona total foi 30% maior nas raízes do cultivar Fernandes (Figura 10). Na presença deste íon, o cultivar Maravilha apresentou aumento de 50% na concentração deste metabólito, enquanto no cultivar Fernandes não se observou efeito significativo. Nas folhas, não houve diferença significativa entre os tratamentos e entre os cultivares (Figura 10).

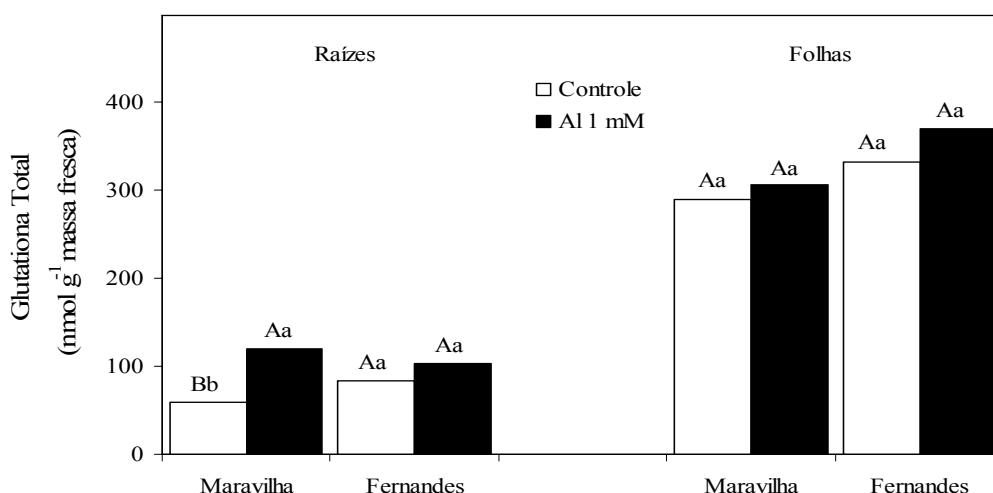


Figura 10: Concentração de glutathiona total (GSH+GSSG) nas raízes e nas folhas de dois cultivares de arroz, tratados com Al 0 e 1 mM durante dez dias.

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 significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A síntese e o acúmulo de glutathiona nos tecidos vegetais pode aumentar em resposta a vários tipos de estresses (FOYER et al., 2001). O aumento observado na raiz do cultivar Maravilha, aparentemente está relacionado à importante função da glutathiona no combate aos ROIs. A síntese deste composto envolve duas enzimas: a sintetase da γ -glutamilcisteína (γ -GCS) e a sintetase da glutathiona (GSH-S) (NOCTOR et al., 2002). Apesar destas enzimas não terem sido avaliadas neste

experimento, outros autores, trabalhando com estresse oxidativo, encontraram aumentos na atividade da γ -GCS seguidos de aumentos na concentração de glutathiona total (CREISSEN et al., 1999; NAGALAKSHMI & PRASAD, 2001). Portanto, no presente trabalho, o estresse causado pelo Al nas raízes do cultivar Maravilha, pode ter ativado as enzimas relacionadas com a síntese de glutathiona.

Segundo ANDERSON (1985), a forma reduzida da glutathiona (GSH) é responsável por mais de 99% da glutathiona total presente no interior das células. Portanto, aumentos na concentração de glutathiona total sugerem acréscimos na concentração da forma reduzida de glutathiona. As enzimas GRs e GPXs estão diretamente envolvidas com a concentração de GSH no interior das células (APEL & HIRT, 2004). No presente trabalho, a atividade das GRs e das GPXs, aumentou nas raízes dos dois cultivares na presença de Al (Figura 7 e 8). A primeira enzima pode ter contribuído para o aumento na concentração da GSH, que conseqüentemente levaria ao aumento na atividade da segunda enzima, visto que a GSH é substrato imediato da reação catalisada pelas GPXs. Portanto, um controle fino entre a biossíntese de glutathiona e a atividade das enzimas GRs e GPXs pode contribuir para a manutenção do metabolismo das plantas, a fim de remover os ROIs do interior das células.

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram avaliados os efeitos do Al sobre o crescimento e sobre os sistemas de defesa antioxidativos, enzimáticos e não-enzimáticos, em plantas de dois cultivares de arroz com tolerância diferencial ao Al, sendo um tolerante (Fernandes: CNA-1158) e outro sensível (Maravilha: CNA-6843-1) a esse metal.

A tolerância diferencial dos dois cultivares de arroz ao Al foi confirmada com base nos parâmetros de crescimento em comprimento e na produção de massa seca, tanto das raízes como das folhas. A exposição ao Al não acarretou nenhum efeito nas variáveis de crescimento do cultivar Fernandes, enquanto, no cultivar Maravilha, reduções significativas foram observadas nas duas variáveis analisadas.

Nas raízes dos dois cultivares, a presença do Al aumentou a atividade das enzimas CATs, POXs, GRs e GPXs. Já a atividade das SODs aumentou apenas nas raízes do cultivar Fernandes, não sendo modificada no cultivar Maravilha. Nas folhas, o Al não alterou a atividade de nenhuma das enzimas no cultivar Fernandes, exceto a das POXs que sofreu redução. No cultivar Maravilha, por outro lado, as atividades das enzimas SODs, POXs e GPXs sofreram redução na presença de Al. Independente do tratamento aplicado e da parte da planta analisada, a atividade das peroxidases do ascorbato (APXs) foi sempre maior no cultivar Fernandes.

Dentre as enzimas estudadas, as SODs, APXs e GPXs nas raízes e as CATs, POXs, APXs nas folhas, exibiram resposta consistente com a tolerância diferencial ao Al apresentada pelos dois cultivares de arroz estudados. De modo geral, as diferentes atividades das enzimas do sistema antioxidativo, tanto nas raízes como nas folhas dos dois cultivares, suportam a idéia de ter o cultivar Fernandes melhor mecanismo de defesa enzimático sobre os ROIs produzidos durante o tratamento com Al.

A concentração de glutatona total e, principalmente, de ascorbato, demonstrou interação entre os sistemas de defesa enzimático e não-enzimático para o cultivar Fernandes, reforçando a idéia de ter este cultivar melhor mecanismo de defesa no combate aos ROIs produzidos durante o estresse com Al. Portanto, a maior eficiência dos mecanismos indutivos de combate ao estresse oxidativo apresentada pelo cultivar Fernandes confirma que este cultivar apresenta maior tolerância ao Al que o cultivar Maravilha.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, R.M.M. **Produção, acúmulo e exsudação de ácidos orgânicos em dois cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.), submetidos a níveis tóxicos de alumínio.** Viçosa, MG: UFV. 2005. 77p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, 2005.
- ALSCHER, R.G., ERTURK, N., HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, 53:1331-1341, 2002.
- ANDERSON, M.E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Methods in Enzymology**, 113:548-555, 1985.
- ANDERSON, J.V., CHEVONE, B.I., HESS, J.L. Seasonal variation in the antioxidant system of eastern white pine needles. **Plant Physiology**, 98:501-508, 1992.
- ANDERSON, J.V., DAVIS, D.G. Abiotic stress alters transcript profiles and activity of glutathione S-transferase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in *Euphorbia esula*. **Physiologia Plantarum**, 120:421-433, 2004.
- ANDERSON, M.D.; PRASAD, T.K., STEWART, C.R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. **Plant Physiology**, 109:1247-1257, 1995.
- APEL, K., HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, 55:373-399, 2004.
- ARORA, A., SAIRAM, R.K., SRIVASTAVA, G.C. Oxidative stress and antioxidative system in plants. **Current Science**, 82:1227-1238, 2002.
- ASADA, K. Ascorbate peroxidase: a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, 85:235-241, 1992.
- ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 50:601-639, 1999.

- ASADA, K., TAKAHASHI, M-A., NAGATE, M. Assay and inhibitors of spinach superoxide dismutase. **Agriculture Biology Chemistry**, 38:471-473, 1974.
- BARCELÓ, J., POSCHENRIEDER, C. Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. **Environmental and Experimental Botany**, 48:75-92, 2002.
- BEAUCHAMP, C., FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, 44:276-287, 1971.
- BOSCOLO, P.R.S., MENOSSI, M., JORGE, R.A. Aluminum-induced oxidative stress in maize. **Phytochemistry**, 62:181-189, 2003.
- BREUSEGEM, F.V., VRANOVÁ, E., DAT, J.F., INZÉ, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, 161:405-414, 2001.
- CAKMAK, I. Activity of ascorbate-dependent H₂O₂-scavenging enzymes and leaf chlorosis are enhanced in magnesium- and potassium-deficient leaves, but not in phosphorus-deficient leaves. **Journal of Experimental Botany**, 45:1259-1266, 1994.
- CAKMAK, I., HORST, W.J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, 83:463-468, 1991.
- CARDOSO, P.F., MOLINA, S.M.G., PERIRA, G.J.G., VITÓRIA, A.P., AZEVEDO, R.A. Response of rice inbred lines to cadmium exposure **Journal of Plant Nutrition**, 25:927-944, 2002.
- CARLBERG, I., MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods in Enzymology**, 113: 484-495, 1985.
- CLARK, R.B. Characterization of phosphatase of intact maize roots. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, 23:458-460, 1975.
- CHANCE, B., MAEHLEY, A.C. Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, 2:764-775, 1955.

- CHANG, Y.C., MA, J.F., MATSUMOTO, H. Mechanisms of Al-induced iron chlorosis in wheat (*Triticum aestivum*) Al-inhibited biosynthesis and secretion of phytosiderophore. **Physiologia Plantarum**, 102:9-15, 1998.
- CALBO, A.G., CAMBRAIA, J. Efeito do alumínio sobre a composição mineral de dois cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench). **Revista Ceres**, 27:369-378, 1980.
- CREISSEN, G., FIRMIN, J., FRYER, M., KULAR, B., LEYLAND, N., REYNOLDS, H., PASTORI, G., WELLBURN, F., BAKER, N., WELBURN, A., MULLINEAUX, P. Elevated glutathione biosynthetic capacity in the chloroplasts of transgenic tobacco plants paradoxically causes increased oxidative stress. **The Plant Cell**, 11:1277-1291, 1999.
- CUYPERS, A., VANGRONNSVELD, J., CLIJSTERS, H. Biphasic effect of copper on the ascorbate-glutathione pathway in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* seedling during the early stages of metal assimilation. **Physiologia Plantarum**, 110:512-517, 2000.
- DELHAIZE, E., RYAN, P.R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiology**, 107:315-321, 1995.
- 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 Physiology**. 34:1023-1028, 1993.
- DEL RIO, L.A., CORPAS, F.J., SANDALIO, L.M., PALMA, J.M., GOMES, M., BARROSO, J.B. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. **Journal of Experimental Botany**, 53:1255-1272, 2002.
- DEMIRAL, T., TÜRKAN, Í. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. **Environmental and Experimental Botany**. 53:247-257, 2005.
- DIONISIO-SESE, M.L., TOBITA, S. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. **Plant Science**, 135:1-9, 1998.

- 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. **Journal of Plant Physiology**, 162:529-536, 2005.
- ECHART, C.L., CAVALLI-MOLINA, S. Fitotoxicidade do alumínio: efeitos, mecanismos de tolerância e seu controle genético. **Ciência Rural**, 31:531-541, 2001.
- EMMANUEL, D., PETER, R.R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiology**, 107:315-321, 1995.
- ESHDAT, Y., HOLLAND, D., FALTIN, Z., BEM-HAYYIM, G. Plant glutathione peroxidases. **Physiologia Plantarum**, 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 Physiology**, 122:657-665, 2000.
- FAGERIA, N. K., CARVALHO, J. R. P. Influence of aluminum in nutrient solutions on chemical composition in upland rice cultivars. **Plant and Soil**, 69:31-44, 1982.
- FAGERIA, N.K., WRIGHT, R.J., BALIGAR, V.C. Rice cultivars response to aluminum in nutrient solution. **Communication Soil Science Plant Analytical**, 19:1133-1142, 1988.
- FANG, W.C., KAO, C.H. Enhanced peroxidase activity in rice leaves in response to excess iron, copper and zinc. **Plant Science**, 158:71-76, 2000.
- FANG, W.C., WANG, J., LIN, C.C., KAO, C.H. Iron induction of lipid peroxidation and effects on antioxidative enzyme activities in rice leaves. **Plant Growth Regulation**, 35:75-80, 2001.
- FERREIRA, R.P., CRUZ, C.D., SEDIYAMA, C.S., PINHEIRO, B.S. Herança da tolerância à toxidez de alumínio em arroz com base em análise dialélica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 34:615-621, 1999.
- FERREIRA, R.P., CRUZ, C.D., SEDIYAMA, C.S., FAGERIA, N.K. Identificação de cultivares de arroz tolerantes à toxidez de alumínio pela técnica multivariada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 30:49-54, 1995.

- FOYER, C.H., HALLIWELL, B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. **Planta**, 133:21-25, 1976.
- FOYER, C.H., LELANDAIS, M., KUNERT, K.J. Photooxidative stress in plants. **Physiologia Plantarum**, 92:696-717, 1994.
- FOYER, C.H., NOCTOR, G. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. **New Phytologists**, 146:359-388, 2000.
- FOYER, C.H., NOCTOR, G. Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant, Cell and Environment**, 28:1056-1071, 2005.
- FREITAS, F.A., KOPP, M.M., SOUSA, R.O., ZIMMER, P.D., CARVALHO, F.I.F., OLIVEIRA, A.C. Absorção de P, Mg, Ca, e K e tolerância de genótipos de arroz submetidos a estresse por alumínio em sistemas hidropônicos. **Ciência Rural**, 36:72-79, 2006.
- GHANATI, F., MORITA, A., YOKOTA, H. Effects of aluminum on the growth of tea plant and activation of antioxidant system. **Plant and Soil**, 276:133-141, 2005.
- GIANNOPOLITIS, C.N., RIES, S.K. Superoxide dismutases: Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, 59:309-314, 1977.
- GONÇALVES, J.F.C., PEIXOTO, P.H.P., CAMBRAIA, J. Toxicidade do alumínio em plantas. **Revista Universa**, 8:243-258, 2000.
- HAVIR, E.A., McHALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, 84:450-455, 1987.
- HEGEDÜS, A., ERDEI, S., HORVÁTH, G. Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. **Plant Science**, 160:1085-1093, 2001.
- HORVÁTH, E., SZALAI, G., PÁL, M., PÁLDI, E., JANDA, T. Differences between the catalase isozymes of maize (*Zea mays* L.) in respect of inhibition of various phenolic compounds. **Acta Biologica Szegediensis**, 46:33-34, 2002.

- HUANG, C., HE, W., GUO, J., CHANG, X., SU, P., ZHANG, L. Increased sensitivity to salt stress in an ascorbate-deficient Arabidopsis mutant. **Journal of Experimental Botany**, 56:3041-3049, 2005b.
- HUANG, M., GUO, Z. Responses of antioxidative system to chilling stress in two rice cultivars differing in sensitivity. **Biologia Plantarum**, 49:81-84, 2005a.
- JIMENEZ, A., HERNÁNDEZ, J.A., DEL RIO, L.A., SEVILLA, F. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. **Plant Physiology**, 114:275-284, 1997.
- 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. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 41:1285-1290, 2006.
- KAMPFENKEL, K., MONTAGU, M.V., INZÉ, D. Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. **Analytical Biochemistry**, 225:165-167, 1995.
- KAR, M., MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, 57:315-319, 1976.
- KASAI, M., SASAKI, M., YAMAMOTO, Y., MATSUMOTO, H. Al increases K⁺ efflux and activities of ATP-dependent and PPi-dependent H⁺ pumps of tonoplast-enriched vesicles from barley roots. **Plant Cell Physiology**, 33:1035-1039, 1992.
- KOCHIAN, L.V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 46: 237-260, 1995.
- KOCHIAN, L.V., HOEKENGA, O.A., PIÑEROS, M.A. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, 55:459-493, 2004.
- KOSHIBA, T. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedling and leaves of maize (*Zea mays*), **Plant Cell Physiology**, 34:713-721, 1993.
- KUO, M.C., KAO, C.H. Aluminum effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. **Biologia Plantarum**, 46:149-152, 2003.

- 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.). **Journal of Plant Physiology**, 158:737-745, 2001.
- LIN, J-N., KAO, C.H. Involvement of lipid peroxidation in water stress-promoted senescence of detached rice leaves. **Biologia Plantarum**, 43:141-145, 2000.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.L. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal Biology Chemistry**, 193:265-275, 1951.
- MA, J.F., RYAN, P.R., DELHAIZE, E. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. **Trends in Plant Science**, 6:273-278, 2001.
- MATSUMOTO, H., HIRASAWA, F., TORIKAI, H. Localization of absorbed aluminium in pea root and its binding to nuclei acid. **Plant Cell Physiology**, 17:627-631, 1976.
- 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. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 40:447-452, 2005.
- MENDONÇA, R.J., CAMBRAIA, J., OLIVEIRA, J.A., OLIVA, M.A. Efeito do alumínio na absorção e na utilização de macronutrientes em duas cultivares de arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 38:843-848, 2003.
- MERIGA, B., REDDY, B.K., RAO, R., REDDY, L.A., KISHOR, P.B.K. Aluminium-induced production of oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA damage in seedlings of rice (*Oryza sativa*). **Journal of Plant Physiology**, 161:63-68, 2004.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, 7:405-409, 2002.
- MITTLER, R., VANDERAUWERA, S., GOLLERY, M., BREUSEGEM, F.V. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science**, 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*. **Journal of Experimental Botany**, 55:1105-1113, 2004.
- MIZUNO, M., KAMEI, M., TSUCHIDA, H. Ascorbate peroxidase and catalase cooperate for protection against hydrogen peroxide generated in potato tubers during low-temperature storage. **Biochemistry Molecular Biology International**, 44:717-725, 1998.
- MØLLER, I. M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 52:561-591, 2001.
- NAGALAKSHMI, N., PRASAD, M.N.V. Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. **Plant Science**, 160:291-299, 2001.
- NAKANO, Y., ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidases in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, 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 and Soil**, 277:139-152, 2005.
- NGUYEN, N.T., MOHAPATRA, P.K., FUJITA, K. Leaf necrosis is a visual symptom of the shift from growth stimulation to inhibition effect of Al in *Eucalyptus camaldulensis*. **Plant Science**, 165:147-157, 2003.
- NGUYEN, V.T., BUROW, M.D., NGUYEN, H.T., LE, B.T., LE, T.D., PATERSON, A.H. Molecular mapping of genes conferring aluminum tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, 102:1002-1010, 2001.
- NOCTOR, G., GOMEZ, L., VANACKER, H., FOYER, C.H. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling. **Journal of Experimental Botany**, 53:1283-1304, 2002.

- NOCTOR, G., FOYER, C.H. Ascorbate and Glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 49:249-279, 1998.
- OHKI, K. Aluminium stress on sorghum growth and nutrient relationship. **Plant Soil** 98:195-202, 1987.
- PEIXOTO, P.H.P., CAMBRAIA, J., SANTANNA, R., MOSQUIM, P.R., MOREIRA, M.A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 11:137-143, 1999.
- RESENDE, M.L.V., SALGADO, S.M.L., CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, 28:123-130, 2003.
- RICHARDS, K.D., SCHOTT, E.J., SHARMA, Y.K., DAVIS, K.R., GARDNER, R.C. Aluminum induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, 116:409-418, 1998.
- ROUT, G.R., SAMANTARAY, S., DAS, P. Aluminium toxicity in plants: a review. **Agronomie**, 21:3-21, 2001.
- RYAN, P.R., DITONASO, J.M., KOCHIAN, L.V. Aluminum toxicity in roots: an investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. **Journal 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 Physiology**, 99:1193-1200, 1992.
- SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, 103:7-12, 1993.
- SCHAEDLE, M., BASSHAM, J.A., Chloroplast glutathione reductase. **Plant Physiology**, 59:1011-1012, 1977.
- SIEGEL, B.Z. Plant peroxidases – an organismic perspective. **Plant Growth Regulation**, 12:303-312, 1993.

- SIMONOVICOVÁ, M., TAMÁS, L., HUTTOVÁ, J., MISTRÍK, I. Effect of aluminium on oxidative stress related enzymes activities in barley roots. **Biologia Plantarum**, 48:261-266, 2004.
- SIVAGURU, M., JAMES, M.R., ANBUDURAI, P.R., BALAKUMAR, T. Characterization of differential aluminum tolerance among rice genotypes cultivated in south India. **Journal of Plant Nutrition**, 15:236-246, 1992.
- SIVAGURU, M., PALIWAL, K. Differential aluminum tolerance in some tropical rice cultivars. II. Mechanism of aluminum tolerance. **Journal of Plant Nutrition**, 16:1717-1732, 1993.
- SMIRNOFF, N., CONKLIN, P.L., LOEWUS, F.A. Biosynthesis of ascorbic acid in plants: a renaissance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 52:437-467, 2001.
- SRIVALLI, B., SHARMA, G., KHANMA-CHOPRA, R. Antioxidative defense system in an upland rice cultivar subjected to increasing intensity of water stress followed by recovery. **Physiologia Plantarum**, 119:503-512, 2003.
- TAMÁS, L., HUTTOVÁ, J., MISTRÍK, I., SIMONOVICOVÁ, M. Aluminium-induced drought and oxidative stress in barley roots. **Journal of Plant Physiology**, 162:781-784, 2006.
- TAYOR, G.J., BASU, A., BASU, U., SLASKI, J.J., ZHANG, G., GOOD, A. Al-induced 51-kilodalton membrane-bound proteins are associated with resistance to Al in a segregating population of wheat. **Plant Physiology**, 114:363-372, 1997.
- VESTENA, S. **Efeito do cádmio sobre o metabolismo de glutatona e fitoquelatinas em aguapé (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) e salvinia (*Salvinia auriculata* Aubl.)**. Viçosa, MG: UFV. 2004. 103p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, 2004
- VITORELLO, V.A., CAPALDI, F.R., STEFANUTO, V.A. Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. **Brazilian Journal Plant Physiology**, 17:129-143, 2005.

- WAGATSUMA, T., ISHIKAWA, S., OBATA, H., TAWARAYA, K., KATOHDA, S. Plasma membrane of younger and outer cells in the primary specific site for aluminum toxicity in roots. **Plant Soil**, 171:105-112, 1995.
- WANG, J., ZHANG, H., ALLEN, R.D. Overexpression of an Arabidopsis peroxisomal ascorbate peroxidase gene in tobacco increases protection against oxidative stress. **Plant Cell Physiology**, 40:725-732, 1999.
- WISSEMEIER, A.H., DIENING, A., HERGENRÖDER, A. Callose formation as parameter for assessing genotypical plant tolerance of aluminum and manganese. **Plant and Soil**, 146:67-75, 1992.
- YAMAMOTO, Y., KOBAYASHI, Y., DEVI, S.R., RIKIISHI, S., MATSUMOTO, H. Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells. **Plant Physiology**, 128:63-72, 2002.
- YAMAMOTO, Y., KOBAYASHI, Y., MATSUMOTO, H. Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. **Plant Physiology**, 125:199-208, 2001.
- ZHAO, X-J., SUCOFF, E., STADELMANN, E.J. Al^{3+} and Ca^{2+} alteration of membrane permeability of *Quercus rubra* root cortex cells. **Plant Physiology**, 83:159-162, 1987.

6. APÊNDICE

Quadro 1 – Análise de variância sumarizada do efeito do alumínio sobre o crescimento da raiz seminal e das folhas de dois cultivares de arroz, tratados com Al 0 e 1 mM durante dez dias.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		F	
		Raiz seminal	Folhas	Raiz seminal	Folhas
Níveis de Al	1	87,42601	3,542533	24,20**	7,79*
Cultivares	1	157,3252	226,0272	43,55**	496,67**
Al*Cultivar	1	10,10167	3,499200	2,8 ^{NS}	7,69*
Resíduo	6	3,612722	0,4548111		
CV (%)		7,2076	2,3561		

* Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade

** Significativo pelo teste F a 1% de probabilidade

^{NS} Não-Significativo

Quadro 2 – Análise de variância sumarizada do efeito do alumínio sobre a produção de massa seca nas raízes e nas folhas de dois cultivares de arroz, tratados com Al 0 e 1 mM durante dez dias

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		F	
		Raízes	Folhas	Raízes	Folhas
Níveis de Al	1	0,0014966333	0,01147008	60,94**	11,82*
Cultivares	1	0,02803333	0,1999501	1141,63**	206,13**
Al*Cultivar	1	0,000768	0,002214083	31,28**	2,28 ^{NS}
Resíduo	6	0,00002455556	0,00097		
CV (%)		5,4958	11,801		

* Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade

** Significativo pelo teste F a 1% de probabilidade

^{NS} Não-Significativo

Quadro 3 – Análise de variância sumarizada da atividade das superóxido dismutases (SODs) nas raízes e nas folhas de dois cultivares de arroz, tratados com Al 0 e 1 mM durante dez dias

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		F	
		Raízes	Folhas	Raízes	Folhas
Níveis de Al	1	1,400833	0,0432	14,02**	14,31**
Cultivares	1	0,09720000	0,0003	0,97 ^{NS}	0,1 ^{NS}
Al*Cultivar	1	0,3468000	0,001633333	3,47 ^{NS}	0,54 ^{NS}
Resíduo	6	0,09993611	0,003019444		
CV (%)		4,9356	4,2929		

** Significativo pelo teste F a 1% de probabilidade

^{NS} Não-Significativo

Quadro 4 – Análise de variância sumarizada da atividade das catalases (CATs) nas raízes e nas folhas de dois cultivares de arroz, tratados com Al 0 e 1 mM durante dez dias

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		F	
		Raízes	Folhas	Raízes	Folhas
Níveis de Al	1	1670,172	47,92003	44,08**	0,83 ^{NS}
Cultivares	1	78,89941	3360,723	2,08 ^{NS}	58,43**
Al*Cultivar	1	88,94408	101,2683	2,35 ^{NS}	1,76 ^{NS}
Resíduo	6	37,89264	57,51559		
CV (%)		7,3116	7,6147		

** Significativo pelo teste F a 1% de probabilidade

^{NS} Não-Significativo

Quadro 5 – Análise de variância sumarizada da atividade das peroxidases (POXs) nas raízes e nas folhas de dois cultivares de arroz, tratados com Al 0 e 1 mM durante dez dias.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		F	
		Raízes	Folhas	Raízes	Folhas
Níveis de Al	1	2255,295	14,71867	208,99**	32,80**
Cultivares	1	204,6002	18,37687	18,96**	40,95**
Al*Cultivar	1	77,57168	0,4680750	7,19*	1,04 ^{NS}
Resíduo	6	10,79165	0,4487417		
CV (%)		3,8998	7,7976		

* Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade

** Significativo pelo teste F a 1% de probabilidade

^{NS} Não-Significativo

Quadro 6 – Análise de variância sumarizada da atividade das peroxidases do ascorbato (APXs) nas raízes e nas folhas de dois cultivares de arroz, tratados com Al 0 e 1 mM durante dez dias.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		F	
		Raízes	Folhas	Raízes	Folhas
Níveis de Al	1	0,07363333	0,009075	3,06 ^{NS}	3,87 ^{NS}
Cultivares	1	3,1827	0,054675	132,23**	23,32**
Al*Cultivar	1	0,0003	0,001408333	0,01 ^{NS}	0,6 ^{NS}
Resíduo	6	0,02406944	0,002344444		
CV (%)		2,7242	3,4897		

** Significativo pelo teste F a 1% de probabilidade

^{NS} Não-Significativo

Quadro 7 – Análise de variância sumarizada da atividade das redutases da glutatona (GRs) nas raízes e nas folhas de dois cultivares de arroz, tratados com Al 0 e 1 mM durante dez dias.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		F	
		Raízes	Folhas	Raízes	Folhas
Níveis de Al	1	2555,585	10,52813	334,48**	1,48 ^{NS}
Cultivares	1	2,466133	16,85070	0,32 ^{NS}	2,38 ^{NS}
Al*Cultivar	1	30,78403	1,613333	4,03 ^{NS}	0,23 ^{NS}
Resíduo	6	7,640567	7,094164		
CV (%)		2,3383	6,0734		

** Significativo pelo teste F a 1% de probabilidade

^{NS} Não-Significativo

Quadro 8 – Análise de variância sumarizada da atividade das peroxidases da glutatona (GPXs) nas raízes e nas folhas de dois cultivares de arroz, tratados com Al 0 e 1 mM durante dez dias.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		F	
		Raízes	Folhas	Raízes	Folhas
Níveis de Al	1	521,0054	25,52083	89,55**	8,26*
Cultivares	1	326,2504	14,43213	56,07**	4,67 ^{NS}
Al*Cultivar	1	136,0807	1,414533	23,39**	0,46 ^{NS}
Resíduo	6	5,818256	3,090175		
CV (%)		4,2158	4,7607		

* Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade

** Significativo pelo teste F a 1% de probabilidade

^{NS} Não-Significativo

Quadro 9A – Análise de variância sumarizada da concentração de ascorbato total nas raízes e nas folhas de dois cultivares de arroz, tratados com Al 0 e 1 mM durante dez dias.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		F	
		Raízes	Folhas	Raízes	Folhas
Níveis de Al	1	0,3706567	7,030352	41,16**	37,54**
Cultivares	1	0,1032307	0,02091675	11,46*	0,11 ^{NS}
Al*Cultivar	1	0,004760083	0,001656750	0,53 ^{NS}	0,01 ^{NS}
Resíduo	6	0,009006194	0,1872554		
CV (%)		10,882	4,4865		

* Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade

** Significativo pelo teste F a 1% de probabilidade

^{NS} Não-Significativo

Quadro 9B – Análise de variância sumarizada da concentração de ascorbato reduzido, nas raízes e nas folhas de dois cultivares de arroz, tratados com Al 0 e 1 mM durante dez dias

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		F	
		Raízes	Folhas	Raízes	Folhas
Níveis de Al	1	0,001610083	7,308602	1,44 ^{NS}	39,37**
Cultivares	1	0,08484008	0,03131408	75,71**	0,17 ^{NS}
Al*Cultivar	1	0,1220083	0,003852083	1,09 ^{NS}	0,02 ^{NS}
Resíduo	6	0,001120667	0,1856576		
CV (%)		10,055	4,6346		

** Significativo pelo teste F a 1% de probabilidade

^{NS} Não-Significativo

Quadro 9C – Análise de variância sumarizada da concentração de desidroascorbato nas raízes e nas folhas de dois cultivares de arroz, tratados com Al 0 e 1 mM durante dez dias

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		F	
		Raízes	Folhas	Raízes	Folhas
Níveis de Al	1	0,3243941	0,002610750	70,14**	4,45 ^{NS}
Cultivares	1	0,0009540833	0,001064083	0,21 ^{NS}	1,82 ^{NS}
Al*Cultivar	1	0,01086008	0,0004940833	2,35 ^{NS}	0,84 ^{NS}
Resíduo	6	0,004624917	0,0005862222		
CV (%)		12,615	6,9558		

** Significativo pelo teste F a 1% de probabilidade

^{NS} Não-Significativo

Quadro 9D – Análise de variância sumarizada da razão ascorbato reduzido/desidroascorbato nas raízes e nas folhas de dois cultivares de arroz, tratados com Al 0 e 1 mM durante dez dias

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		F	
		Raízes	Folhas	Raízes	Folhas
Níveis de Al	1	0,3748868	135,1327	178,19**	28,81**
Cultivares	1	0,2041021	9,238320	97,02**	1,97 ^{NS}
Al*Cultivar	1	0,005590083	2,420110	2,66 ^{NS}	0,52 ^{NS}
Resíduo	6	0,002103806	4,690022		
CV (%)		6,8246	8,0278		

** Significativo pelo teste F a 1% de probabilidade

^{NS} Não-Significativo

Quadro 10 – Análise de variância sumarizada da concentração de glutathiona total (GSH+GSSG) nas raízes e nas folhas de dois cultivares de arroz, tratados com Al 0 e 1 mM durante dez dias.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		F	
		Raízes	Folhas	Raízes	Folhas
Níveis de Al	1	4925,895	2120,765	44,00**	0,94 ^{NS}
Cultivares	1	42,11628	8429,650	0,38 ^{NS}	3,75 ^{NS}
Al*Cultivar	1	1271,247	318,8677	11,36*	0,14 ^{NS}
Resíduo	6	111,9476	2246,643		
CV (%)		11,635	14,594		

* Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade

** Significativo pelo teste F a 1% de probabilidade

^{NS} Não-Significativo