

**ÉLCIO MEIRA DA FONSECA JÚNIOR**

**AÇÃO DO ETILENO E DE INTERMEDIÁRIOS REATIVOS DE  
OXIGÊNIO SOBRE O CRESCIMENTO DE ÁPICES RADICULARES  
EM DOIS GENÓTIPOS DE MILHO, NA PRESENÇA DE ALUMÍNIO**

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2011**

**ÉLCIO MEIRA DA FONSECA JÚNIOR**

**AÇÃO DO ETILENO E DE INTERMEDIÁRIOS REATIVOS DE  
OXIGÊNIO SOBRE O CRESCIMENTO DE ÁPICES RADICULARES  
EM DOIS GENÓTIPOS DE MILHO, NA PRESENÇA DE ALUMÍNIO**

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

**APROVADA: 02 de maio de 2011**

---

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

---

**Prof. Marco Aurélio P. e Silva**

---

**Prof<sup>a</sup>. Luzimar Campos da Silva**

---

**Prof. José Pires de Lemos Filho**

---

**Prof. José Cambraia  
(Orientador)**

*Aos meus pais: Élcio (in memoriam) e  
Maria do Socorro: exemplos de vida,  
honestidade e discernimento. Meus  
primeiros e eternos professores.*

## **MINHA HOMENAGEM**

À minha Mãe

À minhas irmãs

Aos meus sobrinhos

Aos meus familiares

Aos meus amigos

A DEUS

## **OFEREÇO E DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por ter me proporcionado esta oportunidade, dando-me coragem e força nos momentos de maior provação.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de realização do curso.

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

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

Aos Professores Marco Oliva e Juraci pela Co-Orientação, amizade, sugestões e contribuição para realização do trabalho. Aos professores Marco Aurélio, Luzimar e José Pires pelas correções e sugestões. A todos os professores da Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal pelos ensinamentos, pelas excelentes aulas e o conhecimento transmitido.

A todos de minha família, pelo apoio incondicional, os conselhos, o entendimento na ausência, a torcida e o incentivo.

A todos os colegas do curso de Fisiologia Vegetal pela amizade e convívio: Raiza, Rosilene, Eduardo Gusmão, Elaine Cabrini, Iulla, Grazielle, Gizele e, em especial Kelly Telles e Carol. Aos amigos do laboratório pela convivência, entendimento e apoio nos momentos de dificuldade: Cleberson, Dany, Flávio, Leandro e Gládis.

Aos amigos Rúbia Fonseca e Vagner pelo apoio em todos os momentos, pela amizade sincera e por estarem do meu lado nos momentos de maior dúvida e dificuldade. A Sheila, Manu e Hilton Galvão pela amizade.

Ao técnico José Antônio Bhering, pela colaboração indispensável.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

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

Em Março de 2001, ingressou na Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES), graduando-se Bacharel em Ciências Biológicas em Janeiro de 2005.

Em Março de 2005, iniciou a Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), concluindo em Março de 2007. Neste mesmo ano, ingressou no curso de Doutorado, no mesmo programa de Pós-Graduação, concluindo em Maio de 2011.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....</b>	<b>viii</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>x</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>5</b>
<b>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>6</b>
<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>.....</b>
<b>PRODUÇÃO DE ETILENO E INIBIÇÃO DO ALONGAMENTO RADICULAR, EM PLÂNTULAS DE MILHO NA PRESENÇA DE ALUMÍNIO.....</b>	<b>9</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>9</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
2.1. OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO .....	13
2.2. AVALIAÇÃO DO ALONGAMENTO RADICULAR.....	13
2.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ALUMÍNIO SOBRE A PRODUÇÃO DE ETILENO EM ÁPICES DA RAIZ PRINCIPAL .....	14
2.4. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ALUMÍNIO SOBRE A ATIVIDADE DE ENZIMAS DO METABOLISMO DE ETILENO.....	14
2.4.1. <i>Determinação da atividade da oxidase do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACO, EC 1.14.17.4)</i> .....	15
2.4.2. <i>Determinação da atividade da sintase do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACS, EC 4.4.1.14)</i> .....	15
2.5. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ALUMÍNIO E DA APLICAÇÃO DE ETILENO EXÓGENO SOBRE O ALONGAMENTO RADICULAR .....	16
2.6. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE INIBIDORES DA SÍNTESE E DA AÇÃO DE ETILENO SOBRE A TOXICIDADE DO ALUMÍNIO.....	16
2.7. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	16
2.8. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	17
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>18</b>
3.1. EFEITO DO ALUMÍNIO NO ALONGAMENTO RADICULAR.....	18

3.2. EFEITO DO ALUMÍNIO SOBRE A PRODUÇÃO DE ETILENO EM ÁPICES RADICULARES.....	18
3.3. EFEITO DO ALUMÍNIO SOBRE A ATIVIDADE DE ENZIMAS DO METABOLISMO DO ETILENO.....	19
3.4. EFEITO DO ALUMÍNIO E DA APLICAÇÃO EXÓGENA DE ETILENO NO ALONGAMENTO RADICULAR.....	20
3.5. EFEITO DE INIBIDORES DA SÍNTESE E AÇÃO DE ETILENO NO ALONGAMENTO RADICULAR.....	21
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>23</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>27</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>28</b>
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>9</b>
<b>PRODUÇÃO DE INTERMEDIÁRIOS REATIVOS DE OXIGÊNIO E INIBIÇÃO DO ALONGAMENTO RADICULAR EM DOIS GENÓTIPOS DE MILHO, NA PRESENÇA DE ALUMÍNIO.....</b>	<b>32</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>32</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>33</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
2.1. OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	38
2.2. AVALIAÇÃO DO ALONGAMENTO RADICULAR.....	38
2.3. DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE ALUMÍNIO EM ÁPICES RADICULARES...	39
2.4. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO AI SOBRE A ATIVIDADE DE ENZIMAS DO SISTEMA ANTIOXIDATIVO EM ÁPICES DA RAIZ PRINCIPAL.....	39
2.4.1. <i>Aplicação dos tratamentos e obtenção das amostras.....</i>	39
2.4.2. <i>Obtenção dos extratos enzimáticos brutos.....</i>	40
2.4.3. <i>Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1).....</i>	40
2.4.4. <i>Determinação da atividade da peroxidase (POX, EC 1.11.1.7).....</i>	41
2.4.5. <i>Determinação da atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6).....</i>	41
2.4.6. <i>Determinação da atividade da peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11).....</i>	41
2.5. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ALUMÍNIO SOBRE OS TEORES DE ROIs EM ÁPICES DA RAIZ PRINCIPAL.....	42
2.5.1. <i>Determinação dos teores de ânion superóxido.....</i>	42

2.5.2. <i>Determinação dos teores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></i> .....	42
2.6. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ALUMÍNIO SOBRE A ATIVIDADE DE ENZIMAS PRODUTORAS DE ROIs NO APOPLASTO.....	43
2.6.1. <i>Obtenção dos extratos enzimáticos, da fração microsomal e da fração da parede celular</i> .....	43
2.6.2. <i>Determinação da atividade da oxidase da diamina (EC 1.4.3.6)</i> .....	44
2.6.3. <i>Determinação da atividade da oxidase do NADPH da fração microsomal (EC 1.6.3.1)</i> .....	45
2.6.4. <i>Determinação da atividade da peroxidase do NADH (EC 1.11.1.1)</i> .....	45
2.7. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE INIBIDORES DE ENZIMAS PRODUTORAS DE ROIs .....	46
2.8. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO Al SOBRE A PEROXIDAÇÃO DE LIPÍDIOS.....	46
2.9. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	47
2.10. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	47
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>48</b>
3.1. EFEITO DO ALUMÍNIO NO ALONGAMENTO RADICULAR.....	48
3.2. TEORES DE ALUMÍNIO EM ÁPICES DA RAIZ PRINCIPAL.....	49
3.4. EFEITO DO ALUMÍNIO SOBRE OS TEORES DE ROIs E PEROXIDAÇÃO DE LIPÍDIOS EM ÁPICES DA RAIZ PRINCIPAL.....	51
3.5. EFEITO DO ALUMÍNIO SOBRE A ATIVIDADE DE ENZIMAS PRODUTORAS DE ROIs EM ÁPICES DA RAIZ PRINCIPAL.....	53
3.6. EFEITO DE INIBIDORES DE ENZIMAS PRODUTORAS DE ROIs NO ALONGAMENTO RADICULAR .....	55
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	<b>56</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>63</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>64</b>
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	<b>71</b>
<b>APÊNDICE</b> .....	<b>72</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- ACC – Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
- ACO – Oxidase do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
- ACS – Sintase do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
- Al – Alumínio
- AOA – Ácido aminooxiacético
- APX – Peroxidases do ascorbato
- AUX1 – Transportador de influxo de auxina
- CAT – Catalase
- CTR – Resposta tripla constitutiva
- DAO – Oxidase da diamina
- DPI – Difenileno iodônio
- EDTA – Ácido etileno diamino tetracético
- EIN – Insensível a etileno
- Eles – Elementos de resposta a etileno
- ETH – Erel ou Etefon (ácido-2-cloroetilfosfônico)
- ETR – Receptores de etileno
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogênio
- HEH – 2-hidroxiethylhidrazina
- MAPKs – proteínas cinases ativadas por mitógenos
- NaN<sub>3</sub> – Azida sódica
- O<sub>2</sub><sup>•-</sup> – Ânion superóxido
- OH – Radical hidroxílico
- PIN2 – Transportador de efluxo de auxina
- POX – Peroxidase
- ROIs – Intermediários reativos de oxigênio
- S-AdoMet – S-adenosil metionina
- SAM – Sintetase da S – adenosil metionina

SOD – Dismutases do superóxido

XTT – Sal de sódio do [2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida

## RESUMO

FONSECA JÚNIOR, Élcio Meira da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2011. **Ação do etileno e de intermediários reativos de oxigênio sobre o crescimento de ápices radiculares em dois genótipos de milho, na presença de alumínio.** Orientador: José Cambraia. Co-Orientadores: Juraci Alves de Oliveira e Marco Antônio Oliva Cano.

O objetivo principal deste estudo foi avaliar a ação de etileno e de intermediários reativos de oxigênio (ROIs) na inibição do crescimento radicular causada por Al, em ápices radiculares de dois genótipos de milho. Nos experimentos foram utilizados os genótipos de milho UFVM 100 (sensível) e UFVM 200 (tolerante), submetidos aos tratamentos com Al nas concentrações de 0 e 100  $\mu\text{M}$ , em solução de  $\text{CaCl}_2$  0,5 mM, pH 4,0, durante 24 horas. O tratamento com Al inibiu o alongamento radicular e aumentou a produção de etileno nos dois genótipos de milho, com maior intensidade no UFVM 100. Os coeficientes de correlação entre alongamento radicular e teores de etileno, na presença de Al, foram de -0,97 e -0,90, para os genótipos UFVM 100 e UFVM 200, respectivamente. O tratamento com Al, também, aumentou as atividades das enzimas da síntese de etileno: sintase do ácido aminociclopropano carboxílico (ACS) e oxidase do ácido aminociclopropano carboxílico (ACO), nos dois genótipos de milho, sempre com maior intensidade no genótipo UFVM 100. O tratamento das plântulas com precursores da biossíntese de etileno: ácido aminociclopropano carboxílico (ACC) e etrel inibiram o alongamento radicular na mesma intensidade que a inibição causada por Al aplicado isoladamente, nos dois genótipos. Por outro lado, a aplicação de inibidores da síntese de etileno: ácido aminooxiacético (inibidor da ACS), cloreto de cobalto (inibidor da ACO) e tiosulfato de prata (inibidor da percepção do etileno) eliminaram a inibição do alongamento radicular causada por Al nos dois genótipos. O tratamento com Al aumentou os teores do ânion superóxido e as atividades das enzimas superóxido dismutase e peroxidase, reduziu os teores de peróxido de hidrogênio, mas não influenciou nas atividades da catalase e peroxidase do ascorbato. Nenhuma destas variáveis foi modificada pelo tratamento com Al no genótipo UFVM 200. O Al, também, aumentou as atividades das enzimas oxidase do NADPH (NOX), oxidase da diamina (DAO) e peroxidase do NADH (NADH-POX) de frações de membrana plasmática e parede celular, respectivamente, relacionadas com a produção de ROIs no apoplasto radicular, apenas no genótipo sensível. Dentre os inibidores

aplicados: difenileno iodônio, azida sódica e 2-hidroxiethylhidrazina apenas a azida e a combinação dos três inibidores eliminaram parcialmente o efeito do Al no genótipo UFVM 100. O aumento na atividade das enzimas DAO, NOX e NADH-POX é indicativo de ter ocorrido aumento no teor de ROIs no apoplasto das raízes das plantas do genótipo sensível tratadas com Al. Embora não tenha sido observado aumento na peroxidação de lipídios do ápice radicular, acredita-se que o acúmulo destes ROIs no apoplasto, tenha sido suficiente para ativar peroxidases ligadas à parede celular, causando enrijecimento da parede celular e, conseqüentemente, inibição do alongamento radicular. O genótipo UFVM 200 não sofreu qualquer dano oxidativo nas condições do presente experimento. O somatório destas respostas dos genótipos de milho estudados sugere que a inibição do alongamento radicular induzida por níveis tóxicos de Al é mediada por mecanismos de sinalização envolvendo a síntese e a percepção de etileno e a produção e remoção de intermediários reativos de oxigênio no apoplasto radicular.

## ABSTRACT

FONSECA JÚNIOR, Élcio Meira da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May of 2011. **Action of ethylene and reactive oxygen intermediates on growth in root tips in two maize genotypes, in the presence of aluminum.** Adviser: José Cambraia. Co-advisers: Juraci Alves de Oliveira and Marco Antônio Oliva Cano.

The main objective of this study was to evaluate the action of ethylene and reactive oxygen intermediates (ROIs) in the inhibition of root tips growth caused by Al in two genotypes of maize. Seedlings of two maize genotypes, UFVM 100 (sensitive) and UFVM 200 (tolerant) were subjected to treatments with Al 0 and 100  $\mu\text{M}$  in 0.5 mM  $\text{CaCl}_2$  solution for 24 hours. Al treatment inhibited root elongation and increased ethylene production in two maize genotypes with greater intensity in the UFVM 100. The correlation coefficients between root elongation and ethylene levels in the presence of Al, were -0.97 and -0.90, for genotypes UFVM 200 and 100, respectively. Al treatment also increased the enzymes activities of ethylene synthesis, aminocyclopropane carboxylic acid synthase (ACS) and aminocyclopropane carboxylic acid oxidase (ACO), in both maize genotypes with ever greater intensity in the sensitive genotype. The treatment of seedlings with precursors of ethylene biosynthesis, aminocyclopropane carboxylic acid (ACC) and ethrel inhibited root elongation in the same intensity as that caused by Al applied alone, in both genotypes. On the other hand, application of inhibitors of ethylene synthesis: aminooxiacetic acid (inhibitor of ACS), cobalt chloride (inhibitor of ACO) and silver thiosulfate (inhibitor of ethylene perception) eliminated the inhibition of root elongation caused by the Al in both genotypes. Al treatment increased the levels of superoxide anion and the activities of the enzymes superoxide dismutase and peroxidase, reduced hydrogen peroxide content, but did not influence the activities of catalase and ascorbate peroxidase. None of these variables was modified by Al treatment in the tolerant genotype. Al also increased the activities of enzymes NADPH oxidase (NOX), diamine oxidase (DAO) and NADH peroxidase (NADH-POX) in fractions of plasma membrane and cell wall related to the production of ROIs in the root apoplast, only in the sensitive genotype. Among the inhibitors used: diphenylene iodonium, sodium azide and 2-hidroxiethylhidrazina only the azide and the combination of three inhibitors partially eliminated the effect of Al in the genotype UFVM 100. The increase in the activity of DAO enzymes, NADH-POX and

NOX was taken as indicative of an increase in the level of ROIs in the apoplast of plants of the genotype UFVM 100 treated with Al. Although no increase in lipid peroxidation in root tips has been observed, we believe that the accumulation of ROIs in the apoplast was high enough to activate peroxidases linked to the cell wall causing cell wall stiffening and, therefore, inhibiting root elongation. The genotype UFVM 200 suffered no damage oxidative in the conditions of this experiment. The sum of these responses of maize genotypes studied suggests that the inhibition of root elongation induced by toxic levels of Al is mediated by signaling mechanisms involving the synthesis and perception of ethylene and the production and removal of reactive oxygen intermediates in the apoplast root.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Os trópicos e subtropicais respondem por 60 % dos solos ácidos no mundo (Kochian et al., 2004) e, por serem regiões produtoras de alimentos, a agricultura é seriamente limitada pela toxicidade do alumínio (Kochian et al., 2004; Magalhães et al., 2007).

Em solos ácidos ( $\text{pH} \leq 5,5$ ), espécies tóxicas de alumínio, especialmente  $\text{Al}^{3+}$ , tornam-se disponíveis na solução do solo inibindo o crescimento radicular e a produtividade de espécies de importância econômica (Kochian et al., 2004). Em razão disto, a toxicidade do Al representa uma limitação primária para a produção das culturas economicamente importantes em solos ácidos, o que restringe o aumento da produção de alimentos, principalmente em países em desenvolvimento.

O sintoma primário e mais evidente da toxicidade do Al em vegetais é a inibição do alongamento radicular (Panda, 2007; Chandran et al., 2008). O ápice da raiz, local de acúmulo de Al, especialmente a região da zona de transição, é apontado como alvo primário das injúrias causadas pelo alumínio (Kollmeier et al., 2000; Horst et al., 2010). O Al ao penetrar nas raízes pode interagir com inúmeros alvos potenciais de sua ação tóxica como a parede celular, o citoesqueleto e, principalmente, a membrana plasmática (Kochian et al., 2004; Horst et al., 2010). Talvez, por esta diversidade de ação, ainda não seja compreendido como ou em qual destes sítios o Al age inicialmente para provocar a rápida inibição do alongamento radicular. Somado a isso, prevalece a dúvida: para exercer seus efeitos tóxicos primários o Al atravessa a membrana plasmática e penetra no citossol, ou seus efeitos são causados e, ou percebidos já no apoplasto do ápice radicular (Horst et al., 2010). Em razão de o Al inibir o alongamento radicular em poucos minutos, mas existir uma aparente lentidão na sua penetração no simplasma, alguns autores apóiam a hipótese de que o Al exerça seus efeitos diretamente no apoplasto (Kochian, 1995; Horst et al., 2010). Apesar disto, a hipótese de uma ação do Al no citossol não pode ser descartada, uma vez que em células da alga *Chara corallina* o transporte de Al através da membrana plasmática ocorre em poucos minutos (Taylor et al., 2000).

A ação do Al pode ser também por um processo de sinalização celular (Kochian, 1995), com envolvimento de fitohormônios, dentre os quais se destaca o etileno. O etileno é um fitohormônio gasoso reconhecido por estar envolvido em diversas respostas fisiológicas nas plantas (Guo e Ecker, 2004; Pierik et al., 2006; Dugardeyn e Straeten, 2008). Um efeito atribuído ao etileno é a rápida inibição do alongamento radicular (Ruzicka et al., 2007; Dugardeyn e Straeten, 2008), semelhante ao causado por Al. Em virtude desta semelhança, a relação entre etileno e Al na inibição do alongamento radicular foi estudada em algumas espécies (Gunsé et al., 2000; Massot et al., 2002; Sun et al., 2007).

Alguns estudos mostraram que o Al pode estimular a síntese rápida e precoce de etileno. Massot et al. (2002) verificaram que a evolução de etileno em ápices radiculares dobrou após 15 min de exposição a 50  $\mu\text{M}$  de Al, atingindo um máximo em 30 min de tratamento. A taxa de crescimento da raiz, por outro lado, foi significativamente reduzida em 360 min, sugerindo ser a síntese de etileno estimulada antes da inibição do alongamento radicular. Em concordância com esta observação, em raízes de *Lotus japonicus* expostas a 50  $\mu\text{M}$  de Al, Sun et al. (2007) também constataram aumento na produção de etileno, atingindo um pico após 30 min de exposição, seguido por redução na produção até 6 h, estabilizando-se, então, a produção deste hormônio. Apesar destes resultados, nas variedades ATP SR Yellow e HS 701B de milho, o  $\text{Al}^{3+}$  inibiu o alongamento radicular, mas não foi detectado aumento na produção de etileno após 4 e 24 horas de tratamento (Gunsé et al., 2000).

Apesar de reconhecida há bastante tempo a inibição do crescimento radicular causada pelo etileno, não se sabe ainda como isto ocorre. Utilizando plântulas de *Arabidopsis thaliana*, Ruzicka et al. (2007) verificaram que o etileno estimula a expressão de transportadores em ápices radiculares e a redistribuição de auxina para a zona de alongamento, onde ativa uma resposta que resulta na inibição do alongamento radicular (Ruzicka et al., 2007). Em plântulas de *Arabidopsis thaliana* tratadas com Al, Sun et al. (2010) constataram que o pico de produção de etileno e o aumento da expressão de genes das enzimas de biossíntese de etileno, oxidase do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACO) e sintase do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACS), ocorre dentro de 30 min, anterior ao aumento da expressão de transportadores de auxina AUX1 e PIN2 (2 h). Para estes autores, o aumento da produção de etileno pelo Al funciona como um sinal que altera a distribuição de auxina



nas raízes através de transportadores AUX1 e PIN2, resultando em redistribuição de auxina do ápice para zona de alongamento, com inibição do alongamento radicular.

A inibição do alongamento radicular tem sido associada com alterações induzidas por etileno e também com a produção de intermediários reativos de oxigênio (ROIs) no apoplasto (Cnodder et al., 2005; Laohavisit e Davies, 2007). Há evidências de que os ROIs presentes no apoplasto favoreçam a formação de ligações cruzadas entre componentes da parede celular, tais como glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (Cnodder et al., 2005). Estas ligações cruzadas entre proteínas estruturais causariam enrijecimento e restrição ao alongamento radicular (Passardi et al., 2004).

Apesar da possibilidade anterior apresentada por alguns autores, ainda não se conhece a relação entre etileno e a “explosão oxidativa” de ROIs no apoplasto. Há evidências de que o etileno possa amplificar a produção de ROIs, notadamente  $H_2O_2$  (Moeder et al., 2002; Cnodder et al., 2005). Para explicar a possível relação entre a percepção de etileno e a produção de ROIs, Laohavisit e Davies (2007) propuseram a ligação de etileno a um receptor, seguida de um estímulo à liberação de  $Ca^{2+}$  de locais de armazenamento interno, resultando em aumento na concentração citossólica de  $Ca^{2+}$  e ativação das oxidases do NADPH com produção de  $H_2O_2$  extracelular. Este  $H_2O_2$ , por sua vez, estimularia a abertura de canais de cálcio da membrana plasmática aumentando mais ainda a concentração de cálcio no citoplasma com intensa ativação das oxidases do NADPH, favorecendo a explosão oxidativa de ROIs no apoplasto.

Em outras espécies, o Al também parece estimular a produção de ROIs e a abertura de canais de cálcio. Em células BY-2 de tabaco (*Nicotiana tabacum*) tratadas com Al, Kawano et al. (2003) verificaram pico de produção de  $O_2^{\bullet-}$  por oxidases do NADPH, seguido por abertura de canais de cálcio da membrana plasmática com aumento na concentração citossólica de cálcio. Estes autores sugeriram que os ROIs foram os responsáveis pela abertura dos canais na membrana plasmática e aumento na concentração de cálcio citossólico. Em plântulas de centeio expostas a 100  $\mu M$  de Al, Ma et al. (2002) verificaram aumento na concentração citossólica de cálcio em ápices de raízes após 10 min de exposição e, portanto, anterior à inibição do crescimento que só foi observada após 2 horas. Para os autores, o aumento na concentração citossólica de cálcio pelo Al deve alterar processos metabólicos dependente de  $Ca^{2+}$ , resultando em inibição do alongamento radicular (Ma et al., 2002).

Além das oxidases do NADPH, outras enzimas podem produzir ROIs no apoplasto, como as peroxidases do NADH, as oxidases do oxalato e as oxidases da diamina (Cona et al., 2006; Miller et al., 2010). A contribuição relativa de cada uma destas enzimas na síntese de ROIs, entretanto, não é perfeitamente conhecida (Cona et al., 2006), principalmente sob estresse causado por alumínio.

A relação entre a produção de ROIs no apoplasto e a inibição do alongamento radicular também é matéria de discussão. Acredita-se que exista um mecanismo bifásico no apoplasto com envolvimento de peroxidases (Passardi et al., 2004; Xue et al., 2008). O  $H_2O_2$ , ao ser consumido por peroxidases, pode resultar em ligações cruzadas entre componentes estruturais da parede celular, o que pode contribuir para o enrijecimento e inibição do alongamento radicular (Passardi et al., 2004). Por outro lado, caso o  $H_2O_2$  não seja consumido, ele pode originar radical hidroxílico ( $\cdot OH$ ), pela reação de Fenton (Chen e Schopfer, 1999). Estes radicais, então, promoveriam a clivagem de polissacarídeos da parede celular, resultando numa espécie de afrouxamento e, ao invés de inibir, favoreceria o alongamento radicular (Passardi et al., 2004; Passardi et al., 2005; Cona et al., 2006). O modo de ação dos radicais hidroxílicos na clivagem de polissacarídeos da parede celular ainda não é perfeitamente conhecido (Rose et al., 2004). Por serem altamente reativos os radicais hidroxílicos clivam inespecificamente diversos polissacarídeos, como xiloglucanos ou outros polímeros ligados à celulose, resultando em afrouxamento da parede celular (Cosgrove et al., 1999). Com o afrouxamento da parede, ocorre redução da pressão de turgescência e do potencial hídrico no interior da célula, gerando uma diferença de potencial hídrico entre o meio interno e externo, que favoreceria a absorção de água (Cosgrove, 1997), aumentando a pressão sobre a parede celular, resultando em alargamento da célula (Cosgrove, 1999).

Apesar dos relatos mencionados anteriormente, os estudos sobre possíveis relações entre etileno, produção de ROIs no apoplasto e atividade de enzimas antioxidativas sobre a inibição do alongamento radicular são ainda escassos e contraditórios. Tanto quanto se sabe, nenhum estudo foi realizado com o intuito de avaliar se a inibição do alongamento radicular pelo Al está ou não associada com alterações na produção de etileno, de ROIs e na atividade de enzimas produtoras e removedoras destes intermediários. Fica evidente a necessidade de se realizar estudos nesta linha de pesquisa não só pelas dúvidas existentes, mas também para tentar esclarecer o modo de ação do alumínio.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a relação entre os teores de etileno, a produção de ROIs e as atividades de enzimas da biossíntese do etileno e antioxidativas com a inibição do alongamento radicular causada por Al, em dois genótipos de milho.

Para atingir este objetivo, foram avaliados em ápices radiculares de dois genótipos de milho com tolerância diferencial ao Al as seguintes variáveis:

- 1- A produção de etileno e as atividades das enzimas que controlam a sua biossíntese.
- 2- O efeito do Al e da aplicação de etileno exógeno sobre o alongamento radicular.
- 3- O efeito do Al e de inibidores da síntese e da ação de etileno sobre o alongamento radicular.
- 4- A produção e acúmulo de dois dos principais ROIs:  $O_2^{\bullet}$  e  $H_2O_2$ .
- 5- A atividade de enzimas produtoras de ROIs e de enzimas antioxidativas envolvidas na remoção destas espécies reativas.
- 6- O efeito do Al e de inibidores de enzimas produtoras de ROIs sobre o alongamento radicular.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHANDRAN, D.; SHAROPOVA, N.; IVASHUTA, S.; GANTT, J. S.; VANDENBOSCH, K. A.; SAMAC, D. A. Transcriptome profiling identified novel genes associated with aluminum toxicity, resistance and tolerance in *Medicago truncatula*. *Planta*, 228: 151-166, 2008.
- CHEN, S. X.; SCHOPFER, P. Hydroxyl-radical production in physiological reactions: a novel function of peroxidase. *European Journal of Biochemistry*, 260: 726-735, 1999.
- CNODDER, T.; VISSENBERG, K.; STRAETEN, V. D.; VERBELEN, J. P. Regulation of cell length in the *Arabidopsis thaliana* root by the ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid: a matter of apoplastic reactions. *New Phytologist*, 168: 541-550, 2005.
- CONA, A.; REA, G.; ANGELINI, R.; FEDERICO, R.; TAVLADORAKI, P. Functions of amine oxidases in plant development and defense. *Trends in Plant Science*, 11: 80-88, 2006.
- COSGROVE, D. J. Relaxation in a high stress environment: the molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. *The Plant Cell*, 9: 1031-1041, 1997.
- COSGROVE, D. J. Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annual Review Plant Molecular Biology*, 50: 391- 417, 1999.
- DUGARDEYN, J.; STRAETEN, V. D. Ethylene: fine-tuning plant growth and development by stimulation and inhibition of elongation. *Plant Science*, 175: 59-70, 2008.
- GUNSE, B.; POSCHENRIEDER, C.; BARCELÓ, J. The role of ethylene metabolism in the short-term responses to aluminum by roots of two maize cultivars different in Al-resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 43: 73-81, 2000.
- GUO, H.; ECKER, J. R. The ethylene signaling pathway: new insights. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 40-49, 2004.
- HORST, W. J.; WANG, Y.; ETICHA, D. The role of the root apoplast in aluminum-induced inhibition of root elongation and in aluminum resistance of plants: a review. *Annals of Botany*, 106: 185-197, 2010.
- KAWANO, T.; KADONO, T.; FURUICHI, T.; MUTO, SHOSHI; LAPEYRIE, F. Aluminum-induced distortion in calcium signaling involving oxidative bursts and channel regulation in tobacco BY-2 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 308: 35-42, 2003.

- KOCHIAN, L. V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology*, 46: 237-260, 1995.
- KOCHIAN, L. V.; HOEKENGA, O. A.; PIÑEROS, M. A. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 459-493, 2004.
- KOLLMEIER, M.; FELLE, H. H.; HORST, W. J. Genotypic differences in aluminum resistance of maize are expressed in the distal part of the transition zone. Is reduced basipetal auxin flow involved in inhibition of root elongation by aluminum? *Plant Physiology*, 122: 945-956, 2000.
- LAOHAVISIT, A.; DAVIES, J. M. The gas that opens gates: calcium channel activation by ethylene. *New Phytologist*, 174: 470-473, 2007.
- MA, Q.; RENGEL, Z.; KUO, J. Aluminum toxicity in Rye (*Secale cereale*): Root Growth and Dynamics of cytoplasmic  $Ca^{2+}$  in intact root tips. *Annals of Botany*, 89: 241-244, 2002.
- MAGALHÃES, J. V.; LIU, J.; GUIMARÃES, C. T.; LANA, U. G. P.; ALVES, V. M. C.; WANG, Y-H; SCHAFFERT, R. E.; HOEKENGA, W. A.; PIÑEROS, M. A.; SHAFF, J. E.; KLEIN, P. E.; CARNEIRO, N. P.; COELHO, C. M.; TRICK, H. N.; KOCHIAN, L. V. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. *Nature Genetics*, 39: 1156-1161, 2007.
- MASSOT, N.; NICANDER, B.; BARCELÓ, J. POSCHENRIEDER, CH.; TILBERG, E. A rapid increase in cytokinin levels and enhanced ethylene evolution precede  $Al^{3+}$ -induced inhibition of root growth in bean seedlings (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Growth Regulation*, 37: 105-112, 2002.
- MILLER, G.; SUZUKI, N.; CIFTCI-YILMAZ, S.; MITTLER, R. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell and Environment*, 33: 453-467, 2010.
- MOEDER, W.; BARRY, C. S.; TAURIAINEN, A. A.; BETZ, C.; TUOMAINEN, J.; UTRIAINEN, M.; GRIERSON, D.; SANDERMANN, H.; LANGEBARTELS, C.; KANGASJÄRVI, J. Ethylene synthesis regulated by biphasic induction of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase genes is required for hydrogen peroxide accumulation and cell death in ozone-exposed tomato. *Plant Physiology*, 130: 1918-1926, 2002.
- PANDA, S. K. Molecular physiology of aluminum toxicity and tolerance in plants. *The Botanical Review*, 73: 326-347, 2007.
- PASSARDI, F.; COSIO, C.; PENEL, C.; DUNAND, C. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports*, 24: 255-265, 2005.
- PASSARDI, F.; PENEL, C.; DUNAND, C. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science*, 9: 534-540, 2004.

- ROSE, J. K. C.; SALADIÉ, M.; CATALA, C. The plot thickens: new perspectives of primary cell wall modification. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 296-301, 2004.
- RUZICKA, K.; LJUNG, K.; VANNESTE, S.; PODHORSKÁ, R.; BEECKMAN, T.; FRIML, J.; BENKOVÁ, E. Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution. *The Plant Cell*, 19: 2197-2212, 2007.
- SUN, P.; TIAN, Q-Y; CHEN, J.; ZHANG, W-H. Aluminum-induced inhibition of root elongation in *Arabidopsis* is mediated by ethylene and auxin. *Journal of Experimental Botany*, 61: 347-356, 2010.
- SUN, P.; TIAN, Q-Y., T.; ZHAO, M-G.; DAI, X-Y.; HUANG, J-H.; LI, L-H.; ZHANG, W-H. Aluminum-induced ethylene production is associated with inhibition of root elongation in *Lotus japonicus* L. *Plant Cell Physiology*, 48: 1229-1235, 2007.
- TAYLOR, G. J.; McDonald-STEPHENS, J. L.; HUNTER, D. B.; BERTSCH, P. M.; ELMORE, D.; RENGEL, Z.; REID, R. J. Direct measurement of aluminum uptake and distribution in single cells of *Chara corallina*. *Plant Physiology*, 123: 987-996, 2000.
- XUE, Y. J.; TAO, L.; YANG, Z. M. Aluminum-induced cell wall peroxidase activity and lignin synthesis are differentially regulated by jasmonate and nitric oxide. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 56: 9676-9684, 2008.

## CAPÍTULO I

### PRODUÇÃO DE ETILENO E INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO RADICULAR, EM PLÂNTULAS DE MILHO NA PRESENÇA DE ALUMÍNIO

#### RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a ação de etileno e das enzimas de biossíntese deste hormônio na inibição do crescimento radicular causada por alumínio (Al). Nos experimentos foram utilizados os genótipos de milho UFVM 100 (sensível) e UFVM 200 (tolerante), submetidos aos tratamentos com Al 0 e 100  $\mu$ M em solução de CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM, pH 4,0, durante 24 horas. O tratamento com Al inibiu o alongamento radicular e aumentou a produção de etileno nos dois genótipos de milho, com maior intensidade no UFVM 100. Os coeficientes de correlação entre alongamento radicular e teores de etileno, na presença de Al, foram de -0,97 e -0,90, para os genótipos UFVM 100 e UFVM 200, respectivamente. O tratamento com Al, também, aumentou as atividades das enzimas da síntese de etileno: sintase do ácido aminociclopropano carboxílico (ACS) e oxidase do ácido aminociclopropano carboxílico (ACO), nos dois genótipos de milho, sempre com maior intensidade no genótipo UFVM 100. O tratamento das plântulas com precursores da biossíntese de etileno: ácido aminociclopropano carboxílico (ACC) e etrel inibiram o alongamento radicular na mesma intensidade que a inibição causada por Al aplicado isoladamente, nos dois genótipos. Por outro lado, a aplicação de inibidores da síntese de etileno: ácido aminooxiacético (inibidor da ACS), cloreto de cobalto (inibidor da ACO) e tiosulfato de prata (inibidor da percepção do etileno) eliminaram a inibição do alongamento radicular causada por Al nos dois genótipos. Os resultados aqui obtidos sugerem que a inibição do alongamento radicular induzida por Al ocorre via interferência em certas etapas da síntese e, ou de sinalização do etileno. O Al estimula a atividade das enzimas envolvidas na biossíntese do etileno e os receptores envolvidos na percepção deste hormônio, desencadeando uma série de reações que culmina na resposta fisiológica, a inibição do alongamento radicular. A tolerância diferencial dos genótipos de milho parece estar associada com a maior atividade de enzimas de síntese de etileno estimuladas por este cátion.

**Palavras chave:** Toxicidade alumínio, produção de etileno, milho.

## 1. INTRODUÇÃO

O alumínio é o metal mais abundante na crosta terrestre, considerado um dos mais importantes limitantes da produtividade de culturas de importância econômica em solos ácidos (Kochian et al., 2004; Ma, 2007; Horst, 2010). O Al, em solos ácidos ( $\text{pH} \leq 5,0$ ), apresenta-se na forma iônica de octaedro hexahidrato,  $\text{Al}^{3+}$ , considerada a mais tóxica para as plantas (Ma, 2007). Nesta forma, o Al é absorvido resultando em sérios problemas para o crescimento e desenvolvimento das plantas (Kochian et al., 2004; Ma, 2007; Horst et al., 2010).

O sintoma precoce e mais evidente de toxicidade do  $\text{Al}^{3+}$  em vegetais é a inibição do alongamento radicular observado após poucos minutos de exposição a este íon (Panda, 2007; Horst et al., 2010). O ápice da raiz, particularmente a zona de transição distal, é apontado como principal local de percepção e expressão da toxicidade do Al (Ryan et al., 1993; Sivaguru e Horst, 1998; Rangel et al., 2007). Não se sabe, contudo, os mecanismos primários pelos quais o Al age para causar inibição do alongamento radicular.

Efeitos primários apontados para explicar a ação tóxica do Al incluem alterações nas propriedades da membrana plasmática como fluidez, permeabilidade e no potencial de membrana (Ahn et al., 2006; Khan et al., 2009); alteração na homeostase do cálcio com aumento na concentração citossólica (Rengel et al., 2003); indução da produção de intermediários reativos de oxigênio (Jones et al., 2006), dentre outros processos. O Al pode, também, estimular a produção de fitohormônios, dentre os quais um dos mais importantes parece ser o etileno (Sun et al., 2010). Este hormônio é reconhecido por causar rápida inibição do alongamento radicular e alterações na morfologia do ápice da raiz (Ruzicka et al., 2007; Dugardeyn e Straeten, 2008), muito semelhantes aos efeitos do Al. Em virtude desta semelhança, a relação entre etileno e Al na inibição do alongamento radicular tem sido estudada em algumas espécies como feijão (Massot et al., 2002), *Lotus japonicus* (Sun et al., 2007) e *Arabidopsis thaliana* (Sun et al., 2010).

O etileno é um hormônio gasoso bastante conhecido por sua participação em processos fisiológicos diversos como amadurecimento de frutos, senescência, abscisão e



germinação de sementes (Tian e Lu, 2006). Em plantas, o etileno é sintetizado a partir do aminoácido metionina que é convertido em S-adenosil metionina (S-AdoMet) pela S-adenosil metionina sintetase (SAM) (Wang et al., 2002; Tian e Lu, 2006). O S-AdoMet é convertido a ácido-1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) pela sintase do ACC (ACS) que, em seguida, é oxidado a etileno, pela oxidase do ACC (ACO) (Wang et al., 2002; Tian e Lu, 2006). Para sua ação, o etileno sintetizado liga-se a um de seus receptores (ETR1, ETR2, ERS1, ERS2, EIN4) localizados na superfície do retículo endoplasmático (Dugardeyn e Van Der Straeten, 2008), inibindo a função do repressor negativo CTR1 (CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE1) sobre EIN2 (ETHYLENE INSENSITIVE2) que fica livre para atuar na sua rota de sinalização (Tian e Lu, 2006; Dugardeyn e Van Der Straeten, 2008). O EIN2 livre do controle do repressor migra para o núcleo onde ativa fatores de transcrição da família EIN3 que se ligam ao promotor, estimulando a transcrição gênica (Dugardeyn e Van Der Straeten, 2008).

A produção de etileno é regulada por sinais internos durante o desenvolvimento da planta e em resposta a estímulos de estresse biótico (por exemplo, ataque de patógenos) e estresse abiótico tais como ferimento, hipoxia, resfriamento, congelamento (Wang et al., 2002) e metais como cádmio (Rodríguez-Serrano et al., 2009) e alumínio (Sun et al., 2010). Sob condições estressantes, a produção de etileno é estimulada, provavelmente, como resultado do aumento na atividade da ACS (Wang et al., 2002; Liu e Zhang, 2004). Em condições normais, a atividade da ACS em tecidos vegetais é baixa, mas sob estresse, esta enzima é ativada rapidamente por fosforilação, que aumenta a produção de etileno (Kim et al., 2003). Como a ACO está presente constitutivamente na maioria dos tecidos vegetais, ACS é considerada limitante e reguladora da produção de etileno (Kim et al., 2003). Acredita-se que em condições de estresse, algumas de suas isoformas sejam ativadas rapidamente por proteínas cinases ativadas por mitógenos (MPKs) conforme verificado por Liu e Zhang (2004) em plântulas de *Arabidopsis thaliana*, com aumento na produção de etileno.

Uma das respostas mais comuns das plantas submetidas a vários estresses ambientais é o aumento na produção de etileno (Wang et al., 2002; Tian e Lu, 2006). Etileno é amplamente reconhecido como inibidor de crescimento em plantas, embora em baixas concentrações possa estimulá-lo (Pierik et al., 2006). Este hormônio pode causar a inibição do alongamento de folhas (Fiorani et al., 2002), radicular (Le et al., 2001) e estimular a expansão radial (Le et al., 2001).

O Al também inibe o alongamento radicular e causa alterações morfológicas semelhantes ao etileno (Blancaflor et al., 1998). Estudos mostram que o Al pode estimular a produção de etileno precocemente em ápices radiculares (Massot et al., 2002; Sun et al., 2007; Sun et al., 2010). Estímulo à produção de etileno foi verificado em *Lotus japonicus* (Sun et al., 2007) expostos a 50  $\mu\text{M}$  de Al anterior à inibição do alongamento radicular. Apesar destes resultados, em duas variedades de milho (ATP SR Yellow e HS 701B), o  $\text{Al}^{3+}$  inibiu o alongamento radicular, mas não foi detectado aumento na produção de etileno após 4 e 24 horas de tratamento (Gunsé et al., 2000). Em plântulas de *Arabidopsis thaliana* tratadas com Al, Sun et al. (2010) detectaram pico de produção de etileno e o aumento da expressão de genes das enzimas de biossíntese de etileno: oxidase do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACO) e sintase do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACS) anterior à inibição do alongamento radicular.

Como a produção de etileno é estimulada precocemente sob condições de estresse por Al, existem sugestões de o etileno estar intermediando os efeitos do Al na inibição do alongamento radicular (Massot et al., 2002; Sun et al., 2007). A maioria dos estudos envolvendo etileno e Al foi realizado em dicotiledôneas como feijão, *Arabidopsis thaliana* e *Lotus japonicus*, mas em monocotiledôneas, apenas em milho. Em um destes trabalhos, Gunsé et al. (2000), utilizando as variedades de milho ATP SR Yellow e HS 701B expostas ao Al, observaram redução do alongamento radicular, mas nenhum efeito sobre a produção de etileno, após 4 e 24 horas. Em folhas de milho da variedade XL-72.3, por outro lado, o Al estimulou a produção de etileno e inibiu o alongamento da lâmina foliar (Lidon et al., 1995). Novos estudos, portanto, são necessários para verificar se o Al estimula produção de etileno e se este hormônio estaria envolvido com a inibição do alongamento radicular em raízes de milho.

O objetivo deste estudo foi avaliar a produção de etileno e a atividade de enzimas do metabolismo deste hormônio e verificar o seu possível envolvimento na inibição do alongamento radicular em ápices da raiz principal de dois genótipos milho, na presença de alumínio.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Nos experimentos foram utilizados dois genótipos de milho (*Zea mays* L.) com tolerância diferencial ao Al: um tolerante (UFVM 200) e outro sensível (UFVM 100), fornecidos pelo Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, MG.

As sementes foram selecionadas quanto ao tamanho e forma, tratadas com ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) concentrado por 1 min, lavadas em água corrente e em água desmineralizada. As sementes foram colocadas para germinar em cartuchos de papel “germiteste”, mergulhados em solução de  $CaCl_2$  0,5 mM, pH 4,0, sob aeração contínua. Cinco dias após a semeadura, as plântulas foram selecionadas quanto à uniformidade de tamanho e forma, e transplantadas para recipientes de polietileno contendo  $CaCl_2$  0,5 mM, pH 4,0, e submetidas aos tratamentos com Al nas concentrações de 0 e 100  $\mu M$ , na forma de  $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ .

Durante toda a fase de obtenção das plântulas e aplicação dos tratamentos elas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada ( $25 \pm 3^\circ C$ ), sob irradiância de  $230 \mu mol m^{-2} s^{-1}$  e fotoperíodo de 16 h.

### 2.2. AVALIAÇÃO DO ALONGAMENTO RADICULAR

Cinco dias após a semeadura, as plântulas foram selecionadas quanto à uniformidade de tamanho e forma e transplantadas, em número de quatro, para vasos de polietileno, contendo 1,0 L de solução de  $CaCl_2$  0,5 mM, pH 4,0. Então, foram submetidas aos tratamentos com Al nas concentrações de 0 e 100  $\mu M$ , na forma de  $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ , durante 24 horas. Imediatamente antes da introdução das plantas nas soluções de tratamento e após 24 h de tratamento com Al, foi determinado o comprimento da raiz principal. Pela diferença entre as medições obteve-se o alongamento radicular para o período de 24 h. Com estes dados foi calculado o alongamento radicular (% do controle):

$$AR (\% \text{ controle}) = (Alongamento Al_t / Alongamento Al_0) \times 100$$

em que:

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

$Al_0$  = Alongamento da raiz primária de plântulas controle (sem tratamento com Al)

$Al_t$  = Alongamento da raiz primária de plântulas submetidas ao tratamento com Al

### **2.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ALUMÍNIO SOBRE A PRODUÇÃO DE ETILENO EM ÁPICES RAIZ PRINCIPAL**

Neste ensaio, vinte plântulas obtidas conforme item 2.1, foram transferidas para recipientes de polietileno, contendo 6,5 L de solução de  $CaCl_2$  0,5 mM, pH 4,0, e submetidas aos tratamentos com Al 0 e 100  $\mu$ M, aplicados na forma de  $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ . Após 24 horas, as plântulas foram retiradas e seccionados os ápices da raiz principal, de aproximadamente 1 cm, para quantificação de etileno. Vinte ápices radiculares foram colocados em recipientes de vidro de 9,5 mL, forrados internamente com papel filtro umedecido com solução de  $CaCl_2$  0,5 mM, pH 4,0 (Eliasson et al., 1989, Massot et al., 2002). Os frascos foram hermeticamente fechados e armazenados no escuro por um período de 2 h. Amostras de 1,0 mL da atmosfera interna dos frascos foram retiradas com uma seringa cromatográfica “gas tight” e injetadas em cromatógrafo a gás Shimadzu GC-2014, com coluna capilar de sílica fundida (Carboxen-1006 Plot; 30 m x 0,32 mm) e equipado com detector de ionização de chama. O fluxo do gás de arraste (nitrogênio ultrapuro) foi de 42 mL  $min^{-1}$  e as temperaturas do injetor, da coluna e do detector foram 180, 100 e 200 °C, respectivamente.

### **2.4. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ALUMÍNIO SOBRE A ATIVIDADE DE ENZIMAS DO METABOLISMO DE ETILENO**

Para determinação da atividade da ACO e ACS trinta plântulas obtidas conforme item 2.1, foram transferidas para recipientes de polietileno, contendo 6,5 L de solução de  $CaCl_2$  0,5 mM, pH 4,0, e submetidas aos tratamentos com Al 0 e 100  $\mu$ M, aplicados na forma de  $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ . Após 24 horas, as plântulas foram retiradas, o sistema

radicular lavado e, então, foram seccionados ápices radiculares da raiz principal, de aproximadamente 1 cm, para análise enzimática.

#### *2.4.1. Determinação da atividade da oxidase do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACO, EC 1.14.17.4)*

Os extratos enzimáticos foram obtidos pela maceração de aproximadamente 0,2 g de ápices radiculares em N<sub>2</sub> líquido e, então, adicionados 0,5 mL de meio de homogeneização, constituído de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,2, glicerol 10 % (v/v), ascorbato de sódio 30 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 5% (p/v) (Fernández-Maculet e Yang, 1992). O homogeneizado, depois de filtrado em quatro camadas de gaze, foi centrifugado a 28.000 g, por 20 min, a 4°C e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático bruto.

A atividade da ACO foi determinada pela adição de 0,2 mL do extrato bruto a 2,0 mL de um meio de reação constituído de Tris-HCl 0,1 M, pH 7,0, glicerol 10 % (v/v), ascorbato de sódio 30 mM, FeSO<sub>4</sub> 50 µM e ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) 1 mM (Fernández-Maculet e Yang, 1992), em tubos “tipo penicilina” hermeticamente fechados. Após incubação a 30°C por 1 h, amostra de 1,0 mL do gás da atmosfera interna do tubo foi retirada e o etileno produzido foi quantificado por cromatografia gasosa, conforme descrito em 2.3.

#### *2.4.2. Determinação da atividade da sintase do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACS, EC 4.4.1.14)*

Os extratos enzimáticos foram obtidos pela maceração de aproximadamente 0,2 g de ápices radiculares em N<sub>2</sub> líquido e, seguida, adicionou-se 0,5 mL de meio de homogeneização constituído de tampão de Hepes (sal sódico do ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etanosulfônico) 100 mM, pH 8,5, contendo DL-ditiotreitol (DTT) 5 mM, piridoxal fosfato 5 µM e fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 500 µM e polivinilpirrolidona (PVPP) 2 % (p/v) (Moeder et al., 2002). O homogeneizado, depois de filtrado em quatro camadas de gaze, foi centrifugado a 12.000 g por 20 minutos, a 4° C, e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático.

A atividade da ACS foi determinada pela adição 0,2 mL do extrato bruto a 0,3 mL de um meio de reação constituído de tampão de Hepes 80 mM, pH 8,5, piridoxal fosfato 20  $\mu$ M e adenosil metionina (Ado-Met) 100  $\mu$ M em tubos hermeticamente fechados (Moeder et al., 2002). Após incubação a 30° C, por 2 h, a reação foi paralisada pela adição de 100  $\mu$ L de HgCl<sub>2</sub> 10 mM. Amostra de 1,0 mL da atmosfera interna dos frascos foi retirada e o etileno liberado foi analisado por cromatografia gasosa, conforme descrito em 2.3.

## **2.5. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ALUMÍNIO E DA APLICAÇÃO DE ETILENO EXÓGENO SOBRE O ALONGAMENTO RADICULAR**

Plântulas de milho de 5 dias de idade, obtidas e selecionadas conforme 3.1, foram transplantadas em número de quatro para vasos de 1 L e submetidas aos seguintes tratamentos em solução de CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM, pH 4,0: 1) controle; 2) Al 100  $\mu$ M; 3) etrel 100  $\mu$ M; 4) ACC 100  $\mu$ M. Após 24 horas de aplicação dos tratamentos, o alongamento radicular foi avaliado, conforme mencionado em 2.2.

## **2.6. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ALUMÍNIO E DE INIBIDORES DA SÍNTESE E DA AÇÃO DE ETILENO**

Plântulas de milho de 5 dias de idade, obtidas e selecionadas conforme 2.1, foram transplantadas em número de quatro para vasos de 1 L e submetidas aos seguintes tratamentos em solução de CaCl<sub>2</sub> 0,5mM, pH 4,0: 1) controle; 2) Al 100  $\mu$ M; 3) Al 100  $\mu$ M + ácido aminooxiacético (AOA) 100  $\mu$ M; 4) Al 100  $\mu$ M + cloreto de cobalto (CoCl<sub>2</sub>) 100  $\mu$ M; 5) Al 100  $\mu$ M + tiosulfato de prata (Ag (S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)<sub>2</sub><sup>3-</sup>) 100  $\mu$ M. O experimento foi encerrado após 24 horas e o alongamento radicular avaliado, conforme mencionado em 2.2.

## **2.7. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS**

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

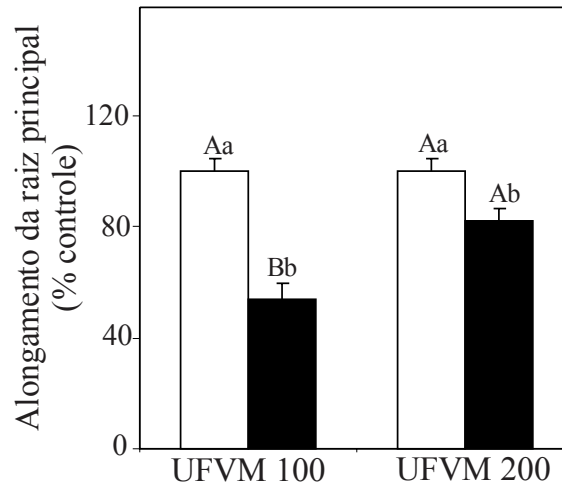
## 2.8. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os tratamentos foram dispostos no delineamento de blocos casualizados, em esquema fatorial (2x2x3): dois genótipos de milho (UFVM 100 e UFVM 200), dois níveis de Al (0 e 100  $\mu\text{M}$ ), com três repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias, comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. O efeito do Al sobre o alongamento radicular foi montado em esquema fatorial (2x4x4): dois genótipos de milho (UFVM 100 e UFVM 200), quatro níveis de Al (0, 25, 50 e 100  $\mu\text{M}$ ), com quatro repetições. Os testes com inibidores da síntese e da ação de etileno foram montados em esquema fatorial (2x5x4): dois genótipos de milho (UFVM 100 e UFVM 200), 5 tratamentos (controle, + Al, Al + AOA, Al +  $\text{CoCl}_2$ , Al +  $(\text{Ag}(\text{S}_2\text{O}_3)_2)^{3-}$ ), com quatro repetições. O efeito do alumínio e da aplicação de etileno exógeno sobre o crescimento radicular foi montado em esquema fatorial (2x4x4): dois genótipos de milho (UFVM 100 e UFVM 200), 4 tratamentos (controle, + Al, + etrel, + ACC), com quatro repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias, comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico “SAEG”, da Fundação Arthur Bernardes, da Universidade Federal de Viçosa, versão 9.0.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. EFEITO DO ALUMÍNIO NO ALONGAMENTO RADICULAR

O Al reduziu o alongamento da raiz principal, expresso como porcentagem do controle, dos dois genótipos após 24 horas de exposição (Figura 1). A redução no alongamento radicular no genótipo UFVM 100 foi maior que no genótipo UFVM 200, chegando a um valor 34,8% maior na concentração de Al de 100  $\mu$ M. As inibições do alongamento radicular foram de 46 % e 18 % na concentração de 100  $\mu$ M nos genótipos UFVM 100 e UFVM 200, respectivamente.



**Figura 1** - Efeito do Al sobre o alongamento da raiz principal de dois genótipos de milho tratados com  $\square$  0 e  $\blacksquare$  100  $\mu$ M de Al, durante 24 horas.

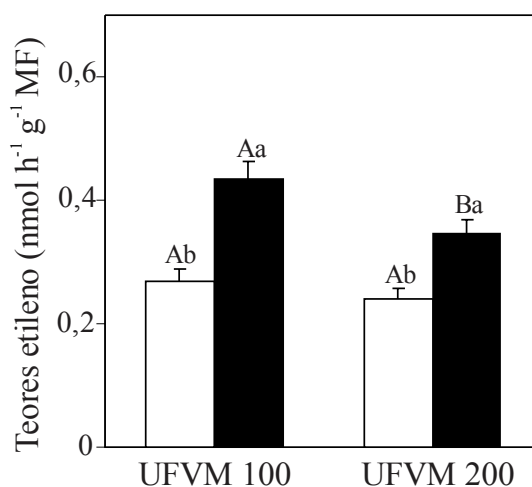
Médias seguidas pelas mesmas letras, maiúsculas entre os genótipos e minúsculas entre níveis de Al, não diferem estatisticamente, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

#### 3.2. EFEITO DO ALUMÍNIO SOBRE A PRODUÇÃO DE ETILENO EM ÁPICES RADICULARES

Os ápices radiculares das plantas-controle dos dois genótipos milho apresentaram essencialmente a mesma produção de etileno (Figura 1). O tratamento com Al aumentou a produção de etileno nos ápices radiculares em cerca de 59 % e 45% nos genótipos UFVM 100 e UFVM 200, respectivamente. Nas plantas tratadas com Al,



a produção de etileno pelo genótipo UFVM 100 foi cerca de 25 % mais elevada que no UFVM 200.

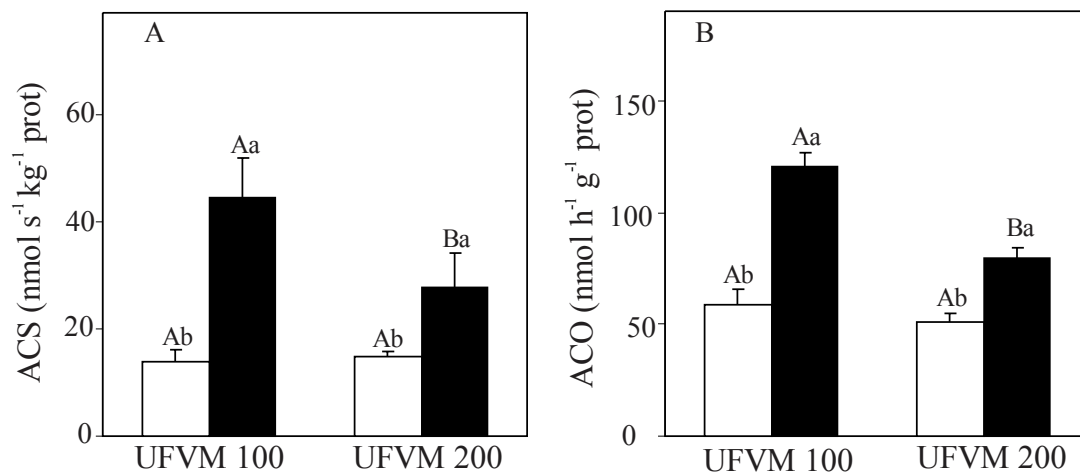


**Figura 2** - Efeito do Al sobre a produção de etileno em ápices da raiz principal em dois genótipos de milho tratados com □ 0 e ■ 100 μM de Al, durante 24 horas.

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

### 3.3. EFEITO DO ALUMÍNIO SOBRE A ATIVIDADE DE ENZIMAS DE SÍNTESE DO ETILENO

Na ausência de Al, a atividade da ACS foi similar em ápices radiculares dos dois genótipos de milho (Figura 3A). O tratamento com Al aumentou a atividade da ACS em cerca de 218 % e de 85,3 % nos ápices radiculares dos genótipos UFVM 100 e UFVM 200, respectivamente. Na presença de Al, a atividade da ACS no genótipo UFVM 100 foi 61 % mais elevada que no genótipo UFVM 200.



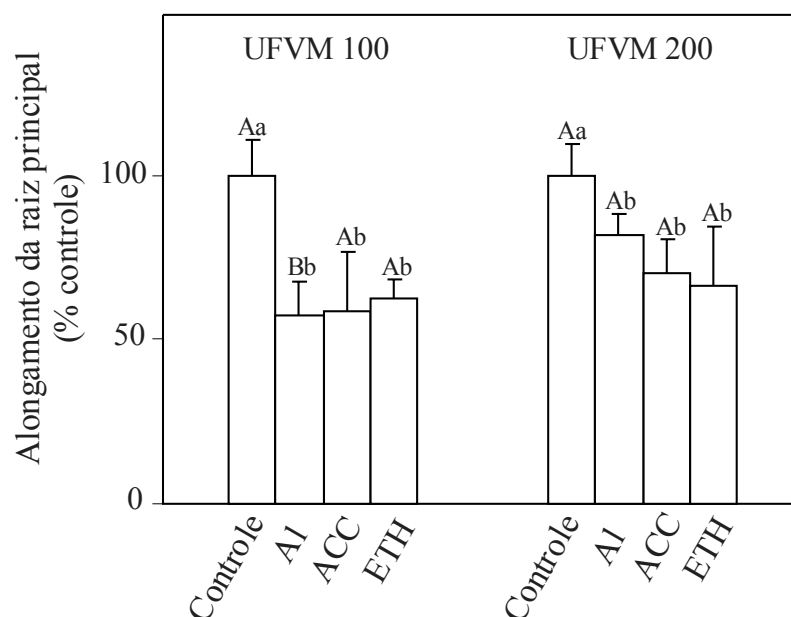
**Figura 3** - Efeito do Al sobre as atividades das (A) ACS e (B) ACO em ápices da raiz principal de dois genótipos de milho tratados com □ 0 e ■ 100 μM de Al, durante 24 horas.

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

Na ausência de Al, a atividade da oxidase do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACO) foi similar nos ápices radiculares dos dois genótipos de milho (Figura 3B). O tratamento com Al aumentou a atividade enzimática em 104 % e de 56 % nos genótipos UFVM 100 e UFVM 200, respectivamente. Na presença de Al, a atividade da ACO no genótipo UFVM 100 foi 51 % mais elevada que no genótipo UFVM 200.

### 3.4. EFEITO DO ALUMÍNIO E DA APLICAÇÃO EXÓGENA DE ETILENO NO ALONGAMENTO RADICULAR

O Al inibiu o alongamento da raiz principal, em aproximadamente, 43 % e 18 % nos genótipos UFVM 100 e UFVM 200, respectivamente. Os tratamentos com ACC e etrel inibiram significativamente o alongamento radicular em cerca de 41 % e 37 % no genótipo UFVM 100 e 30 % e 34 % no genótipo UFVM 200, respectivamente. Os efeitos de ACC e ETH sobre o alongamento radicular foram similares nos dois genótipos de milho.

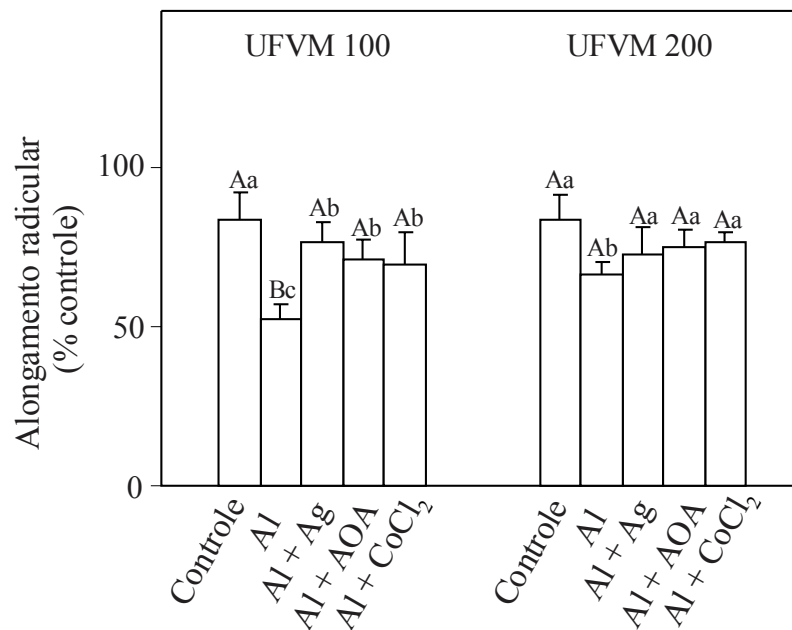


**Figura 4** - Efeito do ácido-1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) e etrel (ETH) no alongamento da raiz principal de genótipos de milho tratados com 0 e 100  $\mu\text{M}$  de Al, durante 24 horas.

Médias seguidas pelas mesmas letras, maiúsculas entre os genótipos e minúsculas entre os tratamentos, não diferem estatisticamente, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

### 3.5. EFEITO DE INIBIDORES DA SÍNTESE E DA AÇÃO DE ETILENO NO ALONGAMENTO RADICULAR

A aplicação de inibidores da síntese AOA (inibidor da ACS) e  $\text{CoCl}_2$  (inibidor da ACO); e da ação de etileno Ag (inibidor da percepção de etileno) à solução nutritiva recuperou o alongamento da raiz principal nos dois genótipos (Figura 4). O Al inibiu o alongamento radicular em aproximadamente 38 % no genótipo UFVM 100, por outro lado, o tratamento de Al + inibidores causou menor inibição: 8,7 % com Ag, 15 % com AOA e 17 % com  $\text{CoCl}_2$ , em relação ao controle. No genótipo UFVM 200, a recuperação do alongamento radicular não diferenciou significativamente em relação ao controle. O tratamento das plântulas com Al inibiu o alongamento radicular em 20 % enquanto no tratamento com inibidores foi aproximadamente: 12 % Ag, 10 % AOA e 8%  $\text{CoCl}_2$ , em relação ao controle.



**Figura 5** - Efeito de ácido aminooxiacético (AOA), cloreto de cobalto (CoCl<sub>2</sub>) e tiosulfato de prata (Ag) no alongamento da raiz principal de genótipos de milho tratados com 0 e 100 μM de Al, durante 24 horas

Médias seguidas pelas mesmas letras, maiúsculas entre os genótipos e minúsculas entre os tratamentos, não diferem estatisticamente, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

#### 4. DISCUSSÃO

O Al, após ser absorvido, acumula-se preferencialmente no ápice da raiz, especialmente na região da zona de transição e, a partir daí, desencadeia uma série de efeitos (Horst et al., 2010). Um dos efeitos mais precoces da toxicidade do Al é a inibição do alongamento radicular observado poucos minutos após exposição a este íon (Panda, 2007; Horst et al., 2010).

Semelhante ao Al, o etileno é reconhecido por causar inibição do crescimento da raiz (Ruzicka et al., 2007; Dugardeyn e Straeten, 2008). Le et al. (2001) mostraram que a aplicação do precursor de etileno ácido-1-amino-ciclopropano-1-carboxílico (ACC) inibe o alongamento de células da raiz de *Arabidopsis thaliana* dentro de minutos. De modo semelhante, Cnodder et al. (2005) também verificaram inibição do alongamento de células da raiz em *Arabidopsis thaliana* com a aplicação de ACC, ao passo que o inibidor da síntese de etileno 2-aminoetoxivinilglicina (AVG) resultou em alongamento superior ao do controle. Esta característica assemelha-se com a rápida inibição do alongamento radicular causada pelo alumínio (Horst et al., 2010). Na literatura, há indicações de que a inibição do alongamento radicular pelo Al é mediada pela produção de etileno, como verificado em plantas de feijão (Massot et al., 2002), *Lotus japonicus* (Sun et al., 2007) e *Arabidopsis thaliana* (Sun et al., 2010).

O tratamento com Al inibiu o alongamento radicular dos genótipos de milho com maior intensidade no genótipo UFVM 100 (Figura 1). Além desta inibição, o tratamento das plântulas de milho com Al resultou em aumento na produção de etileno nos dois genótipos, especialmente no genótipo UFVM 100 que após 24 h foi duas vezes maior do que no controle. De modo similar, foi verificado em raízes de *Lotus japonicus* expostas a 50  $\mu\text{M}$  de Al aumento na produção de etileno num período de 24 horas com um pico após 30 min de exposição (Sun et al., 2007). Ao final do período experimental, estabilizou-se a produção deste hormônio atingindo, neste ponto, uma concentração igual a duas vezes o valor do controle.

Experimentos como os descrito acima têm procurado estabelecer uma relação entre a produção de etileno e os efeitos tóxicos do Al, principalmente, num efeito comum entre eles, que resulte na redução do alongamento radicular (Sun et al., 2007).

Tentando correlacionar estes dois processos, foi verificado que o Al também estimulou a produção de etileno em raízes de feijão (Massot et al., 2002), *Arabidopsis thaliana* (Sun et al., 2010) e na lâmina foliar de milho variedade XL-72.3 (Lindon et al., 1995). No entanto, nas variedades de milho ATP SR Yellow e HS 701B não houve efeito do Al sobre a produção de etileno, apesar da inibição do alongamento radicular (Gunsé et al., 2000).

Neste estudo, o tratamento das plântulas de milho com Al resultou em aumento na produção de etileno nos dois genótipos de milho e em inibição no alongamento radicular. No genótipo UFVM 100, considerado mais sensível ao Al, a inibição do alongamento radicular foi maior e a produção de etileno maior do que no genótipo UFVM 200, considerado mais tolerante ao Al (Figura 2). Os coeficientes de correlação entre alongamento radicular e teores de etileno foram de -0,97 e -0,90, para os genótipos UFVM 100 e UFVM 200, respectivamente, sugerindo que a redução no alongamento radicular pode ser o resultado da produção de etileno, induzida por níveis tóxicos de Al.

As atividades de duas enzimas relacionadas com a biossíntese do etileno aumentaram com o tratamento das plantas com Al, principalmente no genótipo UFVM 100. Em plântulas de *Lotus japonicus* também foi observado aumento na atividade da ACO e na expressão de genes de ACO e ACS (Sun et al., 2007). Para estes autores, a expressão gênica destas duas enzimas e o aumento da atividade de ACO induzidos por níveis elevados de Al podem ser os responsáveis pelo aumento na produção de etileno rápida e precocemente. A sintase do ACC (ACS) é uma enzima que catalisa a conversão do S-AdoMet a ACC, enquanto, a oxidase do ACC (ACO) oxida ACC a etileno e, portanto, aumentam a biossíntese de etileno (Tian e Lu, 2006). No genótipo UFVM 100, o aumento na produção de etileno e na atividade das duas enzimas foram maiores que no genótipo UFVM 200. Nas plantas tratadas com Al, os coeficientes de correlação entre o teor de etileno e a atividade da ACS foram de 0,99 e 0,77; e entre o teor de etileno e a atividade da ACO foram de 0,95 e 0,84 para os genótipos UFVM 100 e UFVM 200, respectivamente. Estes resultados indicam que o Al estimula estas duas enzimas, cuja ação resulta na produção de etileno, causando redução no alongamento radicular.

Vários tipos de estresse abiótico podem estimular a produção de etileno, como ozônio (He et al., 2011), estresse hídrico (Manavella et al., 2006), estresse por metais

pesados (Rodríguez-Serrano et al., 2006) e estresse por Al (Sun et al., 2010). Não se sabe até o momento se a produção de etileno sob estresse abiótico é estimulada pela peroxidação de lipídios ou pela ativação de enzimas como a ACS e, ou ACO (Sun et al., 2007). A exposição dos genótipos de milho UFVM 100 e UFVM 200 a 100  $\mu\text{M}$  de Al, por 24 h, não aumentou a peroxidação de lipídios (Capítulo 1, Figura 5). No entanto, estimulou a produção de etileno, indicando que, pelo menos para estes genótipos e para a intensidade de estresse aplicada, a peroxidação de lipídios parece não estar ligada ao estímulo à produção de etileno conforme se observou neste experimento. Por outro lado, ao aumentar as atividades das duas enzimas (Figura 3) fica evidente o modo de ação do Al nestas plantas. Os resultados sugerem que o Al, em níveis tóxicos, provoca aumento na atividade destas enzimas, que estimula a biossíntese do etileno, resultando na inibição do alongamento radicular.

Esta hipótese é suportada por dados da literatura que demonstram ser a produção de etileno desencadeada após a ativação das enzimas ACO e ACS sob condições de estresse (Kim et al., 2003; Liu e Zhang, 2004). A ACS catalisa a etapa limitante e regulatória da produção de etileno. Geralmente, sob condições normais, os níveis de atividade desta enzima nas plantas são baixos, mas são rapidamente aumentados sob condições de estresse (Liu e Zhang, 2004). A etapa catalisada pela ACO, por outro lado, não é considerada limitante, pois está presente constitutivamente na maioria dos tecidos vegetais (Kim et al., 2003).

A aplicação exógena de etileno, na forma de etrel e, ou do precursor da biossíntese de etileno (ACC) à solução de crescimento, inibiu o alongamento radicular nos dois genótipos de milho. De modo similar, Sun et al. (2007) aplicaram etrel e ACC à solução de crescimento verificando, também, inibição do alongamento radicular em plântulas de *Lotus japonicus* em intensidade similar ao observado em plântulas tratadas unicamente com alumínio. Apesar de o genótipo UFVM 200 ter apresentado menor produção de etileno (Figura 2) e ter causado menor inibição no alongamento radicular na presença de Al (Figura 4) que o genótipo UFVM 100, a aplicação exógena de etileno ou de um de seus precursores (ACC) à solução de crescimento resultou em inibição do alongamento radicular. Esta inibição foi similar nos dois genótipos e estatisticamente igual àquela observada na presença de alumínio (Figura 4). Isto sugere que no genótipo UFVM 200, as enzimas ACO e ACS são menos ativadas pelo Al do que no genótipo UFVM 100, uma vez que, quando o etileno está presente na mesma concentração no

tecido radicular, fornecido por fontes externas, são eliminadas as diferenças de tolerância entre os genótipos.

A aplicação de inibidores ao meio de cultivo como o AOA e  $\text{CoCl}_2$  (inibidores da ACS e da ACO, respectivamente) e do tiosulfato de prata (Ag) (inibidor da percepção de etileno no receptor específico na superfície da membrana do retículo endoplasmático) (Ciardi e Klee, 2001; Chen et al., 2007) eliminou a inibição do alongamento radicular induzida pelo Al, nos dois genótipos de milho (Figura 5). Em plântulas de *Lotus japonicus* (Sun et al., 2007) e de *Arabidopsis thaliana* (Sun et al., 2010) foram encontrados resultados similares aos aqui obtidos. O uso de inibidores da síntese e da ação de etileno também reduziu os efeitos tóxicos de ozônio em tomate (Tuomainen et al. 1997; Moeder et al., 2002). Estes resultados indicam que em condições de estresse há produção de etileno, mas sua percepção também se faz necessária para exercer seus efeitos tóxicos e inibir o alongamento radicular.

Os resultados aqui obtidos sugerem que a inibição do alongamento radicular induzida por Al ocorre via interferência em certas etapas da síntese e, ou de sinalização do etileno. O Al estimula a atividade das enzimas envolvidas na biossíntese do etileno e os receptores envolvidos na percepção deste hormônio, desencadeando uma série de reações que culmina na resposta fisiológica, a inibição do alongamento radicular. A tolerância diferencial dos genótipos de milho parece estar associada com a maior atividade de enzimas de síntese de etileno estimuladas por este cátion.



## 5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

- 1) O Al e o etileno inibem o alongamento radicular dos dois genótipos de milho, com maior intensidade no genótipo UFVM 100, considerado sensível ao Al.
- 2) A inibição do alongamento radicular induzida por Al em milho é mediada por mecanismo de sinalização envolvendo a síntese e a percepção do etileno.
- 3) As diferenças de respostas dos dois genótipos estudados às concentrações tóxicas de Al é resultado da maior atividade de enzimas da síntese de etileno estimuladas por este cátion.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHN, S-J; MATSUMOTO, H. The role of the plasma membrane in the response of plant roots to aluminum toxicity. *Plant Signaling e Behavior*, 1: 37-45, 2006.
- BLANCAFLOR, E. B.; JONES, D. L.; GILROY, S. Alterations in the cytoskeleton accompany aluminum-induced growth inhibition and morphological changes in primary roots of maize. *Plant Physiology*, 118: 159-172, 1998.
- CHEN, Y-C; SHAKEEL, S. N.; BOWERS, J.; ZHAO, X-C; ETHERIDGE, N.; SCHALLER, G. E. Ligand-induced degradation of the ethylene receptor ETR2 through a proteasome-dependent pathway in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 282: 24752-24758, 2007.
- CIARDI, J.; KLEE, H. Regulation of ethylene-mediated responses at the level of the receptor. *Annals of Botany*, 88: 813-822, 2001.
- CNODDER, T.; VISSENBERG, K.; STRAETEN, V. D.; VERBELEN, J. P. Regulation of cell length in the *Arabidopsis thaliana* root by the ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid: a matter of apoplastic reactions. *New Phytologist*, 168: 541-550, 2005.
- DUGARDEYN, J.; STRAETEN, V. D. Ethylene: fine-tuning plant growth and development by stimulation and inhibition of elongation. *Plant Science*, 175: 59-70, 2008.
- ELIASSON, L.; BERTELL, G.; BOLANDER, E. Inhibitory action of auxin on root elongation not mediated by ethylene. *Plant Physiology*, 91: 310-314, 1989.
- FERNÁNDEZ-MACULET, J. C.; YANG, S. F. Extraction and partial characterization of the ethylene-forming enzyme from apple fruit. *Plant Physiology*, 99: 751-754, 1992.
- FIORANI, F.; BOGEMANN, G. M.; VISSER, E. J. W.; LAMBERS, H.; VOESENEK, L. A. C. J. Ethylene emission and responsiveness to applied ethylene vary among *Poa* species that inherently differ in leaf elongation rates. *Plant Physiology*, 129: 1382-1390, 2002.
- GUNSE, B.; POSCHENRIEDER, C.; BARCELÓ, J. The role of ethylene metabolism in the short-term responses to aluminum by roots of two maize cultivars different in Al-resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 43: 73-81, 2000.
- HORST, W. J.; WANG, Y.; ETICHA, D. The role of the root apoplast in aluminum-induced inhibition of root elongation and in aluminum resistance of plants: a review. *Annals of Botany*, 106: 185-197, 2010.
- KHAN, M. S. H.; TAWARAYA, K.; SEKIMOTO, H.; KOYAMA, H.; KOBAYASHI, Y.; MURAYAMA, T.; CHUBA, M.; KAMBAYASHI, M.; SHIONO, Y.;

- UEMURA, M.; ISHIKAWA, S.; WAGATSUMA, T. Relative abundance of  $\Delta^5$  – sterols in plasma membrane lipids of root-tip cells correlates with aluminum tolerance of rice. *Physiologia Plantarum*, 135: 73-83, 2009.
- KIM, C. Y.; LIU, Y.; THORNE, E. T.; YANG, H.; FUKUSHIGE, H.; GRASSMANN, W.; HILDEBRAND, D.; SHARP, R. E.; ZHANG, S. Activation of a stress-responsive mitogen-activated protein kinase cascade induces the biosynthesis of ethylene in plants. *The Plant Cell*, 15: 2707-2718, 2003.
- 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.
- JONES, D. L.; BLANCAFLOR, E. B.; KOCHIAN, L. V.; GILROY, S. Spatial coordination of aluminum uptake, production of reactive oxygen species, callose production and wall rigidification in maize roots. *Plant, Cell and Environment*, 29: 1309-1318, 2006.
- LE, J.; VANDENBUSSCHE, F.; STRAETEN, D. V. D.; VERBELEN, J-P. In the early response of Arabidopsis roots to ethylene, cell elongation is up and down regulated and uncoupled from differentiation. *Plant Physiology*, 125: 519-522, 2001.
- LESHEM, Y. Y.; PINCHASON, Y. Non-invasive photoacoustic spectroscopic determination of relative endogenous nitric oxide and ethylene content stoichiometry during the ripening of strawberries *Fragaria ananassa* (Duch.) and avocados *Persea Americana* (Mill.). *Journal of Experimental Botany*, 51: 1471-1473, 2000.
- LIDON, F. C.; BARREIRO, M. G.; HENRIQUES, F. S. Al excess mediated effects on biomass production and ethylene synthesis in maize leaves. *Acta Botanica Hungarica*, 39: 369-375, 1995
- LIU, Y.; ZHANG, S. Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 16: 3386-3399, 2004.
- 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. Syndrome of aluminum toxicity and diversity of aluminum resistance in higher plants. *International Review of Cytology*, 264: 225-253, 2007.
- MANAVELLA, P. A.; ARCEL, A. L.; DEZAR, C. A.; BITTON, F.; RENO, J-P; CRESPI, M.; CHAN, R. L. Cross-talk between ethylene and drought signaling pathways is mediated by the sunflower Hahb-4 transcription factor. *The Plant Journal*, 48: 125–137, 2006.
- MASSOT, N.; NICANDER, B.; BARCELÓ, J. POSCHENRIEDER, CH.; TILBERG, E. A rapid increase in cytokinin levels and enhanced ethylene evolution precede

- Al<sup>3+</sup>-induced inhibition of root growth in bean seedlings (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Growth Regulation*, 37: 105-112, 2002.
- MENG-CHEN, L.; WEI-HONG, S.; SHUA-HUA, Z.; JIE, Z. Effects of nitric oxide and exogenous ethylene treatments on ethylene biosynthesis in Feicheng peach. *Agricultural Sciences in China*, 6: 290-295, 2007.
- MOEDER, W.; BARRY, C. S.; TAURIAINEN, A. A.; BETZ, C.; TUOMAINEN, J.; UTRIAINEN, M.; GRIERSON, D.; SANDERMANN, H.; LANGEBARTELS, C.; KANGASJÄRVI, J. Ethylene synthesis regulated by biphasic induction of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase genes is required for hydrogen peroxide accumulation and cell death in ozone-exposed tomato. *Plant Physiology*, 130: 1918-1926, 2002.
- PANDA, S. K. Molecular physiology of aluminum toxicity and tolerance in plants. *The Botanical Review*, 73: 326-347, 2007.
- PIERIK, R.; THOLEN, D.; POORTER, H.; VISSER, E. J. W.; VOESENEK, L. A. C. J. The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. *Trends in Plant Science*, 11: 176-183, 2006.
- RANGEL, A. F.; RAO, I. M.; HORST, W. J. Spatial aluminum sensitivity of root apices of two common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes with contrasting aluminum resistance. *Journal of Experimental Botany*, 58: 3895-3904, 2007.
- RENGEL, Z.; ZHANG, W-H. Role of dynamics of intracellular calcium in aluminum-toxicity syndrome. *New Phytologist*, 159: 295-314, 2003.
- RYAN, P. R.; DITOMASO, J. M.; KOCHIAN, L. V. Aluminum toxicity in roots: an investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. *Journal of Experimental Botany*, 44: 437-446, 1993.
- RODRIGUEZ-SERRANO, M.; ROMERO-PUERTAS, M. C.; PAZMINO, D. M.; TESTILLANO, P. S.; RISUENO, M. C.; Del RIO, L. A.; SANDALIO, L. M. Cellular response of pea plants to cadmium toxicity: cross talk between reactive oxygen species, nitric oxide and calcium. *Plant Physiology*, 150: 229-243, 2009.
- RUZICKA, K.; LJUNG, K.; VANNESTE, S.; PODHORSKÁ, R.; BEECKMAN, T.; FRIML, J.; BENKOVÁ, E. Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution. *The Plant Cell*, 19: 2197-2212, 2007.
- SIVAGURU, M.; HORST, W. J. The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize. *Plant Physiology*, 116: 155-163, 1998.
- STEPANOVA, A. N.; HOYT, J. M.; HAMILTON, A. A.; ALONSO, J. M. A link between ethylene and auxin uncovered by the characterization of two root-specific ethylene-insensitive mutants in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 17: 2230-2242, 2005.

- SUN, P.; TIAN, Q-Y.; ZHAO, M-G.; DAI, X-Y.; HUANG, J-H.; LI, L-H.; ZHANG, W-H. Aluminum-induced ethylene production is associated with inhibition of root elongation in *Lotus japonicus* L. *Plant Cell Physiology*, 48: 1229-1235, 2007.
- SUN, P.; TIAN, Q-Y.; CHEN, J.; ZHANG, W-H. Aluminum-induced inhibition of root elongation in *Arabidopsis* is mediated by ethylene and auxin. *Journal of Experimental Botany*, 61: 347-356, 2010.
- TIAN, Q-T; SUN, D-H; ZHAO, M-G; ZHANG, W-H. Inhibition of nitric oxide synthase (NOS) underlies aluminum-induced inhibition of root elongation in *Hibiscus moscheutos*. *New Phytologist*, 174: 322-331, 2007.
- TIAN, Y.; LU, X. Y. The molecular mechanism of ethylene signal transduction. *South African Journal of Botany*, 72: 487-491, 2006.
- TUOOMAINEN, J.; BETZ, C.; KANGASJARVI, J.; ERNST, D.; YIN, Z-H.; LANGEBARTELS, C.; SANDERMANN JR, H. Ozone induction of ethylene emission in tomato plants: regulation by differential accumulation of transcripts for the biosynthetic enzymes. *The Plant Journal*, 12: 1151-1162, 1997.
- WANG, K. L. C.; LI, W.; ECKER, J. R. Ethylene biosynthesis and signaling networks. *The Plant Cell*, 14: 131-151, 2002.

## CAPÍTULO II

### PRODUÇÃO DE INTERMEDIÁRIOS REATIVOS DE OXIGÊNIO E INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO RADICULAR EM DOIS GENÓTIPOS DE MILHO, NA PRESENÇA DE ALUMÍNIO

#### RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a relação entre a produção de ROIs, a atividade de enzimas antioxidativas e a inibição do crescimento radicular causada por Al nos genótipos de milho UFVM 100 (sensível) e UFVM 200 (tolerante) submetidos aos tratamentos com 0 e 100  $\mu\text{M}$  de Al, durante 24 horas. Em ápices da raiz principal do genótipo UFVM 100, o Al aumentou os teores de ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), a atividade da superóxido dismutase (SOD) e da peroxidase (POX), reduziu os teores de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), mas não modificou a atividade da catalase (CAT) e da peroxidase do ascorbato (APX). O Al também aumentou a atividade das enzimas produtoras de ROIs no apoplasto: oxidase da diamina (DAO), oxidase do NADPH (NOX) e peroxidase do NADH (NADH-POX). O tratamento com os inibidores difenileno iodônio (DPI, inibidor da NOX), azida sódica ( $\text{NaN}_3$ , inibidor de peroxidases) e 2-hidroxiethylhidrazina (HEH, inibidor da DAO) recuperou o efeito do Al apenas com  $\text{NaN}_3$  e a combinação dos inibidores: DPI +  $\text{NaN}_3$  + HEH no genótipo UFVM 100. O genótipo UFVM 200, por outro lado, não sofreu modificações significativas em nenhuma das análises mencionadas acima. O aumento na atividade das enzimas DAO, NOX e NADH-POX, mesmo que indiretamente, sugere aumento no teor de ROIs no apoplasto, quando as plantas foram submetidas ao tratamento com Al. O acúmulo destes ROIs, por sua vez, pode ativar peroxidases ligadas à parede celular que, ao removê-los, pode causar enrijecimento da parede celular e inibição do alongamento radicular. Prova disto foi a recuperação dos efeitos do Al no alongamento radicular com inibidores das enzimas produtoras de ROIs. O genótipo UFVM 200, por outro lado, não sofreu estresse oxidativo provavelmente associado com algum mecanismo de tolerância ao Al. Estes resultados sugerem relação entre o acúmulo de ROIs no apoplasto e a inibição do alongamento radicular causada pelo alumínio.

**Palavras chave: Alumínio, estresse oxidativo, enzimas antioxidativas.**

## 1. INTRODUÇÃO

Em condições de pH ácido, formas tóxicas de alumínio, especialmente  $\text{Al}^{3+}$ , tornam-se solúveis na solução do solo afetando o crescimento e o desenvolvimento das plantas. O Al absorvido acumula-se predominantemente no ápice radicular onde inibe o alongamento radicular, poucos minutos após a exposição a este íon (Horst et al., 2010). As plantas apresentam inúmeros sítios potenciais de injúria pelo Al como a parede celular, a membrana plasmática e outros (Horst et al., 2010). Não se sabe, contudo, que sítio sofre a primeira ação tóxica do Al que resulta na inibição do alongamento radicular (Horst et al., 2010).

Uma das possíveis formas de ação precoce do Al parece ser o estresse oxidativo com aumento na produção de intermediários reativos de oxigênio (Yamamoto et al., 2003; Jones et al., 2006). Intermediários reativos de oxigênio (ROIs) são formas reduzidas do oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ), extremamente reativos e que podem causar danos oxidativos a diversos componentes celulares (Mittler, 2002; Miller et al., 2008). Eles incluem o ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), o radical hidroxílico ( $\bullet\text{OH}$ ) e o oxigênio “singlete” ( $^1\text{O}_2$ ) (Jaspers e Kangasjarvi, 2010).

Em plantas, estes ROIs podem ser produzidos em diferentes compartimentos celulares, incluindo cloroplastos, mitocôndrias, membrana plasmática, peroxissomos e apoplasto (Jaspers e Kangasjarvi, 2010). Os ROIs são considerados “subprodutos inevitáveis” do metabolismo aeróbico sendo continuamente produzidos e removidos das células por mecanismos antioxidativos enzimáticos e/ou não enzimáticos (Mittler, 2002). Dentre as enzimas que participam dos sistemas de defesa das plantas destacam-se a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD), a peroxidase (POX), a peroxidase do ascorbato (APX), a peroxidase da glutathione (GPX) e a redutase da glutathione (GR). Dentre os metabólitos destacam-se o ascorbato (AA), a glutathione reduzida (GSH),  $\alpha$ -tocoferol e outros (Mittler et al., 2004).

Além do Al, várias perturbações ambientais como altas e, ou baixas temperaturas, alta intensidade luminosa, deficiência hídrica, salinidade, metais pesados e outros, podem aumentar a produção destes ROIs (Miller et al., 2010), resultando em estresse oxidativo e conseqüente oxidação de biomoléculas (lipídios, proteínas e DNA, por exemplo), resultando em redução na produtividade das plantas.

Um dos principais locais de produção de ROIs em plantas são os cloroplastos (Miller et al., 2010). A produção de ROIs em cloroplastos, sob condições estressantes, ocorre durante a etapa fotoquímica da fotossíntese em razão de limitações na fixação de CO<sub>2</sub>. Isto provoca excessiva redução da cadeia de transporte de elétrons, com elevação da relação NADPH/NADP no fotossistema I (PSI) e a transferência de elétrons para o oxigênio molecular, formando radicais superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) (Apel e Hirt, 2004; Miller et al., 2010). Estes radicais superóxidos podem ser transformados espontaneamente ou em reação catalisada por uma superóxido dismutase cobre/zinco (Cu/ZnSOD) em peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Miller et al., 2010).

Outro local de produção de ROIs em plantas são os peroxissomos (Miller et al., 2010). Nestas organelas, os ROIs podem ser produzidos pela ação catalítica da oxidase do glicolato durante a fotorrespiração; por uma “pequena” cadeia de transporte de elétrons existente na membrana peroxissomal e por reação catalisada pela oxidase da xantina (Corpas et al., 2001; Miller et al., 2010). Na fotorrespiração, a oxidase do glicolato, nos peroxissomos, promove a oxidação do glicolato, proveniente dos cloroplastos, a glioxilato e peróxido de hidrogênio (Miller et al., 2010). Tanto a oxidase da xantina e a “pequena” cadeia de transporte de elétrons da membrana peroxissomal, constituída de uma redutase da flavoproteína NADH: ferricianeto redutase e um citocromo b<sub>5</sub>, por sua vez, originam O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e, na seqüência, peróxido de hidrogênio (Corpas et al., 2001; Del Río et al., 2006).

Nas mitocôndrias, durante o processo da respiração, também, podem ser produzidos ROIs (Navrot et al., 2007). Nestas organelas, a cadeia de transporte de elétrons é apontada como principal local de produção de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, especialmente, o complexo I e complexo III, envolvendo ubiquinona reduzida que transfere elétrons para o oxigênio (Navrot et al., 2007). Como em raízes, com algumas exceções, não ocorre fotossíntese acredita-se, que nesse caso as mitocôndrias possam ser o principal local de produção de ROIs (Navrot et al., 2007). A existência de oxidase alternativa na cadeia de transporte de elétrons e de eficiente sistema de defesa antioxidativo atuando em mitocôndrias (Blokhina e Fagerstedt, 2010), porém, são sugestivos de não ser este local o principal responsável pelo acúmulo de ROIs nesta parte da planta.

Aparentemente, enzimas produtoras de ROIs existentes no apoplasto podem desempenhar grande importância em raízes. Três importantes enzimas associadas com a



produção de ROIs são as oxidases do NADPH, na superfície da membrana plasmática, as peroxidases do NADH e as oxidases da diamina no apoplasto (Lin et al., 2001a; Cona et al., 2006). As oxidases do NADPH estão presentes na membrana plasmática e catalisam a oxidação do NADPH formando  $O_2^{\bullet-}$  extracelular (Groom et al., 1996). As oxidases do NADPH, designadas como RBOH (*respiratory burst oxidase homolog*) em plantas são proteínas com seis domínios transmembrana apresentando na região carboxiterminal, no lado citossólico, sítios de ligação para FAD e NADPH (Sagi e Flur, 2006). Possui ainda dois grupos heme na terceira e quinta alça do domínio transmembrana ligados através de quatro resíduos de histidina. Os grupos heme são necessários para transferência de elétrons provenientes do NADPH, no lado citossólico, para o oxigênio, o acceptor extracelular, gerando ânion superóxido (Sagi e Flur, 2006). As oxidases do NADPH apresentam ainda, na porção aminoterminal do lado citossólico, dois sítios de ligação de cálcio chamados “EF-hands”, sugerindo regulação da atividade desta enzima por cálcio (Kobayashi et al., 2007). Acredita-se que as oxidases do NADPH sejam reguladas por  $Ca^{2+}$  e proteínas cinases que promovem modificações postraducional via fosforilação (Kobayashi et al., 2007). Sob condições de estresse haveria abertura de canais de  $Ca^{2+}$  da membrana plasmática, permitindo o aumento da concentração deste íon no citossol, resultando na ativação de proteínas cinases dependentes de  $Ca^{2+}$  (CDPKs) que, por sua vez, ativariam as oxidases do NADPH produzindo intensamente ROIs no apoplasto, no chamado “surto oxidativo” de ROIs (Kobayashi et al., 2007).

A importância da participação das oxidases do NADPH na produção de ROIs sob estresse oxidativo foi comprovada por Pourrut et al. (2008). Eles verificaram que em plantas de *Vicia faba* tratadas com chumbo 10  $\mu$ M houve aumento na produção de  $O_2^{\bullet-}$ , avaliada por quimiluminescência, após cerca de 50 s, atingindo valor máximo após cerca de 90 s, relacionado com a ativação das oxidases do NADPH. Garnier et al. (2006) também verificaram aumento da produção de ROIs por oxidases do NADPH, em células de tabaco tratadas com cádmio, anterior à produção de ROIs por mitocôndrias.

Além da oxidase do NADPH, outras enzimas podem estar envolvidas na produção de ROIs no apoplasto como as oxidases da diamina (Cona et al., 2006) e as peroxidases do NADH (Fecht-Christoffers et al., 2006). As oxidases da diamina, da rota das poliaminas, agem especificamente sobre a putrescina formando  $\Delta^1$ -pirrolina,

amônia e peróxido de hidrogênio (Cona et al., 2006). As peroxidases, amplamente distribuídas nos tecidos vegetais, exercem as mais diversas funções, associadas com uma aparente ausência de especificidade de substrato (Passardi et al., 2005). No apoplasto das plantas estas enzimas podem consumir o  $H_2O_2$  oxidando compostos fenólicos e, ou formando lignina, que são incorporados na parede celular secundária (Passardi et al., 2004). Por outro lado, estas peroxidases, podem também utilizar NADH como doador de elétrons e produzir  $H_2O_2$  necessário ao processo de lignificação (Passardi et al., 2004). Neste caso recebem o nome de peroxidases do NADH.

Há evidências da existência de uma relação entre a produção de ROIs no apoplasto e inibição do alongamento radicular (Chen e Schopfer, 1999; Passardi et al., 2004; Passardi et al., 2005). Conforme mencionado anteriormente, as peroxidases no apoplasto podem ser consideradas enzimas bi-funcionais (Passardi et al., 2004). Elas poderiam gerar  $H_2O_2$  promovendo a formação de ligações cruzadas entre componentes estruturais da parede celular, contribuindo para enrijecimento e inibição do alongamento radicular (Passardi et al., 2004). Por outro lado, podem contribuir para formar radicais hidroxílicos ( $\bullet OH$ ) pela reação de Fenton (Chen e Schopfer, 1999). Os  $\bullet OH$ , então, atuam clivando polissacarídeos da parede celular, resultando em afrouxamento dos componentes da parede celular e, portanto, favorecimento do alongamento radicular (Passardi et al., 2004; Passardi et al., 2005; Cona et al., 2006).

Apesar de resultados experimentais mostrarem produção de ROIs induzido por Al, ainda não se sabe exatamente como isto acontece (Yamamoto et al., 2002; Jones et al., 2006; Achary et al., 2008). O Al não é um metal de transição nem pode catalisar reações de redox, portanto, não pode participar diretamente na produção ROIs pela transferência de elétrons para o oxigênio molecular (Gutteridge et al., 1985; Yamamoto et al., 2003). Desta forma, a produção de ROIs por Al representa uma consequência de seus efeitos tóxicos. Jones et al. (2006), por exemplo, acreditam que a ligação de Al à membrana plasmática é pré-requisito para a produção de intermediários reativos de oxigênio, embora não exista comprovação experimental.

A produção de ROIs decorrente de fatores estressantes, incluindo por Al é, geralmente estimada indiretamente, com base na atividade de enzimas antioxidantes (Boscolo et al., 2003; Liu et al., 2008). Relativamente poucos estudos fizeram a quantificação dos diversos tipos de ROIs e sua relação com sistema de defesa

antioxidativo. Poucos trabalhos, também, têm procurado entender os fatores bioquímicos e biofísicos que resultam na produção e manutenção dos níveis destes intermediários reativos de oxigênio. Tanto quanto se sabe, pela literatura consultada, esta é a primeira pesquisa realizada com genótipos nacionais de milho com o intuito de avaliar a produção de ROIs sob condições de toxidez de Al.

O objetivo do presente trabalho, portanto, foi tentar estabelecer a relação entre a formação de ROIs nos tecidos radiculares e, em especial, em frações da parede celular, a atividade de enzimas relacionadas com a eliminação destes intermediários de oxigênio reativo e o alongamento radicular em dois genótipos de milho expostos a níveis tóxicos de Al.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Nos experimentos foram utilizados dois genótipos de milho (*Zea mays* L.) com tolerância diferencial ao Al: um tolerante (UFVM 200) e outro sensível (UFVM 100), fornecidos pelo Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, MG.

As sementes foram selecionadas quanto ao tamanho e forma, tratadas com ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) concentrado por 1 min; lavadas em água corrente e em água desmineralizada. As sementes foram, então, colocadas para germinar em cartuchos de papel “germiteste”, pH neutro, mergulhados em solução de  $CaCl_2$  0,5 mM, pH 4,0, sob aeração contínua. Cinco dias após a semeadura, as plântulas foram selecionadas quanto à uniformidade de tamanho e forma, e transplantadas para recipientes de polietileno contendo  $CaCl_2$  0,5 mM, pH 4,0, e submetidas aos tratamentos com Al nas concentrações de 0 e 100  $\mu M$ , na forma de  $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ , durante 24 horas.

Durante toda a fase de obtenção das plântulas e aplicação dos tratamentos elas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada ( $25 \pm 3^\circ C$ ), sob irradiância de  $230 \mu mol m^{-2} s^{-1}$  e fotoperíodo de 16 h.

### 2.2. AVALIAÇÃO DO ALONGAMENTO RADICULAR

Cinco dias após a semeadura, as plântulas foram selecionadas quanto à uniformidade de tamanho e forma e transplantadas, em número de quatro, para vasos de polietileno, contendo 1,0 L de solução de  $CaCl_2$  0,5 mM, pH 4,0. Então, foram submetidas aos tratamentos com Al nas concentrações de 0, 25, 50 e 100  $\mu M$ , na forma de  $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ , durante 24 horas. Imediatamente antes da introdução das plantas nas soluções de tratamento e após 24 h de tratamento com Al foi determinado o comprimento da raiz primária. Pela diferença entre as medições obteve-se o alongamento radicular para o período de 24 h. Com estes dados foram calculados o alongamento radicular (AR) (% do controle) e a porcentagem de inibição:

$$AR (\% \text{ controle}) = (Alongamento Al_t / Alongamento Al_0) \times 100$$

$$\% \text{ inibição} = (\text{Alongamento } Al_0 - \text{Alongamento } Al_t / \text{Alongamento } Al_0) \times 100$$

em que:

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

$Al_0$  = Alongamento da raiz primária de plântulas controle (sem tratamento com Al)

$Al_t$  = Alongamento da raiz primária de plântulas submetidas ao tratamento com Al

### **2.3. DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE ALUMÍNIO EM ÁPICES RADICULARES**

Plântulas dos dois genótipos de milho, obtidas conforme item 2.1, foram transferidas, em número de quinze, para vasos de polietileno contendo 6,5 L de solução de  $CaCl_2$  0,5 mM, pH 4,0, e submetidas aos tratamentos com Al 0 e 100  $\mu$ M, na forma de  $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ . Após 24 horas de tratamento, as plântulas foram removidas, seu sistema radicular lavado em HCl 0,1 N, em água corrente e desmineralizada e, então, foram removidos os ápices da raiz principal, com aproximadamente 1 cm. Estes ápices foram colocados em tubos tipo Eppendorf contendo 1 mL de HCl 2 N, com agitação ocasional por 24 horas. Os ápices foram retirados dos tubos e as soluções resultantes foram utilizadas para determinação da concentração de alumínio, de acordo com metodologia descrita por Ma et al. (2004). Amostras, adequadamente diluídas foram analisadas por espectrofotometria de absorção atômica em forno de grafite. As concentrações de Al nas amostras foram estimadas com base em curva de calibração preparada com padrões autênticos de alumínio.

### **2.4. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO AL SOBRE A ATIVIDADE DE ENZIMAS DO SISTEMA ANTIOXIDATIVO EM ÁPICES DA RAIZ PRINCIPAL**

#### *2.4.1. Aplicação dos tratamentos e obtenção das amostras*

Plântulas dos dois genótipos de milho, obtidas conforme descrito no item 2.1, foram transferidas, em número de quinze, para vasos de polietileno contendo 6,5 L de

solução de  $\text{CaCl}_2$  0,5 mM, pH 4,0, e submetidas aos tratamentos com Al 0 e 100  $\mu\text{M}$ , na forma de  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Após 24 horas foram removidas, o sistema radicular lavado em água corrente e desmineralizada e, então foram seccionados ápices radiculares da raiz principal de aproximadamente 1 cm.

#### *2.4.2. Obtenção dos extratos enzimáticos brutos*

Os extratos enzimáticos foram obtidos pela maceração de aproximadamente 0,15 g de ápices radiculares em  $\text{N}_2$  líquido e, então, adicionado 1 mL de meio de homogeneização, constituído de 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). O homogeneizado, depois de filtrado através de quatro camadas de gaze, foi centrifugado a 12.000 g por 15 minutos, a 4° C, e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático bruto.

#### *2.4.3. Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)*

A atividade da superóxido dismutase foi determinada pela adição de 30  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático bruto a 1,97 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  $\mu\text{M}$ , EDTA 0,1 mM e riboflavina 2  $\mu\text{M}$  (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 e 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 de SOD foi definida como a quantidade da enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (Beauchamp e Fridovich, 1971).

#### *2.4.4. Determinação da atividade da peroxidase (POX, EC 1.11.1.7)*

A atividade da peroxidase foi determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto a 1,9 mL de um meio de reação constituído de tampão de fosfato de potássio 25 mM pH 6,8, pirogalol 20 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 mM (Kar e Mishra, 1976). A atividade da POX foi determinada pelo acréscimo na absorbância a 420 nm, à temperatura de 25°C, durante o primeiro minuto de reação pela produção de purpurogalina. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Chance e Maehley, 1955) e o resultado expresso em μmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína.

#### *2.4.5. Determinação da atividade da catalase (EC 1.11.1.6)*

A atividade da catalase foi determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto a 1,9 mL de um meio de reação constituído de tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 12,5 mM (Havir e Mchale, 1987). O decréscimo na absorbância, no primeiro minuto de reação, foi medido a 240 nm a 25°C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 36 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Anderson et al., 1995) e expressa em μmoles de peróxido de hidrogênio min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína.

#### *2.4.6. Determinação da atividade da peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11)*

A atividade da peroxidase do ascorbato foi determinada de acordo com o método de Nakano e Asada (1981), modificado por Koshiba (1993). Alíquotas de 0,1 mL do extrato enzimático bruto foram adicionados a 1,9 mL de um meio de reação constituído de tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, ácido ascórbico 0,8 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM. O decréscimo na absorbância, no primeiro minuto de reação, foi medido a 290 nm a 25° C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,8 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Nakano e Asada, 1981) e o resultado expresso em μmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína.

## **2.5. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ALUMÍNIO SOBRE OS TEORES DE ROIS EM ÁPICES DA RAIZ PRINCIPAL**

Plântulas dos dois genótipos de milho, obtidas conforme item 2.1, foram submetidas aos tratamentos com Al 0 e 100  $\mu\text{M}$ . Após 24 horas de aplicação dos tratamentos, conforme descrito no item 2.4.1., as plântulas foram removidas e ápices radiculares da raiz principal, de aproximadamente 1 cm, foram cortados e utilizados para determinação dos teores de ROIs.

### *2.5.1. Determinação dos teores de ânion superóxido*

Para determinação dos teores de ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) amostras de 50 mg de ápices da raiz primária, de aproximadamente 1 cm, foram cortadas em pequenos segmentos. Estes segmentos foram incubados em 2 mL de meio de reação constituído do sal dissódico do ácido etilenodiamino tetracético ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) 100  $\mu\text{M}$ ,  $\beta$ -nicotinamida adenina nucleotídeo reduzida (NADH) 20  $\mu\text{M}$  e tampão de fosfato de sódio 20 mM, pH 7,8 (Mohammadi e Karr, 2001) em frascos hermeticamente fechados. A reação foi iniciada pela introdução de 100  $\mu\text{L}$  de epinefrina 25,2 mM em HCl 0,1 N, usando-se seringa cromatográfica. As amostras foram incubadas a 28°C, sob agitação contínua por 5 min e, então, os ápices radiculares foram removidos e, a partir do sétimo minuto, iniciou-se a leitura da absorbância a 480 nm, durante 5 minutos. O branco foi realizado sob as mesmas condições, mas sem ápice radicular. A produção de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  foi avaliada pela determinação da quantidade de adenocromo acumulado (Misra e Fridovich, 1971), utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar de  $4,0 \times 10^3$  ( $\text{mol/L}$ )<sup>-1</sup> (Boveris, 1984).

### *2.5.2. Determinação dos teores de $\text{H}_2\text{O}_2$*

Para determinação dos teores de  $\text{H}_2\text{O}_2$  amostras de ápices radiculares de 0,2 g foram trituradas em nitrogênio líquido e, então, homogeneizadas em 2,0 mL de tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 6,5, contendo hidroxilamina 1 mM. Após filtração através de 4 camadas de gaze, o homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g, por 15 min, a 4°C, coletando-se o sobrenadante (Kuo e Kao, 2003).



Alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram adicionadas a um meio de reação constituído de  $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)$  100  $\mu\text{M}$ , ácido sulfúrico 25 mM, laranja de xilenol 250  $\mu\text{M}$  e sorbitol 100 mM, em volume final de 2 mL (Gay e Gebicki, 2000). As amostras foram mantidas no escuro por 30 minutos e a absorbância determinada a 560 nm. Brancos para as cores dos reagentes e dos extratos vegetais foram preparados em paralelo e subtraídos da amostra. As concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nas amostras foram estimadas com base em curva de calibração preparada com padrões de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Merck, Rahway, NJ, USA) na faixa de 0,2–1,0  $\mu\text{M}$ . A padronização de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi realizada de acordo com Patterson et al. (1984). O peróxido de hidrogênio (30% v/v) foi diluído a aproximadamente 10 mM em tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, padronizando sua absorvância a 240 nm utilizando o coeficiente de extinção molar de 40  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .

## **2.6. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ALUMÍNIO SOBRE A ATIVIDADE DE ENZIMAS PRODUTORAS DE ROIS NO APOPLASTO**

Plântulas dos dois genótipos de milho, obtidas conforme item 2.1, foram submetidas aos tratamentos com Al 0 e 100  $\mu\text{M}$ . Após 24 horas de aplicação dos tratamentos conforme descrito no item 2.4.1., as plântulas foram removidas e os ápices radiculares da raiz principal, de aproximadamente 1 cm, foram cortados e utilizados para obtenção de extratos brutos, da fração microsomal e fração da parede celular.

### *2.6.1. Obtenção dos extratos enzimáticos brutos, de fração microsomal e de fração iônica da parede celular*

Os extratos enzimáticos brutos para determinação da atividade da oxidase da diamina foram obtidos por maceração de 0,2 g de ápices radiculares em  $\text{N}_2$  líquido e, então, adicionados 0,5 mL de meio de homogeneização, constituído de tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 6,5, contendo NaCl 1 M (An et al., 2008). O homogeneizado, depois de filtrado através de quatro camadas de gaze, foi centrifugado a 10.000 g por 20 minutos, a 4° C, e o sobrenadante, utilizado como extrato enzimático.

As frações microsomais foram obtidas segundo procedimento de extração recomendado por Larsson et al. (1987). Neste caso, amostras de ápices radiculares da

raiz primária de aproximadamente 0,2 g foram trituradas com N<sub>2</sub> líquido em almofariz de porcelana na presença de meio de homogeneização constituído de sacarose 250 mM, EDTA 2 mM, ditiotreitól 1 mM e tampão de Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, na proporção 4 mL por g de matéria fresca. O material obtido foi filtrado através de quatro camadas de gaze e, posteriormente, centrifugado a 10.000 g por 10 min, descartando-se o precipitado. O sobrenadante foi novamente centrifugado a 30.000 g por 1 h, coletando-se, em seguida, o precipitado. O resíduo foi ressuspenso em 0,5 mL do mesmo meio de homogeneização, constituindo a fração microsomal.

Para a obtenção de frações de paredes celulares, ápices radiculares obtidos conforme descrito anteriormente foram homogeneizados em tampão de fosfato de sódio 66 mM (pH 6,1), seguido de filtração através de 4 camadas de gaze e centrifugação a 1000 g por 10 min (Raniere et al., 2001). O sobrenadante obtido foi centrifugado a 1000 g por 10 min. O resíduo foi, então, lavado por duas vezes com tampão de extração, duas vezes com água e incubado em Triton X-100 2 %, 4° C, sob agitação contínua, por 1 h. O resíduo foi novamente lavado duas vezes com água fria e incubado em NaCl 1 M por 2 h , a 4° C, e centrifugado novamente a 1000 g por 10 min a 4° C. O sobrenadante resultante foi considerado *fração iônica da parede celular*.

#### 2.6.2. Determinação da atividade da oxidase da diamina (EC 1.4.3.6)

A atividade da oxidase da diamina foi determinada de acordo com Naik et al. (1981), adaptado por Lin et al. (2001a). Aliquotas de 0,1 mL de extrato enzimático bruto, obtido conforme descrito no item 2.6.1. foi acrescentado a 0,9 mL meio de reação constituído de tampão de fosfato 50 mM (pH 7,5), putrescina 10 mM e piridoxal fosfato 0,1 mM. Após incubação a 30° C, por 2 h a reação foi paralisada acrescentando-se 0,5 mL de ácido tricloroacético 20% (p/v). Após 30 min de repouso, o meio de incubação foi centrifugado a 10.000 g, por 15 min e, ao sobrenadante coletado, foi adicionado 1,0 mL de solução de ninhidrina (250 mg de ninhidrina em 6 mL de ácido acético e 4 mL de ácido fosfórico 6 M). A mistura foi, novamente, incubada a 100°C por 30 min e, após resfriamento dos tubos, foi adicionado 0,5 mL de ácido acético concentrado e a absorbância foi determinada a 510 nm. Uma unidade de DAO foi definida como o aumento de uma unidade na absorbância a 510 nm por minuto. Os resultados foram expressos U min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína.

### *2.6.3. Determinação da atividade da oxidase do NADPH da fração microsomal (EC 1.6.3.1)*

A atividade da oxidase do NADPH da fração microsomal foi determinada pela redução de sal de sódio do [2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida] (XTT), na presença de NADPH (Sagi e Fluhr, 2001). Alíquotas de 0,1 mL da fração microsomal foram adicionadas a 0,9 mL do meio de reação constituído de tampão de Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, XTT 0,3 mM e NADPH 0,18 mM. A reação foi iniciada pela adição de 100  $\mu$ L NADPH, medindo-se o aumento na absorvância a 470 nm, por 3 min, após incubação por 2 min, na presença e ausência de 50 unidades de SOD (4400 U/mg de proteína; preparada em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, conforme proposto por Del Longo et al., 1993). Os resultados foram expressos em  $\Delta A_{470\text{ nm}} \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína (Sagi e Fluhr, 2001).

### *2.6.4. Determinação da atividade da peroxidase do NADH (EC 1.11.1.1)*

A atividade da peroxidase do NADH foi determinada em fração iônica da parede celular. Alíquotas de 100  $\mu$ L do extrato desta fração de parede celular foram adicionadas a 0,8 mL de um meio de reação constituído de tampão de Tris-malato 50 mM, pH 7,0, 4-aminoantipirina 1 mM, 2,4-diclorofenol 1 mM,  $\text{MnCl}_2$  50 mM e NADH 0,2 mM. A reação foi iniciada pela adição de 100  $\mu$ L NADH, medindo-se o aumento na absorvância a 510 nm, por 3 min, após incubação por 5 min (Zelinová et al., 2010). A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 13,6  $\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Loprasert et al, 1990) e o resultado, expresso em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  proteína.

## **2.7. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE INIBIDORES DE ENZIMAS PRODUTORAS DE ROIs**

Plântulas de milho de 5 dias de idade, obtidas e selecionadas conforme 2.1, foram submetidas aos seguintes pré-tratamentos em 1 L de solução de  $\text{CaCl}_2$  0,5 mM, pH 4,0: 1) controle; 2) + Al 100  $\mu\text{M}$ ; 2) difenileno iodônio (DPI) 100  $\mu\text{M}$ , inibidor da oxidase do NADPH (Sagi e Fluhr, 2001); 3) azida sódica ( $\text{NaN}_3$ ) 100  $\mu\text{M}$ , inibidor da peroxidase do NADH (Liszkay et al., 2003); 4) 2-hidroxiethylhidrazina 100  $\mu\text{M}$ , inibidor da oxidase da diamina (Su et al., 2005); 5) DPI 100  $\mu\text{M}$  +  $\text{NaN}_3$  100  $\mu\text{M}$  + 2-hidroxiethylhidrazina 100  $\mu\text{M}$ . Após 2 horas, as plântulas foram removidas, os sistemas radiculares lavados e, então, foram transferidas para 1 L de solução de  $\text{CaCl}_2$  0,5 mM, pH 4,0 e as plântulas referentes aos tratamentos 2 a 5 expostas ao Al 100  $\mu\text{M}$  por 24 h. Após este tempo o experimento foi encerrado e avaliado o alongamento radicular.

## **2.8. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO Al SOBRE A PEROXIDAÇÃO DE LIPÍDIOS**

Plântulas dos dois genótipos de milho, obtidas conforme item 2.1 foram submetidas aos tratamentos com Al 0 e 100  $\mu\text{M}$ . Após 24 horas de aplicação dos tratamentos conforme descrito no item 2.4.1., as plântulas foram removidas e ápices radiculares da raiz principal, de aproximadamente 1 cm, foram cortados e utilizados para determinação da peroxidação de lipídios.

Para determinação da peroxidação de lipídios amostras de 0,2 g de ápices radiculares foram trituradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 1% (p/v). Os homogeneizados foram filtrados através de quatro camadas de gaze e centrifugados a 12.000 g por 15 min. Todas as etapas necessárias ao processo de extração foram conduzidas a 4°C. Aliquotas de 0,5 mL dos sobrenadantes foram adicionadas a 1,5 mL de uma solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (p/v) em TCA 20% (p/v), os tubos de ensaio foram fechados e incubados em banho-maria a 95° C. Após 30 min, a reação foi paralisada transferindo-se os tubos de ensaio para banho de gelo. Posteriormente, foram centrifugados a 9.000 g por 10 min e a absorbância dos sobrenadantes determinadas a 532 nm. A absorvância inespecífica a 600 nm foi medida e subtraída das amostras. A concentração do complexo aldeído

malônico-TBA foi calculada usando o coeficiente de absorvidade molar de  $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Heath e Packer, 1968).

## **2.9. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS**

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

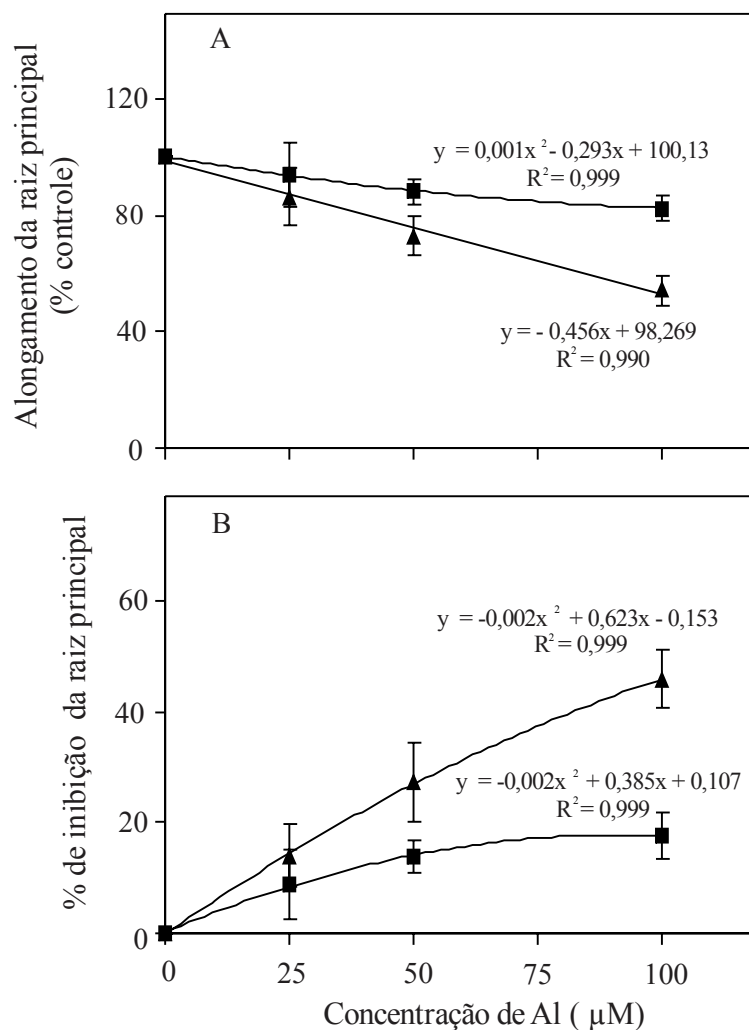
## **2.10. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os tratamentos foram dispostos no delineamento de blocos casualizados, em esquema fatorial ( $2 \times 2 \times 3$ ): dois genótipos de milho (UFVM 100 e UFVM 200), dois níveis de Al (0 e  $100 \mu\text{M}$ ), com três repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias, comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. O efeito do Al sobre o alongamento radicular foi montado em esquema fatorial ( $2 \times 4 \times 4$ ): dois genótipos de milho (UFVM 100 e UFVM 200), quatro níveis de Al (0, 25, 50 e  $100 \mu\text{M}$ ), com quatro repetições. Os testes com inibidores de enzimas produtoras de ROIs foram montados em esquema fatorial ( $2 \times 5 \times 4$ ): dois genótipos de milho (UFVM 100 e UFVM 200), 5 tratamentos (controle, + Al, + DPI, +  $\text{NaN}_3$ , + HEH, DPI +  $\text{NaN}_3$  + HEH), com quatro repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias, comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico “SAEG”, da Fundação Arthur Bernardes, da Universidade Federal de Viçosa, versão 9.0.

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. EFEITO DO ALUMÍNIO NO ALONGAMENTO RADICULAR**

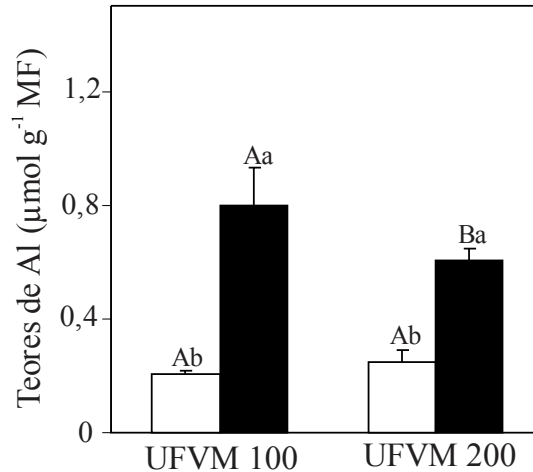
O alongamento da raiz primária dos dois genótipos, expresso como porcentagem do controle, reduziu com o aumento da concentração de Al na solução de crescimento após 24 horas de exposição (Figura 1A). A redução no alongamento radicular no genótipo UFVM 100 foi maior que no genótipo UFVM 200 em todas as concentrações testadas, chegando a um valor 34,8% maior na concentração de Al de 100  $\mu$ M. A porcentagem de inibição do alongamento radicular aumentou com o incremento da concentração de Al na solução nutritiva (Figura 1 B). As inibições do alongamento radicular foram de 29 % e 14 % na concentração de Al de 50 e de 46 % e 18 % na concentração de 100  $\mu$ M nos genótipos UFVM 100 e UFVM 200, respectivamente. Como as maiores diferenças entre os genótipos foram encontradas na concentração de 100  $\mu$ M de Al, ela foi escolhida para as demais análises realizadas neste estudo.



**Figura 1** - Efeito de concentrações de Al sobre o alongamento da raiz primária (A) e a porcentagem de inibição do alongamento da raiz (B) de dois genótipos de milho: UFVM 100 (-▲-) e UFVM 200 (--■--), após tratamento por 24 horas.

### 3.2. TEORES DE ALUMÍNIO EM ÁPICES DA RAIZ PRINCIPAL

Após 24 h de exposição a 100 µM de Al, observou-se aumento nos teores deste íon em ápices radiculares dos dois genótipos (Figura 2). O aumento no teor de Al foi cerca de 3,8 vezes no genótipo UFVM 100 e cerca de 2,4 vezes no genótipo UFVM 200, em relação ao controle. O teor de Al nos ápices radiculares do genótipo UFVM 100 foi cerca de 1,6 vezes maior que no genótipo UFVM 200.



**Figura 2** - Teores de Al em ápices da raiz primária de dois genótipos de milho tratados com □ 0 e ■ 100 μM de Al, durante 24 horas.

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

### 3.3. EFEITO DO ALUMÍNIO SOBRE A ATIVIDADE DE ENZIMAS DO SISTEMA ANTIOXIDATIVO EM ÁPICES DA RAIZ PRIMÁRIA

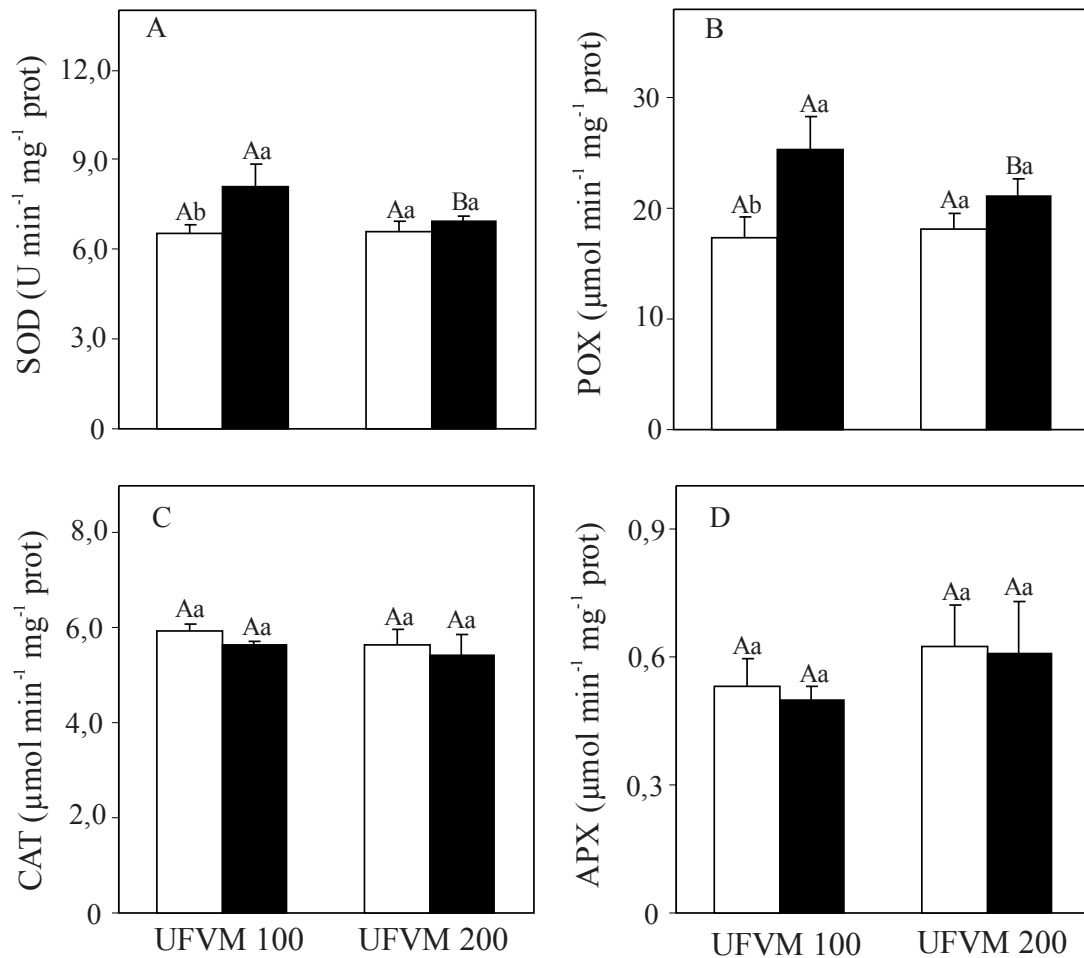
A atividade da superóxido dismutase (SOD) em ápices radiculares do genótipo UFVM 200 não foi alterada significativamente, enquanto no genótipo UFVM 100 a atividade desta enzima, aumentou cerca de 24 % em relação ao controle (Figura 3A). Nas plantas controle não houve diferença entre os genótipos, mas na presença de Al a atividade das SODs foi 17 % maior no genótipo UFVM 100.

A atividade de peroxidase (POX) em ápices radiculares do genótipo UFVM 200, também, não foi alterada significativamente, enquanto no genótipo UFVM 100 a exposição ao Al resultou em maior atividade (cerca de 40 %) em relação às plantas do genótipo UFVM 200. Nas plantas controle, não houve diferença entre os genótipos, mas na presença de Al a atividade de POX foi 20 % maior no genótipo UFVM 100.

O Al não afetou a atividade da catalase (CAT) e não foram observadas diferenças significativas entre os genótipos (Figura 3C).

De modo semelhante o Al não afetou a atividade da peroxidase do ascorbato (APX) e não foram observadas diferenças significativas entre os genótipos (Figura 3D).





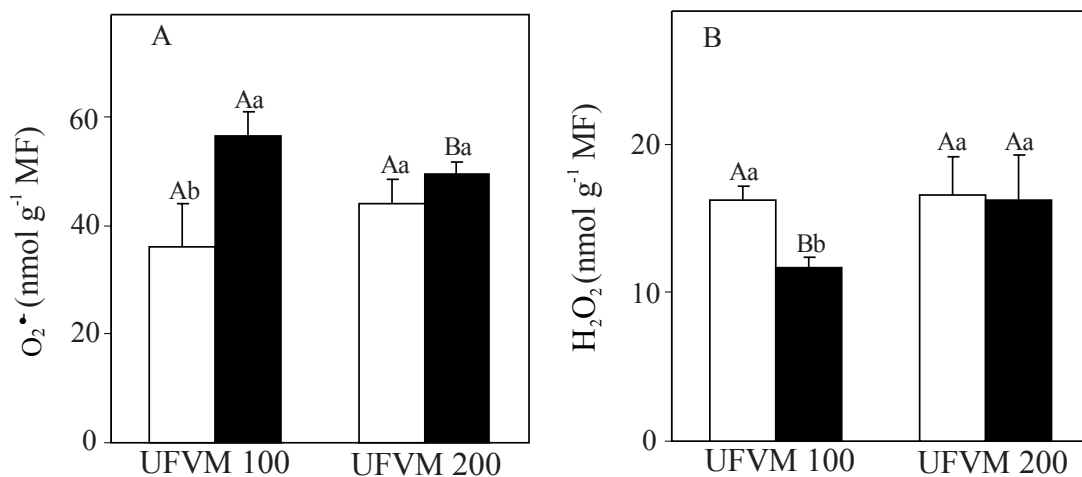
**Figura 3** - Efeito do alumínio sobre a atividade da (A) superóxido dismutase (SOD), (B) de peroxidase (POX), (C) catalase (CAT) e (D) ascorbato peroxidase (APX) em ápices da raiz primária de dois genótipos de milho tratados com □ 0 e ■ 100 μM de Al, durante 24 horas.

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

### 3.4. EFEITO DO ALUMÍNIO SOBRE OS TEORES DE ROIS E PEROXIDAÇÃO DE LIPÍDIOS EM ÁPICES DA RAIZ PRINCIPAL

As plantas controles dos dois genótipos apresentaram em seus ápices radiculares teores de ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) estatisticamente iguais (Figura 4A). O tratamento das plantas com Al aumentou aproximadamente 56 % os teores de  $O_2^{\bullet-}$  em ápices radiculares no genótipo UFVM 100, enquanto no genótipo UFVM 200, não foram observadas diferenças significativas. Nas plantas tratadas com Al, o genótipo UFVM 100 apresentou um teor de  $O_2^{\bullet-}$  16 % mais elevado do que o genótipo UFVM 200.

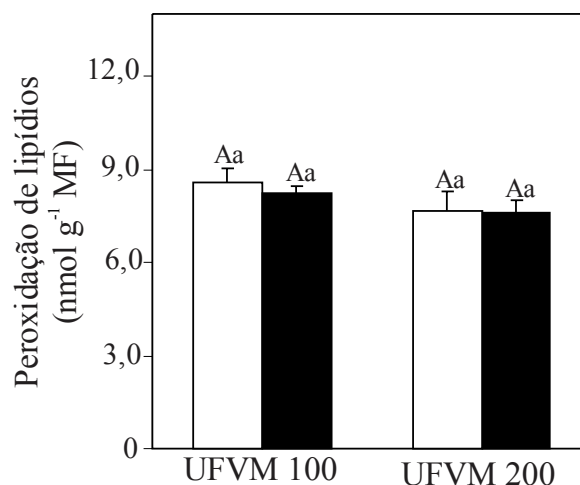
Os teores de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em ápices radiculares das plantas controles dos dois genótipos de milho foram estatisticamente iguais (Figura 4B). O tratamento com Al reduziu significativamente os teores de  $H_2O_2$  em cerca de 28 % nos ápices radiculares do genótipo UFVM 100, enquanto no genótipo UFVM 200, não foram observadas diferenças significativas.



**Figura 4** - Efeito do alumínio sobre os teores de (A) ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e (B) peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em ápices da raiz primária de dois genótipos de milho tratados com □ 0 e ■ 100  $\mu M$  de Al, durante 24 horas.

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

O tratamento com Al não modificou a peroxidação de lipídios nos ápices radiculares de nenhum dos genótipos estudados e eles não diferiram entre si na ausência ou presença de Al (Figura 5).



**Figura 5** - Efeito do alumínio sobre a peroxidação de lipídios em ápices da raiz primária de dois genótipos de milho, tratados com □ 0 e ■ 100 μM de Al, durante 24 horas.

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

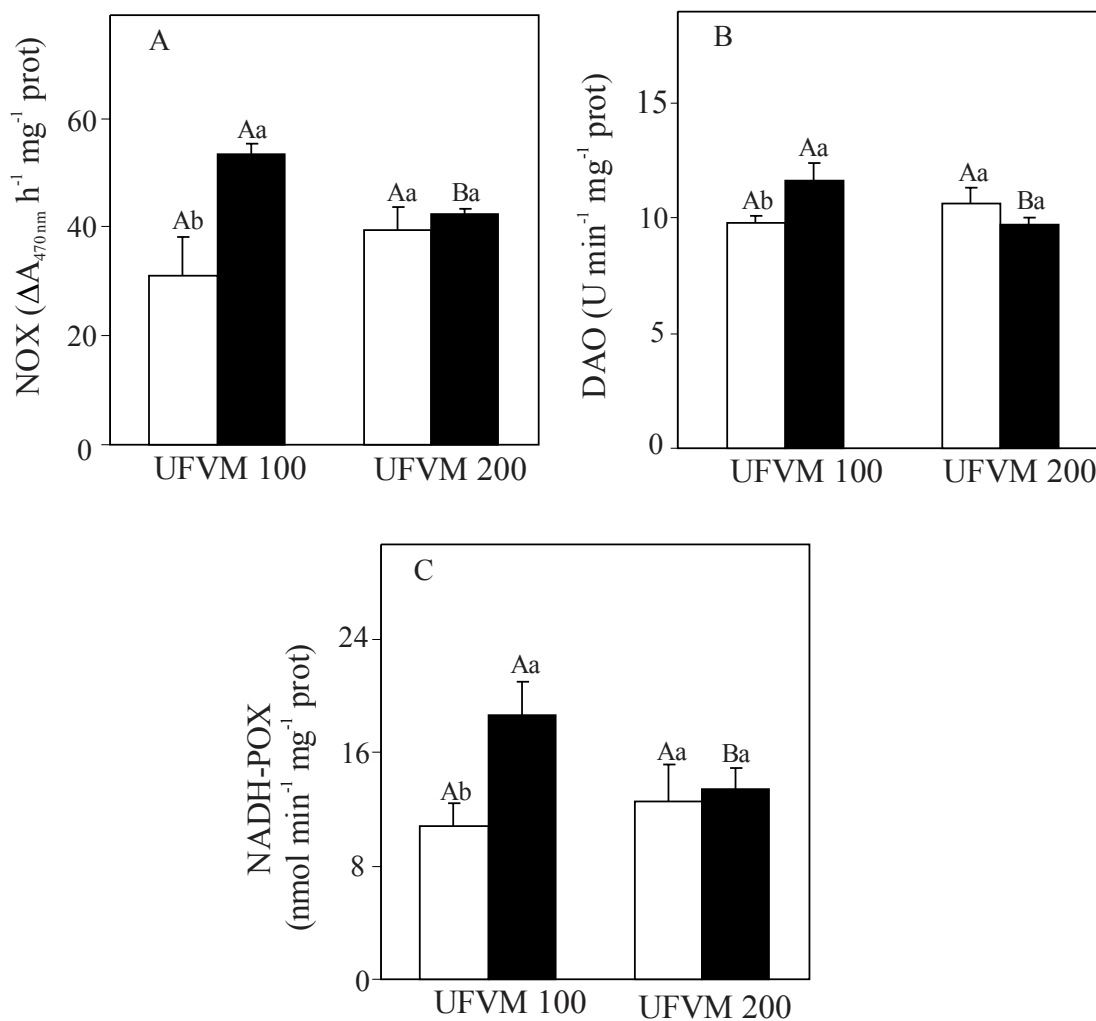
### 3.5. EFEITO DO ALUMÍNIO SOBRE A ATIVIDADE DE ENZIMAS PRODUTORAS DE ROIS EM ÁPICES DA RAIZ PRIMÁRIA

A atividade da oxidase do NADPH na fração microsomal obtida de ápices radiculares foi similar nas plantas-controle dos dois genótipos de milho (Figura 6A). O tratamento das plantas com Al aumentou a atividade da oxidase do NADPH em cerca de 72 % nos ápices radiculares do genótipo UFVM 100, enquanto no genótipo UFVM 200 não houve aumento significativo na atividade desta enzima. Na presença de Al, a atividade da oxidase do NADPH no genótipo UFVM 100 foi 26 % maior do que no UFVM 200.

Na ausência de Al, a atividade da oxidase da diamina (DAO) no extrato enzimático bruto foi similar nos ápices radiculares dos dois genótipos (Figura 6B). O tratamento das plantas com Al resultou em aumento na atividade da DAO em cerca de 28 % nos ápices radiculares do genótipo UFVM 100, sem alterações significativas no genótipo UFVM 200. Na presença de Al a atividade da DAO no genótipo UFVM 100 foi 20 % maior do que no UFVM 200.

A atividade da peroxidase do NADH (NADH-POX) na fração ionicamente ligada de parede isolada de ápices radiculares foi similar nas plantas-controle dos dois

genótipos (Figura 6C). O tratamento das plantas com Al resultou em aumento na atividade da NADH-POX em cerca de 75 % nos ápices radiculares do genótipo UFVM 100 sem alterações significativas no genótipo UFVM 200. Na presença de Al a atividade da POX-NADH no genótipo UFVM 100 foi 40 % maior do que no UFVM 200.

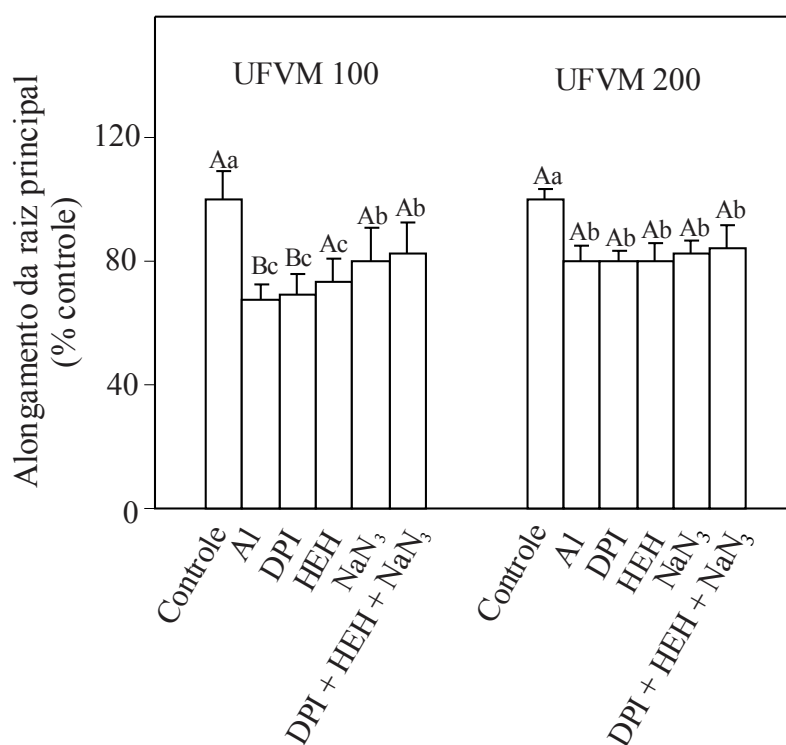


**Figura 6** - Efeito do alumínio sobre a atividade de enzimas produtoras de ROIs (A) Oxidase do NADPH (NOX); (B) Oxidase da Diamina (DAO) e (C) Peroxidase do NADH (NADH-POX) em ápices da raiz primária de dois genótipos de milho tratados com □ 0 e ■ 100 μM de Al, durante 24 horas.

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

### 3.6. EFEITO DE INIBIDORES DE ENZIMAS PRODUTORAS DE ROIs NO ALONGAMENTO RADICULAR

Os alongamentos das raízes primárias do genótipo UFVM 100 e do UFVM 200 sofreram reduções de 32 e de 20 %, respectivamente, após tratamento com Al (Figura 7). As adições dos inibidores DPI (inibidor da oxidase NADPH) e HEH (inibidor DAO), nas concentrações utilizadas, não foram capazes de recuperar o alongamento radicular em nenhum dos genótipos estudados. A aplicação de  $\text{NaN}_3$  (inibidor de peroxidases) ou da combinação dos inibidores: DPI +  $\text{NaN}_3$  + HEH em relação ao tratamento com Al promoveu uma recuperação de 19 e de 23 % apenas no genótipo UFVM 100. Não houve, entretanto, efeito significativo adicional do tratamento DPI +  $\text{NaN}_3$  + HEH sobre aquele em que se utilizou apenas  $\text{NaN}_3$ . Não houve nenhum efeito significativo dos inibidores das enzimas produtoras de ROIs, aplicados isoladamente ou em mistura, sobre o alongamento radicular no genótipo UFVM 200.



**Figura 7** - Efeito de inibidores de enzimas produtoras de ROIs: DPI; HEH,  $\text{NaN}_3$  e DPI + HEH +  $\text{NaN}_3$  no alongamento da raiz principal de dois genótipos de milho, tratados com 0 e 100  $\mu\text{M}$  de Al, durante 24 horas.

Médias seguidas pelas mesmas letras, maiúsculas entre os genótipos e minúsculas entre os tratamentos, não diferem estatisticamente, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

#### 4. DISCUSSÃO

O Al acumula-se predominantemente no ápice radicular, especialmente na região da zona de transição e a partir daí desencadeia uma série de efeitos a curto e a longo prazo. Um dos efeitos mais precoces da toxicidade do Al em vegetais é a inibição do alongamento radicular (Panda, 2007; Chandran et al., 2008). O mecanismo de inibição do alongamento radicular não está ainda esclarecido e ainda é matéria de debate se as lesões primárias do Al ocorrem no apoplasto ou no simplasma (Horst et al., 2010). Contudo, sabe-se que a inibição do alongamento radicular é um dos efeitos mais precoces do Al, manifestando em apenas 45 min após exposição das plantas a este íon (Doncheva et al., 2005). Trabalho recente mostra que o estresse oxidativo induzido por Al é, também, um dos efeitos precoces do Al (Tabaldi et al., 2009). A relação entre produção de ROIs e a inibição do alongamento radicular em plantas tratadas com Al, também, é matéria de discussão.

O tratamento com Al, à semelhança do que já foi observado em várias espécies, provocou redução no alongamento da raiz nos dois genótipos de milho. A intensidade do efeito do Al sobre o alongamento, conforme verificado também por Piñeros et al. (2005) aumentou com a concentração do Al no meio nutritivo e variou com o genótipo analisado. Aparentemente, as diferenças entre os genótipos se ampliam com o aumento na concentração do alumínio. Em geral, contudo, ultrapassado certo limite de tolerância desaparecem estas diferenças (Dos Anjos, 2007). No presente experimento, a maior diferença entre os genótipos foi obtida na maior concentração testada. Piñeros et al. (2005) em estudo similar, testaram o efeito do Al sobre o crescimento relativo da raiz primária de seis genótipos de milho (3 nacionais e 3 norte-americanos). Apesar de certas semelhanças, os dois experimentos diferiram quanto à concentração de Al aplicada, quanto ao tempo de exposição a este íon e quanto ao meio de cultivo utilizado. Os resultados, contudo, foram essencialmente semelhantes.

O genótipo UFVM 100, além de maior inibição do alongamento radicular, acumulou mais Al em seus ápices radiculares que o genótipo UFVM 200. A maior capacidade das raízes deste genótipo em acumular Al pode ser devida à forte interação deste cátion trivalente com as várias estruturas no sistema radicular, principalmente no apoplasto, rico em cargas negativas (Kochian, 1995). Por outro lado, é possível que o

genótipo UFVM 200 apresente algum mecanismo de tolerância interna, ou então, de exclusão. Em genótipos de milho, um tolerante (C100-6) e outro sensível (L53), Maron et al. (2008) também verificaram menor acúmulo de Al em ápices do genótipo tolerante admitindo o funcionamento de um possível mecanismo de exclusão, principalmente, por detectarem maior liberação de citrato. Estudando genótipos de milho, Piñeros et al. (2005) também observaram menor acúmulo de Al em ápices dos genótipos mais tolerantes, sugerindo que a diferença entre eles resulta da capacidade de excluir Al do ápice radicular. Estes autores salientam que em milho o mecanismo de exclusão por meio da exsudação de ácidos orgânicos não funciona sozinho, mas em conjunto com outros, como por exemplo, pela exsudação de outros quelantes, pela alteração do pH da rizosfera ou por um mecanismo de tolerância interna.

Além de afetar diferencialmente o alongamento radicular o Al manifestou, de modo diferente, seus efeitos sobre a produção e o acúmulo de ROIs e sobre a atividade de enzimas antioxidativas que formam o sistema de defesa antioxidativo nos dois genótipos de milho estudados. Sabe-se que as enzimas antioxidativas são responsáveis pela remoção dos ROIs e manutenção do equilíbrio homeostático nas células. A primeira linha de defesa nas plantas contra o estresse oxidativo são as SODs, enzimas que catalisam a conversão do radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) a  $H_2O_2$  (Alscher et al., 2002). O  $H_2O_2$  formado, por sua vez, pode ser removido das células por enzimas como peroxidase, catalase e peroxidase do ascorbato que, de modo geral, o utilizam como substrato reduzindo-o a água (Mittler, 2002).

Neste estudo, o Al aumentou a atividade da SOD e, também, os teores de  $O_2^{\bullet-}$  em ápices radiculares do genótipo UFVM 100 sem modificações significativas no genótipo UFVM 200. O aumento nos teores de  $O_2^{\bullet-}$  pelo Al, entretanto, foi maior do que aumento na atividade da SOD, indicando ter havido certo acúmulo deste ROI nos ápices radiculares do genótipo UFVM 100. De modo semelhante, Sharma et al. (2007) também verificaram aumento nos teores de  $O_2^{\bullet-}$  superior ao da atividade da SOD em raízes de arroz, indicando ter havido acúmulo deste ROI. Os resultados deste estudo também evidenciam, pelo menos em parte, a maior tolerância do genótipo UFVM 200 que não teve aumentada a produção de  $O_2^{\bullet-}$ . Em ápices radiculares de um genótipo tolerante de milho submetido a 36  $\mu$ M de Al também não foram observadas modificações na atividade da SOD após 24 horas de exposição (Boscolo et al., 2003).

Em função do aumento na atividade da SOD nas raízes do genótipo UFVM 100 esperava-se um conseqüente incremento nos teores de peróxido de hidrogênio. Mas ao contrário, houve diminuição nos teores deste ROI nos ápices radiculares do genótipo UFVM 100. Esta redução deve ter ocorrido, pelo menos em parte, em função do aumento da atividade de peroxidase (POX), já que a atividade da CAT e APX, enzimas que também utilizam H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como substrato, não foi alterada pelo Al. O aumento na atividade da POX na presença de Al justifica a redução dos teores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para valores mais baixos que no controle. Resultados como estes também foram verificados por Sharma et al. (2007) em raízes de arroz. Os autores, também, destacaram a importância da POX na remoção do excesso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido sob toxicidade de alumínio. Em ápices radiculares (0-1 cm) de dois cultivares de triticales com tolerância diferencial ao Al, Liu et al. (2008) também verificaram maior atividade da SOD e de POX no genótipo sensível com aumento no tempo de exposição (0 a 12 h) e da concentração de alumínio (0 a 100 µM). O genótipo UFVM 200, por outro lado, não apresentou modificação no teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e nas atividades das enzimas CAT, POX ou APX indicando não ter sofrido estresse oxidativo, pelo menos nas condições experimentais aplicadas.

Alguns estudos mostram que o Al pode causar diminuição e, ou aumento nos teores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tamás et al. (2004) observaram redução no teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com o aumento na concentração e do tempo de exposição ao Al em sementes de cevada (*Hordeum vulgare* L.), em processo de germinação. Em raízes de abóbora (*Curcubita pepo* L. Var. Butternut) o teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentou com o tempo de exposição a 50 µM de Al até 48h, decrescendo em seguida em virtude do aumento na atividade enzimática (Dipierro et al., 2005). Já em raízes de arroz (*Oryza sativa* L. cv. Pant-12) tratadas com Al foi observada diminuição no teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, proporcional ao aumento da concentração e do tempo de exposição associado com aumento na atividade de enzimas do sistema de defesa antioxidativo, principalmente de POX (Sharma e Dubey, 2007). Estas diferenças indicam que o teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> depende não apenas da intensidade do estresse por Al (duração e concentração), mas também da atividade de enzimas produtoras e, ou degradativas. Os resultados do presente trabalho sugerem que a atividade de POX tenha sido a principal responsável pela diminuição no teor deste tipo de ROI em ápices radiculares do genótipo UFVM 100.

Os ROIs podem ser produzidos no apoplasto de célula das plantas através do aumento da atividade da oxidase do NADPH ligada à membrana plasmática, da



peroxidase do NADH ligada à parede celular, além de amino oxidases em condições de estresse biótico e abiótico (Jaspers e Kangasjarvi, 2010).

Neste estudo, o Al aumentou a produção de ROIs no apoplasto verificado pelo aumento na atividade da oxidase do NADPH, peroxidase do NADH e oxidase da diamina em ápices radiculares do genótipo UFVM 100. A oxidase do NADPH e peroxidase do NADH catalisam a formação de  $O_2^{\bullet-}$  (Cona et al., 2006), que por dismutação pela SOD, contribui para a produção de  $H_2O_2$  no apoplasto. O Al também aumentou a atividade da DAO, contribuindo também para elevar os teores de  $H_2O_2$  no apoplasto. O  $H_2O_2$  produzido no apoplasto pode ser utilizado como substrato em reações catalisadas por peroxidases ligadas à parede celular, podendo formar ligações cruzadas entre polímeros, contribuindo para o enrijecimento da parede e inibição do alongamento radicular (Passardi et al., 2004). Este fato pode ter contribuído para a inibição do alongamento radicular verificada neste estudo.

Na literatura há pouca informação sobre a atuação das enzimas produtoras de ROIs, principalmente, relacionando-as à inibição do alongamento radicular. Talvez porque, somente na última década, a produção de ROIs envolvendo enzimas presente no apoplasto tenha sido confirmada (Miller et al., 2010). Isto dificultou, portanto, comparações mais apuradas com resultados da literatura não só em trabalhos com Al, mas sob outras condições de estresse abiótico. Além disso, em nenhuma referência consultada as três enzimas produtoras de ROIs foram correlacionadas ao mesmo tempo com o alongamento radicular.

Estudos relacionando Al, produção de ROIs no apoplasto e inibição do alongamento radicular focaram especialmente a peroxidase do NADH. O Al aumentou a atividade desta enzima em raízes de plântulas de cevada (Simonovicová et al., 2004) e de *Cassia tora* (Xue et al., 2008), de modo semelhante ao verificado neste estudo. Em ápices radiculares de cebola, Achary et al (2008) também verificaram aumento na produção extracelular de ROIs. Embora não tenham determinado diretamente a atividade de enzimas produtoras de ROIs, estes autores verificaram que as peroxidases do NADH, mas não as oxidases do NADPH foram as responsáveis pela geração de ROIs com o uso de inibidores enzimáticos específicos para estas enzimas. Em ápices radiculares de *Lotus japonicus*, por outro lado, o Al não modificou a atividade das peroxidases do NADH, mas reduziu os teores de  $H_2O_2$  e aumentou a atividade das

peroxidases ligadas à parede celular que utilizam este intermediário como acceptor de elétrons (Zelinová et al., 2010). Apesar deste resultado, outras enzimas presentes no apoplasto podem ter sido as responsáveis pela produção de  $H_2O_2$  uma vez que não foram quantificadas por estes autores.

A oxidase do NADPH também parece exercer importante papel na geração de ROIs em condições de estresse por metal. A atividade desta enzima aumentou em ápices radiculares dos dois genótipos milho tratados com Al neste experimento, significando que, provavelmente, está ocorrendo produção de  $O_2^{\bullet-}$ , conforme sugeriu o trabalho de Kawano et al. (2003), usando inibidores enzimáticos específicos. O aumento na produção deste tipo de ROI no apoplasto, também, pode estar associado com a atividade da oxidase do NADPH em estresse causado por chumbo em raízes de *Vicia faba* (Pourrut et al., 2008) e por níquel em raízes de cevada (Hao et al., 2006).

No presente estudo, a atividade da DAO, também, aumentou com o tratamento das plantas com Al. Como estas enzimas são produtoras de  $H_2O_2$ , o aumento de sua atividade significa aumento deste tipo de ROI no apoplasto. Em raízes de arroz, Lin e Kao (2001b), também, constataram aumento na atividade da DAO e da NADH-POD concluindo que a ação das duas enzimas contribuiu para geração de  $H_2O_2$  na parede celular de raízes tratadas com NaCl.

O aumento na atividade destas enzimas, mesmo que indiretamente, significa aumento na produção de ROIs no apoplasto, quando as plantas são submetidas a tratamento com Al. O acúmulo destes ROIs, por sua vez, pode ativar peroxidases ligadas à parede celular que, ao removê-los, pode causar enrijecimento da parede celular e inibição do alongamento radicular (Passardi et al., 2004). Em plântulas de arroz e ervilha submetidas a estresse salino e por cádmio, respectivamente, atribuiu-se a inibição do crescimento radicular ao aumento na atividade das peroxidases (Lin e Kao, 2001b; Chaoui et al., 2004). Semelhante aos resultados do presente experimento, foi observado em ápices radiculares de plântulas de cevada tratadas com 10 mM de Al aumento na atividade da POX após 24 horas (Tamás et al., 2003). Estes autores defenderam, também, a idéia de uma forte correlação entre a atividade de POX e a inibição do crescimento radicular em cevada.

O genótipo UFVM 200, conforme mencionado, apresentou resposta bastante diferente do genótipo UFVM 100 na presença de alumínio. Neste genótipo, não foi

verificado aumento na produção de ROIs, na atividade das enzimas antioxidativas nem nas atividades das três enzimas produtoras de ROIs e houve menor redução no alongamento radicular. Xue et al. (2008) verificaram que óxido nítrico (NO) e o hormônio ácido metil jasmônico (MJ) podem ser responsáveis pela regulação de peroxidases da parede celular. NO e MJ são moléculas antagônicas, de modo que MJ estimula as peroxidases da parede celular: peroxidases ligadas à parede e peroxidases do NADH, enquanto NO as inibe (Xue et al., 2008). Além do hormônio MJ, a produção de etileno também é estimulada por alumínio (Massot et al., 2002; Sun et al., 2010). Semelhantemente à ação do MJ, sugere-se, também, o envolvimento de etileno na produção de ROIs no apoplasto (Cnodder et al., 2005) em plantas tratadas com alumínio.

Como a tolerância das plantas ainda é essencialmente desconhecida, além dos mecanismos anteriormente mencionados, o genótipo UFVM 200 também pode estar lançando mão de outros mecanismos como, por exemplo, a capacidade de exsudar ácidos orgânicos para o meio nutritivo externo evitando sua absorção (Anjos, 2007). Provavelmente por isso, o Al absorvido não foi suficientemente elevado para atingir níveis tóxicos neste genótipo a ponto de causar estresse oxidativo. De modo semelhante, não foi encontrado em ápices radiculares de outro genótipo de milho tolerante ao Al modificação nas atividades da SOD e POX, 24 h de exposição a 36  $\mu\text{M}$  de Al (Boscolo et al., 2003), atribuindo a inexistência de estresse oxidativo a algum mecanismo de tolerância, como a exsudação de ácidos orgânicos.

O envolvimento de ROIs na inibição do alongamento causado pelo Al pode ser reforçado com base nos resultados obtidos neste estudo com inibidores. A exposição prévia das plântulas de milho aos inibidores  $\text{NaN}_3$  (inibidor de peroxidases) e da combinação DPI (inibidor da oxidase do NAPH) +  $\text{NaN}_3$  + HEH (inibidor da oxidase da diamina) recuperou o alongamento radicular no genótipo UFVM 100. Os inibidores DPI e HEH, aplicados individualmente, entretanto, não foram capazes de recuperar o alongamento radicular neste genótipo. Esta incapacidade do DPI recuperar o alongamento radicular, embora tenha inibido a oxidase do NAPH, pode ser resultado da ação de peroxidases ligadas à parede que continuaram utilizando o  $\text{H}_2\text{O}_2$  como substrato. Já o tratamento com HEH provavelmente não recuperou o alongamento, pois as outras enzimas continuaram a produzir  $\text{H}_2\text{O}_2$  que, provavelmente, foram consumidas pelas peroxidases. O acúmulo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  parece necessário para a formação de radicais

hidroxílicos ( $\cdot\text{OH}$ ) através da reação de Fenton (Passardi et al., 2004). Estes  $\cdot\text{OH}$  podem clivar polímeros da parede contribuindo para afrouxamento e crescimento em extensão (Liskay et al., 2003). Provavelmente, foi o que aconteceu com o uso de  $\text{NaN}_3$ , pois como inibe peroxidases em geral, estas não atuaram o que pode ter resultado em acúmulo de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que juntamente com  $\text{O}_2^{\cdot-}$  produzido pela oxidase do NADPH, podem ter sido utilizados para formar  $\cdot\text{OH}$ , resultando em recuperação do alongamento radicular.

Os resultados aqui obtidos sugerem que Al pode exercer seus efeitos tóxicos estimulando a produção de ROIs no apoplasto. Estes ROIs ao serem eliminados por peroxidases da parede celular podem favorecer o enrijecimento da parede e contribuir para a inibição do alongamento radicular causada pelo alumínio. A tolerância diferencial dos genótipos de milho, neste estudo, esta associada à produção diferencial de ROIs no apoplasto.

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

1) O Al estimulou a produção de ROIs no genótipo sensível, mas o acúmulo dependeu do balanço entre a produção e a remoção destes intermediários.

2) O acúmulo de ROIs induzido por Al pode estar diretamente relacionado com a inibição do alongamento radicular causada por este elemento.

3) A tolerância diferencial dos genótipos de milho neste estudo relaciona-se com a produção diferencial de ROIs no apoplasto.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHARY, V. M. M.; JENA, S.; PANDA, K. K.; PANDA, B. B. Aluminum induced oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70: 300-310, 2008.
- 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.
- AN, Z.; JING, W.; LIU, Y.; ZHANG, W. Hydrogen peroxide generated by copper amine oxidase is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Journal of Experimental Botany*, 59: 815–825, 2008.
- 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 Plant Biology*, 55: 373-399. 2004.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44:276-287, 1971.
- BLOKHINA, O.; FAGERSTEDT, K. V. Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems. *Physiologia Plantarum*, 138: 447-462, 2010.
- BOSCOLO, P. R. S.; MENOSSI, M.; JORGE, R. A. Aluminum induced oxidative stress in maize. *Phytochemistry*, 62: 181-189, 2003.
- BOSE, J.; BABOURINA, O.; RENGEL, Z. Role of magnesium in alleviation of aluminum toxicity in plants. *Journal of Experimental Botany*, 62: 1-14, 2011.
- BOVERIS. *Methods in Enzymology*, 105: 429-435. 1984.
- CAKMAK, I.; HORST, W.J. Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum*, 83:463-468, 1991.
- CHANCE, B.; MAEHLEY, A.C. Assay of catalyses and peroxides. *Methods in Enzymology*, 2:764-775, 1955.
- CHANDRAN, D.; SHAROPOVA, N.; IVASHUTA, S.; GANTT, J. S.; VANDENBOSCH, K. A.; SAMAC, D. A. Transcriptome profiling identified novel genes associated with aluminum toxicity, resistance and tolerance in *Medicago truncatula*. *Planta*, 228: 151-166, 2008.

- CHAOUI, A.; JARRAR, B.; FERJANI, EL FERJANI. Effects of cadmium and copper on peroxidase, NADH oxidase and IAA oxidase activities in cell wall, soluble and microsomal membrane fractions of pea roots. *Journal of Plant Physiology*, 161: 1225-1234, 2004.
- CHEN, S.-X.; CHOPFER, P. Hydroxyl-radical production in physiological reactions: a novel functions of peroxidase. *European Journal Biochemistry*, 260:726-735. 1999.
- CNODDER, T.; VISSENBERG, K.; STRAETEN, V. D.; VERBELEN, J. P. Regulation of cell length in the *Arabidopsis thaliana* root by the ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid: a matter of apoplastic reactions. *New Phytologist*, 168: 541-550, 2005.
- CONA, A.; REA, G.; ANGELINI, R.; FEDERICO, R.; TAVLADORAKI, P. Functions of amine oxidases in plant development and defense. *Trends in Plant Science*, 11: 80-88, 2006.
- CORPAS, F. J.; BARROSO, J. B.; DEL RIO, L. A. Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends in Plant Science*, 6: 145-150, 2001.
- Del LONGO, O.T.; GONZÁLEZ, A.; PASTORI, G.M.; TRIPPI, V.S. Antioxidant defenses under hyper oxygenic and hyper osmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. *Plant Cell Physiology*. 34:1023-1028, 1993.
- Del RÍO, L. A.; SANDALIO, L. M.; CORPAS, F. J.; PALMA, J. M.; BARROSO, J. B. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in paroxysms: production, scavenging and role in cell signaling. *Plant Physiology*, 141: 330-335, 2006.
- DIPIERRO, N.; MONDELLI, D.; PACIOLLA, C.; BRUNETTI, G.; DIPIERRO, S. Changes in the ascorbate system in the response of pumpkin (*Cucurbit pep* L.) roots to aluminum stress. *Journal of Plant Physiology*, 162: 529-536, 2005.
- DONCHEVA, S.; AMENÓS, M.; POSCHENRIEDER, C.; BARCELÓ, J. Root cell patterning: a primary target for aluminum toxicity in maize. *Journal of Experimental Botany*, 56: 1213-1220, 2005.
- DOS ANJOS, O. F. *Exsudação de ácido málico e alongamento radicular de genótipos de milho tratados com níveis tóxicos de alumínio*. Viçosa, MG: UFV. 2007. 38 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, 2007.
- FECHT-CHRISTOFFERS, M. M.; FUHRS, H.; BRAUN, H-P.; HORST, W. J. The role of hydrogen peroxide-producing and hydrogen peroxide-consuming peroxidases in the leaf apoplast of cowpea in manganese tolerance. *Plant Physiology*, 140: 1451–1463, 2006.
- GARNIER, L.; SIMON-PLAS, F.; THULEAU, P.; AGNEL, J-P; BLEIN, J-P.; RANJEVA, R.; MONTILLET, J-L. Cadmium affects tobacco cells by a series of

- three waves of reactive oxygen species that contribute to cytotoxicity. *Plant, Cell and Environment*, 29: 1956-1969, 2006.
- GAY, C.; GEBICKI, J. M. A critical evolution of the effect of sorbitol on the ferric-xylene orange hydroperoxide assay. *Analytical Biochemistry*, 284: 217-220, 2000.
- GIANNOPOLITIS, C.N., RIES, S.K. Superoxide dismutases: Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59: 309-314, 1977.
- GROOM, Q. J.; TORRES, M. A.; FORDHAM-SKELTON, A. P.; HAMMOND-KOSACK, K. E.; ROBINSON, N. J.; JONES, J. D. G. *rbohA*, a Rice homologue of the mammalian *gp91phox* respiratory burst oxidase gene. *The Plant Journal*, 10: 515-522, 1996.
- GUTTERIDGE, J. M. C.; QUINLAN, G. J.; CLARK, I.; MATTICK, R. Aluminum salts accelerate peroxidation of membrane lipids stimulated by iron salts. *Biochemistry Biophysical Acta*, 835: 441-447, 1985.
- HAO, F.; WANG, X.; CHEN, J. *Plant Science*, 170: 151-158, 2006.
- HAVIR, E.A., McHALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology*, 84:450-455, 1987.
- HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives Biochemistry and Biophysics*, 125: 189-198, 1968.
- HORST, W. J.; WANG, Y.; ETICHA, D. The role of the root apoplast in aluminum-induced inhibition of root elongation and in aluminum resistance of plants: a review. *Annals of Botany*, 106: 185-197, 2010.
- JASPERS, P. e KANGASJARVI, J. Reactive oxygen species in biotic stress signaling. *Physiologia Plantarum*, 138: 405-413, 2010.
- JONES, D. L.; BLANCAFLOR, E. B.; KOCHIAN, L. V.; GILROY, S. Spatial coordination of aluminum uptake, production of reactive oxygen species, callose production and wall rigidification in maize roots. *Plant, Cell and Environment*, 29: 1309-1318, 2006.
- KAR, M., MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*, 57:315-319, 1976.
- Kawano, T.; Kadono, T.; Furuichi, T.; Muto, S.; Lapeyrie, F. Aluminum-induced distortion in calcium signaling involving oxidative bursts and channel regulations in tobacco BY-2 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 308: 35-42, 2003.
- KOBAYASHI, M.; OHURA, I.; KAWAKITA, K.; YOKOTA, N.; FUJIWARA, M.; SHIMAMOTO, K.; DOKE, N.; YOSHIOKA, H. Calcium-dependent protein



- kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase. *The Plant Cell*, 19: 1065-1080, 2007.
- KOCHIAN, L. V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology*, 46:237-260, 1995.
- 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.
- LARSSON, C.; WIDELL, S.; KJELLBOM, P. Preparation of high-purity plasma membranes. *Methods Enzymology*, 148: 558-568, 1987.
- LIN, C. C.; KAO, C. H. Abscisic acid induced changes in cell wall peroxidase activity and hydrogen peroxide level in roots of rice seedlings. *Plant Science*, 160: 323-329, 2001a.
- LIN, C. C. e KAO, C. H. Cell wall peroxidase activity, hydrogen peroxide level and NaCl-inhibited root growth of rice seedlings. *Plant and Soil*, 230: 135-143, 2001b.
- LISKAY, A.; ZALM, E.; SCHOPFER, P. Production of reactive oxygen intermediates ( $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$ , and  $\bullet OH$ ) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. *Plant Physiology*, 136: 3114-3123, 2004.
- LISZKAY, A.; KENK, B.; SCHOPFER, P. Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. *Planta*, 217: 658-667, 2003.
- LOPRASERT, S.; URABE, I.; OKADA, H. Overproduction and single-step purification of *Bacillus stearothermophilus* peroxidase in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 32: 690-692, 1990.
- 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.
- LIU, Q.; YANG, J. L.; HE, L. S.; LI, Y. Y.; ZHENG, S. J. Effect of aluminum on cell wall, plasma membrane, antioxidants and root elongation in triticale. *Biologia Plantarum*, 52: 87-92, 2008.
- MA, J. F.; SHEN, R.; NAGAO, S.; TANIMOTO, E. Aluminum targets elongating cells by reducing cell wall extensibility in wheat roots. *Plant and Cell Physiology*, 45: 583-589, 2004.
- MARON, L. G.; KIRST, M.; MAO, C.; MILNER, M. J.; MENOSSI, M.; KOCHIAN, L. V. Transcriptional profiling of aluminum toxicity and tolerance responses in maize roots. *New Phytologist*, 179: 116-128, 2008.

- MASSOT, N.; NICANDER, B.; BARCELÓ, J. POSCHENRIEDER, CH.; TILBERG, E. A rapid increase in cytokinin levels and enhanced ethylene evolution precede  $Al_3^+$ -induced inhibition of root growth in bean seedlings (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Growth Regulation*, 37: 105-112, 2002.
- MILLER, G.; SHULAEV, V.; MITTLER, R. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiologia Plantarum*, 133: 481-489, 2008.
- MILLER, G.; SUZUKI, N.; CIFTCI-YILMAZ, S.; MITTLER, R. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell and Environment*, 33: 453-467, 2010.
- MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The generation of superoxide radical during the autoxidation of ferredoxins. *The Journal of Biological Chemistry*, 246: 6886-6890, 1971.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7: 405-410. 2002.
- MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; BREUSEGEM, F. V. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 10:490-498, 2004.
- MOHAMMADI, M.; KARR, A. L. Superoxide anion generation in effective and ineffective soybean root nodules. *Journal of Plant Physiology*, 158: 1023-1029, 2001.
- NAIK, B. I.; GOSWAMI, R. G.; SRIVASTAVA, S. K. A rapid and sensitive colorimetric assay of amine oxidase. *Analytical Biochemistry*, 111: 146-148, 1981.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidases in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology*, 22:867-880, 1981.
- NAVROT, N.; ROUHIER, N.; GELHAYE, E.; JACQUOT, J-P. Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiologia Plantarum*, 129: 185-195, 2007.
- PANDA, S. K. Molecular physiology of aluminum toxicity and tolerance in plants. *The Botanical Review*, 73: 326-347, 2007.
- PASSARDI, F.; COSIO, C.; PENEL, C.; DUNAND, C. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports*, 24: 255-265, 2005.
- PASSARDI, F.; PENEL, C.; DUNAND, C. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science*, 9: 534-540, 2004.
- PATTERSON, B. D.; MACRAE, E.; FERGUSON, I. B. Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using titanium (IV). *Analytical Biochemistry*, 139: 487-492, 1984.

- 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.
- PIÑEROS, M. A.; SHAFF, J. E.; MANSLANK, S.; ALVES, V. M. C.; KOCHIAN, L. V. Aluminum resistance in maize cannot be solely explained by root organic acid exudation. A comparative physiological study. *Plant Physiology*, 137: 231-241, 2005.
- POURRUT, B.; PERCHET, G.; SILVESTRE, J.; CECCHI, M.; GUIRESSE, M.; PINELLI, E. Potential role of NADPH-oxidase in early steps of lead-induced oxidative burst in *Vicia faba* roots. *Journal of Plant Physiology*, 165: 571-579, 2008.
- RANIERI, A.; CASTAGNA, A.; BALDAN, B.; SOLDATINI, G. F. Iron deficiency differently affects peroxidase isoforms in sunflower. *Journal of Experimental Botany*, 52: 25-35, 2001.
- RUIZ, J. M.; RIVERO, R. M.; ROMERO, L. Boron increases synthesis of glutathione in sunflower plants subjected to aluminum stress. *Plant and Soil*, 279: 25-30, 2006.
- SAGI, M.; FLUHR, R. Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiology*, 141: 336-340, 2006.
- SAGI, M.; FLUHR, R. Superoxide production by plant homologues of the gp91<sup>phox</sup> NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiology*, 126: 1281-1290, 2001.
- SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum. *Plant Cell Reports*, 26: 2027-2038, 2007.
- SILVA, I.R.; SMYTH, T.J.; ISRAEL, D.W.; RUFTY, T.W. Altered aluminum inhibition of soybean root elongation in the presence of magnesium. *Plant and Soil*, 230:223-230, 2001. *Journal of Experimental Botany*, 52: 1673-1682, 2001.
- SIMONOVICOVÁ, M.; HUTTOVÁ, J.; MISTRÍK, I.; SIROKÁ, B.; TAMÁS, L. Root growth inhibition by aluminum is probably caused by cell death due to peroxidase-mediated hydrogen peroxide production. *Protoplasma*, 224: 91-98, 2004.
- SU, G.; AN, Z.; ZHANG, W.; LIU, Y. Light promotes the synthesis of lignin through the production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediated by diamina oxidases in soybean hypocotyls. *Journal of Plant Physiology*, 162: 1297-1303, 2005.
- SUN, Q. B.; SHEN, R. F.; ZHAO, X. Q.; CHEN, R. F.; DONG, X. Y. Phosphorus enhances Al resistance in Al-resistant *Lespedeza bicolor* but not in Al-sensitive *L. cuneata* under relatively high Al stress. *Annals of Botany*, 102: 795-804, 2008.

- SUN, P.; TIAN, Q-Y; CHEN, J.; ZHANG, W-H. Aluminum-induced inhibition of root elongation in *Arabidopsis* is mediated by ethylene and auxin. *Journal of Experimental Botany*, 61: 347-356, 2010.
- SUMIMOTO, H. Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS Journal*, 275: 3249-3277, 2008.
- TABALDI, L. A.; CARGNELUTTI, D.; GONÇALVES, J. F.; PEREIRA, L. B.; CASTRO, G. Y.; MALDANER, J.; RAUBER, R.; ROSSATO, L. V.; BISOGNIN, D. A.; SCHETINGER, M. R. C.; NICOLOSO, F. T. Oxidative stress is an early symptom triggered by aluminum in Al-sensitive potato plantlets. *Chemosphere*, 76: 1402-1409, 2009.
- TAMÁS, L.; HUTTOVÁ, J.; MISTRÍK, I. Inhibition of Al-induced root elongation and enhancement of Al-induced peroxidase activity in Al-sensitive and Al-resistant barley cultivars are positively correlated. *Plant and Soil*, 250: 193-200, 2003.
- TAMÁS, L.; ŠIMONOVÍČOVÁ, M.; HUTTOVÁ, J. MISTRÍK, I. Aluminum stimulated hydrogen peroxide production of germinating barley seeds. *Environmental and Experimental Botany*, 51: 281-288, 2004.
- XUE, Y. J.; TAO, L.; YANG, Z. M. Aluminum-induced cell wall peroxidase activity and lignin synthesis are differentially regulated by jasmonate and nitric oxide. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 56: 9676-9684, 2008.
- YAMAMOTO, Y.; KOBAYASHI, Y.; DEVI, S. R.; RIKIISHI, S.; MATSUMOTO, H. Oxidative stress triggered by aluminum in plant roots. *Plant and Soil*, 255: 239-243, 2003.
- 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.
- ZELINOVÁ, V.; MISTRÍK, I.; PAL'OVE-BALANG, P.; TAMÁS, L. Peroxidase activity against guaiacol, NADH, chlorogenic acid, ferulic acid and coniferyl alcohol in root tips of *Lotus japonicus* and *L. corniculatus* grown under low pH and aluminum stress. *Biologia*, 65: 279-283, 2010.

## CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados do presente estudo mostram que o Al não age de forma direta sobre os processos que determinam o crescimento radicular, mas indiretamente através de moléculas sinalizadoras. Após a percepção da entrada do Al pelas células da raiz são ativadas enzimas da biossíntese (ACS e ACC) e receptores de percepção do etileno, resultando em aumento na produção deste hormônio. Adicionalmente, o Al estimula a atividade de enzimas produtoras de ROIs no apoplasto (DAO, oxidase do NADPH e peroxidase do NADH). O somatório destas respostas dos genótipos de milho estudados sugere que a inibição do alongamento radicular induzida por níveis tóxicos de Al é mediada por mecanismos de sinalização envolvendo a síntese e a percepção de etileno e a produção e a remoção de intermediários reativos de oxigênio no apoplasto radicular.

# APÊNDICE

## APÊNDICE CAPÍTULO I

**Quadro 1:** Análise de variância sumarizada da produção de etileno em ápices da raiz principal em dois genótipos de milho tratados com Al 0  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , por 24 horas.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	F
Bloco	2		
Alumínio (Al)	1	0,0548	76,88**
Genótipo	1	0,0105	14,79**
Al*Genótipo	1	0,0024	3,31 <sup>ns</sup>
Resíduo	6	0,0007	
CV (%)		8,30	

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

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

<sup>ns</sup> Não significativo

**Quadro 2:** Análise de variância sumarizada da atividade da oxidase do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACO) em ápices da raiz principal em dois genótipos de milho tratados com Al 0  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , por 24 horas.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	F
Bloco	2		
Alumínio (Al)	1	6077,245	110,54**
Genótipo	1	1763,778	32,08 <sup>ns</sup>
Al*Genótipo	1	798,384	14,52**
Resíduo	6	54,980	
CV (%)		9,56	

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

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

<sup>ns</sup> Não significativo

**Quadro 3:** Análise de variância sumarizada da atividade da sintase do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACS) no alongamento da raiz principal em dois genótipos de milho tratados com Al 0  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , por 24 horas.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	F
Bloco	2		
Alumínio (Al)	1	1406,565	48,60**
Genótipo	1	191,7014	6,62*
Al*Genótipo	1	238,4515	8,24*
Resíduo	6	28,9441	
CV (%)		21,26	

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

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

<sup>ns</sup> Não significativo

**Quadro 4:** Análise de variância sumarizada de precursor da síntese de etileno (ACC) e etrel (ETH) no alongamento da raiz principal em dois genótipos de milho tratados com Al 0  $\mu$ M e 100  $\mu$ M, por 24 horas.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	F
Bloco	3		
Tratamento	3	2332,418	14,92 <sup>**</sup>
Genótipo	1	764,5053	4,89 <sup>*</sup>
Trat*Genótipo	3	235,9026	1,51 <sup>ns</sup>
Resíduo	21	156,3747	
CV (%)		16,76	

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

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

<sup>ns</sup> Não significativo.

**Quadro 5:** Análise de variância sumarizada de inibidores da síntese (AOA e CoCl<sub>2</sub>) e da ação de etileno (Ag) no alongamento da raiz principal em dois genótipos de milho tratados com Al 0  $\mu$ M e 100  $\mu$ M, por 24 horas.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	F
Bloco	3		
Tratamento	4	879,5021	18,01 <sup>**</sup>
Genótipo	1	252,7826	5,18 <sup>*</sup>
Tratamento*Genótipo	4	130,6411	2,68 <sup>*</sup>
Resíduo	27	48,8212	
CV (%)			

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

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

<sup>ns</sup> Não significativo.



## APÊNDICE CAPÍTULO II

**Quadro 1:** Análise de variância sumarizada dos teores de Al em ápices da raiz principal em dois genótipos de milho tratados com Al 0  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , por 24 horas.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	F
Bloco	2		
Alumínio (Al)	1	0,6762	118,61**
Genótipo	1	0,0177	3,11 <sup>ns</sup>
Al*Genótipo	1	0,0402	7,05*
Resíduo	6	0,0057	
CV (%)		16,27	

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

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

<sup>ns</sup> Não significativo

**Quadro 2:** Análise de variância sumarizada da atividade da superóxido dismutase (SOD) em ápices da raiz principal em dois genótipos de milho tratados com Al 0  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , por 24 horas.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	F
Bloco	2		
Alumínio (Al)	1	2,6632	14,86**
Genótipo	1	0,9111	5,08 <sup>ns</sup>
Al*Genótipo	1	1,0708	5,97*
Resíduo	6	0,1793	
CV (%)		6,00	

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

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

<sup>ns</sup> Não significativo

**Quadro 3:** Análise de variância sumarizada da atividade da peroxidase (POX) em ápices da raiz principal em dois genótipos de milho tratados com Al 0  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , por 24 horas.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	F
Bloco	2		
Alumínio (Al)	1	93,1915	29,24**
Genótipo	1	9,3256	2,93 <sup>ns</sup>
Al*Genótipo	1	19,0026	5,96*
Resíduo	6	3,1872	
CV (%)		8,72	

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

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

<sup>ns</sup> Não significativo

**Quadro 4:** Análise de variância sumarizada da atividade da catalase (CAT) em ápices da raiz principal em dois genótipos de milho tratados com Al 0  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , por 24 horas.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	F
Bloco	2		
Alumínio (Al)	1	0,2033	2,96 <sup>ns</sup>
Genótipo	1	0,1996	2,90 <sup>ns</sup>
Al*Genótipo	1	0,0073	0,10 <sup>ns</sup>
Resíduo	6	0,0688	
CV (%)		4,63	

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

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

<sup>ns</sup> Não significativo

**Quadro 5:** Análise de variância sumarizada da atividade da peroxidase do ascorbato (APX) em ápices da raiz principal em dois genótipos de milho tratados com Al 0  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , por 24 horas.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	F
Bloco	2		
Alumínio (Al)	1	0,0018	0,32 <sup>ns</sup>
Genótipo	1	0,0309	5,51 <sup>ns</sup>
Al*Genótipo	1	0,0002	0,04 <sup>ns</sup>
Resíduo	6	0,0056	
CV (%)		13,26	

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

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

<sup>ns</sup> Não significativo

**Quadro 6:** Análise de variância sumarizada dos teores de ânion superóxido em ápices da raiz principal em dois genótipos de milho tratados com Al 0  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , por 24 horas.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	F
Bloco	2		
Alumínio (Al)	1	370,094	15,18 <sup>**</sup>
Genótipo	1	6,8972	0,28 <sup>ns</sup>
Al*Genótipo	1	256,8817	10,54 <sup>*</sup>
Resíduo	6	24,3813	
CV (%)		10,81	

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

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

<sup>ns</sup> Não significativo

**Quadro 7:** Análise de variância sumarizada dos teores de peróxido de hidrogênio em ápices da raiz principal em dois genótipos de milho tratados com Al 0  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , por 24 horas.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	F
Bloco	2		
Alumínio (Al)	1	25.48461	5.73*
Genótipo	1	26.80794	6.03*
Al*Genótipo	1	20.38838	4.58 <sup>ns</sup>
Resíduo	6	4.446968	
CV (%)		14.13	

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

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

<sup>ns</sup> Não significativo

**Quadro 8:** Análise de variância sumarizada da peroxidação de lipídeos em ápices da raiz principal em dois genótipos de milho tratados com Al 0  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , por 24 horas.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	F
Bloco	2		
Alumínio (Al)	1	0,3067	1,29 <sup>ns</sup>
Genótipo	1	2,2970	9,65 <sup>ns</sup>
Al*Genótipo	1	0,0040	0,02 <sup>ns</sup>
Resíduo	6	0,2381	
CV (%)		6,12	

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

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

<sup>ns</sup> Não significativo

**Quadro 9:** Análise de variância sumarizada da atividade da oxidase do NADPH em ápices da raiz principal em dois genótipos de milho tratados com Al 0  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , por 24 horas.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	F
Bloco	2		
Alumínio (Al)	1	477,8279	19,16**
Genótipo	1	5,5233	0,22 <sup>ns</sup>
Al*Genótipo	1	276,7199	11,10*
Resíduo	6	24,94	
CV (%)		12,03	

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

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

<sup>ns</sup> Não significativo

**Quadro 10:** Análise de variância sumarizada da atividade da oxidase da diamina em ápices da raiz principal em dois genótipos de milho tratados com Al 0  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , por 24 horas.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	F
Bloco	2		
Alumínio (Al)	1	0,5756	1,58 <sup>ns</sup>
Genótipo	1	0,9320	2,56 <sup>ns</sup>
Al*Genótipo	1	5,5650	15,31 <sup>**</sup>
Resíduo	6	0,3636	
CV (%)		5,78	

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

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

<sup>ns</sup> Não significativo

**Quadro 11:** Análise de variância sumarizada da atividade da peroxidase do NADH em ápices da raiz principal em dois genótipos de milho tratados com Al 0  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , por 24 horas.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	F
Bloco	2		
Alumínio (Al)	1	31,8479	11,0 <sup>**</sup>
Genótipo	1	5,2163	1,80 <sup>ns</sup>
Al*Genótipo	1	20,8250	7,2 <sup>*</sup>
Resíduo	6	2,8940	
CV (%)		16,40	

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

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

<sup>ns</sup> Não significativo

**Quadro 12:** Análise de variância sumarizada do efeito de inibidores de enzimas produtoras de ROIs no alongamento da raiz principal em dois genótipos de milho tratados com Al 0  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , por 24 horas.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	F
Bloco	3		
Tratamento	5	957.1662	28.98 <sup>**</sup>
Genótipo	1	386.5434	11.70 <sup>**</sup>
Trat*Genótipo	5	53.98223	1.63 <sup>ns</sup>
Resíduo	32	33.02606	
CV (%)		7,70	

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

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

<sup>ns</sup> Não significativo.