

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

ESTRESSE OXIDATIVO EM RESPOSTA AO ALUMÍNIO EM AVEIA  
BRANCA

Graciela Castilhos  
Engenheira Agrônoma/UFSM

Dissertação apresentada como um dos requisitos  
à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia  
Ênfase Fisiologia e Manejo Vegetal

Porto Alegre (RS), Brasil  
Abril de 2010



DEDICO

*Aos meus pais Jorge e  
Bernadete Castilhos, à minha irmã  
Caroline e ao meu Esposo João  
Rafael pelo carinho e apoio  
incondicional.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Jorge e Bernadete Castilhos, à minha querida irmã Caroline agradeço pelo incentivo e apoio em todos os momentos. À distância me fez perceber o quanto me fazem falta e são importantes na minha vida.

Ao meu esposo João Rafael, que está sempre ao meu lado, não tenho palavras para agradecer o amor, a compreensão, o apoio, a paciência e a motivação para alcançar meus objetivos e realizar-me profissionalmente.

Aos meus tios Rita e Fabiano, por todo incentivo e motivação nesta etapa de minha vida, e à minha avó Norma, por vir me visitar e me ligar quase todos os dias para saber como eu estava. À Adriana Colaço pela imensa amizade e por ser parte de minha família. À Júlia e Juliana por tornarem nossos dias mais divertidos!

Aos meus sogros Carmem e Jorge e à minha cunhada Luiza, por serem tão especiais que se tornaram minha segunda família e por entenderem quando não podiam vir nos visitar devido aos estudos nos finais de semana.

À professora Carla Andrea Delatorre, pela dedicação e orientação durante meu mestrado, por sempre estar disposta a tirar dúvidas. Enfim, pelas contribuições no aprimoramento de meus conhecimentos que servirão para a vida toda.

Aos professores do Departamento de Plantas de Lavoura, em especial ao professor Paulo Henrique de Oliveira, pelo apoio e ajuda nos experimentos de recrescimento, ao professor Marcelo Pacheco, pela ajuda nas análises estatísticas e à professora Marisa Azzolini, pela atenção e dedicação em me ajudar nas análises de microscopia.

À amiga e colega de faculdade Paula e à amiga Daiane, por sempre estarem ao meu lado, principalmente nas horas mais difíceis.

Às minhas queridas amigas e companheiras Ana Carolina e Fernanda, pela ajuda nos experimentos, por ficarem tardes no laboratório medindo e cortando raízes, pelas risadas nos momentos de descontrações, pelas horas de estudos e, principalmente por tornarem a minha vida em Porto Alegre muito mais alegre. Nossa amizade vai além do mestrado, adoro vocês!!

À Laize Espindula, pela amizade e por todo amparo no primeiro ano de mestrado, por todos os momentos agradáveis, por me ensinar técnicas e, principalmente por toda a contribuição nos conhecimentos científicos.

À Carolina Cover, pela amizade, desabafos, conselhos, por ser tão especial e por ser esta amiga tão querida que ficará sempre no meu coração!

À Vladirene pelas risadas e amizade; aos amigos do laboratório Adriana, Adriano e Letícia pela ajuda na execução dos experimentos, à Melissa agradeço principalmente pelas “milhares” de sementes descascadas!!

Aos Laboratoristas Fábio e Jonatan pela paciência, simpatia e por estarem sempre dispostos a ajudar, por me ensinarem a trabalhar em um Laboratório e por serem meus orientadores.

Ao professor da graduação Sylvio Henrique Bidet Dornelles, pelo incentivo na área de pesquisa.

À Bióloga Júlia Gomes Farias da UFSM pelo ajuda e empenho nas técnicas de estresse oxidativo.

Por fim, a CAPES- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, ao apoio financeiro.

# ESTRESSE OXIDATIVO EM RESPOSTA AO ALUMÍNIO EM AVEIA BRANCA<sup>1</sup>

Autora: Graciela Castilhos

Orientadora: Carla Andréa Delatorre

## RESUMO

A toxidez por alumínio (Al) é um dos fatores limitantes para a produção agrícola em solos ácidos, os quais abrangem aproximadamente 60% do território brasileiro. Evidências têm relacionado à tolerância ao Al com mecanismos de detoxificação de espécies reativas de oxigênio, uma vez que, além de inibir o desenvolvimento normal da raiz, o excesso de alumínio interfere nas reações enzimáticas. Sua absorção através da parede celular contribui para indução do estresse oxidativo, levando à oxidação de biomoléculas como lipídios, pigmentos e ácidos nucleicos. Com o objetivo de avaliar o efeito da exposição ao Al sobre o metabolismo oxidativo dos genótipos tolerantes UFRGS 17 e UPF 91Al-100-1-4 e sensível UFRGS 930598 de aveia branca, foram feitas análises fisiológicas, genéticas e bioquímicas em plântulas sob condição hidropônica após sete dias de tratamento com 740  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$ . Foram analisadas as enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT) e glutationa redutase (GR); o conteúdo de tióis não protéicos (NPSH) e ascorbato (AsA), assim como os níveis de clorofila A, B e carotenóides. O estresse oxidativo foi estimado através do teor de MDA, que avalia os níveis de peroxidação de lipídeos e pelo teor de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Constatou-se que o Al induz estresse oxidativo em aveia e, que os genótipos tolerantes UFRGS 17 e UPF 91Al-100-1-4 apresentam mecanismos eficientes de detoxificação. A peroxidação de lipídeos é significativa apenas no genótipo sensível, há um decréscimo na produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  na presença do Al, o mesmo é verificado para as atividades enzimáticas da CAT e APX. Os genótipos tolerantes aumentam a atividade de SOD e GR, assim como o teor de AsA e NPSH. Os genótipos tolerantes apresentam maior crescimento radicular comparado ao sensível e a tolerância ao Al nestes genótipos é governada pelo mesmo gene. A diferente deposição de Al nos tecidos da raiz entre os genótipos tolerantes sugere que o mecanismo de tolerância não seja de detoxificação externa, mas, possivelmente, relacionado à redução do estresse oxidativo causado pelo Al.

---

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (81p.) Abril, 2010.

# OXIDATIVE STRESS IN RESPONSE TO ALUMINUM IN OAT<sup>1</sup>

Author: Graciela Castilhos

Adviser: Carla Andréa Delatorre

## ABSTRACT

The toxicity of aluminum (Al) is one of the limiting factors to agriculture in acid soils, which cover approximately 60% of Brazilian territory. It is suggested that Al tolerance mechanisms is related to reactive oxygen species detoxification. Once Al not only inhibits the normal root development but also interferes with enzymatic reactions. Al uptake contributes to oxidative stress induction, leading to oxidation of biomolecules such as lipids, pigments and nucleic acids. In order to evaluate the effect of Al on the oxidative metabolism of tolerant oat genotypes (UFRGS 17 and UPF 91Al-100-1-4), and sensitive UFRGS 930598 oat, physiological, genetic and biochemical analysis were conducted under hydroponics after seven days of treatment with 740 $\mu$ M AlCl<sub>3</sub>. We analyzed the enzymes superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT) and glutathione reductase (GR), the content of non-protein thiols (NPSH) and ascorbate (AsA), and the levels of chlorophyll A, B and carotenoids. Oxidative stress was estimated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels and MDA content, which assesses the level of lipid peroxidation. It was found that Al induces oxidative stress in oat and the tolerant genotypes UFRGS 17 and UPF 91Al100-1-4 have efficient mechanisms of detoxification. The lipid peroxidation is significant only in the sensitive genotype. There is also a decrease in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in the presence of Al. The activities of CAT and APX are reduced upon Al exposure. The tolerant genotypes increase the activity of SOD and GR, as well as the content of AsA and NPSH. The tolerant genotypes have longer roots compared to the sensitive one. Al tolerance in these two genotypes is governed by the same gene. The different Al deposition in the root tissues of tolerant genotypes suggests that the mechanism of tolerance is not external detoxification, but possibly related to reduction of the oxidative stress caused by Al.

---

<sup>1</sup> Master of Science dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (81p.) April, 2010.

## SUMÁRIO

|   | Página |
|---|--------|
| 1 INTRODUÇÃO.....   | 1      |
| 1.1 Hipótese principal .....  | 3      |
| 1.2 Hipóteses secundárias .....                                     | 3      |
| 1.3 Objetivo principal: .....                                       | 3      |
| 1.4 Objetivos específicos: .....                                    | 4      |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....                                       | 5      |
| 2.1 A cultura da aveia branca em solos com presença de Al.....      | 5      |
| 2.2 O Alumínio no solo .....  | 7      |
| 2.3 O Al na planta.....   | 9      |
| 2.4 Mecanismos de tolerância ao Al.....                             | 13     |
| 2.4.1 Exsudação de ácidos orgânicos da raiz ativados por Al.....    | 13     |
| 2.4.2 Detoxificação interna.....                                    | 14     |
| 2.5 Estresse oxidativo .....  | 15     |
| 2.5.1 Produção de EROs.....   | 17     |
| 2.5.2 Efeitos de EROs em tecidos vegetais .....                     | 18     |
| 2.5.3 Sistema antioxidante.....                                     | 20     |
| 2.5.4 Efeitos de EROs em resposta ao estresse por Al.....           | 23     |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS.....   | 26     |
| 3.1 Material genético .....   | 26     |
| 3.2 Estudos do estresse oxidativo .....                             | 26     |
| 3.2.1 Extração enzimática.....                                      | 27     |
| 3.2.3 Determinação da atividade de catalase (CAT) .....             | 28     |
| 3.2.4 Determinação da atividade de glutathione redutase (GR).....   | 28     |
| 3.2.5 Determinação da atividade de ascorbato peroxidase (APX) ..... | 29     |
| 3.2.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).....             | 29     |
| 3.2.7 Estimativa da peroxidação de lipídeos (Técnica TBARS).....    | 30     |
| 3.2.8 Quantificação de peróxido de hidrogênio.....                  | 31     |
| 3.2.9 Histolocalização de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....       | 31     |



|         |   |    |
|---------|---|----|
| 3.2.10  | Histolocalização de Superóxido .....                                  | 32 |
| 3.2.11  | Extração de clorofila e carotenóides.....                             | 32 |
| 3.2.12  | Determinação de Ácido Ascórbico (AsA) e de tióis não-protéicos.....   | 33 |
| 3.3     | Avaliação da tolerância ao Al.....                                    | 34 |
| 3.3.1   | Preparo das sementes.....   | 34 |
| 3.3.2   | Crescimento em hidroponia.....  | 34 |
| 3.3.3   | Análise de recrescimento.....   | 35 |
| 3.3.4   | Distribuição de frequências .....                                     | 36 |
| 3.5     | Localização do Al.....  | 36 |
| 3.6     | Análise estatística .....   | 36 |
| 4       | RESULTADOS .....  | 38 |
| 4.1     | Metabolismo Antioxidante .....  | 38 |
| 4.1.1   | Atividade enzimática .....  | 39 |
| 4.1.1.1 | Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD).....                   | 39 |
| 4.1.1.2 | Atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX).....                   | 40 |
| 4.1.1.3 | Atividade da enzima Catalase (CAT).....                               | 42 |
| 4.1.1.4 | Atividade da enzima Glutathiona Redutase (GR) .....                   | 43 |
| 4.1.2   | Atividade não enzimática .....  | 44 |
| 4.1.2.2 | Conteúdo de tióis não-protéicos (NPSH) e Ácido Ascórbico (AsA). ....  | 44 |
| 4.1.2.3 | Pigmentos Cloroplastídicos .....                                      | 45 |
| 4.1.2.4 | Histolocalização de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....               | 47 |
| 4.1.1.5 | Histolocalização de Superóxido .....                                  | 47 |
| 4.1.1.6 | Teor de Peróxido de Hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) ..... | 49 |
| 4.1.1.7 | Peroxidação de lipídeos (TBARS) .....                                 | 49 |
| 4.2     | Análise de Recrescimento .....  | 51 |
| 4.2.1   | Distribuição de Frequência.....                                       | 52 |
| 4.3     | Citocalização de Al via hematoxilina.....                             | 53 |
| 5       | DISCUSSÃO .....   | 55 |
| 6       | CONSIDERAÇÕES FINAIS .....  | 67 |
| 7       | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                      | 69 |
| 8       | VITA.....   | 81 |

## RELAÇÃO DE TABELAS

Página

|  |    |
|--|----|
| 1. Mecanismos de remoção de EROs em células vegetais (Moller et al., 2007).....  | 23 |
| 2. Composição da solução nutritiva: fontes minerais usadas e concentração final..  | 27 |
| 3. Composição da solução nutritiva: fontes minerais usadas e concentração final..  | 35 |
| 4. Análise de variância, com probabilidade determinada para o efeito de alumínio, órgão e genótipo.....  | 38 |
| 5. Coeficientes de correlação entre as diferentes análises relacionadas ao metabolismo antioxidante e pigmentos cloroplastídicos nos genótipos de aveia branca.....                  | 39 |
| 6. Médias do recrescimento da raiz principal (mm) sob tratamento de 740 $\mu$ M de Al nos genótipos tolerantes UFRGS 17 e UPF 91Al 100-1-4 e, no genótipo sensível UFRGS 930598..... | 52 |

## RELAÇÃO DE FIGURAS

|  | Página |
|--|--------|
| 1 Distribuição das atividades reativas de $Al^{+3}$ e das espécies mononucleares de Al-OH em função do pH (modificado de Kinraide & Parker, 1989).....   | 8      |
| 2 (A) Sucessivas reduções do oxigênio molecular para $OH^{\bullet}$ . A reação envolve (1) a redução de um elétron do oxigênio molecular para formação de $O_2^{\bullet-}$ , (2) dismutação de $O_2^{\bullet-}$ para $H_2O_2$ , e (3) redução de um elétron do $H_2O_2$ para $OH^{\bullet}$ . (B) Redução dirigida por íon $Fe^{+2}$ de $H_2O_2$ para $OH^{\bullet}$ via reação de Fenton (Modificado de Pospisil et al., 2004).....   | 18     |
| 3 Mecanismos de remoção de EROs em células vegetais (Noctor et al., 2002).....   | 22     |
| 4 Perfil da atividade da enzima superóxido dismutase em PAGE no ápice radicular, na zona diferenciada da raiz e nas folhas de plântulas de aveia dos genótipos UFRGS 17 (1), UFRGS 930598 (2) e UPF 91Al 100-1-4 (3) submetidas ao estresse por toxidez de Al (+) durante sete dias.....   | 40     |
| 5 Atividade da enzima ascorbato peroxidase no ápice radicular, na zona diferenciada da raiz (raiz) e nas folhas de plântulas de aveia dos genótipos UFRGS 17, UFRGS 930598 e UPF 91Al 100-1-4 submetidas ao estresse por toxidez de Al (+) ou sem estresse (-) durante sete dias. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam genótipos dentro da mesma dose e órgão e, letras minúsculas comparam doses dentro do mesmo genótipo e órgão, pelo teste Duncan ao nível de 5%..... | 41     |
| 6 Atividade da enzima catalase no ápice radicular, na zona diferenciada da raiz (raiz) e nas folhas de plântulas de aveia dos genótipos UFRGS 17, UFRGS 930598 e UPF 91 Al 100-1-4 submetidas ao estresse por toxidez de Al (+) ou sem estresse (-) durante sete dias. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam genótipos dentro da mesma dose e órgão e, letras minúsculas comparam doses dentro do mesmo genótipo e órgão, pelo teste Duncan ao nível de 5%.....            | 42     |

- 7 Atividade da enzima glutatona redutase no ápice radicular, na zona diferenciada da raiz (raiz) e nas folhas de plântulas de aveia dos genótipos UFRGS 17, UFRGS 930598 e UPF 91Al 100-1-4 submetidas ao estresse por toxidez de Al (+) ou sem estresse (-) durante sete dias. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam genótipos dentro da mesma dose e órgão e, letras minúsculas comparam doses dentro do mesmo genótipo e órgão, pelo teste Duncan ao nível de 5%..... 44
- 8 Concentração de tióis não protéicos (NPSH) ( $\mu\text{mol-SH/g}$  PF) no ápice radicular, na zona diferenciada da raiz (raiz) e na parte aérea (folha), nos genótipos tolerantes UFRGS 17 e UPF p1 Al 100-1-4 e, no genótipo sensível UFRGS 930598, submetidas ao estresse por toxidez de Al (+) ou sem estresse (-) durante sete dias. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam genótipos dentro da mesma dose e órgão e, letras minúsculas comparam doses dentro do mesmo genótipo e órgão, pelo teste Duncan ao nível de 5%..... 45
- 9 Concentração de ácido ascórbico (AsA) ( $\mu\text{g/g}$  de PF) no ápice radicular, na zona diferenciada da raiz (raiz) e na parte aérea (folha), nos genótipos tolerantes UFRGS 17 e UPF p1 Al 100-1-4 e, no genótipo sensível UFRGS 930598, submetidas ao estresse por toxidez de Al (+) ou sem estresse (-) durante sete dias. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam genótipos dentro da mesma dose e órgão e, letras minúsculas comparam doses dentro do mesmo genótipo e órgão, pelo teste Duncan ao nível de 5%..... 46
- 10 Conteúdo (mg/g MF) de clorofila A, B, e carotenóides em plântulas de aveia branca dos genótipos sensível UFRGS 930598 e nos genótipos tolerantes UFRGS 17 e UPF 91Al 100-1-4 submetidas ao estresse por toxidez de Al (+) ou sem estresse (-) durante sete dias. NS: Não significativo pelo teste Duncan ao nível de 5%..... 46
- 11 Histolocalização de peróxido de hidrogênio nos genótipos de aveia branca. A coloração marrom avermelhada representa a formação de peróxido de hidrogênio em raízes. A) UFRGS 930598 com Al; B) UFRGS 930598 sem Al; C) UFRGS 17 com Al; D) UFRGS 17 sem Al; E) UPF 91Al100-1-4 com Al; F) UPF 91Al 100-1-4 sem Al (aumento 40x)..... 47
- 12 Histolocalização de superóxido nos genótipos de aveia branca. A coloração azulada representa a formação de superóxido em raízes. A) UFRGS 930598 com Al; B) UFRGS 930598 sem Al; C) UFRGS 17 com Al; D) UFRGS 17 sem Al; E) UPF 91Al100-1-4 com Al; F) UPF 91Al 100-1-4 sem Al (aumento 40x)..... 48
- 13 Histolocalização de superóxido nos genótipos de aveia branca. A coloração azulada representa a formação de superóxido em raízes. A) produção de superóxido em células da epiderme de UFRGS 17 sem Al; B) produção de superóxido na raiz lateral de UPF 91Al 100-1-4 sem Al (aumento 100x)..... 49

- 14 Produção de peróxido de hidrogênio ( $\mu\text{mol/g}$  de peso fresco) no ápice radicular, na zona diferenciada da raiz (raiz) e na parte aérea (folha), nos genótipos tolerantes UFRGS 17 e UPF 91 Al 100-1-4 e, no genótipo sensível UFRGS 930598, submetidas ao estresse por toxidez de Al (+) ou sem estresse (-) durante sete dias. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam genótipos dentro da mesma dose e órgão e, letras minúsculas comparam doses dentro do mesmo genótipo e órgão, pelo teste Duncan ao nível de 5%..... 50
- 15 Níveis de malonaldeído (MDA) ( $\text{mmol MDA/mg}$  proteína) no ápice radicular, na zona diferenciada da raiz (raiz) e na parte aérea (folha), nos genótipos tolerantes UFRGS 17 e UPF p1 Al 100-1-4 e, no genótipo sensível UFRGS 930598, submetidas ao estresse por toxidez de Al (+) ou sem estresse (-) durante sete dias. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam genótipos dentro da mesma dose e órgão e, letras minúsculas comparam doses dentro do mesmo genótipo e órgão, pelo teste Duncan ao nível de 5%..... 51
- 16 Sintomas da exposição temporária ao Al em aveia branca. Calosidade formada pela presença do Al tóxico em plântulas de aveia. Raízes com coloração escurecida e com a presença de uma curvatura na extremidade. Sintomas presentes após 48 h de exposição a  $740\mu\text{M}$  de Al, (A) genótipo tolerante, (B e C) genótipo sensível..... 52
- 17 Distribuição das frequências do recrescimento da raiz principal (mm) da população UFRGS 91 Al 100-1-4 x UFRGS 17 após choque de  $\text{Al}^{+3}$  ( $740\mu\text{M}$ )..... 53
- 18 Cortes transversais ( $10\mu\text{m}$ ) de raízes de aveia branca coradas com hematoxilina após sete dias de exposição a  $740\mu\text{M}$  de Al. A coloração roxa avermelhada indica a localização de Al. (A) UFRGS 930598, (B) UFRGS 17 e (C) UPF 91Al 100-1-4 (Aumento 200x)..... 54

## 1 INTRODUÇÃO

A toxidez por alumínio (Al) constitui um problema em solos ácidos, uma vez que se torna um dos fatores limitantes para a produção agrícola em solos com pH abaixo de 5,5. Muitos desses solos ácidos estão localizados em países em desenvolvimento, com crescente pressão populacional, levando à insegurança alimentar nestas regiões (Ligaba *et al.*, 2009). A acidez natural dos solos aumenta em virtude da alta utilização de fertilizantes amoniacais e da frequente liberação atmosférica de poluentes industriais, associada à lixiviação de solos com chuva ácida (Rengel & Zhang, 2003).

No Brasil, aproximadamente 60% dos solos com potencial agrícola são ácidos (Rossiello & Jacob Neto, 2006), sendo a área de “Cerrados” a mais afetada (Embrapa, 1999). A elevada acidez, associada a grandes quantidades de Al no solo, representam um problema para adaptação de cereais de interesse agrônômico (Echart & Cavalli-Molina, 2001). Aliados à toxidez de Al, os solos ácidos apresentam outros fatores que limitam a produção agrícola, como a toxidez por manganês (Mn) e ferro (Fe) e deficiência de fósforo (P), sendo esta a maior limitação nutricional em solos ácidos (Kochian *et al.*, 2004).

Os sintomas de toxidez por Al manifestam-se rapidamente, destacando-se como característica típica o crescimento radicular limitado, o qual é especialmente importante em condições de deficiência hídrica ou limitação de fósforo (Rossiello & Jacob Neto, 2006). Além de inibir a formação normal da raiz, o excesso de Al interfere em reações

enzimáticas e sua absorção através da parede celular contribui para indução do estresse oxidativo, levando a oxidação de biomoléculas como lipídios, pigmentos e ácidos nucleicos (Tamás *et al.*, 2006).

O melhoramento vegetal para tolerância ao Al é considerado um excelente caminho para aumentar o desempenho de plantas cultivadas em solos ácidos. As respostas à tolerância ao Al diferem entre e dentro das diferentes espécies, sendo a identificação de mecanismos de tolerância e o conhecimento do controle destas estratégias importantes para uma melhor compreensão do comportamento de cultivares nesta situação (Echart & Cavalli-Molina, 2001).

A toxidez por Al e seus significativos prejuízos no desenvolvimento das plantas tem sido um problema estudado desde as primeiras décadas do século passado. Várias pesquisas têm sido realizadas para tentar elucidar os mecanismos responsáveis pela toxidez e pela tolerância em diversos genótipos (Hartwell & Pember, 1918; Magistad, 1925; Fernandes, 2006), a fim de reduzir os efeitos danosos deste metal em plantas.

Têm sido constatados dois principais mecanismos de tolerância ao Al em plantas. A detoxificação interna a partir de compartimentação no vacúolo e a exclusão do alumínio pela raiz, através da liberação de ácidos orgânicos que possuem a capacidade de quelar o Al na rizosfera evitando o contato danoso com a raiz (Ma *et al.*, 2001).

Recentemente, trabalhos verificaram que, ao lado destes mecanismos de exclusão, está a eficiência do sistema antioxidante, que aumenta a capacidade de tolerância da planta a estresses, devido à diminuição dos efeitos causados pelas espécies reativas de oxigênio (EROs), como, por exemplo, a peroxidação de lipídeos. Além disso, as plantas utilizam EROs como mensageiros secundários em rotas de transdução de sinal. O acúmulo de EROs tem se mostrado crucial para o desenvolvimento e síntese

do sistema antioxidante enzimático, como o aumento da síntese da enzima superóxido dismutase (SOD), responsável pela prevenção da geração descontrolada de EROs em células na presença do Al (Giannakoula *et al.*, 2010).

Por fim, a identificação de diferentes mecanismos de tolerância ao Al pode permitir combiná-los, produzindo genótipos com maior tolerância. A eficiência do sistema antioxidante vegetal pode ser um importante atributo para aumentar a tolerância ao estresse por Al nas plantas.

### **1.1 Hipótese principal**

O metabolismo oxidativo em resposta à exposição ao Al é diferenciado entre genótipos tolerantes e sensíveis de aveia branca.

### **1.2 Hipóteses secundárias**

Os genótipos tolerantes de aveia branca expostos ao Al (UFRGS 17 e UPF 91 A1100-1-4) têm sua tolerância devido a mecanismos e genes diferentes.

A resposta oxidativa é diferenciada no ápice radicular e a ocorrência de menor estresse permite manutenção parcial do crescimento do meristema nos genótipos tolerantes.

### **1.3 Objetivo principal:**

Avaliar o efeito da exposição ao Al sobre o metabolismo oxidativo em genótipos tolerantes e sensíveis de aveia branca.



**1.4 Objetivos específicos:**

1. Fenotipar, quanto à tolerância ao Al, indivíduos da geração F2 dos cruzamentos entre os genótipos de aveia UFRGS 17 e UPF 91 A1100-1-4.

2. Verificar, indiretamente, se a tolerância de UFRGS17 e UPF 91 A1100-1-4 deve-se a ação de mesmo gene;

3. Analisar o estresse oxidativo em resposta a presença de Al tóxico nos genótipos UFRGS 17 (tolerante), UFRGS 930598 (sensível), e UPF 91A1100-1-4 (tolerante).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A cultura da aveia branca em solos com presença de Al

A aveia branca (*Avena sativa* L.) é uma espécie da família Poáceas, originária do oriente médio, de clima temperado e úmido, o que possibilitou seu cultivo na região sul do Brasil (Federizzi *et al.*, 1995). É uma espécie anual, destinada a produção de grãos, com grande contribuição para alimentação humana.

Devido ao alto potencial de recuperação da estrutura do solo e da elevada capacidade de se adaptar a diversos ambientes, a aveia está sendo empregada em sistemas de semeadura direta onde tradicionalmente eram cultivados apenas trigo e cevada (Federizzi *et al.*, 1995). Entre os principais cereais de inverno utilizados nos sistema de produção pelos agricultores do sul do Brasil (trigo, aveia e cevada), a aveia é o mais tolerante ao alumínio (Camargo & Felício, 1984).

Em solos ácidos, geralmente com pH abaixo de 5, o Al adquire sua forma catiônica  $Al^{+3}$ , tornando-se tóxico para as plantas (Rossiello & Jacob Neto, 2006). Nestas áreas, é empregada a prática da calagem, como forma de elevar o pH do solo e conseqüentemente converter o Al para formas menos tóxicas. No entanto, com o sistema plantio direto, a não incorporação do calcário torna menos eficiente a correção da acidez do solo em profundidade, pois o calcário apresenta lenta solubilidade. Isto gera um gradiente de pH no solo, limitando a zona de crescimento radicular, a qual é

especialmente importante em condições de deficiência hídrica ou limitação de fósforo (Rossiello & Jacob Neto, 2006).

Além de inibir a formação normal da raiz, o excesso de Al interfere nas reações enzimáticas e sua absorção através da parede celular contribui para indução do estresse oxidativo, levando a oxidação de biomoléculas como lipídios, pigmentos e ácidos nucleicos (Tamás *et al.*, 2006). Em vista desta situação, torna-se necessária a seleção de variedades produtivas e tolerantes à toxidez de Al.

A herança da tolerância ao Al em cereais de inverno é considerada simples, sendo atribuída a um ou poucos genes. A tolerância ao Al em trigo foi determinada como uma característica monogênica com ação de dominância ou aditividade (Kerridge & Kronstad, 1968; Campbell & Lafever, 1981; Aniol & Gustafson, 1984). Porém, outros trabalhos apontam dois ou mais genes envolvidos no mecanismo de tolerância ao Al (Camargo & Oliveira, 1981; Garvin *et al.* 2000). Existem poucos estudos sobre a genética da tolerância ao Al em aveia branca, tendo a maioria sido feitos pelo grupo de pesquisa em aveia branca da UFRGS. Sánchez-Chacón *et al.* (2000) e Nava *et al.* (2006) identificaram um gene dominante para tolerância ao Al em aveia branca. Wagner *et al.* (2001) identificaram dois genes dominantes para essa característica. Em *A. strigosa*, foram identificados quatro QTL's (*Quantitative Trait Loci*) associados à tolerância ao Al, que juntos explicaram 55% da variação fenotípica (Wight *et al.*, 2006), o que indica que existe mais de uma fonte de tolerância ao Al no gênero *Avena*.

Os mecanismos envolvidos na tolerância ao Al em aveia não são conhecidos. É possível que genótipos diferentes utilizem estratégias diversas, principalmente considerando a ausência deste estresse na região de origem da aveia branca e que as principais fontes de tolerância ao Al em trigo e aveia foram desenvolvidas no Brasil (Rajaram *et al.*, 1981).

Assim, a identificação dos mecanismos relacionados à tolerância ao Al em diferentes genótipos de aveia branca pode permitir o desenvolvimento de novas estratégias, inclusive a piramidização de mecanismos, gerando genótipos com nível superior de tolerância ao Al tóxico.

## 2.2 O Alumínio no solo

O Al compõe 8% da crosta terrestre, sendo o terceiro elemento mais abundante da litosfera, após o oxigênio e o silício. Nos solos, o Al está presente na fase sólida e se encontra como minerais primários e secundários na forma de aluminossilicatos, oxihidróxidos, sulfatos e fosfatos (Fernandes, 2006).

Em solos com elevado pH, os íons Al que estão adsorvidos nos colóides dos solos reagem com os radicais aniônicos, entre eles o íon  $\text{OH}^-$ . Esta interação resulta na formação do complexo  $\text{Al}(\text{OH})_3$  insolúvel, evitando a interação de cargas positivas do íon Al com cargas negativas presentes nas partículas do solo, reduzindo o efeito das cargas iônicas do Al e atenuando sua atividade fitotóxica (Rossiello & Jacob Neto, 2006). Porém, em solos com pH menores que 5,5, a dissolução das formas sólidas do Al tende a aumentar, liberando a sua forma iônica na solução do solo. Com a diminuição do pH, o cátion Al é adsorvido pelas superfícies eletronegativas de colóides dos solos, desestruturando a eletronegatividade das partículas do solo e, por consequência, reduzindo a capacidade de adsorção de cátions (Curtin & Smillie, 1983). Esta situação tem sido verificada em solos tropicais submetidos a intenso intemperismo.

A espécie trivalente de Al, a qual é a mais nociva para o crescimento das plantas (Kochian, 1995), prevalece na forma de hexahidrato octaedro ( $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ ), ocorrendo de forma predominante em pH inferior a 4,0 (Rossiello & Jacob Neto, 2006). Outras formas de Al tóxico podem ser encontradas quando o cátion de Al trivalente está

parcialmente hidrolisado na forma de  $\text{Al(OH)}^{2+}$ . Com o aumento do pH, ocorrem reações de hidrólise formando complexos com menor efeito tóxico (Rossiello & Jacob Neto, 2006), conforme Figura 1.

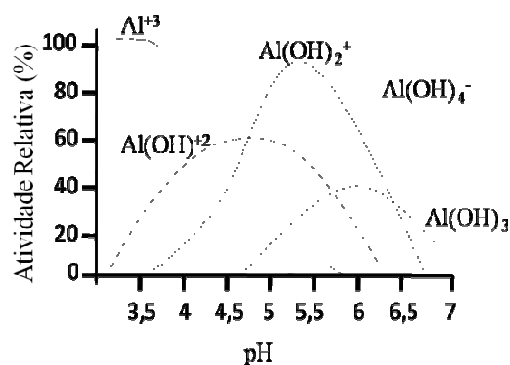


FIGURA 1. Distribuição das atividades reativas de  $\text{Al}^{3+}$  e das espécies mononucleares de Al-OH em função do pH (modificado de Kinraide & Parker, 1989).

O Al, por ser um cátion trivalente, é firmemente retido nos colóides e, assim, sua concentração na solução do solo é baixa, permanecendo dentro da faixa de  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (Haynes & Mokolobate, 2001). Entretanto, o metal torna-se tóxico para o desenvolvimento da maioria das espécies vegetais, mesmo em baixas concentrações, afetando o crescimento e funcionamento das raízes e bloqueando os mecanismos de aquisição e transporte de água e nutrientes (Rossiello & Jacob Neto, 2006).

A toxidez por Al é um dos fatores limitantes para a produção agrícola em solos ácidos. Os solos ácidos no mundo ocupam aproximadamente 37,8 milhões de  $\text{km}^2$ , dos quais 67% apresentam valores de pH inferiores a 5,5 (Eswaran *et al.*, 1997). Em várias partes do mundo, os níveis de acidez do solo estão aumentando devido à atividade humana. Nas áreas cultivadas, a nitrificação devido à aplicação de altas doses de fertilizantes amoniacais tem agravado a situação (Rengel & Zhang, 2003).

### 2.3 O Al na planta

A capacidade de troca de cátions de raízes desempenha um importante papel na permuta de cátions entre a planta e os colóides do solo. Esta relação explica como as diferentes espécies vegetais sobrevivem em ambientes com baixa disponibilidade de cátions a serem absorvidos (Gray *et al.*, 1953), como ocorre em ambientes com elevada quantidade de Al. A capacidade de troca de cátions da raiz ocorre devido à presença de cargas negativas decorrentes de grupos ácidos funcionais presentes em várias moléculas que compõem o tecido das raízes (Jozefaciuk & Szatanik- Kloc, 2004).

O  $Al^{+3}$  corresponde à forma mais rizotóxica e interfere em diversos processos fisiológicos e moleculares (Kochian *et al.*, 2005), podendo ser igualmente problemático no ambiente iônico prevalecente no apoplasto, na superfície externa da membrana plasmática, nos vacúolos, ou ainda em exsudados xilemáticos (Kinraide, 1991). Em estudo com plântulas de trigo submetidas a uma concentração fixa de Al, combinada com níveis de pH decrescentes, a partir de 5,0, Parker *et al.* (1988) observaram que, conforme aumentava a atividade do Al, o crescimento radicular diminuía e deduziram ser a espécie trivalente a responsável pela manifestação da toxidez.

A toxidez iônica por excesso de Al implica em limitações nutricionais, provocando deficiências de Ca e Mg às plantas, e reduz a disponibilidade de P. O Al em concentrações elevadas no solo reduz o crescimento radicular, tornando limitada a absorção de nutrientes e água para as plantas (Kochian *et al.*, 2005). Outra limitação ocorre devido ao Al precipitar o P nas raízes, reduzindo sua translocação para parte aérea (Alam, 1981). Há uma grande dificuldade na detecção dos efeitos do Al *per se*, pois a expressão da toxidez é modificada pelo pH, composição iônica da solução, nível de disponibilidade de bases trocáveis e por teores de matéria orgânica (Rossiello & Jacob Netto, 2006).

O aumento da concentração de Al e do tempo de exposição às plantas ao mesmo resultam em acúmulo de formas trocáveis e não-trocáveis de Al no apoplasto, nos tecidos apicais das raízes, induzindo os sintomas de toxidez nas plantas. Os principais sintomas são: inibição do crescimento radicular, acúmulo de calose na membrana plasmática e acúmulo e distribuição de formas tóxicas de Al nas células.

A inibição do crescimento radicular pode ser vista como o sintoma inicial da toxidez por Al (Foy, 1988), sendo o ápice da raiz, especificamente a parte distal da zona de transição da raiz, o primeiro alvo do Al tóxico (Sivaguru & Horst, 1998), modificando, assim, a morfologia da raiz (Ciamporova, 2002). O Al pode inibir o crescimento radicular em concentrações micromolares, em minutos ou horas após o contato com as células da raiz, podendo interagir com locais no apoplasto e no simplasto da célula (Ma *et al.*, 2001).

Os danos gerados pelo Al são percebidos em diversos locais nas células. Entre eles estão a parede celular, a membrana plasmática, o citoesqueleto das células da raiz e o núcleo (Kochian *et al.*, 2005).

O Al desloca os íons  $\text{Ca}^{+2}$  da parede celular, uma vez que se liga às pectinas da parede celular com muito mais força que o  $\text{Ca}^{+2}$  e, assim, induz uma situação de deficiência do cátion deslocado (Kinraide, 1998). O deslocamento de  $\text{Ca}^{+2}$  desestabiliza a parede celular, tornando-a mais rígida e diminuindo a expansão normal da célula (Kochian *et al.*, 2005).

Em contato com a porção negativa da membrana plasmática, o Al pode modificar a estrutura e o ambiente iônico da mesma. Estas modificações decorrem do Al possuir grande afinidade pelos lipídeos da membrana, causando peroxidação destes, alterando a fluidez e modificando a homeostase celular (Kochian *et al.*, 2005), principalmente devido ao deslocamento de íons  $\text{Ca}^{+2}$  (Cakmak & Horst, 1991).

O deslocamento de  $\text{Ca}^{+2}$  da superfície da membrana implica na síntese de calose ( $\beta$ -1,3 glucano) no apoplasto, inibindo o transporte via plasmodesmos (Sivaguru *et al.*, 2000). Ainda, o potencial eletroquímico da membrana pode ser alterado na presença do Al, devido à capacidade de bloquear os transportadores transmembrana e induzir distúrbios locais e alterações na concentração de íons, gerando a despolarização da membrana (Liendberg *et al.*, 2001).

Outro efeito do Al na membrana plasmática é a inibição da atividade das  $\text{H}^+$ -ATPases, as quais regulam o fluxo de  $\text{H}^+$  que atravessa a membrana plasmática, impedindo a formação do gradiente de  $\text{H}^+$  (Ahn *et al.*, 2001). Deste modo, também afeta o transporte secundário de íons, alterando o status iônico e a homeostase celular (Kochian *et al.*, 2005).

A perturbação da homeostase celular é verificada principalmente em relação aos cátions divalentes, sendo as mais relevantes aquelas com o  $\text{Ca}^{+2}$  e com o  $\text{Mg}^{+2}$ . Estes íons desempenham papel importante na transdução de sinais, no metabolismo e no crescimento vegetal. A ação fitotóxica do Al implica na inibição do alongamento celular, parcialmente pelo bloqueamento dos processos de afrouxamento da parede celular que seriam mediados por íons  $\text{Ca}^{+2}$  (Decreux & Messiaen, 2005).

Além de interagir diretamente com íons  $\text{Ca}^{+2}$ , o Al inibe vários canais da membrana, dificultando a absorção de íons  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{+2}$ , alterando a voltagem destes canais. Ainda, ao modificar os níveis de pH citosólico, o Al altera as rotas de transdução de sinal mediadas pelo  $\text{Ca}^{+2}$  (Kochian *et al.*, 2005). A modificação nas rotas de sinalização se deve também à inibição de enzimas dependentes de  $\text{Ca}^{+2}$ , como as fosfolipases C (Jones & Kochian, 1997; Rengel & Zang, 2003).

O deslocamento do  $\text{Ca}^{+2}$  também resulta indiretamente na interferência do Al nos elementos do citoesqueleto (microtúbulos, filamentos de actina) (Sivaguru *et al.*,



1999), via conexões estabelecidas por uma família de proteínas quinases denominadas WAK (“*wall-associated kinase*”) que atuam entre a parede celular e a membrana plasmática (Decreux & Messiaen, 2005).

A concentração de  $\text{Al}^{3+}$  no interior da célula, onde o pH do simplasto é neutro, é bastante reduzida ( $10^{-10}\text{M}$ ) devido a formação de  $\text{Al}(\text{OH})^3$ . No entanto, mesmo esta baixa concentração pode ser tóxica, devido à grande afinidade do Al por ligantes de oxigênio. Por exemplo, sabe-se que Al inibe a atividade de  $\text{H}^+$ ATPases da membrana plasmática (Ahn *et al.*, 2001). Isto se deve à maior força de ligação do Al ao ATP em relação ao Mg ( $10^7$  vezes maior). Exposições prolongadas ao Al podem levar a interações com estruturas nucleares, afetando a composição do DNA e a estrutura da cromatina (Silva *et al.*, 2000; Kochian *et al.*, 2005). A ligação do Al com a superfície do núcleo durante a fase G2 do ciclo celular resulta na desestruturação do citoesqueleto e inibição do processo de divisão celular (Franklin & Cande, 1999; Kochian, *et al.*, 2005).

O Al induz a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), como superóxido e peróxido de hidrogênio. Estes radicais estão associados aos danos peroxidativos nos lipídeos da membrana (Cakmak & Horst, 1991) e à formação de radical hidroxil, que, além de causar peroxidação de lipídeos, provoca desnaturação de proteínas, mutações no DNA e inibição da fotossíntese (Rengel & Zang, 2003). A produção de EROs provoca disfunções mitocondriais e inibe o crescimento radicular (Yamamoto *et al.*, 2002).

Apesar dos efeitos prejudiciais do Al nos vegetais, algumas espécies como chá (*Camellia sinensis*) e hortênsia (*Hydrangea macrophylla*) possuem capacidade de acumular elevados teores de Al em sua folhagem, sem provocar danos em seu desenvolvimento (Rossiello & Jacob Netto, 2006). Estas plantas acumuladoras utilizam estratégias para detoxificação interna do Al. Aonde o Al é complexado a outras

moléculas reduzindo a quantidade de Al livre no citoplasma.

## **2.4 Mecanismos de tolerância ao Al.**

A menor sensibilidade ao Al em plantas se expressa por uma menor inibição do crescimento radicular e menor acúmulo apical de Al nas espécies tolerantes, em relação às sensíveis (Ahn *et al.*, 2004).

A tolerância ao Al pode ser alcançada por mecanismos que facilitam a exclusão do Al do ápice radicular ou por mecanismos que conferem a capacidade das plantas de tolerar Al no simplasma (Kochian *et al.*, 2004).

### **2.4.1 Exsudação de ácidos orgânicos da raiz ativada por Al.**

Este mecanismo é considerado, atualmente, como a principal estratégia relacionada à tolerância ao Al nas diferentes espécies vegetais (Hartwig *et al.*, 2007). Consiste na liberação na rizosfera de ácidos orgânicos, como malato, citrato e oxalato, os quais formam complexos com o Al, reduzindo sua disponibilidade (Ma *et al.*, 2001). Além disso, os ácidos orgânicos favorecem a fitodisponibilidade de P, devido ao poder que estes compostos possuem em formar complexos estáveis com o Al, dissociando as ligações Al-P e liberando o P para a solução do solo, tornando-o disponível às plantas (Sposito, 1989).

Ma *et al.* (2000) sugerem dois modelos de secreção de ânions de ácidos orgânicos estimulados por Al. No primeiro modelo, a resposta ao Al ocorre rapidamente, entre 15 a 30 min. Neste, o Al ativa canais de ânions na membrana plasmática que, por sua vez, são permeáveis aos ânions de ácidos orgânicos. No segundo modelo, a liberação de ácidos orgânicos ocorre várias horas após a exposição ao Al. O Al interage com um receptor protéico na membrana plasmática e ativa a

transcrição de genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo de ácidos orgânicos e transportadores destes.

Espécies como milho (Piñeros *et al.*, 2002), cevada (Ma *et al.*, 2004), soja (Yang *et al.*, 2000), fumo (Delhaize *et al.*, 2000) e sorgo (Magalhães, 2002) liberam citrato em resposta ao Al. Já em trigo sarraceno (Zheng *et al.*, 1998b) observou-se secreção de oxalato e em *Arabidopsis* (Hoekenga *et al.*, 2003) e trigo (Sasaki *et al.*, 2004), a liberação de malato. Em centeio (Matsumoto, 2000), triticale (Ma *et al.*, 2000), nabo e aveia (Zheng *et al.*, 1998a) ocorre a liberação de citrato e malato.

Dentre os ácidos orgânicos utilizados como quelantes do Al, o citrato destaca-se como o mais comum e o mais efetivo, visto que, por ser um ânion tricarboxilado, forma um complexo muito estável com o Al, comparado com os quelatos formados, por exemplo, a partir de malato que é um ânion dicarboxilado (Hartwig *et al.*, 2007). Em algumas espécies o aumento da secreção de ácidos orgânicos pelas plantas está localizado no ápice da raiz e depende da presença do Al na solução (Ma *et al.*, 2001).

#### **2.4.2 Detoxificação interna**

Um segundo mecanismo de resistência ao Al está baseado na complexação e detoxificação de Al após sua entrada na planta. Algumas espécies acumulam elevados níveis de Al na parte aérea.

Matsumoto (2000) subdivide em cinco os tipos de detoxificação interna e se refere a estes como mecanismos intracelulares de tolerância. São eles: 1) quelação do Al por ácidos orgânicos ou compostos fenólicos no citosol; 2) compartimentação do Al no vacúolo; 3) promoção de processos biossintéticos de ácidos orgânicos, que são quelados com Al nas células; 4) Aumento da extensibilidade e do conteúdo de pectina na parede; 5) anulação do estresse induzido por oxigênio reativo.

Morita *et al.* (2008) identificaram que as raízes da planta de chá (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) possuem uma enorme capacidade de acumular Al formando complexos solúveis e insolúveis em água, indicando que o Al é detoxificado. Os níveis do complexo de Al com oxalato aumentam em resposta ao aumento dos níveis de Al, demonstrando que o oxalato é importante no mecanismo de detoxificação de Al nas raízes ou na interface solo-raiz. Após entrar nas células da raiz, a forma química do ácido orgânico é modificada, formando complexos de Al com citrato durante a translocação no xilema e acúmulo nas células das folhas. A formação de complexos de Al com citrato também foi verificada em *Fagopyrum esculentum* (Ma *et al.*, 2001). Ao passar pela membrana plasmática, o Al foi quelado com oxalato na forma 1:3. Porém, quando o Al foi translocado pelo xilema da raiz para parte aérea, ocorreu a formação do complexo Al-citrato, forma esta que foi estocada no vacúolo, inibindo a toxidez.

Em hortênsia (*Hydrangea sepals*), ocorre a formação de complexos de Al com compostos orgânicos, como o delfinidina 3-glicosídeo, os quais são acumulados nas sépalas, conferindo diferentes cores à flor. Esta planta tem a capacidade de acumular até 4 g de Al/kg de peso seco em suas sépalas, sem sinais de danos a célula (Ma *et al.*, 2001).

Em trigo sarraceno, a presença de Al não afetou a concentração de ácido oxálico nas células das folhas (Hartwig *et al.*, 2007). No entanto, mais de 80% do Al foi encontrado complexado com oxalato e sequestrado no vacúolo das células das folhas (Shen *et al.*, 2002).

## **2.5 Estresse oxidativo**

Um dos processos de detoxificação do Al envolve a anulação do estresse induzido por oxigênio reativo ou estresse oxidativo.

O oxigênio ( $O_2$ ) em seu estado natural não é reativo. Porém, com a evolução do metabolismo aeróbico, no qual o  $O_2$  participa comoceptor final de elétrons na respiração aeróbica, ocorre a formação de espécies reativas de oxigênio (Foyer & Noctor, 2000). Estima-se que 1% do consumo total de  $O_2$  de um tecido vegetal participe da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Moller, 2001). As EROs são constantemente produzidas em plantas como subprodutos da respiração e fotossíntese. Assim, a produção de EROs em mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos tornou-se inevitável (Scandalios, 1993; Apel & Hirt, 2004). Algumas destas espécies, como superóxido ( $O_2^-$ ), oxigênio singlete ( $^1O_2^*$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $\cdot OH$ ) são altamente tóxicas, possuindo a capacidade de causar danos oxidativos em proteínas, DNA e lipídios.

Diferentes condições de estresses biótico ou abiótico, como danos mecânicos, hipoxia, ozônio, flutuações de temperatura e presença de metais, causam perturbação da homeostase celular, na maioria dos organismos aeróbicos elevando a produção de EROs (Scandalios, 1994).

Frente ao estresse oxidativo, as plantas desenvolveram mecanismos de defesa, a fim de minimizar os danos ocasionados pelos radicais de oxigênio. Estes compreendem mecanismos enzimáticos e não enzimáticos. Além disso, as plantas podem, propositalmente, gerar EROs como moléculas sinalizadoras, para controlar vários processos, incluindo defesa de patógenos, morte celular programada e movimento estomático (Apel & Hirt, 2004). O efeito sinalizador ou destrutivo de EROs depende de suas concentrações, locais de produção e interação com outros estresses na planta, assim como do estágio de desenvolvimento da mesma (Gechev, 2006). A severidade do estresse oxidativo depende da capacidade das plantas produzirem mecanismos de defesa (Noctor & Foyer, 1998).

### 2.5.1 Produção de EROs

Existem três tipos de processos que consomem  $O_2$  associados à fotossíntese nos cloroplastos:

- a) Redução direta do oxigênio molecular pelo transporte de elétrons do fotossistema I (PSI);
- b) Reação oxigenase da Ribulose-1,5 bifosfato carboxilase-oxigenase (RUBISCO);
- c) Clororrespiração.

Os dois primeiros processos produzem EROs pela redução direta do  $O_2$  para radical superóxido ( $O_2^-$ ) (Apel & Hirt, 2004).

Quando a energia armazenada na clorofila no seu estado excitado não for rapidamente dissipada, ela pode reagir com o oxigênio molecular para formar um estado excitado de oxigênio, conhecido como oxigênio singlete ( $^1O_2^*$ ). Este é fortemente reativo, reagindo e danificando muitos componentes celulares, especialmente lipídios (Taiz & Zeiger, 2004).

Os cloroplastos produzem  $^1O_2^*$  no fotossistema II e  $O_2^-$  no PSI e PSII como subprodutos, e seus níveis são aumentados quando ocorre fotoinibição decorrente do estresse por excesso de luz (Apel & Hirt, 2004). A mitocôndria produz superóxido ( $O_2^-$ ) nos complexos I e III, também como subprodutos. Estima-se que 1 a 5% do oxigênio consumido na mitocôndria resulta na produção de EROs (Tiwari *et al.*, 2002). As NADPH oxidases na membrana plasmática também são fontes de  $O_2^-$  (Pospisil *et al.*, 2003; Moller *et al.*, 2007).

O radical hidroxil ( $OH^\cdot$ ) é considerado o radical mais reativo entre as EROs, podendo reagir com integrantes de todos os compartimentos celulares. Este radical é formado no PSII via reação de Fenton ou Haber-Weiss (Figura 2). Para manter as

concentrações de  $\cdot\text{OH}$  baixas, é necessária a presença de metalochaperonas, que irão se ligar ao Fe, Cu e Mn, deixando estes íons em baixa concentração nas células e evitando a reação de Fenton (Moller *et al.*, 2007).

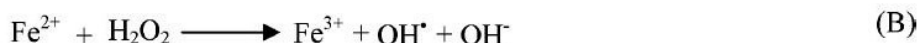
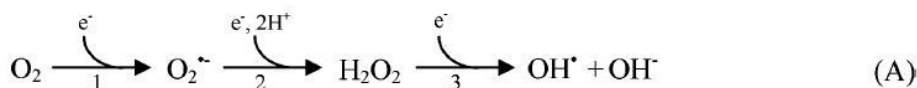


FIGURA 2. (A) Sucessivas reduções do oxigênio molecular para  $\text{OH}^{\cdot}$ . A reação envolve (1) a redução de um elétron do oxigênio molecular para formação de  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , (2) dismutação de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  para  $\text{H}_2\text{O}_2$ , e (3) redução de um elétron do  $\text{H}_2\text{O}_2$  para  $\text{OH}^{\cdot}$ . (B) Redução dirigida por íon  $\text{Fe}^{+2}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para  $\text{OH}^{\cdot}$ , via reação de Fenton (Modificado de Pospíšil *et al.*, 2004)

O  $\text{H}_2\text{O}_2$  é estável e menos reativo que o  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Entretanto, na presença de metais redutores, como  $\text{Fe}^{+2}$ , leva à formação de  $\text{OH}^{\cdot}$ .

Em mitocôndrias, não há elevada produção de EROs devido à presença de oxidases alternativas (AOX), que catalisam a redução tetravalente do  $\text{O}_2$  por uma ubiquinona. A AOX compete com o citocromo  $\text{bc}_1$  por elétrons e, assim, ajuda a reduzir a produção de EROs. A expressão de AOX é induzida pelo aumento de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Wagner, 1995).

Tipicamente, os níveis de EROs são aumentados na planta quando se eleva o nível de estresse, causando danos em todos os compartimentos celulares.

### 2.5.2 Efeitos de EROs em tecidos vegetais

Uma vez formados, os radicais livres de oxigênio atuam nas células provocando danos significativos, tanto fisiológicos como bioquímicos.

As EROs, principalmente o  $^1\text{O}_2^*$ , reagem com ácidos graxos polinsaturados da membrana celular e danificam o DNA (interagindo principalmente com a base

Guanina), e proteínas. Os ácidos graxos polinsaturados ácido linoléico (18:2) e o ácido linolênico (18:3) estão presentes na membrana do tilacóide na forma de galactolipídios e nas demais membranas como fosfolipídios. Estes ácidos graxos são altamente suscetíveis ao ataque de  $^1\text{O}_2^*$  e  $\cdot\text{OH}$ , promovendo peroxidações de membranas. Estas peroxidações diminuem a fluidez, causando extravasamento de íons na célula, além de afetarem o funcionamento de proteínas associadas a membranas. Além disso, a peroxidação de lipídeos origina aldeídos que destroem o DNA e proteínas (Moller *et al.*, 2007).

A reação de  $\cdot\text{OH}$  com carboidratos, tais como açúcares, causa oxidação na parede celular (Moller *et al.*, 2007). Além disto, outros efeitos de EROs podem ser vistos, como a reação do superóxido com o centro de proteína Fe-S (Moller *et al.*, 2007).

O aumento da produção de EROs também serve como resposta de resistência da planta a doenças. A planta produz  $\text{O}_2^-$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  quando reconhece patógenos específicos. Estas espécies reativas de oxigênio atuam diretamente matando o patógeno ou, ainda, induzem resposta à hipersensibilidade, proporcionando morte celular programada com a expressão de genes de defesa ao redor da área atacada (Mach & Greenberg, 2004). Ainda, EROs podem atuar como sinalizadores de moléculas, iniciando uma resposta em cascata que poderá levar à morte (Lamb & Dixon, 1997) ou ainda atuar diretamente na morte celular (Bethke & Jones, 2001). Foi verificado que EROs têm papel na morte celular programada da camada de aleurona de sementes de cevada (*Hordeum vulgare*) em resposta ao ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ ). O  $\text{H}_2\text{O}_2$  é visto como a ERO que mais participa da morte celular da camada de aleurona, sendo responsável pela iniciação da morte destas que ficam mais suscetíveis ao ataque de EROs devido à inativação de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato



peroxidase (APX) pelo GA<sub>3</sub>. A redução no número de oleossomas, que armazenam lipídeos via ciclo do glicolato, na presença de EROs sugere que os glioxissomos sejam fontes de EROs nas células de aleurona (Fath *et al.*, 2002).

A regulação gênica realizada por EROs tem recebido grande destaque, sendo o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> um exemplo envolvido na regulação de genes presentes na rota de sinalização de etileno. Estudos com raízes de *Arabidopsis* tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sugerem que este diminui o tamanho e a forma das células da ponta das raízes, inibindo o crescimento celular. Isto não está apenas vinculado às modificações nos componentes de estrutura celular, como oxidação de polissacarídeos e lignina da parede celular. As mudanças na forma da célula da ponta de raízes tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estão também associadas com a diferenciação celular e expressão gênica de receptores de percepção de etileno (Noriega *et al.* 2009).

### **2.5.3 Sistema antioxidante**

As plantas desenvolveram mecanismos enzimáticos e não enzimáticos para a detoxificação de EROs. Estes mecanismos são requeridos para remoção destas espécies reativas nos diferentes componentes celulares, sendo essenciais para a sobrevivência da planta ao estresse (Tabela 1).

O mecanismo não enzimático compreende moléculas pequenas, como ácido ascórbico (vitamina C) e o grupo de tióis não-protéicos (NPSH).

O ácido ascórbico está envolvido na regulação da fotossíntese, na alongação das raízes e na expansão celular (Noctor & Foyer, 1998), atuando diretamente na remoção de EROs (Sinha *et al.*, 2005). O ascorbato (AsA) é encontrado no citoplasma, no cloroplasto, na mitocôndria e no apoplasto e pode se ligar diretamente com os radicais

livres ou podem ser usados como fonte de poder redutor pelas enzimas antioxidantes (Mach & Greenberg, 2004).

A glutathiona reduzida (GSH) atua como o principal NPSH (Noctor & Foyer, 1998), sendo precursora das fitoquelatinas, as quais agem como peptídeos que complexam metais pesados em plantas, além de participar como substrato na redução do ascorbato no ciclo ascorbato-glutathiona. Além disso, pode reagir com radicais livres de  $O_2$ , como superóxido e radical hidroxila, removendo os radicais livres das células (Rosen, 2002). A GSH reduz diretamente os radicais livres de  $O_2$ , enquanto que a enzima glutathiona redutase (GR) utiliza NADPH para reduzir glutathiona oxidada (GSSG) a GSH (Noctor & Foyer, 1998).

Além do ascorbato e da glutathiona, outras moléculas atuam na defesa da planta contra radicais livres. Os carotenóides evitam a fotoinibição e a formação do oxigênio singlete (Mach & Greenberg, 2004), impedindo o colapso da membrana dos cloroplastos, por proteger a clorofila da peroxidação de lipídeos (Knox & Dodge, 1985).

Os mecanismos enzimáticos de defesa antioxidante compreendem enzimas que catalisam as reações de neutralização das espécies ativas de oxigênio. Estas enzimas atuam na cascata de oxidação e anulam o poder destrutivo das espécies ativas de oxigênio, preservando a integridade da célula (Noctor & Foyer, 1998).

As principais enzimas que atuam na destruição do  $O_2^{\bullet-}$  e do  $H_2O_2$  são superóxido dismutase (SOD) no cloroplasto, catalase (CAT) no peroxissomo, ascorbato peroxidase (APX) no cloroplasto, dehidroascorbato redutase (DHAR), monodehidroascorbato redutase (MDHAR), glutathiona redutase (GR), glutathiona peroxidase (GPX), e guaiacol peroxidase (GOPX).

Os níveis de estresse oxidativo são determinados pela quantidade de  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$  e de radicais  $\bullet OH$  nas células. Alguns destes compostos são diretamente metabolizados

por enzimas, como a CAT, que metaboliza  $\text{H}_2\text{O}_2$  nos peroxissomos (Lamb & Dixon, 1997; Polidoros & Scandalios, 1999), a SOD, que atua no cloroplasto convertendo o  $\text{O}_2^{\cdot -}$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$  com conversão posterior de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$  pela ação da enzima CAT (Tabela 1).

A APX é a enzima chave do ciclo ascorbato-glutationa. Esta enzima, em plantas, utiliza duas moléculas de AsA para a redução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$ , gerando duas moléculas de monohidroascorbato (MDHA), o qual é reduzido a AsA pela dehidroascorbato redutase (DHAredutase), usando NADH/NADPH como doador de elétrons. A DHAredutase utiliza a glutationa como substrato para reduzir o AsA (Noctor *et al.*, 2002; Eltayeb *et al.*, 2007) (Figura 3).

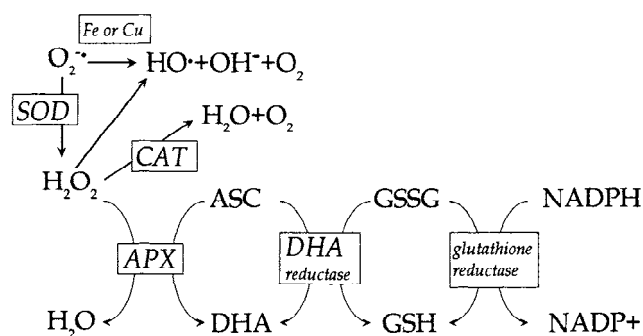


FIGURA 3. Mecanismos de remoção de EROs em células vegetais (Noctor *et al.*, 2002)

As enzimas SOD, nas células, são consideradas a primeira linha de defesa contra superóxido e seus produtos de reação  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2$  (Alscher *et al.*, 2002). As SOD são classificadas em três grupos, de acordo com o co-fator usado pela enzima: ferro SOD (SOD-Fe), localizada no cloroplasto; manganês SOD (SOD-Mn), localizada em mitocôndrias e peroxissomos e a SOD cobre-zinco (SOD Cu-Zn) em cloroplastos, citosol e, possivelmente, no apoplasto (Alscher *et al.*, 2002).

A atividade da SOD resulta na produção de  $H_2O_2$ . Sendo assim, ela está intimamente ligada a ação da CAT e de peroxidases, para garantir o balanço otimizado para reduzir os danos oxidativos (Gomes-Junior, 2006).

Nem sempre o aumento do sistema de proteção é facilmente visualizado, pois, além de envolver diversos metabólitos e enzimas, as enzimas apresentam isoenzimas específicas a determinados compartimentos.

TABELA 1. Mecanismos de remoção de EROs em células vegetais (Moller *et al.*, 2007)

| Mecanismo                     | Remove ( produz)               | Localização celular   |
|-------------------------------|--------------------------------|---|
| Superóxido Dismutase          | $O_2^{\bullet -}$ ( $H_2O_2$ ) | Cloroplasto, Citosol, Mitocôndria,<br>Peroxisomo              |
| Catalase                      | $H_2O_2$ ( $H_2O$ )            | Mitocôndria ?, Peroxisomo                                     |
| Peroxidases                   | $H_2O_2$ ( $H_2O$ )            | Vários locais   |
| Ciclo<br>Ascorbato/Glutationa | $H_2O_2$ ( $H_2O$ )            | Cloroplasto, Citosol?, Mitocôndria,<br>Peroxisomo             |
| Glutationa peroxidase         | $H_2O_2$ ( $H_2O$ )            | Cloroplasto, Citosol, Retículo<br>endoplasmático, Mitocôndria |
| Carotenos e tocoferol         | $H_2O_2$ ( $H_2O$ )            | Cloroplasto   |

#### 2.5.4 Efeitos de EROs em resposta ao estresse por Al

O Al não é um metal de transição, porém tem atividade pró-oxidante através da formação do íon radical semi reduzido superóxido de alumínio (Exley, 2004). Aumento na quantidade de EROs tem sido observado em resposta ao estresse de Al (Cakmak and Horst, 1991; Ezaki *et al.*, 2000; Boscolo *et al.*, 2003; Tamás *et al.*, 2006). O íon Al tem sido descrito como indutor do estresse oxidativo em plantas, tanto em raízes com em parte aérea (Devi *et al.*, 2003). Em células de fumo, foi reportado que o estresse por Al induziu a formação de EROs, resultando em disfunções irreversíveis nas mitocôndrias, seguido de morte celular (Panda *et al.*, 2008). No entanto o estresse oxidativo não é considerado a primeira resposta à exposição ao metal (Darkó *et al.*, 2004).

Em resposta a toxidez de Al, Cakmak & Horst (1991) observaram em plantas de soja um aumento na peroxidação de lipídios nas raízes por EROs. Os autores constataram que este efeito está relacionado com a interação do Al na superfície da membrana plasmática, que por sua vez, age sobre a integridade da membrana. Ainda, a peroxidação de lipídios mediada por EROs pode ser acompanhada por mudanças na atividade de enzimas envolvidas no metabolismo de oxigênio.

Aumento na peroxidação de lipídios também foi observado em folhas de arroz tratadas com Al, agravando os efeitos do estresse oxidativo (Kuo & Kao, 2003). Os mesmos autores verificaram um decréscimo na ativação da enzima SOD, o que aumentou os danos no crescimento e desenvolvimento da planta. Em contraste, cultivares tolerantes de arroz, tratadas com Al, obtiveram teores menores de peroxidação de lipídios nas membranas, e, conseqüentemente, maior crescimento da planta (Fonseca, 2007).

O aumento da atividade enzimática antioxidante reduz a formação de  $H_2O_2$ , os quais aumentam a lignificação e a biossíntese e acúmulo de compostos fenólicos, prejudicando o desenvolvimento normal das plantas, o que pode explicar a rápida diminuição do crescimento observado em plantas tratadas com Al. Em plantas de chá, o forte papel do sistema antioxidante resulta em maior estabilidade das membranas e da parede celular, beneficiando o crescimento das plantas (Ghanati *et al.*, 2005).

Em batata, a atividade antioxidante da enzima APX aumentou com o tempo de exposição ao Al. Este aumento promoveu maior tolerância desta espécie por diminuir o efeito de EROs sobre os lipídeos da membrana (Tabaldi *et al.*, 2009).

A atividade eficiente do sistema antioxidante foi vista como a melhor proteção contra o estresse oxidativo gerado pelo tratamento com Al tóxico em raízes de cultivares tolerantes de milho (Giannakoula *et al.*, 2010). O aumento da atividade da

SOD em raízes de cultivares de milho tolerantes após 72 h de exposição ao alumínio se deve a indução da síntese de SOD pelas células, para remover o radical superóxido, produzido em grande quantidade na presença de Al (Giannakoula *et al.*, 2010).

Em aveia branca, não foram encontrados trabalhos relacionando estresse oxidativo com a presença de Al.

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Material genético**

O material genético constou de genótipos de aveia branca contrastantes quanto à tolerância ao Al: UFRGS 17 (tolerante) (COR2/CTZ3/PENDEK/ME1563/76-29-76-23/75-28/CI833), UPF 91A1100-1-4 (tolerante) (8014/301/SRcpx/CRcps/SRcpx/JHG-8) e UFRGS 930598 (sensível) (UFRGS15/UFRGS881920) e a população F2 oriunda do cruzamento dos genótipos tolerantes. UFRGS 17 é uma variedade comercial desde 1996 e registrada na LVEC (*List of Varieties Eligible for Certification*) da OECD (*Organization for Economic Co-operation and Development*). UPF 91 A1100-1-4 e UFRGS 930598 são linhagens dos Programas de Melhoramento Genético de Aveia da Universidade de Passo Fundo e da UFRGS, respectivamente.

### **3.2 Estudos do estresse oxidativo**

Foram utilizados os genótipos UFRGS17, UFRGS 930598 e UPF 91 A1100-1-4. As sementes, as quais foram selecionadas para que apresentassem um tamanho similar, foram descascadas (remoção de lema e pálea), desinfetadas com hipoclorito de sódio 2% por três minutos e lavadas três vezes em água destilada estéril. Após, as sementes foram transferidas para papel germinador e mantidas em câmara de crescimento em temperatura constante de  $19^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 2 dias. As plântulas com tamanho de radícula uniforme em torno de 2 cm foram transferidas para solução hidropônica formulada

conforme Tabela 2, pH 4,5 e livre de Al ou contendo 740  $\mu\text{M}$  de Al, na forma de cloreto de alumínio (atividade de  $\text{Al}^{+3}$  de  $6,46 \cdot 10^{-6}$ ). Foram feitas duas repetições de cada genótipo, sendo que cada recipiente recebeu 250 plântulas de cada um dos genótipos. Os recipientes foram mantidos em câmara de crescimento regulada para 22°C e sob aeração constante. A solução nutritiva para cada repetição foi feita a partir da mesma diluição, sendo trocada a cada 48 horas durante sete dias, depois dos quais as plantas foram retiradas e analisadas.

TABELA 2. Composição da solução nutritiva: fontes minerais usadas e concentração final

|  | Concentração final do sal |
|--|---------------------------|
| $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 4 mM                      |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$            | 2 mM                      |
| $\text{KNO}_3$                                       | 4 mM                      |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$                         | 0,435 mM                  |
| KCl  | 0,5 $\mu\text{M}$         |
| $\text{MnSO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$            | 2 $\mu\text{M}$           |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$            | 0,3 $\mu\text{M}$         |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$            | 0,8 $\mu\text{M}$         |
| NaCl   | 30 $\mu\text{M}$          |
| $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$           | 0,1 $\mu\text{M}$         |
| $\text{H}_3\text{BO}_3$                              | 10 $\mu\text{M}$          |
| GeoFe-6  | 0,9 mM                    |
| $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$            | 740 $\mu\text{M}$         |

### 3.2.1 Extração enzimática

O tecido de raiz e parte aérea foi separado e pesado. A extração enzimática foi conduzida a 4°C. O tecido foi homogeneizadas (2:1 volume de tampão/ massa fresca) em mortár e pistilo, em 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,5) contendo 1 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 3 mM de DL-ditiotreitol e 5% (m/v) de PVPP insolúvel. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g por 30 min e o sobrenadante estocado em alíquotas separadas a -20°C, para as análises enzimáticas.



### **3.2.2 Determinação da concentração de proteína**

A concentração de proteína nas amostras foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando como padrão curva calibrada por BSA (*Bovine Serum Albumine*). A absorbância foi determinada em espectrofotômetro ultravioleta-visível, modelo Spectronic Gênesis II, a 595 nm.

### **3.2.3 Determinação da atividade de catalase (CAT)**

A atividade da CAT foi determinada conforme Azevedo *et al.* (1998), com pequenas modificações. A atividade da CAT foi avaliada em espectrofotômetro a 25°C em uma reação composta de 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo 2,5 µL de solução a 30% (v/v) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, preparado imediatamente antes do uso. A reação foi iniciada pela adição de 25 µL de extrato vegetal e a atividade determinada pelo monitoramento de degradação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 240 nm, com amostragem de 10 em 10 segundos durante 1 minuto, contra um branco livre de extrato vegetal. Os resultados foram corrigidos considerando o conteúdo protéico das amostras.

### **3.2.4 Determinação da atividade de glutathiona redutase (GR)**

A atividade da GR foi determinada conforme Azevedo *et al.* (1998). A atividade da GR foi avaliada em espectrofotômetro a 30°C em uma reação composta de 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo 1 mM de 5,5''- ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB), 1 mM de glutathiona oxidada (GSSG) e 0,1 mM de NADPH. A reação iniciou pela adição de 50 µL de extrato enzimático. A taxa de redução da GSSG foi acompanhada pelo monitoramento do aumento na absorbância a 412 nm durante 1 min. Os resultados foram corrigidos considerando o conteúdo protéico das amostras.

### **3.2.5 Determinação da atividade de ascorbato peroxidase (APX)**

A atividade da APX foi determinada pelo método de Nakano e Asana (1981), pelo monitoramento da taxa de oxidação do ascorbato via leitura da absorção a 290 nm, na temperatura de 30°C. O meio de reação foi composto de tampão fosfato de potássio 80 mM (pH 7,0), 5 mM de ascorbato, 1 mM de EDTA, 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 50 µL de extrato enzimático, em um volume total de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição da solução contendo ascorbato, previamente preparada. O decréscimo na absorbância foi monitorado a partir de 10 até 60 s do início da reação. Os resultados foram corrigidos considerando o conteúdo protéico das amostras.

### **3.2.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)**

As enzimas envolvidas na eliminação das espécies reativas de oxigênio ocorrem em diferentes compartimentos, havendo, portanto, diferentes isoenzimas. A avaliação de atividade total da enzima não discrimina a atividade das isoenzimas, causando algumas vezes dificuldade na compreensão do processo, uma vez que estas podem responder de forma diferenciada ao estresse. Assim, optou-se por complementar os dados analisando a atividade em gel de poliacrilamida, esperando-se com isso identificar a resposta ao Al das diversas isoenzimas. A eletroforese foi conduzida verticalmente sob condições não desnaturantes em géis de poliacrilamida a 10% (m/v), revelados para atividade da SOD. Uma corrente constante de 30 mA foi aplicada por 3 h a 4°C. Os tampões de eletroforese e géis nativos foram preparados conforme descrito por Laemmli (1970), exceto o dodecil sulfato de sódio (SDS) que foi excluído. Quantidades iguais de 30 ng de proteína foram aplicadas em cada poço do gel. No primeiro poço, foi aplicado o marcador padrão de atividade correspondente para a SOD.

A revelação da atividade de SOD após a separação eletroforética foi realizada conforme protocolo descrito por Beauchamp & Fridovich (1971) e modificado por Azevedo *et al.* (1998). Os géis foram lavados em água deionizada e incubados no escuro por 30 min em temperatura ambiente, em solução contendo 50 mM de riboflavina, 0,1 mM de nitroblue tetrazolium (NBT) e 0,3% (v/v) de N,N,N'',N''-tetrametiletlenodiamina (TEMED). Ao final deste período, os géis foram lavados com água deionizada e mantidos em água até o surgimento de bandas descoloridas relativas à atividade da SOD, em um gel de revelação púrpura. Para paralisar a reação, os géis foram transferidos para ácido acético a 7% (v/v).

### **3.2.7 Estimativa da peroxidação de lipídeos (Técnica TBARS)**

Utilizou-se a técnica descrita por El- Mosahaty *et al.* (1993). Amostras de 0,8 g de ápices radiculares, de raízes (zona diferenciada) e de folhas foram trituradas separadamente em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 8 ml de tampão fosfato de citrato 0,2mM (pH 6,5), com adição de Triton 0,5%. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 20.000 g durante 15 min a 4°C. Alíquotas de 1 ml dos sobrenadantes foram adicionadas a 1 ml de uma solução de ácido tiobartúrico (TBA) 0,5% (p/v) em TCA 20% (p/v). Os tubos de ensaio foram cobertos com bolitas de vidro, a fim de evitar evaporação, e as amostras foram incubadas em banho-maria a 95°C durante 40 min. Após o período de incubação, a reação foi paralisada transferindo-se os tubos de ensaio para banho de gelo durante 15 min. Posteriormente, foram centrifugados a 5000 rpm por 15 minutos e a absorbância dos sobrenadantes determinada a 532 nm. A absorbância inespecífica a 600 nm foi medida e subtraída das amostras. A concentração do complexo aldeído malônico-TBA foi calculada usando o fator de correção estimado a partir da curva de malonaldeído (MDA).

### 3.2.8 Quantificação de peróxido de hidrogênio

Utilizou-se o método descrito por Loreto & Velikova (2001). Amostras de 0,25 g de ápice radicular, de raízes (zona diferenciada) e de folhas, separadamente, foram trituradas em nitrogênio líquido e, então, homogeneizadas em 5 ml de ácido tricloracético (TCA) 0,1%. O homogeneizado foi centrifugado a 12.000g, por 15 min, a 4°C, coletando-se o sobrenadante. Alíquotas de 500 µL do sobrenadante foram adicionadas a um meio de reação constituído de 0,5 ml de tampão fosfato de potássio 10 mM (pH 7,0) e 1 ml de iodeto de potássio (KI) 1M. A leitura de absorvância foi determinada a 390 nm. O branco foi preparado em paralelo e subtraído da amostra. As concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas amostras foram estimadas com base em curva de calibração preparada com padrões de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, utilizando um fator fixo de 0,54.

### 3.2.9 Histolocalização de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Utilizou-se o método de Thordal-Chirstensen *et al.* (1997), com modificações. Segmentos de 2 cm da região mediana das folhas e de raízes foram coletados e infiltrados a vácuo com uma solução de 3,3'-diaminobenzidina-4HCl (DAB) 1mg/ml dissolvido em água destilada acidificada (pH 3,8) com HCl, para evitar a precipitação de DAB em pH maiores que 4. Os segmentos foram incubados em temperatura ambiente durante 3 h no escuro e, em seguida, transferidos para uma solução de clorofórmio (EtOH: clorofórmio- 3:1) com adição de 0,15% de TCA para parar a reação e clarificar o tecido, permanecendo no escuro por 24 h. Após este período, as amostras foram transferidas para uma solução de glicerol 50%. A histolocalização foi visualizada em microscópio, a partir da formação de precipitado marrom oriundo do corante DAB na presença de peroxidases endógenas.

### 3.2.10 Histolocalização de Superóxido

Utilizou-se o método de Wang *et al.* (2007), com algumas modificações. Segmentos de 2 cm de folhas e raízes foram coletados e infiltrados a vácuo com uma solução de 0,1 % de nitro blue tetrazolium (NBT) (p:v) dissolvido em tampão fosfato de potássio 10mM (pH 7,8). Os segmentos infiltrados foram incubados em temperatura ambiente na presença de luz constante durante 15 min. Em seguida, foram transferidos para uma solução de clorofórmio (EtOH: clorofórmio- 3:1) com adição de 0,15% de ácido tricloracético (TCA) para parar a reação e clarificar o tecido, permanecendo no escuro por 24 h. Após este período, as amostras foram transferidas para uma solução de glicerol 50%. A histolocalização foi visualizada em microscópio a partir da formação de um precipitado azul insolúvel na presença de superóxido ( $O_2^-$ ).

### 3.2.11 Quantificação de clorofila e carotenóides

Utilizou-se o método de extração de clorofila sem maceração proposto por Hiscox *et al.* (1979). Amostras de 0,07g de folhas foram transferidas para tubos de vidros graduados, incubadas com 5 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) em banho-maria a 65°C por 30 min até o branqueamento das folhas. Os tubos foram cobertos com bolitas de vidro para evitar evaporação. Em seguida, os tubos foram retirados do banho-maria e o volume completado para 7 ml de DMSO. O sobrenadante foi então transferido para espectrofotômetro e a leitura procedeu-se nos comprimentos de ondas de 645, 663 e 471 nm. Os teores de clorofilas e carotenóides foram mensurados a partir das seguintes fórmulas:

$$\text{Clorofila a (mg/g PF)} = \{[(11,75 \times A_{663}) - (2,35 \times A_{645})] \times 50\} / 500$$

$$\text{Clorofila b (mg/g PF)} = \{[(18,61 \times A_{645}) - (3,96 \times A_{663})] \times 50\} / 500$$

Carotenóides (mg/g PF) =  $\{[(1000 \times A_{470}) - (2,27 \times \text{Conc.Clor. a}) - (81,4 \times \text{Conc.Clor. b})] / 227 \times 50\} / 500$

Foram utilizadas quatro repetições para cada tratamento.

### **3.2.12 Determinação de ácido ascórbico (AsA) e de tióis não-protéicos**

Foi homogeneizado 1 g de tecido em uma solução contendo 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) (1:5). As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 min e, em seguida, foi adicionado ao sobrenadante ácido tricloroacético (TCA) 10% na proporção 1:1 (v:v), seguindo para uma nova centrifugação a 300 rpm durante 10 min, para remoção de proteínas.

A determinação do ácido ascórbico foi realizada conforme descrito por Jacques-Silva *et al.* (2001). Alíquotas de 300  $\mu\text{L}$  foram incubadas à 37°C em um meio contendo 100  $\mu\text{L}$  de TCA 13,3%, 100  $\mu\text{L}$  de água deionizada e 75  $\mu\text{L}$  de 1 L 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). A solução de DNPH foi composta por: 0,23% tiuréia e 0,27%  $\text{CuSO}_4$ , diluídos em 49%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Após 3 h, adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  65% às amostras e procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a 520 nm.

A determinação da concentração de tióis não-protéicos foi realizada a partir de alíquotas contendo 400  $\mu\text{L}$  de amostra, 550  $\mu\text{L}$  de Tris-HCl 1 M (pH 7,4) e 50  $\mu\text{L}$  de DTNB 10mM. A leitura de absorbância procedeu-se via espectrofotômetro a 412 nm. Para o cálculo da concentração do grupo de tióis não protéicos foi utilizado o valor de uma curva de cisteína (Tabaldi *et al.*, 2009).

### **3.3 Avaliação da tolerância ao Al**

A avaliação do recrescimento da raiz principal como forma de identificar a tolerância ao Al tóxico foi conduzida em laboratório sob condições de temperatura, luz e pH controladas. Utilizou-se neste experimento duas soluções nutritivas distintas, sendo estas com ou sem a presença do Al na forma de sulfato de Al ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ) na concentração de 370  $\mu\text{M}$  que equivale a 20 ppm ou 740  $\mu\text{M}$  de Al.

#### **3.3.1 Preparo das sementes**

Sementes de seis populações  $F_2$  do cruzamento UFRGS17 x UPF 91 Al100-1-4 e os genitores foram avaliados quanto ao recrescimento da raiz primária em solução hidropônica, conforme Nava (2005). Mais de 100 indivíduos de cada população  $F_2$  foram avaliados. Cerca de 100 sementes de cada genitor e 50 sementes do genótipo sensível ao Al (UFRGS 930598) foram utilizadas como controle. As sementes foram descascadas, desinfetadas com hipoclorito de sódio 2% por três minutos e lavadas seis vezes em água destilada. Depois de desinfetadas, as sementes foram transferidas para papel germinador e mantidas em câmara de crescimento (temperatura constante de  $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  e regime de luz de 12 h) por 48 h.

#### **3.3.2 Crescimento em hidroponia**

Após 48 h da germinação, as plântulas que apresentaram crescimento radicular de aproximadamente 1 cm foram transferidas para recipientes contendo solução hidropônica nutritiva completa composta, conforme Tabela 3. Os recipientes foram mantidos dentro da câmara de crescimento a  $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  sob luz e aeração constante e correções diárias de pH, para que o mesmo permanecesse em 4,5. Após 48 horas, as plântulas foram transferidas para solução nutritiva composta por um décimo da solução

nutritiva completa, com exceção do fósforo, o qual foi completamente omitido, a fim de evitar complexação com o Al, precipitando e diminuindo a sua atividade química, e com acréscimo de 740  $\mu\text{M}$  de Al. O pH foi diariamente medido e permaneceu em 4,5. Cada um dos recipientes recebeu também plântulas de trigo, as quais serviram como controle negativo. Após 48 horas, as plântulas foram transferidas novamente para solução nutritiva completa sem Al por mais 72 horas, sendo então medido o recrescimento. Este experimento foi repetido duas vezes.

TABELA 3. Composição da solução nutritiva: fontes minerais usadas e concentração final

|  | Concentração final do sal |
|--|---------------------------|
| $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 4 mM                      |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$            | 2 mM                      |
| $\text{KNO}_3$                                       | 4 mM                      |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$                         | 0,435 mM                  |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                             | 0,5 mM                    |
| $\text{MnSO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$            | 2 $\mu\text{M}$           |
| $\text{CuSO}_4$                                      | 0,3 $\mu\text{M}$         |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$            | 0,8 $\mu\text{M}$         |
| $\text{NaCl}$  | 30 $\mu\text{M}$          |
| $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$           | 0,1 $\mu\text{M}$         |
| $\text{H}_3\text{BO}_3$                              | 10 $\mu\text{M}$          |
| GeoFe-6  | 0,9 mM                    |

### 3.3.3 Análise de recrescimento

O recrescimento da raiz foi medido após os sete dias em hidroponia conforme Nava (2005). A partir do choque com Al foi possível observar alterações nas raízes como curvatura e engrossamento ou calosidade da raiz principal gerada pela exposição ao Al. O ponto de engrossamento (calo) foi utilizado como ponto inicial para medição do recrescimento com o auxílio de um paquímetro digital.



### **3.3.4 Distribuição de frequências**

A determinação do número de genes foi realizada através de uma análise qualitativa, com base na distribuição de frequências de recrescimento da raiz principal da geração F2 de cruzamentos entre os genótipos tolerantes UFRGS 17 e UPF 91A1 100-1-14. A distribuição de frequência foi analisada em Excel, utilizando-se 30 classes com intervalos de 1 mm.

### **3.5 Localização do Al**

As condições de crescimento foram as mesmas descritas no estudo do estresse oxidativo. As plantas foram analisadas após sete dias de crescimento contínuo em Al e comparadas com as plantas crescidas na ausência deste elemento.

As raízes foram lavadas em água destilada por 15 min e depois coradas com solução de 0,2% de hematoxilina e 0,02% de KIO<sub>3</sub> por 15 min em temperatura ambiente. Em seguida, as raízes sofreram desidratação com teores crescente de etanol e xilol. Segmentos de 1 cm de ápices radiculares foram emblocados em parafina. Foram feitos cortes transversais em micrótomo com 10 µm de espessura à partir do ápice radicular. Por fim, as fitas de cortes de parafina foram retiradas cuidadosamente e colocadas sob uma gota de água na lâmina. As lâminas foram aquecidas para a remoção da parafina e fixadas com glicerina. Por fim, os cortes foram visualizados em microscópio ótico.

### **3.6 Análise estatística**

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado. Para a análise estatística, utilizou-se a análise fatorial. A comparação entre médias foi realizada pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade. Foram realizadas análises de

correlação entre as características avaliadas. Todos os testes estatísticos foram realizados com o programa SAS (*Statistical Analysis System*).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Metabolismo Antioxidante

Os dados referentes ao metabolismo antioxidante mostraram diferença significativa entre os fatores Al (presença e ausência), órgãos (ápice, raiz e folha) e genótipos, nas diferentes análises. O Al apenas não interagiu significativamente com os diferentes genótipos (tolerante e sensível) nas análises de peroxidação de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A interação tríplice não foi significativa apenas para a análise de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os teores dos pigmentos cloroplastídicos (clorofila A, clorofila B e carotenóides) não foram significativamente afetados por nenhum dos fatores testados (Tabela 4).

TABELA 4. Análise de variância, com probabilidade determinada para o efeito de alumínio, órgão e genótipo

| Causa da Variação | GL | Pr > F |      |      |                               |      |      |      |       |       |        |
|-------------------|----|--------|------|------|-------------------------------|------|------|------|-------|-------|--------|
|                   |    | TBARs  | NPSH | AsA  | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | CAT  | APX  | GR   | ClorA | ClorB | Carot. |
| Alumínio (Al)     | 1  | **     | **   | **   | **                            | **   | **   | *    | NS    | NS    | NS     |
| Órgão             | 2  | **     | **   | **   | **                            | **   | **   | **   | -     | -     | -      |
| Genótipo (Gen)    | 2  | **     | **   | **   | **                            | **   | **   | **   | NS    | NS    | NS     |
| Al x órgão        | 2  | **     | **   | **   | **                            | **   | **   | **   | -     | -     | -      |
| Gen x Al          | 2  | **     | **   | **   | NS                            | **   | **   | **   | NS    | NS    | NS     |
| Gen x órgão       | 2  | **     | **   | **   | **                            | **   | **   | **   | -     | -     | -      |
| Gen x Al x órgão  | 4  | **     | **   | **   | NS                            | **   | **   | **   | -     | -     | -      |
| C. V. (%)         |    | 6,99   | 4,89 | 1,80 | 10,95                         | 9,32 | 9,60 | 7,41 | 23,31 | 19,52 | 24,17  |

ClorA: Clorofila A; ClorB: Clorofila B; Carot.: Carotenóides

CV: Coeficiente de variação.

\*significativo ao nível de 5% de probabilidade.

\*\*significativo ao nível de 1% de probabilidade.

NS: Não significativo

Houve correlação negativa do teor de NPSH, AsA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, atividade de CAT com o nível de peroxidação de lipídeos (TBARs). Houve correlação entre os teores de NPSH e os de AsA e com a atividade da enzima CAT. Entretanto, não houve correlação do teor de NPSH com o conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> também não se correlacionaram com a atividade da CAT e com o teor de AsA. Os pigmentos fotossintéticos clorA, clorB e carotenóides apresentaram correlação positiva apenas com o conteúdo de AsA (Tabela 5).

TABELA 5. Coeficientes de correlação entre as diferentes análises relacionadas ao metabolismo antioxidante e pigmentos cloroplastídicos nos genótipos de aveia branca

|                               | (r) Pr>F |         |         |                               |         |
|-------------------------------|----------|---------|---------|-------------------------------|---------|
|                               | TBARs    | GSH     | AsA     | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | CAT     |
| TBARs                         | -        | -0,80** | -0,74** | -0,32*                        | -0,73** |
| GSH                           | -0,80**  | -       | 0,54*   | NS                            | 0,76**  |
| AsA                           | -0,74**  | 0,54*   | -       | NS                            | 0,56*   |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | -0,32*   | NS      | NS      | -                             | NS      |
| CAT                           | -0,73**  | 0,76**  | 0,56*   | NS                            | -       |
| ClorA                         | NS       | NS      | 0,62*   | NS                            | NS      |
| ClorB                         | NS       | NS      | 0,70*   | NS                            | NS      |
| Carot.                        | NS       | NS      | 0,65*   | NS                            | NS      |

ClorA: Clorofila A; ClorB: Clorofila B; Carot.: Carotenóides .

\*significativo ao nível de 5% de probabilidade.

\*\*significativo ao nível de 1% de probabilidade.

NS: Não significativo

#### 4.1.1 Atividade enzimática

##### 4.1.1.1 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A atividade antioxidante da enzima SOD foi verificada em todos os genótipos tanto na presença como na ausência de Al.

As análises do padrão e atividade das isoformas de SOD através de PAGE nativo mostraram três isoformas em aveia (Figura 4). As isoformas foram definidas como SOD 1, 2 e 3. Observou-se maior atividade das isoformas SOD 1 e 2 no sistema radicular e maior atividade da isoforma SOD3 na parte aérea.

Na zona diferenciada da raiz, a atividade de SOD apresentou resposta oposta nos genótipos tolerantes quando da exposição ao Al. No genótipo UFRGS 17 a atividade das isoformas de SOD aumentou especialmente da SOD1, enquanto UPF 91 Al 100-1-4 reduziu a atividade das isoformas na presença de Al. O genótipo sensível manteve a atividade das três isoformas similar independente da presença de Al. Já no ápice radicular, houve comportamento diferenciado entre todos os genótipos. UFRGS 17 reduziu a atividade de SOD1 e aumentou de SOD2 na presença de Al no ápice, enquanto UFRGS 930598 reduziu a atividade das três isoformas. UPF 91 Al 100-1-4 teve a atividade de SOD1 e 2 aumentadas pela presença do Al (Figura 4).

Nas folhas, a atividade da isoforma 3 foi elevada e similar entre todos os genótipos e independente da presença de Al. Por outro lado, observou-se incremento na atividade de SOD1 e 2 na presença de Al para UFRGS17 e UFRGS 930598.

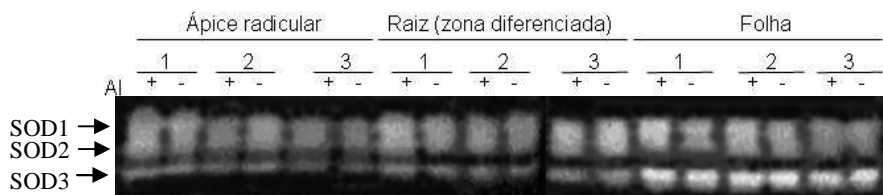


FIGURA 4. Perfil da atividade da enzima superóxido dismutase em PAGE no ápice radicular, na zona diferenciada da raiz e nas folhas de plântulas de aveia dos genótipos UFRGS 17 (1), UFRGS 930598 (2) e UPF 91Al 100-1-4 (3) submetidas ao estresse por toxidez de Al (+) durante sete dias.

#### 4.1.1.2 Atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX)

No genótipo tolerante UFRGS 17 ocorreu uma diminuição na atividade da APX quando as plantas foram tratadas com Al, tanto na região do ápice radicular quanto na região diferenciada da raiz. Enquanto nos demais genótipos não houve efeito significativo do Al sobre esta enzima na raiz (Figura 5).

O genótipo UFRGS 17 possui a atividade da enzima APX bem mais elevada nos ápices radiculares em situação normal, sem estresse por Al, que os demais genótipos. O genótipo UPF 91 Al 100-1-4 não apresentou diferença significativa ao estresse por Al, comparado ao tratamento sem Al. Na presença de Al, a atividade de APX foi superior no genótipo UPF 91 Al 100-1-4, seguido pelo outro genótipo tolerante, UFRGS 17. O genótipo sensível apresentou a menor atividade da enzima no ápice radicular na presença de Al.

Na região diferenciada da raiz, a atividade foi reduzida em cerca de 6 vezes pela presença de Al em UFRGS 17. No genótipo UFRGS 930598, a atividade foi similar em ambas as condições (Figura 5).

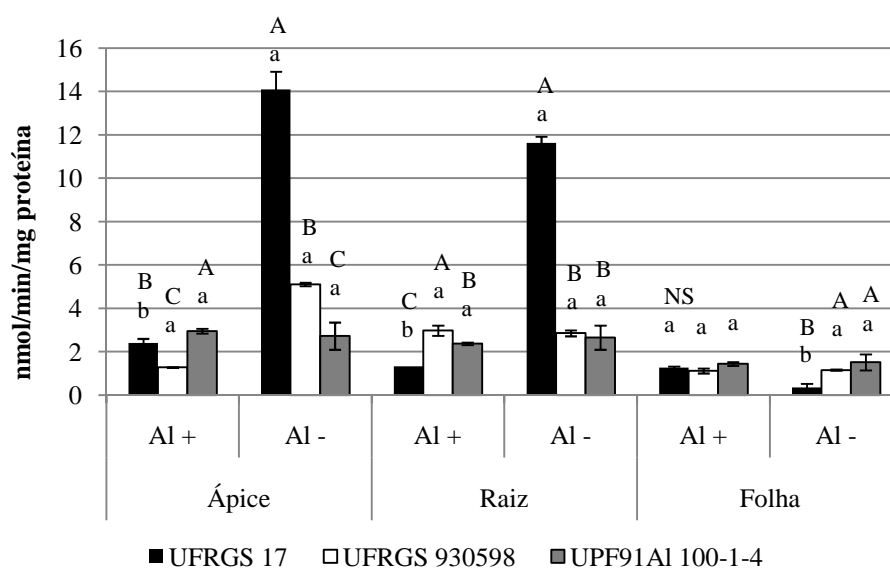


FIGURA 5. Atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) no ápice radicular, na zona diferenciada da raiz (raiz) e nas folhas de plântulas de aveia dos genótipos UFRGS 17 (Al-tolerante), UFRGS 930598 (Al sensível) e UPF 91Al 100-1-4 (Al-tolerante) submetidas ao estresse por toxidez de Al (+) ou sem Al (-) durante sete dias. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam genótipos dentro da mesma dose e órgão e, letras minúsculas comparam doses dentro do mesmo genótipo e órgão, pelo teste Duncan ao nível de 5%.

Todos os genótipos apresentaram, de forma geral, menor atividade da enzima na folha comparada à atividade nas regiões da raiz (Figura 5). A atividade de APX na folha não diferiu entre genótipos na presença de Al. Apenas o genótipo UFRGS 17 aumentou a atividade de APX na presença de Al igualando-se aos demais genótipos.

#### 4.1.1.3 Atividade da enzima Catalase (CAT)

O genótipo tolerante UFRGS 17 apresentou atividade de CAT maior no ápice de raízes tratadas com Al, em relação aos demais genótipos. No entanto, a atividade deste foi reduzida em relação à condição sem Al (Figura 6). Nos demais genótipos, os níveis de CAT mantiveram-se constantes nos ápices radiculares nos tratamentos com e sem Al (Figura 6).

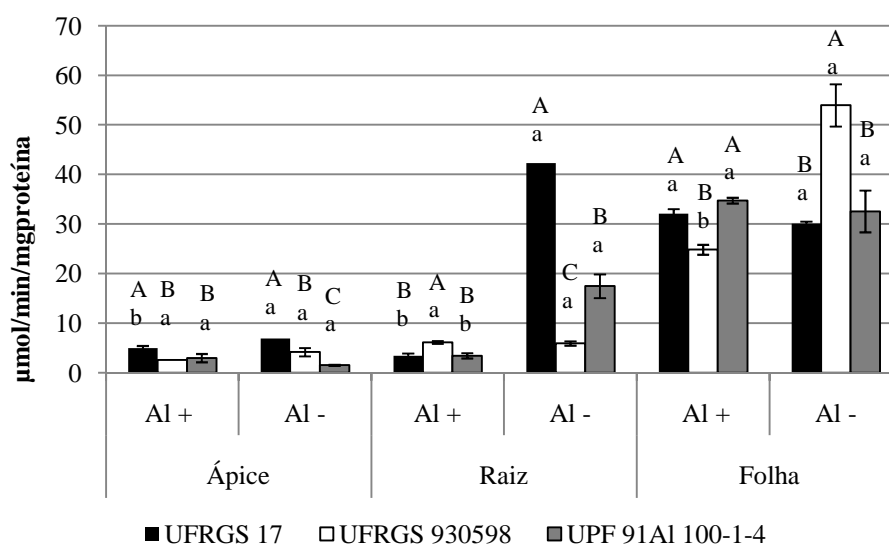


FIGURA 6. Atividade da enzima catalase no ápice radicular, na zona diferenciada da raiz (raiz) e nas folhas de plântulas de aveia dos genótipos UFRGS 17 (Al-tolerante), UFRGS 930598 (Al sensível) e UPF 91Al 100-1-4 (Al-tolerante) submetidas ao estresse por toxidez de Al (+) ou sem Al (-) durante sete dias. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam genótipos dentro da mesma dose e órgão e, letras minúsculas comparam doses dentro do mesmo genótipo e órgão, pelo teste Duncan ao nível de 5%.

Na região diferenciada da raiz, na ausência de Al, observou-se maior atividade de CAT em UFRGS 17, seguido por UPF 91 Al 100-1-4. Estas atividades reduziram em torno de 90 e 85 % pela exposição ao Al, respectivamente. Não houve efeito significativo sobre o genótipo UFRGS 930598.

Os maiores níveis de atividade de CAT foram encontrados nas folhas, os quais não foram afetados significativamente pela exposição ao Al, a exceção do genótipo sensível que reduziu a atividade em 40% (Figura 6).

#### **4.1.1.4 Atividade da enzima Glutathione Redutase (GR)**

O genótipo tolerante UFRGS 17 aumentou os níveis de atividade de GR no tratamento com Al no ápice radicular (aproximadamente quatro vezes) e na zona diferenciada da raiz (aproximadamente duas vezes). O genótipo sensível UFRGS 930598 também aumentou os níveis de GR no ápice radicular (duas vezes) e com menor intensidade na zona diferenciada das raízes em plantas tratadas com Al, comparadas àquelas sem a presença deste elemento.

Verificou-se que a atividade da GR no genótipo tolerante UPF 91 Al100-1-4 manteve-se constante em toda raiz, independente do Al. Porém, na folha, os níveis de GR reduziram no tratamento com Al (Figura 7).

Nas folhas, houve redução significativa da atividade de GR no genótipo sensível pela exposição ao Al, no entanto sendo ainda superior aos genótipos tolerantes.



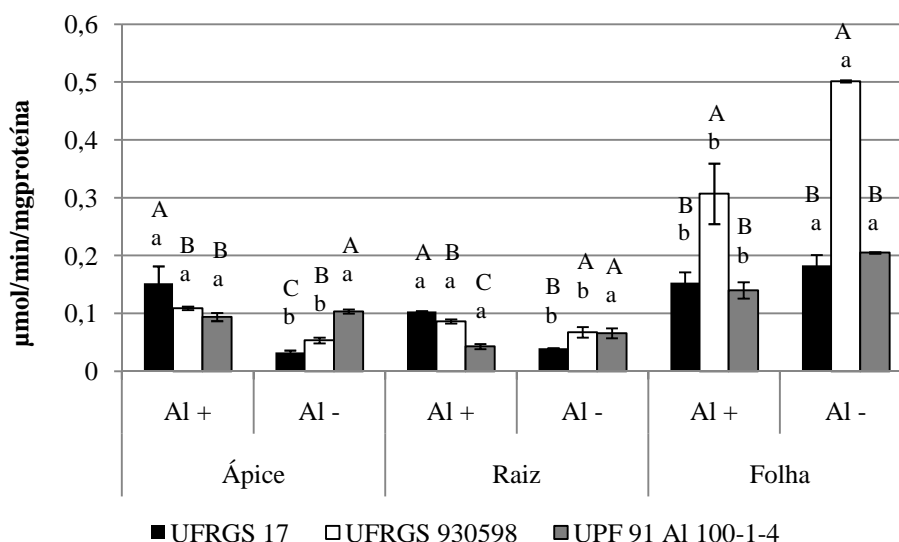


FIGURA 7. Atividade da enzima glutathione redutase no ápice radicular, na zona diferenciada da raiz (raiz) e nas folhas de plântulas de aveia dos genótipos UFRGS 17 (Al-tolerante), UFRGS 930598 (Al sensível) e UPF 91Al 100-1-4 (Al-tolerante) submetidas ao estresse por toxidez de Al (+) ou sem Al (-) durante sete dias. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam genótipos dentro da mesma dose e órgão e, letras minúsculas comparam doses dentro do mesmo genótipo e órgão, pelo teste Duncan ao nível de 5%.

#### 4.1.2 Atividade não enzimática

##### 4.1.2.2 Conteúdo de tióis não-protéicos (NPSH) e Ácido Ascórbico (AsA).

O conteúdo de NPSH foi reduzido na presença do Al nas folhas no genótipo sensível UFRGS 930598 e do tolerante UPF 91 Al 100-1-4. A cultivar UFRGS17 aumentou o teor de NPSH na presença de Al na parte aérea e na região diferenciada da raiz (Figura 8).

Entre as cultivares, a cultivar UFRGS 17 apresentou maior conteúdo de NPSH na presença do Al no ápice radicular e nas folhas (Figura 8).

O conteúdo de AsA aumentou na raiz dos genótipos tolerantes na presença do Al no ápice com maior intensidade para UFRGS 17 e na área diferenciada da raiz para UPF 91 Al 100-1-4. Por outro lado o genótipo sensível reduziu o conteúdo na raiz. O

conteúdo de AsA foi similar na parte aérea independente do Al e mostrou-se menor para o genótipo sensível em ambas condições (Figura 9).

#### 4.1.2.3 Pigmentos Cloroplastídicos

Como esperado, o conteúdo de clorofila a foi superior aos demais pigmentos em todos os genótipos, porém não houve diferença significativa entre os tratamentos com e sem Al. Não houve diferença significativa entre os genótipos e pela presença do Al nos teores dos pigmentos avaliados (Figura 10).

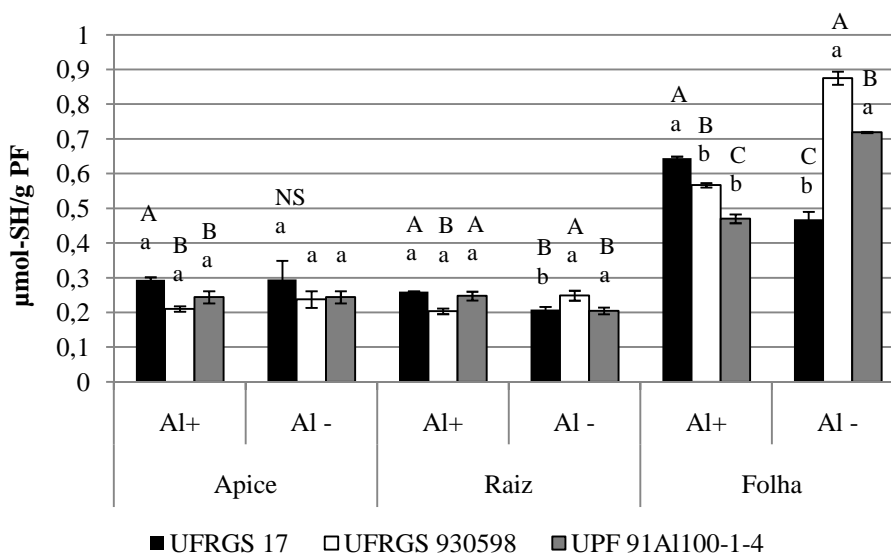


FIGURA 8. Concentração de tióis não protéicos (NPSH) ( $\mu\text{mol-SH/g PF}$ ) no ápice radicular, radicular, na zona diferenciada da raiz (raiz) e nas folhas de plântulas de aveia dos genótipos UFRGS 17 (Al-tolerante), UFRGS 930598 (Al sensível) e UPF 91Al 100-1-4 (Al-tolerante) submetidas ao estresse por toxidez de Al (+) ou sem Al (-) durante sete dias. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam genótipos dentro da mesma dose e órgão e, letras minúsculas comparam doses dentro do mesmo genótipo e órgão, pelo teste Duncan ao nível de 5%.

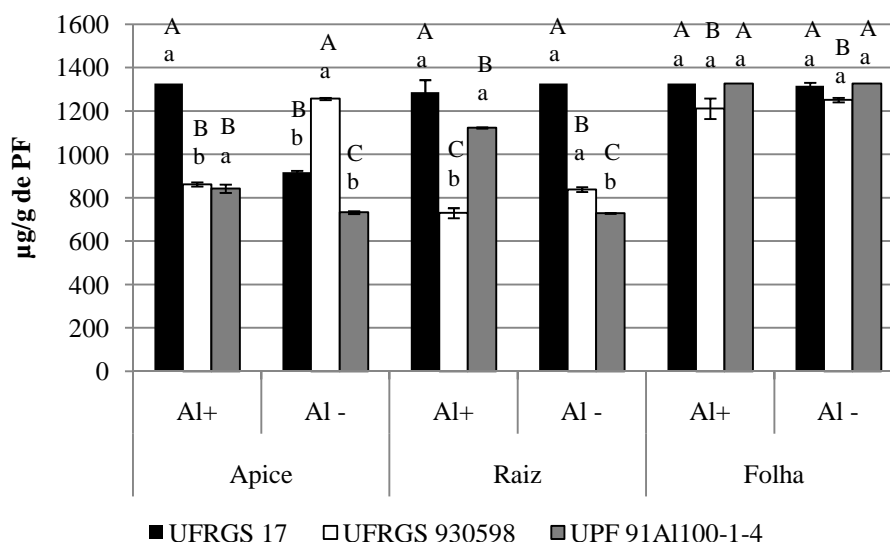


FIGURA 9. Concentração de ácido ascórbico (AsA) no ápice radicular, na zona diferenciada da raiz (raiz) e na parte aérea (folha), nos genótipos tolerantes UFRGS 17 (Al-tolerante), UFRGS 930598 (Al-sensível) e UPF 91Al 100-1-4 (Al-tolerante) submetidas ao estresse por Al (+) ou sem Al (-) durante sete dias. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam genótipos dentro da mesma dose e órgão e, letras minúsculas comparam doses dentro do mesmo genótipo e órgão, pelo teste Duncan ao nível de 5%.

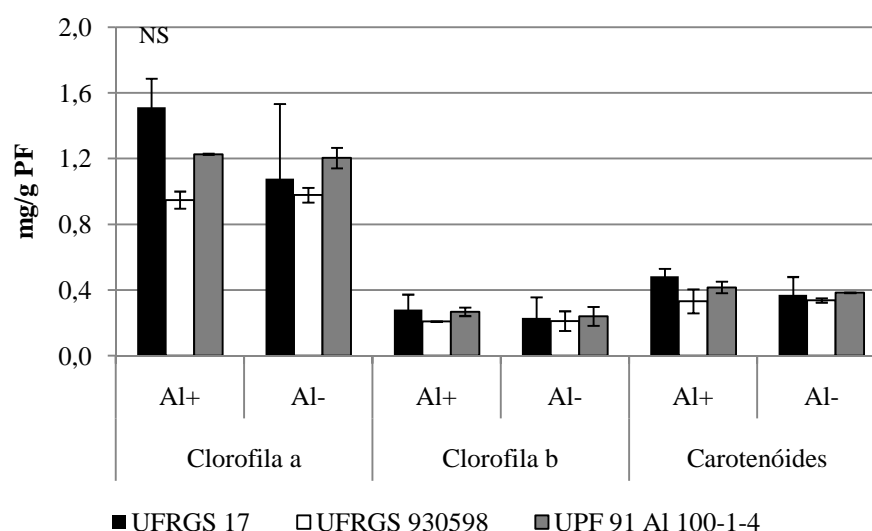


FIGURA 10. Conteúdo de clorofila a, b, e carotenóides em plântulas de aveia branca dos genótipos sensível UFRGS 930598 e nos genótipos tolerantes UFRGS 17 e UPF 91Al 100-1-4 submetidas ao estresse por toxidez de Al (+) ou sem estresse (-) durante sete dias. NS: Não significativo pelo teste Duncan ao nível de 5%.

#### 4.1.2.4 Histolocalização de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Através da análise histológica de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, observou-se que os três genótipos apresentaram produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas raízes em todas as condições. Quando as plantas de aveia foram expostas ao estresse por Al, houve aumento na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 11). Não houve diferença visível na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de raízes entre os genótipos tolerantes e o sensível.

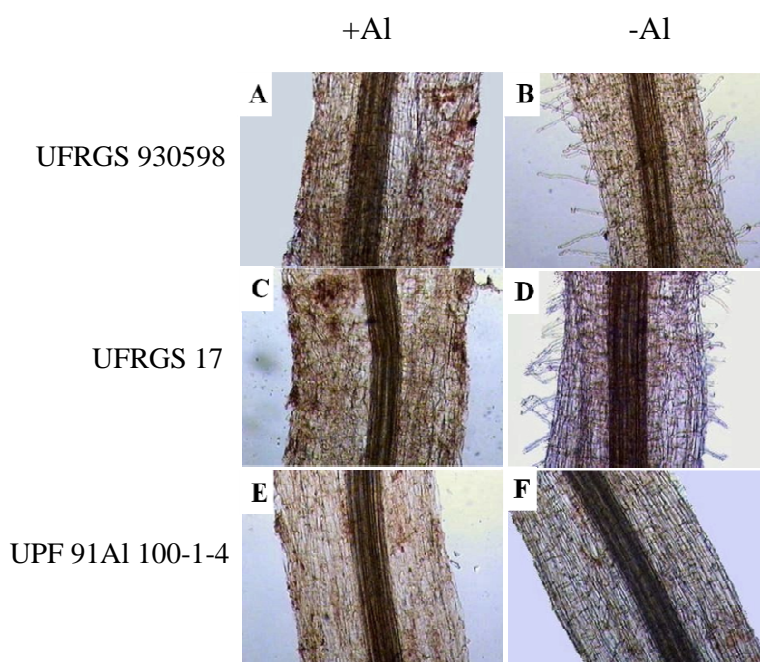


FIGURA 11. Histolocalização de peróxido de hidrogênio em raízes de genótipos de aveia branca expostas por 7 dias a 740 $\mu$ M Al. A coloração marrom avermelhada representa a formação de peróxido de hidrogênio em raízes. A) UFRGS 930598 com Al; B) UFRGS 930598 sem Al; C) UFRGS 17 com Al; D) UFRGS 17 sem Al; E) UPF 91Al100-1-4 com Al; F) UPF 91Al 100-1-4 sem Al (aumento 40x).

#### 4.1.1.5 Histolocalização de Superóxido

A análise histológica de superóxido mostrou maior produção de superóxido em raízes do genótipo sensível UFRGS 930598, expostas ao tratamento com Al (Figura 12A), em relação às raízes sem estresse por Al (Figura 12B) e aos demais genótipos

(Figura 12 C-F). A formação de superóxido no genótipo tolerante UFRGS 17 também foi observada em resposta ao Al (Figura 12C e 12D) porém em menor magnitude.

No genótipo UPF 91AL100-1-4 a produção de superóxido das plantas expostas ao Al restringiu-se às células do feixe vascular, com menor produção nos demais tecidos (Figura 12E), diferindo das raízes que não sofreram estresse (Figura 12F).

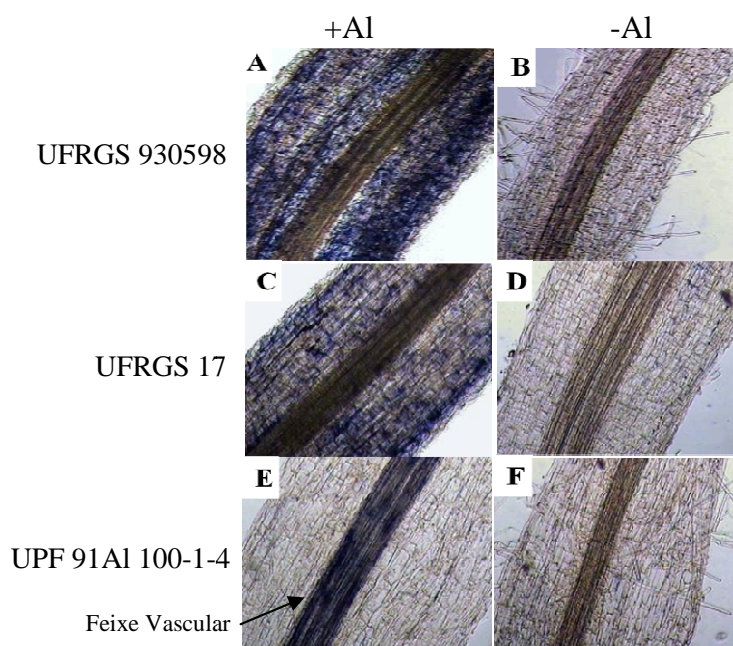


FIGURA 12. Histolocalização de superóxido em raízes de genótipos de aveia branca expostas por 7 dias a  $740\mu\text{M}$  Al. A coloração azulada representa a formação de superóxido em raízes. A) UFRGS 930598 com Al; B) UFRGS 930598 sem Al; C) UFRGS 17 com Al; D) UFRGS 17 sem Al; E) UPF 91Al100-1-4 com Al; F) UPF 91Al 100-1-4 sem Al (aumento 40x).

As duas variedades tolerantes estudadas produziram naturalmente o radical superóxido, porém na cultivar UFRGS 17 a produção foi visualizada principalmente nas células da epiderme, não havendo presença do radical em pêlos radiculares (Figura 13A). Já em UPF 91 Al 100-1-4, a produção de superóxido ficou maximizada na região de emissão de raízes laterais, sendo reduzida nas células da epiderme (Figura 13B).

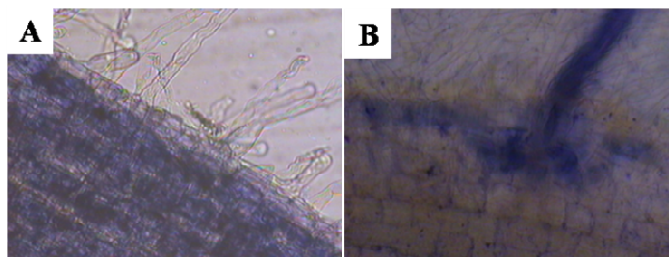


FIGURA 13. Histolocalização de superóxido nos genótipos de aveia branca. A coloração azulada representa a formação de superóxido em raízes. A) produção de superóxido em células da epiderme de UFRGS 17 sem Al; B) produção de superóxido na raiz lateral de UPF 91Al 100-1-4 sem Al (aumento 100x).

#### 4.1.1.6 Teor de Peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ )

O genótipo sensível UFRGS 930598 na presença de Al apresentou 0,03 e 0,043 $\mu$ mol/g de peso fresco de  $H_2O_2$  no ápice radicular e na região diferenciada da raiz, respectivamente, sendo os maiores teores encontrados, diferenciando-se dos genótipos tolerantes. Os genótipos tolerantes não apresentaram aumento nos teores de  $H_2O_2$  na presença de Al na raiz (Figura 14).

As folhas apresentaram os níveis mais baixos de  $H_2O_2$  e, novamente o genótipo sensível na presença de Al, diferenciou-se dos demais. Houve um pequeno incremento nos genótipos UFRGS na presença de Al em relação a ausência (Figura 14).

#### 4.1.1.7 Peroxidação de lipídeos (TBARS)

No ápice radicular na presença de Al, o genótipo tolerante UPF 91Al 100-1-4 reduziu os níveis de malonaldeído (MDA) em relação a ausência de Al e, o genótipo UFRGS 17 manteve-os similares. Por outro lado, o genótipo sensível UFRGS 930598 aumentou os níveis de MDA em toda a raiz na presença de Al.

Na região diferenciada das raízes, o genótipo UPF 91Al 100-1-4 apresentou aumento da peroxidação de lipídeos na presença do Al, porém em menor magnitude que o genótipo sensível UFRGS930598.

O nível de acúmulo de MDA foi menor nas folhas em todos os genótipos. A adição do Al causou aumento de MDA no genótipo UFRGS 17 e novamente no sensível UFRGS 930598 (Figura 15). O conteúdo de MDA foi sempre superior no genótipo sensível na presença de Al.

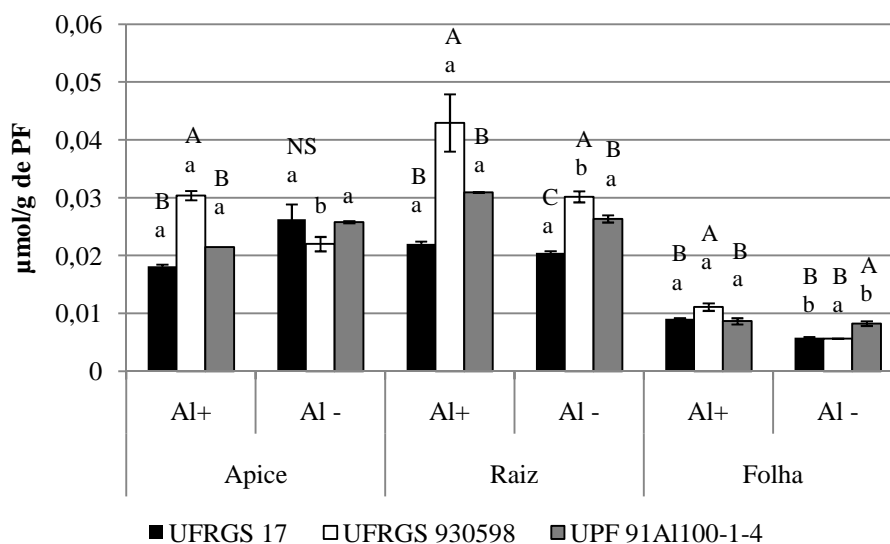


FIGURA 14. Produção de peróxido de hidrogênio ( $\mu\text{mol/g}$  de peso fresco) no ápice radicular (ápice), na zona diferenciada da raiz (raiz) e nas folhas de plântulas de aveia dos genótipos UFRGS 17 (Al-tolerante), UFRGS 930598 (Al sensível) e UPF 91Al 100-1-4 (Al-tolerante) submetidas ao estresse por toxidez de Al (+) ou sem Al (-) durante sete dias. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam genótipos dentro da mesma dose e órgão e, letras minúsculas comparam doses dentro do mesmo genótipo e órgão, pelo teste Duncan ao nível de 5%.

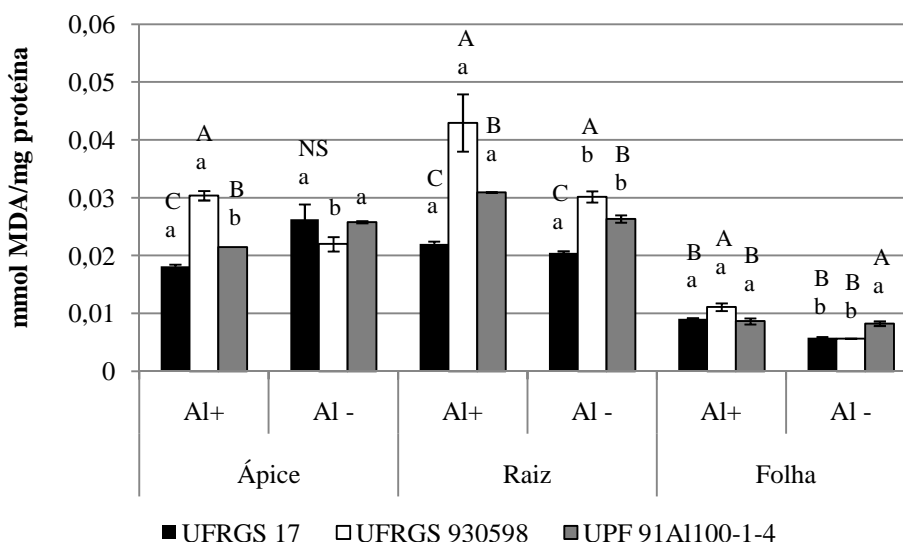


FIGURA 15. Níveis de malonaldeído (MDA) (mmol MDA/mg proteína) no ápice radicular (ápice), na zona diferenciada da raiz (raiz) e nas folhas de plântulas de aveia dos genótipos UFRGS 17 (Al-tolerante), UFRGS 930598 (Al sensível) e UPF 91Al 100-1-4 (Al-tolerante) submetidas ao estresse por toxidez de Al (+) ou sem Al (-) durante sete dias. Médias e desvio padrão apresentados. Letras maiúsculas comparam genótipos dentro da mesma dose e órgão e, letras minúsculas comparam doses dentro do mesmo genótipo e órgão, pelo teste Duncan ao nível de 5%.

#### 4.2 Análise de Recrescimento

Um sintoma comumente observado em aveia branca submetida à exposição temporária ao Al é o engrossamento ou calosidade do ápice da raiz principal. Outros sintomas de toxidez por Al foram percebidos nesta etapa do experimento, como a mudança na coloração normal da raiz, a qual se tornou mais amarelada, e formação de uma curvatura na extremidade das raízes (Figura 16).

Os genótipos parentais tolerantes UFRGS 17 e UPF 91 Al 100-1-4 apresentaram maiores valores de recrescimento da raiz principal, comprovando que estes genótipos são tolerantes ao Al, enquanto o genótipo UFRGS 930598 é sensível (Tabela 6).



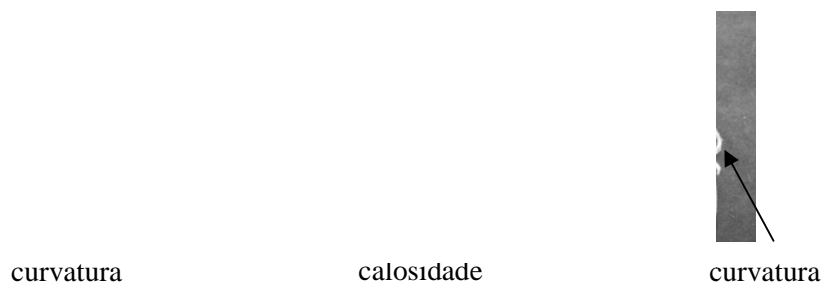


FIGURA 16. Sintomas da exposição temporária ao Al em aveia branca. Calosidade formada pela presença do Al tóxico em plântulas de aveia. Raízes com coloração escurecida e com a presença de uma curvatura na extremidade. Sintomas presentes após 48 h de exposição a  $740\mu\text{M}$  de Al, (A) genótipo tolerante, (B e C) genótipo sensível

TABELA 6. Médias do recrescimento da raiz principal (mm) sob tratamento de  $740\mu\text{M}$  de Al nos genótipos tolerantes UFRGS 17 e UPF 91Al 100-1-4 e, no genótipo sensível UFRGS 930598.

| Genótipo         | Médias  | DP   | Mínimo | Máximo |
|------------------|---------|------|--------|--------|
| UFRGS 17         | 12,47 A | 2,88 | 5,11   | 27,50  |
| UPF 91Al 100-1-4 | 16,89 A | 5,14 | 4,90   | 30,35  |
| UFRGS 930598     | 5,91 B  | 1,79 | 3,08   | 11,67  |
| Média Geral      | 11,75   |      |        |        |

DP: Desvio Padrão. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste Duncan ao nível de 5%.

#### 4.2.1 Distribuição de Frequência

Verificou-se a distribuição de frequência para populações F2 provenientes do cruzamento entre os genótipos tolerantes UFRGS17 e UPF91Al100-1-4. O parâmetro utilizado foi o comprimento da raiz principal a partir da calosidade formada devido ao contato com o Al tóxico. A média de resposta ao Al, apresentada pela população F2, foi 15,87 mm, sendo os valores extremos 7 e 28 mm, os quais foram abrangidos pela amplitude dos pais (Figura 17).

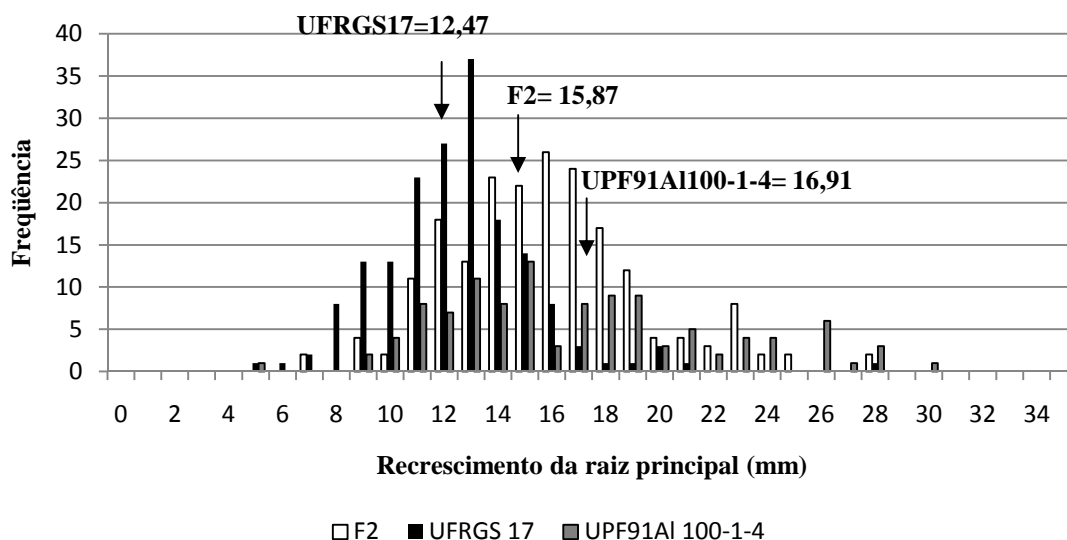


FIGURA 17. Distribuição das frequências do recrescimento da raiz principal (mm) da população UFRGS 91 Al 100-1-4 x UFRGS 17 após choque de  $Al^{+3}$  ( $740 \mu M$ ).

### 4.3 Citolocalização de Al via hematoxilina

A partir do corte transversal do tecido da raiz, observou-se localização do Al diferenciada entre os genótipos. Houve acúmulo de Al na epiderme, córtex e feixes vasculares no genótipo UFRGS 930598 (Figura 18A). No genótipo tolerante UFRGS 17 o Al permaneceu na epiderme não sendo observada translocação para a região do córtex e tecidos vasculares (Figura 18B). O genótipo tolerante UPF 91 Al 100-1-4, mostrou acúmulo de Al na epiderme, em algumas células do córtex e no feixe vascular, similar ao observado para o genótipo sensível (Figura 18C).

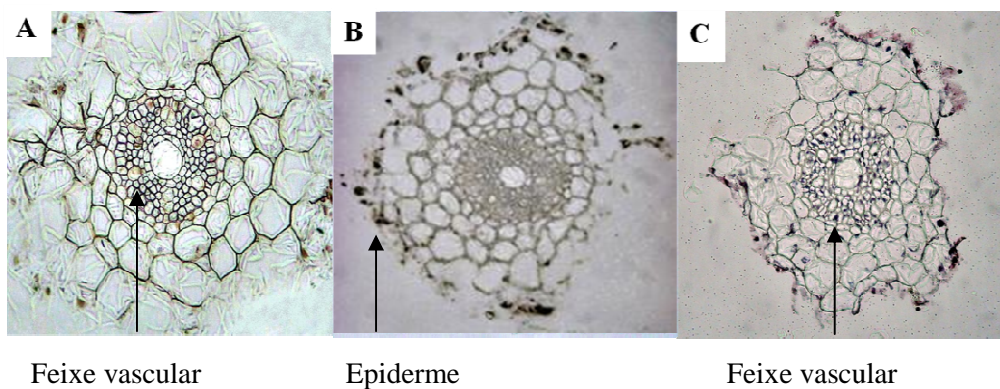


FIGURA 18. Cortes transversais (10 $\mu$ m) de raízes de aveia branca coradas com hematoxilina após sete dias de exposição a 740  $\mu$ M de Al. A coloração roxa avermelhada indica a localização de Al. (A) UFRGS 930598, (B) UFRGS 17 e (C) UPF 91Al 100-1-4 (Aumento 200x).

## 5 DISCUSSÃO

A tolerância ao Al tem sido estudada por programas de melhoramento genético, a fim de se obter genótipos com níveis adequados de tolerância e permitir o cultivo de espécies agrícolas em áreas com níveis tóxicos de Al (Nava *et al.*, 2006). O primeiro sintoma observado da toxidez por Al é a inibição do crescimento da raiz (Foy, 1988). Esta característica tem sido utilizada para diferenciar genótipos dentro da mesma espécie quanto à tolerância ao Al.

Diferentes metodologias têm sido utilizadas, sendo a mais comum o crescimento relativo à condição sem o estresse. No caso da aveia, a metodologia que se mostra mais eficiente é a análise de recrescimento radicular a partir do choque por Al (Sanchez-Chacon *et al.*, 2000). Esta técnica permitiu mensurar o comprimento da raiz a partir da calosidade formada após a exposição ao Al e diferenciar os genótipos avaliados (Tabela 6). Ainda, outros sintomas de toxidez foram identificados: as raízes apresentaram coloração amarelada e foi possível verificar uma curvatura nas extremidades das raízes, formada devido a alterações na divisão celular (Figura 16). A tolerância do genótipo UFRGS 17 e a sensibilidade de UFRGS 930598 também foram confirmadas avaliando o crescimento relativo em exposição continuada ao Al por sete dias em hidroponia (Limberger, 2006) e pela exposição ao Al no solo (Nava, 2005), indicando que a análise de recrescimento radicular é eficiente em diferenciar quanto à tolerância.

Os genótipos de aveia tolerantes mostraram grandes diferenças para o recrescimento da raiz principal em relação ao sensível. No entanto, observou-se uma grande amplitude de resposta dos indivíduos de mesmo genótipo, onde o recrescimento variou de 5 a 30 mm nos genótipos considerados tolerantes (Figura 17). Similar amplitude foi obtida por Nava (2005) e Oliveira (2002). Esta variação sugere um forte efeito de outros fatores, que não o genético, na expressão da tolerância. Segundo Lisitsyn (2000), a tolerância ao Al é muito dependente das condições de desenvolvimento da semente. Do mesmo modo, Limberger (2006) observou variações no grau de tolerância devido às condições ambientais durante a exposição ao estresse em aveia. Essas variações dentro dos genótipos tornam o estudo da tolerância ainda mais complexo, uma vez que alguns indivíduos comportam-se como sensíveis, apesar de pertencerem ao genótipo tolerante (Tabela 6).

De acordo com os trabalhos realizados por Sanchez-Chacon *et al.* (2000) e Oliveira *et al.* (2005), o caráter tolerância à toxidez de alumínio é uma característica herdável, controlada por um gene e a ação gênica observada foi a de dominância, havendo alelos múltiplos. Avaliando um número maior de cruzamentos, Wagner (1999) obteve resultados indicando a presença de um a dois genes dominantes envolvidos na tolerância ao alumínio. A presença de um único gene promovendo a tolerância foi sugerida para o genótipo UPF 91 Al 100-1-4 (Oliveira *et al.*, 2005). Da mesma forma, através da avaliação de linhagens recombinantes do cruzamento de UFRGS 17 com UFRGS 930598, a tolerância ao Al do genótipo UFRGS 17 foi considerada devido à presença de um gene, onde o genótipo tolerante carrega o alelo  $Al_aAl_a$  e o sensível  $al_aal_a$  (Nava *et al.*, 2006).

Para avaliar se a tolerância ao Al nos genótipos UFRGS 17 e UPF 91 Al 100-1-4 se devia ao mesmo gene, avaliaram-se os indivíduos F2 do cruzamento entre os dois

genótipos tolerantes. A análise de frequência sugere a presença de apenas um gene, uma vez que não houve segregação para a característica e não foi verificado indivíduo sensível na população F2. Os indivíduos tiveram recrescimento da raiz entre 7 e 28 mm, dentro da amplitude observada para os genitores (Figura 17). A amplitude de frequência da população F2, similar ao que ocorreu com os pais, deve-se possivelmente a fatores ambientais e não genéticos. Acredita-se na presença de um único gene maior conferindo a tolerância, porém genes menores relacionados ao estresse também podem estar presentes e serem influenciados pelo ambiente. Os pais possuem *background* genético diferente, o que pode gerar expressão diferenciada de genes com ação *downstream* do gene responsável pela tolerância sob mesma condição ambiental, conduzindo a diferenças, tais como na atividade das enzimas antioxidantes.

O mecanismo de tolerância e a função deste possível único gene responsável pela tolerância ao Al nestes dois genótipos de aveia não são conhecidos. De acordo com a literatura, os dois primeiros genes identificados na tolerância ao Al foram relacionados à secreção de ácidos orgânicos. O gene *TaALMT1*, codifica um transportador constitutivo de malato e foi encontrado em trigo (Sasaki *et al.*, 2004) e o gene *SbMATE*, codifica um transportador de citrato induzido pelo Al encontrado em sorgo (Magalhães *et al.*, 2007).

Estudos realizados a campo com as linhagens recombinantes da população F6 do cruzamento de UFRGS 17 com UFRGS 930598 indicaram que o mecanismo de tolerância ao Al em UFRGS 17 não se deve a uma característica constitutiva e sim induzida pelo estresse por toxidez de Al (Nava *et al.*, 2006).

Há evidências que o estresse por Al pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas plantas (Cakmak & Horst, 1991; Devi *et al.*, 2003; Panda *et al.*, 2008). O efeito inibitório do Al sobre as células da raiz ocorre mais cedo

do que a ativação de algumas defesas de plantas contra o estresse oxidativo, reforçando a hipótese de que o estresse oxidativo não é a primeira causa da inibição do crescimento radicular (Boscolo *et al.*, 2003). Por outro lado, em batata, houve correlação positiva entre o aumento de EROs e inibição do crescimento radicular nas primeiras 24 horas de exposição ao Al (Tabaldi *et al.*, 2009).

A indução da produção de EROs na presença de Al é verificada em menor quantidade em espécies tolerantes, resultando em menores danos oxidativos (Darkó *et al.*, 2004; Tabaldi *et al.*, 2009). Os dados obtidos no presente estudo confirmam a relação entre toxidez por Al e geração de EROs, uma vez que o genótipo sensível UFRGS 930598 apresentou maior teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e maior peroxidação de lipídeos nas raízes na presença do Al (Figuras 14 e 15).

O Al, ao entrar em contato com a raiz, se acumula principalmente no apoplasto e atravessa vagarosamente a membrana plasmática, causando os efeitos tóxicos do metal (Vázquez *et al.*, 1999). Estes autores observaram, alterações na estrutura da parede celular, em raízes de milho, uma vez que os elétrons presentes nesta região funcionam como alvos do metal. Ainda, identificaram rupturas nas células do córtex de ápices radiculares, as quais exibem numerosos e pequenos vacúolos que funcionam como depósitos de íons, após 24 h de tratamento com Al. No presente estudo, foi verificada a presença do Al nas células da epiderme no genótipo tolerante UFRGS 17 (Figura 18B). Entretanto, foi detectada também a presença do Al nas células do córtex e no câmbio no genótipo sensível UFRGS 930598 (Figura 18A) e no genótipo tolerante UPF 91 Al 100-1-4 (Figura 18C).

Quando o Al entra em contato com as células vegetais, as plantas possuem vários mecanismos para detoxificá-lo e minimizar seus danos. Entre eles está o mecanismo enzimático de defesa, envolvendo várias enzimas, como SOD, APX, CAT e

GR (Noctor *et al.*,2002). O comportamento do sistema antioxidante em genótipos de aveia contrastantes quanto à tolerância ao efeito tóxico de Al foi avaliado. Foi possível identificar três isoformas da enzima SOD nos tecidos de aveia branca, sendo a isoforma SOD3 não responsiva ao Al e mais ativa nos tecidos foliares. Os dados demonstraram aumento na atividade da SOD nas cultivares tolerantes UFRGS17 e UPF 91 Al100-1-4 em resposta ao Al (Figura 4). Este comportamento pode garantir um sistema antioxidante eficiente, uma vez que ocorrerá maior dismutação do  $O_2^-$ , reduzindo os danos oxidativos nestes genótipos. O mesmo foi constatado por Ghanati *et al.* (2005) em raízes da planta de chá. Já no genótipo sensível, a menor atividade das enzimas SOD pode resultar em maior formação de  $O_2^-$  e, posteriormente, de outras EROs, resultando em danos nos tecidos vegetais.

Apesar do comportamento geral de aumento da SOD nos genótipos tolerantes, observou-se no ápice das raízes comportamento diferenciado em relação às isoformas, onde UFRGS 17 aumentou uma e reduziu outra isoforma em resposta ao Al (Figura 4). Em milho, foi observado comportamento constante da enzima SOD, tanto em genótipos tolerantes como em sensíveis, durante 24 h de exposição ao Al, sugerindo não ser fator determinante da tolerância (Giannakoula *et al.*, 2010).

O papel da SOD é participar da catálise de  $O_2^-$  à  $H_2O_2$  e  $O_2$  (Alscher *et al.*, 2002). Entretanto, mesmo com elevada atividade da SOD, foram encontrados teores expressivos de superóxido nas raízes dos genótipos (Figura 12). O genótipo UFRGS 17, na presença de Al, aumentou a atividade da SOD (Figura 4), o que possivelmente causou o menor acúmulo de  $O_2^-$  na raiz em relação ao genótipo sensível (Figura 12A e C). Interessante observar que o genótipo UPF 91 Al100-1-4 aumentou o nível de superóxido na presença de Al apenas nos feixes vasculares e, não nos demais tecidos (Figura 12 E). A parede celular e a membrana plasmática constituem as camadas



celulares que conferem proteção às células aos estresses ambientais bióticos e abióticos (Mohan Murali Achary *et al.*, 2008). A elevada formação de  $O_2^{\cdot-}$  nas membranas do genótipo sensível pode contribuir para sua reduzida expansão celular, assim como a presença do radical no núcleo prejudica a divisão celular, reduzindo o crescimento das raízes.

Outra enzima avaliada foi APX, a qual participa da redução do  $H_2O_2$  à  $H_2O$  usando o ácido ascórbico como doador de elétrons (Mohan Murali Achary *et al.*, 2008). O aumento da atividade da APX está relacionado ao aumento de ácido ascórbico e redução do conteúdo de  $H_2O_2$  (Dipierro *et al.*, 2005). Nas raízes não houve alteração significativa da atividade da APX pela presença do Al, a exceção do genótipo UFRGS 17 onde esta foi reduzida (Figura 5). No entanto, os níveis de APX da UFRGS 17 são elevados na ausência de Al na raiz, sendo provavelmente suficientes para remoção das EROs geradas nas primeiras horas de exposição ao Al. Estas características possivelmente auxiliam na conferência de tolerância a estes genótipos. Ainda, o genótipo sensível UFRGS 930598, mesmo com maior atividade da enzima APX do que a UPF 91Al 100-1-4 na ausência de Al no ápice radicular, quando submetido ao estresse diminuiu significativamente os níveis de APX, ficando inferior aos demais genótipos (Figura 5). No entanto, esta não é a única enzima envolvida na degradação do peróxido de hidrogênio.

O aumento na atividade antioxidante da CAT é visto como mecanismo de defesa contra as EROs geradas pela presença do Al atuando também na degradação de  $H_2O_2$  à  $H_2O$  e  $O_2$ , especialmente no peroxissomo (Darkó *et al.*, 2004). Em plantas de chá (Ghanati *et al.*, 2005), trigo (Darkó *et al.*, 2004) e batata (Tabaldi *et al.*, 2009) foram observados aumentos na atividade da CAT em raízes tolerantes tratadas com Al. Porém, no presente estudo, nenhum aumento foi observado na atividade da CAT, sugerindo que

o Al inibiu a atividade ou a síntese da enzima CAT na raiz dos genótipos de aveia (Figura 6).

As raízes do genótipo UFRGS 17 produzem naturalmente elevados teores de CAT na área diferenciada da raiz. É possível que os níveis pré-existent de CAT sejam suficientes para eliminar as EROs, não havendo necessidade da planta sintetizar mais CAT quando submetida ao Al.

A atividade de CAT mostrou-se maior na parte aérea, apresentando o genótipo sensível 1,8 vezes mais atividade que os tolerantes na condição sem Al. Na presença de Al, a atividade de CAT nas folhas permaneceu igual nos genótipos tolerantes e significativamente maior que a atividade desta enzima no genótipo sensível UFRGS 930598 (Figura 6). Isto sugere que o Al seja translocado para a parte aérea no genótipo sensível ou que os efeitos do Al na homeostase da raiz afetem a atividade fotossintética.

A inibição da enzima CAT também foi verificada em células da raiz de *Allium cepa* L. por Mohan Murali Achary *et al.* (2008). Os autores constataram que a CAT, diferentemente das demais enzimas antioxidantes, não requer poder redutor para desestruturar a molécula de  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$ . A CAT possui menor afinidade por  $H_2O_2$  do que a APX e os autores atribuíram à APX o papel antioxidante de  $H_2O_2$ , quando este é encontrado em baixas concentrações nas células. Em raízes de milho, a inibição da atividade da CAT na presença do Al sugere a ativação de outras peroxidases responsáveis pela degradação de  $H_2O_2$  (Boscolo *et al.*, 2003). A quebra de  $H_2O_2$ , em cevada, deve-se às peroxidases da parede celular dependentes de NADH (Tamás *et al.*, 2004).

Não houve correlação entre a atividade das enzimas APX e CAT e a produção de peróxido de hidrogênio (Tabela 5). A indução da síntese de peróxido de hidrogênio no ápice do genótipo sensível, em plantas de aveia, após sete dias em solução

hidropônica sob estresse de 740  $\mu\text{M}$  de Al (Figura 14), sugere que o estresse por Al induz a formação de EROs no ápice radicular do genótipo sensível UFRGS 930598, mas não nos genótipos de aveia tolerantes, ou que a ação conjunta de enzimas redutoras de peróxido de hidrogênio seja eficiente, especialmente no ápice radicular dos genótipos tolerantes. Neste local os teores de peróxido não aumentaram na presença do Al nos genótipos tolerantes (Figura 14). Similar resposta foi obtida em raízes de milho tolerantes ao Al (Boscolo *et al.*, 2003; Giannakoula *et al.*, 2010) e batata (Tabaldi *et al.*, 2009).

O não aumento da atividade em resposta ao Al das enzimas APX e CAT pode estar relacionado ao tempo de exposição ao estresse no momento da análise, ou seja, se a explosão oxidativa ocorrer nas primeiras horas de exposição ao Al, aos sete dias de tratamento a reduzida quantidade de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e a baixa atividade enzimática indicam que o peróxido já tenha sido degradado pelas enzimas antioxidantes. Na literatura, em algumas espécies, o Al diminuiu o conteúdo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  dependendo da quantidade e do tempo de exposição ao Al. Em cevada, os maiores níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ocorreram nas primeiras 24 h e reduziram em 48 h (Tamás *et al.*, 2004). Já em abóbora, o aumento desta ERO foi verificado até as primeiras 48 h de exposição, decrescendo em seguida (Dipierro *et al.*, 2005).

A partir da histolocalização de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode-se perceber que ocorreu acúmulo de peróxido de hidrogênio nas raízes de todos os genótipos independente da presença de Al (Figura 11). Esta produção pode estar relacionada ao papel sinalizador desta ERO. O  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode atuar como uma molécula sinalizadora gerada continuamente no metabolismo normal da planta ou mediante os estresses bióticos e abióticos, iniciando uma resposta de sinalização incluindo ativação de genes que codificam enzimas antioxidantes (Neill *et al.*, 2002).

A peroxidação de lipídeos, mensurada a partir do teor de MDA, indicou diferença significativa, na presença do Al, entre os genótipos e órgãos analisados (Tabela 4). Os teores de peroxidação de lipídeos aumentaram no genótipo sensível na presença de Al em todos os órgãos avaliados, indicando ineficiência no sistema antioxidante. Nos genótipos tolerantes, os teores reduziram nos ápices radiculares (Figura 15).

O aumento da peroxidação de lipídeos no genótipo sensível é visto como sintoma recente de toxidez induzido pela presença do Al. Os lipídeos são o primeiro alvo celular atingido pelo estresse oxidativo, afetando o crescimento radicular, causando danos irreversíveis aos tecidos celulares (Tabaldi *et al.*, 2009). O não incremento da peroxidação de lipídeos nos ápices radiculares dos genótipos tolerantes na presença de Al indica um provável sistema antioxidante eficiente.

Entretanto, em raízes tolerantes de milho, houve a inibição do crescimento radicular por Al mesmo sem indução da peroxidação de lipídeos. Isto indica que os lipídeos não são alvo primário do estresse oxidativo e, este alvo varia dependendo da espécie, podendo ser as proteínas (Boscolo *et al.*, 2003). Nos genótipos estudados, houve correlação negativa entre o teor de MDA e o conteúdo de peróxido de hidrogênio (Tabela 5). Isto sugere que o principal causador da peroxidação de lipídeos não foi o  $H_2O_2$ , podendo ser o radical  $\cdot OH$ . Os lipídeos da membrana são ácidos graxos insaturados e suas ligações duplas são excelentes alvos para o ataque de radicais livres (Nordberg & Arnér, 2001). O  $H_2O_2$  pode ser convertido ao radical hidroxila, via reação química catalisada por metais, a partir da reação de Fenton, sendo extremamente reativo (Figura 2) e, assim, promovendo peroxidação nos lipídeos da membrana.

A enzima GR contribui para remoção de  $H_2O_2$  a partir da GSH, aumentando a tolerância a estresses ambientais (Szalai *et al.*, 2009). A atividade da enzima GR foi

aumentada pelo Al nas raízes nos genótipos UFRGS 17 e UFRGS 930598 e permaneceu inalterada no genótipo UPF 91Al 100-1-4 (Figura 7). Essa pode ser uma enzima importante na redução de EROs no genótipo UFRGS 17.

Além do sistema antioxidante enzimático para reduzir os danos oxidativos, as plantas possuem mecanismos não enzimáticos de defesa, como AsA, grupo de tióis não-protéicos (NPSH) e carotenóides, os quais funcionam interrompendo a cascata descontrolada de oxidação dentro das organelas (Tabaldi *et al.*, 2009).

No genótipo sensível UFRGS 930598, o teor de AsA reduziu significativamente no ápice e na zona diferenciada da raiz na presença do Al, mantendo-se elevado apenas na parte aérea (Figura 9). A redução no teor de AsA também foi verificado em raízes de clones sensíveis de batata após 24 h submetidas ao estresse por Al (Tabaldi *et al.*, 2009).

Nas cultivares tolerantes de aveia estudadas, houve aumento significativo de AsA nas raízes, especialmente no ápice. Este aumento no conteúdo de AsA pode conferir tolerância ao estresse, atuando como mecanismo protetor, contribuindo na detoxificação de EROs geradas pelo Al (Noctor & Foyer, 1998) protegendo a membrana contra a peroxidação de lipídeos (Tabaldi *et al.*, 2009) e, diminuindo os danos gerados por EROs no DNA (Yin *et al.*, 2010). Em plantas de fumo, menor conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e de peroxidação de lipídeos foi encontrado em plantas tratadas com Al comparadas ao controle. Isto foi atribuído a presença da enzima DHAR capaz de regenerar e elevar os teores de AsA (Yin, *et al.*, 2010). A reduzida peroxidação de lipídeos e de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nos genótipos tolerantes de aveia estudados, pode dever-se ao aumento da biossíntese de AsA. A manutenção do conteúdo de AsA é um parâmetro importante para o controle do estresse oxidativo (Eltayeb *et al.*, 2007).

Os dados não mostraram correlação entre o conteúdo de AsA e a atividade da enzima APX. Este fato pode reforçar a hipótese de que haja algum outro mecanismo responsável pela síntese de AsA, o qual também participa da proteção contra os efeitos do Al (Yin *et al.*, 2010).

Os teores de NPSH foram maiores na parte aérea do que nas raízes nos três genótipos, local onde se observou efeito do Al reduzindo NPSH nos genótipos UFRGS 93095 e UPF 91 Al 100-1-4 e aumentando no genótipo UFRGS 17 (Figura 8). Segundo Noctor & Foyer (1998), a glutationa reduzida (GSH) atua como o principal NPSH, sendo precursora das fitoquelatinas, as quais agem como peptídeos que complexam metais pesados em plantas e participam como substrato na redução do ascorbato no ciclo ascorbato-glutationa. Além disso, podem reagir com radicais livres de O<sub>2</sub>, como superóxido, radical hidroxila (Rosen, 2002) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Szalai *et al.*, 2009) removendo os radicais livres das células.

No ápice radicular, o Al não interferiu na síntese de NPSH. Na região diferenciada das raízes, os genótipos tolerantes apresentaram o teor de NPSH superior ao sensível na presença de Al, o que pode ter algum papel protetor durante o estresse por Al em plantas tolerantes. O NPSH, além de participar diretamente na detoxificação de EROs, também protege as células de estresses ambientais a partir da ativação de vários mecanismos de defesa, por estar envolvido na sinalização redox da célula (Noctor & Foyer, 1998).

Em relação aos pigmentos cloroplastídicos, apesar de ser conhecida a função protetora dos carotenóides em relação aos pigmentos fotossintetizantes do ataque das EROs (Mach & Greenberg, 2004), não houve efeito do Al sobre estes (Figura 10). Pode-se supor que o incremento nos teores de AsA e NPSH nas folhas tenha tornado desnecessário a ação destes ou, mais provavelmente, que a ação dos pigmentos esteja

mais relacionada aos EROs causados por desbalanços na fotossíntese e, portanto, sejam pouco influenciáveis pelo estresse de Al em curto prazo (sete dias).

De modo geral, observou-se maior dano oxidativo no genótipo sensível e maior produção de antioxidantes nos genótipos tolerantes. Quanto à importância das enzimas, o cenário ainda não é claro. O incremento da atividade da GR e da SOD, em UFRGS 17, e da SOD em UPF 91Al 100-1-4 sugere importância destas na redução de EROs. No entanto, a ocorrência de atividade bastante elevada de CAT e APX na raiz de UFRGS 17 na ausência de estresse também pode ter efeito durante o início do estresse oxidativo causado pelo Al. As diferentes respostas de cada enzima entre os genótipos tolerantes podem estar relacionadas ao diferente background genético destes genótipos.

A tolerância ao Al nos dois genótipos tolerantes deve-se ao mesmo gene. Porém, considerando que o padrão de acúmulo de alumínio é diferenciado, pois UFRGS 17 consegue mais eficientemente reduzir a entrada de Al para os tecidos internos da raiz, não se pode afirmar que o gene seja um transportador de ácidos orgânicos. Da mesma forma, apesar de ambos reduzirem o estresse oxidativo causado pelo Al, as respostas enzimáticas não foram similares. Sugere-se, portanto, que este gene, responsável pela tolerância em ambos os genótipos, atue em algum outro processo. Talvez possa ser um fator de transcrição que, uma vez induzido pelo Al, desencadeie respostas, entre elas a ativação do sistema antioxidante, o que acabou por reduzir os níveis de  $H_2O_2$  e de peroxidação de lipídeos.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Al induz estresse oxidativo em aveia branca. Os genótipos tolerantes ao Al apresentam um eficiente mecanismo de defesa reduzindo os danos gerados pelo estresse oxidativo. A tolerância ao Al nos genótipos tolerantes se deve ao mesmo gene.

A ação do gene de tolerância previne os efeitos tóxicos do Al nas raízes e as raízes das plantas de aveia tolerantes exibem maior crescimento radicular e menor acúmulo de EROs do que o genótipo sensível.

No genótipo tolerante UFRGS 17, a maior parte do Al fica retida na epiderme das células da raiz, como o metal não é transportado para a região do córtex e nos tecidos vasculares, proporciona menores danos às células. No genótipo sensível UFRGS 930598, o Al é localizado também nas células do córtex e do sistema vascular, danificando as células. No genótipo tolerante UPF 91Al 100-1-4, o Al também atinge os tecidos internos. Portanto, a detoxificação externa não é o mecanismo determinado pelo gene de tolerância.

O Al não induz a peroxidação de lipídeos e acúmulo de peróxido de hidrogênio nos genótipos tolerantes UFRGS 17 e UPF 91Al 100-1-4, porém induz no genótipo sensível UFRGS 930598, indicando baixa eficiência no sistema antioxidante.

Os genótipos tolerantes UPF 91Al 100-1-4 e, especialmente, UFRGS 17, exibem elevada atividade de enzimas do sistema antioxidante na ausência de Al, fato que pode contribuir na detoxificação de EROs quando as plantas são submetidas ao Al.



Nos genótipos de aveia branca testados, a tolerância ao Al pode ser conferida por detoxificação interna, via redução dos efeitos do estresse oxidativo. O gene de tolerância deve desencadear o processo de detoxificação, porém os genótipos tolerantes apresentam *background* genético diferente. Esta diferença no *background* genético pode explicar as diferenças nas respostas enzimáticas ao estresse oxidativo.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, R.K.; LINDE, J.; SENGUPTA, J.; NIERHAUS, K.H.; FRANK, J. Localization of L11 protein on the ribosome and elucidation of its involvement in EF-G-dependent translocation. **Journal of Molecular Biology**, New York, v.311, p.777–787, 2001.

AHN, S. J.; SIVAGURU, M.; OSAWA, H.; CHUNG, G.G.; MATSUMOTO, H. Aluminum inhibits the H<sup>+</sup>-ATPase activity by permanently altering the plasma membrane surface potentials in squash roots. **Plant Physiology**, Rockville, v.126, p.1381-1390, 2001.

AHN,S.J.; RENGEL, Z.; MATSUMOTO, H. Aluminium-induced plasma membrane surface potential and H<sup>+</sup>-ATPase activity in near-isogenic wheat lines differing in tolerance to aluminium. **New Phytologist**, Oxon, v.162, p.71-79, 2004.

ALAM, S. M. Influence of aluminum on plant growth and mineral nutrition of barley. **Communications Soil Science and Plant Analysis**, New York, v.12, p. 121-138, 1981.

ALEXIEVA, V.; SERGIEV, S.; MAPELLI; KARANOV, E. The effect of drought and radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.24, p.1337-1344, 2001.

ALLARD, R. W. **Principles of plant breeding**. 3ed. New York: J. Wiley, 1960. 485p.

ALSCHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, L.S. Role of superoxide dismutase (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.53, p.1331-1341, 2002.

ANIOL, A.; GUSTAFSON, J.P. Chromosome location of genes controlling aluminum tolerance in wheat, rye and triticale. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Ottawa, v.26, p.701-705, 1984.

APEL, K. ; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.55, p.373–399, 2004.

AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v.104, p.280-292, 1998.

BEAUCHAMP, C; FRIDOVIC, I. Superoxide dismutase- improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.44, n.1, p.276-279, 1971.

BOSCOLO, P.R.; MENOSSI, M.; JORGE, R.A. Aluminum-induced oxidative stress in maize. **Phytochemistry**, New York, v.62, p.181-189, 2003.

BOVERIS. **Methods in Enzymology**, San Diego, v.105, p.429-435, 1984.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v.72, p.248-259, 1976.

CAKMAK, I.; HORST, W. J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.83, p.463-468, 1991.

CAMARGO, C.E.O.; OLIVEIRA, O. F. Tolerância de cultivares de trigo a diferentes níveis de alumínio em solução nutritiva e no solo. **Bragantia**, Campinas, v.40, n.3, p.21-31, 1981.

CAMARGO, C.E.O.; FELICIO, J.C. Tolerância de cultivares de trigo, triticale e centeio em diferentes níveis de alumínio em solução nutritiva. **Bragantia**, Campinas, v.43, n.1, p.9-16, 1984.

CAMPBELL, L.G.; LAFEVER, H.N. Heritability of aluminum tolerance in wheat. **Cereal Research Communications**, Szeged, v.9, p.282-287, 1981.

CIAMPOROVA, M. Morphological and structural responses of plant roots to aluminum at organ, tissue, and cellular levels. **Biologia Plantarum**, Praha, v.45, p.161-171, 2002.

CURTIN, D.; SMILLIE, G.W. Soil solution composition as affected by liming and incubation. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.47, n.4, p.701-707, 1983.

DARKÓ, E.; AMBRUS, H.; STEFANOVITS-BÁNYAI, É.; FODOR, J.; BAKOS, F.; BARNABÁS, B. Aluminium toxicity, Al tolerance and oxidative stress in an Al-sensitive wheat genotype and in Al-tolerant lines developed by in vitro microspore selection. **Plant Science**, Clare, v.166, p.583-591, 2004.

DECREUX, A.; MESSIAEN, J. Wall-associated kinase WAK1 interacts with cell wall pectins in a calcium-induced conformation. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v.46, p.268-278, 2005.

DELHAIZE, E.; HEBB, D.M.; RYAN, P.R. Expression of a *Pseudomonas aeruginosa* citrate synthase gene in tobacco is not associated with either enhanced citrate accumulation or efflux. **Plant Physiology**, Rockville, v.125, n.4, p.2059-2067, 2001.

DEMIREVSKA-KEPOVA, K.; SIMOVA-STOILLOVA, L.; STOYANOVA, Z.; HOLZER, R.; FELLER, U. Biochemical changes in barley plants after excessive supply

of copper and manganese. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v.52, p.253–266, 2004.

DEVI, S.R.; YAMAMOTO, Y.; MATSUMOTO, H. An intracellular mechanism of aluminum tolerance associated with high antioxidant status in cultured tobacco cells. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v.97, p.59–68, 2003.

DIPIERRO, N.; MONDELLI, D.; PACIOLLA, C.; BRUNETTI, G.; DIPIERRO, S. Changes in the ascorbate system in the response of pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) roots to aluminum stress. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v.162, p.529–536, 2005.

ECHART, C.L.; CAVALLI-MOLINA, S. Fitotoxicidade do alumínio: efeitos, mecanismos de tolerância e seu controle genético. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.3, p.531- 541, 2001.

EL-MOSHATY, F.I.B.; PIKE, S.M.; NOVACKY, A.J.; SEHGAL, O.P. Lipid peroxidation and superoxide production in cowpea (*Vigna unguiculata*) leaves infected with tobacco ringspot virus or southern bean mosaic virus. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.43, p.109-119. 1993.

ELTAYEB, A.E.; KAWANO, N.; BADAWI, G.H.; KAMINAKA, H.; SANEKATA, T.; SHIBAHARA, T.; INANAGA, S.; TANAKA, K. Overexpression of monodehydroascorbate reductase in transgenic tobacco confers enhanced tolerance to ozone, salt and polyethylene glycol stresses. **Planta**, New York, v.225, p.1255–1264, 2007.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Brasília: Embrapa Produção da Informação; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 1999. 412p.

ESWARAN, H.; REICH, P.; BEINROTH, F. Global distribution of soils with acidity. In: MONIZ, A.C. (ed). **Plant soil interactions at low pH: sustainable agriculture and forestry production**. Campinas : Brazilian Soil Science Society, p.159-164, 1997.

EZAKI, B.; GARDNER, R.; EZAKI, Y.; MATSUMOTO, H. Expression of aluminum-induced genes in transgenic Arabidopsis plants can ameliorate aluminum stress and/ or oxidative stress. **Plant Physiology**, Rockville, v.122, p.657-665, 2000.

FEDERIZZI, L.C.; ACAUAN, L.R.; CARVALHO, F.I.F. Variabilidade fenotípica de diferentes caracteres da panícula em aveia (*Avena sativa* L.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.30, n.2, p.223-229, 1995.

FERNANDES, M.S. **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa : [s.n.], 2006. 432p.

FONSECA JUNIOR, E.M. **Produção de intermediários reativos de oxigênio em arroz, na presença do alumínio**. 2007. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

FOY, C.D. Plant adaptation to acid, aluminum-toxic soils. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v.19, p. 959-987, 1988.

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. **New Phytologist**, Oxford, v.146, p.359-388, 2000.

FRANKLIN, A.E.; CANDE, W.Z. Nuclear organization and chromosome segregation. **The Plant Cell**, Rockville, v.11, p.523-534, 1999.

TANG, Y.; GARVIN, D.F.; KOCHIAN, L.V.; SORRELLS, M.E.; CARVER, B.F. Physiological genetics of aluminum tolerance in the wheat cultivar Atlas 66. **Crop Science**, Madison, v.42, p.1541-1546, 2002.

GECHEV, T.S.; BREUSEGEM, F.V.; STONE, J.M.; DENEV, I.; LALOI, C. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. **BioEssays**, Cambridge, v.28, p.1091-1101, 2006.

GHANATI, F.; MORITA, A.; YOKOTA, H. Effects of aluminum on the growth tea plant and activation of antioxidant system. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.276, p.133-141, 2005.

GIANNAKOULA, A.; MOUSTAKAS, M.; SYROS, T.; YUPSANIS, T. Aluminum stress induces up-regulation of an efficient antioxidant system in the Al-tolerant maize line but not in the Al-sensitive line. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v.67, p.487-494, 2010.

GOMES JUNIOR, R. A. **Resposta antioxidativas de células *in vitro* de café (*Coffea arabica*) submetidas aos metais pesados cádmio (Cd) e níquel (Ni)**. 135f. 2006. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”-ESALQ, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

GRAY, B.; DRAKE, M.; COLBY, W.G. Potassium competition in grass-legume associations as a function of root cation exchange capacity. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, Proc. v.17, p.235-239. 1953.

GUO, Z.F.; TAN, G.Q.; ZHU, Z.H.; LU, S.Y.; ZHOU, B.Y. Effect of intermediates on ascorbic acid and oxalate biosynthesis of rice and in relation to its stress resistance. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.43, p.955-962, 2005.

HARTWELL, B. L.; PEMBER, F.R. The presence of aluminum as a reason for the difference in the effect of so-called acid soils on barley and rye. **Soil Science**, Baltimore, v.6, p.259-279, 1918.

HARTWIG, I.; OLIVEIRA, A.C.; CARVALHO, F.I.F.; BERTAN, I.; SILVA, A.G.; SCHIMIDT, D.A.M.; VALÉRIO, I.P.; MAIA, L.C.; FONSECA, D.A.R.; REIS, C.E. S. Mecanismos associados à tolerância ao alumínio em plantas. Associated mechanisms of aluminum tolerance in plants. **Semina: Ciência Agrária**, Londrina, v.28, n.2, p.219-228, 2007.

HAYNES, R.J.; MOKOLOBATE, M.S. Amelioration of Al toxicity and P deficiency in acid soils by additions of organics residues: a critical review of the phenomenon and the

mechanisms involved. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Dordrecht, v.59, p.47-63, 2001.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplast I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.125, p.189-198, 1968.

HISCOX, J.D.; ISRAELSTAM, G.F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.57, p.1132-1334, 1979.

HOEKENGA, O.A.; VISION, T.J.; SHAFF, J.E.; MONFORTE, A.J.; LEE, G.P.; HOWELL, S.H.; KOCHIAN, L.V. Identification and characterization of aluminum tolerance loci in *Arabidopsis* (*Landsberg erecta* x *Columbia*) by quantitative trait locus mapping. A physiologically simple but genetically complex trait. **Plant Physiology**, Rockville, v.132, n.2, p.936-948, 2003.

HOUDE, M.; DIALLO, A.O.; Identification of genes and pathways associated with aluminum stress and tolerance using transcriptome profiling of wheat near-isogenic lines. **BMC Genomics**, London, v.9, p.400-413, 2008.

HUANG, C.F.; YAMAJI, N.; MITANI, N.; YANO, M.; NAGAMURA, Y.; MA, J.F. Bacterial-Type ABC Transporter Is Involved in Aluminum Tolerance in Rice. **The Plant Cell**, Rockville, v.21, p.655-667, 2009.

JACQUES-SILVA, M.C., NOGUEIRA, C.W., BROCH, L.C., FLORES, E.M.M., ROCHA, J.B.T. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. **Pharmacology & Toxicology**, Copenhagen, v.88, p.119-125, 2001.

JONES, D.L.; KOCHIAN, L.V. Aluminum interaction with plasma membrane lipids and enzyme metal binding sites and its potential role in Al cytotoxicity. **FEBS: Federation of European Biochemical Societies- Letters**, Netherlands, v.400, p.51-57, 1997.

JOZEFACIUK, G.; SZATANIK-KLOC, A. Decrease in variable charge and acidity of root surface under Al treatment are correlated with Al tolerance of cereal plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.260, p.137-145, 2004.

KERRIDGE, P.C.; KRONSTAD, W.E. Evidence of genetic resistance to aluminum toxicity in wheat (*Triticum aestivum* Vill., host). **Agronomy Journal**, Madison, v.60, n.6, p.710-711, 1968.

KINRAIDE, T.B.; PARKER, D.R. Assessing the phytotoxicity of mononuclear hydroxy- aluminum. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.12, p.479-487, 1989.

KINRAIDE, T.B. Identity of the rhizotoxic aluminium species. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.134, p.167-178, 1991.

KINRAIDE, T.B. Three mechanisms for the calcium alleviation of mineral toxicities. **Plant Physiology**, Rockville, v.118, p.513-520, 1998.

KNOX, J.P.; DODGE, A.D. The photodynamic action of eosin, a singlet oxygen generator. 2. The inhibition of photosynthetic electron transport. **Planta**, New York, v.164, p.30-34, 1985.

KOCHIAN, L.V. Cellular mechanism of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, New York, v.46, p.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 Plant Physiology Plant Molecular Biology**, New York, v.55, p.459-493, 2004.

KOCHIAN, L.V.; PIÑEROS, M.A.; HOEKEMGA, O.A. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.274, p.175-195, 2005.

KUO, M.C.; KAO, C.H. Aluminum effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v.46, n.1, p.149-152, 2003.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, p.680-685, 1970.

LEGGETT, J.M.; MARKHAND, S.M. The genomic identification of some monosomics of *Avena sativa* L. Cv Sun II using GISH. **Genome**, Ottawa, v.38, p.747 – 751, 1995.

LEVINE, R.L.; GARLAND, D.; OLIVER, C.N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A.G.; AHN, B.W.; SHALTIEL, S.; STADTMAN, E.R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, New York, v.186, p.464-478. 1990.

LIGABA, A.; KOCHIAN, L.; PIÑEROS, M. Phosphorylation at S384 regulates the activity of the TaALMT1 malate transporter that underlies aluminum resistance in wheat. **The Plant Journal**, Oxford, v.60, p.411-423, 2009.

LIMBERGER, E. **Identificação de genes responsivos ao alumínio tóxico em aveia branca (*Avena sativa* L.)** 2006. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

LINDBERG, S.; SZYNKIER, K.; GREGER, M. Aluminum effects on transmembrane potentials in cells of fibrous roots of sugar beet. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.83, p.54-62, 1991.

LISITSYN, E.M. Intravarietal level of aluminum resistance in cereal crops. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.23, p.793 – 804, 2000.

LORETO, F.; VELIKOVA, V. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. **Plant Physiology**, Rockville, v.127, p.1781-1787, 2001.

MA, J.F.; NAGAO, K.; SATO, K.; ITO, H.; FURUKAWA, J.; TAKEDA, K. Molecular mapping of a gene responsible for Al-activated secretion of citrate in barley. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.55, n.401, p.1335-1341, 2004.

MA, J.F.; RYAN, P.R.; DELHAIZE, E. Aluminum tolerance in plants and the complexing role of organic acids. **Trends in Plant Science**, London, v.6, p.273-278, 2001.

MACH, F.M.; GREENBERG, J.T. Free Radicals and Oxidative Stress. **Plant Cell Death Processes**, Hardbound, 392 pages, 2004.

MAGALHÃES, J.V. **Molecular genetic and physiological investigation of aluminum tolerance in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench)**. 2002. PhD (Thesis) – Cornell University, New York, 2002.

MAGALHÃES, J.V.; JIPING LIU, J.; GUIMARÃES, C.T.; LANA, U.G.P.; ALVES, V.M.C.; WANG, Y.; SCHAFFERT, R.E.; HOEKENGA, O.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 aluminium tolerance in sorghum. **Nature Genetics**, London, v.39, n.9, p. 1156-1161, 2007.

MAGISTAD, C.C. The aluminium content of the soil solution and its relation to soil reaction and plant growth. **Soil Science**, Baltimore, v.20, p.181-225, 1925.

MATHER, K.; JINKS, J.L. **Biometrical genetics**. 3ed. Cambridge: University Press, 396p, 1982.

MATSUMOTO, H. Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. **International Review of Cytology**, New York, v.200, p.1-46, 2000.

MCCLINTOCK, B. The significance of responses of the genome to challenge. **Science**, New York, v.226, p.792–801, 1984.

MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. The generation of superoxide radical during the autoxidation of ferredoxins. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.246, p.6886-6890, 1971.

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



MOHAN MURALI ACHARY, V.; JENA, S.; PANDA, K.K.; PANDA, B.B. Aluminium induced oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v.70, p.300-310, 2008.

MOLLER, I.M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. **Annual Review of Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.52, p.561-591, 2001.

MOLLER, I.M.; JENSEN, P.E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.58, p.459-481, 2007.

MORITA, A.; YANAGISAWA, O.; TAKATSU, S.; MAEDA, S.; HIRADATE, S. Mechanism for the detoxification of aluminum in roots of tea plant (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze). **Phytochemistry**, New York, v.69, p.147-153, 2008.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v.22, p.867-880, 1981.

NAVA, I.C. **Estratégias de avaliação e herança ao alumínio em linhagens recombinantes de aveia (*Avena sativa* L.)**. 92f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós- Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

NAVA, I.C.; DELATORRE, C.A.; DUARTE, I.T.L.; PACHECO, M.T.; FEDERIZZI, L.C. Inheritance of aluminum tolerance and its effects on grain yield and grain quality in oats (*Avena sativa* L.). **Euphytica**, Dordrecht, v.148, p.353-358, 2006.

NEILL, E.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J. Hydrogen peroxide signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, England, v.5, p.388-395, 2002.

NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, Palo Alto, v.49, p.249-279, 1998.

NOCTOR, G.; GOMEZ, L.; VANACKER, H.; FOYER, C.H. Interaction between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.53, p.1283-1304, 2002.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v.31, p.1287-1312, 2001.

NORIEGA, A.; TOCINO, A.; CERVANTES, E. Hydrogen peroxide treatment results in reduced curvature values in the Arabidopsis root apex. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v.166, p.554-558, 2009.

OLIVEIRA, P.H. **Herança genética e mapeamento molecular da tolerância à toxicidade do alumínio em aveia**. 101f. 2002. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

OLIVEIRA, P. H., FEDERIZZI, L., MILACH, S. C. K., GOTUZZO, C., SAWASATO, J.T. Inheritance in oat (*Avena sativa* L.) of tolerance to soil aluminum toxicity. *Crop breeding and applied biotechnology*. , v.5, p.125 - 133, 2005.

PARKER, D.R.; KINRAIDE, T.B.; ZELAZNY, L.W. Aluminium speciation and phytotoxicity in dilute hydroxi-aluminum solutions. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.52, p.438-444, 1988.

PIÑEROS, M.A.; MAGALHAES, J.V.; ALVES, V.M.C.; KOCHIAN, L.V. The physiology and biophysics of an aluminum tolerance mechanism based on root citrate exudation in maize. **Plant Physiology**, Rockville, v.129, n.3, p.1194-1206, 2002.

POLIDOROS, N.A.; SCANDALIOS, J.G. Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione S-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.) **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v.106, p.112-120, v. 1999.

POSPÍSIL, P.; ARATÓ, A.; KRIEGER-LISZKAY, A.; RUTHERFORD, W. Hydroxyl radical generation by photosystem II. **Biochemistry**, New York, v.43, p.6783-6792, 2004.

RAJARAM, S.; LOPEZ, J.; VILLEGAS, E.; BORLAUG, N.E. Breeding for resistance to aluminum toxicity in wheat. **Annual Meeting of the American Society of Agronomy**, Washington, v73., p.45. 1981.

RENGEL, Z.; ZHANG, W.H. Role of dynamics of intracellular calcium in aluminium-toxicity syndrome. **New Phytologist**, Oxon, v.159, p.295-314, 2003.

RODRIGUEZ-MILLA, E.; BUTLER, E.; RODRIGUEZ, H.A.; WILSON, C.F.; ANDERSON, O.; GUSTAFSON, J.P. Expressed sequence Tag-based gene expression analysis under aluminium stress in rye. **Plant Physiology**, Rockville, v.130, p.1706-1716, 2002.

ROSEN, B.P. Biochemistry of arsenic detoxification. **FEBS: Federation of European Biochemical Societies- Letters**, Netherlands, v.529, p.86-92, 2002.

ROSSIELO, R.O.P.; JACOB NETO, J. Toxidez de alumínio em plantas: novos enfoques para um velho problema. In: FERNANDES, M.S. (Ed.) **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa : Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p.375-418.

SÀNCHEZ-CHACÒN, C.D.; FEDERIZZI, L.C.; MILACH, S.C.K.; PACHECO, M.T. Variabilidade genética e herança da tolerância à toxicidade do alumínio em aveia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.9, p.1797-1808, 2000.

SASAKI, T.; YAMAMOTO, Y.; EZAKI, B.; KATSUHARA, M.; AHN, S. J.; RYAN, P.R.; DELHAIZE, E.; MATSUMOTO, H. A wheat gene encoding a aluminum-activated malate transporter. **The Plant Journal**, Oxford, v.37, p.645-653, 2004.

SAWAKI, Y.; IUCHI, S.; KOBAYASHI, Y.; KOBAYASHI, Y.; TAKASHI IKKA, T.; SAKURAI, N.; FUJITA, M.; SHINOZAKI, K.; SHIBATA, D.; KOBAYASHI, M.; KOYAMA, H. STOP1 regulates multiple genes that protect Arabidopsis from proton and aluminum toxicities. **Plant Physiology**, Rockville, v.150, p.281–294, 2009.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, Rockville, v.101, p.7-12, 1993.

SCANDALIOS, J.G. In: C.H. Foyer and P.M. Mullineaux, Editors, **Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants**, CRC Press, Boca Raton, p.275–316, 1994.

SHEN R.F.; MA, J.F.; KYO, M.; IWASHITA, T. Compartmentation of aluminium in leaves of an Al accumulator, *Fagopyrum esculentum* Moench. **Planta**, New York, v.215, n.3, p.394-398, 2002.

SILVA, I.R.; SMYTH, T.J.; RAPER, C.D.; CARTER, T.E.; RUFTY, T.W. Differential aluminum tolerance in soybean: An evaluation of the role of organic acids. **Physiologia Plantarum**, Oxford, v.112, n.2, p.200-210, 2001.

SILVA, I.; SMYTH, T.; MOXLEY, D.; CARTER, T.; ALLEN, N.; RUFTY, T. Aluminum accumulation at nuclei of cells in the root tip. Fluorescence detection using lumogallion and confocal laser scanning microscopy. **Plant Physiology**, Rockville, v.123, p.543-552, 2000.

SINHA, S.; SAXENA, R.; SINGH, S. Chromium induced lipid peroxidation the plants of *Pistia stratiotes* L.: role of antioxidants and antioxidant enzymes. **Chemosphere**, Oxford, v.58, p.595-604, 2005.

SIVAGURU, M.; HORST, W. The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize. **Plant Physiology**, Rockville, v.116, p.155-163, 1998.

SIVAGURU, M.; BALUKA, F.; VOLKMANN, D.; FELLE, H.; HORST, W.J. Impacts of Aluminum on the Cytoskeleton of the Maize Root Apex. Short-Term Effects on the Distal Part of the Transition Zone. **Plant Physiology**, Rockville, v.119, p.1073-1082, 1999.

SIVAGURU, M.; FUJIWARA, T.; SAMAJ, J.; BALUSKA, F.; YANG, Z.; OSAWA, H.; MAEDA, T.; MORI, T.; VOLKMANN, D.; MATSUMOTO, H. Aluminum-induced 1-3 beta-D- glucan inhibits cell-to-cell trafficking of molecules through plasmodesmata. A new mechanism of aluminum toxicity in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v.124, p.991-1006, 2000.

SPOSITO, G. **The chemistry of soils**. New York: Oxford University, 1989.

STELL, R.G.D.; TORRIE, J. H. **Principles and procedures of statistics**. New York: McGraw-Hill, 1960. 481p.

SZALAI, G.; KELLOS, T.; GALIBA, G.; KOCSY, G. Glutathione as a antioxidant and regulatory molecule in plants under abiotic stress conditions. **Journal Plant Growth Regul**, v.28, p.66-80, 2009.

TABALDI, L.A.; CARGNELUTTI, D.; GONÇALVES, J.F.; PEREIRA, L.B.; Y CASTRO, G.; 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**, Oxford, v.76, p.1402-1409, 2009.

TAMÁS, L.; HUTTOVÁ, J.; MISTRÍK, I.; SIMONOVICOVÁ, M.; SIROKÁ, B. Aluminium-induced drought and oxidative stress in barley roots. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v.163, p.781-784, 2006.

TAMÁS, L.; SIMONOVICOVÁ, M.; HUTTOVÁ, J.; MISTRÍK, I. Aluminium stimulated hydrogen peroxide production of germinating barley seeds. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v.51, p.281–288, 2004.

THORDAL-CHISTENSEN, H.; ZHANG, Z.; WEI, Y.D.; COLLINGE, D.B. Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. **The Plant Journal**, Oxford, v.11, p.1187-1194, 1997.

VÁZQUEZ, M. D.; POSCHENRIEDER, C.; CORRALES, I.; BARCELÓ, J. Change in apoplastic aluminum during the initial growth response to aluminum by roots of a tolerant maize variety. **Plant Physiology**, Rockville, v.119, p.435-444, 1999.

VITORELLO, V.A.; CAPALDI, F.R.; STEFANUTO, V.A. Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plant. **Brazilian Journal Plant Physiology**, Campinas, v.17, p.129-143, 2005.

VITORIA, A.P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. **Phytochemistry**, New York, v.57, p.701-710, 2001.

WAGNER, C.W.; MILACH, S.C.K.; FEDERIZZI, L.C. Genetic inheritance of aluminum tolerance in oat. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 1, n.1, p.22-26, 2001.

WANG, D.F.; HUANG, L.L.; BUCHENAUER, E.; HAN, Q.M.; ZHANG, H.C.; KAMG, Z.C. Histochemical studies on the accumulation of reactive oxygen species (O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in the incompatible and compatible interaction of wheat-*Puccinia striiformis* f. sp. *Tritici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.71, p.230-239, 2007.

WIGHT, C.P.; KIBITE, S.; TINKER, N.A.; MOLNAR, S.J. Identification of molecular markers for aluminium tolerance in diploid oat through comparative mapping and QTL analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v.112, p.222–231, 2006.

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

YANG, Z.M.; SIVAGURU, M.; HORST, W. J.; MATSUMOTO, H. Aluminum tolerance is achieved by exudation of citric acid from roots of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, Oxford, v.110, n.1, p.72-77, 2000.

YIN, L.; WANG, S.; ELSADIG ELTAYEB, E.A.; IMTIAZ UDDIN, I.; YAMAMOTO, Y.; TSUJI, W.; TAKEUCHI, Y.; TANAKA, K. Overexpression of dehydroascorbate reductase, but not monodehydroascorbate reductase, confers tolerance to aluminum stress in transgenic tobacco. **Planta**, New York, v.231, p.609-621, 2010.

ZHENG, S.J.; MA, J.F.; MATSUMOTO, H. Continuous secretion of organic acids in related to aluminum resistance during relatively long-term exposure to aluminum stress. **Physiologia Plantarum**, Oxford, v.103, n.2, p.209-214, 1998a.

ZHENG, S.J.; MA, J.F.; MATSUMOTO, H. High aluminum resistance in buckwheat: I. Al-induced specific secretion of oxalic acid from root tips. **Plant Physiology**, Rockville, v.117, n.3, p.745-751, 1998b.

## **8 VITA**

Graciela Castilhos é filha de Jorge Alberto Napp Castilhos e Maria Bernadete Castilhos. Nasceu em Santa Maria-RS, em 02 de setembro de 1983. Coursou o primeiro e o segundo grau no Colégio Riachuelo em Santa Maria-RS. Em 2003 ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal de Santa Maria-RS, onde se graduou Engenheira Agrônoma em 2008. No mesmo ano, iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre-RS, com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).