



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Departamento de Botânica

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal**



**RAQUEL DE OLIVEIRA FARIA**

**EFEITO DO ÓXIDO NÍTRICO NO FLUXO DE AUXINA E NO  
ESTRESSE OXIDATIVO EM RAÍZES DE *Triticum aestivum* EM  
RESPOSTA AO ALUMÍNIO**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto  
de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas  
Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de  
Mestre em Biologia Vegetal.**

**Área de Concentração Fisiologia Vegetal**

**BELO HORIZONTE – MG**

**2013**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Departamento de Botânica

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal**



**RAQUEL DE OLIVEIRA FARIA**

**EFEITO DO ÓXIDO NÍTRICO NO FLUXO DE AUXINA E NO  
ESTRESSE OXIDATIVO EM RAÍZES DE *Triticum aestivum* EM  
RESPOSTA AO ALUMÍNIO**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto  
de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas  
Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de  
Mestre em Biologia Vegetal.**

**Área de Concentração Fisiologia Vegetal**

**Orientadora: Profa. Dra. Luzia Valentina Modolo**

**Universidade Federal de Minas Gerais**

**BELO HORIZONTE – MG**

**2013**

043

Faria, Raquel de Oliveira.

Efeito do óxido nítrico no fluxo de auxina e no estresse oxidativo em raízes de *Triticum aestivum* em resposta ao alumínio [manuscrito] / Raquel de Oliveira Faria. - 2013.

75 f.: il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Luzia Valentina Modolo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Botânica.

1. *Triticum aestivum* - Raízes - Teses. 2. Alumínio - Teses. 3. Óxido nítrico - Teses. 4. Estresse oxidativo - Teses. 5. Plantas - Efeito da auxina - Teses. 6. Botânica - Teses. I. Modolo, Luzia Valentina. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Botânica. III. Título.

CDU: 581

Dissertação defendida e aprovada, em 27 de fevereiro de 2013, pela banca examinadora:

---

Dra. Luzia Valentina Modolo – Orientadora

---

Dr. Cleberson Ribeiro

---

Dr. Cleber Cunha Figueredo

"A inspiração do Todo-poderoso é que dá a inteligência"  
(Livro de Jó cap.32 vers.8)

Aos meus pais, Ronaldo e Marilene e  
ao meu irmão, Rafael,  
com carinho dedico esta dissertação.

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, que me deu a vida e está comigo por onde quer que eu vá firmando os meus passos. Meu melhor amigo sempre presente nas horas mais difíceis para me dar força e amor. Essa dissertação nunca seria sequer iniciada sem você!

Aos meus queridos pais, Ronaldo e Marilene Faria, pelo apoio e amor desde os primórdios da minha existência e por proporcionar a mim uma boa educação. Ao meu irmão, Rafael Faria, sempre misterioso e filosófico, que me ajuda a ver o mundo de forma diferente.

Ao Pedro Kapitzky, pela ajuda com os experimentos nos finais de semana e feriados, pelos conselhos e pelo companheirismo.

À Profa. Dra. Luzia Valentina Modolo pela orientação, pela paciência em ensinar, pela dedicação, pela disponibilidade e por acreditar na minha capacidade.

À minha amiga, Dandara Muniz, estudante de iniciação científica que me acompanhou por longa data, sempre me ajudando na execução dos experimentos e compartilhando erros e acertos, dias felizes e cansativos.

À minha querida prima, Rebecca Rios, que dedicou seu sábado para me ajudar quando mais precisei, macerando amostras.

Ao meu amigo, Jefferson Rodrigues de Souza, e minha amiga, Fernanda Gomes da Silva, pela ajuda com as análises estatísticas e paciência em me ensinar sobre o assunto.

Aos meus queridos amigos Ana Paula de Faria, Camila Vitória, Débora Araújo, Fernanda Gomes, Gisele Barbosa, Janaína Garcia, Vinícius Moraes, Leandro Torres, Lívia Horta pessoas excepcionais que sempre me apoiaram nos momentos que mais precisei. A construção dessa dissertação foi muito melhor, mais leve e agradável graças a vocês!

Ao meu amigo, Advanio Inácio, que me auxiliou com a execução da parte de anatomia vegetal para a localização de auxina e sempre que precisei esteve disponível para ajudar. Sua ajuda foi essencial!

Aos meus amigos e colegas do laboratório de Anatomia Vegetal que auxiliaram em procedimentos pouco familiares a mim e foram companheiros nas horas de trabalho.

Aos professores Dr. João Aguiar Nogueira Batista (Departamento de Botânica, UFMG), Dra. Maria Aparecida de Resende Stoianoff (Departamento de Microbiologia, UFMG) e Dr. Ângelo de Fátima (Departamento de Química, UFMG) pelo empréstimo de equipamentos e materiais laboratoriais indispensáveis à execução deste trabalho.

Ao prof. Dr. Antônio Wilson Penteado Ferreira Filho do Instituto Agrônomo de Campinas (SP), pelo fornecimento das sementes dos cultivares tolerante e sensível ao alumínio de *Triticum aestivum*.

Aos docentes, funcionários e colegas de todos os laboratórios do Departamento de Botânica, que contribuíram de alguma forma, para a realização desta dissertação e para minha formação acadêmica.

À Profa. Dra. Denise Maria Trombert de Oliveira, assim como às secretárias Terezinha, Sônia e Sara, pelo auxílio nos processos burocráticos.

À UFMG pela infraestrutura fornecida, à CAPES, pela bolsa de mestrado a mim investida e PRPq/UFMG, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro concedido.

Ao povo brasileiro, por financiar minha formação acadêmica na UFMG. Pretendo retribuir o favor através da minha atuação como profissional de forma excelente em prol da formação de outros cidadãos.

## Sumário

|   | Pág. |
|---|------|
| Abreviaturas.....   | ix   |
| Lista de figuras e tabelas.....   | xi   |
| Resumo.....   | xiii |
| Abstract.....   | xiv  |
| 1. Introdução.....  | 1    |
| 1.1. Alumínio e estresse oxidativo.....   | 4    |
| 1.2. O óxido nítrico e o estresse por alumínio.....                                     | 8    |
| 1.3. As auxinas e o estresse por alumínio.....  | 10   |
| 1.4. O óxido nítrico e a via de sinalização por auxinas na resposta ao<br>alumínio..... | 11   |
| 2. Justificativa e objetivos.....   | 12   |
| 3. Materiais e métodos.....   | 13   |
| 3.1. Material vegetal e tratamento das plantas.....                                     | 13   |
| 3.2. Localização de óxido nítrico (NO) e Al <sup>3+</sup> .....                         | 15   |
| 3.3. Detecção de ânion superóxido ( <sup>•</sup> O <sub>2</sub> ).....                  | 16   |
| 3.4. Localização de células mortas.....   | 17   |
| 3.5. Quantificação de lignina.....  | 17   |
| 3.6. Quantificação de hidroperóxidos de lipídios (LOOHs).....                           | 18   |
| 3.7. Quantificação de proteínas oxidadas.....   | 19   |
| 3.8. Determinação da atividade de enzimas do sistema antioxidante.....                  | 20   |
| 3.9. Determinação de proteínas totais.....  | 21   |
| 3.10. Localização imunohistoquímica de ácido indol-3-acético (AIA).....                 | 21   |
| 3.11. Análises estatísticas.....  | 23   |

|   |    |
|---|----|
| 4. Resultados.....  | 24 |
| 4.1. Localização de óxido nítrico (NO) e Al <sup>3+</sup> .....                       | 24 |
| 4.2. Detecção de ânion superóxido ( <sup>•</sup> O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ).....   | 27 |
| 4.3. Localização de células mortas.....   | 29 |
| 4.4. Quantificação de lignina.....  | 31 |
| 4.5. Quantificação de hidroperóxidos de lipídios (LOOHs) e proteínas<br>oxidadas..... | 32 |
| 4.6. Determinação da atividade de enzimas do sistema antioxidante.....                | 33 |
| 4.7. Localização imunohistoquímica de ácido indol-3-acético (AIA).....                | 36 |
| 5. Discussão.....   | 41 |
| 6. Conclusão.....   | 47 |
| 7. Referências bibliográficas.....  | 48 |

## Abreviaturas

|                        |   |
|------------------------|---|
| $\cdot\text{H}$        | Radical hidrogênio                      |
| $\cdot\text{O}_2^-$    | Ânion superóxido                        |
| $^1\text{O}_2^*$       | Oxigênio singleto                       |
| 2,4-DNPH               | 2,4-dinitrofenilhidrazina               |
| AIA                    | Ácido indol-3-acético                   |
| Al                     | Alumínio                                |
| $\text{Al}^{3+}$       | Cátion alumínio                         |
| APX                    | Ascorbato peroxidase                    |
| ATP                    | Adenosina trifosfato                    |
| BCIP                   | 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato       |
| BHT                    | Hidroxitolueno butilado                 |
| BSA                    | Albumina de soro bovino                 |
| $\text{CaCl}_2$        | Cloreto de cálcio                       |
| CAT                    | Catalase                                |
| DAF-2                  | 4,5-Diaminofluoresceína                 |
| DAF-2 DA               | Diaminofluoresceína diacetato           |
| DAF-2T                 | Triazolofluoresceína                    |
| DHAR                   | Dehidroascorbato redutase               |
| DNA                    | Ácido desoxirribonucleico               |
| EDTA                   | Ácido etilenodiaminotetracético         |
| FOX                    | <i>Ferrous Oxidation-Xylenol Orange</i> |
| GR                     | Glutationa redutase                     |
| GSH-PX                 | Glutationa peroxidase                   |
| GST                    | Glutationa S-transferase                |
| GSNO                   | S-nitrosoglutationa                     |
| $\text{H}_2\text{O}_2$ | Peróxido de hidrogênio                  |
| HCl                    | Ácido clorídrico                        |

|                   |   |
|-------------------|---|
| HEPES             | Ácido <i>N</i> -2-hidroxietyl piperazina- <i>N</i> -2-etanossulfônico |
| $\cdot\text{OH}$  | Radical hidroxil  |
| $\text{KNO}_3$    | Nitrato de potássio   |
| KPSC              | Solução contendo sacarose, cloranfenicol e fosfato de potássio        |
| L-arg             | L-arginina  |
| $\text{LO}\cdot$  | Radical alcóxil   |
| $\text{LOO}\cdot$ | Radical peróxil   |
| LOOH              | Hidroperóxido de lipídios   |
| MDHAR             | Monodehidroascorbato redutase   |
| $\text{N}_2$      | Nitrogênio molecular  |
| $\text{NaClO}$    | Hipoclorito de sódio  |
| $\text{NaOH}$     | Hidróxido de sódio  |
| NBT               | <i>Nitroblue tetrazolium</i>  |
| $\text{NO}$       | Óxido nítrico   |
| $\text{NO}_3^-$   | Ânion nitrato   |
| $\text{O}_2$      | Oxigênio molecular  |
| $\text{ONOO}^-$   | Ânion peroxinitrito   |
| PVPP              | Polivinilpolipirrolidona  |
| RNA               | Ácido ribonucleico  |
| RNS               | Espécies reativas de nitrogênio                                       |
| ROS               | Espécies reativas de oxigênio   |
| SNP               | Nitroprussiato de sódio   |
| SOD               | Superóxido dismutase  |
| TBARS             | Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico                          |
| TFF               | Trifenilfosfina   |
| TIBA              | Ácido 2,3,5-triiodobenzóico   |

## Lista de Figuras

|                  |  |    |
|------------------|--|----|
| <b>Figura 1</b>  | Modelo de formação de hidroperóxidos de lipídios (LOOH) em células vegetais.....   | 6  |
| <b>Figura 2</b>  | Preparo dos rolos de germinação de sementes de <i>Triticum aestivum</i> (A). Plântulas, cujas raízes foram submetidas aos tratamentos (B)..... | 15 |
| <b>Figura 3</b>  | Representação esquemática da reação de detecção de óxido nítrico (NO) envolvendo o marcador DAF-2DA por microscopia de fluorescência.....      | 16 |
| <b>Figura 4</b>  | Representação esquemática da reação do ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) com o <i>nitroblue tetrazolium</i> (NBT).....                       | 17 |
| <b>Figura 5</b>  | Representação esquemática da reação utilizada para a detecção de proteínas oxidadas.....   | 19 |
| <b>Figura 6</b>  | Representação esquemática da reação de revelação anticorpos anti-AIA na presença de fosfatase alcalina.....                                    | 23 |
| <b>Figura 7</b>  | Localização de NO em cortes transversais de raízes de <i>Triticum aestivum</i> cv. Anahuac (sensível ao Al).....                               | 25 |
| <b>Figura 8</b>  | Localização de NO em cortes transversais de raízes de <i>Triticum aestivum</i> cv. BH1146 (tolerante ao Al).....                               | 25 |
| <b>Figura 9</b>  | Localização de $\text{Al}^{3+}$ em cortes transversais de raízes de <i>Triticum aestivum</i> cv. Anahuac (sensível ao Al).....                 | 26 |
| <b>Figura10</b>  | Localização de $\text{Al}^{3+}$ em cortes transversais de raízes de <i>Triticum aestivum</i> cv. BH1146 (tolerante ao Al).....                 | 27 |
| <b>Figura11</b>  | Localização de $\text{O}_2^-$ em cortes transversais de raízes de <i>Triticum aestivum</i> cv. Anahuac (sensível ao Al).....                   | 28 |
| <b>Figura12</b>  | Localização de $\text{O}_2^-$ em cortes transversais de raízes de <i>Triticum aestivum</i> cv. Anahuac (sensível ao Al).....                   | 28 |
| <b>Figura 13</b> | Localização de células mortas em cortes transversais de raízes de <i>Triticum aestivum</i> cv. Anahuac (sensível ao Al).....                   | 30 |

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>Figura14</b>  | Localização de células mortas em cortes transversais de raízes de <i>Triticum aestivum</i> cv. BH1146 (tolerante ao Al).....  | 30 |
| <b>Figura15</b>  | Efeito do NO sobre o acúmulo de lignina em raízes de <i>Triticum aestivum</i> .   | 31 |
| <b>Figura16</b>  | Efeito do NO nos níveis de hidroperóxidos de lipídios ( <b>A</b> ) e proteínas oxidadas ( <b>B</b> ) em raízes de <i>Triticum aestivum</i> .....                        | 33 |
| <b>Figura17</b>  | Efeito do NO na atividade superóxido dismutase (SOD) em raízes de <i>Triticum aestivum</i> .....  | 34 |
| <b>Figura18</b>  | Efeito do NO na atividade catalase (CAT) em raízes de <i>Triticum aestivum</i> .....  | 35 |
| <b>Figura19</b>  | Efeito do NO na atividade ascorbato peroxidase (APX) em raízes de <i>Triticum aestivum</i> .....  | 36 |
| <b>Figura 20</b> | Tratamentos-controle para validação dos testes de imunolocalização de ácido indol-3-acético (AIA) em raízes e folhas de <i>Triticum aestivum</i> .....                  | 37 |
| <b>Figura 21</b> | Efeito do NO na distribuição de ácido indol-3-acético (AIA) em cortes longitudinais de ápices radiculares de <i>Triticum aestivum</i> cv. Anahuac (sensível ao Al)..... | 38 |
| <b>Figura 22</b> | Efeito do NO na distribuição de ácido indol-3-acético (AIA) em cortes longitudinais de ápices radiculares de <i>Triticum aestivum</i> cv. BH1146 (tolerante ao Al)..... | 39 |
| <b>Figura 23</b> | Efeito do pré-tratamento de <i>Triticum aestivum</i> com GSNO e TIBA na distribuição de ácido indol-3-acético (AIA) em raízes.....                                      | 40 |

## Resumo

O alumínio é um elemento amplamente encontrado em solos, sendo a espécie  $\text{Al}^{3+}$  uma das mais prejudiciais ao crescimento e desenvolvimento vegetal. O efeito do  $\text{Al}^{3+}$  no fluxo de ácido indol-3-acético (AIA) e o papel do óxido nítrico (NO) como sinalizador de respostas a estresses abióticos em plantas são documentados. O objetivo deste estudo foi investigar uma possível relação entre a produção de NO, o fluxo de AIA e a eficiência do sistema antioxidante enzimático na resposta de raízes de *Triticum aestivum* cvs. BH1146 e Anahuac, tolerantes e sensíveis ao  $\text{Al}^{3+}$ , respectivamente. Os níveis basais de NO em raízes do cultivar tolerante foram superiores aos de plântulas sensíveis ao  $\text{Al}^{3+}$ , com presença deste radical livre no cilindro vascular. O estresse com  $\text{Al}^{3+}$   $75 \mu\text{mol L}^{-1}$  por 48 h estimulou a produção de NO nos tecidos radiculares dos dois cultivares, sendo mais expressiva no tolerante. O acúmulo de NO em raízes sob estresse foi maior em células da epiderme e endoderme. O pré-tratamento por 24 h com S-nitrosoglutationa (GSNO; liberador de NO)  $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $\text{NO}_3^-$  ou L-arginina (L-arg)  $300 \mu\text{mol L}^{-1}$  (ambos substratos para síntese de NO) reduziu o acúmulo de  $\text{Al}^{3+}$  no citoplasma, núcleos e membranas celulares de ápices radiculares de ambos os cultivares. Independentemente do estresse, o cultivar tolerante não apresentou número significativo de células mortas. O estresse, contudo, intensificou a morte de células de raízes do cultivar sensível, enquanto que o tratamento com GSNO,  $\text{NO}_3^-$  ou L-arg atenuou este evento. Tais pré-tratamentos também proporcionaram uma redução dos níveis de ânion superóxido em células de raízes de ambos os cultivares sob estresse por  $\text{Al}^{3+}$ . Os níveis de lipídios peroxidados diminuíram em decorrência do estresse imposto, sendo ainda mais evidente quando as raízes de ambos os cultivares foram pré-tratadas com GSNO,  $\text{NO}_3^-$  ou L-arg. O estresse por  $\text{Al}^{3+}$  não afetou os níveis de proteínas oxidadas e lignina, independentemente do cultivar testado, mas provocou aumento da atividade superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) no cultivar tolerante. GSNO,  $\text{NO}_3^-$  ou L-arg afetou, em diferentes extensões, a atividade SOD, CAT e APX em ambos os cultivares expostos ao  $\text{Al}^{3+}$ . Em condições fisiológicas, raízes do tolerante apresentaram fluxo de AIA mais intenso que as do cultivar sensível. O tratamento com  $\text{Al}^{3+}$  reduziu o fluxo de AIA em raízes de ambos os cultivares, sendo este efeito abolido em plântulas sob estresse que foram pré-tratadas com GSNO,  $\text{NO}_3^-$  ou L-arg. O GSNO também suprimiu o efeito de um reconhecido inibidor de efluxo de AIA ao estimular a distribuição dessa auxina na protoderme, no promeristema, no procâmbio e no córtex de células das raízes de ambos os cultivares. Em geral, substratos de síntese de NO, bem como um liberador de NO, mostraram contribuir na resposta de raízes de *Triticum aestivum* ao  $\text{Al}^{3+}$ , auxiliando no reestabelecimento do fluxo de AIA e no controle do estresse oxidativo nestes órgãos.

**Palavras-chave:** *Triticum aestivum*, alumínio, auxina, óxido nítrico, estresse oxidativo.

## Abstract

Aluminum is an element widely distributed in soils, in which the species  $\text{Al}^{3+}$  is considered one of the most detrimental to plant growth and development. The effect of  $\text{Al}^{3+}$  on indole-3-acetic acid (IAA) flow and the role of nitric oxide (NO) as a signaling molecule in plant responses to abiotic stresses are documented. This study has focused on the investigation of a possible relationship among NO production, IAA flow and the efficiency of the enzymatic antioxidant system during the response of *Triticum aestivum* cvs. BH1146 ( $\text{Al}^{3+}$ -tolerant) and Anahuac ( $\text{Al}^{3+}$ -sensitive). The NO basal levels were higher in  $\text{Al}^{3+}$ -tolerant plants than those of  $\text{Al}^{3+}$ -sensitive ones, being found mainly in cells of vascular cylinder. The treatment with  $75 \mu\text{mol L}^{-1} \text{Al}^{3+}$  for 48 h stimulated NO production in root cells of both cultivars with  $\text{Al}^{3+}$ -tolerant plants accumulating much higher amounts of this free radical, detected mainly in epidermal and endodermal cells. Exposure of roots for 24 h to  $300 \mu\text{mol L}^{-1}$  S-nitrosoglutathione (GSNO; an NO donor),  $\text{NO}_3^-$  or L-arginine (L-arg) (both substrates for NO synthesis) decreased  $\text{Al}^{3+}$  accumulation particularly in the cytosol, nuclei and cell membranes in both cultivars. Regardless of the stress,  $\text{Al}^{3+}$ -tolerant plants did not exhibit a significant number of dead cells. The stress, however, intensified cell death in roots of  $\text{Al}^{3+}$ -tolerant plantlets, while the pre-treatments with GSNO,  $\text{NO}_3^-$  or L-arg attenuated this event in such cultivar. These same pre-treatments decreased superoxide anion levels in roots of both cultivars in response to  $\text{Al}^{3+}$ . The  $\text{Al}^{3+}$  stress diminished lipid peroxide levels more intensively in roots of  $\text{Al}^{3+}$ -tolerant plantlets. Such levels further decreased in roots of GSNO-,  $\text{NO}_3^-$ - or L-arg-treated plantlets upon  $\text{Al}^{3+}$  stress. The superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) activities, but not the levels of lignin or oxidized protein, were stimulated in roots of  $\text{Al}^{3+}$ -tolerant plantlets upon stress. Additionally, GSNO,  $\text{NO}_3^-$  or L-arg affected SOD, CAT and APX activities in both cultivars upon  $\text{Al}^{3+}$  stress, at different extents. Under physiological conditions, IAA flow in roots was more intense in  $\text{Al}^{3+}$ -tolerant plantlets. The  $\text{Al}^{3+}$  stress reduced IAA flow in roots of both cultivars while the pre-treatment with GSNO,  $\text{NO}_3^-$  or L-arg restored IAA flow to the normal levels, regardless the cultivar. In addition, GSNO was found to suppress the effect of a known inhibitor of IAA efflux by stimulating the distribution of such auxin on cells of protoderm, promeristem, procambium and cortex in roots of both cultivars. Overall, substrates for NO synthesis and an NO donor were shown to contribute for the response of *Triticum aestivum* roots to  $\text{Al}^{3+}$  by reestablishing the IAA flow and controlling the oxidative burst in such organs.

**Keywords:** *Triticum aestivum*, aluminum, auxin, nitric oxide, oxidative stress.

## 1. Introdução

O alumínio (Al) é o elemento metálico mais abundante na crosta terrestre. Ele é normalmente encontrado na forma de minerais primários e secundários como silicatos ( $\text{Al}_2\text{SiO}_5$ ), óxidos ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), hidróxidos [ $\text{Al}(\text{OH})_3$ ], sulfatos [ $(\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ] e fosfatos ( $\text{AlPO}_4$ ). O aluminossilicato, o fosfato de alumínio e complexos orgânicos de alumínio são substâncias estáveis e não tóxicas. No entanto, em condições de acidez do solo ( $\text{pH} \leq 5$ ), o Al se torna disponível como cátion  $\text{Al}^{3+}$ , podendo este ser absorvido pelo sistema radicular das plantas (Fernandes, 2006).

Os solos ácidos ocupam cerca de 30% de toda a superfície terrestre, dos quais 50% constituem solos potencialmente aráveis. Assim, a toxicidade do Al configura-se como uma das limitações à produção agrícola (Piñeros *et al.*, 2005). Muitos desses solos ácidos estão localizados em países em desenvolvimento, onde a população crescente causa uma alta pressão para o aumento da produção agrícola, levando à insegurança alimentar nestas regiões (Ligaba *et al.*, 2009). Além disso, a ação antrópica contribui para o aumento da acidez dos solos devido ao uso de fertilizantes amoniacais e da poluição atmosférica ocasionada pelas indústrias, aumentando a incidência de chuvas ácidas (Rengel e Zhang, 2003).

A acidez do solo pode ser corrigida por calagem, que consiste na aplicação de calcário na superfície do solo. Porém, esse tratamento é feito apenas na superfície do solo, pois a realização do procedimento a grandes profundidades geralmente apresenta problemas técnicos e econômicos (Echart e Cavalli-Molina, 2001).

Vários estudos demonstraram que o  $\text{Al}^{3+}$  apresenta efeitos citotóxicos em plantas. O órgão mais sensível ao  $\text{Al}^{3+}$  é a raiz, cujo crescimento e desenvolvimento são comprometidos na presença desse cátion (Kochian *et al.*, 2005). Estudos espaciais indicaram que a porção distal da zona de transição no ápice radicular, onde as células passam por uma fase de preparação para o rápido alongamento, é o alvo primário do Al (Sivaguru e Horst, 1998). A rapidez na inibição do crescimento radicular provocada pelo Al está associada a interrupção no processo de expansão das células das raízes, seguida de inibição da síntese de DNA e divisão celular (Wallace e Anderson, 1984; Frantzios *et al.*, 2001). O tratamento com Al também estimula o acúmulo de polissacarídeos, especialmente hemicelulose, na parede celular da região de crescimento (Tabuchi e Matsumoto, 2001). De fato, alterações

na viscosidade e elasticidade da parede celular vegetal também são sintomas de toxidez do Al, confirmados em estudos com *Triticum aestivum* L. cv. Scout 66 (sensível ao Al) na presença de Al<sup>3+</sup> por 6 a 9 h (Tabuchi e Matsumoto, 2001; Ma *et al.*, 2004). Essa diminuição da elasticidade está provavelmente relacionada ao aumento da deposição de lignina nas paredes celulares (Ezaki *et al.*, 2005; Hossain *et al.*, 2005; Sasaki *et al.*, 2006; Matsumoto e Motoda, 2012). Uma evidência disso é que a atividade de peroxidases de *Cassia tora* L., relacionadas à produção de lignina, aumentou em resposta à exposição de raízes ao Al (Xue *et al.*, 2008). Deposição de lignina nas células da zona de alongamento em *T. aestivum* mostrou afetar o processo de divisão celular (Sasaki *et al.*, 2006). Assim, a lignificação precoce das células responsáveis pelo alongamento pode compreender um dos mecanismos de inibição do crescimento radicular desencadeado por Al. A redução no crescimento da raiz afeta negativamente a absorção de nutrientes e de água do solo, o que prejudica o desenvolvimento das plantas. Além disso, esse cátion interfere na absorção e movimentação de fósforo, cálcio e magnésio, elementos importantes para a nutrição mineral de plantas (Echart e Cavalli-Molina, 2001).

Plantas expostas ao Al apresentam uma série de alterações na arquitetura e morfologia de suas raízes como, formação de raízes espessas, atrofiadas, curvas, com alteração na coloração e com redução na formação de raízes laterais e de pelos radiculares (Čiamporová, 2002). A superfície da raiz também pode apresentar rupturas transversais quando a planta é exposta a níveis tóxicos de Al. A deposição de lignina causa distorções na parede celular que podem induzir a ruptura das células e, conseqüentemente, da rizoderme e de camadas externas do córtex (Matsumoto e Motoda, 2012). As rupturas podem levar à morte das células da epiderme, hipoderme e até mesmo as do córtex (Delhaize e Ryan, 1995; Yamamoto *et al.*, 2001; Čiamporová, 2002; Jones *et al.*, 2006).

O Al<sup>3+</sup> sofre atração eletrostática na presença de doadores de oxigênio. Portanto, liga-se fortemente às pectinas das paredes celulares, bem como carboxilatos e fosfatos (Yamamoto *et al.*, 2001). Com isso, a integridade e fluidez da membrana plasmática são afetadas, além do sistema transmembrana de transporte de íons (Echart e Cavalli-Molina, 2001). Despolarização da membrana plasmática em decorrência da inibição de H<sup>+</sup>-ATPases, com conseqüente formação e manutenção do gradiente de prótons transmembrana, foi observada em sistemas vegetais tratados com Al (Kochian *et al.*, 2005). Ahn *et al.* (2004) demonstraram que

4 h de tratamento com Al foram suficientes para diminuir, *in vivo*, o transporte de H<sup>+</sup> pela H<sup>+</sup>-ATPase em vesículas do ápice radicular de *T. aestivum* cv. ES8 (sensível ao Al).

A formação de calose é rapidamente induzida por Al, sendo sua detecção comumente utilizada para classificar plantas quanto ao grau de sensibilidade ao Al (Horst *et al.*, 1997). A síntese de calose depende da presença de Ca<sup>2+</sup> e pode causar danos celulares pela inibição do transporte via conexões plasmodésmicas. O Al causa a mobilização do Ca<sup>2+</sup> a partir da superfície da membrana plasmática para o apoplasto, ocasionando, assim, a formação de calose (Sivaguru *et al.*, 1999). A formação de calose também pode ocorrer a partir da abertura de canais de Ca<sup>2+</sup>, estimulada pelo Al<sup>3+</sup>, levando ao aumento da concentração de Ca<sup>2+</sup> no citoplasma (Echart e Cavalli-Molina, 2001).

O Al<sup>3+</sup> pode interagir com macromoléculas, desencadeando distúrbios nas organelas celulares. Alterações estruturais foram observadas em células de tabaco tratadas com Al, a citar: dilatação das mitocôndrias, aumento do número de vacúolos e ocorrência de distúrbios estruturais na membrana plasmática e no núcleo, típicos de células que estão em fase inicial de morte celular (Panda *et al.*, 2008).

Apesar de todos os efeitos tóxicos proporcionados pelo Al, muitas espécies nativas são capazes de prosperar em ambientes de solos ácidos por desenvolverem mecanismos de ajustes metabólicos que melhoram suas chances de sobrevivência nesse ambiente. Exemplos desses mecanismos incluem: **i)** exclusão de Al<sup>3+</sup> pelas raízes, por meio da liberação de ácidos orgânicos, como o malato e o citrato, capazes de complexar o Al de maneira estável (mecanismo de resistência); **ii)** compartimentalização de Al<sup>3+</sup>, acumulando-o em vacúolos (mecanismo de tolerância) (Ryan *et al.*, 2011). A inibição de H<sup>+</sup>-ATPases de raízes de *T. aestivum* sensíveis ao Al foi revertida por malato em sistemas sob estresse por Al<sup>3+</sup> (Ahn *et al.*, 2004).

Algumas plantas cultivadas, como o trigo, foram submetidas a melhoramentos genéticos com o intuito de incorporar, em tais plantas, mecanismos de tolerância e resistência à toxicidade do Al. Já foi identificado em alguns cultivares de *T. aestivum* a presença de um gene transportador de malato ativado por Al (*ALMT1*) (Sasaki *et al.*, 2004). Também foram encontradas evidências de que o efluxo de citrato via proteínas da família *MATE*, é um mecanismo secundário de resistência ao Al em trigo (Ryan *et al.*, 2009). Kidd *et al.* (2001) relataram que o estresse por Al estimulou

a exsudação de oxalacetato em três cultivares de *Zea mays* L. e desencadeou a liberação de compostos fenólicos, como quercetina e catequina, que parecem funcionar como substâncias que atuam na tolerância da planta ao Al. A maioria das tentativas para melhorar a resistência de plantas ao Al<sup>3+</sup>, utilizando engenharia genética, tem como alvo os genes induzidos por Al ou os que poderiam aumentar o efluxo de ácidos orgânicos. Atualmente, o melhoramento vegetal é considerado uma ótima ferramenta para aumentar o crescimento e a produtividade em solos ácidos ricos em Al<sup>3+</sup> (Ryan *et al.*, 2011).

### 1.1. Alumínio e estresse oxidativo

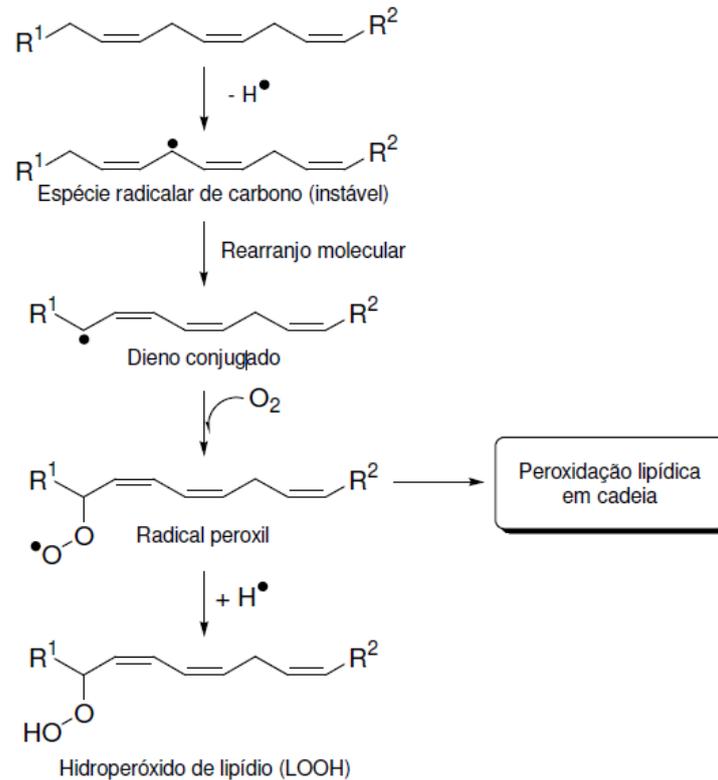
O aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) é uma das respostas celulares primárias a diferentes tipos de estresses, como aqueles desencadeados por alumínio, cádmio ou cromo (Panda e Choudhury, 2005; Semane *et al.*, 2007; Panda *et al.*, 2009; Marques e Soares, 2011). A superprodução de ROS é, principalmente, desencadeada pela intensificação do vazamento de elétrons na cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria e do cloroplasto. Exemplos de ROS incluem o ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), o radical hidroxil ( $\text{OH}^\bullet$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), o oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2^*$ ) etc (Richards *et al.*, 1998; Yamamoto *et al.*, 2002; Panda *et al.*, 2009). Yamamoto *et al.* (2003) detectaram níveis aumentados de ROS em ápices de plântulas de *Pisum sativum* L. após 2 h de exposição ao Al<sup>3+</sup>. Os níveis de ROS aumentaram ainda mais com o aumento do tempo de exposição das plântulas a este cátion. O tratamento por 10 min com Al<sup>3+</sup> aumentou da produção de ROS em células da epiderme de raízes de milho (Jones *et al.*, 2006). Depleção da síntese de ATP, inibição da respiração e perda da capacidade de crescimento foram eventos observados simultaneamente ao acúmulo de ROS em cultura de células de *Nicotiana tabacum* L. e raízes de *P. sativum* tratadas com Al (Yamamoto *et al.*, 2002). O Al também induziu, em *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., a expressão de genes que codificam enzimas do sistema antioxidante tais como glutathione S-transferase, peroxidase e proteínas que ligam cobre (Richards *et al.*, 1998).

A deposição de lignina em plântulas de *Triticum aestivum* estressadas com Al<sup>3+</sup> está associada com o aumento da concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nas células (Hossain *et al.*, 2005). O  $\text{H}_2\text{O}_2$  contribui para a polimerização de compostos fenólicos

formando lignina, que causa aumento na rigidez da parede celular (Matsumoto e Motoda, 2012).

O aumento de ROS desencadeado por Al foi correlacionado aos elevados níveis de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos oxidados (Hamel *et al.*, 1998; Yamamoto *et al.*, 2001). A peroxidação de lipídios causada pelo estresse por Al foi documentada em várias espécies, como cevada (Guo *et al.*, 2004), arroz (Meriga *et al.*, 2004), sorgo (Peixoto *et al.*, 1999) e trigo (Hossain *et al.*, 2005). Yamamoto *et al.* (2001) observaram que o acúmulo de lipídios peroxidados na superfície do ápice radicular de plântulas de *P. sativum* tratadas com Al<sup>3+</sup> ocorreu nos mesmos sítios em que foi observada a formação de calose. A integridade da membrana, contudo, só foi afetada na extremidade das rupturas da epiderme radicular. Posteriormente, Yamamoto *et al.* (2003) concluíram que o aumento da peroxidação de lipídios é um sintoma do acúmulo de Al, ocasionado logo após a imposição do estresse, e parece causar aumento da produção de calose, mas não a inibição do alongamento radicular. Resultados contrastantes foram obtidos por Boscolo *et al.* (2003), que observaram que os níveis de hidroperóxidos de lipídios em milho não foram afetados pelo tratamento das plantas com Al.

A Figura 1 mostra uma representação esquemática do processo de formação de hidroperóxidos de lipídios em células vegetais. As membranas biológicas são constituídas de lipídios insaturados que são os primeiros alvos de ROS. A peroxidação lipídica se inicia pelo ataque à bicamada lipídica por qualquer espécie suficientemente reativa para abstrair um átomo de hidrogênio *bis*-alílico de um ácido graxo poliinsaturado (Loureiro *et al.*, 2002). Foi verificado que espécies tais como  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{HO}_2\cdot$  e  $\cdot\text{NO}_2$  podem promover essa oxidação. Assim, ocorre a formação de uma espécie radicalar de carbono a partir do esqueleto lipídico. A instabilidade desse radical lipídico leva a um rearranjo molecular e à formação de um dieno conjugado. A reação com o oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ) presente no meio leva à formação do radical peroxil ( $\text{LOO}\cdot$ ). O radical  $\text{LOO}\cdot$  pode combinar com o hidrogênio radicalar ( $\cdot\text{H}$ ) abstraído para formar um hidroperóxido de lipídio ( $\text{LOOH}$ ) ou entrar em fase de propagação, reagindo com outro ácido graxo poliinsaturado, iniciando uma nova cadeia de oxidação a partir da formação de outro radical lipídico. Radicais alcóxilas podem abstrair átomos de hidrogênio de lipídios poliinsaturados, auxiliando na formação de outros radicais lipídicos, que podem contribuir para a propagação da peroxidação lipídica (Loureiro *et al.*, 2002).



**Figura 1.** Representação esquemática da reação de formação de hidroperóxidos de lipídios (LOOH) em células vegetais. Espécies radicalares, tais como o radical hidroxil ( $\cdot OH$ ), promovem a quebra homolítica da ligação C-H, liberando o radical  $\cdot H$  (oriundo do hidrogênio alílico). A espécie radicalar de carbono recém formada é muito instável, levando ao rearranjo molecular para a formação de um dieno conjugado, que é mais estável. O  $O_2$  reage com o dieno conjugado radicalar formando o radical peróxil ( $LOO^\bullet$ ), que pode proporcionar a peroxidação em cadeia de outros lipídios ou então abstrair um  $H^\bullet$  do meio para formar o hidroperóxido de lipídio correspondente (LOOH). Os grupos  $R^1$  e  $R^2$  foram utilizados para indicar que a cadeia carbônica dos ácidos graxos que constituem os lipídios apresenta tamanho variável. LOOH, hidroperóxido de lipídio. Reproduzido de Faria (2010).

A oxidação de proteína é definida como a modificação covalente de uma proteína, induzida por ROS, espécies reativas de nitrogênio (RNS) ou por produtos do estresse oxidativo. A maioria dos processos de oxidação proteica é essencialmente irreversível, exceto aquelas que envolvem resíduos de L-cisteína cuja oxidação de seu grupo  $-SH$  compreende um mecanismo importante de regulação da função de certas enzimas. Assim, a detecção de proteínas oxidadas é uma modificação amplamente utilizada como marcador diagnóstico de estresse oxidativo (Møller *et al.*, 2007). A oxidação de proteínas causada pelo estresse por Al foi documentada em várias espécies, como *Zea mays* L. (Boscolo *et al.*, 2003), *Hordeum vulgare* L. (Achary *et al.*, 2012), *Allium cepa* L. (Achary *et al.*, 2008) e *Cucumis sativus* L. (Pereira *et al.*, 2010). A oxidação de cadeias laterais de resíduos de aminoácidos, como Arg, His, Lys, Pro, Thr e Trp gera grupos carbonila livres.

Este é o tipo de oxidação de proteínas irreversível mais comum (Møller *et al.*, 2007). Proteínas carboniladas podem ser encontradas normalmente nos tecidos, mas em condições de estresse, o aumento de carbonilação pode comprometer o metabolismo normal do organismo e até levar à morte celular (Møller e Kristensen, 2004).

As células vegetais possuem um sistema de defesa antioxidante composto por enzimas, como catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), superóxido dismutase (SOD), monodehidroascorbato redutase (MDHAR), dehidroascorbato redutase (DHAR), glutathione S-transferase (GST), glutathione redutase (GR) e glutathione peroxidases (GSH-PX), além de metabólitos antioxidantes, como ascorbato, glutathione,  $\alpha$ -tocoferol, carotenoides e flavonoides. As substâncias supracitadas são responsáveis pela manutenção de ROS em níveis que não prejudiquem o funcionamento normal das células (Hossain *et al.*, 2005).

As peroxidases totais (PXs) e CATs são os sistemas que atuam na remoção enzimática do  $H_2O_2$  em plantas, decompondo-o a  $H_2O$  e  $O_2$  (Willekens *et al.*, 1995). A decomposição mediada por PXs é assistida por um agente redutor (doador de elétrons) que pode ser um metal ou um composto orgânico. Assim, as PXs são classificadas de acordo com o doador de elétrons. O mecanismo de decomposição de  $H_2O_2$  por CATs não demanda a presença de agente redutor, sendo tais enzimas amplamente encontradas nos peroxissomos (Willekens *et al.*, 1995). Em condições fisiológicas, as APXs são responsáveis pela rápida redução do  $H_2O_2$ , em um processo mediado pelo ácido ascórbico. As enzimas dessa família são encontradas em vários compartimentos celulares, como cloroplastos, mitocôndrias, citosol e peroxissomos (Pereira *et al.*, 2005). As CATs possuem uma taxa de *turnover* muito rápida, mas sua afinidade pelo  $H_2O_2$  é inferior àquela da APX, uma vez que o  $K_m$  do  $H_2O_2$  para esta última é muito menor (na ordem de  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Assim, a atividade das APXs é mais expressiva em condições de baixa produção de  $H_2O_2$ . Contudo, em situações de estresse, quando a produção de ROS está aumentada, a atividade das CATs torna-se muito relevante (Mhamdi *et al.*, 2010). O sistema antioxidante baseado na atividade das GSH-PXs envolve a redução de hidroperóxidos de lipídios (LOOH) aos correspondentes alcoóis (Huber *et al.*, 2008).

As SODs são metaloenzimas responsáveis pela dismutação do  $\bullet O_2^-$  em  $H_2O_2$ , que então pode ser decomposto pelas CATs, APXs e/ou GSH-PXs. O  $\bullet O_2^-$  é produzido em vários compartimentos celulares, como mitocôndrias, cloroplastos,

peroxissomos, apoplasto e citosol. Como a membrana plasmática é impermeável a espécies carregadas, é crucial que as SODs estejam presentes em todos os compartimentos em que  $\bullet\text{O}_2^-$  é formado (Alscher *et al.*, 2002).

Alguns trabalhos já documentaram a produção de ROS e alteração no sistema antioxidante enzimático em decorrência da exposição do órgão vegetal ao  $\text{Al}^{3+}$ . Liu *et al.* (2008) relataram aumento das atividades APX e SOD em cultivares de triticale com tolerância diferencial ao Al, sendo que o cultivar sensível mostrou alteração a partir de 6 h de exposição ao Al e o resistente, apenas após 12 h. Boscolo *et al.* (2003) também relataram aumento das atividades da APX e SOD em cultivares de *Z. mays* após estresse por  $\text{Al}^{3+}$ . Ghanati *et al.* (2005) observaram aumento nas atividades SOD, CAT e APX após tratamento de *Camellia sinensis* L. com  $\text{Al}^{3+}$ . O aumento da atividade das enzimas do sistema antioxidante em plantas submetidas a algum tipo de estresse abiótico contribui para a manutenção da integridade da membrana plasmática e atraso da lignificação dos tecidos.

## 1.2. O óxido nítrico e o estresse por alumínio

O óxido nítrico (NO), uma RNS, é um sinalizador celular gasoso e de fácil permeabilidade em membrana (Corpas *et al.*, 2004). Ele influencia diversos processos fisiológicos, como a germinação de sementes (Sírová *et al.*, 2011), o crescimento e desenvolvimento de raízes adventícias (Correa-Aragunde *et al.*, 2004), a fotomorfogênese (Pagnussat *et al.*, 2002; 2003), a senescência (Magalhaes *et al.*, 2000), o movimento estomático (Sakihama *et al.*, 2003), a lignificação de parede celular (Ferrer e Ros Barceló, 1999), a atividade de enzimas do sistema antioxidante (Clark *et al.*, 2000), a indução da morte celular (Delledonne *et al.*, 1998; Saviani *et al.*, 2002), a sinalização por citocininas (Shen *et al.*, 2012) entre outros. Além disso, o NO está envolvido na resposta e aclimatação de plantas a diversos estresses abióticos, como seca (Mata e Lamattina, 2001; Shi *et al.*, 2012), alta salinidade (Zhang *et al.*, 2006) e exposição ao cádmio (Rodríguez-Serrano *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2008), além de estresses bióticos (Modolo *et al.*, 2002; 2005; 2006; Modolo, 2011).

A biossíntese do NO em células vegetais pode ocorrer a partir da atividade de uma série de enzimas, a citar: nitrato redutase, que utiliza  $\text{NO}_3^-$  como substrato (Magalhaes *et al.*, 2000; Rockel *et al.*, 2002); nitrito redutase (Kuznetsova *et al.*, 2004; Kolbert *et al.*, 2008); proteínas do tipo óxido nítrico sintase (NOS) de

mamíferos, que utilizam L-arginina como substrato (Modolo *et al.*, 2002; Corpas *et al.*, 2006), dentre outras. Mecanismos não enzimáticos também podem contribuir para a síntese de NO em células. Shi *et al.* (2012) relataram aumento no conteúdo de NO em plântulas de *A. thaliana* que superexpressavam o gene neuronal de ratos, que codifica uma NOS, contribuiu para a tolerância das plantas a estresses abióticos, como alta salinidade e déficit hídrico (Shi *et al.*, 2012).

Alguns pesquisadores investigaram a importância do NO na resposta de plantas ao estresse por  $Al^{3+}$  (Wang e Yang, 2005; Illéš *et al.*, 2006; Tian *et al.*, 2007; Xue *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010; Marciano *et al.*, 2010; He *et al.*, 2012; Alvim *et al.*, 2012). *Hibiscus moscheutos* L. apresentou inibição do crescimento radicular após 1 h de exposição a  $AlCl_3$  100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (pH 4,5). Esse efeito foi acompanhado da inibição da atividade de uma enzima do tipo NOS que resultou na diminuição da concentração de NO. Porém, o alongamento radicular foi recuperado quando as raízes foram incubadas com solução contendo  $Al^{3+}$  e nitroprussiato de sódio (SNP), um liberador de NO, sugerindo que esta RNS atenua os efeitos tóxicos do  $Al^{3+}$  (Tian *et al.*, 2007). Raízes de *C. tora* pré-tratadas por 12 h com SNP 0,4  $\text{mmol L}^{-1}$  e, em seguida, expostas a  $Al^{3+}$  10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  por 24 h apresentaram raízes maiores e com menor acúmulo de Al, quando comparadas às raízes sem tratamento com SNP (Wang e Yang, 2005). Illéš *et al.* (2006) observaram que células da parte distal da zona de transição da raiz de *A. thaliana* produziram grandes quantidades de NO, mas que a produção foi inibida pelo tratamento com  $Al^{3+}$  90  $\mu\text{mol L}^{-1}$  por 1 h. É sugerido que o NO desencadeia tolerância ao  $Al^{3+}$  em raízes de *Phaseolus vulgaris* L., pois o tratamento de plântulas com  $Al^{3+}$  por 24 h levou à inibição do crescimento radicular em decorrência do seu acúmulo no ápice. Os efeitos do Al foram minimizados pelo tratamento com SNP. O tratamento com um sequestrador de NO ou um inibidor da atividade nitrato redutase resgataram, no órgão, os efeitos tóxicos do Al. O tratamento com SNP também levou à diminuição da peroxidação lipídica e da produção de ROS (Wang *et al.*, 2010). A atividade de peroxidases associadas à síntese de lignina foi induzida por  $Al^{3+}$  em *C. tora*. Contudo, o tratamento das plantas com SNP promoveu a tolerância ao Al, diminuindo a atividade da PX apoplástica e, conseqüentemente, o acúmulo de lignina e  $H_2O_2$  (Xue *et al.*, 2008). O NO neutralizou os efeitos inibitórios do Al na germinação de sementes de *Oryza sativa* L. e estudos histoquímicos mostraram que o  $Al^{3+}$  é capaz de estimular a produção de NO em raízes desta espécie (Marciano *et al.*, 2010; Alvim *et al.*, 2012).

As evidências até então reportadas sugerem um efeito protetor do NO em plantas expostas a níveis tóxicos de  $Al^{3+}$ .

### 1.3. As auxinas e o estresse por alumínio

As auxinas compreendem a primeira classe de moléculas orgânicas reconhecida como hormônio em plantas, sendo o ácido indol-3-acético (AIA) a auxina mais abundante em vegetais. As auxinas influenciam vários processos relacionados ao crescimento e desenvolvimento das plantas tais como, alongamento e expansão celular, respostas à luz e à gravidade e desenvolvimento vascular e da arquitetura geral da raiz e ápice caulinar (Pagnussat *et al.*, 2003). O AIA é sintetizado, principalmente, nos meristemas apicais de caules e folhas jovens. Tais tecidos apresentam rápida divisão e expansão celular (Ljung *et al.*, 2001). O hormônio é então transportado destes tecidos até o ápice radicular por meio de um transporte polar unidirecional. Este transporte ocorre, principalmente, célula a célula no parênquima vascular, com gasto de energia (Zažímalová *et al.*, 2007). O fluxo de AIA também pode ocorrer via floema a partir dos locais de síntese para a raiz, porém em menor taxa (Zažímalová *et al.*, 2010). Na parte aérea, o fluxo de AIA segue o sentido do ápice para a base (transporte basípeto). Nas raízes, o fluxo pode ser da base para o ápice (transporte acrópeto, nas células do parênquima vascular), e do ápice para a base (transporte basípeto, nas células da epiderme e da coifa) (Swarup *et al.*, 2001). Em razão da existência de múltiplas vias de sinalização estimuladas por AIA, a inibição de seu fluxo na planta pode levar a prejuízos no crescimento e modificação da morfologia dos tecidos (Friml e Palme, 2002; Zažímalová *et al.*, 2007).

O influxo de AIA nas células pode ocorrer de duas maneiras. Uma delas seria por difusão passiva, da forma protonada, através da membrana. A outra seria por transporte secundário ativo do tipo simporte, na qual a espécie dissociada ( $AIA^-$ ), passa pela membrana por meio de um processo dependente da  $H^+$ -ATPase e do pH do apoplasto. Este transportador simporte cotransporta dois prótons junto com o  $AIA^-$  (Kerr e Bennett, 2007). Em decorrência do pH do citoplasma (7,0), as auxinas protonadas sofrem desprotonação, formando  $AIA^-$ . Transportadores AUX1 foram identificados como proteínas permeases capazes de promover o influxo de AIA nas células (Bennett *et al.*, 1996). Swarup *et al.* (2001) mostraram, por meio de técnica de imunolocalização, que AUX1 medeia um duplo transporte de AIA no ápice

radicular de *Arabidopsis*, facilitando o fluxo acrópeto no protofloema e o fluxo basípeto nas células laterais da coifa. Rubery e Sheldrake (1974) propuseram a hipótese quimiosmótica, segundo a qual o fluxo polar de auxina é consequência de uma localização assimétrica de transportadores de efluxo de auxina. Essa hipótese foi confirmada posteriormente, a partir da detecção de proteínas da família PIN, hoje reconhecidas como as responsáveis pelo efluxo de AIA, distribuídas assimetricamente nas membranas celulares e alinhadas com a direção do transporte de AIA (Gälweiler *et al.*, 1998).

Bennet e Breen (1991) descreveram várias alterações na ultraestrutura das células da coifa em raízes de milho, após 2 h de tratamento com  $Al^{3+}$ . Foi sugerido que a inibição do crescimento radicular por  $Al^{3+}$  está associada às alterações nos níveis de hormônios vegetais e segundo-mensageiros no ápice de raízes (Bennet e Breen, 1991). Interessantemente, Hasenstein e Evans (1988) observaram que o Al afeta a direção do transporte de auxina em ápices radiculares de milho. Kollmeier *et al.* (2000) relataram que o tratamento da zona de transição distal de *Z. mays* com  $Al^{3+}$   $90 \mu mol L^{-1}$  por 1 h inibiu a expansão celular na zona principal de alongamento, na mesma extensão que o tratamento do ápice radicular com este cátion. A aplicação de AIA apenas na zona de alongamento reverteu a inibição do alongamento radicular por Al aplicado à zona de transição distal.

Também foi sugerido que a inibição do crescimento de raízes de *A. thaliana* por Al esteja vinculada ao efeito negativo deste metal no transporte de vesículas de proteínas PIN2 (responsáveis pelo efluxo de auxina) entre a membrana plasmática e os endossomos (Shen *et al.*, 2008). O bloqueio do transporte de auxina nas células foi comprovado pela diminuição em 34% dos níveis deste hormônio na zona de transição de raízes tratadas com Al em comparação às raízes não tratadas (Shen *et al.*, 2008). Análises de qRT-PCR e *Western-blotting* mostraram que os níveis de transcritos de *PIN2* e a distribuição de proteínas PIN2 nos endossomos diminuíram após estresse por Al. Isso sugere que o Al inibe o transporte de vesículas de PIN2 entre membrana plasmática e endossomos (Shen *et al.*, 2008).

#### **1.4. O óxido nítrico e a via de sinalização por auxinas na resposta ao alumínio**

A ação do NO na regulação da sinalização por AIA já foi documentada. Estudos com milho realizados por Gouvêa *et al.* (1997) sugeriram que o NO induz o alongamento radicular. Estas evidências sugerem que o NO pode estimular vias de

transdução de sinal similares àquelas desencadeadas por AIA. Pagnussat *et al.* (2002; 2003) demonstraram que o NO e a guanosina monofosfato cíclica (cGMP) medeiam a resposta do AIA durante a formação de raízes adventícias em *C. sativus*. Yadav *et al.* (2010) demonstraram que a indução da formação de raízes adventícias em hipocótilos de *Helianthus annuus* L. cv. Morden pelo AIA é dependente de NO. Pii *et al.* (2007) observaram que a formação de nódulos de *Rhizobium* em leguminosas do gênero *Medicago* ocorreu em função de um aumento da síntese de AIA e NO e que, este último, aumenta a expressão de genes que codificam transportadores de efluxo de auxina. Kolbert *et al.* (2008) mostraram, a partir de evidências genéticas e farmacológicas, que a indução por auxina do desenvolvimento de raízes laterais em *A. thaliana* é acompanhada da produção de NO a partir da atividade nitrato redutase. Terrile *et al.* (2011) mostraram que o tratamento de raízes de *A. thaliana* com AIA  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$  por 90 min induziu a produção de NO. Ainda, a expressão gênica estimulada por AIA foi mediada por NO, que promoveu a degradação de repressores de auxina do tipo Aux/AIA.

Até o momento, há apenas dois relatos na literatura que abordam NO, auxina e resposta ao Al (Illéš *et al.*, 2006; He *et al.*, 2012). Porém, nenhum deles faz referência inequívoca a respeito do papel do NO sobre o fluxo de AIA em raízes sob estresse por Al. Os relatos de Illéš *et al.* (2006) mostram que o  $\text{Al}^{3+}$  inibe o fluxo de auxina na raiz e que a compartimentalização deste metal em endossomos reduz a síntese de NO nos ápices radiculares de *A. thaliana*. Ainda, estudo recente utilizando abordagem farmacológica sugere que o NO regula o equilíbrio hormonal em raízes de *Secale cereale* L. cv King e *T. aestivum* cv. Jinmai47 (He *et al.*, 2012). Foi proposto que o NO exógeno reduziu o efeito inibitório do Al sobre o alongamento radicular ao diminuir a razão AIA/giberelinas e AIA/citocininas. Contudo, este estudo apresenta várias conclusões controversas, todas fundamentadas em procedimentos experimentais de quantificação de hormônios um tanto quanto questionáveis.

Diante do cenário científico atual, este trabalho visou ao estudo da possível relação entre o NO, o fluxo de AIA e o sistema antioxidante enzimático de células de raízes de *T. aestivum* sob tratamento com  $\text{Al}^{3+}$ .

## 2. Justificativa e objetivos

Grande parte dos solos brasileiros é de natureza ácida, apresentando níveis consideráveis de  $\text{Al}^{3+}$ . Algumas espécies nativas, contudo, apresentam mecanismos

de tolerância ao  $\text{Al}^{3+}$  que garantem a sobrevivência da espécie sob tal condição desfavorável ao crescimento e desenvolvimento. O entendimento das alterações bioquímicas que levam a planta a minimizar os efeitos citotóxicos deste metal é imprescindível tanto para fins de conservação de espécies nativas quanto para o melhoramento de plantas cultivadas.

Sabe-se que o NO está envolvido na resposta de plantas a estresses bióticos e abióticos, como o imposto por  $\text{Al}^{3+}$  (Zhang *et al.*, 2011). Além disso, o  $\text{Al}^{3+}$  inibe o crescimento de raízes (Illés *et al.*, 2006), processo fisiológico estimulado pelo hormônio AIA. Este trabalho teve como objetivo geral investigar uma possível relação entre a produção de NO, o fluxo de AIA e a eficiência do sistema antioxidante enzimático na resposta de raízes de *T. aestivum* ao  $\text{Al}^{3+}$ . Para isso, foram utilizadas plântulas de *T. aestivum* cvs. BH1146 e Anahuac, tolerantes e sensíveis ao  $\text{Al}^{3+}$ , respectivamente, em experimentos de estresse abiótico que visaram determinar:

- o efeito de um liberador de NO e de substratos de síntese de NO na resposta de raízes ao estresse por  $\text{Al}^{3+}$ ;
- a localização de  $\text{Al}^{3+}$  e NO em cortes de ápices radiculares;
- a localização de ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) e células mortas em cortes de ápices radiculares;
- a quantidade de hidroperóxidos de lipídios, proteínas oxidadas e lignina em raízes;
- a atividade de enzimas do sistema antioxidante em raízes;
- a distribuição de AIA em cortes de ápices radiculares.

### **Hipótese**

O tratamento com precursores de síntese de NO ( $\text{NO}_3^-$  ou L-arginina) ou liberador de NO (GSNO) contribuem para a redução do estresse oxidativo e o restabelecimento do fluxo de AIA em raízes de *T. aestivum* tratadas com  $\text{Al}^{3+}$ .

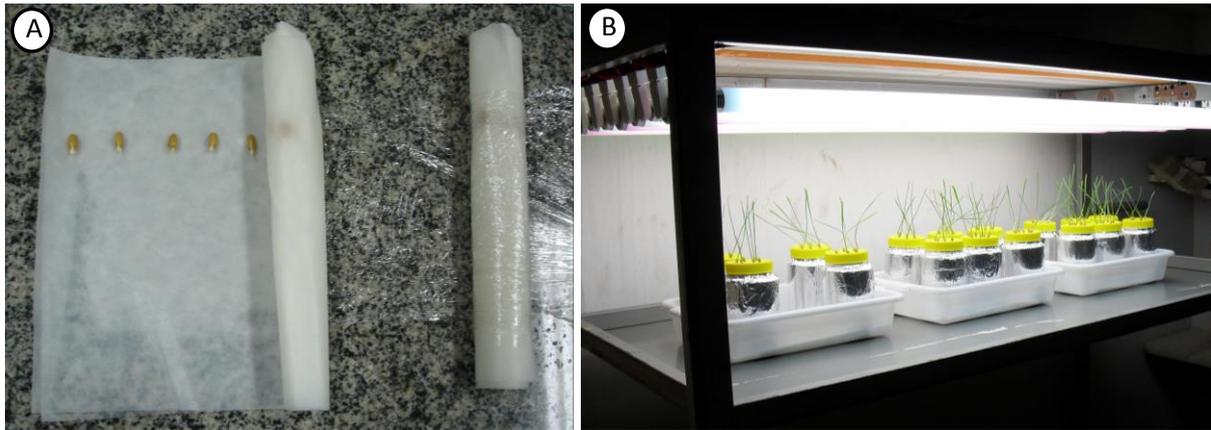
## **3. Materiais e métodos**

### **3.1. Material vegetal e tratamento das plantas**

Os experimentos foram conduzidos com plântulas de *T. aestivum* cvs. BH1146 (tolerante ao Al) e Anahuac (sensível ao Al), cujas sementes foram

gentilmente cedidas pelo Dr. Antônio Wilson Penteado Ferreira Filho, do Instituto Agronômico de Campinas (SP). A classificação do cultivar Anahuac como sensível ao Al foi baseada na observação de que raízes primárias de tal cultivar apresentaram inibição de crescimento quando expostas a  $\text{Al}^{3+}$   $2 \text{ mg L}^{-1}$  a pH 4,0, que equivale a  $75 \text{ } \mu\text{mol Al}^{3+} \text{ L}^{-1}$  (Camargo *et al.*, 1987; 1992). Em contraste, o cultivar BH1146 apresentou crescimento radicular considerável mesmo quando exposto a uma solução de  $\text{Al}^{3+}$   $10 \text{ mg L}^{-1}$  a pH 4,0 (equivalente a  $375 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ), sendo, portanto, considerado tolerante a este cátion (Camargo *et al.*, 1987; 1992).

Todas as vidrarias e materiais descartáveis utilizados na execução dos experimentos foram previamente descontaminados por 24 h em solução de ácido clorídrico (HCl) 3,7%. Para a germinação, as sementes foram desinfestadas com hipoclorito de sódio (NaClO) 1% (v/v) durante 5 min e posteriormente lavadas com água desionizada. Em seguida, as sementes foram enfileiradas sobre folhas de papel de filtro embebidas com solução aquosa de Nistatina<sup>®</sup> 0,2% (v/v), que foram enroladas (Figura 2A) e mantidas em câmara de germinação com fotoperíodo de 12 h e temperatura de 25 °C, por 4 dias. As plântulas foram então transferidas para potes plásticos de 500 mL cobertos por folhas de alumínio. Os sistemas radiculares de plântulas foram submetidos aos seguintes tratamentos hidropônicos a concentração de  $300 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ , pH 7,0: **a)** Controle com água desionizada; **b)**  $\text{KNO}_3$ ; **c)** L-arginina (L-arg); **d)** S-nitrosoglutathione (GSNO).  $\text{NO}_3^-$  e L-arg são precursores da síntese de NO e GSNO é um doador de NO (Wojtaszek, 2000; Modolo *et al.*, 2005). Após 24 h, as raízes foram lavadas e submetidas a um segundo tratamento ( $\text{Ca}^{2+}$   $200 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  [controle] ou  $\text{Al}^{3+}$   $75 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  em  $\text{Ca}^{2+}$   $200 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ) a pH 4,0. A concentração de  $\text{Al}^{3+}$  utilizada é aquela preconizada por Camargo *et al.* (1992) em estudos realizados com os mesmos cultivares de *T. aestivum*. Os sistemas radiculares foram coletados 48 h após o segundo tratamento, lavados abundantemente e utilizados em todas as análises subsequentes. Durante os 3 dias de tratamento, as plantas foram mantidas em sala de crescimento, a 30 °C, sob iluminação constante a uma fluência média de luz de  $191 \text{ } \mu\text{mol s}^{-1} \text{ m}^{-2}$  (Figura 2B).



**Figura 2.** Imagens representativas da montagem dos experimentos de incubação das raízes de *Triticum aestivum* na presença ou não de  $\text{Al}^{3+}$ . **A**, Preparo dos rolos de germinação de sementes para a obtenção de raízes retilíneas. **B**, Plântulas, cujas raízes foram submetidas aos tratamentos.

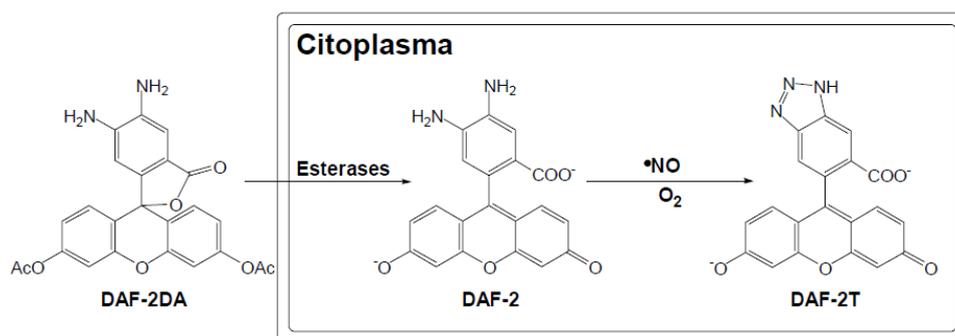
### 3.2. Localização de óxido nítrico (NO) e $\text{Al}^{3+}$

Cortes transversais, à mão livre, de cerca de 0,5 cm a partir do ápice radicular, foram incubados em soluções recém-preparadas de 4,5-diaminofluoresceína diacetato (DAF-2DA)  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  para detecção de NO (Modolo *et al.*, 2006). Após 15 min de incubação no escuro e à temperatura ambiente, os cortes foram lavados em água desionizada, montados em Vectashield (*Vector Laboratories Inc.*, Burlingame, CA) e analisados ao microscópio de epifluorescência (Olympus BX41) utilizando filtro de comprimento de onda de excitação e emissão de 450 nm e 570 nm, respectivamente.

Para a detecção de  $\text{Al}^{3+}$ , cortes semelhantes aos anteriores e dos mesmos tratamentos foram incubados em solução de morina  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  em tampão acetato, pH 5,0 (Tice *et al.*, 1992). Após 1 h de incubação à temperatura ambiente, os cortes foram lavados em água desionizada, montados em lâminas e analisados ao microscópio de epifluorescência (Olympus BX41) utilizando filtro de excitação e emissão na faixa de 420-510 nm. Os cortes foram fotografados utilizando objetiva de 10x e tempos de exposição de 1200 ms para DAF-2 DA e 200 ms para morina, com câmera digital (Olympus SC30).

A localização de NO em raízes sob os vários tratamentos foi determinada empregando DAF-2DA. Este é um composto não fluorescente que se difunde facilmente através de membranas e, sob a ação de esterases intracelulares é hidrolisado em 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2). O grupo diamino do DAF-2 é nitrosilado pelo NO existente no meio, na presença de  $\text{O}_2$ , o que resulta em uma

nitrosamina que apresenta rearranjo de átomos formando triazolofluoresceína (DAF-2T), que emite fluorescência verde esmeralda (Figura 3; Modolo, 2004).



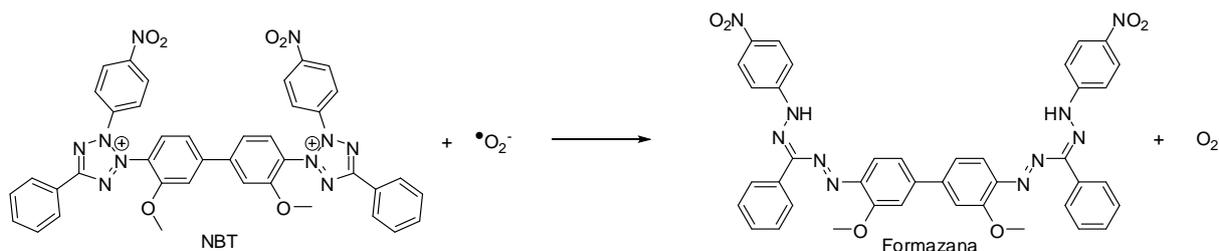
**Figura 3.** Representação esquemática da reação de detecção *in situ* de óxido nítrico (NO). **DAF-2**, 4,5-diaminofluoresceína; **DAF-2DA**, 4,5-diaminofluoresceína diacetato; **DAF-2T**, triazolofluoresceína. **Ac**, grupo acetila. Reproduzido de Modolo (2004).

A localização de  $Al^{3+}$  em cortes transversais de raízes foi feita utilizando o flavonoide morina, que, em meio ácido, forma um complexo com  $Al^{3+}$  e exibe fluorescência verde (Browne *et al.*, 1990). Morina é um fluoróforo altamente sensível e pode detectar concentrações muito baixas de  $Al^{3+}$  em tecidos vegetais (Eggert, 1970). Seu limite de detecção é inferior a  $2 \text{ nmol de } Al^{3+} \text{ L}^{-1}$  (Lian *et al.*, 2003).

### 3.3. Localização de ânion superóxido ( $\cdot O_2^-$ )

A localização de  $\cdot O_2^-$  foi realizada de acordo com Lee *et al.* (2002), com modificações. Cortes transversais, à mão livre, de cerca de 0,5 cm a partir do ápice radicular, foram infiltrados a vácuo por 10 min com tampão fosfato  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  (pH 7,6) contendo *nitroblue tetrazolium* (NBT)  $0,2 \text{ g L}^{-1}$ . Os cortes foram incubados por 2 h à temperatura ambiente e ausência de luz. Em seguida, os cortes foram lavados com água desionizada, montados em glicerina 50% e avaliados ao microscópio óptico (Olympus BX41), sob objetiva de 10x e fotografados com câmera digital (Olympus SC30), com tempo de exposição de 30 ms.

A produção de  $\cdot O_2^-$  em raízes sob os diversos tratamentos impostos foi avaliada *in situ* empregando o reagente NBT. Esta técnica permite a determinação semi quantitativa da produção de  $\cdot O_2^-$  (Choi *et al.*, 2006) em sistemas *in vitro* e *in vivo*. A quantidade relativa de  $\cdot O_2^-$  é determinada pelo número de células contendo depósitos de formazana, um composto de coloração azul formado a partir da redução do NBT, de coloração amarela (Figura 4).



**Figura 4.** Representação esquemática da reação do ânion superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) com o *nitroblue tetrazolium* (NBT).

### 3.4. Localização de células mortas

A localização *in situ* de células mortas foi realizada de acordo com Rate *et al.* (1999), com modificações. Cortes transversais, à mão livre, de cerca de 0,5 cm a partir do ápice radicular, foram incubados por 5 min a 100 °C em solução recém-preparada de lactofenol (ácido láctico, glicerol, fenol e água destilada 1:1:1:1; v/v/m/v) contendo azul de tripan 0,25 mg mL<sup>-1</sup>. Os tecidos vegetais foram lavados com solução alcoólica de lactofenol (etanol/lactofenol 2:1; v/v) por 5 min, seguido de lavagem em etanol 50% por 5 min para a remoção de reagente livre. Os cortes foram montados em glicerina 50%, avaliados ao microscópio óptico (Olympus BX41) sob objetiva de 10x e fotografados com câmera digital (Olympus SC30), com tempo de exposição de 30,0 ms.

A localização de células mortas em raízes sob os vários tratamentos foi determinada empregando o corante azul de tripan em solução de lactofenol. Células vivas não incorporam o corante, pois possuem membranas intactas impermeáveis ao azul de tripan. No entanto, células mortas apresentam membranas com integridade e/ou seletividade reduzida, o que permite a entrada do azul de tripan no simplasto com subsequente coloração das células em tons que variam do violeta ao azul.

### 3.5. Quantificação de lignina

A extração da parede celular das raízes foi realizada de acordo com Tokunaga *et al.* (2005). As raízes intactas foram maceradas em  $\text{N}_2$  líquido e extraídas com 1 mL de etanol 95%. As amostras foram transferidas para tubos plásticos previamente pesados e os extratos centrifugados a 8.000 x g por 5 min. O *pellet* foi recolhido e lavado por três vezes com 1,5 mL de etanol 95%, seguindo duas lavagens com 1,5 mL de etanol/hexano (1:2; v/v). Os *pellets* foram secos

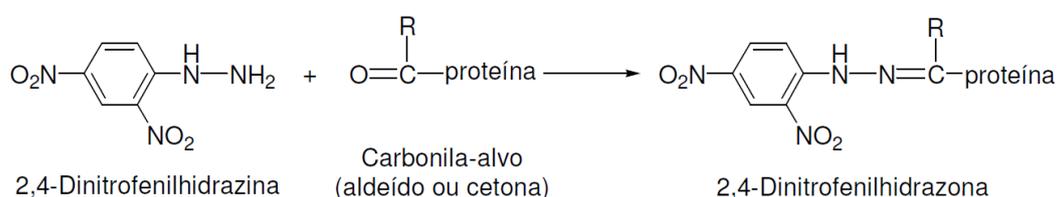
*overnight* a 70 °C em estufa de circulação forçada de ar e a massa das amostras de parede celular, registradas. O conteúdo de lignina das amostras foi determinado de acordo com Fukushima e Kerley (2011). A fração seca foi ressuspensa com brometo de acetila 25% em ácido acético glacial na proporção de 1 mL para 10 mg de parede celular e o sistema foi mantido em banho-maria a 50 °C por 2 h. Após o resfriamento em banho de gelo, as misturas foram centrifugadas a 8.000 x g por 10 min. A 0,5 mL do sobrenadante resultante foi adicionada uma solução de ácido acético contendo NaOH 0,3 mol L<sup>-1</sup> e hidroxilamina 0,5 mol L<sup>-1</sup>. A mistura foi centrifugada a 10.000 x g por 5 min e o sobrenadante submetido à análise espectrofotométrica a 280 nm. O teor de lignina foi determinado utilizando a seguinte fórmula produzida a partir de uma curva padrão:  $X = (Y - 0,0009)/23,077$ , onde X é a concentração de lignina (mg mL<sup>-1</sup>), Y é a densidade óptica da amostra. O conteúdo de lignina nas raízes foi expresso em mg g<sup>-1</sup> de massa seca de parede celular.

### **3.6. Quantificação de hidroperóxidos de lipídios (LOOHs)**

A quantificação de LOOH em raízes foi realizada de acordo com DeLong *et al.* (2002) e Gay e Gebicki (2002), com modificações. As raízes intactas foram maceradas em N<sub>2</sub> líquido na presença de polivinilpolipirrolidona (PVPP) na proporção de 30 mg para 0,3 g de material vegetal. Após a completa maceração foi acrescentada solução aquosa de etanol 80%, contendo hidroxitolueno butilado (BHT) 0,01% (m/v) (1 mL para 0,3 g de material vegetal). Os homogenatos foram centrifugados a 16.000 x g por 10 min. Vinte e cinco microlitros dos sobrenadantes foram adicionados individualmente a 25 µL de uma solução metanólica de trifetilfosfina (TEF) 10 mmol L<sup>-1</sup> ou 25 µL de metanol. O sistema foi incubado por 30 min à temperatura ambiente, sob agitação, seguindo a adição de 500 µL de solução recém-preparada do reagente FOX (metanol 90%, HClO<sub>4</sub> 110 mmol L<sup>-1</sup>, BHT 4 mmol L<sup>-1</sup>, sulfato ferroso amoniacal 2,5 mmol L<sup>-1</sup> e alaranjado de xilenol 1 mmol L<sup>-1</sup>). As amostras foram incubadas por 10 min à temperatura ambiente na ausência de luz, sendo analisadas a 560 nm em leitor de microplacas (Thermo Scientific Multiskan Spectrum, modelo 1500). A quantidade de hidroperóxidos de lipídios foi determinada em termos de equivalentes de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) utilizando este reagente puro (Merck) como padrão. Os resultados foram expressos em µmol de hidroperóxidos de lipídios g<sup>-1</sup> de massa seca.

A quantificação de LOOH em raízes sob os vários tratamentos foi realizada a partir do uso de reagente FOX, que foi reconhecido como sendo mais sensível que o método baseado na detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês, TBARS) (DeLong *et al.*, 2002). Além disso, é uma técnica que não apresenta interferências do oxigênio do meio, apresenta boa linearidade e os resultados obtidos são altamente reprodutíveis (DeLong *et al.*, 2002). O método do reagente FOX é baseado na oxidação de  $Fe^{2+}$  a  $Fe^{3+}$  por LOOH presentes em uma amostra vegetal em estudo. O  $Fe^{3+}$  se liga ao alaranjado de xilenol para formar um complexo de coloração que pode variar de alaranjada à púrpura, com máxima absorção de luz na faixa de 500 a 600 nm (DeLong *et al.*, 2002; Pinto *et al.*, 2007).

O método usado para quantificar proteínas oxidadas baseia-se na reação entre a 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH) e grupamentos carbonilas presentes em cetonas ou aldeídos das proteínas (Figura 5). Grupos carbonilas são formados na estrutura de proteínas a partir da oxidação da cadeia lateral de resíduos de L-histidina e L-triptofano. A base de Schiff resultante dessa reação (derivado 2,4-dinitrofenilhidrazona) é estável, sendo detectada a 360 nm (Reznick e Packer, 1994; Klebl *et al.*, 1998).



**Figura 5.** Representação esquemática da reação utilizada para a detecção de proteínas oxidadas. Carbonilas cetônicas ou aldeídicas oriundas da oxidação de cadeias laterais de resíduos de L-histidina e L-triptofano presentes nas proteínas reagem com 2,4-dinitrofenilhidrazina para formar uma fenilhidrazona de cor amarela. Reproduzido de Faria, 2010.

### 3.7. Quantificação de proteínas oxidadas

A determinação dos níveis de proteínas oxidadas foi realizada de acordo com Levine *et al.* (1990) e Reznick e Packer (1994), com modificações. As raízes inteiras foram maceradas em  $N_2$  líquido na presença de PVPP (0,3 g para 1 g de amostra). As proteínas solúveis foram extraídas com 1 mL de tampão HEPES 50 mmol  $L^{-1}$  (pH 7,0). O homogenato foi centrifugado a 10.000 x  $g$  por 10 min a 4 °C. Adicionou-se 150  $\mu L$  de uma solução de 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH) 8 mmol  $L^{-1}$  contendo

HCl 2 mol L<sup>-1</sup> a 225 µL do sobrenadante resultante. Cada sistema foi incubado por 1 h sob agitação, na ausência de luz e à temperatura ambiente. Aos sistemas foram adicionados 180 µL de ácido tricloroacético 30% (m/v) para proporcionar a precipitação das proteínas. As misturas foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 min. O precipitado foi lavado três vezes com 500 µL de uma solução de etanol/acetato de etila (1:1; v/v) para a remoção de 2,4-DNPH livre. O material foi ressuscitado em 360 µL de solução de guanidina 6 mol L<sup>-1</sup>, preparada em tampão fosfato 20 mmol L<sup>-1</sup> (pH 2,3). As amostras foram, então, analisadas espectrofotometricamente na faixa de 300 a 400 nm em leitor de microplacas. A análise mostrou máxima absorção de luz a 360 nm para as amostras, sendo este comprimento de onda escolhido para a expressão dos resultados em nmol de carbonila mg<sup>-1</sup> de proteína total.

### **3.8. Determinação da atividade de enzimas do sistema antioxidante**

As raízes intactas das plântulas foram maceradas em N<sub>2</sub> líquido na presença de PVPP (30 mg para 0,3 g de tecido vegetal) e as proteínas solúveis extraídas com solução composta de tampão fosfato 50 mmol L<sup>-1</sup> (pH 6,8), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 100 µmol L<sup>-1</sup> e coquetel completo de inibidores de protease (Sigma). As amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 15 min (4 °C) e o sobrenadante utilizado para a determinação da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX).

A atividade SOD foi determinada de acordo com Giannopolitis e Ries (1977). Foi utilizado um meio de reação constituído de tampão fosfato 50 mmol L<sup>-1</sup> (pH 7,8), L-metionina 13 mmol L<sup>-1</sup>, NBT 75 µmol L<sup>-1</sup>, EDTA 100 µmol L<sup>-1</sup> e riboflavina 2 µmol L<sup>-1</sup>. Dois conjuntos idênticos de reações foram acondicionados em câmara fechada, à temperatura ambiente por um período de 10 min, sendo um deles mantido na presença de luz (15 W) e o outro, a reação controle, mantida na ausência de luz. O azul de formazana resultante da fotorredução do NBT foi quantificado a 575 nm. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade da enzima necessária para inibir a fotorredução do NBT em 50%. O método utilizado para quantificar a atividade SOD baseou-se na produção artificial de <sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup> no meio de reação a partir da redução de O<sub>2</sub> na presença de riboflavina e L-metionina, em um processo dependente de luz. Uma vez formado no meio contendo o extrato proteico vegetal, o <sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup> servirá de substrato para a SOD. O <sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup> não dismutado pela SOD reduzirá o NBT, também adicionado ao

sistema, resultando na formação de uma formazana de coloração azul-violeta (Figura 4) que é quantificada por medidas espectrofotométricas na região do visível.

A atividade CAT foi determinada de acordo com Boscolo *et al.* (2003), com modificações. Foi utilizado um meio de reação constituído de tampão fosfato 50 mmol L<sup>-1</sup> (pH 6,8) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 12,5 mmol L<sup>-1</sup>. A diminuição da absorbância a 240 nm devido ao decréscimo na concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi monitorada. Os cálculos foram feitos com base no coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) de 39,4 L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

A atividade APX foi determinada de acordo com Nakano e Asada (1981). Foi utilizado um meio de reação constituído de tampão fosfato 50 mmol L<sup>-1</sup> (pH 6,0), ácido ascórbico 1 mmol L<sup>-1</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 mmol L<sup>-1</sup>. A diminuição da concentração de ácido ascórbico no meio foi monitorada com medidas espectrofotométricas a 290 nm. Os cálculos foram feitos com base no coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) de 2,8 L mmol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

### **3.9. Determinação de proteínas totais**

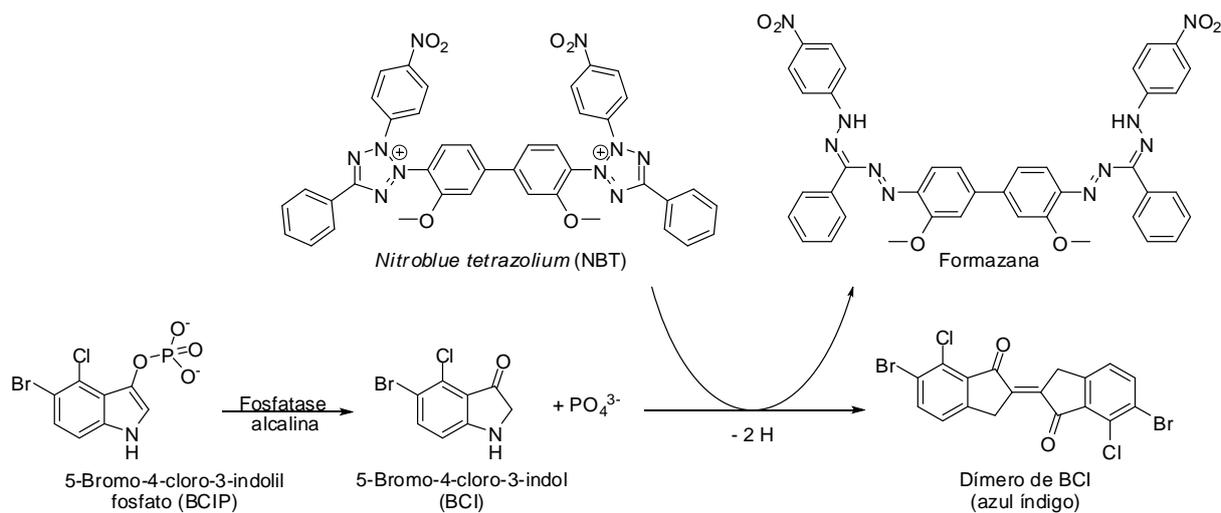
A quantificação de proteínas totais nas amostras foi realizada pelo método de ligação ao *coomassie blue* (Bradford, 1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

### **3.10. Localização imunohistoquímica de ácido indol-3-acético (AIA)**

A distribuição de AIA em ápices radiculares (0,5 cm) foi investigada de acordo com Moctezuma (1999) e Thomas *et al.* (2002) com modificações. As amostras foram pré-fixadas em solução aquosa recém-preparada de cloreto de 1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil)-carboxidiimida 4% (EDAC; Sigma) a partir de infiltração a vácuo e incubação por 4 h a 4 °C. A pré-fixação garante a antigenicidade do AIA ao anticorpo monoclonal anti-AIA. As amostras foram fixadas utilizando solução de Karnovsky (glutaraldeído 5%, paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,2) (Karnovsky, 1965) a partir de infiltração à vácuo e incubação por 16 h à 4° C. O material foi desidratado em série butílica crescente (Johansen, 1940) e, posteriormente, incluído em Paraplast<sup>®</sup> (Kraus e Arduin, 1997) a 60 °C. Cortes longitudinais de 10 µm foram realizados com o auxílio de um micrótomo de rotação (Leica Jung Biocut 2035). Os cortes foram desparafinados, reidratados, incubados

em solução bloqueadora [tampão PBS 10 mmol L<sup>-1</sup> (pH 7,0), tween-20 0,1%, glicina 1,5% e BSA 5%] por 45 min e lavados em PBS 10 mmol L<sup>-1</sup> (pH 7,0) contendo Tween-20 0,1% e BSA 0,8%. Os cortes foram incubados *overnight* a 4 °C com anticorpo primário monoclonal anti-AIA (Sigma) 50 µg mL<sup>-1</sup>, preparado em mistura de PBS 10 mmol L<sup>-1</sup> com BSA 0,8%. As amostras foram lavadas com solução diluente do anticorpo e incubadas por 7 h à temperatura ambiente na ausência de luz com anticorpo secundário conjugado anti-mouse IgG fosfatase alcalina (Sigma) diluído 20 vezes em uma mistura de PBS mmol L<sup>-1</sup> com BSA 0,8%. Os cortes foram lavados com PBS 10 mmol L<sup>-1</sup>/BSA 0,8% e revelados com solução de NBT 0,34 g L<sup>-1</sup> em 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato 0,18 g L<sup>-1</sup>. Após 20 min a reação foi paralisada com Tris 100 mmol L<sup>-1</sup> (pH 8,0) contendo EDTA 1 mmol L<sup>-1</sup>. Os cortes foram montados em solução de montagem (Sigma), avaliados ao microscópio óptico Leica DM500 sob objetiva de 10x e fotografados com câmera digital (Leica ICC50 HD). O controle negativo foi obtido a partir do tratamento de fragmentos de raízes de *T. aestivum* com uma solução de KPSC constituída de sacarose 2%, cloranfenicol 50 µg mL<sup>-1</sup> e tampão fosfato 10 mmol L<sup>-1</sup> (pH 6) por 12 h (McClure e Guilfoyle, 1987). A solução de KPSC foi trocada após 1 h e 3 h de incubação. Para o controle positivo, os fragmentos foram incubados com KPSC por 4 h para remover a auxina endógena, seguido de tratamento por 8 h com uma solução de 2,4-ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) µmol L<sup>-1</sup>. Após essas incubações, os controles foram tratados para a imunolocalização de AIA. Além dos tratamentos já descritos no item 3.1, utilizou-se ácido 2,3,5-triodobenzóico (TIBA) 10 µM sozinho ou em associação com GSNO, como pré-tratamento, por 24 h.

A técnica de localização de AIA em cortes longitudinais de ápices radiculares baseou-se no uso de um anticorpo primário monoclonal capaz se ligar especificamente à auxina AIA. Os cortes foram posteriormente incubados com anticorpos secundários IgG (obtidos a partir de camundongos) conjugados com fosfatase alcalina que, na presença de NBT e 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) promove a formação da formazana correspondente e um dímero de coloração azul índigo (Figura 6). Sendo assim, a presença de AIA em raízes é verificada pela formação de um precipitado azul índigo como a apresentada na Figura 20, em cortes suplementados com 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), um análogo de auxina (tratamento KPSC + 2,4-D). Como controle-negativo, utilizou-se o tratamento com KPSC para a depleção de AIA endógeno (Figura 20).



**Figura 6.** Representação esquemática da reação de revelação de anticorpos anti-AIA na presença de fosfatase alcalina. Fosfatases alcalinas conjugadas ao anticorpo secundário IgG promovem a hidrólise da ligação fosfomonoéster presente na estrutura do 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP). O produto desta catálise (5-bromo-4-cloro-indolil; BCI) promove a conversão de *nitroblue tetrazolium* (NBT) à correspondente formazana, com formação de um precipitado azul índigo correspondente a um dímero de BCI.

### 3.11. Análises estatísticas

Os resultados foram analisados por meio de ANOVA *one way* com significância de 5% para comparação entre os diferentes tratamentos de um mesmo cultivar, utilizando o programa Systat 10.2 (Wilkinson, 2002).

Após verificação de distribuição normal e variância homocedástica, os dados foram submetidos à análise estatística de variância ANOVA *one way* para dados paramétricos e Kruskal-Wallis para dados não paramétricos, com significância de 5%, para comparação entre os diferentes tratamentos de um mesmo cultivar. Em seguida foi realizado teste de Tukey a 5% de significância, para comparações múltiplas entre os tratamentos.

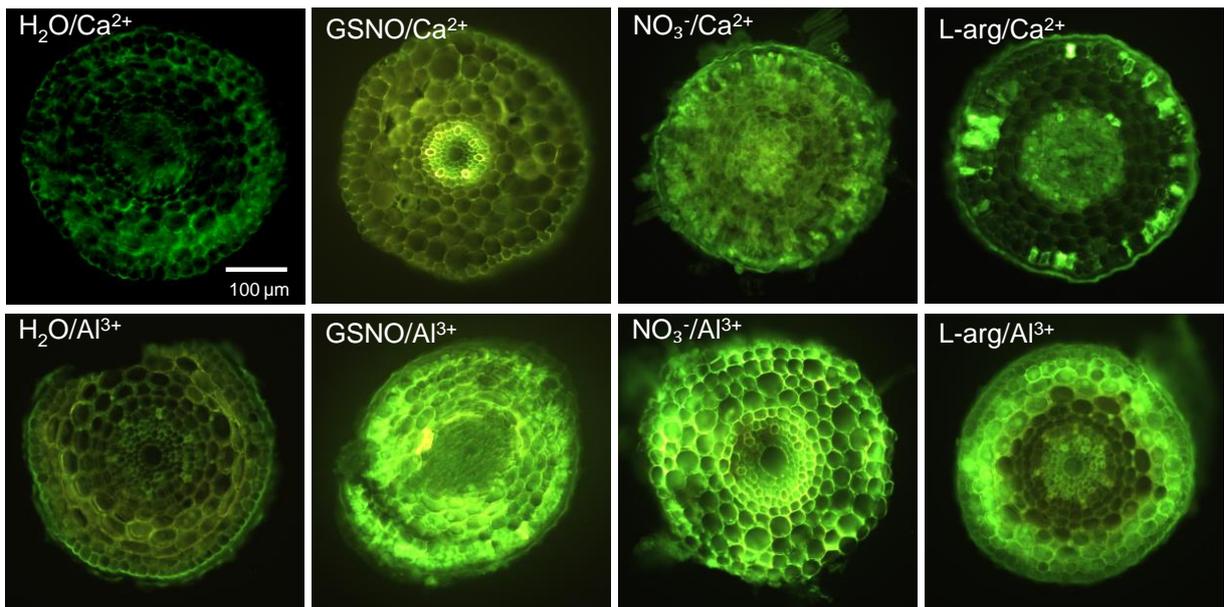
Para testar o efeito de cada tratamento entre os cultivares, os resultados obtidos foram analisados por teste *t* para duas amostras, no caso de dados paramétricos, ou por teste de Mann-Whitney, quando se tratou de dados não paramétricos.

## 4. Resultados

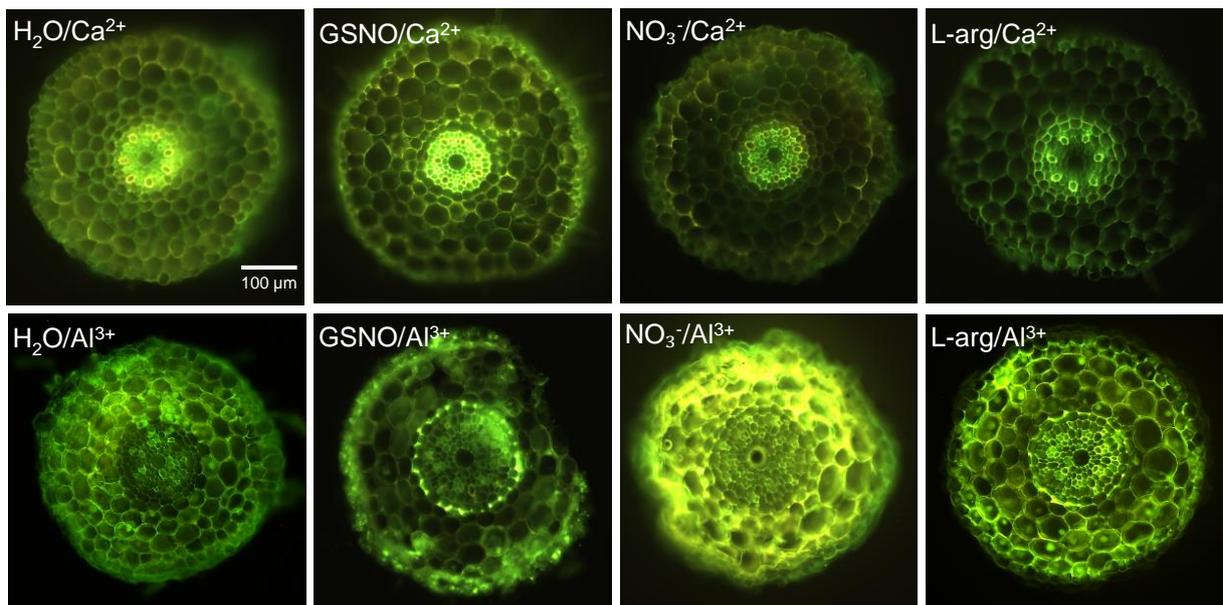
### 4.1. Localização de óxido nítrico (NO) e $\text{Al}^{3+}$

Raízes de ambos os cultivares não apresentaram autofluorescência. Raízes do cultivar tolerante, submetidas ao tratamento-controle ( $\text{H}_2\text{O}/\text{Ca}^{2+}$ ) apresentaram NO principalmente no cilindro vascular, enquanto que a presença de NO foi detectada em algumas células do córtex de raízes de plântulas sensíveis ao Al (Figuras 7 e 8). Essa fluorescência corresponde ao NO produzido em condições fisiológicas. A intensidade de fluorescência verde exibida pelo cultivar tolerante (BH1146) demonstra que raízes do referido cultivar naturalmente sintetizam mais NO do que as do cultivar sensível (Anahuac) ao Al. Adicionalmente, os níveis endógenos de NO parecem aumentar mais expressivamente em raízes do cultivar tolerante do que nas do cultivar sensível, após 48 h de tratamento com  $\text{Al}^{3+}$ . Como esperado, a intensidade de fluorescência foi bem maior nos cortes de raízes pré-tratadas com um reconhecido liberador de NO (GSNO), em comparação aos tratamentos-controle. Resultado similar foi observado em cortes tratados com  $\text{NO}_3^-$  ou L-arg, reconhecidos precursores da síntese de NO (Figuras 7 e 8). A intensidade da fluorescência aumentou ainda mais quando as raízes pré-submetidas ao tratamento com GSNO ou precursores de síntese de NO foram posteriormente tratadas com  $\text{Al}^{3+}$ , principalmente no cultivar sensível (Figuras 7 e 8).

Raízes do cultivar tolerante tratadas com GSNO,  $\text{NO}_3^-$  ou L-arg e posteriormente expostas ao  $\text{Al}^{3+}$  apresentaram acúmulo de NO, principalmente, na endoderme e na epiderme enquanto que as raízes dos respectivos tratamentos controles exibiram fluorescência principalmente no cilindro vascular (Figura 8).



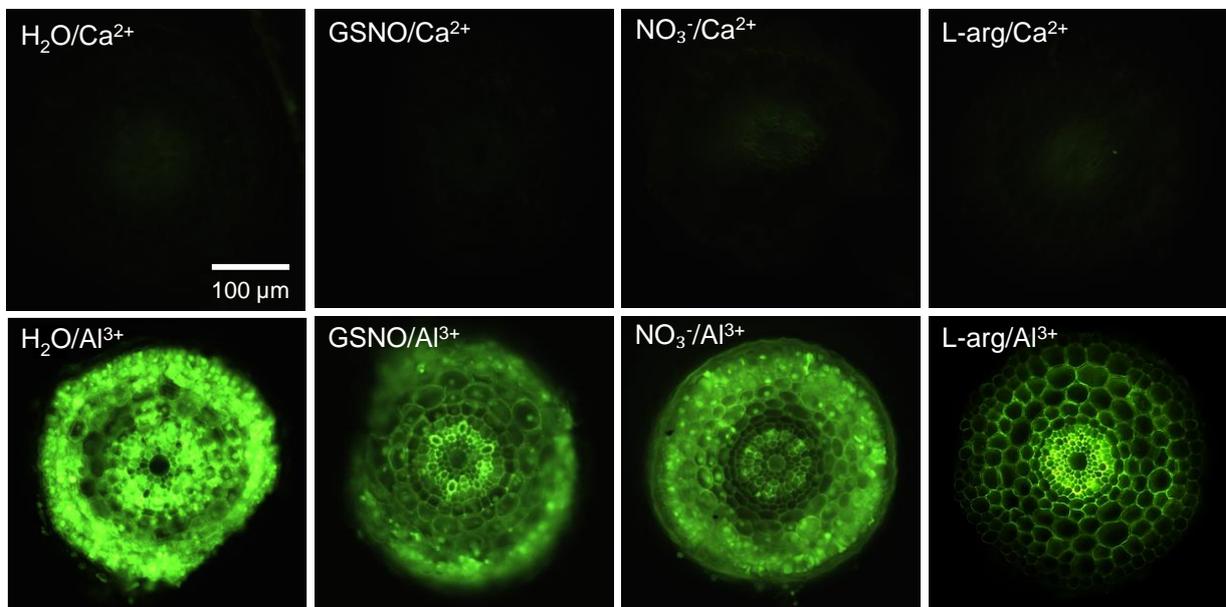
**Figura 7.** Localização de NO, por DAF-2DA, em cortes transversais de raízes de *Triticum aestivum* cv. Anahuac (sensível ao Al). Os tratamentos descritos antes da barra duraram 24 h enquanto que os depois da barra duraram 48 h. Foi utilizada solução de  $\text{Al}^{3+}$   $75 \mu\text{mol L}^{-1}$  para a imposição do estresse. **GSNO**, S-nitrosoglutationa; **L-arg**, L-arginina. As imagens são representativas de, pelo menos, dois experimentos independentes realizados em triplicata.



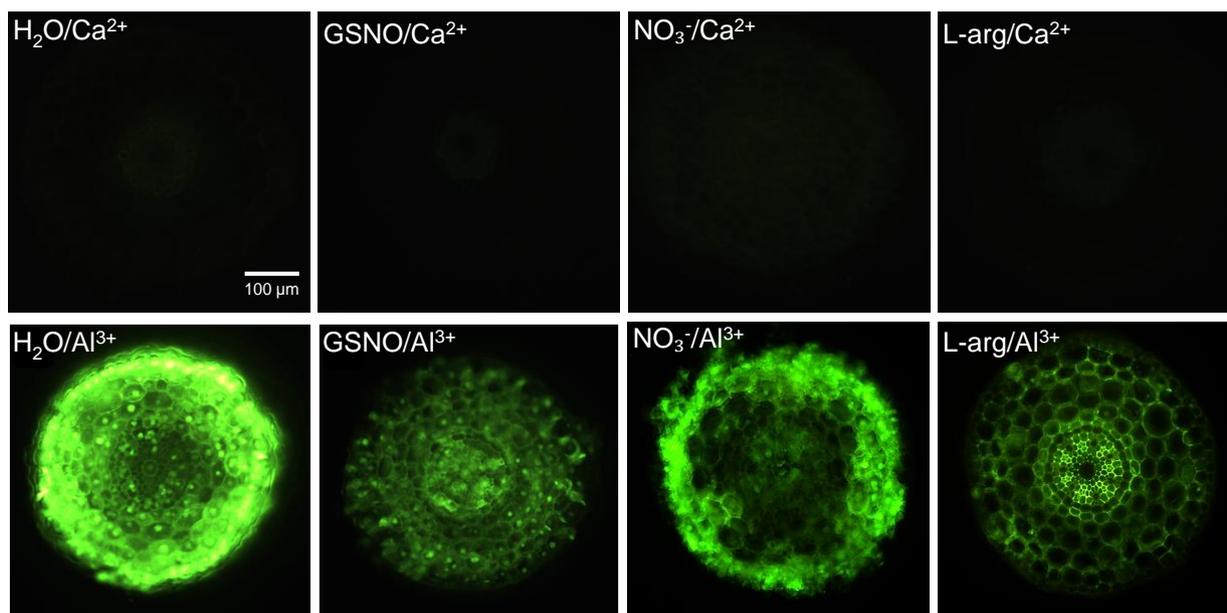
**Figura 8.** Localização de NO, por DAF-2DA, em cortes transversais de raízes de *Triticum aestivum* cv. BH1146 (tolerante ao Al). Os tratamentos descritos antes da barra duraram 24 h enquanto que os depois da barra duraram 48 h. Foi utilizada solução de  $\text{Al}^{3+}$   $75 \mu\text{mol L}^{-1}$  para a imposição do estresse. **GSNO**, S-nitrosoglutationa; **L-arg**, L-arginina. As imagens são representativas de, pelo menos, dois experimentos independentes realizados em triplicata.

As Figuras 9 e 10 apresentam micrografias representativas dos resultados de localização *in situ* de  $\text{Al}^{3+}$  em raízes de *Triticum aestivum* cvs. Anahuac e BH1146. Como esperado, raízes não-tratadas com  $\text{Al}^{3+}$  não apresentaram qualquer

fluorescência após incubação com morina (Figuras 9 e 10), indicando ausência de contaminação dos experimentos com esse cátion. Raízes de plântulas tolerantes tratadas com  $\text{Al}^{3+}$  apresentaram este cátion concentrado em células da epiderme e do córtex, enquanto que raízes de plântulas sensíveis apresentaram marcação fluorescente intensa correspondente à presença de  $\text{Al}^{3+}$  em praticamente todos os tecidos (Figuras 9 e 10). Interessantemente, a fluorescência em raízes de ambos os cultivares pré-tratados com GSNO,  $\text{NO}_3^-$  ou L-arg foi menos intensa que aquela em raízes sob os tratamentos  $\text{H}_2\text{O}/\text{Al}^{3+}$  (Figuras 9 e 10). Os pré-tratamentos pareceram diminuir o acúmulo de  $\text{Al}^{3+}$  no simplasto visto que este cátion foi detectado associado, principalmente, a núcleos e a membranas plasmáticas. O pré-tratamento com L-arg inibiu o acúmulo de  $\text{Al}^{3+}$  na epiderme de raízes de ambos os cultivares.



**Figura 9.** Localização de  $\text{Al}^{3+}$ , por morina, em cortes transversais de raízes de *Triticum aestivum* cv. Anahuac (sensível ao Al). Os tratamentos descritos antes da barra duraram 24 h enquanto que os depois da barra duraram 48 h. Foi utilizada solução de  $\text{Al}^{3+}$   $75 \mu\text{mol L}^{-1}$  para a imposição do estresse. **GSNO**, S-nitrosoglutationa; **L-arg**, L-arginina. As imagens são representativas de, pelo menos, dois experimentos independentes realizados em triplicata.

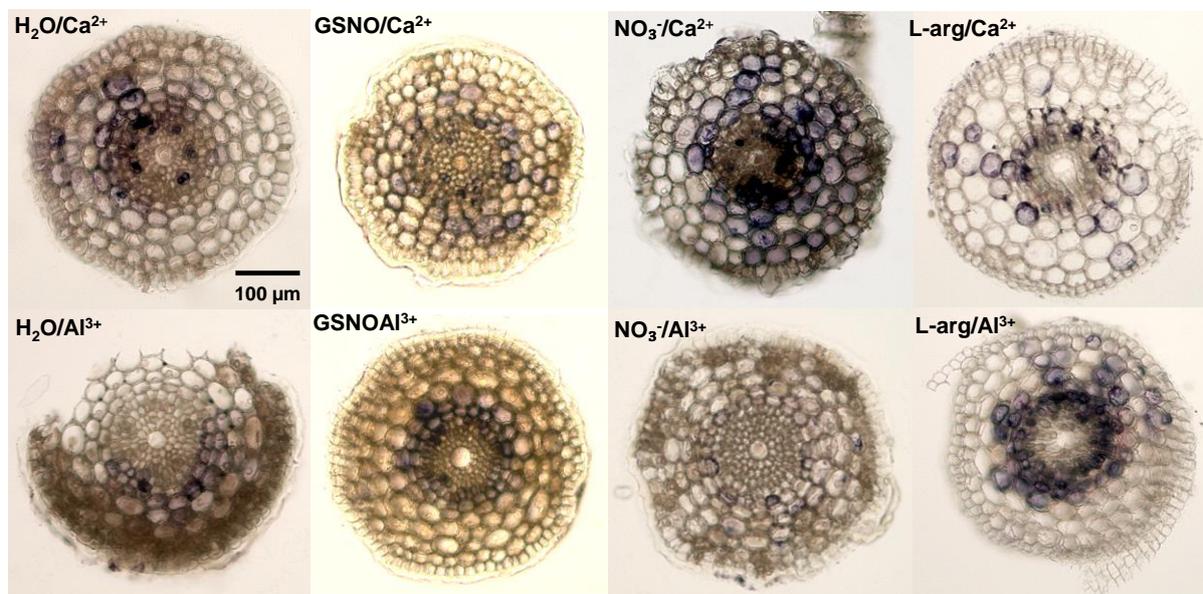


**Figura 10.** Localização de  $\text{Al}^{3+}$ , por morina, em cortes transversais de raízes de *Triticum aestivum* cv. BH1146 (tolerante ao Al). Os tratamentos descritos antes da barra duraram 24 h enquanto que os depois da barra duraram 48 h. Foi utilizada solução de  $\text{Al}^{3+}$   $75 \mu\text{mol L}^{-1}$  para a imposição do estresse. **GSNO**, S-nitrosoglutationa; **L-arg**, L-arginina. As imagens são representativas de, pelo menos, dois experimentos independentes realizados em triplicata.

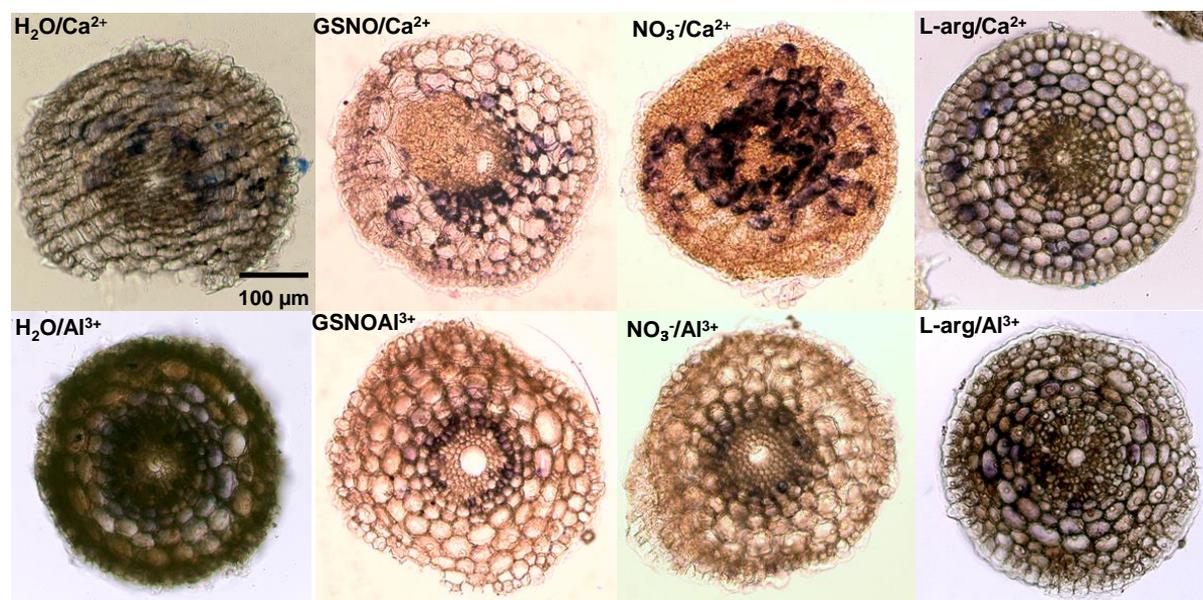
#### 4.2. Localização de ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ )

As Figuras 11 e 12 apresentam micrografias dos resultados de localização *in situ* de  $\text{O}_2^-$  em raízes de cultivares de *T. aestivum* com tolerância diferencial ao  $\text{Al}^{3+}$ . Os níveis endógenos de  $\text{O}_2^-$  (tratamento  $\text{H}_2\text{O}/\text{Ca}^{2+}$ ) foram aparentemente maiores em células de raízes do cultivar sensível, dada a maior intensidade da coloração azul distribuída desde as camadas do córtex mais próximas à endoderme até às células do cilindro vascular (Figura 11). Distribuição similar de  $\text{O}_2^-$ , porém em menor intensidade, foi observada nos tecidos de raízes do cultivar tolerante (Figura 12). O tratamento  $\text{H}_2\text{O}/\text{Al}^{3+}$  parece estimular o maior acúmulo de  $\text{O}_2^-$  em raízes do cultivar tolerante, com distribuição desde as células do córtex até às do cilindro central (Figura 12). Sob o mesmo tratamento, raízes do cultivar sensível acumularam  $\text{O}_2^-$  em poucas células do córtex, porém com ampla distribuição na endoderme (Figura 11). O pré-tratamento das raízes com GSNO ou  $\text{NO}_3^-$  diminuiu os níveis de  $\text{O}_2^-$  em ápices radiculares de ambos os cultivares, na presença de  $\text{Al}^{3+}$ . O  $\text{O}_2^-$  localizado nas células sob esses tratamentos ( $\text{GSNO}/\text{Al}^{3+}$  ou  $\text{NO}_3^-/\text{Al}^{3+}$ ) restringiu-se à endoderme e às células do córtex vicinais à endoderme. O pré-tratamento com L-arg, contudo, não foi capaz de conter a produção de  $\text{O}_2^-$  estimulada por Al, independentemente do

cultivar utilizado. Interessantemente,  $\text{NO}_3^-$  por si só estimulou a formação de  $\cdot\text{O}_2^-$  (tratamentos  $\text{NO}_3^-/\text{Ca}^{2+}$ ).



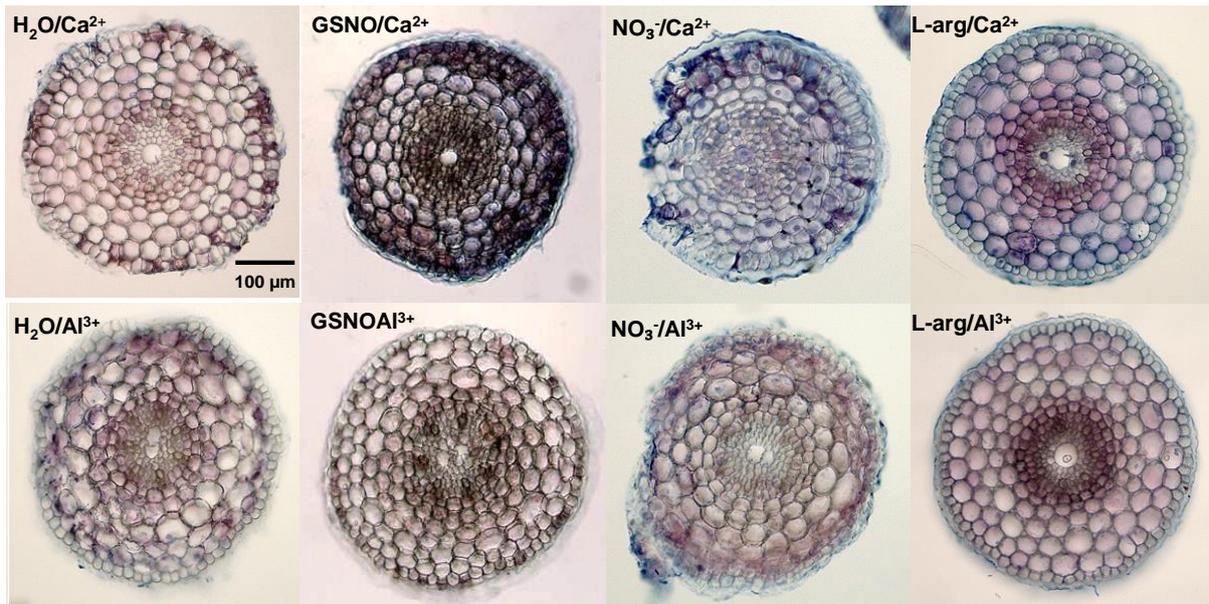
**Figura 11.** Localização de  $\cdot\text{O}_2^-$ , com NBT, em cortes transversais de raízes de *Triticum aestivum* cv. Anahuac (sensível ao Al). Os tratamentos descritos antes da barra duraram 24 h enquanto que os depois da barra duraram 48 h. A presença de  $\cdot\text{O}_2^-$  é evidenciada pela coloração azul. Foi utilizada solução de  $\text{Al}^{3+}$   $75 \mu\text{mol L}^{-1}$  para a imposição do estresse. **GSNO**, S-nitrosoglutationa; **L-arg**, L-arginina. As imagens são representativas de, pelo menos, dois experimentos independentes realizados em triplicata.



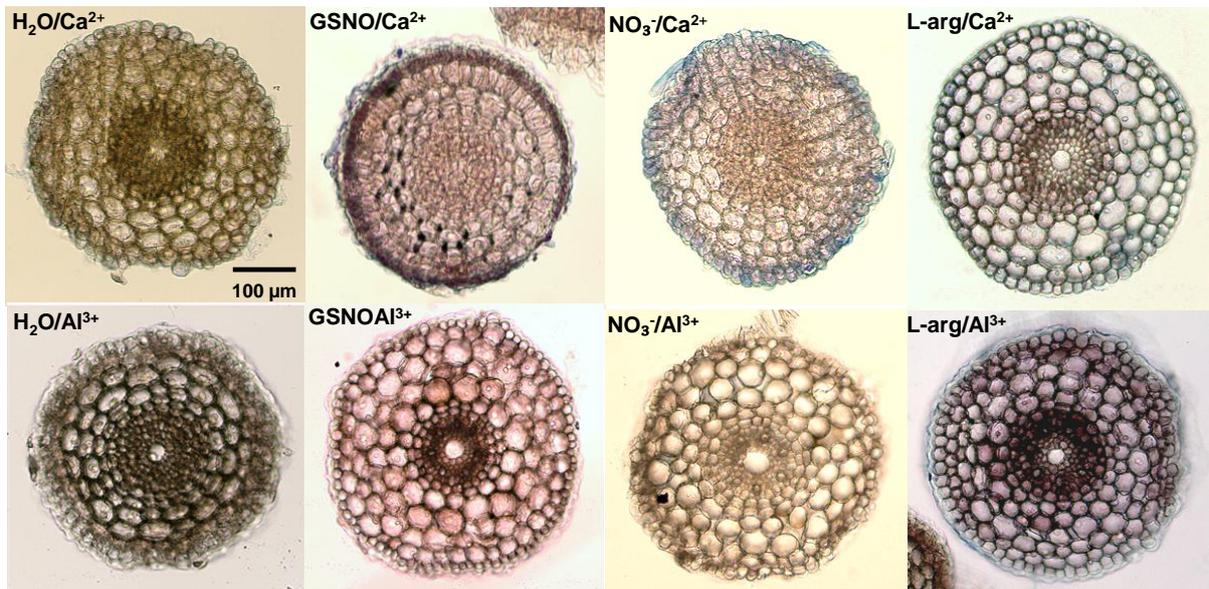
**Figura 12.** Localização de  $\cdot\text{O}_2^-$ , com NBT, em cortes transversais de raízes de *Triticum aestivum* cv. BH1146 (tolerante ao Al). Os tratamentos descritos antes da barra duraram 24 h enquanto que os depois da barra duraram 48 h. A presença de  $\cdot\text{O}_2^-$  é evidenciada pela coloração azul. Foi utilizada solução de  $\text{Al}^{3+}$   $75 \mu\text{mol L}^{-1}$  para a imposição do estresse. **GSNO**, S-nitrosoglutationa; **L-arg**, L-arginina. As imagens são representativas de, pelo menos, dois experimentos independentes realizados em triplicata.

### 4.3. Localização de células mortas

Não foram encontradas células mortas em ápices de raízes-controle (tratamentos  $\text{H}_2\text{O}/\text{Ca}^{2+}$ ) de ambos os cultivares (Figuras 13 e 14). O cultivar sensível ao Al apresentou várias células mortas desde a epiderme até a endoderme dos ápices radiculares após os tratamentos  $\text{H}_2\text{O}/\text{Al}^{3+}$  (Figura 13). Notavelmente, nenhuma célula morta foi detectada em ápices radiculares do cultivar tolerante submetido ao estresse por Al (tratamentos  $\text{H}_2\text{O}/\text{Al}^{3+}$ ; Figura 14). O pré-tratamento do cultivar sensível com GSNO preveniu a morte celular em raízes posteriormente incubadas com  $\text{Al}^{3+}$  enquanto que o pré-tratamento com  $\text{NO}_3^-$  minimizou o surgimento de células mortas na epiderme e córtex e suprimiu a morte de células da endoderme (Figura 13). Constatou-se ausência de células mortas em raízes do cultivar tolerante sob os tratamentos  $\text{GSNO}/\text{Al}^{3+}$  e  $\text{NO}_3^-/\text{Al}^{3+}$  (Figura 14). L-arg,  $\text{NO}_3^-$  ou GSNO, por si só, (tratamentos L-arg/ $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{NO}_3^-/\text{Ca}^{2+}$ , GSNO/ $\text{Ca}^{2+}$ ) estimularam a morte de células da epiderme, córtex, endoderme e cilindro vascular de ápices radiculares do cultivar sensível ao Al, enquanto que o tolerante não exibiu células mortas, salvo na epiderme de raízes tratadas com  $\text{NO}_3^-/\text{Ca}^{2+}$  (Figuras 13 e 14).



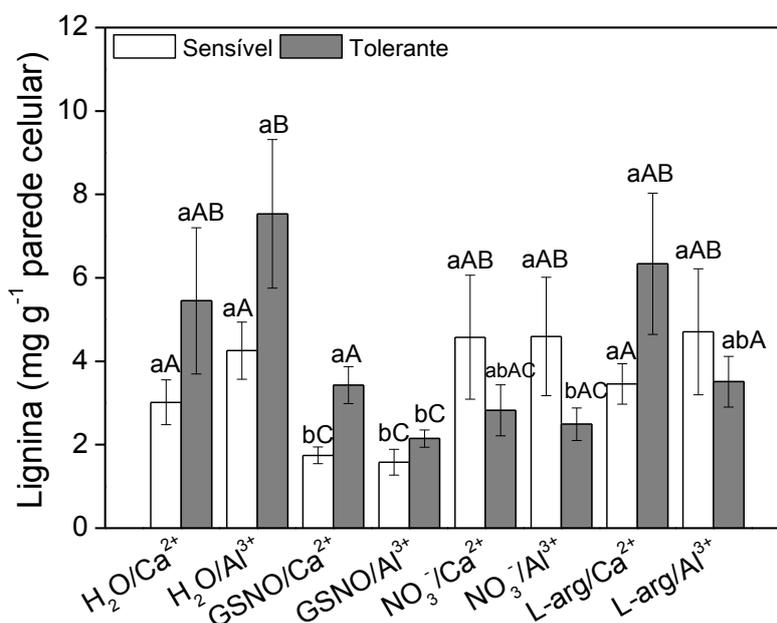
**Figura 13.** Localização de células mortas, com azul de Tripian, em cortes transversais de raízes de *Triticum aestivum* cv. Anahuac (sensível ao Al). Os tratamentos descritos antes da barra duraram 24 h enquanto que os depois da barra duraram 48 h. Foi utilizada solução de  $\text{Al}^{3+}$   $75 \mu\text{mol L}^{-1}$  para a imposição do estresse. As células mortas foram evidenciadas pela coloração azul. **GSNO**, S-nitrosoglutationa; **L-arg**, L-arginina. As imagens são representativas de, pelo menos, dois experimentos independentes realizados em triplicata.



**Figura 14.** Localização de células mortas, com azul de Tripian, em cortes transversais de raízes de *Triticum aestivum* cv. BH1146 (tolerante ao Al). Os tratamentos descritos antes da barra duraram 24 h enquanto que os depois da barra duraram 48 h. Foi utilizada solução de  $\text{Al}^{3+}$   $75 \mu\text{mol L}^{-1}$  para a imposição do estresse. As células mortas foram evidenciadas pela coloração azul. **GSNO**, S-nitrosoglutationa; **L-arg**, L-arginina. As imagens são representativas de, pelo menos, dois experimentos independentes realizados em triplicata.

#### 4.4. Quantificação de lignina

A Figura 15 mostra que, de uma maneira geral, as células de raízes de ambos os cultivares apresentaram baixa quantidade de lignina e esta variou consideravelmente entre as amostras biológicas de um mesmo tratamento. Os níveis basais de lignina em raízes de plântulas sensíveis ao Al foram similares aos de raízes do cultivar tolerante (tratamentos  $H_2O/Ca^{2+}$ ) e não variaram significativamente com a imposição do estresse (tratamentos  $H_2O/Al^{3+}$ ). Apenas o pré-tratamento com GSNO foi capaz de afetar o acúmulo de lignina em raízes dos dois cultivares seguindo incubação com Al, reduzindo os níveis desse polímero fenólico em mais de 60%. O pré-tratamento com  $NO_3^-$  inibiu o acúmulo de lignina em 67% em raízes do cultivar tolerante sob estresse por Al (Figura 15). Tais pré-tratamentos, contudo, não afetaram a deposição de lignina no cultivar sensível sob estresse por Al. O pré-tratamento com GSNO diminuiu a produção de lignina em 42% e 37% em raízes dos cultivares sensível e tolerante, respectivamente, quando em condições fisiológicas (pós-tratamentos com  $Ca^{2+}$ ).

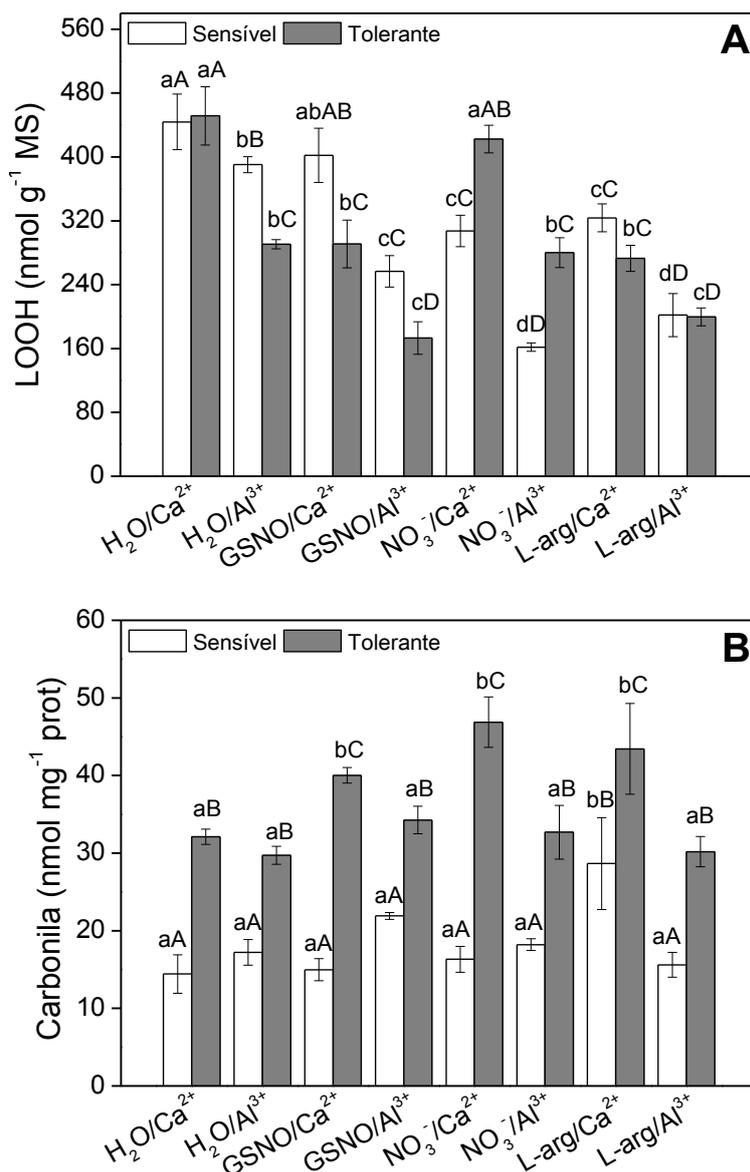


**Figura 15.** Efeito do NO sobre o acúmulo de lignina em raízes de *Triticum aestivum*. As raízes foram tratadas por 24 h com as soluções descritas antes da barra seguido dos tratamentos com  $CaCl_2$  200  $\mu$ M ou  $Al^{3+}$  75  $\mu$ M em  $CaCl_2$  200  $\mu$ M por 48 h. Os valores correspondem à média  $\pm$  erro padrão de experimentos realizados com cinco replicatas. **GSNO**, S-nitrosoglutationa; **L-arg**, L-arginina. Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre tratamentos do mesmo cultivar. Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os cultivares.

#### 4.5. Quantificação de hidroperóxidos de lipídios (LOOHs) e proteínas oxidadas

Níveis similares de LOOH ( $450 \text{ nmol g}^{-1}$  massa seca) foram encontrados em raízes dos dois cultivares sob os tratamentos-controle ( $\text{H}_2\text{O}/\text{Ca}^{2+}$ ; Figura 16A). O tratamento de raízes com  $\text{Al}^{3+}$  provocou redução significativa nos níveis de LOOH em 13,3% no cultivar sensível e 35,6% no cultivar tolerante ao Al, em relação aos tratamentos-controle. Comparados aos tratamentos com  $\text{Al}^{3+}$ , os níveis de LOOH foram 33% e 41% menores em raízes dos cultivares sensível e tolerante, respectivamente, quando submetidas aos tratamentos GSNO/ $\text{Al}^{3+}$ . Os menores níveis de LOOH em raízes do cultivar sensível ao Al (cerca de  $200 \text{ nmol g}^{-1}$  massa seca) foram alcançados quando os órgãos foram submetidos aos tratamentos  $\text{NO}_3^-/\text{Al}^{3+}$  e L-arg/ $\text{Al}^{3+}$  (Figura 16A). L-arg, mas não  $\text{NO}_3^-$ , também estimulou diminuição mais expressiva dos níveis de LOOH em raízes do tolerante tratadas com  $\text{Al}^{3+}$ , em comparação aos tratamentos  $\text{H}_2\text{O}/\text{Al}^{3+}$ . Em geral, o pré-tratamento com  $\text{NO}_3^-$  não se mostrou eficiente na diminuição dos níveis de LOOH em raízes do cultivar tolerante ao Al, sendo, contudo, tão eficiente quanto L-arg e mais eficiente que o GSNO com respeito ao cultivar sensível.

A Figura 16B apresenta os resultados de quantificação de proteínas oxidadas. Os níveis basais de proteínas oxidadas em raízes do cultivar tolerante foram 57% maiores do que aqueles encontrados em raízes de plântulas sensíveis ao Al (tratamentos  $\text{H}_2\text{O}/\text{Ca}^{2+}$ ). A imposição do estresse por Al não causou quaisquer alterações significativas nos níveis de proteínas oxidadas, independentemente do cultivar estudado. Apesar de os tratamentos com GSNO/ $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{NO}_3^-/\text{Ca}^{2+}$  ou L-arg/ $\text{Ca}^{2+}$  causarem aumento nos níveis de proteínas oxidadas em raízes do cultivar tolerante, o uso de liberador de NO ou substratos de sua síntese, associado ao estresse por Al, não afetou o processo de oxidação de proteínas.

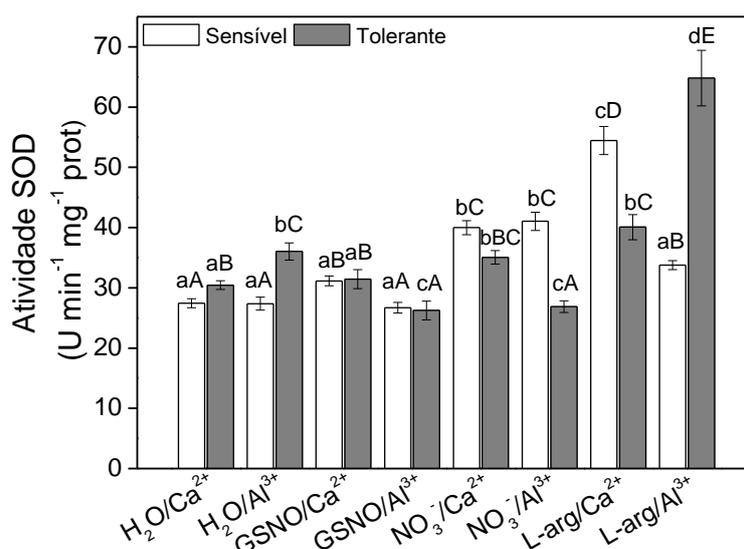


**Figura 16.** Efeito do NO nos níveis de hidroperóxidos de lipídios (A) e proteínas oxidadas (B) em raízes de *Triticum aestivum*. As raízes foram tratadas por 24 h com as soluções descritas antes da barra seguido dos tratamentos com CaCl<sub>2</sub> 200 µM ou Al<sup>3+</sup> 75 µM em CaCl<sub>2</sub> 200 µM por 48 h. Os valores correspondem à média ± erro padrão de experimentos realizados com, no mínimo cinco replicatas. **GSNO**, S-nitrosoglutaciona; **L-arg**, L-arginina; **LOOH**, hidroperóxidos de lipídios; **MS**, massa seca. Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre tratamentos do mesmo cultivar, enquanto letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre tratamentos dos dois cultivares.

#### 4.6. Determinação da atividade de enzimas do sistema antioxidante

A Figura 17 apresenta os resultados de quantificação da atividade SOD em raízes de cultivares de *T. aestivum* com tolerância diferencial ao Al<sup>3+</sup>. Em condições fisiológicas, raízes de plântulas tolerantes ao Al exibiram atividade SOD 10% maior que aquela detectada em plântulas sensíveis sob as mesmas condições

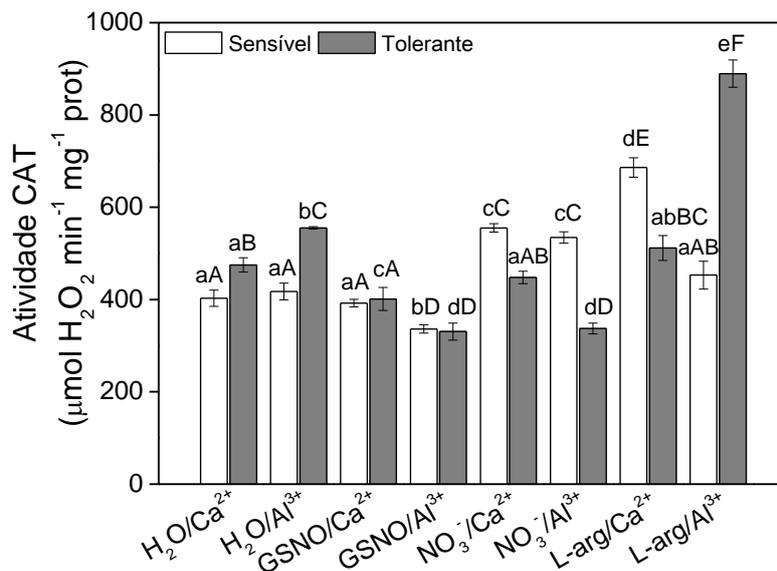
experimentais. A atividade SOD em raízes do cultivar tolerante foi estimulada em 22% por  $\text{Al}^{3+}$  quando comparada ao tratamento-controle. A atividade SOD não foi afetada pelo tratamento com  $\text{Al}^{3+}$  em raízes de plântulas sensíveis, mesmo em situações em que as plântulas foram pré-tratadas com GSNO ou L-arg. O  $\text{NO}_3^-$  estimulou em 52% a atividade SOD no cultivar sensível, em resposta ao  $\text{Al}^{3+}$  e inibiu a atividade desta enzima em 29% no cultivar tolerante sob as mesmas circunstâncias. GSNO inibiu a atividade SOD em 29% no cultivar tolerante sob estresse por Al enquanto L-arg estimulou a atividade em 79%.



**Figura 17.** Efeito do NO na atividade superóxido dismutase (SOD) em raízes de *Triticum aestivum*. As raízes foram tratadas por 24 h com as soluções descritas antes da barra seguido dos tratamentos com  $\text{CaCl}_2$  200  $\mu\text{M}$  ou  $\text{Al}^{3+}$  75  $\mu\text{M}$  em  $\text{CaCl}_2$  200  $\mu\text{M}$  por 48 h. Os valores correspondem à média  $\pm$  erro padrão de experimentos realizados com quatro replicatas. **GSNO**, S-nitrosoglutationa; **L-arg**, L-arginina. Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre tratamentos do mesmo cultivar enquanto letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre tratamentos dos dois cultivares.

A avaliação da atividade CAT se deu pela determinação do consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em meio de reação contendo o extrato vegetal. Em condições fisiológicas, raízes de plântulas tolerantes ao Al exibiram atividade CAT 13% maior que aquela detectada em plântulas sensíveis sob as mesmas condições experimentais. Similarmente ao observado para a atividade SOD, a atividade CAT em raízes do tolerante aumentou 18% seguindo o estresse por Al e permaneceu inalterada nas raízes do sensível sob as mesmas condições experimentais (Figura 18). GSNO diminuiu em 21%,  $\text{NO}_3^-$  aumentou em 29% e L-arg não alterou a atividade CAT em raízes do cultivar sensível em resposta ao Al. GSNO e  $\text{NO}_3^-$  diminuíram em 21% a atividade CAT no

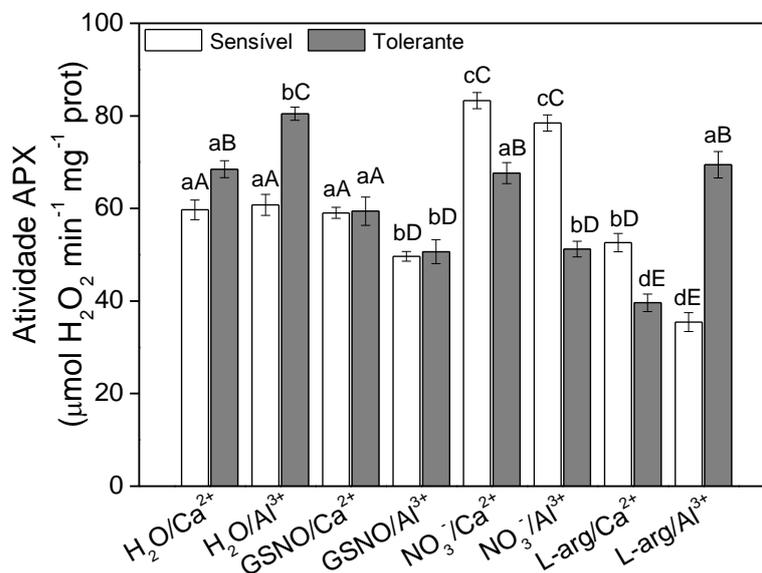
cultivar tolerante, enquanto que L-arg estimulou a atividade enzimática em 59% em raízes sob estresse por Al.



**Figura 18.** Efeito do NO na atividade catalase (CAT) em raízes de *Triticum aestivum*. As raízes foram tratadas por 24 h com as soluções descritas antes da barra seguido dos tratamentos com CaCl<sub>2</sub> 200 µM ou Al<sup>3+</sup> 75 µM em CaCl<sub>2</sub> 200 µM por 48 h. Os valores correspondem à média ± erro padrão de experimentos realizados com quatro replicatas. **GSNO**, S-nitrosoglutationa; **L-arg**, L-arginina. Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre tratamentos do mesmo cultivar enquanto letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre tratamentos dos dois cultivares.

A avaliação da atividade APX se deu pela determinação do consumo de ácido ascórbico em função de sua oxidação por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, assistida pelo extrato vegetal. Em condições fisiológicas, raízes de plântulas tolerantes ao Al exibiram atividade APX 11% maior que aquela observada em plântulas sensíveis sob as mesmas condições experimentais (Figura 19). O tratamento com Al<sup>3+</sup> afetou apenas a atividade APX das raízes de plântulas tolerantes que exibiram um aumento de 18% na capacidade de decompor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (tratamento H<sub>2</sub>O/Al<sup>3+</sup>). GSNO desencadeou, respectivamente, uma redução em 17% e 38% na atividade APX de plântulas sensíveis e tolerantes tratadas com Al<sup>3+</sup>. O pré-tratamento com L-arg também desencadeou a redução da atividade APX em raízes de ambos os cultivares, sob estresse (Figura 19). Sob tais condições, a atividade APX diminuiu em 41% nas raízes do sensível e 13% nas do tolerante, quando comparada aos resultados obtidos com os tratamentos H<sub>2</sub>O/Al<sup>3+</sup>. O pré-tratamento com NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, seguido de incubação com Al<sup>3+</sup>, resultou em respostas contrastantes: plântulas sensíveis exibiram aumento de 29% na atividade APX enquanto a atividade nas tolerantes reduziu em 36%. Experimentos-controle revelaram que o GSNO causou redução na atividade APX basal do cultivar tolerante

sem afetar o sensível enquanto que o  $\text{NO}_3^-$  reduziu a atividade no tolerante e aumentou no sensível ao Al (Figura 19; tratamentos GSNO/ $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{NO}_3^-/\text{Ca}^{2+}$ ). L-arg afetou negativamente a atividade APX basal em ambos os cultivares (Figura 19; L-arg/ $\text{Ca}^{2+}$ ).

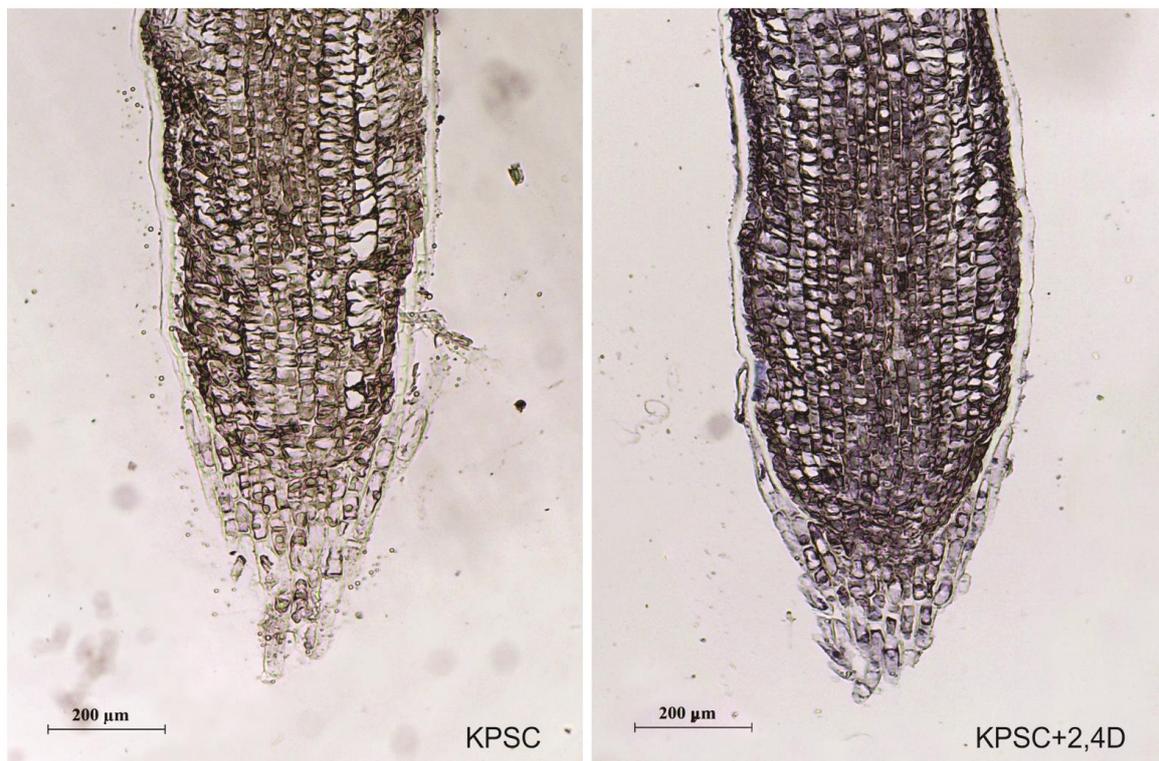


**Figura 19.** Efeito do NO na atividade ascorbato peroxidase (APX) em raízes de *Triticum aestivum*. As raízes foram tratadas por 24 h com as soluções descritas antes da barra seguido dos tratamentos com  $\text{CaCl}_2$  200  $\mu\text{M}$  ou  $\text{Al}^{3+}$  75  $\mu\text{M}$  em  $\text{CaCl}_2$  200  $\mu\text{M}$  por 48 h. Os valores correspondem à média  $\pm$  erro padrão de experimentos realizados com quatro replicatas. **GSNO**, S-nitrosoglutationa; **L-arg**, L-arginina. Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre tratamentos do mesmo cultivar enquanto letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre tratamentos dos dois cultivares.

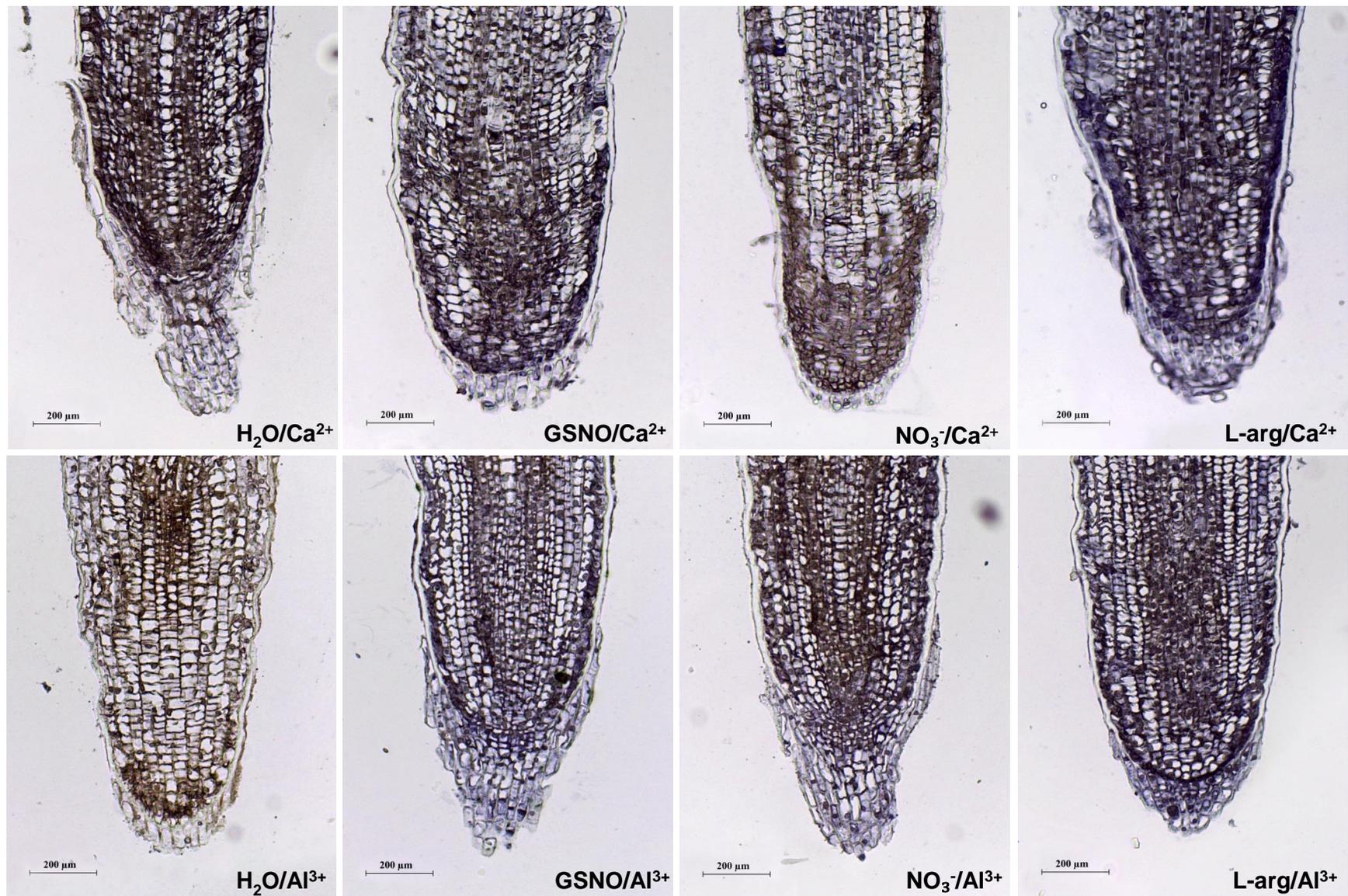
#### 4.7. Localização imunohistoquímica de ácido indol-3-acético (AIA)

Em condições fisiológicas, ambos os cultivares apresentaram AIA distribuído em células da protoderme, do procâmbio e do promeristema de ápices radiculares. A intensidade de coloração resultante da marcação de AIA foi maior no cultivar tolerante, sendo mais evidente no procâmbio e no meristema fundamental. Membranas e núcleos também apresentaram AIA (Figuras 21 e 22; tratamentos  $\text{H}_2\text{O}/\text{Ca}^{2+}$ ). Os níveis de AIA em ápices de raízes do cultivar sensível foram menores que aqueles do cultivar tolerante ao Al (Figuras 21 e 22). O tratamento com  $\text{Al}^{3+}$  afetou negativamente os níveis de AIA nas raízes dos dois cultivares, sendo a redução mais expressiva nas plântulas sensíveis ao Al. Neste cultivar, poucas células da epiderme exibiram marcação correspondente ao AIA quando tratadas com  $\text{Al}^{3+}$ . Já no cultivar tolerante, observou-se marcação para AIA no córtex e epiderme. De uma maneira geral, os pré-tratamentos estimularam o fluxo de AIA nas

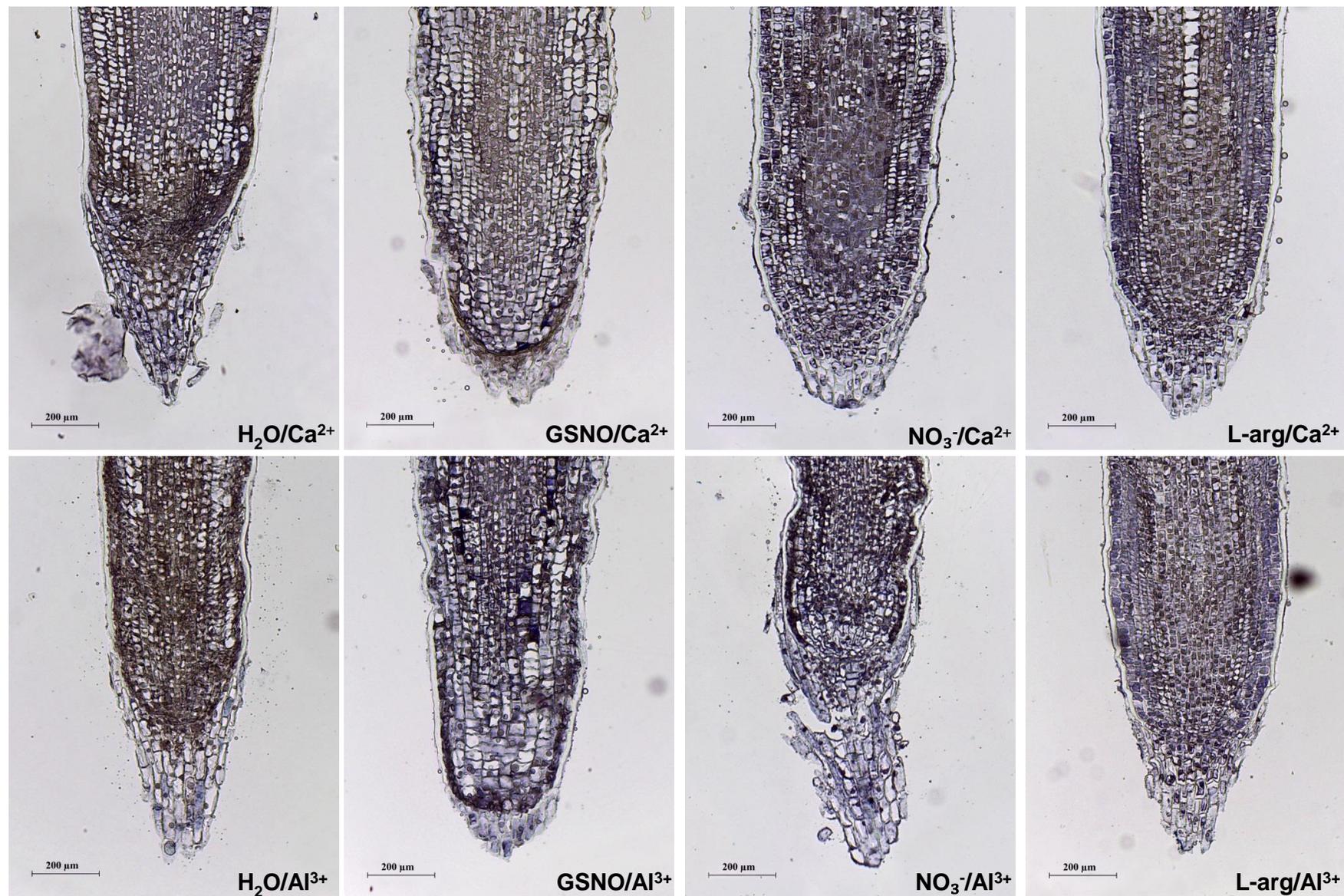
raízes sob condições fisiológicas e esse efeito persistiu mesmo após o tratamento das raízes com  $\text{Al}^{3+}$  (Figuras 21 e 22). Os efeitos do  $\text{NO}_3^-$  foram menos notórios no cultivar sensível que os observados no tolerante, sob as mesmas condições experimentais (Figuras 21 e 22). O pré-tratamento com GSNO,  $\text{NO}_3^-$  ou L-arg estimulou o fluxo de AIA nas raízes sob estresse por  $\text{Al}^{3+}$ , independentemente do cultivar. Em ambos os cultivares, os pré-tratamentos estimularam acúmulo de AIA nas células da epiderme, do promeristema, do procâmbio e do meristema fundamental. O pré-tratamento com ácido triiodobenzóico (TIBA), um inibidor de efluxo de auxina, reduziu os níveis basais de AIA em ápices radiculares de ambos os cultivares, sendo esta inibição intensificada em raízes subsequentemente expostas ao  $\text{Al}^{3+}$  (Figura 23). O GSNO, mesmo na presença de TIBA, estimulou acúmulo de AIA nos mesmos tecidos, a saber: protoderme, promeristema e procâmbio. É digno de nota que o pré-tratamento com TIBA causou um estrangulamento na zona de alongamento das raízes, independentemente do cultivar, além de comprometer a expansão foliar (dados não mostrados).



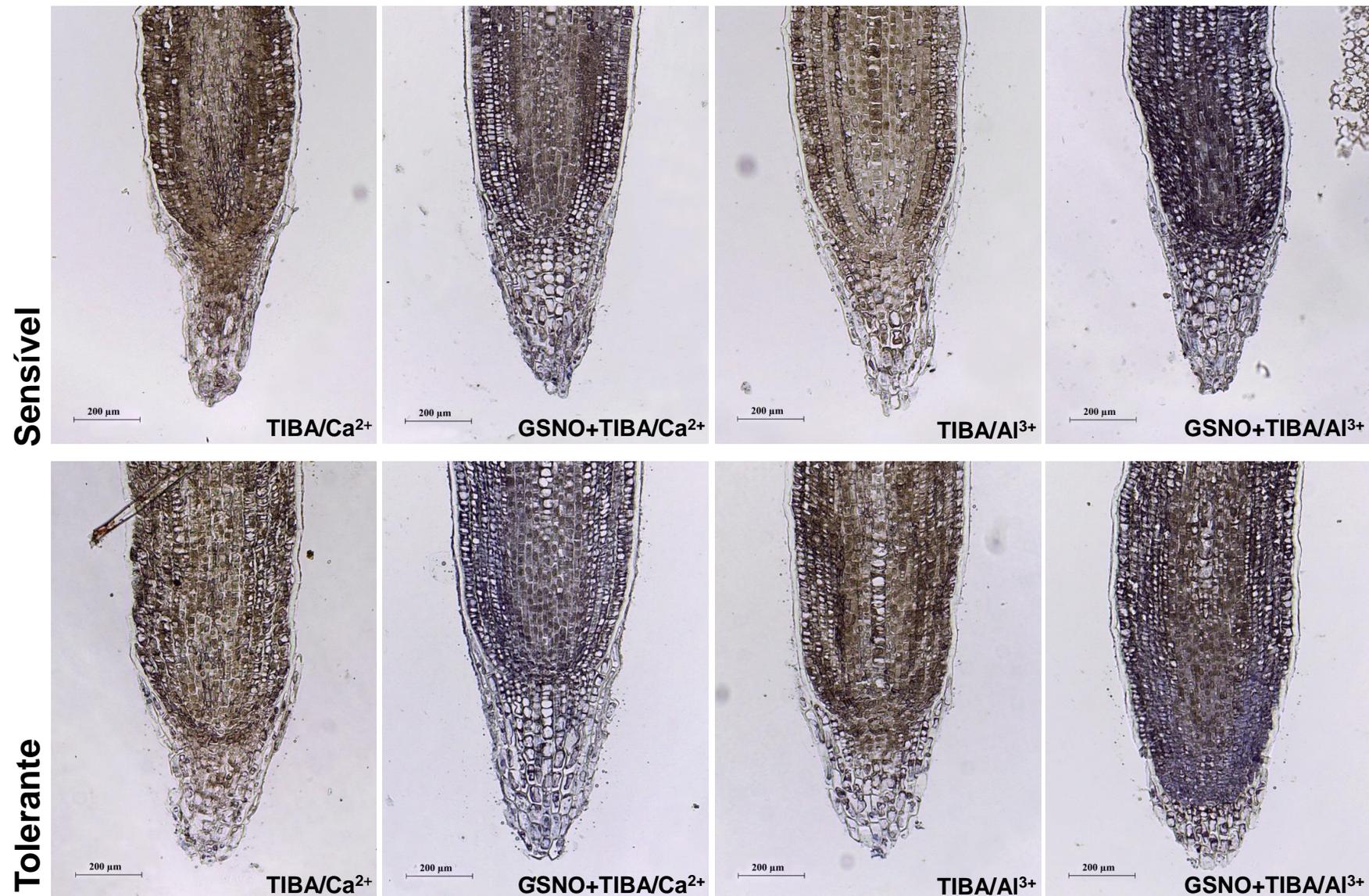
**Figura 20.** Tratamentos-controle para validação dos testes de imunolocalização de ácido indol-3-acético (AIA) em raízes e folhas de *Triticum aestivum*. **KPSC**, controle negativo; **KPSC + 2,4-D**, controle positivo. A presença de AIA foi evidenciada pela coloração azul índigo. As imagens são representativas de experimento realizado em sextuplicata.



**Figura 21.** Efeito do NO na distribuição de ácido indol-3-acético (AIA) em cortes longitudinais de ápices radiculares de *Triticum aestivum* cv. Anahuac (sensível ao Al). Os tratamentos descritos antes da barra duraram 24 h, enquanto que os depois da barra duraram 48 h. **GSNO**, S-nitrosoglutationa; **L-arg**, L-arginina. A presença de AIA foi evidenciada pela formação de coloração azul índigo. As imagens são representativas de experimento realizado em sextuplicata.



**Figura 22.** Efeito do NO na distribuição de ácido indol-3-acético (AIA) em cortes longitudinais de ápices radiculares de *Triticum aestivum* cv. BH1146 (tolerante ao Al). Os tratamentos descritos antes da barra duraram 24 h, enquanto que os depois da barra duraram 48 h. **GSNO**, S-nitrosoglutationa; **L-arg**, L-arginina. A presença de AIA foi evidenciada pela formação de coloração azul índigo. As imagens são representativas de experimento realizado em sextuplicata.



**Figura 23.** Efeito do pré-tratamento de *Triticum aestivum* com GSNO e TIBA na distribuição de ácido indol-3-acético (AIA) em raízes. Os tratamentos descritos antes da barra duraram 24 h enquanto que os depois da barra duraram 48 h. Imagens superiores referem-se ao cultivar sensível ao Al (Anahuac) enquanto que as imagens inferiores referem-se ao tolerante ao Al (BH1146). **GSNO**, S-nitrosoglutationa; **TIBA**, ácido triiodobenzóico. A presença de AIA foi evidenciada pela coloração azul índigo. As imagens são representativas de experimento realizado em sextuplicata.

## 5. Discussão

Interessantemente, o pré-tratamento com GSNO,  $\text{NO}_3^-$  ou L-arg por 24 h reduziu drasticamente o acúmulo de  $\text{Al}^{3+}$  nas raízes de ambos os cultivares. Esses resultados corroboram os obtidos por Wang e Yang (2005) em que o acúmulo de  $\text{Al}^{3+}$  em ápices radiculares de *C. tora* foi inibido pelo pré-tratamento com SNP, um liberador de NO. A presença de  $\text{Al}^{3+}$  foi verificada no simplasto, núcleos e membranas celulares de ápices radiculares dos dois cultivares. Resultado semelhante já foi observado por Silva *et al.* (2000). É esperado que o cátion  $\text{Al}^{3+}$  se associe a ânions pela atração eletrostática. Cargas negativas são encontradas nos grupos fosfatos de DNA, RNA e moléculas de ATP presentes nas células, mais especificamente no núcleo. A capacidade de morina em formar complexo com  $\text{Al}^{3+}$  ligado a DNA e ATP é bem documentada (Eticha *et al.*, 2005). Portanto, a marcação fluorescente encontrada nos núcleos de células de *T. aestivum* tratadas com morina pode indicar associações entre o  $\text{Al}^{3+}$  e ácidos nucleicos e/ou ATP. Os resultados aqui apresentados também sugerem que a marcação com morina próxima ao apoplasto se refere à interação do  $\text{Al}^{3+}$  com os grupos fosfatos de lipídios de membrana, visto que este flavonoide não se liga ao  $\text{Al}^{3+}$  associado às pectinas da parede celular (Eticha *et al.*, 2005). De fato, Delhaize e Ryan (1995) e Jones e Kochian (1997) mostraram que a membrana plasmática funciona como barreira à penetração de  $\text{Al}^{3+}$ , assim como de outros íons polivalentes insolúveis na bicamada lipídica. Contudo, o  $\text{Al}^{3+}$  pode atravessar membranas via transportadores de membrana específicos para este cátion (Xia *et al.*, 2010), justificando assim a detecção de  $\text{Al}^{3+}$  no citoplasma.

O estresse por  $\text{Al}^{3+}$  causou aumento na fluorescência indicativa da presença de NO nos tecidos da raiz de ambos os cultivares. Xue *et al.* (2008) e Marciano *et al.* (2010) também relataram resultados similares em estudos conduzidos com *C. tora* e *O. sativa*, respectivamente. Como esperado, os níveis de NO encontrados em raízes submetidas ao pré-tratamento com um doador ou com precursores de síntese de NO foram muito maiores que aqueles do controle (pré-tratamentos com  $\text{H}_2\text{O}$ ).

Notavelmente, a localização *in situ* de NO em cortes de raízes mostrou que o cultivar tolerante (BH1146) naturalmente produz maior quantidade dessa RNS, amplamente reconhecida como uma molécula sinalizadora em células vegetais (Lamattina *et al.*, 2003; Arasimowicz, 2007). A localização celular de NO em raízes

sob estresse por  $\text{Al}^{3+}$  também foi alterada quando comparada aos tratamentos-controle, como observado por Illés *et al.* (2006). Na ausência do estresse, a fluorescência que indica presença de NO encontrou-se principalmente no cilindro vascular, mas quando ocorreu o estresse, o NO passou a ser encontrado, principalmente, na endoderme, na epiderme e no córtex. Esse conjunto de resultados indica que o NO foi mobilizado para a região mais afetada pelo estresse, o ápice radicular, podendo atuar como sinalizador de processos que culminam no alívio da toxicidade por Al. Também foi observado que o  $\text{Al}^{3+}$  dificilmente está presente no sistema vascular do cultivar tolerante. Isso pode explicar, em parte, a tolerância do cultivar BH1146 ao  $\text{Al}^{3+}$  visto que grande quantidade de NO foi produzida e/ou deslocada para células da epiderme, córtex e endoderme, constituindo uma barreira juntamente com essas barreiras físicas. Esse evento dificultaria a translocação de Al para a parte aérea. Isso indica que o NO está envolvido na resposta ao Al contribuindo para a maior eficiência do cultivar tolerante na ativação de mecanismos celulares de exclusão de  $\text{Al}^{3+}$ .

O pré-tratamento com GSNO ou  $\text{NO}_3^-$  diminuiu os níveis de  $^{\bullet}\text{O}_2^-$  em ápices radiculares de ambos os cultivares sob estresse por Al. De fato, o efeito do NO na atenuação do estresse oxidativo foi demonstrado em *C. tora* exposta ao  $\text{Al}^{3+}$  (Wang e Yang, 2005). O pré-tratamento de plântulas com  $\text{NO}_3^-$ , em condições fisiológicas, causou aumento significativo nos níveis de  $^{\bullet}\text{O}_2^-$  em ambos os cultivares. Isso pode ser explicado pelo aumento do metabolismo de nitrogênio a partir do  $\text{NO}_3^-$  e, conseqüente, aumento da respiração celular, com maior produção de  $^{\bullet}\text{O}_2^-$ . O cultivar tolerante apresentou níveis endógenos de  $^{\bullet}\text{O}_2^-$  superiores ao do cultivar sensível ao Al. Além disso, os níveis de proteínas oxidadas no cultivar tolerante foram o dobro do encontrado em raízes de plântulas sensíveis. Parece que o cultivar tolerante ao Al produz, constitutivamente, uma quantidade maior de ROS e RNS, o que causa naturalmente uma maior oxidação de proteínas. Apesar disso, não foi encontrada grande quantidade de células mortas em tecidos de raízes do cultivar tolerante, ao contrário do que foi encontrado em tecidos de raízes do cultivar sensível. Pode-se concluir que os níveis mais elevados de proteínas oxidadas em plântulas tolerantes, em relação ao cultivar sensível, não afetam o funcionamento celular suficientemente para causar sua morte.

As raízes do cultivar sensível apresentaram maior número de células mortas após o estresse por  $\text{Al}^{3+}$ , processo este atenuado pelos pré-tratamentos com GSNO,

$\text{NO}_3^-$  ou L-arg. Interessantemente, o cultivar tolerante não apresentou células mortas quando sob estresse. O efeito intensificador do  $\text{Al}^{3+}$  na morte de células de raízes de *H. vulgare* foi documentado por Pan *et al.* (2001). No cultivar sensível, observou-se que os pré-tratamentos com GSNO,  $\text{NO}_3^-$  ou L-arg resultou no aumento de células mortas em raízes sob condições fisiológicas. Acredita-se que o aumento da morte celular no cultivar sensível seja em razão de o excesso de NO no sistema contribuir para a formação de macromoléculas oxidadas e outras espécies ainda mais oxidantes ( $\text{ONOO}^-$ ,  $\text{NO}_2$  etc) (Stamler *et al.*, 1992). Realmente, a atividade basal das enzimas do sistema antioxidante em células de raízes do cultivar sensível ao Al é menor que as de células do tolerante. O aumento, nas células, de macromoléculas oxidadas e oxidantes mais fortes, pode levar à perda da fluidez e integridade da membrana plasmática, que, em última instância, pode causar morte celular. Contudo, os pré-tratamentos com GSNO,  $\text{NO}_3^-$  ou L-arg amenizaram o efeito indutor de morte celular provocado por Al em células de raízes de plântulas sensíveis.

Raízes de plântulas sensíveis e tolerantes ao Al apresentam níveis basais similares de LOOH. O tratamento de raízes de ambos os cultivares com  $\text{Al}^{3+}$  levou a uma diminuição significativa dos níveis celulares de LOOH, sendo este efeito muito mais intenso no cultivar tolerante. Vários trabalhos relatam que o conteúdo de LOOH em células de diferentes espécies vegetais aumenta em decorrência do tratamento com  $\text{Al}^{3+}$ , como um resultado do aumento de ROS (Cakmak e Horst, 1991; Hamel *et al.*, 1998; Richards *et al.* 1998; Yamamoto *et al.*, 2001). Portanto, os resultados aqui relatados, no que tange o acúmulo de LOOH em resposta ao  $\text{Al}^{3+}$ , contrastam a maioria dos já descritos na literatura.

O conteúdo de LOOH em raízes de *Z. mays* não foi afetado pelo tratamento com  $\text{Al}^{3+}$  (Boscolo *et al.*, 2003). Estudos realizados com cultura de células de *C. sinensis* demonstraram a ocorrência de diminuição da peroxidação lipídica após estresse por  $\text{Al}^{3+}$  (Ghanati *et al.*, 2005). Esse resultado pode ser explicado pelo aumento da atividade das enzimas SOD, CAT e APX nas células de *C. sinensis* sob estresse. Os dados das Figuras 15A-18 indicam que células de raízes de *T. aestivum* tolerante ao  $\text{Al}^{3+}$  potencialmente apresentam mecanismos de resposta a este cátion que são similares aos exibidos por células de *C. sinensis*. Neste contexto, é razoável assumir que lipídios (particularmente os fosfolipídios de membrana) de *T. aestivum* não são os alvos primários dos efeitos do Al assim como acontece em certo cultivar de milho e células de *C. sinensis* (Boscolo *et al.*, 2003;

Ghanati *et al.*, 2005). Diminuição, ainda mais acentuada, na quantidade de LOOH foi observada no cultivar tolerante quando pré-tratado com GSNO, no cultivar sensível sob pré-tratamento com  $\text{NO}_3^-$  e em ambos os cultivares pré-tratados com L-arginina, seguido de estresse por  $\text{Al}^{3+}$ . Isso pode ser explicado pela interação do NO com radicais peroxil ( $\text{LOO}^\bullet$ ) e alcóxil ( $\text{LO}^\bullet$ ), interrompendo a perpetuação da cadeia de reação durante a peroxidação lipídica (Beligni e Lamattina, 2002). Outra possibilidade é o desencadeamento, por GSNO, de nitrosilação da enzima MDHAR, do sistema antioxidante, levando ao aumento de sua atividade. Esse fenômeno foi reportado em *A. thaliana* tratada com GSNO e desafiada com *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Romero-Puertas *et al.*, 2008). Não se pode descartar, contudo, a ocorrência de um aumento nos níveis de antioxidantes não enzimáticos (ascorbato, tocoferol, carotenóides, flavonóides e glutatona) durante a resposta de raízes de plântulas tolerantes de *T. aestivum* ao Al (Hossain *et al.*, 2005).

Em geral, os níveis de proteínas oxidadas não variaram nos dois cultivares após o estresse por Al. Além disso, a quantidade de proteínas oxidadas não foi muito alta, o que demonstra que as proteínas não são o alvo primário das ROS.

Clark *et al.* (2000) demonstraram que o NO inibe as atividades de APX e CAT purificadas de *N. tabacum*. Resultados semelhantes foram encontrados para a atividade APX em *T. aestivum*. Independentemente do cultivar, o pré-tratamento de raízes com GSNO ou  $\text{NO}_3^-$  causou diminuição significativa na atividade APX em resposta ao  $\text{Al}^{3+}$ . L-arg, contudo, estimulou a atividade APX em raízes sob tratamento com  $\text{Al}^{3+}$ . Comportamento similar a este foi observado para as atividades SOD e CAT em raízes de ambos os cultivares sob pré-tratamento com GSNO ou  $\text{NO}_3^-$  seguido de estresse por  $\text{Al}^{3+}$ . Novamente, L-arg desencadeou respostas contrastantes nos cultivares sob tratamento com  $\text{Al}^{3+}$ : aumento da atividade SOD no tolerante sem afetar a atividade no sensível. Tais variações nas respostas das raízes ao  $\text{Al}^{3+}$ , mediante pré-tratamento com  $\text{NO}_3^-$  e L-arg podem ser devido à possíveis diferenças, entre os cultivares, no metabolismo desses dois precursores de síntese de NO. Estudos comparando, por exemplo, a atividade nitrato redutase, nitrito redutase, arginina descarboxilase e arginase entre os cultivares, sob estresse por  $\text{Al}^{3+}$ , certamente contribuirão para a confirmação ou refutação desta hipótese. A formação de ROS em excesso, como a de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $^\bullet\text{O}_2^-$ , é uma das primeiras respostas à exposição ao  $\text{Al}^{3+}$  (Yamamoto *et al.*, 2002; Devi *et al.*, 2003). O  $^\bullet\text{O}_2^-$  é formado na célula em condições de elevada oferta de oxigênio. Este ânion pode

reagir com NO para formar peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) e/ou contribuir para a produção de radical hidroxil (<sup>•</sup>OH), sendo este último processo dependente de quelatos de Fe (III). O ONOO<sup>-</sup> e o <sup>•</sup>OH são oxidantes mais fortes que o <sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup>. A reação do <sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup> com <sup>•</sup>OH leva à produção de oxigênio singleto (<sup>1</sup>O<sub>2</sub><sup>\*</sup>), que é a espécie de oxigênio mais deletéria aos organismos vivos (Barreiros *et al.*, 2006). Portanto, é natural que ocorra o aumento da síntese e/ou atividade de enzimas do sistema antioxidante, como SOD, CAT e APX, em caso de estresse, assim como foi encontrado por Ghanati *et al.* (2005) em *C. sinensis*, e Aftab *et al.* (2010) em *Artemisia annua* L. Entretanto, nos experimentos apresentados neste trabalho, o estresse por Al<sup>3+</sup> não causou nenhum efeito na atividade da SOD, APX ou CAT no cultivar sensível, mas provocou um aumento da atividade dessas enzimas no cultivar tolerante ao Al. Isso demonstra que, mecanismos de contenção do excesso de ROS produzido via síntese *de novo* e/ou ativação das enzimas do sistema antioxidante são eficientemente ativados em resposta ao Al<sup>3+</sup>.

Como esperado, foi encontrada baixa quantidade de lignina na parede celular de raízes de *T. aestivum* com 7 dias de idade. Neste estágio de desenvolvimento, o produto da fotossíntese é investido para a formação de moléculas estruturais, outras que lignina, e metabólitos primários para o crescimento do indivíduo. A lignina, um polímero fenólico de alta complexidade estrutural, é normalmente produzida em estágios finais de desenvolvimento, pois a deposição das camadas de lignina compromete a expansão e divisão celular (Fukushima e Kerley, 2011). O estresse por Al<sup>3+</sup> não afetou significativamente o acúmulo de lignina em células de raízes de ambos os cultivares. O tratamento com GSNO, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e L-arg anteriormente à imposição do estresse causou diminuição nos níveis de lignina de raízes do tolerante ao Al, mas sem afetar os do cultivar sensível, à exceção do pré-tratamento com GSNO. Novamente, diferenças no metabolismo de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e L-arg entre os cultivares podem explicar esses resultados, ainda porque o fornecimento direto de NO (como GSNO) provocou, nos dois cultivares, respostas similares de deposição de lignina. Existem relatos na literatura que mostram o aumento da deposição de lignina nas paredes celulares, como resultado da maior produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e atividade de peroxidases, provocado pelo estresse por Al<sup>3+</sup> em *A. thaliana*, *T. aestivum* e *Sorghum bicolor* L. (Ezaki *et al.*, 2005; Hossain *et al.*, 2005; Peixoto *et al.*, 2007). Ressalta-se que a idade das plantas utilizadas nos estudos de Ezaki *et al.* (2005) e Peixoto *et al.* (2007) foi de 10 e 17 dias, respectivamente, e que os

sistemas vegetais utilizados foram distintos daquele aqui estudado. No caso do trabalho de Hossain *et al.* (2005), além da idade fisiológica das plântulas de *T. aestivum* ser diferente, o cultivar utilizado pelos autores foi o Kalyansona, originário de Bangladesh. Portanto, não se pode descartar a existência de variação genética entre estes cultivares de *T. aestivum*.

Sob condições fisiológicas, ápices radiculares dos dois cultivares de *T. aestivum* apresentaram imunomarcação para AIA nas células da protoderme, do procâmbio e do promeristema. O AIA também foi localizado nas membranas celulares e núcleos. O estresse por alumínio diminuiu tal marcação mais proeminentemente nos ápices radiculares de plântulas sensíveis ao Al, sendo registrada a presença de AIA em células do procâmbio e meristema fundamental. Notavelmente, os pré-tratamentos com liberador de NO ou substratos de sua síntese reverteram o efeito inibitório do Al no fluxo de AIA nos ápices radiculares dos dois cultivares. O fato de o efeito do  $\text{NO}_3^-$  no fluxo de AIA em raízes do cultivar sensível expostas ao  $\text{Al}^{3+}$  ter sido menos expressivo que no cultivar tolerante, sugere que a taxa de metabolização desta espécie nitrogenada é diferente entre os cultivares estudados. A presença de AIA nas membranas e/ou núcleos de células de plantas sob condições fisiológicas é bem documentada (Swarup *et al.*, 2001; Schlicht *et al.*, 2006). Ainda, a localização deste hormônio, principalmente nas células do procâmbio e meristema fundamental, coincide com a localização de proteínas de influxo de auxina (AUX1) em células de ápices radiculares de *A. thaliana* (Swarup *et al.*, 2001). Tal observação indica que os transportes acrópeto e basípeto, típicos nos ápices radiculares, estão ocorrendo normalmente. O efeito negativo do  $\text{Al}^{3+}$  no fluxo de AIA em ápices radiculares é bem conhecido (Kollmeier *et al.*, 2000). Esse comportamento é explicado pelo comprometimento, por  $\text{Al}^{3+}$ , do funcionamento das bombas de  $\text{H}^+$ -ATPase e, conseqüentemente do potencial elétrico da membrana. Esse fenômeno compromete a função dos transportadores AUX e PIN que são responsáveis, respectivamente, pelo influxo e efluxo de AIA nas células. Os pré-tratamentos com GSNO,  $\text{NO}_3^-$  ou L-arginina garantiram o fluxo normal de AIA em raízes de *T. aestivum* (ambos os cultivares), mesmo sob estresse por  $\text{Al}^{3+}$ . Observou-se também que o estímulo do fluxo de AIA por NO reverteu o bloqueio de distribuição desse hormônio causado por TIBA. De fato, é sabido que o NO estimula o fluxo de AIA em ápices radiculares (Pii *et al.*, 2007; Terrile *et al.*, 2011). Neste contexto, os menores níveis basais de NO encontrados em raízes de plântulas

sensíveis, em comparação às tolerantes ao Al, certamente contribuem para a sensibilidade de *T. aestivum* ao metal em questão. Ahad e Nick (2007) mostraram que mutantes de tabaco (*AlRes*) tolerantes ao Al apresentavam um aumento significativo na produção de actina e empacotamento de seus microfilamentos. Kasprovicz *et al.* (2009) observaram que o tratamento com diferentes doadores de NO afetou reversivelmente a organização dos filamentos de actina nas células da endoderme e da zona de transição de ápices radiculares de *Z. mays*, levando à sua reorientação e despolimerização. Foi demonstrado que proteínas do citoesqueleto, como actina e tubulina, são passíveis de serem nitrosiladas (Yemets *et al.*, 2011). Esses resultados suportam a ideia de que a dinâmica da F-actina, influenciada por NO, afeta processos de endocitose e movimentação de vesículas. Schlicht *et al.* (2006) propuseram que endossomos e a reciclagem de vesículas seriam parte essencial do transporte polar de auxina, pois a exportação deste hormônio teria natureza secretória parecida com a de um neurotransmissor. Assim o  $Al^{3+}$ , provavelmente, inibe o fluxo de AIA por meio do distúrbio da homeostase da membrana plasmática e da modificação do arranjo dos microfilamentos de actina e outros componentes do citoesqueleto. Dessa forma, a movimentação dos endossomos contendo transportadores de AIA é então impedida. O NO contudo, reverteria o efeito do  $Al^{3+}$  sobre fluxo de AIA ao restaurar a movimentação de vesículas e a atividade normal do citoesqueleto, principalmente nas células da zona de alongamento radicular.

## 6. Conclusão

Evidências na literatura sugerem que o NO contribui para a resposta de plantas ao estresse por  $Al^{3+}$  e que este cátion afeta negativamente o fluxo de AIA em raízes. Os resultados aqui apresentados não somente confirmam essa observação como também demonstram que  $NO_3^-$  e L-arg, reconhecidos substratos para a síntese de NO em células vegetais, em conjunto com GSNO, um liberador de NO, revertem os efeitos do  $Al^{3+}$  no estresse oxidativo e no fluxo de AIA em raízes de *T. aestivum* com tolerância diferencial ao Al. Adicionalmente aos estudos farmacológicos descritos nesta dissertação, foi possível mostrar que os níveis basais de NO em raízes de plântulas sensíveis (Anahuac) ao Al são mais baixos que aqueles encontrados no cultivar tolerante (BH1146) e que, o aumento de NO após estresse por Al é mais evidente no cultivar BH1146. Este estudo contribuiu para

expandir o conhecimento das vias de sinalização por NO, ativadas mais eficientemente em um cultivar de *T. aestivum* tolerante, em resposta ao estresse por Al<sup>3+</sup>. Em geral, o NO produzido por raízes do cultivar tolerante, mediante estresse por Al<sup>3+</sup>, impediu a translocação deste cátion para as células do cilindro vascular, estimulou a atividade das enzimas SOD, CAT e APX, diminuiu a ocorrência de peroxidação lipídica e restaurou o fluxo de AIA.

## 7. Referências Bibliográficas

- Achary, V.M.M., Jena, S., Panda, K.K., Panda, B.B. (2008) Aluminium induced oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70: 300-310.
- Achary, V.M.M., Patnaik, A.R., Panda, B.B. (2012) Oxidative biomarkers in leaf tissue of barley seedlings in response to aluminum stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 75(1): 16-26.
- Aftab, T., Khan, M.M.A., Idrees, M., Moinuddin, M.N. (2010) Effects of aluminium exposures on growth, photosynthetic efficiency, lipid peroxidation, antioxidant enzymes and artemisinin content of *Artemisia annua* L. *Journal of Phytology*, 2(8): 23-37.
- Ahad, A., Nick, P. (2007) Actin is bundled in activation-tagged tobacco mutants that tolerate aluminum. *Planta*, 225: 451-468.
- Ahn, S.J., Rengel, Z., Matsumoto, H. (2004) Aluminum-induced plasma membrane surface potential and H<sup>+</sup>-ATPase activity in near-isogenic wheat lines differing in tolerance to aluminum. *New Phytologist*, 162: 71-79.
- Alscher, R.G., Erturk, N., Heath, L.S. (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53(372): 1331-1341.
- Alvim, M.N., Ramos, F.T., Oliveira, D.C., Isaias, R.M.S., França, M.G.C. (2012) Aluminium localization and toxicity symptoms related to root growth inhibition in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Journal of Biosciences*, 37(6): 1-10.
- Arasimowicz, M., Floryszak-Wieczorek, J. (2007) Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. *Plant Science*, 172: 876-887.
- Barreiros, A.L.B.S., David, J.M. (2006) Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, 29: 113-123.

- Beligni, M.V., Lamattina, L. (2002) Nitric oxide interferes with plant photo-oxidative stress by detoxifying reactive oxygen species. *Plant, Cell and Environment*, 25: 737-748.
- Bennet, R.J., Breen, C.M. (1991) The aluminium signal: New dimensions to mechanisms of aluminium tolerance. *Plant and Soil*, 134: 153-166.
- Bennett, M.J., Marchant, A., Green, H.G., May, S.T., Ward, S.P., Millner, P.A., Walker, A.R., Schultz, B., and Feldmann, K.A. (1996) *Arabidopsis* AUX1 gene: A permease-like regulator of root gravitropism. *Science*, 273: 948-950.
- Boscolo, P.R.S., Menossi, M., Jorge, R.A. (2003) Aluminum-induced oxidative stress in maize. *Phytochemistry*, 62: 181-189.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Browne, B.A., McColl, J.G., Driscoll, C.T. (1990) Aluminum speciation using morin: I. Morin and its complexes with aluminum. *Journal Environmental Quality*, 19: 65-72.
- Cakmak, I., Horst, J.H. (1991) Effects of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum*, 83: 463-468.
- Camargo, C.E. de O., Felício, J.C., Rocha Júnior, L.S. (1987) Trigo: tolerância ao alumínio em solução nutritiva. *Bragantia*, 46(2): 183-190.
- Camargo, C.E. de O., Santos, R.R., Pettinelli-Júnior, A. (1992) Trigo duro: tolerância à toxicidade do alumínio em soluções nutritivas e no solo. *Bragantia*, 51: 69-76.
- Choi, H.S., Kim, J.W., Cha, Y.-N., Kim C. (2006) A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 27: 31-44.
- Čiamporová, M. (2002) Morphological and structural responses of plant roots to aluminium at organ, tissue, and cellular levels. *Biologia Plantarum*, 45: 161-171.
- Clark, D., Durner, J., Navarre, D.A., Klessig, D.F. (2000) Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(12): 1380-1384.
- Corpas, F.J., Barroso, J.B., Carreras, A., Quirós, M., León, A.M., Romero-Puertas, M.C., Esteban, F.J., Valderrama, R., Palma, J.M., Sandalio, L.M., Gómez, M., del Río, L.A. (2004) Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. *Plant Physiology*, 136: 2722-2733.

- Corpas, F.J., Barroso, J.B., Carreras, A., Valderrama, R., Palma, J.M., León, A.M., Sandalio, L.M., del Río, L.A. (2006) Constitutive arginine-dependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development. *Planta*, 224: 246-254.
- Correa-Aragunde, N., Graziano, M., Lamattina, L. (2004) Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta*, 218: 900-905.
- Delhaize, E., Ryan, P.R. (1995) Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiology*, 107: 315-321.
- Delledonne, M., Xia, Y.J., Dixon, R.A., Lamb, C. (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, 394: 585-588.
- DeLong, J.M., Prange, R.K., Hodges, D.M., Forney, C.F., Bishop, M.C., Quillian, M. (2002) Using a modified ferrous oxidation-xilenol orange (FOX) assay for detection of lipid hydroperoxides in plant tissue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 248-254.
- Devi, S.R., Yamamoto, Y., Matsumoto, H. (2003) An intracellular mechanism of aluminum associated with high antioxidant status in cultured tobacco cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 97: 59-68.
- Echart, C.L., Cavalli-Molina, S. (2001) Fitotoxicidade do alumínio: efeitos, mecanismo de tolerância e seu controle genético. *Revista Ciência Rural*, 31(3): 531-541.
- Eggert, D.A. (1970) The use of morin for fluorescent localization of aluminum in plant tissues. *Stain Technology*, 45: 301-303.
- Eticha, D., Staß, A., Horst, W.J. (2005) Localization of aluminium in the maize root apex: can morin detect cell wall-bound aluminium? *Journal of Experimental Botany*, 56(415): 1351-1357.
- Ezaki, B., Sasaki, K., Matsumoto, H., Nakashima, S. (2005) Functions of two genes in aluminium (Al) stress resistance: repression of oxidative damage by the *AtBCB* gene and promotion of efflux of Al ions by the *NtGDI1* gene. *Journal of Experimental Botany*, 56: 2661-2671.
- Faria, A.P. (2010) Avaliação *ex vivo* da tolerância de Cultivares de mamoneira (*Ricinus communis* L.) Ao déficit hídrico. Dissertação de metrado. Universidade Federal de Minas Gerais.
- Fernandes, M.S. (2006) Nutrição Mineral de Plantas. *Sociedade Brasileira de Ciência do Solo*, pp. 432.

- Ferrer, M.A., Ros Barceló, A. (1999) Differential effects of nitric oxide on peroxidase and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by the xylem of *Zinnia elegans*. *Plant, Cell and Environment*, 22: 891-897.
- Frantzios, G., Galatis, B., Apostolakos, P. (2001) Aluminum effects on microtubule organization in dividing root tip cells of *Triticum turgidum*. II. Cytokinetic cells. *Journal of Plant Research*, 114: 157-170.
- Friml, J., Palme, K. (2002) Polar auxin transport – old questions and new concepts? *Plant Molecular Biology*, 49: 273-284.
- Fukushima, R.S., Kerley, M.S. (2011) Use of lignin extracted from different plant sources as standards in the spectrophotometric acetyl bromide lignin method. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 59: 3505-3509.
- Gälweiler, L., Guan., C., Müller, A., Wisman, E., Mendgen K., Yephremov, A., Palme, K. (1998) Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science*, 282: 2226-2230.
- Gay, C.A., Gebicki, J.M. (2002) Perchloric acid enhances sensitivity and reproducibility of the ferric-xilenol orange peroxide assay. *Analytical Biochemistry*, 304: 42-46.
- Ghanati, F., Morita, A., Yokota, H. (2005) Effects of aluminum on the growth of tea plant and activation of antioxidant system. *Plant and Soil*, 276(1-2): 133-141.
- Giannopolitis, C.N., Ries, S.K. (1977) Superoxide Dismutases. *Plant Physiology*, 59: 309-314.
- Gouvêa, C.M.C.P., Souza, J.F., Magalhães, C.A.N., Martins, I.S. (1997) NO<sup>\*</sup> – releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. *Plant Growth Regulation*, 21: 183-187.
- Guo, T., Zhang, G., Zhou, M., Wu, F., Chen, J. (2004) Effects of aluminum and cadmium toxicity on growth and antioxidant enzyme activities of two barley genotypes with different Al resistance. *Plant and Soil*, 258: 241-248.
- Hamel, F., Breton, C., Houde, M. (1998) Isolation and characterization of wheat aluminum-regulated genes: possible involvement of aluminum as a pathogenesis response elicitor. *Planta*, 205: 531-538.
- Hasenstein, K.H., Evans, M.L. (1988) Effects of cations on hormone transport in primary roots of *Zea mays*. *Plant Physiology*, 86: 890-894.

- He, H.Y., He, L.F., Gu, M.H., Li, X.F. (2012) Nitric oxide improves aluminum tolerance by regulating hormonal equilibrium in the root apices of rye and wheat. *Plant Science*, 183: 123-130.
- Horst, W.J., Püschel, A.-K., Schmohl, N. (1997) Induction of callose formation is a sensitive marker for genotypic aluminum sensitivity in maize. *Plant and Soil*, 192: 23-30.
- Hossain, M.A., Hossain, A.K.M.Z., Kihara, T., Koyama, H., Hara, T. (2005) Aluminum-induced lipid peroxidation and lignin deposition are associated with an increase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in wheat seedlings. *Soil Science and Plant Nutrition*, 61(2): 223-230.
- Huber, P.C., Almeida, W.P., de Fátima, A. (2008) Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova*, 31(5): 1170-1179.
- Illés, P., Schlicht, M., Pavlovkin, J., Lichtscheidl, I., Baluška, F., Ovečka, M. (2006) Aluminium toxicity in plants: internalisation of aluminium into cells of the transition zone in *Arabidopsis* root apices relates to changes in plasma membrane potential, endosomal behaviour, and nitric oxide production. *Journal of Experimental Botany*, 57: 4201-4213.
- Johansen, D.A. (1940) Plant microtechnique. McGraw-Hill Book Co. Inc., New York.
- Jones, D.L., Blancaflor, E.B., Kochian, L.V., Gilroy, S. (2006) Spatial coordination of aluminium uptake, production of reactive oxygen species, callose production and wall rigidification in maize roots. *Plant, Cell and Environment*, 29: 1309-1318.
- Jones, D.L., Kochian, L.V. (1997) Aluminum interaction with plasma membrane lipids and enzyme metal binding sites and its potential role in Al cytotoxicity. *FEBS Letters*, 400: 51-57.
- Karnovsky, M.J. (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative on high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 27: 137-138.
- Kasprowicz, A., Szuba, A., Volkman, D., Baluška, F., Wojtaszek, P. (2009) Nitric oxide modulates dynamic actin cytoskeleton and vesicle trafficking in a cell type-specific manner in root apices. *Journal of Experimental Botany*, 60(6): 1605-1617.
- Kerr, I.D., Bennett, M.J. (2007) New insight into the biochemical mechanisms regulating auxin transport in plants. *Biochemical Journal*, 401:613-622.
- Kidd, P.S., Llugany, M., Poschenrieder, C., Gunsé, B., Barceló, J. (2001) The role of root exudates in aluminum resistance and silicon-induced amelioration of

- aluminum toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Experimental Botany*, 52: 1339-1352.
- Klebl, B.M., Ayoub, A.T., Pette, D. (1998) Protein oxidation, tyrosine nitration, and inactivation of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase in low-frequency stimulated rabbit muscle. *FEBS Letters*, 42: 381-384.
- Kochian, L.V., Piñeros, M.A., Hoekenga, O.A. (2005) Physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. *Plant and Soil*, 274: 175-195.
- Kolbert, Z., Bartha, B., Erdei, L. (2008) Exogenous auxin-induced NO synthesis is nitrate reductase-associated in *Arabidopsis thaliana* root primordia. *Journal of Plant Physiology*, 165: 967-975.
- Kollmeier, M., Felle, H.H., Horst, W.J. (2000) Genotypical differences in aluminum resistance of maize are expressed in the distal part of the transition zone. Is reduced basipetal auxin flow involved in inhibition of root elongation by aluminum? *Plant Physiology*, 122: 945-956.
- Kraus, J.E., Arduin, M. (1997) Manual básico de métodos em morfologia vegetal, Editora Universidade Rural, Seropédica, Rio de Janeiro.
- Kuznetsova, S., Knaff, D.B., Hirasawa, M., Lagoutte, B., Sétif, P. (2004) Mechanism of spinach chloroplast ferredoxin-dependent nitrite reductase: spectroscopic evidence for intermediate states. *Biochemistry*, 43: 510-517.
- Lamattina, L., García-Mata, C., Graziano, M., Pagnussat, G. (2003) Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annual Review of Plant Biology*. 54: 9-36.
- Lee, B.H., Lee, H., Xiong, L., Zhu J.K. (2002) A mitochondrial complex I defect impairs cold-regulated nuclear gene expression. *The Plant Cell*, 14: 1235-1251.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., Stadtman, E.R. (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 186: 464-478.
- Lian, H.Z., Kang, Y.F., Yasin, A., Bi, S., Shao, D.L., Chen, Y.J., Dai, L.M., Tian, L.C. (2003) Determination of aluminum in environmental and biological samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography via pre-column complexation with morin. *Journal of Chromatography*, 993: 179-185.

- Ligaba, A., Kochian, L., Piñeros, M. (2009) Phosphorylation at S384 regulates the activity of the TaALMT1 malate transporter that underlies aluminum resistance in wheat. *The Plant Journal*, 60: 411-423.
- Liu, Q., Yang, J.L, He, L.S., Li, Y.Y., Zheng, S.J. (2008) Effect of aluminum on cell wall, plasma membrane, antioxidants and root elongation in triticale. *Biologia Plantarum*, 52(1): 87-92.
- Ljung, K., Bhalerao, R.P., Sandberg, G. (2001) Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *The Plant Journal*, 28(4): 465-474.
- Loureiro, A.P.M., Di Mascio, P., Medeiros, M.H.G. (2002) Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. *Química Nova*, 25(5): 777-793.
- Ma, J.F., Shen, R., Nagao, S., Tanimoto, E. (2004) Aluminum targets elongating cells by reducing cell wall extensibility in wheat roots. *Plant Cell Physiology*, 45(5): 583-589.
- Magalhaes, J.R., Monte, D.C., Durzan, D. (2000) Nitric oxide and ethylene emission in *Arabidopsis thaliana*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 6: 117-127.
- Marciano, D.P.R.O., Ramos, F.T., Alvim, M.N., Magalhaes, J.R., França, M.G.C.F. (2010) Nitric oxide reduces the stress effects of aluminum on the process of germination and early root growth of rice. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 173: 885-891.
- Marques, T.C.L.L.S.M., Soares, A.M. (2011) Antioxidant system of ginseng under stress by cadmium. *Scientia Agricola*, 68(4): 482-488.
- Mata G.C., Lamattina L. (2001) Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiology*, 126: 1196-1204.
- Matsumoto, H., Motoda, H. (2012) Aluminum toxicity recovery processes in root apices. Possible association with oxidative stress. *Plant Science*, 185-186: 1-8.
- McClure, B.A., Guilfoyle, T. (1987) Characterization of a class of small auxin-inducible soybean polyadenylated RNAs. *Plant Molecular Biology*, 9: 611-623.
- Meriga, B., Reddy, B.R., Rao, K.R., Reddy, L.A., Kishor, P.B.K. (2004) Aluminium-induced production of oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA damage in seedlings of rice (*Oryza sativa*). *Journal of Plant Physiology*, 161: 63-68.

- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Breusegem, F.V., Noctor, G. (2010) Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany*, 61: 4197-4220.
- Moctezuma, E. (1999) Changes in auxin patterns in developing gynophores of the peanut plant (*Arachis hypogaea* L.). *Annals of Botany*, 83: 235-242.
- Modolo, L.V. (2004) Produção de óxido nítrico pela óxido nítrico sintase, nitrato redutase e uma atividade mitocondrial redutora de nitrito na resposta de defesa de *arabidopsis thaliana* à *pseudomonas syringae*. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas.
- Modolo, L.V. (2011) Effective plant protection weapons against pathogens require “NO bullets”. In: Nitric oxide in Plant Physiology. (S. Hayat, M. Mori, J. Pichtel, & A. Ahmad, Eds.), 103-111.
- Modolo, L.V., Augusto, O., Almeida, I.M.G., Magalhaes, J.R., Salgado, I (2005) Nitrite as the major source of nitric oxide production by *Arabidopsis thaliana* in response to *Pseudomonas syringae*. *FEBS Letters*, 579: 3814-3820.
- Modolo, L.V., Augusto, O., Almeida, I.M.G., Pinto-Maglio, C.A.F., Oliveira, H.C., Seligman, K., Salgado, I (2006) Decreased arginine and nitrite levels in nitrate reductase-deficient *Arabidopsis thaliana* plants impair nitric oxide synthesis and the hypersensitive response to *Pseudomonas syringae*. *Plant Science*, 171: 34-60.
- Modolo, L.V., Cunha, F.Q., Braga, M.R., Salgado, I (2002) Nitric Oxide Synthase-mediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to the *Diaporthe phaseoloum* f. sp. *Meridionalis* elicitor. *Plant Physiology*, 130: 1288-1297.
- Møller, I.M., Jensen, P.E., Hansson, A. (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 58: 459-481.
- Møller, I.M., Kristensen, B.K. (2004) Protein oxidation in plant mitochondria as a stress indicator. *Photochemical and Photobiological Science*, 3: 730-735.
- Nakano, Y., Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22(5): 867-880.
- Pagnussat, G.C., Lanteri, M.L., Lamattina, L. (2003) Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the IAA-induced adventitious rooting process. *Plant Physiology*, 132: 1241-1248.
- Pagnussat, G.C., Simontacchi, M., Puntarulo, S., Lamattina, L. (2002) Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiology*, 129: 954-956.

- Pan, J.W., Zhu, M.Y., Chen, H. (2001) Aluminum-induced cell death in root-tip cells of barley. *Environmental and Experimental Botany*, 46: 71-79.
- Panda, S.K., Baluska, F., Matsumoto, H. (2009) Aluminum stress signaling in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 4(7): 592-597.
- Panda, S.K., Choudhury, S. (2005) Chromium stress in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17: 95-102.
- Panda, S.K., Yamamoto, Y., Kondo, H., Matsumoto, H. (2008) Mitochondrial alterations related to programmed cell death in tobacco cells under aluminium stress. *Comptes Rendus Biologies*, 331: 597-610.
- Peixoto, P.H.P., Cambraia, J., Sant'Anna, R., Mosquim, P.R., Moreira, M.A. (1999) Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 11: 137-143.
- Peixoto, P.H.P., Pimenta, D.S., Cambraia, J. (2007) Alterações morfológicas e acúmulo de compostos fenólicos em plantas de sorgo sob estresse de alumínio. *Bragantia*, 66(1): 17-25.
- Pereira, C.S., Soares da Costa, D., Teixeira, J., Pereira, S. (2005) Organ-specific distribution and subcellular localisation of ascorbate peroxidase isoenzymes in potato (*Solanum tuberosum* L.) plants. *Protoplasma*, 226: 223-230.
- Pereira, L.B., Mazzanti, C.M.A., Gonçalves, J.F., Cargnelutti, D., Tabaldi, L.A., Becker, A.G., Calgaroto, N.S., Farias, J.G., Battisti, V., Bohrer, D., Nicoloso, F.T., Morsch, V.M., Schetinger, M.R.C. (2010) Aluminum-induced oxidative stress in cucumber. *Plant Physiology and Biochemistry*, 8(8): 683-689.
- Pii, Y., Crimi, M., Cremonese, G., Spena, A., Pandolfini, T. (2007) Auxin and nitric oxide control indeterminate nodule formation. *BMC Plant Biology*, 7: 21-32.
- Piñeros, M.A., Shaff, J.E., Manslank, H.S., Carvalho, V.M., Kochian, L.V. (2005) Aluminum resistance in maize cannot be solely explained by root organic acid exudation. A comparative physiology study. *Plant Physiology*, 137: 231-41.
- Pinto, M.C., Tejada, A., Duque, A.L., Macías, P. (2007) Determination of lipoxygenase activity in plant extracts using a modified ferrous oxidation-xylene orange assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 5956-5959.
- Rate, D.N., Cuenca, J.V., Bowman, G.R., Guttman, D.S., Greenberg, J.T. (1999) The gain-of-function *Arabidopsis acd6* mutant reveals novel regulation and function of

- the salicylic acid signaling pathway in controlling cell death, defenses, and cell growth. *The Plant Cell*, 11: 1695-1708.
- Rengel, Z., Zhang, W.H. (2003) Role of dynamics of intracellular calcium in aluminium toxicity syndrome. *New Phytologist*, 159: 295-314.
- Reznick, A.Z., Packer, L. (1994). Oxidative damage proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in Enzymology*, 233: 357-363.
- Richards, K.D., Schott, E.J., Sharma, Y.K., Davis, K.R., Gardner, R.C. (1998) Aluminum induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 116: 409-418.
- Rockel, P., Strube, F., Rockel, A., Wildt, J., Kaiser, W.M. (2002) Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Experimental Botany*, 53(366): 103-110.
- Rodríguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M.C., Zabalza, A., Corpas, F.J., Gómez, M., Delrío, L.A., Sandalio, L.M. (2006) Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation *in vivo*. *Plant, Cell and Environment*, 29: 1532-1544.
- Romero-Puertas, M.C., Campostrini, N., Mattè, A., Righetti, P.G., Perazzolli, M., Zolla, L., Roepstorff, P., Delledonne, M. (2008) Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis thaliana* undergoing hypersensitive response. *Proteomics*, 8: 1459-1469.
- Rubery, P.H., Shelldrake, A.R. (1974) Carrier mediated auxin transport. *Planta*, 188: 101-121.
- Ryan, P.R., Raman, H., Gupta, S., Horst, W.J., Delhaize, E. (2009) A second mechanism for aluminum resistance in wheat relies on the constitutive efflux of citrate from roots. *Plant Physiology*, 149: 340-351.
- Ryan, P.R., Tyerman, S.D., Sasaki, T., Furuichi, T., Yamamoto, Y., Zhang, W.H., Delhaize, E. (2011) The identification of aluminium-resistance genes provides opportunities for enhancing crop production on acid soils. *Journal of Experimental Botany*, 62(1): 9-20.
- Sakihama, Y., Murakami, S., Yamasaki, H. (2003) Involvement of nitric oxide in the mechanism for stomatal opening in *Vicia faba* leaves. *Biologia Plantarum*, 46: 117-119.

- Sasaki, M., Yamamoto, Y., Matsumoto, H. (2006) Lignin deposition induced by aluminium in wheat (*Triticum aestivum*) roots. *Physiologia Plantarum*, 96(2): 193-198.
- Sasaki, T., Yamamoto, Y., Ezaki, B., Katsuhara, M., Ahn, S.J., Ryan, P.R., Delhaize, E. (2004) A wheat gene encoding an aluminium-activated malate transporter. *The Plant Journal*, 37: 645-653.
- Saviani, E.E., Orsi, C.H., Oliveira, J.F.P., Pinto-Maglio, C.A.F., Salgado, I. (2002) Participation of the mitochondrial permeability transition pore in nitric oxide-induced plant cell death. *FEBS Letters*, 510: 136-140.
- Schlicht, M., Strnad, M., Scanlon, M.J., Mancuso, S., Hochholdinger, F., Palme, K., Volkmann, D., Menzel, D., Baluska, F. (2006) Auxin immunolocalization implicates vesicular neurotransmitter-like mode of polar auxin transport in root apices. *Plant Signaling & Behavior*, 1: 122-133.
- Semane, B., Cuypers, A., Smeets, K., Van Belleghem, F., Horemans, N., Schat, H., Vangronsveld, J. (2007) Cadmium responses in *Arabidopsis thaliana*: glutathione metabolism and antioxidative defence system. *Physiologia Plantarum*, 129: 519-528.
- Shen, H., Hou, N.Y., Schlicht, M., Wan, Y.L., Mancuso, S., Baluska, F. (2008) Aluminium toxicity targets PIN2 in *Arabidopsis* root apices: Effects on PIN2 endocytosis, vesicular recycling, and polar auxin transport. *Chinese Science Bulletin*, 53(16): 2480-2487.
- Shen, Q., Wang, Y.T., Tian H., Guo F.Q. (2012) Nitric oxide mediates cytokinin functions in cell proliferation and meristem maintenance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* (no prelo).
- Shi, H.T., Li, R.J., Cai, W., Liu, W., Wang, C.L., Lu, Y.T. (2012) Increasing nitric oxide content in *Arabidopsis thaliana* by expressing rat neuronal nitric oxide synthase resulted in enhanced stress tolerance. *Plant Cell Physiology*, 53(2): 344-357.
- Silva, I.R., Smyth, T.J., Moxley, D.F., Carter, T.E., Allen, N.S., Rufty T.W. (2000) Aluminum accumulation at nuclei of cells in the root tip. Fluorescence detection using lumogallion and confocal laser scanning microscopy. *Plant Physiology*, 123: 543-552.
- Singh, H.P., Batish, D.R., Kaur, G., Arora, K., Kohli, R.K. (2008) Nitric oxide (as sodium nitroprusside) supplementation ameliorates Cd toxicity in hydroponically grown wheat roots. *Environmental and Experimental Botany*, 63: 158-167.

- Sírová, J., Sedlářová, M., Piterková, J., Luhová, L., Petřivalský, M. (2011) The role of nitric oxide in the germination of plant seeds and pollen. *Plant Science*, 181: 560-572.
- Sivaguru, M. Horst, M.J. (1998) The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize. *Plant Physiology*, 116: 155-163.
- Sivaguru, M., Baluška, F., Volkmann, D., Felle, H.H., Horst, W.J. (1999) Impacts of aluminum on the cytoskeleton of the maize root apex. Short-term effects on the distal part of the transition zone. *Plant Physiology*, 119: 1073-1082.
- Stamler, J.S., Singel, D.J., Loscalzo, J. (1992) Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*, 258: 1898-1902.
- Swarup, R., Friml, J., Marchant, A., Ljung, K., Sandberg, G., Palme, K., Bennett, M. (2001) Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex. *Genes and Development*, 15: 2648-2653.
- Tabuchi, A., Matsumoto, H. (2001) Changes in cell-wall properties of wheat (*Triticum aestivum*) roots during aluminum-induced growth inhibition. *Physiologia Plantarum*, 112: 353-358.
- Terrile, M.C., París, R., Calderón-Villalobos, L.I.A., Iglesias, M.J., Lamattina, L., Estelle, M., Casalengué, C.A. (2011) Nitric oxide influences auxin signaling through S-nitrosylation of the *Arabidopsis* TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 auxin receptor. *The Plant Journal*, 70(3): 492-500.
- Thomas, C., Bronner, R., Molinier, E.P., van Onckelen, H., Hahne, G. (2002) Immuno-cytochemical localization of indole-3-acetic acid during induction of somatic embryogenesis in cultured sunflower embryos. *Planta*, 215: 577-583.
- Tian, Q., Sun, D., Zhao, M., Zhang, W. (2007) Inhibition of nitric oxide synthase (NOS) underlies aluminum-induced inhibition of root elongation in *Hibiscus moscheutos*. *New Phytologist*, 174: 322-331.
- Tice, K.R., Parker, D.R., Demason, D.A. (1992) Operationally defined apoplastic and symplastic aluminum fractions in root tips of aluminum-intoxicated wheat. *Plant Physiology*, 100: 309-318.
- Tokunaga, N., Sakakibara, T., Umezawa, T., Ito, Y., Fukuda, H., Sato, Y. (2005) Involvement of extracellular dilignols in lignification during tracheary element differentiation of isolated *Zinnia* mesophyll cells. *Plant and Cell Physiology*, 46: 224-232.

- Wallace, S.U., Andersen, I.C. (1984) Aluminum toxicity and DNA synthesis in wheat roots. *Agronomy Journal*, 76: 5-8.
- Wang, H-H., Huang, J-J., Bi, Y-R. (2010) Nitrate reductase-dependent nitric oxide production is involved in aluminum tolerance in red kidney bean roots. *Plant Science*, 179: 281-288.
- Wang, Y-S., Yang, Z-M. (2005) Oxide reduces aluminum toxicity by preventing oxidative stress in the roots of *Cassia tora* L. *Plant Cell Physiology*, 46: 1915-1923.
- Wilkinson, L. (2002) Systat. Version 10.2. SPSS, Chicago, Illinois, USA.
- Willekens, H., Inzé, D., Van Montagu, M., van Camp, W. (1995) Catalases in plants. *Molecular Breeding*, 1: 207-228.
- Wojtaszek, P. (2000) Nitric oxide in plants. To NO or not to NO. *Phytochemistry*, 54: 1-4.
- Xia, J., Yamaji, N., Kasai, T., Ma, J.F. (2010) Plasma membrane-localized transporter for aluminum in rice. *PNAS*, 107(43): 18381-18385.
- Xue, Y.J., Tao, L., Yang, Z.M. (2008) Aluminum-induced cell wall peroxidase activity and lignin synthesis are differentially regulated by jasmonate and nitric oxide. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 56: 9676-9684.
- Yadav, S., David, A., Bhatla, S.C. (2010) Nitric oxide modulates specific steps of auxin-induced adventitious rooting in sunflower. *Plant Signaling & Behavior*, 5(10): 1163-1166.
- Yamamoto, Y., Kobayashi, Y., Devi, S.R., Rikiishi, S., Matsumoto, H. (2002) Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiology*, 128: 63-72.
- Yamamoto, Y., Kobayashi, Y., Devi, S.R., Rikiishi, S., Matsumoto, H. (2003) Oxidative stress triggered by aluminum in plant roots. *Plant and Soil*, 255(1): 239-243.
- Yamamoto, Y., Kobayashi, Y., Matsumoto, H. (2001) Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in *Pea* roots. *Plant Physiology*, 125: 199-208.
- Yemets, A.I., Krasylenko, Y.A., Lytvyn, D.I., Sheremet, Y.A., Blume, Y.B. (2011) Nitric oxide signalling *via* cytoskeleton in plants. *Plant Science*, 181: 545-554.

- Zažímalová, E., Křeček, P., Skůpa, P., Hoyerová, K., Petrášek, J. (2007) Polar transport of the plant hormone auxin – the role of PIN-FORMED (PIN) proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64: 1621-1637.
- Zažímalová, E., Murphy, A.S., Yang, H., Hoyerová, K., Hosek, P. (2010) Auxin transporters: why so many? *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2:a001552.
- Zhang, Y.Y., Wang, L.L., Liu, Y.L., Zhang, Q., Wei, Q.P., Zhang, W. (2006) Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in the tonoplast. *Planta*, 224: 545-555.
- Zhang, Z., Wang, H., Wang, X., Bi, Y. (2011) Nitric oxide enhances aluminum tolerance by affecting cell wall polysaccharides in rice roots. *Plant Cell Reports*, 30(9): 1701-1711.