



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Botânica
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal



FERNANDA GOMES DA SILVA

**MECANISMOS DE SINALIZAÇÃO EM PLÂNTULAS DE
SORGO E TRIGO EM RESPOSTA AO ALUMÍNIO
MEDIADOS POR GÁS SULFÍDRICO**

**Tese 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
Doutor em Biologia Vegetal.**

Área de Concentração: Fisiologia Vegetal

BELO HORIZONTE – MG

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Botânica
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal



FERNANDA GOMES DA SILVA

**MECANISMOS DE SINALIZAÇÃO EM PLÂNTULAS DE
SORGO E TRIGO EM RESPOSTA AO ALUMÍNIO
MEDIADOS POR GÁS SULFÍDRICO**

**Tese 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
Doutor em Biologia Vegetal.**

Área de Concentração: Fisiologia Vegetal

**Orientadora: Profa. Dra. Luzia Valentina Modolo
Universidade Federal de Minas Gerais**

BELO HORIZONTE – MG

2016

043 Silva, Fernanda Gomes da.
Mecanismos de sinalização em plântulas de sorgo e trigo em resposta ao alumínio mediados por gás sulfídrico [manuscrito] / Fernanda Gomes da Silva. - 2016.

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

Orientadora: Profa. Dra. Luzia Valentina Modolo.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Fisiologia vegetal - Teses. 2. Sorgo. 3. Trigo. 4. Alumínio - Teses.
5. Sinalização celular. 6. Sulfeto de hidrogênio. I. Modolo, Luzia Valentina. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612



UFMG

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal
Universidade Federal de Minas Gerais
ICB - Departamento de Botânica

Tese defendida e aprovada em 29 de abril de 2016, pela Banca
Examinadora constituída pelos professores:

Dra. Luzia Valentina Modolo (UFMG) *Luzia Valentina Modolo*

Dr. Geraldo Aclécio Melo (UNIMONTES) *Geraldo Aclécio Melo*

Dr. Eduardo Gusmão Pereira (UFV) *Eduardo Gusmão Pereira*

Dra. Ana Paula de Faria (UFU) *Ana Paula de Faria*

Dra. Maria Rita Scotti Muzzi (UFMG) *Maria Rita Scotti Muzzi*

“Não importa onde você parou... em que momento da vida você cansou... o que importa é que sempre é possível e necessário recomeçar. Recomeçar é dar uma nova chance a si mesmo... é renovar as esperanças na vida e, o mais importante... acreditar em você de novo. Sofreu muito neste período? Foi aprendizado... Chorou muito? Foi limpeza da alma... Ficou com raiva das pessoas? Foi para perdoá-las um dia... Sentiu-se só por diversas vezes? É porque fechaste a porta até para os anjos... Acreditou que tudo estava perdido? Era o início de tua melhora... Aonde você quer chegar? Ir alto? Sonhe alto... Queira o melhor do melhor... Se pensamos pequeno... coisas pequenas teremos... Mas se desejamos fortemente o melhor e principalmente lutarmos pelo melhor... O melhor vai se instalar em nossa vida. Porque sou do tamanho daquilo que vejo, e não do tamanho da minha altura”

Carlos Drummond de Andrade

Do not follow where the path may lead.
Go instead where there is not path and leave trail.

Muriel Strode

Agradecimentos

Agradeço àqueles que tanto amo, e que tanto me amam! Aos meus amados pais, Sra. Edite Auresina e Sr. João Gomes, aos meus queridos irmãos, Neide, Lia, Divaldo, Meyre e Deilton, e aos meus lindos sobrinhos, Júlia, Ariel, Daniel e Miguel. Querida família, agradeço imensamente pelo companheirismo, bom humor, compreensão, orações e entusiasmo de sempre! Vocês são os melhores!

Ao querido Márcio Maia, por estar ao meu lado frente aos muitos desafios e em cada conquista! Obrigada pelo amor, por acreditar em mim e pelo auxílio em minhas dificuldades.

À minha orientadora, Profa. Dra. Luzia Valentina Modolo, pela oportunidade, paciência, valiosos ensinamentos e amizade!

Ao Dr. Ângelo de Fátima (Depto. de Química da UFMG) e ao seu grupo de pesquisa pelo empréstimo de equipamentos e reagentes.

Ao Dr. Jurandir Magalhães (Embrapa Milho e Sorgo) pela concessão das sementes de sorgo utilizadas nesta pesquisa.

Ao Dr. Antônio Wilson Penteado Ferreira Filho (Instituto Agronômico de Campinas), pelo fornecimento das sementes de trigo utilizadas nesta pesquisa.

À Dra. Alessandra Rodrigues Kozovits, ao MSc. Maurílio Figueiredo e aos técnicos do DEGEO (UFOP) pelo auxílio nas análises por ICP-OES.

Aos Profs. Drs. do Depto. de Botânica, pelos ensinamentos e empréstimo de equipamentos, indispensáveis à execução desta pesquisa.

Ao colegiado do Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal, pelo exemplo de organização, por consultar e considerar a opinião discente em suas decisões.

Aos técnicos Elenice, Socorro, Valquíria, Wagner (Depto. de Botânica - UFMG) e Jamil (Depto. de Bioquímica - UFMG). Muito obrigada pelo empréstimo de materiais e equipamentos, e também pela amizade!

Às secretárias do Depto. de Botânica, Maria Cristina, Denise Márcia e Isabela, pelo auxílio nas questões burocráticas e pela amizade.

À Universidade Federal de Minas Gerais pela oportunidade de realização deste curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela bolsa de doutoramento e demais auxílios.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelos recursos concedidos.

À Fundação Universitária Mendes Pimentel (FUMP), pelo auxílio a mim concedido nos anos iniciais do curso de doutorado.

Aos atuais e ex-membros do Grupo de Estudos em Bioquímica de Plantas: Aline Xavier, Ana Paula de Faria, Camila Faria, Cristiane Jovelina, Dandara Muniz, Débora Araújo, Débora Soares, Gisele Barbosa, Isabela Aquino, Izabel Chaves, Janaína Garcia, Leandro Torres, Lívia Horta, Mariana Costa, Raquel Faria, Yane Campolina e Vinícius Morais. Agradeço pelo auxílio na condução de experimentos, pela alegria, apoio, companhia e amizade.

Muita gratidão às amigas Cristiane Jovelina, Izabel Chaves, Janaína Garcia, Mariana Costa, Raquel Faria e Thamara Ferreira, pelo auxílio prestado na condução de alguns experimentos. Um profundo agradecimento à Cris e Mari por inúmeros motivos, mas especialmente pela ajuda durante a redação desta tese. Obrigada pelas dicas, ideias, paciência e por atenderem aos meus gritos de socorro (que foram muitos). Vocês são pessoas muito especiais!

À minha amiga e conterrânea Telma Chagas, pela acolhida e auxílio assim que cheguei à Belo Horizonte.

Aos estagiários que se dedicaram a este trabalho, Célio Lara, Alexandre Aires e Beatriz Marina, pelo empenho e disponibilidade.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Fisiologia Vegetal, Ailton Rodrigues, Áurea Cordeiro, Alexandre Duarte, Bárbara Castro, Bianca Rodrigues, Cliciana Hollanda, Cristiane Sarmiento, Elisa Monteze, Felipe Della Torre, Leilane Barreto, Thamara Ferreira e Túlio Oliveira, pela agradável convivência.

À Selminha, pela amizade e preocupação de sempre com o desempenho dos alunos, inclusive com o meu.

A todos que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento pessoal e intelectual durante este curso e/ou colaboraram para a realização deste trabalho!

A Deus, a sabedoria suprema, por tudo!

Sumário

Abreviaturas.....	ix
Resumo geral	x
General abstract	xi
1. Introdução geral	1
2. Hipótese	3
3. Objetivo geral	4
3.1. Objetivos específicos.....	4
4. Referências bibliográficas.....	5
Capítulo 1 - Resistência à toxidez de alumínio pode ser mediada por gás sulfídrico em plântulas de sorgo	9
Resumo	10
1. Introdução.....	11
2. Material e métodos	13
2.1. Material vegetal e condições de cultivo	13
2.2. Experimento 1: Avaliação dos efeitos dos tratamentos com Al^{3+} nos teores de nutrientes minerais e de moléculas sinalizadoras em genótipos de sorgo.....	14
2.2.1. Quantificação de alumínio em raízes e parte área.....	14
2.2.2. Quantificação de nutrientes minerais em raízes e parte aérea.....	14
2.2.3. Quantificação de H_2S , NO e H_2O_2 em raízes	14
2.3. Experimento 2: Avaliação dos efeitos do gás sulfídrico na amenização do estresse provocado por alumínio em genótipos de sorgo	15
2.3.1. Atividade de enzimas do sistema antioxidante em raízes	16
2.3.2. Dosagem de proteínas totais.....	17
2.3.3. Quantificação de lignina.....	17
2.3.4. Quantificação de aminoácidos livres totais	18
2.3.5. Detecção de células mortas	18
2.4. Delineamento experimental e análise estatística.....	19
3. Resultados	19
3.1. Concentração de alumínio em raízes e parte aérea de plântulas expostas ao Al^{3+} ..	19
3.2. Efeito do Al^{3+} na concentração de alguns nutrientes minerais em raízes e parte aérea	20

3.3. Concentração de H ₂ O ₂ , NO e H ₂ S em raízes de plântulas de sorgo expostas ao Al ³⁺	21
3.4. Efeito do Al ³⁺ e do H ₂ S sobre a atividade de enzimas antioxidantes	22
3.5. Efeito do H ₂ S sobre a concentração de lignina	23
3.6. Efeito do H ₂ S nos níveis de aminoácidos livres	24
3.7. Efeito do Al ³⁺ na viabilidade celular.....	25
4. Discussão	26
5. Conclusões.....	29
6. Referências bibliográficas.....	30
Capítulo 2 – O gás sulfídrico atenua os efeitos tóxicos de alumínio em plântulas de <i>Triticum aestivum</i>?	36
Resumo	37
1. Introdução.....	38
2. Material e métodos	39
2.1. Material vegetal.....	39
2.2. Cultivo e tratamentos das plântulas	39
2.2.1. Quantificação de H ₂ S, NO e H ₂ O ₂ em raízes	40
2.3. Avaliação dos efeitos do gás sulfídrico na amenização do estresse provocado pelo alumínio nos genótipos de trigo de H ₂ S.....	41
2.3.1. Determinação da atividade de enzimas envolvidas na biossíntese de H ₂ S ...	41
2.3.2. Quantificação de radical hidroxila (*OH) em raízes	42
2.3.3. Detecção de ânion superóxido (*O ₂ ⁻), atividade desidrogenase e células mortas em raízes	42
2.3.4. Determinação da atividade de enzimas do sistema antioxidante.....	43
2.3.5. Dosagem de proteínas totais	44
2.4. Delineamento experimental e análise estatística.....	44
3. Resultados	45
3.1. Efeito do Al ³⁺ sobre os níveis de H ₂ S, NO e H ₂ O ₂ em raízes de trigo	45
3.2. Efeito do Al ³⁺ na atividade de enzimas envolvidas na biossíntese de H ₂ S.....	45
3.3. Efeito do H ₂ S na atividade desidrogenase em raízes expostas ao Al ³⁺	47
3.4. Efeito do H ₂ S na produção de radical hidroxila (*OH) em raízes expostas ao Al ³⁺	48

3.5. Efeito do H ₂ S na produção de ânion superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) em raízes expostas ao Al ³⁺	49
3.6. Efeito do H ₂ S na atividade de enzimas antioxidantes de raízes expostas ao Al ³⁺ ..	50
3.7. Efeito do H ₂ S sobre a viabilidade de células radiculares expostas ao Al ³⁺	51
4. Discussão	52
5. Conclusões	55
6. Referências bibliográficas.....	56
Considerações finais	60

Abreviaturas

$\cdot\text{O}_2^-$	Ânion superóxido
$\cdot\text{OH}$	Radical hidroxila
AlCl_3	Cloreto de alumínio
APX	Ascorbato peroxidase
BSA	Albumina de soro bovino
CaCl_2	Cloreto de cálcio
CAS	β -ciano-alanina sintase
CAT	Catalase
CS	L-cisteína sintase
DP	Desvio padrão da média
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EP	Erro padrão da média
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
H_2S	Sulfeto de hidrogênio ou gás sulfídrico
HCl	Ácido clorídrico
ICP-OES	Espectrometria de absorção óptica com plasma indutivamente acoplado
L-DES	L-cisteína dessulfidrase
MgCl_2	Cloreto de Magnésio
Na_2S	Sulfeto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NBT	Azul de nitro-tetrazólio
NO	Óxido nítrico
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
SiR	Sulfito redutase
SNAP	S-nitroso-N-acetil penicilamina
SNP	Nitroprussiato de sódio
SOD	Superóxido dismutase

Resumo geral

Em solos ácidos, o alumínio (Al^{3+}) é um dos principais fatores que limita a produtividade agrícola. Por este motivo, é essencial identificar cultivares tolerantes e conhecer os mecanismos de resistência ao Al^{3+} . O principal efeito do Al^{3+} em plantas é a indução da superprodução de espécies reativas de oxigênio. O sulfeto de hidrogênio (H_2S) tem sido apontado como sinalizador nas respostas de defesa em plantas sob diferentes estresses ambientais. O presente estudo teve como objetivo analisar os mecanismos de sinalização ativadas durante o estresse por Al^{3+} em genótipos de sorgo (*Sorghum bicolor*) e de trigo (*Triticum aestivum*) contrastantes quanto à tolerância a este cátion. Também se investigou o possível efeito de um doador de H_2S na mitigação dos danos causados pelo Al^{3+} . Os genótipos de sorgo foram expostos ao Al^{3+} (0 a 80 μM) em CaCl_2 200 μM (pH 4,0), enquanto que os genótipos de trigo foram tratados com Al^{3+} 75 μM em solução nutritiva 1/10 da força total (pH 4,0). As principais respostas das plântulas ao Al^{3+} foram observadas após 48 h de tratamento. O Al^{3+} foi tóxico para os genótipos sensíveis (ATF8B, sorgo e Anahuac, trigo), enquanto as plântulas tolerantes (ATF10B, sorgo, e BH1146, trigo) pouco sofreram os efeitos citotóxicos deste cátion. Os níveis endógenos de H_2S em raízes tolerantes de sorgo (ATF10B) foram maiores que os de raízes sensíveis (ATF8B). O tratamento com Al^{3+} estimulou as atividades superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) em raízes sensíveis de sorgo, sem afetar tais enzimas no genótipo tolerante. O pré-tratamento com o doador de H_2S por 24 h provocou efeitos divergentes entre as espécies. Raízes do genótipo sensível de sorgo pré-tratadas com doador de H_2S e em seguida expostas ao Al^{3+} apresentaram atividades SOD, APX e CAT similares às de raízes-controle. O H_2S exógeno também minimizou as alterações morfológicas outrora induzidas pelo Al^{3+} em raízes sensíveis de sorgo. O tratamento com Al^{3+} promoveu aumento dos níveis endógenos de H_2S em raízes de ambos os genótipos de trigo. O aumento no conteúdo de H_2S induzido pelo Al^{3+} em trigo coincidiu com o estímulo da atividade β -ciano-alanina sintase (CAS) e diminuição da atividade L-cisteína dessulfidrase (L-DES). O Al^{3+} também inibiu a atividade desidrogenase e a produção de ânion superóxido em plântulas sensíveis e tolerantes ao cátion, embora tais danos tenham sido menos intensos no genótipo tolerante. Eventos de morte celular parecem ter sido intensificados na epiderme de raízes de trigo sensíveis, mas não em raízes tolerantes, após a exposição com Al^{3+} . Diferentemente dos resultados obtidos para o sorgo, o pré-tratamento de raízes de trigo com H_2S intensificou processos de morte celular, inibiu a respiração e ativou as enzimas SOD, APX e CAT em ambos os genótipos, independentemente da exposição ao Al^{3+} . O aumento do H_2S endógeno induzido pelo Al^{3+} , associado ao fornecimento exógeno do H_2S intensificou os efeitos deletérios deste gás em raízes de trigo. Os resultados indicam que o H_2S 50 μM impulsiona a resposta de defesa de raízes dos genótipos de sorgo ao Al^{3+} enquanto torna-se tóxico aos genótipos de trigo. Os efeitos do H_2S no âmbito da resposta ao Al^{3+} variam de acordo com a espécie vegetal e concentração deste gás na célula.

Palavras-chave: *Sorghum bicolor*, *Triticum aestivum*, alumínio, sulfeto de hidrogênio, sinalização celular.

General abstract

Aluminum (Al^{3+}) is one of the main factors that limit crop productivity in acid soils. For this reason, it is important to identify and know the mechanisms of resistance of Al^{3+} . The overproduction of reactive oxygen species is one of the first responses of plants to Al^{3+} exposure. Also, hydrogen sulfide (H_2S) has been recognized as a key signaling molecule during plant response to (a)biotic stresses. This study focused on the evaluation of signaling processes activated in contrasting sorghum (*Sorghum bicolor*) and wheat (*Triticum aestivum*) genotypes during the response to Al^{3+} stress. The effect of an H_2S donor in the mitigation of damages caused by Al^{3+} was also investigated. Sorghum genotypes were exposed to Al^{3+} (0 to 80 μM) in 200 μM CaCl_2 (pH 4.0), while wheat genotypes were treated with 75 μM Al^{3+} prepared in one tenth total strength nutrient solution (pH 4.0). The key responses of seedlings were observed 48 h post Al^{3+} exposure. Al^{3+} was toxic to the sensitive genotypes (ATF8B, sorghum e Anahuac, wheat) while the cytotoxic effects in tolerant seedlings (ATF10B, sorghum e BH1146, wheat) were quite mild. The endogenous levels of H_2S in Al-tolerant sorghum roots (ATF10B) were higher than those of Al-sensitive ones (ATF8B). The Al^{3+} treatment stimulated the activities of superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT) in Al-sensitive sorghum roots without affecting the activity of such enzymes in the Al-tolerant genotype. The pre-treatment with an H_2S donor for 24 h caused contrasting effects on the studied plant species. The roots from pre-treatment of Al-sensitive sorghum with H_2S rescued the SOD, APX and CAT activities to the levels of control plants, followed by Al^{3+} exposure. The exogenous H_2S also attenuated the morphological alterations triggered by Al^{3+} in Al-sensitive sorghum roots. Wheat roots exhibited increased endogenous levels of H_2S upon Al^{3+} treatment. The increase in H_2S levels induced by Al in wheat was accompanied by stimulation in β -ciano-alanine synthase (CAS) and decrease of L-cysteine desulhydrase (L-DES), enzymes involved in the biosynthesis of H_2S . The Al^{3+} also inhibited the dehydrogenase activity and superoxide anion production in Al-sensitive seedlings and at less extent in the Al-tolerant genotype. Cell death events seem to have been enhanced in the epidermis of sensitive wheat roots, but not in tolerant roots after Al^{3+} exposure. Different from the results obtained for sorghum roots, the pre-treatment of wheat roots with an H_2S donor intensified cell death processes, inhibited cell respiration and stimulated SOD, APX and CAT enzymes in both genotypes, independently of Al^{3+} exposure. The increase of endogenous H_2S levels induced by Al^{3+} exposure, associated with the exogenously generated H_2S boosted the deleterious effects of such gas on wheat roots. Overall, the results indicate that 50 μM H_2S contributes to the sorghum response to Al^{3+} while, in contrast, become toxic to the wheat genotypes. The H_2S effects with respect to the plant response to Al^{3+} vary according to the plant species and gas concentration in plant cells.

Keywords: *Sorghum bicolor*, *Triticum aestivum*, aluminum, hydrogen sulfide, cell signaling.

1. Introdução geral

Recentemente a população global atingiu a marca dos 7 bilhões de habitantes. A previsão da Organização das Nações Unidas (ONU, 2013) é de que a população mundial alcance 9,6 bilhões em 2050. Para atender a demanda da população em crescimento, estima-se que a produção de alimentos deva aumentar em aproximadamente 70% em todo o mundo, e particularmente dobrar em países em desenvolvimento (FAO, 2009).

Um dos principais fatores que limita a produtividade agrícola é a presença de quantidades elevadas de Al^{3+} em solos ácidos ($pH \leq 5,5$), posto que tais solos constituem cerca de 50% das áreas potencialmente cultiváveis mundialmente (Kochian et al., 2004). Em solos neutros, este metal apresenta-se na forma insolúvel não sendo, portanto, absorvível pelo sistema radicular de vegetais. Contudo, a acidificação do solo aumenta a solubilidade do Al, proporcionando o predomínio da forma tóxica Al^{3+} (Kochian et al., 1995; Ma, 2007).

O ápice radicular é o sítio primário de ação do Al^{3+} (Motoda et al., 2010). Devido à sua afinidade por constituintes celulares com carga residual negativa, o Al^{3+} pode interagir com metabólitos presentes na parede celular, membrana plasmática e também no simplasto (Matsumoto, 2000; Ma et al., 2004; Ma, 2007). Além disso, o Al^{3+} pode competir com o Ca^{2+} inibindo a absorção deste importante nutriente mineral (Huang et al., 1996), resultando em danos estruturais e funcionais (Matsumoto, 2000).

Níveis tóxicos de Al^{3+} frequentemente induzem à superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelas células vegetais, desencadeando estresse oxidativo (Ezaki et al., 2000; Achary et al., 2008; Nogueirol et al., 2015), com consequente peroxidação de lipídios (Yamamoto et al., 2001; Wang e Yang, 2005). As EROs são subprodutos do metabolismo aeróbico celular (Gratão et al., 2005) e incluem o ânion superóxido ($\cdot O_2^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($\cdot OH$), dentre outros (Gratão et al., 2005). Apesar de serem potencialmente prejudiciais aos componentes celulares quando em quantidades elevadas, há evidências de que em baixas quantidades as EROs atuam como mensageiros celulares na ativação de mecanismos de defesa contra estresses (Knight e Knight, 2001; Mittler et al., 2004). Posto isso, as células vegetais são capazes de controlar a produção de EROs removendo o excesso geralmente produzido em resposta a algum estímulo (Mittler et al., 2004). Esta homeostase é regulada pela atuação do sistema antioxidante enzimático e não enzimático. Exemplos de enzimas deste sistema são a superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) (Gratão et al., 2005).

A severidade da toxicidade do Al^{3+} depende do estágio de desenvolvimento vegetal, do grau de tolerância da planta e da concentração do elemento no meio celular (Ma et al., 2004; Tahara et al., 2008). Dois principais mecanismos de resistência ao Al^{3+} já são amplamente conhecidos: exclusão apoplástica e tolerância simplástica. No primeiro, as células radiculares exsudam ácidos orgânicos que complexam o cátion, impedindo sua absorção. No segundo, o Al^{3+} absorvido pelas células da raiz é complexado por compostos orgânicos e compartimentalizado em vacúolos, como forma de prevenir a ocorrência de danos celulares (Kochian et al., 2004). Apesar do conhecimento sobre muitas das respostas bioquímicas das plantas ao Al^{3+} , os processos de sinalização que medeiam tais respostas ainda carecem de estudos aprofundados.

O óxido nítrico (NO) é uma molécula sinalizadora gasosa que se difunde facilmente através das membranas celulares. Esta molécula desempenha importante papel no crescimento e desenvolvimento vegetal, induzindo desde a germinação de sementes até a senescência vegetal (García-Mata e Lamattina, 2001; Neill et al., 2003; Hayat et al., 2010). Seu envolvimento na proteção das plantas contra estresses bióticos e abióticos é bem documentado (Delledonne et al., 1998; Modolo et al., 2002, 2005; Wang e Yang, 2005).

Estudos realizados com algumas espécies vegetais sugerem que o NO possui um efeito protetor mediante o estresse por Al^{3+} . O tratamento com nitroprussiato de sódio (SNP), um doador de NO, aliviou a inibição do alongamento radicular em *Hibiscus moscheutos*, induzida por Al^{3+} (Tian et al., 2007). Em plantas de *Cassia tora*, o tratamento com SNP promoveu o crescimento e diminuiu o acúmulo de Al em raízes expostas ao Al^{3+} (Wang e Yang, 2005). Adicionalmente, o NO mitigou os efeitos inibitórios do Al^{3+} sobre germinação de sementes de *Oryza sativa* (Marciano et al., 2010).

Os mecanismos pelos quais o NO atenua os efeitos tóxicos do Al^{3+} em plantas permanecem ainda desconhecidos (Xue et al., 2008). No entanto, acredita-se que este sinalizador diminua o estresse oxidativo (Wang e Yang, 2005) pela ativação do sistema antioxidante e/ou pela remoção direta de $\cdot\text{O}_2^-$ (Kopyra e Gwózdź, 2003; Zhao et al., 2008).

O gás sulfídrico (H_2S) é outra molécula gasosa de fácil difusão em membranas celulares e que por muitos anos foi considerada tóxica às plantas e animais (Tanaka et al., 1968; Li e Lancaster, 2013). Todavia, algumas enzimas produtoras de H_2S já foram identificadas e caracterizadas em plantas, tais como L/D-dessulfidrase (L/D-DES), β -cianoalanina sintase (CAS), sulfito redutase (SiR) e L-cisteína sintase (CS) (Li, 2015). Alguns estudos demonstraram o envolvimento deste gás em uma série de eventos fisiológicos tais

como germinação, biogênese de cloroplastos, movimento estomático e formação de raízes adventícias (Zhang et al., 2008; Chen et al., 2011; García-Mata e Lamattina, 2010; Lin et al., 2012). Estudos recentes reportaram a participação do H₂S na proteção de plantas contra metais, seca, temperaturas elevadas e salinidade (Li et al., 2012, 2015; Wang et al., 2012; Jin et al., 2013; Chen et al., 2015; Zhang et al., 2015). Além disso, o H₂S mitigou os danos provocados por Al³⁺ durante a germinação de sementes e crescimento de plântulas de *Triticum aestivum* (Zhang et al., 2010). Os autores indicaram que o H₂S exógeno possivelmente agiu controlando o estresse oxidativo via estímulo da atividade de enzimas do sistema antioxidante. De modo similar, o H₂S preveniu danos oxidativos em raízes e folhas de plântulas de *Brassica napus* expostas ao Al³⁺ (Ali et al., 2015). Assim, plantas tratadas com um doador de H₂S apresentaram níveis mais baixos de malondialdeído e de EROs, além de terem absorvido menos Al, quando comparadas às plantas tratadas exclusivamente com Al³⁺ (Ali et al., 2015).

Embora as evidências relatadas nos últimos anos indiquem o envolvimento do NO na defesa contra o estresse causado por Al³⁺, o papel do H₂S na tolerância de plantas ao cátion em questão ainda requer investigação aprofundada. Deste modo, o estudo dos mecanismos ativados por estas moléculas sinalizadoras e a possível interação entre elas durante o estresse ainda são escassos. Abordagens com genótipos contrastantes quanto à tolerância ao Al³⁺ podem ser muito úteis para a avaliação dos mecanismos que direcionam as respostas de defesa.

2. Hipótese

Postula-se que o gás sulfídrico (H₂S) medeia a tolerância de genótipos de sorgo (*Sorghum bicolor*) e trigo (*Triticum aestivum*) ao Al³⁺ e que o H₂S exógeno induz esta tolerância nos genótipos sensíveis.

3. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi investigar processos de sinalização celular durante respostas bioquímicas de genótipos contrastantes de sorgo e trigo ao Al^{3+} .

3.1. Objetivos específicos

Capítulo 1:

- Quantificar Al e alguns elementos minerais em raízes e parte aérea de genótipos de sorgo expostos a diferentes concentrações de Al^{3+} ;
- Determinar os níveis endógenos de NO, H_2S e H_2O_2 em raízes de sorgo expostas ao Al^{3+} ;
- Investigar a influência do Al^{3+} sobre a concentração de lignina, aminoácidos livres, viabilidade celular e atividade de enzimas antioxidantes em raízes de sorgo pré-tratadas com H_2S exógeno.

Capítulo 2:

- Determinar os níveis endógenos de NO, H_2S e H_2O_2 em raízes de trigo expostas ao Al^{3+} ;
- Analisar o efeito do Al^{3+} e de H_2S exógeno na concentração de radical hidroxila e ânion superóxido, na atividade desidrogenase e na viabilidade de células de raízes de trigo;
- Investigar o efeito do Al^{3+} e do H_2S exógeno na atividade de enzimas do sistema antioxidante e daquelas relacionadas à biossíntese de H_2S em raízes de trigo.

4. 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(2), 300-310.
- Ali, B., Qian, P., Sun, R., Farooq, M. A., Gill, R. A., Wang, J., Zhou, W. (2015). Hydrogen sulfide alleviates the aluminum-induced changes in *Brassica napus* as revealed by physicochemical and ultrastructural study of plant. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(4), 3068-3081.
- Chen, J., Wang, W. H., Wu, F. H., He, E. M., Liu, X., Shangguan, Z. P., Zheng, H. L. (2015). Hydrogen sulfide enhances salt tolerance through nitric oxide-mediated maintenance of ion homeostasis in barley seedling roots. *Scientific Reports*, 5, 12516, doi:10.1038/srep12516.
- Chen, J., Wu, F. H., Wang, W. H., Zheng, C. J., Lin, G. H., Dong, X. J., Zheng, H. L. (2011). Hydrogen sulfide enhances photosynthesis through promoting chloroplast biogenesis, photosynthetic enzyme expression, and thiol redox modification in *Spinacia oleracea* seedlings. *Journal of Experimental Botany*, 62(13), 4481-4493.
- 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.
- Ezaki, B., Gardner, R. C., Ezaki, Y., Matsumoto, H. (2000). Expression of aluminum-induced genes in transgenic *Arabidopsis* plants can ameliorate aluminum stress and/or oxidative stress. *Plant Physiology*, 122(3), 657-666.
- FAO, U.N. (2009). How to feed the world in 2050. In Rome: High-Level Expert Forum. Disponível em: [http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How to Feed the World in 2050.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf) Acesso em: 10 abr. 2015.
- García-Mata, C., Lamattina, L. (2001). Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiology*, 126(3), 1196-1204.
- García-Mata, C., Lamattina, L. (2010). Hydrogen sulfide, a novel gasotransmitter involved in guard cell signalling. *New Phytologist*, 188(4), 977-984.
- Gratão, P. L., Polle, A., Lea, P. J., Azevedo, R. A. (2005). Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology*, 32(6), 481-494.
- Hayat, S., Hasan., S. A., Mori, M., Fariduddin, Q., Ahmad, A. (2010). Nitric oxide: chemistry, biosynthesis, and physiological role. In: Hayat, S., Mori, M., Pichtel, J., Ahmad, A. (eds) *Nitric oxide in Plant Physiology*, Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 210.
- Huang, J. W., Pellet, D. M., Papernik, L. A., Kochian, L. V. (1996). Aluminum interactions with voltage-dependent calcium transport in plasma membrane vesicles isolated from roots of aluminum-sensitive and-resistant wheat cultivars. *Plant Physiology*, 110(2), 561-569.
- Jin, Z., Xue, S., Luo, Y., Tian, B., Fang, H., Li, H., Pei, Y. (2013). Hydrogen sulfide interacting with abscisic acid in stomatal regulation responses to drought stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 62, 41-46.

- Knight, H., Knight, M. R. (2001). Abiotic stress signaling pathways: specificity and cross-talk. *Trends in Plant Science*, 6(6), 262-267.
- Kochian, L. V. (1995). Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 46(1), 237-260.
- Kochian, L. V., Hoekenga, O. A., Pineros, M. A. (2004). How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 459-493.
- Kopyra, M., Gwózdź, E. A. (2003). Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41(11), 1011-1017.
- Li, Q., Lancaster, J. R. (2013). Chemical foundations of hydrogen sulfide biology. *Nitric Oxide*, 35, 21-34.
- Li, Z. G. (2015). Chapter thirteen - Analysis of some enzymes activities of hydrogen sulfide metabolism in plants. *Methods in Enzymology*, 555, 253-269.
- Li, Z. G., Gong, M., Xie, H., Yang, L., Li, J. (2012). Hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide-induced heat tolerance in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) suspension cultured cells and involvement of Ca²⁺ and calmodulin. *Plant Science*, 185, 185-189.
- Li, Z. G., Xie, L. R., Li, X. J. (2015). Hydrogen sulfide acts as a downstream signal molecule in salicylic acid-induced heat tolerance in maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 177, 121-127.
- Lin, Y. T., Li, M. Y., Cui, W. T., Lu, W., Shen, W. B. (2012). Haem oxygenase-1 is involved in hydrogen sulfide-induced cucumber adventitious root formation. *Journal of Plant Growth Regulation*, 31(4), 519-528.
- Ma, J. F. (2007). Syndrome of aluminum toxicity and diversity of aluminum resistance in higher plants. *International Review of Cytology*, 264, 225-252.
- Ma, J. F., Shen, R., Nagao, S., Tanimoto, E. (2004). Aluminum targets elongating cells by reducing cell wall extensibility in wheat roots. *Plant and Cell Physiology*, 45(5), 583-589.
- Marciano, D. P. R. O., Ramos, F. T., Alvim, M. N., Magalhaes, J. R., França, M. G. C. (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(6), 885-891.
- Matsumoto, H. (2000). Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. *International Review of Cytology*, 200, 1-46.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9(10), 490-498.
- Modolo, L. V., Augusto, O., Almeida, I. M., 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(17), 3814-3820.
- 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 phaseolorum* f. sp. *meridionalis* elicitor. *Plant Physiology*, 130(3), 1288-1297.

- Motoda, H., Kano, Y., Hiragami, F., Kawamura, K., Matsumoto, H. (2010). Morphological changes in the apex of pea roots during and after recovery from aluminium treatment. *Plant and Soil*, 333(1-2), 49-58.
- Neill, S. J., Desikan, R., Hancock, J. T. (2003). Nitric oxide signaling in plants. *New Phytologist*, 159(1), 11-35.
- Nogueirol, R. C., Monteiro, F. A., Gratao, P. L., Borgo, L., Azevedo, R. A. (2015). Tropical soils with high aluminum concentrations cause oxidative stress in two tomato genotypes. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187(3), 1-16.
- ONU - Organização das Nações Unidas. (2013). World population projected to reach 9.6 billion by 2050. Disponível em:
<http://www.un.org/apps/news/story.asp?NewsID=45165&Cr=population&Cr1=#.Vr_U3vkrLIU> Acesso em: 20 jan. 2016.
- Tahara, K., Yamanoshita, T., Norisada, M., Hasegawa, I., Kashima, H., Sasaki, S., Kojima, K. (2008). Aluminum distribution and reactive oxygen species accumulation in root tips of two *Melaleuca* trees differing in aluminum resistance. *Plant and Soil*, 307(1-2), 167-178.
- Tanaka, A., Mulleriyawa, R. P., Yasu, T. (1968). Possibility of hydrogen sulfide induced iron toxicity of the rice plant. *Soil Science and Plant Nutrition*, 14(1), 1-6.
- Tian, Q. Y., Sun, D. H., Zhao, M. G., Zhang, W. H. (2007). Inhibition of nitric oxide synthase (NOS) underlies aluminum-induced inhibition of root elongation in *Hibiscus moscheutos*. *New Phytologist*, 174(2), 322-331.
- Wang, Y. S., Yang, Z. M. (2005). Nitric oxide reduces aluminum toxicity by preventing oxidative stress in the roots of *Cassia tora* L. *Plant and Cell Physiology*, 46(12), 1915-1923.
- Wang, Y., Li, L., Cui, W., Xu, S., Shen, W., Wang, R. (2012). Hydrogen sulfide enhances alfalfa (*Medicago sativa*) tolerance against salinity during seed germination by nitric oxide pathway. *Plant and Soil*, 351(1-2), 107-119.
- 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 and Food Chemistry*, 56(20), 9676-9684.
- 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(1), 199-208.
- Zhang, H., Hu, L. Y., Hu, K. D., He, Y. D., Wang, S. H., Luo, J. P. (2008). Hydrogen sulfide promotes wheat seed germination and alleviates oxidative damage against copper stress. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(12), 1518-1529.
- Zhang, H., Tan, Z. Q., Hu, L. Y., Wang, S. H., Luo, J. P., Jones, R. L. (2010). Hydrogen sulfide alleviates aluminum toxicity in germinating wheat seedlings. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(6), 556-567.
- Zhang, L., Pei, Y., Wang, H., Jin, Z., Liu, Z., Qiao, Z., Zhang, Y. (2015). Hydrogen sulfide alleviates cadmium-induced cell death through restraining ROS accumulation in roots of *Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 1-10.

Zhao, L., He, J., Wang, X., Zhang, L. (2008). Nitric oxide protects against polyethylene glycol-induced oxidative damage in two ecotypes of reed suspension cultures. *Journal of Plant Physiology*, 165(2), 182-191.

- Capítulo 1 -

Resistência à toxidez de alumínio pode ser mediada por gás sulfídrico em plântulas de sorgo

Resumo

Solos ácidos usualmente apresentam quantidades mais elevadas de alumínio (Al) na forma catiônica (Al^{3+}), o qual limita o crescimento e a produtividade vegetal. Plântulas de sorgo contrastantes quanto à tolerância ao Al^{3+} foram tratadas com um doador de gás sulfídrico (H_2S), antes de serem expostas ao Al^{3+} , para verificar se o H_2S liberado ameniza os danos impostos pelo estresse abiótico. O acúmulo de cálcio e de ferro foi severamente diminuído em raízes de plântulas sensíveis expostas a $40 \mu\text{M}$ de Al^{3+} , enquanto que o Al^{3+} afetou minimamente as raízes tolerantes. As atividades superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) aumentaram (pelo menos 5 vezes) apenas em raízes de plântulas sensíveis tratadas com Al^{3+} . O H_2S exógeno mitigou o efeito do Al^{3+} em raízes sensíveis restaurando a atividade de enzimas antioxidantes a níveis semelhantes aos de raízes-controle. Os níveis endógenos de H_2S foram mais elevados (2,4 vezes) em raízes tolerantes, em comparação às raízes sensíveis. A concentração de lignina em raízes tolerantes foi superior ao de raízes sensíveis, independentemente do tratamento. Os pré-tratamentos com liberador de H_2S , seguidos ou não da exposição ao Al^{3+} , provocaram diminuição nos níveis de lignina em raízes de ambos os genótipos. O Al^{3+} inibiu o desenvolvimento de raízes laterais em plântulas sensíveis sem afetar o aspecto de raízes tolerantes. O efeito tóxico do Al^{3+} sobre a morfologia de raízes sensíveis foi atenuado quando as plântulas foram previamente expostas ao doador de H_2S . Raízes de plântulas tolerantes exibiram níveis endógenos de H_2S maiores que os das sensíveis, além de não apresentarem sintomas decorrentes do estresse por Al^{3+} . Concluiu-se que a resistência do genótipo ATF10B ao Al^{3+} é mediada por H_2S , em razão de este genótipo apresentar maior teor endógeno de H_2S e não apresentar sintomas característicos de plântulas tratadas com Al^{3+} . A mitigação dos danos induzidos pelo Al^{3+} no genótipo ATF8B, após a exposição prévia ao H_2S , atesta o papel protetor do H_2S em plântulas de sorgo submetidas ao estresse por Al^{3+} .

1. Introdução

Em solos ácidos ($\text{pH} < 5,0$) a forma solúvel do alumínio (Al), Al^{3+} , é um dos principais fatores que restringe o crescimento e o desenvolvimento vegetal (Kochian, 1995). Os primeiros indícios da toxidez do Al^{3+} são detectados nas raízes minutos após a exposição ao metal (Kochian, 1995; Yamamoto et al., 2003; Horst et al., 2010).

O Al^{3+} diminui o alongamento radicular (Motoda et al., 2010) e provoca importantes alterações na arquitetura e na morfologia das raízes, tais como reduzida formação de pelos e raízes laterais, alteração na cor, engrossamento, atrofia e curvatura das raízes (Čiamporová, 2002), além de rupturas transversais na rizoderme e no córtex (Yamamoto et al., 2001; Kopittke et al., 2008). A diminuição no alongamento radicular e as rupturas são, possivelmente, consequência da ligação do Al^{3+} a componentes celulares, além do incremento da síntese de lignina que aumenta a rigidez da parede celular (Blancaflor et al., 1998; Blarney et al., 2004; Kopittke et al., 2008; Motoda et al., 2010). Dentro das células, este cátion pode reagir com macromoléculas e demais estruturas celulares, provocar disfunção mitocondrial e morte celular (Panda e Matsumoto, 2007).

As principais estratégias de defesa das plantas contra o Al^{3+} são a exclusão apoplástica e a tolerância simplástica. No mecanismo de exclusão as células radiculares exsudam ácidos orgânicos que complexam o metal, impedindo a sua entrada nas células. Já na tolerância simplástica ocorre a complexação dos ácidos orgânicos com Al presente no interior das células. O complexo formado (Al-ácido orgânico) é então transportado para vacúolos como forma de prevenir danos celulares (Kochian, 1995; Kochian et al., 2004, 2015).

O aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) é uma das primeiras respostas das plantas ao estresse por Al^{3+} , podendo resultar em sérios danos celulares (Boscolo et al., 2003; Meriga et al., 2004; Sharma e Dubey, 2007). As EROs são formas reduzidas do oxigênio molecular, produzidas regularmente pelo metabolismo celular, que incluem ânion superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$). Uma vez que as EROs podem oxidar constituintes celulares, as plantas possuem estratégias que permitem manter a produção destas moléculas em níveis toleráveis (Apel e Hirt, 2004). Quando em excesso, as EROs frequentemente são removidas pela ação do sistema antioxidante enzimático e não enzimático (Scandalios, 1993). Exemplos de enzimas do sistema antioxidante são a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) (Mittler, 2002). A ativação do sistema antioxidante é essencial à defesa das

plantas sob estresse por Al^{3+} , visto que controla a superprodução das EROs e, consequentemente, os níveis de lipídios peroxidados (Mittler, 2002; Wang e Yang, 2005).

O estímulo da atividade antioxidante, mediada pelo óxido nítrico (NO), tem sido reportado em plantas expostas a diversos tipos de estresse (Delledone, 1998; Sang et al., 2008; Singh et al., 2008), incluindo o estresse por Al^{3+} (Tian et al., 2007; Wang e Yang, 2005). O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa que se difunde livremente através das membranas (Corpas et al., 2004; Arasimowicz e Floryszak-Wieczorek, 2007). Este sinalizador celular participa de múltiplos processos tais como o estímulo à germinação, floração, movimento estomático e senescência (Magalhaes et al., 1999; Neill et al., 2003; Wilson et al., 2008). Ademais, o NO modula a resposta adaptativa de plantas a estresses bióticos e abióticos (Delledone, 2005; Zhao et al., 2008; Modolo, 2010; González et al., 2012; Zhang et al., 2008a; Sun et al., 2014). Em plantas sujeitas a concentrações tóxicas de Al^{3+} , o NO atua na diminuição do estresse oxidativo induzido pelo cátion (Wang e Yang, 2005), agindo diretamente na eliminação das EROs ou na intensificação da atividade de enzimas antioxidantes (Wang e Yang, 2005; Zhang et al., 2008a).

O gás sulfídrico (H_2S) é uma molécula que atravessa facilmente as membranas celulares e que por muito tempo foi considerada como uma toxina vegetal. Somente no final da década de 2000, Zhang et al. (2008b) demonstraram a ação sinalizadora do H_2S na germinação de sementes e na proteção de plantas contra os efeitos citotóxicos provocados pelo cobre. Desde então, é crescente o número de publicações sobre o papel sinalizador desta molécula em vários processos fisiológicos (Zhang et al., 2009, 2010, 2011; Chen et al., 2011). Também há relatos do efeito do H_2S na defesa de plantas contra estresses abióticos tais como seca, salinidade, altas temperaturas e estresse por metais (Li et al., 2012; Christou et al., 2013; Jin et al., 2013; Cui et al., 2014).

Diante deste cenário, o objetivo do presente estudo foi investigar o papel do H_2S na resposta de genótipos de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], com tolerância diferencial ao Al^{3+} , expostos a concentrações tóxicas deste metal.

2. Material e métodos

2.1. Material vegetal e condições de cultivo

Foram utilizados dois genótipos de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] com tolerância diferencial ao Al^{3+} (ATF8B, Al-sensível e ATF10B, Al-tolerante) provenientes do Programa de Melhoramento de Sorgo da Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas, MG).

A tolerância do genótipo ATF10B ao Al^{3+} é atribuída ao aumento significativo da expressão do gene *SbMATE*, induzida pelo cátion (Magalhaes et al., 2007; Sivaguru et al., 2013). No genótipo ATF8B a indução é muito baixa, o que o caracteriza como Al-sensível (Sivaguru et al., 2013). O gene *SbMATE* codifica um transportador de citrato localizado na membrana plasmática de células do ápice radicular. Acredita-se que em sorgo a liberação do ácido cítrico a partir das raízes seja crítica para a tolerância ao Al^{3+} .

Sementes dos genótipos ATF8B e ATF10B foram desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio 1% (v/v) por 15 min e posteriormente lavadas com água ultrapura. Em seguida as sementes foram colocadas para germinar em rolos de papel de filtro umedecidos com Nistatina[®] 0,2% (v/v). O material foi incubado em câmara de germinação a 25 °C com fotoperíodo de 12 h. Após três dias as plântulas foram selecionadas quanto ao tamanho e transferidas, em número de seis, para um sistema hidropônico constituído por recipientes de polietileno com capacidade de 500 mL contendo água ultrapura (**Figura 1**). As plântulas nesta fase e durante a imposição dos tratamentos foram mantidas em sala de crescimento a 30 °C, sob iluminação constante ($191 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por 4 dias.

Todas as vidrarias utilizadas nos experimentos foram previamente descontaminadas em solução de HCl 3,7% por 24 h, para remoção do Al adsorvido.



Figura 1. Plântulas de *Sorghum bicolor* em sistema hidropônico. Cada recipiente representa uma unidade amostral composta por seis plântulas.

2.2. Experimento 1: Avaliação dos efeitos do tratamento com Al^{3+} nos teores de nutrientes minerais e de moléculas sinalizadoras em genótipos de sorgo

2.2.1. Quantificação de alumínio em raízes e parte aérea

Para a determinação da concentração de alumínio, plântulas de ambos os genótipos, obtidas como descrito no item anterior, foram transferidas para um sistema hidropônico em recipientes de polietileno com capacidade de 500 mL com soluções de CaCl_2 200 μM (pH 4,0) contendo AlCl_3 nas concentrações de 0 (controle), 5, 10, 20, 40 ou 80 μM por 48 ou 96 h. Após exposição ao Al^{3+} raízes e parte aérea foram lavadas em água ultrapura e coletadas separadamente.

As amostras foram secas a 60 °C por 72 h. Em seguida, foram trituradas e pré-digeridas a frio com uma mistura de HNO_3 65% e H_2O_2 30% (1:1, v/v) por 48 h. Posteriormente, os sistemas foram aquecidos a 100 °C por 30 h. As soluções oriundas das digestões foram diluídas em água ultrapura para um volume final de 10 mL e analisadas em um espectrômetro de absorção óptica com plasma indutivamente acoplado (do inglês, ICP-OES) e os resultados expressos como μmol de Al por grama de massa seca (Machado, 2011).

Para as demais análises realizadas nesta pesquisa utilizou-se plântulas cultivadas exclusivamente com AlCl_3 40 μM em CaCl_2 200 μM (pH 4,0) por 48 h, por ter sido a condição experimental que proporcionou resultados contrastantes entre os genótipos.

2.2.2. Quantificação de nutrientes minerais em raízes e parte aérea

Ao final dos tratamentos com Al^{3+} (AlCl_3 0 e 40 μM em CaCl_2 200 μM por 48 h) as amostras foram lavadas em água ultrapura, coletadas e secas a 60 °C por 72 h. Posteriormente foram trituradas e digeridas, conforme descrito no item anterior, e analisadas em ICP-OES para determinação da concentração de Ca, Fe, K, Mg, Mn e P (Machado, 2011).

2.2.3. Quantificação de H_2S , NO e H_2O_2 em raízes

As concentrações de H_2S , NO e H_2O_2 foram determinadas imediatamente após 48 h de incubação com AlCl_3 a 0 ou 40 μM em CaCl_2 200 μM (pH 4,0). Para tanto, as raízes (60-100 mg) foram lavadas em água ultrapura, coletadas e maceradas em nitrogênio líquido. Em

seguida, adicionou-se tampão fosfato 50 mM (pH 6,8) ao macerado e procedeu-se a avaliação do teor das moléculas em um analisador de radicais livres de quatro canais, modelo TBR4100 (World Precision Instruments, Estados Unidos). Curvas padrão de H₂S, NO e H₂O₂ foram construídas a partir de soluções de Na₂S, *S*-nitroso-*N*-acetil penicilamina (SNAP) e H₂O₂, respectivamente. As análises de cada molécula foram conduzidas segundo instruções do fabricante.

2.3. Experimento 2: Avaliação dos efeitos do gás sulfídrico na amenização do estresse provocado pelo alumínio em genótipos de sorgo

Após 3 dias em sistema hidropônico, conforme descrito no item 2.1, as plântulas foram submetidas a um pré-tratamento com diferentes concentrações de sulfeto de sódio (Na₂S, liberador de H₂S) em H₂O ultrapura por 24 h (pH 6,5). Em seguida, deu-se início aos tratamentos com Al³⁺ 0 e 40 µM (pH 4,0) por 48 h, como descrito abaixo:

Pré-tratamento (pH 6,5; 24 h)	Tratamento (pH 4,0; 48 h)
1) H ₂ O ultrapura	CaCl ₂ 200 µM (controle)
2) H ₂ O ultrapura	AlCl ₃ 40 µM
3) Na ₂ S 25 µM	CaCl ₂ 200 µM
4) Na ₂ S 25 µM	AlCl ₃ 40 µM
5) Na ₂ S 50 µM	CaCl ₂ 200 µM
6) Na ₂ S 50 µM	AlCl ₃ 40 µM
7) Na ₂ S 100 µM	CaCl ₂ 200 µM
8) Na ₂ S 100 µM	AlCl ₃ 40 µM

Ao final dos tratamentos, as raízes foram lavadas, coletadas e analisadas imediatamente a fresco (**Figura 2**) ou congeladas em nitrogênio líquido para análises posteriores.

As análises de aminoácidos e detecção de células mortas foram realizadas somente em plântulas pré-tratadas com Na₂S 50 µM, visto que esta concentração proporcionou resultados contrastantes entre os genótipos nas análises executadas previamente.

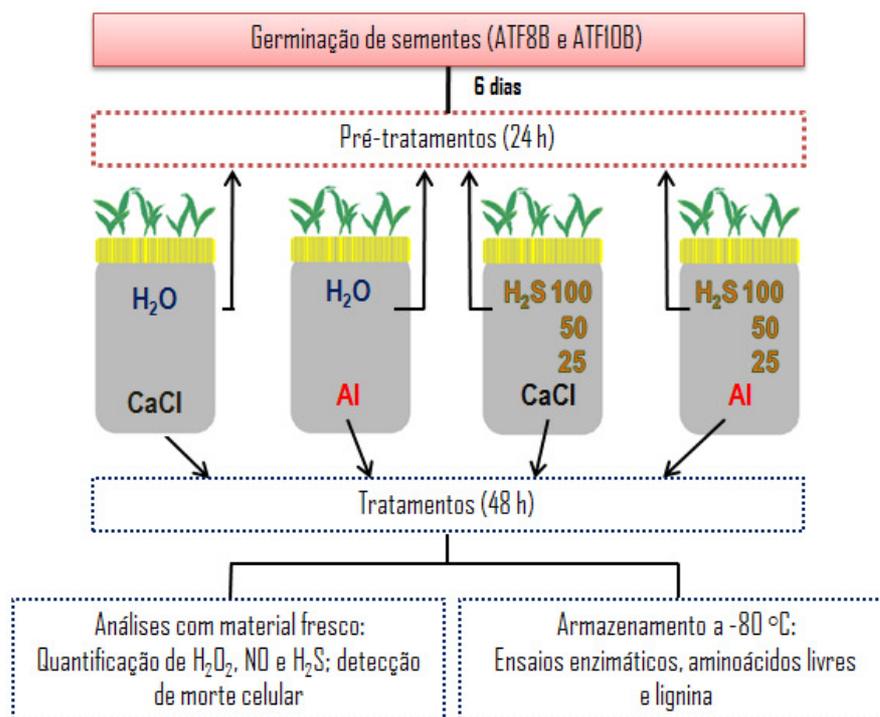


Figura 2. Representação esquemática do experimento de imposição do estresse por Al^{3+} em plântulas de *Sorghum bicolor*.

2.3.1. Atividade de enzimas do sistema antioxidante em raízes

Amostras de raízes (200 mg) foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em tampão fosfato 50 mM (pH 6,8) contendo ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) 100 μM , polivinilpirrolidona (PVPP) 10% (m/v) e coquetel inibidor de protease. Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 x g e 4 °C por 15 min. A atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) foi determinada nos sobrenadantes.

A atividade da SOD foi determinada de acordo com Giannopolitis e Ries (1977), com modificações. Alíquotas dos extratos enzimáticos foram adicionadas a um meio de reação constituído por tampão fosfato 50 mM (pH 7,8), EDTA 100 μM , azul de nitro-tetrazólio (NBT) 75 μM , L-metionina 13 mM e riboflavina 2 μM . As reações foram incubadas em uma câmara equipada com uma lâmpada de 15 W. Reações-controle foram mantidas na ausência de luz. A produção de azul de formazana decorrente da fotorredução do NBT foi verificada a 575 nm, após 10 min. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a fotorredução do NBT em 50% (Beauchamp e Fridovich, 1971). Os resultados foram expressos em $\text{U min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína.

A atividade da APX foi determinada de acordo com Nakano e Asada (1981). Alíquotas do extrato foram adicionadas ao tampão fosfato 50 mM (pH 6,0) contendo ácido ascórbico 1 mM e H₂O₂ 2 mM. A taxa de oxidação do ascorbato foi monitorada a 290 nm por 5 min e a atividade APX determinada utilizando o coeficiente de absorvidade molar (ϵ) igual a 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹. Os resultados foram expressos em μ mol de ascorbato min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

Para determinar a atividade CAT, os extratos foram adicionados ao tampão fosfato 50 mM (pH 6,8) contendo H₂O₂ 12,5 mM. A decomposição de H₂O₂ foi monitorada a 240 nm e a atividade CAT foi estimada a partir do ϵ igual a 39,4 mM⁻¹ cm⁻¹ (Cakmak e Horst, 1991). Os resultados foram expressos em mmol de H₂O₂ min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

2.3.2. Dosagem de proteínas totais

A concentração de proteínas totais nos extratos foi estimada pelo método de coloração com *Coomassie blue* utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão (Bradford et al., 1976).

2.3.3 Quantificação de lignina

A extração da parede celular foi realizada como descrito por Tokunaga et al. (2005). Amostras de raízes (100 mg) foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 1 mL de etanol 95% e centrifugadas a 8.000 x g por 5 min. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados extraídos três vezes com 1,5 mL de etanol 95% e duas vezes com 1,5 mL de etanol/hexano (1:2, v/v). Os precipitados foram secos *overnight* a 70 °C em estufa de circulação forçada de ar para a determinação da massa seca da parede celular. A extração e quantificação de lignina foram feitas de acordo com Fukushima e Kerley (2011). Amostras de parede celular (10 mg) foram tratadas com 1 mL de brometo de acetila 25% em ácido acético (v/v) a 50 °C por 2 h. Após resfriamento, os sistemas foram centrifugados à temperatura ambiente a 8.000 x g por 10 min. Solução de ácido acético contendo NaOH 0,3 M e hidroxilamina 0,3 M foi adicionada aos sobrenadantes e a mistura foi centrifugada a 10.000 x g por 5 min. A absorbância do sobrenadante resultante foi verificada a 280 nm e o conteúdo de lignina calculado a partir da fórmula $X = (Y - 0,0009)/23,077$, onde X é a concentração de lignina (mg mL⁻¹) e Y é a densidade óptica da amostra (Fukushima e Kerley, 2011). Os resultados foram expressos em mg de lignina g⁻¹ de massa seca de parede celular.

2.3.4. Quantificação de aminoácidos livres totais

Esta análise foi conduzida somente com plântulas pré-tratadas com Na₂S 50 µM, obtidas conforme item 2.3, porque nas análises executadas previamente esta concentração proporcionou resultados distintos entre os genótipos.

Raízes (60-100 mg) foram maceradas em nitrogênio líquido e extraídas duas vezes com uma mistura de metanol/clorofórmio/água (MCA; 12:5:3, v/v). A cada extração os homogenatos foram centrifugados a 3.000 x g a temperatura ambiente por 10 min. Os sobrenadantes foram combinados para formar o extrato MCA. Os precipitados resultantes foram extraídos três vezes com etanol 80% e os sobrenadantes combinados, formando o extrato etanólico. Adicionou-se ao extrato MCA uma mistura de clorofórmio e água (1:1,5; v/v). A fase aquosa foi coletada e combinada com o extrato etanólico para liofilização e avaliação do conteúdo de aminoácidos (Bielecki e Turner, 1966). Alíquotas das amostras, após serem ressuspensas em água ultrapura, foram adicionadas ao tampão citrato 0,2 M (pH 5,0) contendo ninhidrina 5% e cianeto de potássio 0,2 M, os dois últimos preparados em 2-metoxietanol (m/v). As reações foram incubadas a 100 °C por 15 min. Após resfriamento adicionou-se etanol 60% a cada sistema e em seguida procedeu-se da leitura de absorbância a 570 nm (Yemm e Cocking, 1995). Os resultados foram expressos em termos de mg de aminoácidos g⁻¹ de massa seca e utilizou-se leucina como padrão

2.3.5. Detecção de células mortas

A detecção de células mortas foi realizada com plântulas expostas exclusivamente ao pré-tratamento com Na₂S 50 µM, como a mesma justificativa apresentada no item 2.3.4.

Ao final dos tratamentos as raízes foram lavadas e cortadas transversalmente, a aproximadamente 0,5 cm a partir do ápice radicular. Os ápices foram incubados em solução de azul de Evans 0,025% preparada em CaCl₂ 100 µM (m/v; pH 5,6) por 10 min (Yamamoto et al., 2001). Em seguida, foram lavados com CaCl₂ 100 µM para remoção de reagente livre, observados em estereomicroscópio e fotografados (Yamamoto et al., 2001).

A intensidade da coloração azul no tecido é diretamente proporcional à mortalidade celular, já que o corante é incorporado somente por células mortas em razão de terem perdido a seletividade da membrana.

2.4. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental empregado em todos os experimentos foi o de blocos casualizados, em esquema fatorial, com no mínimo três repetições. Para avaliar o efeito dos tratamentos com Al^{3+} sobre o acúmulo do metal nos tecidos vegetais utilizou-se o fatorial 2 x 6 x 2 (dois genótipos de sorgo, seis concentrações de Al^{3+} e dois tempos de exposição). Para avaliar o efeito do Al^{3+} sobre a concentração de nutrientes e de moléculas sinalizadoras utilizou-se o fatorial 2 x 2 (dois genótipos e duas concentrações de Al^{3+}). Para determinar o efeito do doador de H_2S na atividade das enzimas do sistema antioxidante e nos níveis de lignina empregou-se o fatorial 2 x 4 x 2 (dois genótipos, quatro concentrações de Na_2S e duas concentrações de Al^{3+}). Para avaliar o efeito do H_2S na concentração de aminoácidos livres adotou-se o esquema fatorial 2 x 2 x 2 (dois genótipos, duas concentrações de Na_2S e duas concentrações de Al^{3+}). Após verificar a normalidade dos dados procedeu-se a análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade. As análises foram conduzidas com os softwares R e Sisvar.

3. Resultados

3.1. Concentração de alumínio em raízes e parte aérea de plântulas expostas ao Al^{3+}

Após 48 h e 96 h de exposição ao Al^{3+} , verificou-se aumento significativo nos níveis deste elemento nas raízes de ambos os genótipos, em comparação com os seus respectivos controles (**Figura 3**). A concentração máxima de Al ($75 \mu\text{mol g}^{-1}$ MS) foi detectada no genótipo tolerante após exposição a $80 \mu\text{M}$ de Al^{3+} por 48 h (**Figura 3**). A concentração de Al nas raízes do genótipo tolerante (ATF10B) foi 32%, 47% e 26% maior que aquele de raízes do genótipo sensível (ATF8B) após 48 h de tratamento com $20 \mu\text{M}$, $40 \mu\text{M}$ e $80 \mu\text{M}$ de Al^{3+} , respectivamente (**Figura 3**). Nenhuma diferença significativa foi detectada na concentração deste metal em ambos os genótipos após 96 h de tratamento, independentemente das concentrações de Al^{3+} testadas (**Figura 3**).

A concentração de Al na parte aérea de plântulas tratadas com o metal foi 7 e 14 vezes maior em comparação com os controles, após 48 h e 96 h de tratamento, respectivamente (**Figura 3**). Analisando a parte aérea dos genótipos somente a exposição a $5 \mu\text{M}$ de Al^{3+} por 48 h proporcionou diferenças significativas no acúmulo do metal, tendo o genótipo tolerante

acumulado 2,8 vezes mais Al do que o sensível (**Figura 3**). Os níveis médios de Al detectados nos controles de raízes e parte aérea de ambos os genótipos não excederam $15 \mu\text{mol g}^{-1}$ MS e $1,5 \mu\text{mol g}^{-1}$ MS, respectivamente (**Figura 3**).

O tratamento com Al^{3+} $40 \mu\text{M}$ por 48 h foi utilizado nos demais experimentos por ter sido a condição experimental que proporcionou maior diferença na concentração deste cátion nas raízes dos genótipos estudados (**Figura 3**).

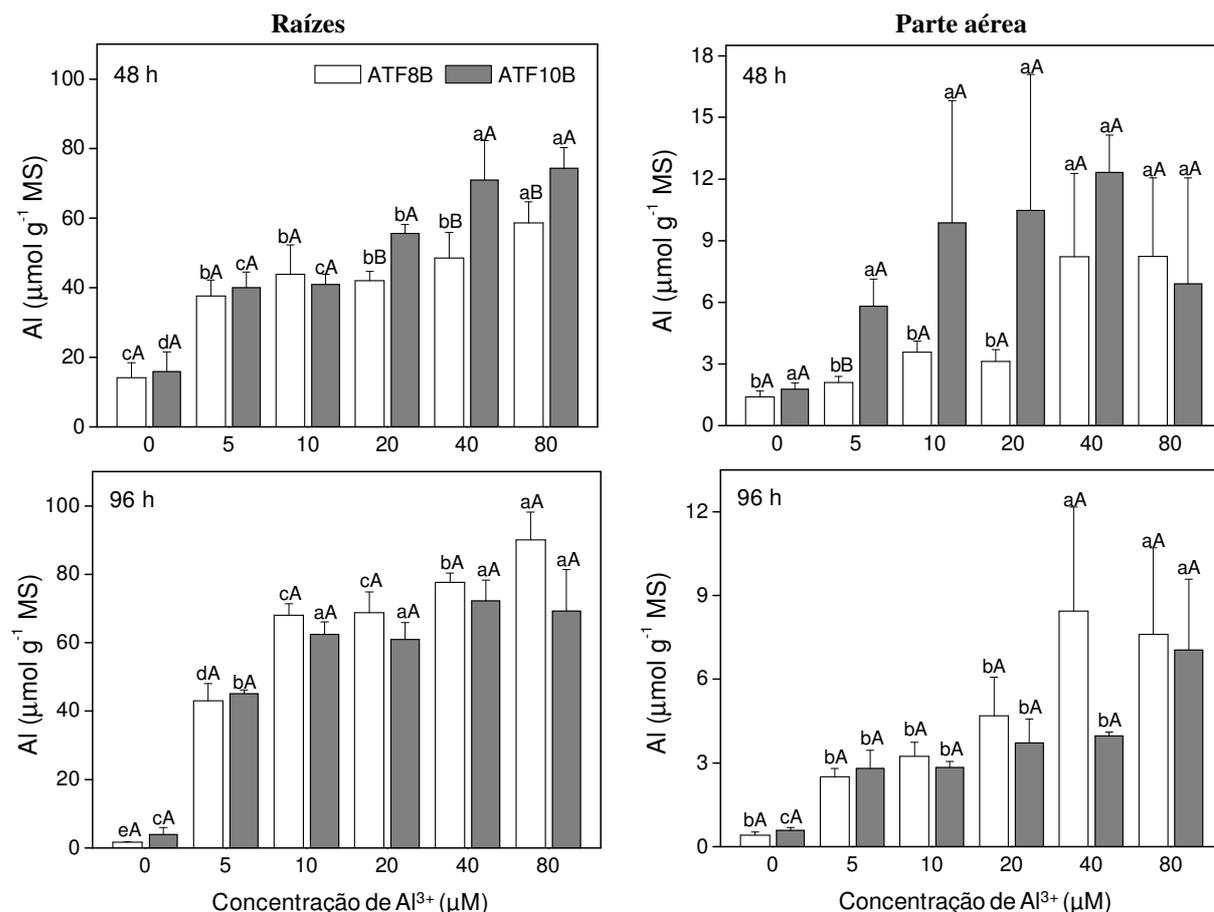


Figura 3. Concentração de Al em raízes e parte aérea de *Sorghum bicolor* (ATF8B, Al-sensível e ATF10B, Al-tolerante) em resposta ao tratamento com Al^{3+} . Plântulas foram hidroponicamente expostas a diferentes concentrações de Al^{3+} em CaCl_2 $200 \mu\text{M}$ (pH 4,0) por 48 h ou 96 h, após os quais, raízes e parte aérea foram coletadas para análises. MS, massa seca. Letras minúsculas distintas indicam diferenças entre os tratamentos com Al^{3+} para um mesmo genótipo, enquanto letras maiúsculas distintas indicam diferenças entre os genótipos para um mesmo tratamento ($P < 0,05$). Média \pm desvio padrão ($n = 3$).

3.2. Efeito do Al^{3+} na concentração de alguns nutrientes minerais em raízes e parte aérea

A concentração de Ca em raízes sensíveis tratadas com Al^{3+} foi 70% menor que aquela de raízes-controle, enquanto que em raízes tolerantes houve uma diminuição de apenas 13%. O tratamento com Al^{3+} diminuiu o acúmulo de Fe em 40% nas raízes do genótipo Al-

sensível em relação ao controle (**Tabela 1**). Em contraste, nenhuma alteração significativa deste nutriente ocorreu em raízes tolerantes (**Tabela 1**). Adicionalmente, a exposição ao Al^{3+} resultou na queda de 40% nos níveis de Ca na parte aérea de plântulas sensíveis ao elemento (**Tabela 1**). O Al^{3+} não afetou a concentração dos demais nutrientes analisados (K, Mg, Mn e P).

Tabela 1. Efeito do Al^{3+} sobre a concentração de alguns nutrientes minerais em *Sorghum bicolor*.

Nutriente ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MS)	Raízes			
	ATF8B (Al-sensível)		ATF10B (Al-tolerante)	
	Controle	Al^{3+}	Controle	Al^{3+}
Ca	93,95 \pm 25,02 ^{aA}	26,72 \pm 5,06 ^{bA}	97,30 \pm 6,82 ^{aA}	84,19 \pm 4,13 ^{bB}
Fe	1,77 \pm 0,45 ^{aA}	1,04 \pm 0,05 ^{bA}	2,26 \pm 0,71 ^{aA}	2,15 \pm 0,27 ^{aB}
K	185,48 \pm 12,77 ^{ns}	188,43 \pm 23,6 ^{ns}	170,68 \pm 23,72 ^{ns}	178,15 \pm 13,73 ^{ns}
Mg	26,72 \pm 4,12 ^{ns}	25,23 \pm 4,69 ^{ns}	24,38 \pm 3,53 ^{ns}	25,20 \pm 2,02 ^{ns}
Mn	0,11 \pm 0,02 ^{ns}	0,10 \pm 0,04 ^{ns}	0,09 \pm 0,01 ^{ns}	0,13 \pm 0,03 ^{ns}
P	131,01 \pm 9,96 ^{ns}	125,36 \pm 9,04 ^{ns}	145,58 \pm 27,70 ^{ns}	134,01 \pm 24,66 ^{ns}
Nutriente ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MS)	Parte aérea			
	ATF8B (Al-sensível)		ATF10B (Al-tolerante)	
	Controle	Al^{3+}	Controle	Al^{3+}
Ca	108,40 \pm 9,62 ^{aA}	65,85 \pm 22,25 ^{bA}	99,62 \pm 38,32 ^{aA}	78,19 \pm 28,48 ^{aA}
Fe	1,87 \pm 0,51 ^{aA}	1,82 \pm 0,5 ^{aA}	3,23 \pm 2,35 ^{aA}	8,49 \pm 3,46 ^{aB}
K	173,23 \pm 0,69 ^{ns}	182,36 \pm 30,56 ^{ns}	156,65 \pm 10,61 ^{ns}	240,28 \pm 88,73 ^{ns}
Mg	91,84 \pm 8,40 ^{ns}	102,74 \pm 14,38 ^{ns}	91,77 \pm 5,57 ^{ns}	107,83 \pm 31,64 ^{ns}
Mn	0,48 \pm 0,03 ^{ns}	0,50 \pm 0,08 ^{ns}	0,48 \pm 0,03 ^{ns}	0,62 \pm 0,20 ^{ns}
P	163,48 \pm 12,10 ^{ns}	164,15 \pm 23,16 ^{ns}	163,52 \pm 14,86 ^{ns}	179,82 \pm 58,55 ^{ns}

Plântulas foram hidroponicamente expostas a CaCl_2 200 μM contendo Al^{3+} 0 μM (controle) ou 40 μM (pH 4,0) por 48 h, após os quais, raízes e parte aérea foram coletadas para análises. Médias seguidas por letras minúsculas distintas indicam diferenças entre os tratamentos em um mesmo genótipo, enquanto letras maiúsculas distintas indicam diferenças entre os genótipos para um mesmo tratamento ($P < 0,05$). MS, massa seca; ns = não significativo. Média \pm desvio padrão (n=3).

3.3. Concentração de H_2O_2 , NO e H_2S em raízes de sorgo expostas ao Al^{3+}

Em plântulas-controle, o genótipo tolerante (ATF10B) apresentou concentração de H_2S 2,4 vezes maior que aquela encontrada no genótipo sensível (ATF8B) (**Tabela 2**). O tratamento com Al^{3+} diminuiu os níveis de H_2S em 66% nas raízes sensíveis ao Al^{3+} , enquanto que os níveis desta molécula permaneceram inalterados no genótipo tolerante, na presença do referido cátion (**Tabela 2**). Os níveis de H_2O_2 e NO foram similares nas plântulas-controle de ambos os genótipos. Porém, o teor de NO diminuiu 38% em raízes sensíveis tratadas com

Al³⁺, em comparação ao controle (**Tabela 2**). Em contraste, o tratamento com Al³⁺ não afetou significativamente os níveis de NO no genótipo tolerante (**Tabela 2**). Em relação ao H₂O₂, ambos os genótipos apresentaram aumento significativo nos níveis desta molécula após a exposição ao Al³⁺, quando comparados aos controles. Contudo, a concentração de H₂O₂ em raízes do genótipo sensível foi 32% maior que aquele do tolerante (**Tabela 2**).

Tabela 2. Efeito do Al³⁺ nos níveis de H₂S, NO e H₂O₂ em raízes de *Sorghum bicolor*.

Molécula	ATF8B (Al-sensível)		ATF10B (Al-tolerante)	
	Controle	Al ³⁺	Controle	Al ³⁺
H ₂ S (nmol g ⁻¹ MS)	484,8 ± 148,5 ^{aA}	162,7 ± 67,8 ^{bA}	1.168,3 ± 541,6 ^{aB}	1.226,8 ± 444,8 ^{aB}
NO (nmol g ⁻¹ MS)	456,5 ± 112,3 ^{aA}	284,1 ± 47,7 ^{bA}	432,4 ± 223,9 ^{aA}	241,4 ± 85,9 ^{aA}
H ₂ O ₂ (µmol g ⁻¹ MS)	556,6 ± 49,2 ^{aA}	816,0 ± 27,7 ^{bA}	473,9 ± 74,7 ^{aA}	617,4 ± 88,5 ^{bB}

Plântulas foram hidroponicamente expostas a CaCl₂ 200 µM contendo Al³⁺ 0 µM (controle) ou 40 µM (pH 4,0) por 48 h, após os quais, as raízes foram coletadas para análises. Médias seguidas por letras minúsculas distintas indicam diferenças entre os tratamentos em um mesmo genótipo, enquanto letras maiúsculas distintas indicam diferenças entre os genótipos para um mesmo tratamento ($P < 0,05$). MS, massa seca. Média ± desvio padrão (n=4).

3.4. Efeito do Al³⁺ e do H₂S sobre a atividade de enzimas antioxidantes

A atividade das enzimas SOD, APX e CAT nas raízes de plântulas-controle (H₂O/Ca) foi similar nos dois genótipos de sorgo (**Figura 4**). Após o tratamento com Al³⁺, as atividades SOD, APX e CAT aumentaram de 5 a 6 vezes em raízes sensíveis (ATF8B) em comparação com os controles (**Figura 4**). Entretanto, o pré-tratamento destas raízes com doador de H₂S conteve o aumento da atividade de todas as enzimas outrora induzido pelo Al³⁺ (**Figura 4**). Em raízes tolerantes, a atividade da APX dobrou após o tratamento com Al³⁺. A incubação prévia com liberador de H₂S restabeleceu a atividade APX aos níveis do controle em raízes tolerantes posteriormente tratadas com Al³⁺ (**Figura 4**). Os pré-tratamentos com Na₂S 25, 50 e 100 µM (S 25/Ca, S 50/Ca e S 100/Ca) também incrementaram a atividade da APX em 80% somente em raízes Al-tolerantes (ATF10B) (**Figura 4**). Apenas o tratamento com doador de H₂S 50 µM seguido do tratamento com Al³⁺ (S 50/Al) proporcionou diferenças significativas entre os genótipos (maior em raízes sensíveis) na atividade das enzimas (**Figura 4**).

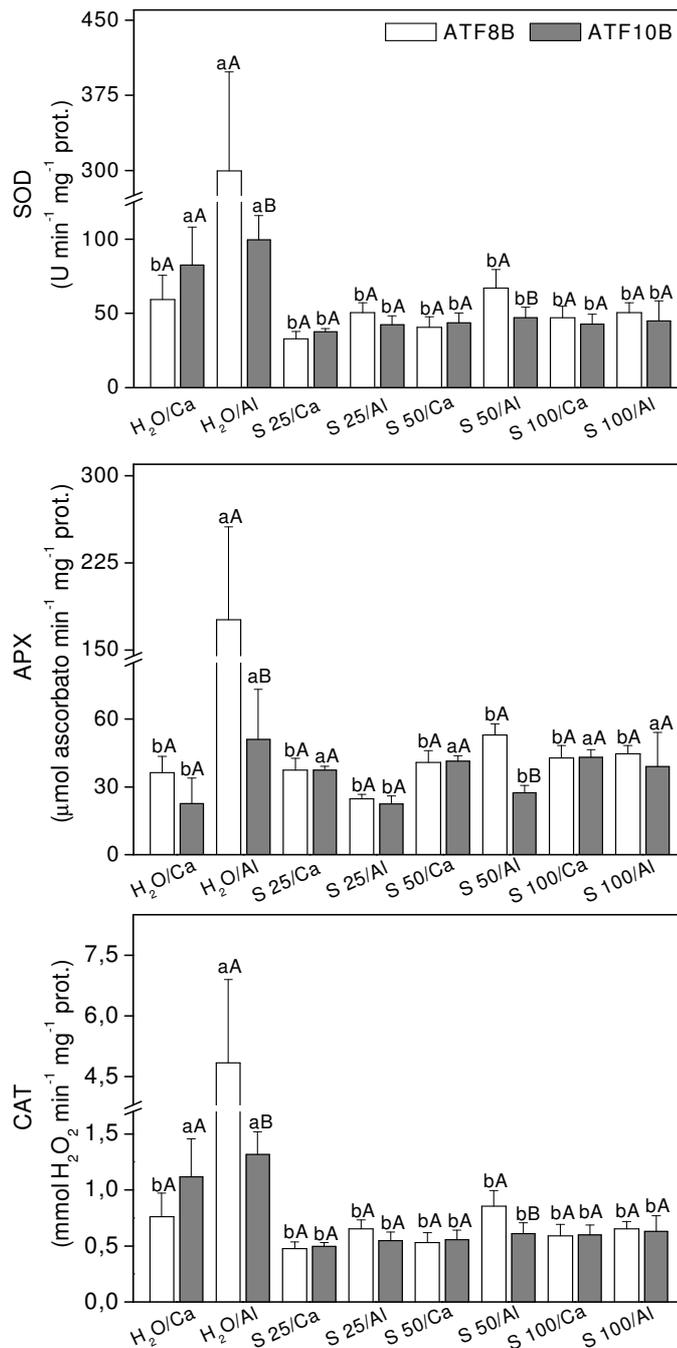


Figura 4. Efeito do H₂S sobre a atividade de enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) em raízes de genótipos de *Sorghum bicolor* (ATF8B, Al-sensível e ATF10B, Al-tolerante). Plântulas foram pré-tratadas com doador de Na₂S (0, 25, 50 ou 100 μM) por 24 h (soluções descritas antes das barras) seguido dos tratamentos com CaCl₂ 200 μM (pH 4,0; controle) ou Al³⁺ 40 μM em CaCl₂ 200 μM (pH 4,0) por 48 h. S, Na₂S; Al, AlCl₃; Ca, CaCl₂. Letras minúsculas distintas indicam diferenças entre os tratamentos para o mesmo genótipo, enquanto letras maiúsculas distintas indicam diferenças entre os genótipos para o mesmo tratamento ($P < 0,05$). Média ± desvio padrão (n=4).

3.5. Efeito do H₂S sobre a concentração de lignina

Foram observados níveis basais de lignina em raízes do genótipo tolerante (H₂O/Ca) em torno de 4 vezes superiores aqueles de raízes do genótipo sensível (**Figura 5**). O

tratamento com Al^{3+} não afetou a concentração de lignina nos genótipos avaliados. O pré-tratamento das plantas sensíveis (ATF8B) com doador de H_2S a 25 ou 50 μM resultou em diminuição no acúmulo de lignina (70%). De modo semelhante, a concentração de lignina em raízes tolerantes (ATF10B) pré-tratadas com doador de H_2S 25 μM e 100 μM foi 47 % menor do que aquele encontrado em plântulas-controle (**Figura 5**).

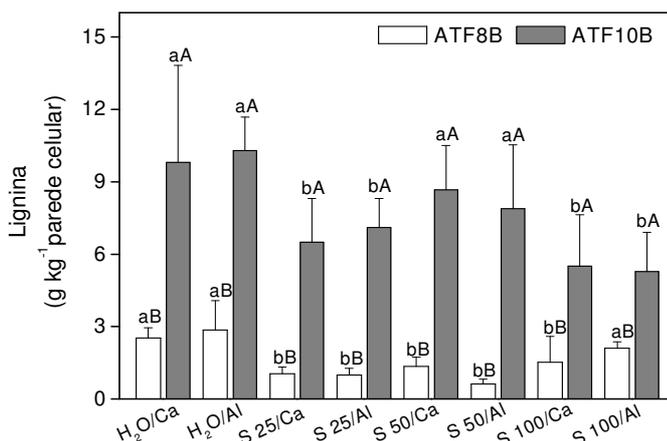


Figura 5. Influência do H_2S sobre a concentração de lignina em raízes de genótipos de *Sorghum bicolor* (ATF8B, Al-sensível e ATF10B, Al-tolerante). Plântulas foram pré-tratadas com doador de Na_2S (0, 25, 50 ou 100 μM) por 24 h (na figura são as soluções descritas antes das barras) seguido dos tratamentos com CaCl_2 200 μM (pH 4,0; controle) ou Al^{3+} 40 μM em CaCl_2 200 μM (pH 4,0) por 48 h. **S**, Na_2S ; **Al**, AlCl_3 ; **Ca**, CaCl_2 . Letras minúsculas distintas indicam diferenças entre os tratamentos para o mesmo genótipo, enquanto letras maiúsculas distintas indicam diferenças entre os genótipos para o mesmo tratamento ($P < 0,05$). Média \pm desvio padrão (n=4).

3.6. Efeito do H_2S nos níveis de aminoácidos livres

Considerando que o pré-tratamento com Na_2S 50 μM e posterior exposição ao Al^{3+} (S 50/Al) proporcionou respostas diferenciais na atividade enzimática entre os genótipos (**Figura 4**), esta concentração foi selecionada para avaliar o efeito do H_2S nos níveis de aminoácidos livres. Raízes-controle ($\text{H}_2\text{O}/\text{Ca}$) de ambos os genótipos apresentaram concentração similar de aminoácidos livres ($5,8 \pm 0,1 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$, em média; **Figura 6**). O tratamento com Al^{3+} não afetou estes valores em nenhum dos genótipos. O pré-tratamento das plântulas tolerantes (ATF10B) com Na_2S 50 μM , expostas ou não ao Al^{3+} (S 50/Ca e S 50/Al), contudo, levou ao decréscimo dos níveis de aminoácidos livres em 43% (**Figura 6**).

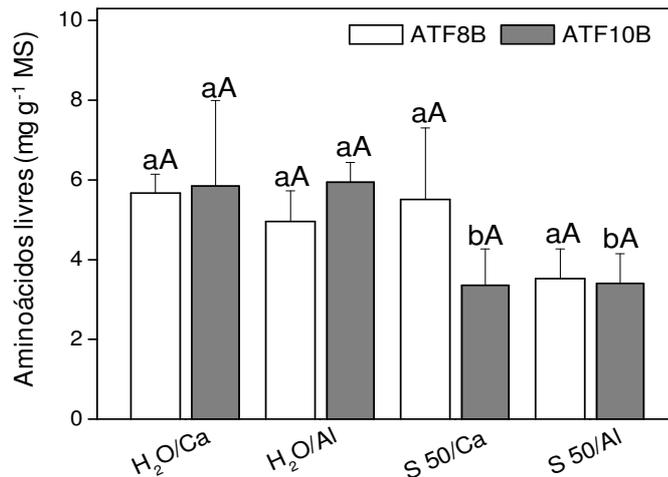


Figura 6. Aminoácidos livres totais em raízes de genótipos de *Sorghum bicolor* (ATF8B, Al-sensível e ATF10B, Al-tolerante) pré-tratados com doador de H₂S 50 µM por 24 h (soluções descritas antes das barras) seguido da incubação com CaCl₂ 200 µM (pH 4,0) contendo ou não Al³⁺ 40 µM por 48 h. Letras minúsculas distintas indicam diferenças entre os tratamentos para o mesmo genótipo, enquanto letras maiúsculas distintas indicam diferenças entre os genótipos para um mesmo tratamento ($P < 0,05$). MS, massa seca; S 50, Na₂S 50 µM; Ca, CaCl₂; Al, AlCl₃. Média ± desvio padrão (n=4).

3.7. Efeito do Al³⁺ na viabilidade celular

Raízes de ambos os genótipos apresentaram coloração azul, indicativa de células mortas, especialmente na região distal do ápice (**Figura 7**). Aparentemente, nenhum dos tratamentos afetou de modo expressivo a viabilidade celular nos dois genótipos de sorgo avaliados, dada a intensidade azul semelhante entre raízes oriundas de diferentes tratamentos (**Figura 7**). Plântulas-controle (H₂O/Ca²⁺) e aquelas tratadas com H₂S (H₂S/Ca²⁺) do genótipo sensível apresentaram primórdios radiculares desenvolvidos. O tratamento de plântulas sensíveis com Al³⁺ inibiu o crescimento de raízes laterais que se apresentaram pouco desenvolvidas ou ausentes, espessamento apical ($\approx 1-1,5$ mm a partir do ápice) e estrangulamento em regiões distais do ápice ($\approx 2-3$ mm a partir do ápice). O tratamento com H₂S seguido de exposição ao Al³⁺ (H₂S/Al³⁺) conferiu às raízes sensíveis um padrão de desenvolvimento dos primórdios radiculares intermediário entre os tratamentos controle (H₂O/Ca²⁺) e com H₂S apenas (H₂S/Ca²⁺). Em geral, os tratamentos não afetaram a morfologia de raízes tolerantes ao Al³⁺ (**Figura 7**).

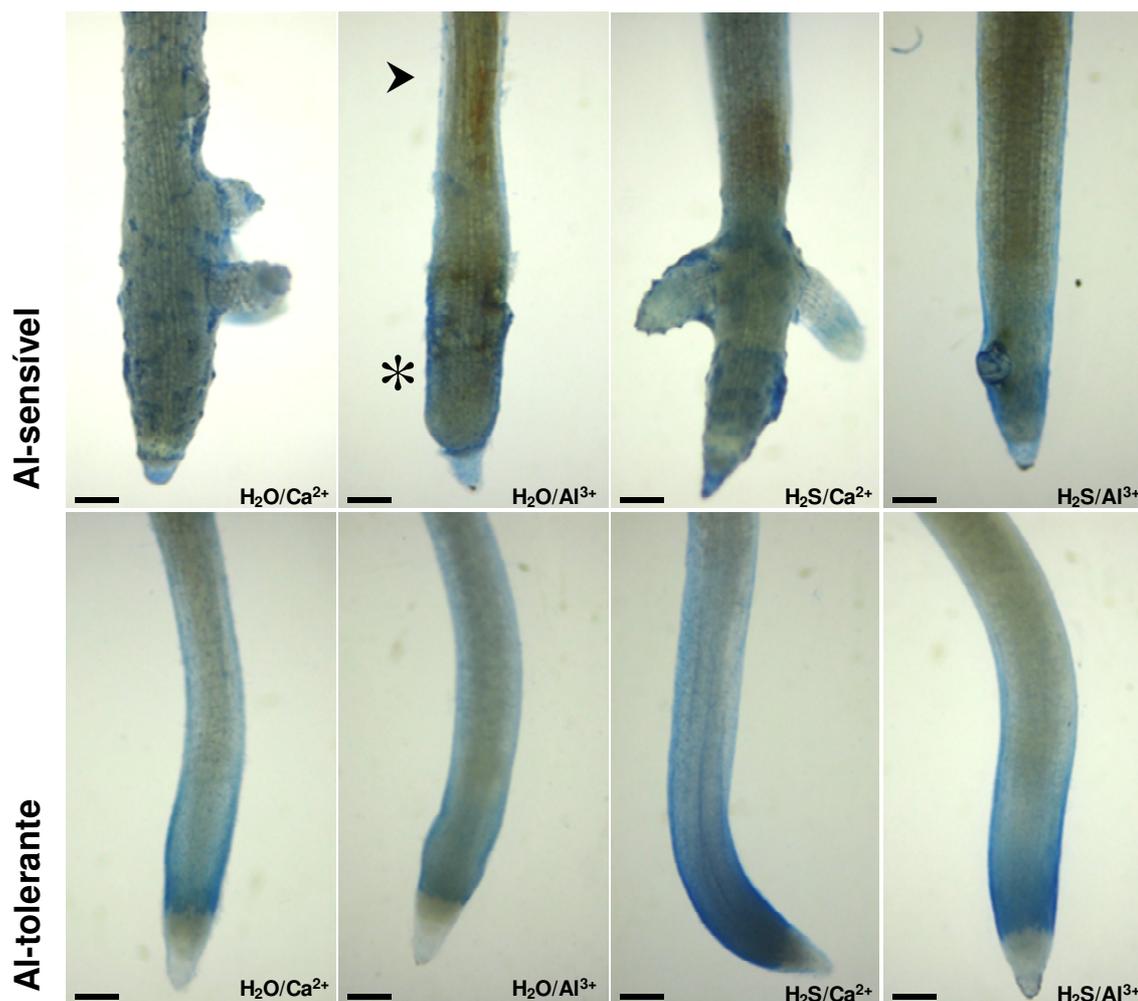


Figura 7. Efeito do H₂S na viabilidade de células radiculares de genótipos de *Sorghum bicolor* (Al-sensível, ATF8B e Al-tolerante, ATF10B) expostos ao Al³⁺. Plântulas foram pré-tratadas com doador de H₂S (Na₂S 0 ou 50 μM, pH 6,0) por 24 h seguido pela incubação com CaCl₂ 200 μM (pH 4,0) contendo Al³⁺ (0 ou 40 μM; pH 4,0) por 48 h. A intensidade da coloração azul é proporcional ao número de células mortas. Barras = 250 μm; n = 6. * indica espessamento apical; ➤ indica estrangulamento do ápice.

4. Discussão

Os maiores níveis de Al foram observados em raízes do genótipo tolerante (ATF10B) em relação ao genótipo sensível (ATF8B), após 48 h de exposição ao cátion, mas nenhuma diferença foi detectada após 96 h (**Figura 3**), indicando que o genótipo tolerante absorve mais rapidamente o Al. Nenhuma diferença no acúmulo de Al foi encontrada nos genótipos de sorgo BR006R, (Al-tolerante) e BR007A (Al-sensível) (Pereira et al., 2008) e de arroz Fernandes (Al-tolerante) e Maravilha (Al-sensível) (Justino et al., 2006) expostos ao Al³⁺. Entretanto, segundo Matsumoto (2000), a sensibilidade de plantas ao Al³⁺ é diretamente proporcional à concentração deste metal nos tecidos radiculares. Os resultados aqui

apresentados sugerem que a velocidade de absorção de Al por raízes de sorgo tolerantes (ATF10B) é maior que aquela exibida por raízes sensíveis (ATF8B).

A sensibilidade do genótipo ATF8B ao Al^{3+} foi evidenciada com a diminuição considerável de Ca e Fe nos tecidos, em comparação com as concentrações detectadas em plântulas-controle (**Tabela 1**). O Al^{3+} apresenta alta afinidade por componentes da parede e membrana celulares (Matsumoto, 2000). Estudos indicam que o Al^{3+} compete por canais de Ca^{2+} (Huang et al., 1992; 1996) diminuindo, de forma mais acentuada, o influxo deste, em células de cultivares sensíveis (Huang et al., 1992; Sivaguru et al., 2005). A ocorrência de competição simultânea entre Al, Ca e Fe foi relatada em plantas de arroz (Tanaka e Navasero, 1966).

No genótipo tolerante, o Al^{3+} interferiu na absorção de Ca somente em raízes, porém, de modo menos expressivo em comparação ao genótipo sensível (**Tabela 1**). Estudos realizados com alguns genótipos de sorgo expostos ao Al^{3+} revelaram a ocorrência de mecanismo de exclusão (Magalhaes et al., 2007), sendo assim é razoável supor que o Al estivesse complexado com ácidos orgânicos no apoplasto. Tal evento pode ter acontecido no genótipo tolerante, objeto do presente estudo. Esta complexação com ácidos orgânicos mantém o Al indisponível como cátion afetando consequentemente sua interação com componentes da membrana e/ou com canais de absorção de Ca e de Fe, como observado pelo limitado efeito na absorção de Ca e Fe no genótipo tolerante.

O incremento na produção de EROs em resposta ao Al^{3+} é documentado em várias espécies (Cakmak e Horst, 1991; Ezaki et al., 2000; Boscolo et al., 2003; Yamamoto et al., 2003; Jones et al., 2006; Tabaldi et al., 2009; Yin et al., 2010), como observado para o sorgo no presente estudo. O estresse oxidativo é normalmente induzido em plantas sensíveis expostas ao Al^{3+} (Darkó et al., 2004). Em concordância com a produção aumentada do H_2O_2 (**Tabela 2**) ocorreu o aumento substancial na atividade das enzimas antioxidantes (SOD, APX e CAT; **Figura 4**) em raízes sensíveis expostas ao Al^{3+} (H_2O/Al^{3+}) e alterações na morfologia radicular (H_2O/Al^{3+} ; **Figura 7**). O aumento de H_2O_2 em raízes tolerantes possivelmente está associado a eventos de sinalização celular em resposta ao cátion. De fato, a atividade APX (enzima que possui alta afinidade por H_2O_2) (Sofa et al., 2015) aumentou consideravelmente em raízes tolerantes expostas ao Al^{3+} e as plântulas não apresentaram dano morfológico aparente. O H_2O_2 é a única ERO capaz de atravessar membranas via aquaporinas, sendo transportado para sítios distantes do local onde foi produzido (Bienert et al., 2007; Dynowski

et al., 2008). É por estas razões que o papel do H_2O_2 é amplamente investigado na regulação de resposta de plantas a estresses ambientais (Sharma et al., 2012).

Em muitas espécies, os efeitos tóxicos do Al^{3+} , incluindo o estresse oxidativo, têm sido atenuados pela ação do NO (Wang e Yang, 2005; Tian et al., 2007; Zhao et al., 2008). Entretanto, do mesmo modo que foi observado nos genótipos desta pesquisa (**Tabela 2**), estudos com *Arabidopsis thaliana* (Illés et al., 2006) e *Hibiscus moscheutos* (Tian et al., 2007) também demonstraram que o Al^{3+} diminui os níveis de NO em raízes. Por outro lado, o Al^{3+} pode induzir o aumento nos níveis de NO em algumas espécies vegetais (Wang et al., 2010). Em geral, a resposta das plantas à toxidez por metais, baseada na sinalização por NO, é bastante variável (Xiong et al., 2010).

Algumas abordagens utilizando H_2S exógeno têm reportado que esta molécula protege o metabolismo vegetal especialmente contra danos oxidativos causados pela exposição a diferentes estresses ambientais (Ali et al., 2015; Cui et al., 2014; Shan et al., 2014). Nesta pesquisa, a atividade enzimática antioxidante de raízes tolerantes (ATF10B) não foi afetada pela exposição ao Al^{3+} nem pelo pré-tratamento com H_2S exógeno (**Figura 4**). Isso pode estar relacionado ao teor endógeno de H_2S neste genótipo que é 2,4 vezes maior que aquele encontrado no genótipo sensível (**Tabela 2**). Em contraste, raízes sensíveis (ATF8B) tratadas com Al^{3+} apresentaram aumentos significativos na atividade de enzimas antioxidantes, contudo, o pré-tratamento com doador de H_2S restabeleceu a atividade ao nível de raízes-controle (**Figura 4**). Estes resultados sugerem que o H_2S desempenha um importante papel na tolerância de sorgo ao Al^{3+} , particularmente contra o estresse oxidativo.

Raízes de sorgo tolerantes (ATF10B) possuem uma proteção intrínseca proporcionada pelo H_2S , enquanto nas raízes sensíveis a proteção antioxidante seria promovida pelo H_2S exógeno. Segundo Li e Lancaster (2013) além da ação sinalizadora, o H_2S pode atuar na remoção direta de ânion superóxido e H_2O_2 . O aumento observado na atividade APX em raízes tolerantes pré-tratadas com o H_2S exógeno (Na_2S 25 $\mu M/Ca$, Na_2S 50 $\mu M/Ca$ e Na_2S 100 $\mu M/Ca$), mas não naquelas expostas ao Al^{3+} , indicou que este gás pode estimular a atividade desta enzima (**Figura 4**). Resultados semelhantes foram encontrados por Zhang et al. (2010) em sementes de trigo.

A maior concentração basal de lignina em raízes tolerantes (ATF10B) pode constituir uma barreira física à entrada de Al^{3+} (Frei, 2013), consistindo em mais um mecanismo de resistência exibido por este genótipo. Embora o Al^{3+} induza a síntese de lignina na parede celular de algumas plantas (Hossain et al., 2005; Vardar et al., 2011), esta resposta não foi

observada no presente experimento (**Figura 5**). Alguns autores sugerem que a biossíntese de lignina é considerada uma resposta secundária à exposição ao Al^{3+} (Sasaki et al., 1996).

O pré-tratamento das plântulas com H_2S , além de resultar em menores níveis de lignina, promoveram menor atividade antioxidante (**Figura 4**), provavelmente relacionado à menor produção de EROs. Por ser o H_2O_2 fundamental para síntese de lignina (Frei, 2013), é possível que o H_2S , ao diminuir os níveis desta ERRO, tenha interferido também na síntese de lignina.

O decréscimo nos níveis de aminoácidos livres nas raízes tolerantes (ATF10B) pré-tratadas com doador de H_2S (**Figura 6**) possivelmente está relacionado à biossíntese de moléculas relacionadas à defesa vegetal. Os aminoácidos livres deste genótipo podem ter sido direcionados à síntese do transportador de citrato ativado pelo Al^{3+} , como observado por Chen et al. (2013) em plantas de cevada. Outra possibilidade é de que os aminoácidos tenham sido mobilizados para a produção de glutatona, dentre outras moléculas necessárias à defesa vegetal (Saito, 2000; Sharma e Dietz, 2006).

Mesmo com as raízes de sorgo (ATF8B e ATF10B) não apresentando diferenças aparentes no padrão de morte celular em nenhum dos tratamentos, as imagens obtidas permitiram a visualização de alterações morfológicas. O espessamento na região distal, afinamento na região proximal do ápice e inibição do desenvolvimento de raízes laterais são características de plantas sensíveis à exposição ao Al^{3+} (Čiamporová, 2002). Todas essas alterações foram observadas exclusivamente em raízes sensíveis expostas ao Al^{3+} (**Figura 7**). O pré-tratamento destas plantas com H_2S mitigou todos os efeitos danosos do metal.

5. Conclusões

As estratégias de defesa do genótipo ATF10B ao Al^{3+} estão relacionadas a eventos de sinalização celular mediados por H_2S . Plântulas tolerantes apresentaram níveis endógenos de H_2S superior às sensíveis, além de não apresentarem sintomas do estresse por Al^{3+} . Adicionalmente, o fornecimento exógeno de H_2S mitigou os danos causados pelo Al^{3+} em plântulas sensíveis (ATF8B).

6. Referências bibliográficas

- Ali, B., Qian, P., Sun, R., Farooq, M. A., Gill, R. A., Wang, J., Zhou, W. (2015). Hydrogen sulfide alleviates the aluminum-induced changes in *Brassica napus* as revealed by physicochemical and ultrastructural study of plant. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(4), 3068-3081.
- Apel, K., Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373-399.
- Arasimowicz, M., Floryszak-Wieczorek, J. (2007). Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. *Plant Science*, 172(5), 876-887.
- Beauchamp, C., Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44(1), 276-287.
- Bielecki, R. L., Turner, N. A. (1966). Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. *Analytical Biochemistry*, 17(2), 278-293.
- Bienert, G. P., Møller, A. L., Kristiansen, K. A., Schulz, A., Møller, I. M., Schjoerring, J. K., Jahn, T. P. (2007). Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 282(2), 1183-1192.
- Blancaflor, E. B., Jones, D. L., Gilroy, S. (1998). Alterations in the cytoskeleton accompany aluminum-induced growth inhibition and morphological changes in primary roots of maize. *Plant Physiology*, 118(1), 159-172.
- Blarney, F. P. C., Nishizawa, N. K., Yoshimura, E. (2004). Timing, magnitude, and location of initial soluble aluminum injuries to mungbean roots. *Soil Science and Plant Nutrition*, 50(1), 67-76.
- Boscolo, P. R., Menossi, M., Jorge, R. A. (2003). Aluminum-induced oxidative stress in maize. *Phytochemistry*, 62(2), 181-189.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Cakmak, I., Horst, W. J. (1991). Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum*, 83(3), 463-468.
- Chen, J., Wang, W. H., Wu, F. H., You, C. Y., Liu, T. W., Dong, X. J., He, J. X., Zheng, H. L. (2013). Hydrogen sulfide alleviates aluminum toxicity in barley seedlings. *Plant and Soil*, 362(1-2), 301-318.
- Chen, J., Wu, F. H., Wang, W. H., Zheng, C. J., Lin, G. H., Dong, X. J., Zheng, H. L. (2011). Hydrogen sulphide enhances photosynthesis through promoting chloroplast biogenesis, photosynthetic enzyme expression, and thiol redox modification in *Spinacia oleracea* seedlings. *Journal of Experimental Botany*, 62(13), 4481-4493.
- Christou, A., Manganaris, G. A., Papadopoulos, I., Fotopoulos, V. (2013). Hydrogen sulfide induces systemic tolerance to salinity and non-ionic osmotic stress in strawberry plants through modification of reactive species biosynthesis and transcriptional regulation of multiple defence pathways. *Journal of Experimental Botany*, 64(7), 1953-1966.

- Čiamporová, M. (2002). Morphological and structural responses of plant roots to aluminium at organ, tissue, and cellular levels. *Biologia Plantarum*, 45(2), 161-171.
- 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., Gomez, M., Del Rio, L. A. (2004). Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. *Plant Physiology*, 136(1), 2722-2733.
- Cui, W., Chen, H., Zhu, K., Jin, Q., Xie, Y., Cui, J., Xia, Y., Zhang, J., Shen, W. (2014). Cadmium-induced hydrogen sulfide synthesis is involved in cadmium tolerance in *Medicago sativa* by reestablishment of reduced (homo) glutathione and reactive oxygen species homeostases. *Plos One*, 9(10), 1-12.
- Darkó, É., Ambrus, H., Stefanovits-Bányai, É., Fodor, J., Bakos, F., Barnabás, B. (2004). Aluminium toxicity, Al tolerance and oxidative stress in an Al-sensitive wheat genotype and in Al-tolerant lines developed by *in vitro* microspore selection. *Plant Science*, 166(3), 583-591.
- Delledonne, M. (2005). NO news is good news for plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(4), 390-396.
- Dynowski, M., Schaaf, G., Loque, D., Moran, O., Ludewig, U. (2008). Plant plasma membrane water channels conduct the signalling molecule H₂O₂. *Biochemical Journal*, 414(1), 53-61.
- Ezaki, B., Gardner, R. C., Ezaki, Y., Matsumoto, H. (2000). Expression of aluminum-induced genes in transgenic *Arabidopsis* plants can ameliorate aluminum stress and/or oxidative stress. *Plant Physiology*, 122(3), 657-666.
- Frei, M. (2013). Lignin: characterization of a multifaceted crop component. *The Scientific World Journal*, 2013, 1-25.
- 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 of Agricultural and Food Chemistry*, 59(8), 3505-3509.
- Giannopolitis, C. N., Ries, S. K. (1977). Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59(2), 309-314.
- González, A., de los Ángeles Cabrera, M., Henríquez, M. J., Contreras, R. A., Morales, B., Moenne, A. (2012). Cross talk among calcium, hydrogen peroxide, and nitric oxide and activation of gene expression involving calmodulins and calcium-dependent protein kinases in *Ulva compressa* exposed to copper excess. *Plant Physiology*, 158(3), 1451-1462.
- Horst, W. J., Wang, Y., Eticha, D. (2010). The role of the root apoplast in aluminium-induced inhibition of root elongation and in aluminium resistance of plants: a review. *Annals of Botany*, 106(1), 185-197.
- Hossain, M. A., Hossain, A. Z., Kihara, T., Koyama, H., Hara, T. (2005). Aluminum-induced lipid peroxidation and lignin deposition are associated with an increase in H₂O₂ generation in wheat seedlings. *Soil Science & Plant Nutrition*, 51(2), 223-230.
- Huang, J. W., Grunes, D. L., Kochian, L. V. (1992). Aluminum effects on the kinetics of calcium uptake into cells of the wheat root apex. *Planta*, 188(3), 414-421.
- Huang, J. W., Pellet, D. M., Papernik, L. A., Kochian, L. V. (1996). Aluminum interactions with voltage-dependent calcium transport in plasma membrane vesicles isolated from

roots of aluminum-sensitive and-resistant wheat cultivars. *Plant Physiology*, 110(2), 561-569.

- Illéš, P., Schlicht, M., Pavlovkin, J., Lichtscheidl, I., Baluška, F., Ovečka, M. (2006). Aluminium toxicity in plants: internalization of aluminium into cells of the transition zone in *Arabidopsis* root apices related to changes in plasma membrane potential, endosomal behaviour, and nitric oxide production. *Journal of Experimental Botany*, 57(15), 4201-4213.
- Jin, Z., Xue, S., Luo, Y., Tian, B., Fang, H., Li, H., Pei, Y. (2013). Hydrogen sulfide interacting with abscisic acid in stomatal regulation responses to drought stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 62, 41-46.
- 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 & Environment*, 29(7), 1309-1318.
- Justino, G. C., Cambraia, J., Oliva, M. A., Oliveira, J. D. (2006). Absorção e redução de nitrato em duas cultivares de arroz na presença de alumínio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41(8), 1285-1290.
- Kochian, L. V. (1995). Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 46(1), 237-260.
- Kochian, L. V., Hoekenga, O. A., Píneros, M. A. (2004). How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 459-493.
- Kochian, L. V., Piñeros, M. A., Liu, J., Magalhaes, J. V. (2015). Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum resistance. *Annual Review of Plant Biology*, 66, 571-598.
- Kopittke, P. M., Blamey, F. P. C., Menzies, N. W. (2008). Toxicities of soluble Al, Cu, and La include ruptures to rhizodermal and root cortical cells of cowpea. *Plant and Soil*, 303(1-2), 217-227.
- Li, Q., Lancaster, J. R. (2013). Chemical foundations of hydrogen sulfide biology. *Nitric Oxide*, 35, 21-34.
- Li, Z. G., Gong, M., Xie, H., Yang, L., Li, J. (2012). Hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide-induced heat tolerance in tobacco (*Nicotiana tabacum* L) suspension cultured cells and involvement of Ca²⁺ and calmodulin. *Plant science*, 185, 185-189.
- Machado, N. A. M. (2011). Metodologias alternativas para facilitação da restauração de áreas de canga degradadas pela extração de bauxita. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Ouro Preto.
- Magalhaes, J. R., Pedroso, M. C., Durzan, D. (1999). Nitric oxide apoptosis and plant stresses. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 5, 115-125.
- Magalhaes, J. V., Liu, J., Guimaraes, C. T., Lana, U. G. P., Alves, V. M. C., Wang, Y. H., Schaffert, R. E., Hoekenga, O. A., Piñeros, M. A., Shaff, J. E., Klein, P. E., Carneiro, N. P., Coelho, C. M., Trick, H. N., Kochian, L. V. (2007) A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. *Nature*, 39(9):1156-1161.
- Matsumoto, H. (2000). Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. *International Review of Cytology*, 200, 1-46.

- Meriga, B., Reddy, B. K., Rao, K. R., Reddy, L. A., Kishor, P. K. (2004). Aluminium-induced production of oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA damage in seedlings of rice (*Oryza sativa*). *Plant Physiology*, 161(1), 63-68.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9), 405-410.
- Modolo, L. V. (2010). Effective plant protection weapons against pathogens require “NO Bullets”. *Nitric Oxide in Plant Physiology*, 103-113.
- Motoda, H., Kano, Y., Hiragami, F., Kawamura, K., Matsumoto, H. (2010). Morphological changes in the apex of pea roots during and after recovery from aluminium treatment. *Plant and Soil*, 333(1-2), 49-58.
- Nakano, Y., Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22(5), 867-880.
- Neill, S. J., Desikan, R., Hancock, J. T. (2003). Nitric oxide signaling in plants. *New Phytologist*, 159(1), 11-35.
- Panda, S. K., Matsumoto, H. (2007). Molecular physiology of aluminum toxicity and tolerance in plants. *The Botanical Review*, 73(4), 326-347.
- Pereira, J. M., Cambraia, J., Fonseca Junior, É. M., Ribeiro, C. (2008). Efeito do alumínio sobre a absorção, o acúmulo e o fracionamento do fósforo em sorgo. *Bragantia*, 67(4), 961-967.
- Saito, K. (2000). Regulation of sulfate transport and synthesis of sulfur-containing amino acids. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(3), 188-195.
- Sang, J., Jiang, M., Lin, F., Xu, S., Zhang, A., Tan, M. (2008). Nitric oxide reduces hydrogen peroxide accumulation involved in water stress-induced subcellular anti-oxidant defense in maize plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50,231-243.
- Sasaki, M., Yamamoto, Y., Matsumoto, H. (1996). Lignin deposition induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum*) roots. *Physiologia Plantarum*, 96(2), 193-198.
- Scandalios, J. G. (1993). Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology*, 101(1), 7-12.
- Shan, C., Liu, H., Zhao, L., Wang, X. (2014). Effects of exogenous hydrogen sulfide on the redox states of ascorbate and glutathione in maize leaves under salt stress. *Biologia Plantarum*, 58(1), 169-173.
- Sharma, P., Dubey, R. S. (2007). Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum. *Plant Cell Reports*, 26(11), 2027-2038.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 2012, 1-26.
- Sharma, S. S., Dietz, K. J. (2006). The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *Journal of Experimental Botany*, 57(4), 711-726.

- 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.
- Sivaguru, M., Liu, J., Kochian, L. V. (2013). Targeted expression of *SbMATE* in the root distal transition zone is responsible for sorghum aluminum resistance. *The Plant Journal*, 76(2), 297-307.
- Sivaguru, M., Yamamoto, Y., Rengel, Z., Ahn, S. J., Matsumoto, H. (2005). Early events responsible for aluminum toxicity symptoms in suspension-cultured tobacco cells. *New Phytologist*, 165(1), 99-109.
- Sofo, A., Scopa, A., Nuzzaci, M., Vitti, A. (2015). Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(6), 13561-13578.
- Sun, C., Lu, L., Liu, L., Liu, W., Yu, Y., Liu, X., Hu, Y., Jin C, Lin, X. (2014). Nitrate reductase-mediated early nitric oxide burst alleviates oxidative damage induced by aluminum through enhancement of antioxidant defenses in roots of wheat (*Triticum aestivum*). *New Phytologist*, 201(4), 1240-1250.
- Tabaldi, L. A., Cargnelutti, D., Gonçalves, J. F., Pereira, L. B., Castro, G. Y., Maldaner, J., Rauber, Rossato, L. V., Bisognin, D. A., Schetinger, M. R., C., Nicoloso, F. T. (2009). Oxidative stress is an early symptom triggered by aluminum in Al-sensitive potato plantlets. *Chemosphere*, 76(10), 1402-1409.
- Tanaka, A., Navasero, S. A. (1966). Aluminum toxicity of the rice plant under water culture conditions. *Soil Science and Plant Nutrition*, 12(2), 9-14.
- Tian, Q. Y., Sun, D. H., Zhao, M. G., Zhang, W. H. (2007). Inhibition of nitric oxide synthase (NOS) underlies aluminum-induced inhibition of root elongation in *Hibiscus moscheutos*. *New Phytologist*, 174(2), 322-331.
- Tokunaga, N., Sakakibara, N., 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(1), 224-232.
- Vardar, F., İsmailoğlu, I., İnan, D., Ünal, M. (2011). Determination of stress responses induced by aluminum in maize (*Zea mays*). *Acta Biologica Hungarica*, 62(2), 156-170.
- 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(3), 281-288.
- Wang, Y. S., Yang, Z. M. (2005). Nitric oxide reduces aluminum toxicity by preventing oxidative stress in the roots of *Cassia tora* L. *Plant and Cell Physiology*, 46(12), 1915-1923.
- Wilson, I. D., Neill, S. J., Hancock, J. T. (2008). Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant, Cell & Environment*, 31(5), 622-631.
- Xiong, J., Fu, G., Tao, L., Zhu, C. (2010). Roles of nitric oxide in alleviating heavy metal toxicity in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 497(1), 13-20.
- Yamamoto, Y., Kobayashi, Y., Devi, S. R., Rikiishi, S., Matsumoto, H. (2003). Oxidative stress triggered by aluminum in plant roots. *Plant and Soil*, 255, 239-24.

- 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(1), 199-208.
- Yemm, E. W., Cocking, E. C. (1955). The determination of amino-acids with ninhydrin. *Analyst*, 80(948), 209-214.
- Yin, L., Mano, J. I., Wang, S., Tsuji, W., Tanaka, K. (2010). The involvement of lipid peroxide-derived aldehydes in aluminum toxicity of tobacco roots. *Plant Physiology*, 152(3), 1406-1417.
- Zhang, H., Dou, W., Jiang, C. X., Wei, Z. J., Liu, J., Jones, R. L. (2010). Hydrogen sulfide stimulates β -amylase activity during early stages of wheat grain germination. *Plant Signaling & Behavior*, 5(8), 1031-1033.
- Zhang, H., Hu, L. Y., Hu, K. D., He, Y. D., Wang, S. H., Luo, J. P. (2008b). Hydrogen sulfide promotes wheat seed germination and alleviates oxidative damage against copper stress. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(12), 1518-1529.
- Zhang, H., Hu, S. L., Zhang, Z. J., Hu, L. Y., Jiang, C. X., Wei, Z. J., Liu, J., Wang, H. L., Jiang, S. T. (2011). Hydrogen sulfide acts as a regulator of flower senescence in plants. *Postharvest Biology and Technology*, 60(3), 251-257.
- Zhang, H., Li, Y. H., Hu, L. Y., Wang, S. H., Zhang, F. Q., Hu, K. D. (2008a). Effects of exogenous nitric oxide donor on antioxidant metabolism in wheat leaves under aluminum stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, 55(4), 469-474.
- Zhang, H., Tang, J., Liu, X. P., Wang, Y., Yu, W., Peng, W. Y., Fang, F., Ma, D. F., Wei, Z.J., Hu, L. Y. (2009). Hydrogen sulfide promotes root organogenesis in *Ipomoea batatas*, *Salix matsudana* and *Glycine max*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 51(12), 1086-1094.
- Zhao, L., He, J., Wang, X., Zhang, L. (2008). Nitric oxide protects against polyethylene glycol-induced oxidative damage in two ecotypes of reed suspension cultures. *Plant Physiology*, 165(2), 182-191.

- Capítulo 2 -

O gás sulfídrico atenua os efeitos tóxicos de alumínio em plântulas de *Triticum aestivum*?

Resumo

Muitos processos bioquímicos em plantas são afetados negativamente por Al^{3+} . A tolerância de plantas ao Al^{3+} está associada a um sistema eficiente de sinalização celular. Os objetivos deste trabalho foram avaliar algumas respostas bioquímicas de plântulas de *Triticum aestivum* ao Al^{3+} em função de pré-tratamento com H_2S . Para tanto, foram utilizados os genótipos Anahuac (Al-sensível) e BH1146 (Al-tolerante) que foram submetidos ao Al^{3+} (0 ou 75 μM) em solução nutritiva 1/10 da força total (pH 4,0) por 48 h. Plântulas foram pré-tratadas com doador de H_2S nas concentrações de 0 ou 50 μM (pH 6,0) por 24 h. A exposição das plântulas de ambos os genótipos ao Al^{3+} causou declínio na atividade da desidrogenase e nas concentrações de óxido nítrico (NO), radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) e ânion superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$). Em geral, os efeitos do Al^{3+} foram mais brandos no genótipo tolerante (BH1146). O Al^{3+} também induziu a morte celular em raízes Al-sensíveis, não afetando as do genótipo tolerante. Os níveis de H_2O_2 assim como as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) não foram afetados pelo Al^{3+} , independentemente do genótipo estudado. O Al^{3+} , contudo, proporcionou aumento de H_2S e estimulou a atividade β -ciano-alanina sintase (CAS), enzima produtora de H_2S . O pré-tratamento com H_2S , independentemente da exposição ao Al^{3+} e do genótipo, acentuou o decréscimo da atividade da desidrogenase e dos níveis de $\cdot\text{O}_2^-$, além de proporcionar maior mortalidade celular e estimular a atividade antioxidante em raízes. O doador de H_2S a 50 μM mostrou-se tóxico às raízes de trigo de ambos os genótipos, como atestado pela inibição da atividade desidrogenase. Sendo assim, o H_2S exógeno constituiu uma fonte adicional de estresse às plântulas de trigo.

1. Introdução

A predominância da espécie catiônica Al^{3+} em solos ácidos é potencialmente danosa aos vegetais, sobretudo por limitar o crescimento das raízes, tornando-as mais susceptíveis à seca e à deficiência nutricional (Mossor-Pietraszewska, 2001; Kochian et al., 2005). A diminuição do alongamento radicular está relacionada ao acúmulo do Al^{3+} preferencialmente no ápice das raízes (Sivaguru e Horst, 1998), na parte distal da zona de transição, onde as células se encontram em fase de rápido alongamento (Ishikawa e Evans, 1995).

O Al^{3+} induz sérias alterações metabólicas no sistema radicular, dentre elas a inibição da divisão celular, decréscimo da taxa de desenvolvimento de raízes laterais, diminuição da respiração e aumento da rigidez da parede celular (Blarney et al., 2004; Kochian et al., 2004). Além disso, este cátion pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), como ânion superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), (Cakmak e Horst, 1991; Boscolo et al., 2003; Kawano et al., 2003; Ma, 2007). As EROs são capazes de oxidar constituintes celulares como lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e induzir morte celular (Møller et al., 2007; Sade et al., 2016).

Respostas específicas de defesa são ativadas na presença de um agente estressor. Após o reconhecimento do estímulo estressante por receptores da membrana celular ocorre a formação de moléculas sinalizadoras que alteram a concentração ou modulam os chamados mensageiros secundários, com consequente estímulo de resposta de defesa (Arasimowicz e Floryszak-Wieczorek, 2007).

O óxido nítrico (NO) é uma espécie reativa de nitrogênio (ERN) que sinaliza diversos processos fisiológicos e de respostas ao estresse em vegetais (Delledonne et al., 1998; Modolo et al., 2005; Tossi et al., 2012; Tewari et al., 2015). Em plantas sob estresse, o NO parece atenuar o estresse oxidativo, controlando a produção de EROs via estímulo do sistema antioxidante (Wang e Yang, 2005; Shi et al., 2007; Liu et al., 2014).

Outra molécula com funções semelhantes àquelas atribuídas ao NO é o sulfeto de hidrogênio (H_2S). Trata-se de um gás que se difunde facilmente através de membranas celulares. Por séculos acreditou-se que esta molécula fosse tóxica às plantas e mamíferos (Tanaka et al., 1968; Beauchamp et al., 1984). Os efeitos benéficos ou deletérios do H_2S estão associados à sua concentração no meio. De fato, estudos recentes têm atribuído a este gás a mediação de importantes eventos fisiológicos em plantas (Zhang et al., 2009; Chen et al., 2011; Fang et al., 2014). Tais observações têm sido feitas a partir de estudos com liberadores

de H₂S, tais como o sulfeto de sódio (Na₂S) e hidrossulfeto de sódio (NaHS). Plantas não somente respondem ao H₂S exógeno como também são capazes de produzir esta molécula sinalizadora. Sua biossíntese tem sido, até o momento, atribuída à atividade de enzimas como a L-cisteína dessulfidrase (L-DES), β-ciano-alanina sintase (CAS), sulfito redutase (SiR) e L-cisteína sintase (CS) (Li, 2015).

O uso de abordagens farmacológicas permitiu demonstrar o papel do H₂S na atenuação de danos causados pela exposição de plantas a temperaturas elevadas, ao congelamento e a metais como cobre e cádmio (Shan et al., 2012; Li et al., 2012a, 2012b; Shi et al., 2013; Cui et al., 2014). Os estudos supramencionados relatam que o principal mecanismo de proteção das plantas contra o estresse, envolvendo o H₂S, se dá pela ativação do sistema antioxidante das plântulas. Objetivou-se avaliar os efeitos de H₂S exógeno na resposta de dois genótipos de trigo *Triticum aestivum* L. ao estresse por Al³⁺.

2. Material e métodos

2.1. Material vegetal

Os experimentos foram conduzidos com plântulas de trigo (*Triticum aestivum* L.), com os cultivares Anahuac (Al-sensível) e BH1146 (Al-tolerante). O grau de tolerância destes cultivares ao Al³⁺ foi determinado por Camargo et al. (1992), os quais definiram a concentração de 1 mg L⁻¹ de AlCl₃ (equivalente a 75 μM, pH 4,0 em solução nutritiva) como a necessária para definir o cultivar Anahuac como sensível e o BH1146 como tolerante a este metal. A discriminação dos genótipos foi determinada baseando-se na inibição do crescimento radicular.

2.2. Cultivo e tratamentos das plântulas

Sementes dos genótipos Anahuac e BH1146 foram desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio 1% (v/v) por 5 min e enxaguadas com água ultrapura. As sementes foram depositadas sobre folhas duplas de papel de filtro umedecidas com Nistatina[®] 0,2% (v/v) que foram enroladas e acondicionadas em câmara de germinação a 25 °C e fotoperíodo de 12 h. Quatro dias após a semeadura, as plântulas (6 por pote) foram transferidas para um sistema hidropônico constituído de potes plásticos de 500 mL contendo solução nutritiva 1/10

de força, pH 4,0 (**Tabela 1**), conforme Camargo e Felício (1984). Os sistemas foram mantidos em sala de crescimento a 30 °C, sob iluminação constante ($191 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por 24 h, até a imposição dos tratamentos.

O sistema radicular das plântulas foi submerso em AlCl_3 a 75 μM em solução nutritiva 1/10 da força total (pH 4,0) por 48 h. O grupo controle recebeu apenas solução nutritiva 1/10 da força total (pH 4,0). O Fe-EDTA foi substituído por FeCl_3 e o KH_2PO_4 omitido da solução nutritiva com o início do tratamento com Al^{3+} (Camargo e Felício, 1984).

Todas as vidrarias utilizadas nos experimentos foram previamente descontaminadas com HCl 3,7% por 24 h.

Tabela 1. Composição da solução nutritiva (força total) utilizada no cultivo de *Triticum aestivum* (Camargo e Felício, 1984).

Substância	Concentração final
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	4 mM
MgSO_4	2 mM
KNO_3	4 mM
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,435 mM
KH_2PO_4	0,5 mM
MnSO_4	2 μM
CuSO_4	0,3 μM
ZnSO_4	0,8 μM
NaCl	30 μM
Fe-EDTA	10 μM
Na_2MoO_4	0,10 μM
H_3BO_3	10 μM

2.2.1. Quantificação de H_2S , NO e H_2O_2 em raízes

Após 48 h nos tratamentos (controle = solução nutritiva 1/10 de força, pH 4,0; Al^{3+} = solução nutritiva 1/10 de força contendo AlCl_3 75 μM , pH 4,0), raízes de trigo foram imediatamente lavadas e coletadas para quantificação de H_2S , NO e H_2O_2 . Para tanto, as raízes (300 mg) foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em tampão fosfato 50 mM (pH 6,8). A quantidade de H_2S , NO e H_2O_2 foi determinada nos homogenatos usando um analisador de radicais livres de quatro canais (World Precision Instruments, Estados Unidos), conforme instruções do fabricante, a partir de curvas-padrão de Na_2S , S-nitroso-N-acetil penicilamina e H_2O_2 , respectivamente.

2.3. Avaliação dos efeitos do gás sulfídrico na amenização do estresse provocado pelo alumínio em genótipos de trigo

O efeito do H₂S foi investigado a partir de pré-tratamento das plântulas de trigo com doador de H₂S a 50 µM (Na₂S, pH 6,0) por 24 h seguido do tratamento com Al³⁺ por 48 h conforme **Figura 1**. Amostras recém-coletadas de raízes foram sujeitas às análises histoquímicas e quantificação de radical hidroxila (•OH) ou então armazenadas a -80 °C até a dosagem das atividades enzimáticas.

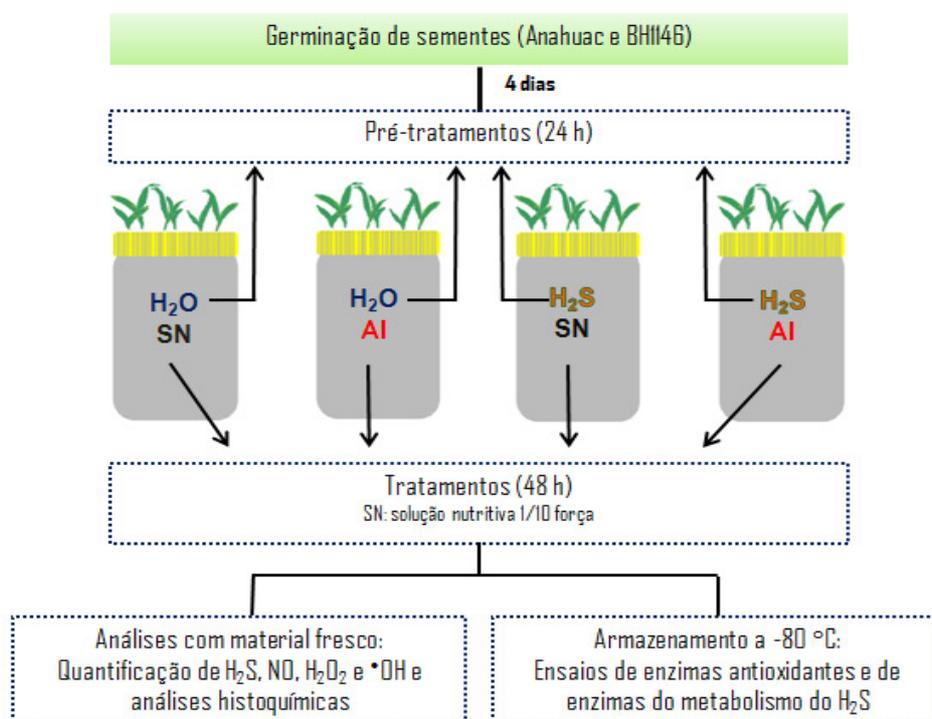


Figura 1. Representação esquemática do experimento de imposição do estresse por Al³⁺ das plântulas de *Triticum aestivum*.

2.3.1. Determinação da atividade de enzimas envolvidas na biossíntese de H₂S

A atividade das enzimas β-ciano-alanina sintase (CAS), L-cisteína dessulfidrase (L-DES) e L-cisteína sintase (CS) foi determinada como estabelecido por Li, 2015.

Raízes inteiras (300 mg) foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em Tris 20 mM (pH 8,0). Os homogenatos foram centrifugados a 14.000 x g a 4 °C por 15 min, e os sobrenadantes utilizados na determinação das atividades de CAS e L-DES. A atividade da CAS foi determinada a partir da incubação, a 30 °C por 15 min, de alíquotas deste sobrenadante em Tris 100 mM (pH 9,0) contendo KCN 10 mM e L-cisteína 0,8 mM. A

reação foi paralisada utilizando FeCl_3 30 mM em HCl 1,2 M (m/v) e *N,N*-Dimetil-*p*-fenilenodiamina (DMPD) 20 mM em HCl 7,2 M (m/v). A formação de H_2S foi monitorada a 670 nm e quantificada a partir do coeficiente de absorvidade molar (ϵ) igual a $15 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os resultados foram expressos em pmol de $\text{H}_2\text{S} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

A atividade L-DES foi acessada incubando, a 37 °C por 15 min, o sobrenadante com Tris 100 mM (pH 9,0) contendo ditioneitol (DTT) 2,5 mM e L-cisteína 0,8 mM. A reação foi paralisada conforme descrito para a atividade CAS. A produção de H_2S foi monitorada a 670 nm e os resultados expressos em pmol de $\text{H}_2\text{S} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína (Li, 2015).

Para a determinação da atividade CS, as raízes (300 mg) foram maceradas e homogeneizadas em tampão fosfato 50 mM (pH 7,5) contendo ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) 1 mM, MgCl_2 5 mM, DTT 2 mM, Triton X-100 0,1% (v/v) e coquetel inibidor de protease. Os homogenatos foram centrifugados a $14.000 \times g$ por 15 min a 4 °C e os sobrenadantes incubados, a 30 °C por 10 min, em tampão fosfato (pH 8,0) contendo Na_2S 4 mM e *O*-acetil-L-serina 12,5 mM. A reação foi paralisada pela adição de ninhidrina ácida 1,25 % (m/v) em HCl 2,34 M e ácido acético 14,08 M, seguida de incubação da mistura a 95 °C por 10 min. A formação de cisteína foi monitorada a 560 nm e quantificada utilizando ϵ igual a $3,24 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os resultados foram expressos em pmol de cisteína $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína (Li, 2015).

2.3.2. Quantificação de radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) em raízes

Raízes (50 mg) foram cortadas em pequenos pedaços e incubadas a 37 °C por 2 h em tampão fosfato 10 mM (pH 7,4) contendo 2-desóxi-D-ribose 15 mM. Alíquotas desta solução foram adicionadas a uma solução de ácido tiobarbitúrico 0,5 % (m/v) e ácido acético, que foi aquecida a 100 °C por 30 min. As reações foram paralisadas por acondicionamento em banho de gelo por 10 min. A absorbância do malondialdeído (MDA) foi registrada a 532 nm e a concentração estimada utilizando ϵ igual a $155 \text{ L mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Achary et al., 2008).

2.3.3. Detecção de ânion superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), atividade desidrogenase e células mortas em raízes

As plântulas utilizadas nestes experimentos foram cultivadas em tubos de ensaio previamente descontaminados em HCl (**Figura 2**). Ápices radiculares (0,5 cm) foram

utilizados para a análise de $\cdot\text{O}_2^-$, atividade desidrogenase e células mortas. Para determinação de $\cdot\text{O}_2^-$, ápices radiculares foram incubados por 1 h em tampão Tris 10 mM, pH 7,0, contendo azul de nitro-tetrazólio (NBT) 1 mM. O material vegetal foi fotografado em estereomicroscópio após lavagem em tampão Tris 10 mM (Zhang et al., 2014). A atividade desidrogenase foi avaliada em ápices incubados em violeta de tetrazólio 0,005 % (m/v) por 40 min (Kurzbaum et al., 2010), enquanto que as células mortas foram visualizadas a partir de incubação de ápices em azul de Evans 0,025 % em CaCl_2 100 μM (m/v; pH 5,6) por 10 min (Yamamoto et al., 2001).



Figura 2. Representação do sistema hidropônico usado nos experimentos para determinação de $\cdot\text{O}_2^-$, atividade desidrogenase e células mortas em ápices radiculares de *Triticum aestivum*. Cada plântula representa uma unidade amostral.

2.3.4. Determinação de atividade de enzimas do sistema antioxidante

Raízes inteiras (300 mg) foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em tampão fosfato 50 mM (pH 6,8) contendo EDTA 100 μM , polivinilpolipirrolidona (PVPP) 10% (m/v) e coquetel inibidor de protease. Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 x g a 4 °C por 15 min, e os sobrenadantes utilizados para a determinação da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT).

A atividade da SOD foi determinada de acordo com Giannopolitis e Ries (1977), com modificações. Os extratos enzimáticos foram adicionados a um meio de reação constituído de tampão fosfato 50 mM (pH 7,8), EDTA 100 μM , L-metionina 13 mM, NBT 75 μM e

riboflavina 2 μM . As reações foram incubadas em uma câmara de reação equipada com uma lâmpada de 15 W. Reações-controle foram mantidas na ausência de luz. A produção de azul de formazana resultante da fotorredução do NBT foi verificada a 575 nm, após 10 min de incubação. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a fotorredução do NBT em 50% (Beauchamp e Fridovich, 1971).

A atividade da APX foi estimada de acordo com Nakano e Asada (1981). Alíquotas do extrato foram adicionadas ao tampão fosfato 50 mM (pH 6,0) contendo ácido ascórbico 1 mM e H_2O_2 2 mM. A atividade APX foi monitorada por 5 min a partir de medidas de oxidação do ascorbato a 290 nm (ϵ igual a $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Os resultados foram expressos em μmol de ascorbato $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

Para determinar a atividade da CAT, os extratos foram incubados em tampão fosfato 50 mM (pH 6,8) contendo H_2O_2 12,5 mM. A decomposição de H_2O_2 foi monitorada a 240 nm (ϵ igual a $39,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Cakmak e Horst, 1991). Os resultados foram expressos em μmol de H_2O_2 $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

2.3.5. Dosagem de proteínas totais

A concentração de proteínas totais nos extratos brutos vegetais foi estimado pelo método de coloração com *Coomassie blue*, utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão (Bradford et al, 1976).

2.4. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado em todos os experimentos foi o de blocos casualizados, em esquema fatorial, com no mínimo três repetições. Para avaliar o efeito do Al^{3+} sobre os níveis de H_2S , NO e H_2O_2 utilizou-se o fatorial 2 x 2 (dois genótipos de trigo e duas concentrações de Al^{3+}). Para as demais análises empregou-se o fatorial 2 x 2 x 2 (dois genótipos de trigo, duas concentrações de Na_2S e duas concentrações de Al^{3+}). Após verificar a normalidade dos dados procedeu-se à análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade. As análises foram conduzidas nos programas R e Sisvar.

3. Resultados

3.1. Efeito do Al³⁺ sobre os níveis de H₂S, NO e H₂O₂ em raízes de trigo

A concentração de H₂S aumentou 54 e 183% em raízes dos cultivares sensível (Anahuac) e tolerante (BH1146), respectivamente (**Tabela 2**). Em contraste, os níveis de NO em raízes de ambos os genótipos diminuíram em torno de 32% após as plantas serem expostas ao Al³⁺ (**Tabela 2**). O tratamento com o Al³⁺ não provocou alterações no teor de H₂O₂, independentemente do cultivar testado (**Tabela 2**). Raízes de plântulas-controle de ambos os cultivares apresentaram concentrações similares de H₂S e H₂O₂ (**Tabela 2**). Enquanto que os níveis de NO em raízes do cultivar tolerante foram 38% maiores do que aqueles observados no cultivar sensível (**Tabela 2**).

Tabela 2. Efeito do Al³⁺ sobre os níveis de H₂S, NO e H₂O₂ em raízes de *Triticum aestivum*.

Molécula	Anahuac (Al-sensível)		BH1146 (Al-tolerante)	
	Controle	Al ³⁺	Controle	Al ³⁺
H ₂ S ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MS)	60,85 \pm 28,25 ^{bA}	93,41 \pm 13,95 ^{aB}	52,50 \pm 6,82 ^{bA}	148,71 \pm 39,39 ^{aA}
NO ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MS)	4,47 \pm 1,04 ^{aB}	3,02 \pm 0,94 ^{bA}	7,26 \pm 1,23 ^{aA}	4,87 \pm 1,02 ^{bA}
H ₂ O ₂ (mmol g^{-1} MS)	0,93 \pm 0,38 ^{aA}	1,49 \pm 1,26 ^{aA}	1,52 \pm 0,72 ^{aA}	0,89 \pm 0,42 ^{aA}

Médias seguidas por letras minúsculas distintas indicam que o Al³⁺ causou diferença significativa nos conteúdos de H₂S, NO ou H₂O₂ em um mesmo genótipo, enquanto letras maiúsculas distintas indicam diferenças entre os genótipos para um mesmo tratamento ($P < 0,05$). Média \pm desvio padrão (n=6). MS = massa seca.

3.2. Efeito do Al³⁺ na atividade de enzimas envolvidas na biossíntese de H₂S

Raízes-controle (tratamento H₂O) do genótipo tolerante (BH1146) apresentaram atividade da enzima β -ciano-alanina sintase (CAS) 42% maior que aquela de raízes de plântulas sensíveis, sob o mesmo tratamento (**Figura 3**). Aumentos substanciais (26% e 39%, respectivamente) na atividade CAS foram observados nos genótipos sensível e tolerante expostos ao Al³⁺ (H₂O/Al³⁺) (**Figura 3**). Em contraste, o pré-tratamento com doador de H₂S 50 μM por si só diminuiu em 50% a atividade desta enzima apenas em raízes tolerantes, quando comparadas ao controle (**Figura 3**). Contudo, o fornecimento de H₂S 50 μM , seguido do estresse por Al³⁺ 75 μM (H₂S/Al³⁺), restabeleceu a atividade CAS em raízes do genótipo tolerante ao nível de plântulas-controle (**Figura 3**). Raízes do genótipo sensível, oriundas do

tratamento $\text{H}_2\text{S}/\text{Al}^{3+}$, apresentaram atividade CAS 96% maior que aquela de plântulas-controle (H_2O ; **Figura 3**).

O pré-tratamento com H_2S sem exposição ao Al^{3+} (H_2S 50) causou um aumento de 148% na atividade L-cisteína sintase (CS) nas raízes tolerantes em comparação aos respectivos controles (**Figura 3**). Nenhum dos tratamentos, contudo, afetou a atividade CS em raízes sensíveis (**Figura 3**). A exposição ao Al^{3+} ($\text{H}_2\text{O}/\text{Al}^{3+}$ e $\text{H}_2\text{S}/\text{Al}^{3+}$) não afetou a atividade CS em raízes de ambos os genótipos em comparação ao controle (**Figura 3**).

Ambos os genótipos expostos aos diferentes tratamentos ($\text{H}_2\text{O}/\text{Al}^{3+}$; H_2S 50; H_2S 50/ Al^{3+}) apresentaram atividade da L-cisteína dessulfidrase (L-DES) menor que a observada nas respectivas plântulas-controles (H_2O) (**Figura 3**). Plântulas sensíveis tratadas com Al^{3+} ($\text{H}_2\text{O}/\text{Al}^{3+}$) apresentaram atividade L-DES 44% menor do que as plântulas-controle (**Figura 3**). O pré-tratamento de raízes sensíveis com H_2S (H_2S 50; H_2S 50/ Al^{3+}) também levou à diminuição da atividade L-DES, porém, em menor extensão (decréscimo de 26%) (**Figura 3**). Similarmente, a exposição de raízes do genótipo tolerante (BH1146) a quaisquer tratamentos ($\text{H}_2\text{O}/\text{Al}^{3+}$; H_2S 50; H_2S 50/ Al^{3+}) resultou na diminuição em torno de 32% da atividade L-DES, em relação ao controle (H_2O) (**Figura 3**). No que tange à produção direta de H_2S , a atividade da L-DES foi pelo menos 10 vezes menor que a atividade CAS.

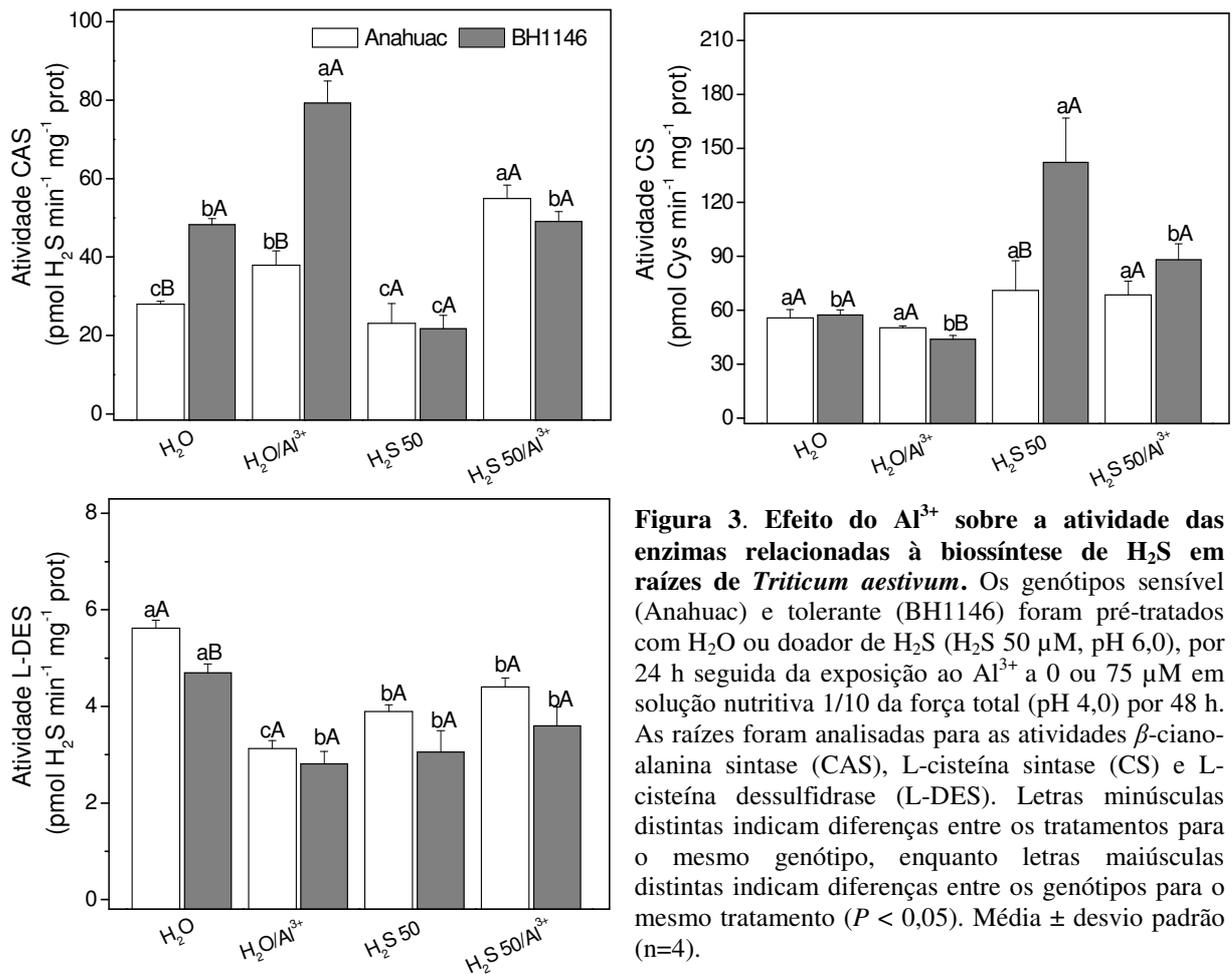


Figura 3. Efeito do Al³⁺ sobre a atividade das enzimas relacionadas à biossíntese de H₂S em raízes de *Triticum aestivum*. Os genótipos sensível (Anahuac) e tolerante (BH1146) foram pré-tratados com H₂O ou doador de H₂S (H₂S 50 μM, pH 6,0), por 24 h seguida da exposição ao Al³⁺ a 0 ou 75 μM em solução nutritiva 1/10 da força total (pH 4,0) por 48 h. As raízes foram analisadas para as atividades β-cianoalanina sintase (CAS), L-cisteína sintase (CS) e L-cisteína dessulfidrase (L-DES). Letras minúsculas distintas indicam diferenças entre os tratamentos para o mesmo genótipo, enquanto letras maiúsculas distintas indicam diferenças entre os genótipos para o mesmo tratamento ($P < 0,05$). Média ± desvio padrão (n=4).

3.3. Efeito do H₂S na atividade desidrogenase em raízes expostas ao Al³⁺

Após o tratamento com Al³⁺ (H₂O/Al³⁺) raízes de ambos os genótipos exibiram atividade desidrogenase notadamente menor que aquelas de plântulas-controle, como atestado pela intensidade da coloração violeta (**Figura 4**). Contudo, sob tais condições experimentais (H₂O/Al³⁺), raízes tolerantes apresentaram maior atividade desidrogenase quando comparadas às sensíveis (**Figura 4**). Raízes de ambos os genótipos pré-tratadas do H₂S apresentaram inibição severa da atividade desidrogenase (H₂S 50 e H₂S 50/Al³⁺). Nestes tratamentos verificou-se ausência de coloração violeta (**Figura 4**). A superfície de ápices de raízes-controle (H₂O) de ambos os genótipos apresentou atividade desidrogenase presumidamente normal, como atestado pela presença de intensa coloração violeta (**Figura 4**).

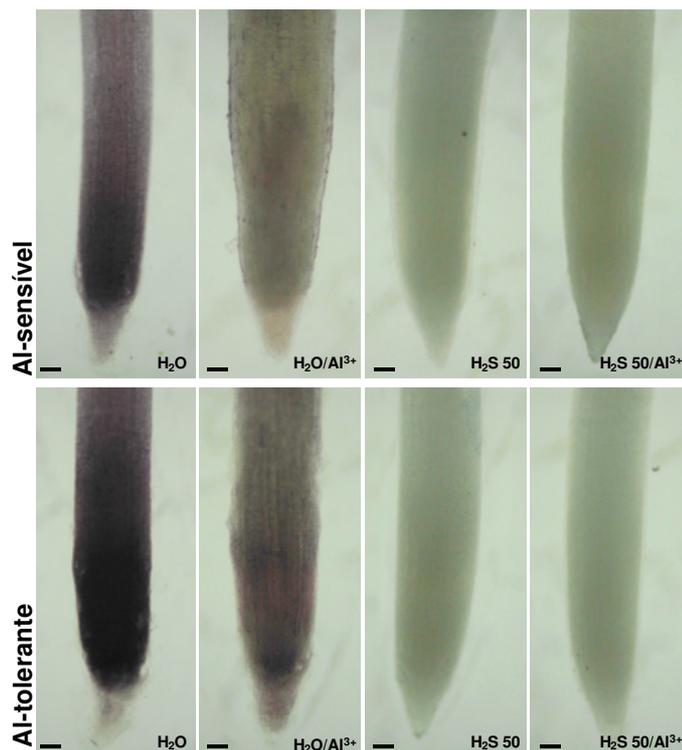


Figura 4. Efeito do H₂S na atividade desidrogenase em ápices radiculares de *Triticum aestivum* cv. Anahuac (Al-sensível) e cv. BH1146 (Al-tolerante) em resposta ao Al³⁺. Os genótipos sensível e tolerante foram pré-tratados com H₂O ou doador de H₂S (H₂S 50 μM, pH 6,0) por 24 h seguida da exposição ao Al³⁺ a 0 ou 75 μM em solução nutritiva 1/10 da força total (pH 4,0) por 48 h. A cor violeta indica a presença de atividade desidrogenase. Barras = 250 μm; n de no mínimo 4 indivíduos.

3.4. Efeito do H₂S na produção de radical hidroxila (•OH) em raízes expostas ao Al³⁺

A exposição do genótipo tolerante ao Al³⁺ (H₂O/Al³⁺) diminuiu significativamente a produção de •OH pelas raízes em relação às raízes-controle (H₂O), sem afetar os níveis deste radical livre nas raízes de plântulas sensíveis (**Figura 5**). Raízes tolerantes pré-tratadas com H₂S apresentaram conteúdo de •OH 73% menor que aquele de plântulas-controle (H₂O), independentemente da exposição ao Al³⁺ (**Figura 5**; H₂S 50 e H₂S 50/Al³⁺). No genótipo sensível (Anahuac) somente o tratamento H₂S 50/Al³⁺ afetou a concentração desta ERO, que foi 9 vezes menor que o de raízes de plântulas-controle (**Figura 5**).

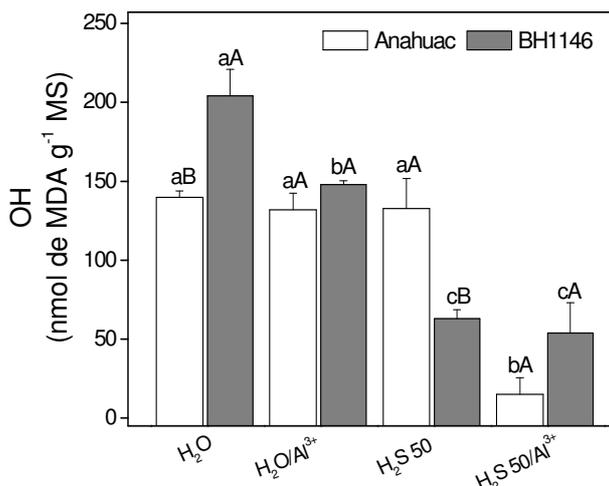


Figura 5. Efeito do pré-tratamento com H₂S no conteúdo de radical hidroxila ([•]OH) em raízes de *Triticum aestivum* cv. Anahuac (Al-sensível) e cv. BH1146 (Al-tolerante) desafiadas com Al³⁺. As plântulas foram incubadas com doador de H₂S (0 ou 50 μM, pH 6,0) por 24 h seguido do tratamento com Al³⁺ (0 ou 75 μM, pH 4,0) em solução nutritiva 1/10 da força total, por 48 h. Letras minúsculas distintas indicam diferenças entre os tratamentos em um mesmo genótipo; letras maiúsculas distintas indicam diferenças entre os genótipos para um mesmo tratamento ($P < 0,05$). MDA, malondialdeído; MS, massa seca. Médias ± desvio padrão (n=4).

3.5. Efeito do H₂S na produção de ânion superóxido ([•]O₂⁻) em raízes expostas ao Al³⁺

A exposição de ambos os genótipos ao Al³⁺ inibiu parcialmente a produção de [•]O₂⁻ na superfície radicular (**Figura 6**), caracterizada pela menor intensidade da coloração roxa formada a partir da reação de NBT com a ERO em questão. Observou-se reação mais intensa na região distal do ápice de raízes tolerantes em comparação às sensíveis, igualmente expostas ao Al³⁺ (**Figura 6**). Quando pré-tratadas com H₂S, raízes de ambos os genótipos tratadas ou não com Al³⁺ exibiram baixa produção de [•]O₂⁻, conforme evidenciado pela coloração roxa pouco intensa (**Figura 6**; H₂S 50 e H₂S 50/Al³⁺). Ápices radiculares das plântulas-controle (H₂O) de ambos os genótipos apresentaram coloração roxa intensa, típica de presença de [•]O₂⁻ (**Figura 6**).

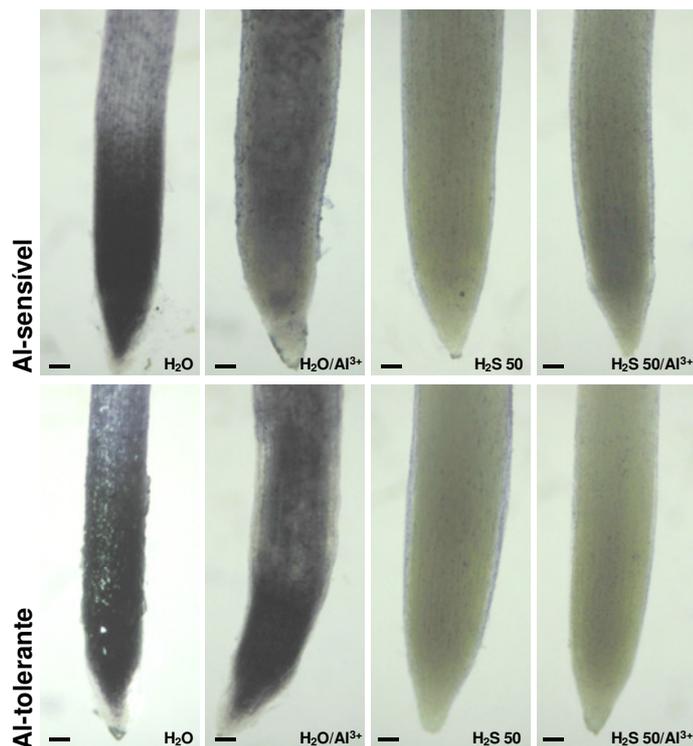


Figura 6. Efeito do H₂S na produção de ânion superóxido ([•]O₂⁻) em ápices radiculares de *Triticum aestivum* cv. Anahuac (Al-sensível) e cv. BH1146 (Al-tolerante) em resposta ao Al³⁺. Os genótipos sensível e tolerante foram pré-tratados com H₂O ou H₂S (H₂S 50 μM, pH 6,0), por 24 h seguida da exposição ao Al³⁺ a 0 ou 75 μM em solução nutritiva 1/10 da força total (pH 4,0) por 48 h. A cor roxa indica a presença de [•]O₂⁻. Barras = 250 μm; n de no mínimo 3 indivíduos.

3.6. Efeito do H₂S na atividade de enzimas antioxidantes de raízes expostas ao Al³⁺

O tratamento dos genótipos sensível e tolerante com Al³⁺ (H₂O/Al³⁺) não afetou a atividade das enzimas SOD, APX e CAT nas raízes, em relação aos respectivos controles (H₂O) (**Figura 7**). Contudo, a exposição das plântulas ao doador de H₂S 50 μM (H₂S 50 e H₂S 50/Al³⁺) estimulou significativamente a atividade destas enzimas. Em raízes tolerantes, o tratamento H₂S 50 resultou em atividades SOD, APX e CAT 3; 2,7 e 2,6 vezes maiores que aquelas de raízes-controle, respectivamente (**Figura 7**). Similarmente, a atividade das enzimas supramencionadas foi 3 vezes maior em raízes de plântulas sensíveis, após o tratamento com doador de H₂S 50 μM (H₂S 50 e H₂S 50/Al³⁺), em comparação com o controle (**Figura 7**). A exposição ao Al³⁺ de plântulas sensíveis pré-tratadas com doador de H₂S proporcionou um aumento de 68%, 73% e 93% nas atividades SOD, APX e CAT, respectivamente (**Figura 7**). Aumentos, em média, de 115% nas atividades das enzimas antioxidantes foram observados em raízes de plântulas tolerantes pré-tratadas com H₂S, expostas ao Al³⁺ (**Figura 7**).

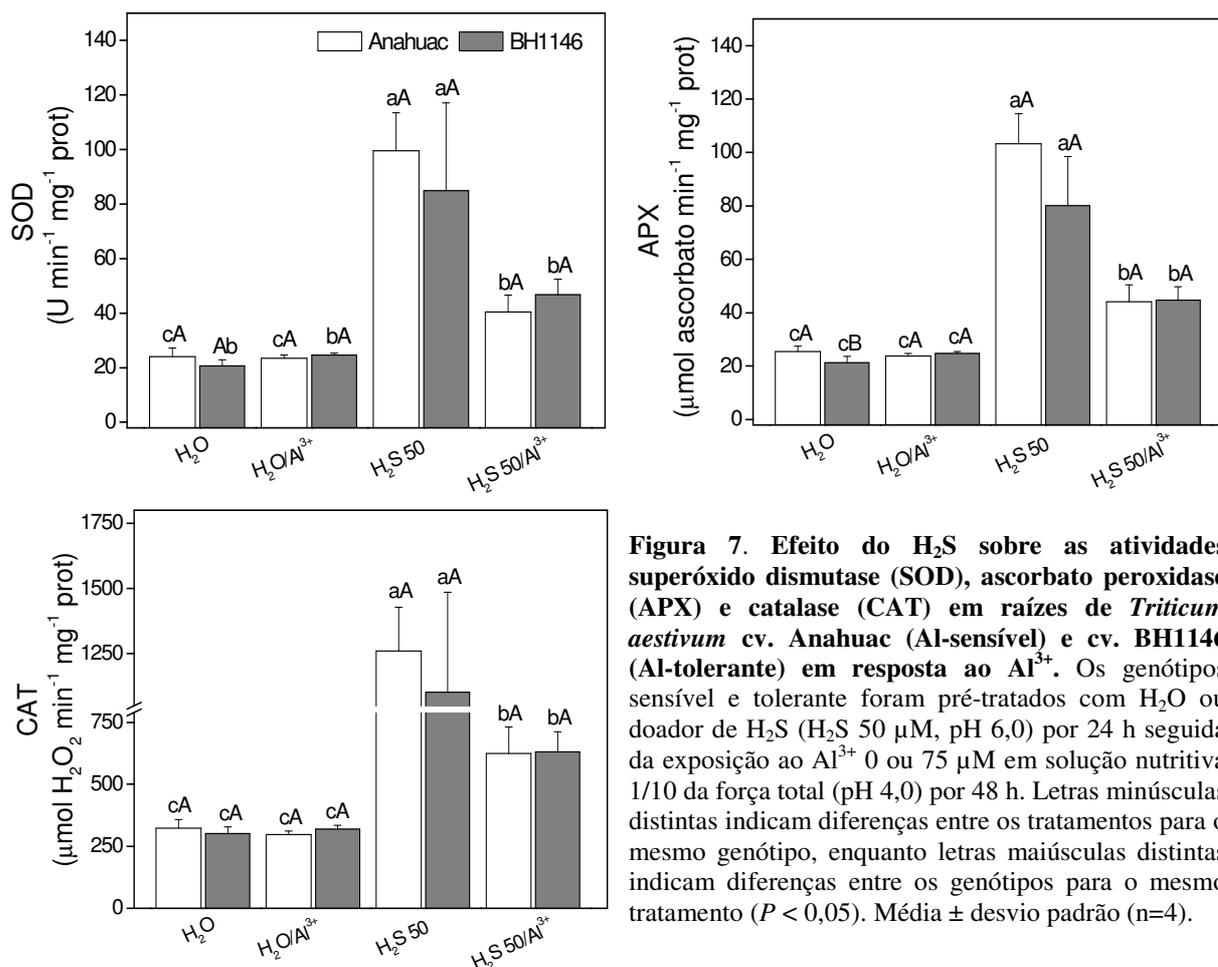


Figura 7. Efeito do H₂S sobre as atividades superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) em raízes de *Triticum aestivum* cv. Anahuac (Al-sensível) e cv. BH1146 (Al-tolerante) em resposta ao Al³⁺. Os genótipos sensível e tolerante foram pré-tratados com H₂O ou doador de H₂S (H₂S 50 μM, pH 6,0) por 24 h seguida da exposição ao Al³⁺ 0 ou 75 μM em solução nutritiva 1/10 da força total (pH 4,0) por 48 h. Letras minúsculas distintas indicam diferenças entre os tratamentos para o mesmo genótipo, enquanto letras maiúsculas distintas indicam diferenças entre os genótipos para o mesmo tratamento ($P < 0,05$). Média ± desvio padrão (n=4).

3.7. Efeito do H₂S sobre a viabilidade de células radiculares expostas ao Al³⁺

A baixa intensidade de coloração azul revelou que ápices radiculares de plântulas-controle (H₂O) de ambos os genótipos apresentaram baixo nível de morte celular (**Figura 8**). A exposição de raízes de plântulas sensíveis ao Al³⁺ (H₂O/Al³⁺), contudo, intensificou eventos de morte celular (**Figura 8**). Em contraste, em raízes tolerantes o tratamento com Al³⁺ (H₂O/Al³⁺) aparenta não afetar a viabilidade celular em comparação às raízes-controle (**Figura 8**). Independentemente da exposição ao Al³⁺, raízes de plântulas de ambos os genótipos pré-tratadas com doador de H₂S (H₂S 50 e H₂S 50/Al³⁺) apresentaram intensa coloração azul indicando aumento da mortalidade celular (**Figura 8**).

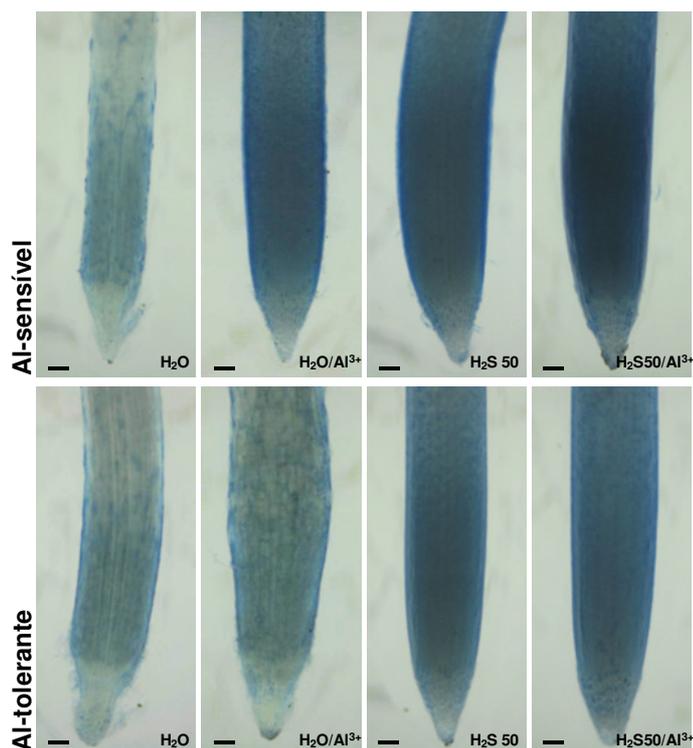


Figura 8. Efeito do H₂S na viabilidade de células radiculares de genótipos de *Triticum aestivum* cv. Anahuac (Al-sensível) e cv. BH1146 (Al-tolerante) expostos ao Al³⁺. Os genótipos sensível e tolerante foram pré-tratados com H₂O ou H₂S (H₂S 50 µM, pH 6,0) por 24 h seguida da exposição ao Al³⁺ a 0 (controle) ou 75 µM em solução nutritiva 1/10 da força total (pH 4,0) por 48 h. A intensidade da coloração azul é proporcional ao número de células mortas. Barras = 250 µm; n de no mínimo 4 indivíduos.

4. Discussão

A diminuição do conteúdo de NO em ambos os genótipos expostos ao Al³⁺, como observado neste estudo (**Tabela 2**), foram reportados para *Hibiscus moscheutos* e *Arabidopsis thaliana* também expostas a este cátion (Illěš et al., 2006; Tian et al., 2007). Maiores níveis basais de NO em plântulas Al-tolerantes, como observado no presente estudo, podem estar relacionados à tolerância no genótipo BH1146 (**Tabela 2**). A diminuição dos níveis desta molécula sinalizadora pode estar relacionada ao decréscimo de sua biossíntese (Tian et al., 2007) ou em decorrência de sua reação direta com EROs (Kopyra e Gwózdź, 2003). Em contraste, plantas de *Phaseolus vulgaris* tratadas com Al³⁺ apresentaram níveis aumentados de NO como resultado de aumento da atividade nitrato redutase (Wang et al., 2010). Estes resultados sugerem que as variações nos níveis de NO desencadeadas pelo estresse por Al³⁺ podem ser espécie-específicas.

Aumentos nos níveis endógenos de H₂S em sementes desta espécie (*T. aestivum*) foram reportados quando expostas a concentrações tóxicas de Al³⁺ (Zhang et al., 2010). O teor

da molécula sinalizadora H_2O_2 nas raízes de ambos os genótipos não foi afetado pelo tratamento com o Al^{3+} . Resultados contrastantes foram observados em raízes e parte aérea de plântulas de cevada (*Hordeum vulgare*) cuja produção de H_2O_2 foi intensificada após exposição ao Al^{3+} (Chen et al., 2013). Ainda, a concentração de H_2O_2 em plântulas de arroz (*Oryza sativa*) declinou após o tratamento com 80 μM de Al^{3+} . Contudo, após exposição destas plântulas à maior concentração do cátion (160 μM) houve o incremento nos níveis de H_2O_2 (Sharma e Dubey, 2007).

A β -ciano-alanina sintase (CAS) é uma enzima que, na presença de cianeto, catalisa a conversão de cisteína a H_2S e β -cianoalanina (Hatzfeld et al., 2000). Neste estudo, o tratamento com Al^{3+} estimulou a atividade CAS em ambos os genótipos, porém, de modo mais acentuado no tolerante (**Figura 3**). De fato, raízes de plântulas tolerantes apresentaram quantidades de H_2S muito maiores que as de plântulas sensíveis (**Tabela 2**).

A atividade da L-cisteína dessulfidrase (L-DES), que converte L-cisteína em piruvato, amônia e H_2S (Li, 2015), foi afetada negativamente pela presença de Al^{3+} . Contudo, este fenômeno não foi expressivo o suficiente para influenciar os níveis endógenos totais de H_2S nas células radiculares (**Tabela 2**). Isso se deve porque a atividade L-DES foi no mínimo 10 vezes menor do que a atividade CAS (**Figura 3**). A atividade da L-cisteína sintase (CS), que catalisa a síntese de L-cisteína e acetato a partir de *O*-acetil serina e H_2S numa reação reversível, não foi afetada pelo tratamento com Al^{3+} (**Figura 3**). Contudo, o aumento da atividade CS por ocasião do tratamento com H_2S é justificado pela oferta deste substrato. Sabe-se que a enzima CAS tem papel relevante na destoxificação de cianeto, produzido concomitantemente à síntese de etileno em plantas não cianogênicas (Yip e Yang, 1988). Ainda, há relatos na literatura de que o tratamento com Al^{3+} induz a síntese de etileno em *Phaseolus vulgaris*, *Lotus japonicus*, *Medicago truncatula* e *Arabidopsis* (Massot et al. 2002; Sun et al., 2007, 2010). Sendo assim, é razoável supor que raízes de *T. aestivum* (planta não cianogênica) tratadas com Al^{3+} apresentaram acúmulo de etileno e conseqüentemente de cianeto, este último destoxificado pela CAS.

A oferta de H_2S exógeno (H_2S 50) contribuiu para a diminuição da atividade CAS, possivelmente por *feedback* negativo, enquanto a CS foi ativada para remover esta molécula catalisando reações de formação de L-cisteína (**Figura 3**). Entretanto, a atividade CAS foi novamente estimulada quando plântulas de ambos os genótipos foram expostas ao H_2S exógeno, seguido do estresse pelo Al^{3+} (H_2S 50/ Al^{3+}) para destoxificação do cianeto. A atividade L-DES, em ambos os genótipos, foi reduzida provavelmente por *feedback* negativo

em função da intensa atividade CAS durante o estresse por Al^{3+} (liberadora de H_2S) ou do fornecimento exógeno de H_2S (**Figura 3**). A diminuição da atividade CAS em raízes tolerantes pré-tratadas com H_2S sem exposição ao Al^{3+} com concomitante aumento da atividade CS pode ser atribuída à reação catalisada pela enzima CS que resulta tanto na síntese de L-cisteína, incorporando H_2S à *O*-acetil-L-serina, quanto na reação liberadora de H_2S (Warrilow e Hawkesford, 2002).

É amplamente conhecido que uma das primeiras respostas a estresses (a)bióticos é o aumento, na planta, da produção de EROs, tais como $\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{OH}$ e H_2O_2 , oriundos da respiração celular (Gratão et al., 2005). Considerando que o Al^{3+} ($\text{H}_2\text{O}/\text{Al}^{3+}$) não afetou a atividade das enzimas SOD, APX e CAT (**Figura 7**), mas diminuiu os níveis de $\cdot\text{O}_2^-$ e $\cdot\text{OH}$ (**Figuras 6 e 5**), independentemente do genótipo, é possível que o *burst* oxidativo gerado tenha sido contido pelo sistema antioxidante não enzimático. Outra possibilidade inclui o efeito negativo do Al^{3+} na respiração celular, como evidenciado pela diminuição da atividade desidrogenase (**Figura 4**). Estes resultados contrastam com aqueles obtidos para outras espécies vegetais, onde foi demonstrado o acúmulo de EROs após a exposição ao Al^{3+} (Yamamoto et al., 2001, 2003; Boscolo et al., 2003; Wang e Yang, 2005; Tabaldi et al., 2009; Nogueirol et al., 2015). A possível produção de cianeto, sugerida pelo aumento da atividade CAS, provavelmente contribuiu ou até mesmo foi responsável pela inibição da atividade respiratória (Domínguez-Solís et al., 2001). Segundo Wurtele et al. (1985), por ser o cianeto um inibidor da respiração celular, as enzimas CAS estão predominantemente localizadas nas mitocôndrias celulares.

Em muitas espécies, a morte celular resulta do estabelecimento do estresse oxidativo pela superprodução das EROs (Boscolo et al., 2003; Sade et al., 2016). Em contraste, apesar dos baixos níveis de EROs, as raízes sensíveis tratadas com Al^{3+} apresentaram maior concentração de células mortas em comparação ao controle (**Figura 8**). Há duas possíveis explicações para tal fato. Primeiro, a inibição da atividade desidrogenase induzida pelo Al^{3+} nas células radiculares (**Figura 4**) resultou na menor produção de energia ocasionando morte celular. A segunda possibilidade se baseia na contenção da entrada de Al^{3+} nas células, desencadeando um mecanismo 'suicida' de proteção, conforme sugerido por Delisle et al. (2001). Neste processo, células da superfície radicular em contato direto com o cátion são removidas constantemente, após quelação do Al^{3+} , protegendo por algum tempo as regiões mais internas das raízes.

Em raízes tolerantes expostas ao Al^{3+} , a baixa densidade de células mortas em relação ao controle (**Figura 8**) demonstra que estas plântulas, de fato, apresentam mecanismos eficientes de tolerância ao metal. Em trigo, o principal mecanismo de resistência é a exsudação de malato por células radiculares capaz de complexar o Al^{3+} . Estes complexos (Al-ácido orgânico) ficam retidos no apoplasto ou, quando formados dentro das células são direcionados aos vacúolos (Ryan et al., 1995; Sasaki et al., 2004). Possivelmente os mecanismos de exclusão tenham sido ativados em trigo sob as condições experimentais relatadas no presente trabalho. A ocorrência de tais eventos justificaria, por exemplo, os efeitos moderados do Al^{3+} sobre a produção de $\cdot\text{O}_2^-$, atividade desidrogenase e principalmente sobre a mortalidade celular (**Figuras 6, 4 e 8**). Raízes de ambos os genótipos pré-tratadas com H_2S (H_2S 50 e H_2S 50/ Al^{3+}) apresentaram em sua superfície intensificação da mortalidade celular (**Figura 8**), além da inibição da atividade desidrogenase (**Figura 4**) e menor produção de $\cdot\text{O}_2^-$ (**Figura 6**). O H_2S em altas concentrações, assim como o Al^{3+} , é tóxico para as plantas, sendo um conhecido inibidor da citocromo oxidase, importante enzima da respiração celular (Beauchamp et al., 1984).

O pré-tratamento das plântulas com H_2S resultou em expressiva mortalidade celular em raízes superficiais de trigo, independentemente da presença do Al^{3+} (H_2S 50 e H_2S 50/ Al^{3+} ; **Figura 8**) sugerindo que a concentração de Na_2S utilizada (50 μM) pode ter sido elevada o suficiente para causar estresse às plântulas. Adicionalmente, os tratamentos supramencionados estimularam a atividade antioxidante enzimática em ambos os genótipos (**Figura 7**). É possível que o incremento significativo na atividade do sistema antioxidante tenha sido desencadeado a fim de proteger as células mais internas do efeito tóxico do H_2S ou que os genótipos avaliados sejam mais sensíveis à presença do H_2S .

5. Conclusões

Os resultados das análises bioquímicas realizadas neste estudo sugerem que o H_2S , na concentração de 50 μM , é tóxico às plântulas de trigo. Este estudo sugere que os genótipos de trigo Anahuac e BH1146 são responsivos a uma concentração mais baixa de H_2S . Portanto, nas condições experimentais adotadas, a hipótese de que o H_2S atua como sinalizador na resposta dos genótipos Anahuac e BH1146 ao Al^{3+} é refutada.

6. 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(2), 300-310.
- Arasimowicz, M., Floryszak-Wieczorek, J. (2007). Nitric oxide as a bioactive signaling molecule in plant stress responses. *Plant Science*, 172,876-887.
- Beauchamp, C., Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44(1), 276-287.
- Beauchamp, R. O., Bus, J. S., Popp, J. A., Boreiko, C. J., Andjelkovich, D. A., Leber, P. (1984). A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 13(1), 25-97.
- Blarney, F. P. C., Nishizawa, N. K., Yoshimura, E. (2004). Timing, magnitude, and location of initial soluble aluminum injuries to mungbean roots. *Soil Science and Plant Nutrition*, 50(1), 67-76.
- Boscolo, P. R., Menossi, M., Jorge, R. A. (2003). Aluminum-induced oxidative stress in maize. *Phytochemistry*, 62(2), 181-189.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Cakmak, I., Horst, W. J. (1991). Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum*, 83(3), 463-468.
- Camargo, C. E. O., Santos, R. R., Júnior, A. P (1992). Trigo duro: tolerância à toxicidade do alumínio em soluções nutritivas e no solo. *Bragantia*, 51(1), 69-76.
- Camargo, C. E. O., Felício, J. C. (1984). Tolerância de cultivares de trigo, triticale e centeio em diferentes níveis de alumínio em solução nutritiva. *Bragantia*, 43(1), 9-16.
- Chen, J., Wu, F. H., Wang, W. H., Zheng, C. J., Lin, G. H., Dong, X. J., Zheng, H. L. (2011). Hydrogen sulphide enhances photosynthesis through promoting chloroplast biogenesis, photosynthetic enzyme expression, and thiol redox modification in *Spinacia oleracea* seedlings. *Journal of Experimental Botany*, 62(13), 4481-4493.
- Cui, W., Chen, H., Zhu, K., Jin, Q., Xie, Y., Cui, J., Xia, Y., Zhang, J., Shen, W. (2014). Cadmium-induced hydrogen sulfide synthesis is involved in cadmium tolerance in *Medicago sativa* by reestablishment of reduced (homo) glutathione and reactive oxygen species homeostases. *Plos One*, 9(10), 1-12.
- Delisle, G., Champoux, M., Houde, M. (2001). Characterization of oxalate oxidase and cell death in Al-sensitive and tolerant wheat roots. *Plant and Cell Physiology*, 42(3), 324-333.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R. A., Lamb, C. (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, 394(6693), 585-588.
- Domínguez-Solís, J. R., Gutiérrez-Alcalá, G., Romero, L. C., Gotor, C. (2001). The cytosolic O-acetylserine (thiol) lyase gene is regulated by heavy metals and can function in cadmium tolerance. *Journal of Biological Chemistry*, 276(12), 9297-9302.

- Fang, T., Cao, Z., Li, J., Shen, W., Huang, L. (2014). Auxin-induced hydrogen sulfide generation is involved in lateral root formation in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*, 76, 44-51.
- Giannopolitis, C. N., Ries, S. K. (1977). Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59(2), 309-314.
- Gratão, P. L., Polle, A., Lea, P. J., Azevedo, R. A. (2005). Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology*, 32(6), 481-494.
- Hatzfeld, Y., Maruyama, A., Schmidt, A., Noji, M., Ishizawa, K., Saito, K. (2000). β -Cyanoalanine synthase is a mitochondrial cysteine synthase-like protein in spinach and *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 123(3), 1163-1172.
- Illěš, P., Schlicht, M., Pavlovkin, J., Lichtscheidl, I., Baluška, F., Ovečka, M. (2006). Aluminium toxicity in plants: internalization of aluminium into cells of the transition zone in *Arabidopsis* root apices related to changes in plasma membrane potential, endosomal behaviour, and nitric oxide production. *Journal of Experimental Botany*, 57(15), 4201-4213.
- Ishikawa, H., Evans, M. L. (1995). Specialized zones of development in roots. *Plant Physiology*, 109(3), 725-727.
- Kawano, T., Kadono, T., Furuichi, T., Muto, S., Lapeyrie, F. (2003). Aluminum-induced distortion in calcium signaling involving oxidative bursts and channel regulation in tobacco BY-2 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 308(1), 35-42.
- Kochian, L. V., Hoekenga, O. A., Pineros, M. A. (2004). How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 459-493.
- Kochian, L. V., Pineros, M. A., Hoekenga, O. A. (2005). The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. In *Root Physiology: From Gene to Function* (pp. 175-195). Springer.
- Kopyra, M., Gwóźdź, E. A. (2003). Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41(11), 1011-1017.
- Kurzbaum, E., Kirzhner, F., Armon, R. (2010). A simple method for dehydrogenase activity visualization of intact plant roots grown in soilless culture using tetrazolium violet. *Plant Root*, 4, 12-16.
- Li, L., Wang, Y., Shen, W. (2012a). Roles of hydrogen sulfide and nitric oxide in the alleviation of cadmium-induced oxidative damage in alfalfa seedling roots. *Biometals*, 25(3), 617-631.
- Li, Z. G. (2015). Chapter thirteen - Analysis of some enzymes activities of hydrogen sulfide metabolism in plants. *Methods in Enzymology*, 555, 253-269.
- Li, Z. G., Gong, M., Xie, H., Yang, L., Li, J. (2012b). Hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide-induced heat tolerance in tobacco (*Nicotiana tabacum* L) suspension cultured cells and involvement of Ca^{2+} and calmodulin. *Plant Science*, 185, 185-189.
- Liu, S., Dong, Y., Xu, L., Kong, J. (2014). Effects of foliar applications of nitric oxide and salicylic acid on salt-induced changes in photosynthesis and antioxidative metabolism of cotton seedlings. *Plant Growth Regulation*, 73(1), 67-78.

- Ma, J. F. (2007). Syndrome of aluminum toxicity and diversity of aluminum resistance in higher plants. *International Review of Cytology*, 264, 225-252.
- Massot, N., Nicander, B., Barceló, J., Poschenrieder, C. H., Tillberg, E. (2002). A rapid increase in cytokinin levels and enhanced ethylene evolution precede Al³⁺-induced inhibition of root growth in bean seedlings (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Growth Regulation*, 37(2), 105-112.
- Modolo, L. V., Augusto, O., Almeida, I. M., 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(17), 3814-3820.
- Møller, I. M., Jensen, P. E., Hansson, A. (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 58, 459-481.
- Mossor-Pietraszewska, T. (2001). Effect of aluminium on plant growth and metabolism. *Acta Biochimica Polonica*, 48(3), 673-686.
- Nakano, Y., Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22(5), 867-880.
- Nogueirol, R. C., Monteiro, F. A., Gratao, P. L., Borgo, L., Azevedo, R. A. (2015). Tropical soils with high aluminum concentrations cause oxidative stress in two tomato genotypes. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187(3), 1-16.
- Ryan, P. R., Delhaize, E., Randall, P. J. (1995). Characterization of Al-stimulated efflux of malate from the apices of Al-tolerant wheat roots. *Planta*, 196(1), 103-110.
- Sade, H., Meriga, B., Surapu, V., Gadi, J., Sunita, M. S. L., Suravajhala, P., Kishor, P. K. (2016). Toxicity and tolerance of aluminum in plants: tailoring plants to suit to acid soils. *BioMetals*, 1-24.
- Sasaki, T., Yamamoto, Y., Ezaki, B., Katsuhara, M., Ahn, S. J., Ryan, P. R., Matsumoto, H. (2004). A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. *The Plant Journal*, 37(5), 645-653.
- Shan, C., Dai, H., Sun, Y. (2012). Hydrogen sulfide protects wheat seedlings against copper stress by regulating the ascorbate and glutathione metabolism in leaves. *Australian Journal of Crop Science*, 6(2), 248.
- Sharma, P., Dubey, R. S. (2007). Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum. *Plant Cell Reports*, 26(11), 2027-2038.
- Shi, H., Ye, T., Chan, Z. (2013). Exogenous application of hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide enhanced multiple abiotic stress tolerance in bermudagrass (*Cynodon dactylon* (L). Pers.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 71, 226-234.
- Shi, Q., Ding, F., Wang, X., Wei, M. (2007). Exogenous nitric oxide protects cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(8), 542-550.
- Sivaguru, M., Horst, W. J. (1998). The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize. *Plant Physiology*, 116(1), 155-163.
- Sun, P., Tian, Q. Y., Chen, J., Zhang, W. H. (2010). Aluminium-induced inhibition of root elongation in *Arabidopsis* is mediated by ethylene and auxin. *Journal of Experimental Botany*, 61(2), 347-356.

- Sun, P., Tian, Q. Y., Zhao, M. G., Dai, X. Y., Huang, J. H., Li, L. H., Zhang, W. H. (2007). Aluminum-induced ethylene production is associated with inhibition of root elongation in *Lotus japonicus* L. *Plant and Cell Physiology*, 48(8), 1229-1235.
- Tabaldi, L. A., Cargnelutti, D., Gonçalves, J. F., Pereira, L. B., Castro, G. Y., Maldaner, J., Rauber, Rossato, L. V., Bisognin, D. A., Schetinger, M. R., C., Nicoloso, F. T. (2009). Oxidative stress is an early symptom triggered by aluminum in Al-sensitive potato plantlets. *Chemosphere*, 76(10), 1402-1409.
- Tanaka, A., Mulleriyawa, R. P., Yasu, T. (1968). Possibility of hydrogen sulfide induced iron toxicity of the rice plant. *Soil Science and Plant Nutrition*, 14(1), 1-6.
- Tewari, R., Horemans, N., Nauts, R., Wannijn, J., Van Hees, M., Vandenhove, H. (2015). Uranium exposure induces nitric oxide and hydrogen peroxide generation in *Arabidopsis thaliana*. *Environmental and Experimental Botany*, 120, 55-64.
- Tian, Q. Y., Sun, D. H., Zhao, M. G., Zhang, W. H. (2007). Inhibition of nitric oxide synthase (NOS) underlies aluminum-induced inhibition of root elongation in *Hibiscus moscheutos*. *New Phytologist*, 174(2), 322-331.
- Tossi, V., Lombardo, C., Cassia, R., Lamattina, L. (2012). Nitric oxide and flavonoids are systemically induced by UV-B in maize leaves. *Plant Science*, 193, 103-109.
- 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(3), 281-288.
- Wang, Y. S., Yang, Z. M. (2005). Nitric oxide reduces aluminum toxicity by preventing oxidative stress in the roots of *Cassia tora* L. *Plant and Cell Physiology*, 46(12), 1915-1923.
- Warrilow, A. G., Hawkesford, M. J. (2002). Modulation of cyanoalanine synthase and O-acetylserine (thiol) lyases A and B activity by β -substituted alanyl and anion inhibitors. *Journal of Experimental Botany*, 53(368), 439-445.
- Wurtele, E. S., Nikolau, B. J., Conn, E. E. (1985). Subcellular and developmental distribution of β -cyanoalanine synthase in barley leaves. *Plant Physiology*, 78(2), 285-290.
- Yamamoto, Y., Kobayashi, Y., Devi, S. R., Rikiishi, S., Matsumoto, H. (2003) Oxidative stress triggered by aluminum in plant roots. *Plant and Soil*, 255, 239-24.
- 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(1), 199-208.
- Yip, W. K., Yang, S. F. (1988). Cyanide metabolism in relation to ethylene production in plant tissues. *Plant Physiology*, 88(2), 473-476.
- Zhang, H., Tan, Z. Q., Hu, L. Y., Wang, S. H., Luo, J. P., Jones, R. L. (2010). Hydrogen sulfide alleviates aluminum toxicity in germinating wheat seedlings. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(6), 556-567.
- Zhang, H., Tang, J., Liu, X. P., Wang, Y., Yu, W., Peng, W. Y., Fang, F., Ma, D. F., Wei, Z.J., Hu, L. Y. (2009). Hydrogen sulfide promotes root organogenesis in *Ipomoea batatas*, *Salix matsudana* and *Glycine max*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 51(12), 1086-1094.

Zhang, Y., Chen, B., Xu, Z., Shi, Z., Chen, S., Huang, X., Chen, J. Wang, X. (2014). Involvement of reactive oxygen species in endosperm cap weakening and embryo elongation growth during lettuce seed germination. *Journal of Experimental Botany*, doi:10.1093/jxb/eru167

Considerações finais

Os genótipos sensíveis (ATF8B, sorgo e Anahuac, trigo) sofreram de modo intenso os danos provocados pelo alumínio (Al^{3+}). Os efeitos nocivos do Al^{3+} nos genótipos tolerantes (ATF10B, sorgo e BH1146, trigo), quando ocorreram, foram moderados. A tolerância ao Al^{3+} em sorgo é possivelmente é mediada pelo H_2S uma vez que maiores quantidades desta molécula foram detectadas no genótipo tolerante. Além disso, o fornecimento exógeno de H_2S mitigou os danos induzidos pelo Al^{3+} no genótipo sensível, validando a hipótese de que esta molécula sinalizadora medeia à tolerância de sorgo ao metal em questão. Diferentemente, o Al^{3+} estimulou a produção de H_2S em plântulas de trigo de ambos os genótipos. No entanto, o fornecimento exógeno de H_2S causou efeitos rizotóxicos às plântulas, independentemente do genótipo. Estes resultados sugerem que além de o H_2S a 50 μM ter sido nocivo às plantas de trigo, ele não esteve relacionado à resistência ao Al^{3+} . Concluiu-se que as respostas de defesa ativadas por H_2S durante o estresse por Al^{3+} , dependendo da concentração, podem ser espécies-específicas e que os seus efeitos benéficos ou tóxicos dependem da sensibilidade da espécie e da concentração do doador.