

JANAÍNA DE OLIVEIRA COSTA E SILVA

**Morfofisiologia foliar sob estresse causado pelo alumínio em
cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) com tolerância diferencial**

Belo Horizonte
Minas Gerais – Brasil
2011

JANAÍNA DE OLIVEIRA COSTA E SILVA

Morfofisiologia foliar sob estresse causado pelo alumínio em cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) com tolerância diferencial

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção de título de doutor em Biologia Vegetal. Área de concentração: Fisiologia Vegetal.

Orientador

Prof. Marcel Giovanni Costa França

Co-orientadores

Prof. Elder Antônio Sousa e Paiva

Prof^a. Luzia Valentina Modolo

Belo Horizonte
Minas Gerais – Brasil
2011

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFMG

Silva, Janaína de Oliveira Costa e.
Morfofisiologia foliar sob estresse causado pelo alumínio em cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) com tolerância diferencial. Janaína de Oliveira Costa e Silva. – Belo Horizonte: UFMG, 2011. 78 p.

Orientador: Marcel Giovanni Costa França.
Tese (Doutorado) – UFMG.
Bibliografia.

1. Raiz. 2. Ultraestrutura. 3. Fotossíntese. 4. Óxido nítrico. 5. Estresse abiótico. I. Universidade Federal de Minas Gerais. II. Título.

JANAÍNA DE OLIVEIRA COSTA E SILVA

Morfofisiologia foliar sob estresse causado pelo alumínio em cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) com tolerância diferencial

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção de título de doutor em Biologia Vegetal. Área de concentração: Fisiologia Vegetal.

Aprovada em 26 de abril de 2011

Banca examinadora

Prof. Dr. Everaldo Zonta

Prof^a. Dr^a. Cristina G. de S. Queiroz

Prof. Dr. Pedro Antônio O. Mangabeira

Prof^a. Dr^a. Rosy Mary dos S. Isaias

Prof. Dr. Marcel Giovanni Costa França
UFMG
(Orientador)
Belo Horizonte
Minas Gerais – Brasil
2011

Aos meus pais, Aloísio e Raquel, e ao meu irmão, Lucas, pelo apoio
incondicional em todos os momentos de minha vida.
Ao meu esposo Evandro e a nossa Helena, pelo apoio,
dedicação e por todo o carinho.
A vida, por sua graça e plenitude.

AGRADECIMENTOS

À vida, por me proporcionar momentos sublimes, mas também por permitir que eu tropeços e quedas para aprender sobre minha insignificância e sobre o quanto ainda tenho que crescer e ser melhor.

Aos meus pais e meu irmão, a quem eu tanto amo e que sempre me apóiam com muito carinho e amor para que eu possa seguir em frente e enfrentar os desafios da vida.

Ao Júnior, meu marido, meu amor e meu companheiro, que esteve e está ao meu lado em todos os momentos para me ajudar a superar os momentos difíceis e a celebrar os de felicidade.

À Té, Dani, Marcelão, Paula, Lud, Lucinho e Flavão, companheiros sempre, para todos os momentos.

A todos os meus amigos que são a família que a vida nos permite escolher, sempre companheiros e que deixam tudo muito mais alegre.

Aos meus avôs e avós, em especial à Mãe Ilza, que amo tanto, pelas lições de vida.

Aos meus familiares, tios, tias, primos e primas, que sempre estiveram junto comigo me acompanhando me dando todo apoio.

À minha segunda família, Janinha, Evandro, Tullinha, Roberto, Bibinha e Amandinha, Dudu, Carol e Caio, que me acolheram com carinho.

A todos da família Gonçalves e da família Braz de Araújo, que me colocaram também como membro da família e me tratam muito bem.

Ao Marcel, que me ensinou os primeiros passos da Fisiologia Vegetal e que sempre esteve ao meu lado, me dando apoiando e acreditando em mim.

À Luzia e ao Elder, pela orientação e pelos ensinamentos. Muito dessa tese devo a vocês.

A todos os meus professores, pois se hoje estou redigindo essa dissertação é porque eles acreditaram em mim e me ajudaram a crescer em aprendizado a cada dia.

Ao Ângelo e à Clésia pela colaboração e pelos ensinamentos, além de emprestarem espaço no laboratório para que eu pudesse trabalhar com tranquilidade.

A todos os estudantes e professores do laboratório de fisiologia e do departamento de Biologia Vegetal, que me acompanharam nesses quatro anos de caminhada, me ajudando e dando apoio.

À Socorro, à Terezinha e a todos os funcionários do departamento, sempre amigos. Sem eles este trabalho não seria possível.

A todos do Colégio Santa Maria, por entenderem minhas angústias, anseios e participarem diariamente da minha vida.

À turma do direito, companheira, alegre e na qual tenho conquistado grandes amigos.

À banca examinadora da tese, por ter aceitado avaliar e colaborar com esse trabalho.

Enfim, a todas as pessoas que de algum modo participaram e participam da minha vida, contribuindo para o meu crescimento.

SUMÁRIO

1	Resumo	11
2	Abstract	13
3	Introdução Geral	14
4	Referencial Teórico	17
5.	Material e Métodos	24
5.1	Material vegetal e indução do estresse por alumínio	24
5.2	Microscopia de luz	26
5.3	Quantificação de alumínio em folhas de plântulas de arroz	26
5.4	Microscopia eletrônica	27
5.5	Determinação do conteúdo de pigmentos cloroplastídicos	27
5.6	Performance fotossintética	27
5.7	Performance fotossintética na presença de NO	28
6	Resultados	29
6.1	Efeito citotóxico do alumínio	29
6.2	Organização estrutural	31
6.3	Quantificação de alumínio em folhas de plântulas de arroz	34
6.4	<i>Avaliação da ultraestrutura em folhas de plântulas de arroz</i>	37
6.4.1	Aspectos ultraestruturais do mesofilo de plântulas controle	37
6.4.2	Aspectos ultraestruturais do mesofilo de plântulas submetidas a 160 μ mol Al	40
6.4.3	Aspectos ultraestruturais do mesofilo de plântulas submetidas a 500 μ mol Al	43
6.5	Determinação do conteúdo de pigmentos cloroplastídicos	49
6.6	Avaliação da performance fotossintética	51
7	Discussão	55
8	Considerações finais e perspectivas	65
9	Referências Bibliográficas	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Efeito do Al^{3+} em plântulas de arroz Al-tolerante sem parte das raízes (cultivar Comum Branco).	30
Figura 2.	Organização estrutural de raízes e lâmina foliar de <i>Oryza sativa</i> L. Al-sensível e Al-tolerante.	32
Figura 3.	Aspectos ultraestruturais do mesofilo de <i>Oryza sativa</i> L., cultivado em solução sem alumínio (controle) e com raízes intactas.	38
Figura 4.	Aspectos ultraestruturais do mesofilo de <i>Oryza sativa</i> L., cultivado em solução com $160\mu M$ Al com raízes intactas.	41
Figura 5.	Aspectos ultraestruturais do mesofilo de <i>Oryza sativa</i> L., cultivado em solução com $500\mu M$ Al e raízes intactas.	45
Figura 6.	Aspectos ultraestruturais do mesofilo de <i>Oryza sativa</i> L., cultivado em solução com $500\mu M$ Al^{3+} e ápices radiculares removidos.	47
Figura 7.	Efeito do alumínio na concentração de clorofilas a, b e carotenóides em folhas de plântulas de arroz.	50
Figura 8.	Efeito do Al^{3+} no fotossistema II (PSII).	53
Figura 9.	Efeito do tratamento com doador de NO (GSNO) no fotossistema II (PSII) de plantas sem parte das raízes, tratadas com Al^{3+} .	54

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.	Composição da solução nutritiva para cultivo e crescimento de plântulas de arroz Al-sensível e Al-tolerante, durante o período de 21 dias para posterior indução de estresse por Al.	25
Tabela 2.	Quantificação foliar de Al^{3+} em folhas de plântulas de arroz Al-tolerante (Comum Branco) e Al-sensível (IAC 1289) intactas ou após remoção de parte das raízes cultivadas na presença de Al^{3+} .	36
Tabela 3.	Quantificação de Al^{3+} em sementes de arroz Al-tolerante (Comum Branco) e Al-sensível (IAC 1289).	36

RESUMO

O sintoma marcante da toxidez por alumínio (Al^{3+}) em plantas é a inibição do crescimento radicular. Diversos estudos apontam o ápice radicular como sítio primário da resposta à sensibilidade ou da tolerância ao Al. Isso ocorre devido à conhecida ação dos mecanismos de exclusão ou de resistência, que operam externamente às estrias de Caspary na endoderme. A ação conjunta dos processos fisiológicos e bioquímicos, associados à barreira física imposta pela endoderme, impede o deslocamento do Al para o cilindro central e sua translocação para a parte aérea. Avaliações dos efeitos tóxicos do Al na parte aérea, sobretudo na em relação à ultraestrutura, apresentam somente os efeitos indiretos provocados pelo Al^{3+} na parte aérea. Este trabalho teve como proposta estabelecer um modelo para o estudo do deslocamento do Al^{3+} para a parte aérea. Para o estabelecimento do modelo foram removidos os ápices radiculares e, posteriormente, parte das raízes de plantas de arroz. A funcionalidade do modelo foi testada a partir do efeito do Al^{3+} nas folhas de duas cultivares de arroz com tolerância diferencial ao Al, que tiveram ou não parte das raízes removidas. A quantificação de Al na parte aérea das duas cultivares utilizadas demonstrou o sucesso do modelo. As análises fotossintéticas apresentaram maior fotoinibição nas sensíveis tratadas com Al em relação às tolerantes. Na microscopia de luz não foi observada a produção de tiloses nos elementos de vaso. Nessas análises, foram visualizadas alterações no mesofilo característicos de necrose e ambas as cultivares tratadas com Al. Análises ultraestruturais demonstraram alterações a estrutura dos cloroplastos e das mitocôndrias, assim como processo de interação entre tais organelas. O óxido nítrico (NO) está diretamente envolvido na resposta ao estresse por Al. Para verificar seu possível efeito na parte aérea e a provável reversão do estresse foram avaliados os efeitos dessa molécula no aparato fotossintético. Os resultados revelaram diferenças na taxa de transporte de elétrons para o fotossistema II (PSII) e, na eficiência fotossintética, mostrando que a cultivar sensível responde melhor à presença de NO em plantas sob estresse por Al em relação à cultivar tolerante. Dessa maneira, o fornecimento

de NO, através de doador de óxido nítrico S-nitrosoglutathione GSNO, foi capaz de reverter alguns sintomas de toxidez nas plantas sensíveis

permitindo a recuperação parcial da atividade fotossintética das mesmas.

Palavras-chave: raiz, óxido nítrico, estresse abiótico, ultraestrutura, fotossíntese.

ABSTRACT

Inhibition of radicular growing is the remarkable symptom of aluminum (Al^{3+}) toxicity in plants. Several studies point out the root tip as the primary site of tolerance or sensitivity to Al. This occurs due to known mechanisms of exclusion or resistance, which operate outside of Casparian strips in endoderm. The conjunct action of physiological and biochemical processes associated to the physical barrier imposed by endoderm prevents the uptake of Al to the central cylinder and its translocation to the shoots. Evaluations of toxic effects caused by Al on the shoots, particularly in relation to the ultrastructure, only demonstrate the indirect effects caused by Al^{3+} in the leaves. This work proposed establish a model for studying the translocation of Al^{3+} to the shoot, from the removal of root apex as well as part of the roots of rice plants and the subsequent effect of this metal in leaves of plants with different tolerance to Al. To create this model, we used two rice cultivars with different tolerance to Al. Intact plants or plants that had part of its roots removed were used. The quantification of Al in shoots of both cultivars showed the success of the model. The photosynthetic analysis showed higher photoinhibition in sensitive treated with Al in relation to the tolerant. In light microscopy there was no tyloses production in vessel elements. In these tests, changes were seen in the mesophyll like necrosis in both cultivars treated with Al. Ultrastructural analysis showed changes in structure of chloroplasts and mitochondria, as well as a process of interaction between these organelles. Nitric oxide (NO) is directly involved in the Al stress response. In order to verify its possible effect on the shoot and the likely reversal of stress, the impact of this molecule for the photosynthetic apparatus was evaluated. The results revealed differences in the rate of electron transport to photosystem II (PSII), as well as in the photosynthetic efficiency. This result demonstrates that the sensitive cultivar responds better than the tolerant one to NO presence in plants under Al stress. Therefore, NO supplied by nitric oxide-donor S-nitrosoglutathione (GSNO) was

able to reverse some toxicity symptoms in Al-sensitive plants allowing them to maintain partially photosynthetic activity.

Key-works: root, nitric oxide, abiotic stress, ultrastructure, photosynthesis.

INTRODUÇÃO GERAL

O alumínio (Al) é o metal mais abundante do planeta e o terceiro elemento mais comum na crosta terrestre (Jansen *et al.*, 2002). A toxidez por este metal é um dos fatores que mais limitam o crescimento vegetal em solos com pH ácido (pH < 5,5) e estes solos correspondem a cerca de 30% das áreas cultiváveis no mundo (Uexküll e Mutert, 1995).

Há diversos relatos da toxidez imposta pelo Al em diversos organismos vivos (Jansen *et al.*, 2002). Geralmente, as formas de ocorrência do Al são estáveis e não tóxicas, tais como Al_2SiO_5 , $\text{Al}(\text{OH})_3$, AlPO_4 , e complexos Al-componentes orgânicos (Jansen *et al.*, 2002). Entretanto, em algumas condições este elemento pode se tornar solúvel, por exemplo, quando o ambiente se torna acidificado, formando cátions trivalentes responsáveis por se ligar a alguns nutrientes no solo, ocasionando os diferentes sintomas que levam a toxidez pelo alumínio nas plantas típicas do Brasil (Jansen *et al.*, 2002).

O principal sintoma da toxidez do Al nas plantas é a rápida inibição do crescimento radicular, causado por diversos mecanismos de resposta, tais como, interações do Al^{3+} à parede celular e membrana plasmática, lesões no apoplasto, produção de calose, entre outros (Godbold *et al.*, 1995; Sivaguru e Horst, 1998; Yamamoto *et al.*, 2001; Bhujra *et al.*, 2004, Ma *et al.*, 2004). Em estudos que tratam da toxidez por Al em arroz, a maior inibição do crescimento radicular ocorre em cultivares sensíveis ao Al e esses sintomas são relatados em diversos trabalhos (Ramos, 1999; Vasconcelos *et al.*, 2002 a, b; Alvim, 2006).

Os estudos que abordam o estresse causado pelo Al no sistema radicular de plantas são bem representativos, entretanto, os mecanismos de sensibilidade ou de tolerância em plantas estão longe de serem completamente esclarecidos. Além disso, estudos relativos ao efeito direto e indireto do alumínio na parte aérea ainda são bastante incipientes. Os primeiros estudos e que indicam alterações na parte aérea de plantas cultivadas foram realizados por Moustakas *et al.*, (1996), apresentando alterações fisiológicas e ultraestruturais causadas pelo efeito indireto de Al na parte aérea. Desde então

alguns grupos de pesquisa começaram a atuar na mesma linha, no sentido de buscar um maior entendimento sobre o efeito do Al na parte aérea de plantas, através de análises ultraestruturais, estudos moleculares e análises fisiológicas (Moustakas *et al.* 1997; Ma *et al.*, 2000; Peixoto *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2010; Li e Xing, 2011). No entanto, ainda há muito a se investigar sobre o impacto deste metal na parte aérea das plantas.

Em solos calcários, a disponibilidade de Al fitotóxico diminui consideravelmente, a ponto de não interferir no crescimento e desenvolvimento da maioria das plantas cultiváveis. No entanto, no cerrado brasileiro encontram-se diversas plantas tolerantes e hiperacumuladoras de Al. Trabalho recente relata a necessidade apresentada por *Qualea cordata* em relação a esse metal para seu crescimento e desenvolvimento (Alvim, 2010), mesmo em solos ácidos, contrariando a idéia, até então apresentada pela maioria dos autores, que o considerava sempre prejudicial. Haridasan (2008) constatou em seus estudos que plantas do cerrado, adaptadas a solos ácidos e ricos em Al, apresentaram inibição no crescimento e desenvolvimento, com conseqüente degradação de clorofila, quando essas foram cultivadas em solos calcários. Dessa maneira, a chamada tolerância das plantas hiperacumuladoras ao Al não se restringe ao sistema radicular, podendo ser observado também na parte aérea (de Andrade *et al.*, 2011).

O óxido nítrico (NO), atualmente, tem sido considerado um regulador do crescimento vegetal, diretamente ligado a diversos tipos de estresses abióticos (Qian *et al.*, 2009, Farooq *et al.*, 2009). Hsu e Kao (2004) relataram em seus estudos redução da toxicidade do cádmio em folhas de arroz na presença de NO. Recentemente, Marciano *et al.* (2010) relatara a importância do NO na germinação de sementes e no crescimento radicular em presença de Al (Marciano *et al.*, 2010). Assim, essa molécula pode também ser requerida para a resposta à toxidez por Al na parte aérea, contribuindo assim para a reversão do estresse ocasionado pelo Al em plantas tolerantes e sensíveis a esse metal.

Atualmente o Brasil está entre os 10 maiores produtores de arroz no mundo, sendo superado somente pelos países do oriente médio. A produção anual de arroz no Brasil gira em torno de 12 milhões de toneladas (FAO, 2010),

sendo que somente a Ásia no ano de 2010 teve uma produção de arroz equivalente a 643 milhões de toneladas do grão. O arroz no Brasil é cultivado em dois tipos de ecossistemas, várzeas e terras altas. O sistema de terras altas ocupa grande parte do cerrado brasileiro, cujo solo é ácido e com elevado conteúdo de alumínio em sua forma tóxica (Embrapa Arroz e Feijão, 2007).

Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver um modelo experimental que permitisse o transporte de alumínio para a parte aérea. Tal modelo foi construído com base e duas cultivares de arroz com tolerância diferencial ao Al que tiveram parte de suas raízes removidas mecanicamente para permitir a translocação de Al^{3+} para a parte aérea. Respostas de sensibilidade ou de tolerância ao Al na parte aérea foram testadas para validar o modelo experimental. Para verificar os efeitos diretos do metal na parte aérea, foram realizadas quantificações de Al nas folhas. Posteriormente, foram realizadas análises morfológicas, anatômicas, ultraestruturais e fotossintéticas. Além disso, foram verificados os efeitos do NO sobre o aparato fotossintético em folhas submetidas ao estresse por Al a fim de investigar os efeitos desse regulador de crescimento sobre tal estresse abiótico.

REFERENCIAL TEÓRICO

O alumínio (Al) é o mais abundante metal encontrado na crosta terrestre (Jansen *et al.*, 2002) e se encontra disponível em solos ácidos ($\text{pH} \leq 5.3$), no qual forma espécies químicas que afetam negativamente o desenvolvimento radicular, assim como o cultivo de plantas (Pietraszewska, 2001). A citotoxicidade do Al leva a inibição da divisão celular, ao desbalanço nutricional e hídrico, assim como diversos outros fatores prejudiciais à estrutura e crescimento vegetal (Godbold *et al.*, 1995; Sivaguru e Horst, 1998; Yamamoto *et al.*, 2001; Bhujra *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2004). A maioria dos estudos realizados com a presença de alumínio e a sua relação com as plantas são focados no sistema radicular, sendo este o primeiro sítio de inibição de transporte do Al para a parte aérea.

Vasconcelos *et al.*, (2002a) demonstraram em arroz que a diferença entre plantas sensíveis e tolerantes ao Al, está diretamente ligada ao crescimento radicular, sendo as sensíveis capazes de crescer somente em ambientes onde o Al não é fitotóxico e as tolerantes, também chamadas resistentes, capazes de se desenvolver também em elevadas concentrações de Al. Questão fundamental é que algumas espécies ou mesmo cultivares apresentam taxas de crescimento superiores em elevadas concentrações de alumínio, as quais seriam tóxicas para a maioria dos organismos (Jansen *et al.*, 2002). Essa tolerância diferencial, em genótipos de trigo, foi associada com a capacidade das raízes das plantas de controlarem a absorção de Al e a partição de nutrientes em outros tecidos (Silva *et al.*, 2010). Genes que codificam proteínas relacionadas à tolerância ao Al são conhecidamente expressos no ápice radicular, contribuindo para a resposta efetiva desse órgão em condições de estresses abióticos (Ryan *et al.*, 1993; Sivaguru e Horst, 1998). Estudos realizados com plantas de milho (*Zea mays*) revelaram que a região distal da zona de transição do ápice radicular apresenta-se mais sensível ao Al que as demais regiões radiculares (Sivaguru e Horst, 1998). Além disso, a endoderme funciona como uma barreira física que bloqueia a entrada de Al, promovendo o acúmulo desse metal nas células do córtex

radicular (Hodson e Wilkins, 1991) ou na epiderme radicular (Delhaize *et al.*, 1993a). Em conjunto, esses fatores criam uma barreira que evita a translocação do Al das raízes para as folhas através do cilindro central (Silva *et al.*, 2010). Assim, a remoção do ápice radicular poderia permitir o livre transporte de alumínio para a parte aérea, já que a barreira física que bloqueia esse transporte seria retirada, expondo assim, o cilindro central para a entrada do metal.

De acordo com Sivaguru e Horst (1998), a parte distal da zona de transição da raiz (1-2 mm) acumula maior quantidade de alumínio em relação às demais regiões. O acúmulo de alumínio no ápice radicular de trigo foi considerado como indicativo de sensibilidade ao alumínio (Samuels *et al.*, 1997). Assim, a tolerância ao alumínio aparentemente está relacionada à capacidade das plantas de proteger esta região da raiz ao elemento, seja pela produção de ácidos orgânicos, tal como malato no trigo (Delhaize *et al.*, 1993b; Ryan *et al.*, 1995) e citrato no milho (Pellet *et al.*, 1995). Estes autores demonstraram que esta região do ápice da raiz é o sítio mais importante de excreção de ácidos orgânicos.

O alongamento radicular é um processo complexo que envolve a divisão e a expansão celular. Entretanto, a divisão celular *per se* não promove o crescimento da raiz (Beemster e Baskin, 1998). O efeito tóxico do alumínio sobre a expansão celular na raiz está bem estabelecido em diversos estudos (Ryan *et al.*, 1993; Delhaize *et al.*, 1993a; Samuels *et al.*, 1997; Sivaguru *et al.*, 1998; Vasconcelos *et al.*, 2002 a, b; Ma *et al.*, 2004; Doncheva *et al.*, 2005; Hossain *et al.*, 2006) e não há dúvidas de que o primeiro evento causado pelo Al tóxico é a inibição do alongamento radicular. No entanto, não se sabe ao certo quais mecanismos bioquímicos e fisiológicos são ativados para levar a estes efeitos. De acordo com Doncheva *et al.* (2005), a auxina parece ter importante papel nos efeitos de inibição da divisão celular na presença do Al. Entretanto, interações com outros reguladores de crescimento, tais como o óxido nítrico, também podem estar envolvidos nestes eventos.

Estudos recentes têm demonstrado que plantas de cerrado adaptadas a solos ácidos e ricos em Al conseguem incorporar e translocar esse metal para

a parte aérea sem prejudicar seu crescimento e desenvolvimento (Haridasan, 2008). Alvim (2010) mostrou em seus estudos que o Al desempenha papel benéfico no metabolismo de *Qualea cordata*, planta de cerrado acumuladora desse metal. Isso leva a crer que os mecanismos de tolerância podem estar relacionados também com a parte aérea de plantas tolerantes e/ou acumuladoras.

Em diversos estudos, foi relatado que o alumínio se liga a vários componentes da parede celular (Zhang e Taylor, 1990; Delhaize *et al.*, 1993a) e esta ligação tem importante papel na inibição do alongamento radicular (Zheng e Yang, 2005). Porém, de acordo com Hossain *et al.* (2006) esta inibição do crescimento da raiz não está diretamente ligado a produção primária de celulose já que o tratamento com alumínio em plantas de trigo sensíveis e tolerantes não influenciou no conteúdo desta molécula nos ápices radiculares. Doncheva *et al.* (2005) observaram em linhagem de milho resistentes ao Al, menor coloração de hematoxilina quando tratada com Al em relação à linhagem sensível, mostrando que a maior exclusão do Al pelas raízes da planta tem importante papel na resistência ao metal. Porém, as interações precisas do alumínio com a parede celular e outras estruturas da raiz precisam ser exploradas de maneira mais complexa para o entendimento dos processos que levam a tolerância das plantas ao Al.

Os mecanismos radiculares utilizados pelas plantas para bloquear a entrada de Al nas células incluem ainda a complexação de Al com ácidos orgânicos exudados na rizosfera ou com componentes da parede celular, a precipitação de Al extra e intracelular, assim como sua compartimentalização (Ryan *et al.*, 1993, Sivaguru e Horst, 1998, Silva *et al.*, 2010). Essas respostas estão bem caracterizadas no sistema radicular das plantas (Kochian *et al.*, 2002). Em geral, plantas cultivadas são capazes de prevenir o acúmulo de alumínio nas folhas devido à eficiência dos mecanismos acima citados. No entanto, por outro lado as plantas nativas de solos ricos em Al, que apresentam elevados níveis de compostos complexados a este elemento em suas folhas (Kochian *et al.*, 2002, Jansen *et al.*, 2002). O sistema radicular em bloquear a entrada de Al ou a saturação de Al no solo é alta o suficiente para superar os

mecanismos de exclusão. Os tilos são semelhantes a tumores formados por células parenquimáticas que podem se desenvolver através de pontuações das células traqueais, ligando células do parênquima aos elementos traqueais do xilema e que podem obstruir por completo o vaso. Esse tipo de formação celular pode levar a obstrução dos elementos traqueais para impedir a entrada de patógenos e a translocação de substâncias indesejadas para a parte aérea da planta (Bergamin *et al.*, 1995; Souza e Maringone, 2008; Carneiro e Cruz, 2009). Assim, estudos relativos à formação de tilose nas raízes de arroz cortadas para permitir o transporte de Al para a parte aérea são relevantes no presente estudo.

Análises estruturais utilizando a microscopia de luz e análises ultraestruturais através da microscopia eletrônica são importantes ferramentas para verificar alterações morfoanatômicas e ultraestruturais provocadas por compostos exógenos. Dessa maneira, alguns estudos têm buscado tais métodos para avaliar o estresse ocasionado pelo Al em vegetais. A toxidez por alumínio ocasiona distúrbios no Complexo de Golgi e em sua função secretora e diminuição na produção de grãos de amido em células meristemáticas e dos ápices radiculares em *Triticum aestivum* L. (Delima e Copeland, 1994). Nas raízes de *Zea mays* L., Bennet *et al.* (1985), descreveram um aumento das células da epiderme e do córtex e visualizaram também distorções da parede celular. Clune e Copeland (1999) verificaram por microscopia eletrônica de transmissão alterações na estrutura do ápice radicular de canola, quando as raízes foram colocadas em solução com Al. Li e Xing (2011) observaram alterações ultraestruturais em protoplastos e mitocôndrias do mesofilo foliar de *Arabidopsis* relacionadas à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e morte celular programada, eventos induzidos pela presença do Al. Assim, análises ultraestruturais de folhas de arroz se permitirão verificar os efeitos da fitotoxicidade de Al nas organelas presentes em células foliares desta espécie.

Baseado no fato da endoderme constituir uma barreira física, que limita a entrada de Al nas raízes (Hodson e Wilkins, 1991), evitando a translocação desse elemento para a parte aérea, nosso grupo investigou a remoção do ápice radicular como um modelo plausível para facilitar a ascensão do Al para

as folhas. Isso nos possibilitou o acesso às alterações causadas pelo Al^{3+} nas células do mesofilo foliar, permitindo a visualização de efeitos distintos em plantas com tolerância diferencial ao Al.

Esforços para mostrar os efeitos indiretos do Al na parte aérea de plantas foram demonstrados por Moustakas *et al.*, (1996 e 1997), Peixoto *et al.*, (2002) e Silva *et al.*, (2010). Efeitos danosos no aparato fotossintético, tais como a fotoinibição, foram observados em plantas de *Thinopyrum bessarabicum* (Savul. e Rayss) e em *Sorghum bicolor* L., crescendo em meio de cultivo com Al^{3+} . A presença de Al na solução na qual as raízes dessas plantas foram imersas interferiram na performance fotossintética e induziu alterações ultraestruturais nos cloroplastos que levaram a modificações na assimilação de carbono (Moustakas *et al.*, 1996, 1997; Pereira *et al.*, 2000; Peixoto *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2005a, 2005b). Porém, tais estudos ainda devem ser explorados a ponto de permitir maior entendimento sobre o efeito do Al na parte aérea.

Medidas de fluorescência de clorofila são ferramentas eficientes para monitorar os efeitos de diversos estresses no aparato fotossintético. A eficiência pela qual a luz é absorvida pelo centro de reação do fotossistema II (PSII), promovendo o transporte de elétrons pode ser analisado utilizando técnicas para verificar a fluorescência da clorofila (Genty *et al.*, 1989). O PSII é bastante sensível e facilmente danificado por estresse bióticos e abióticos (Krause e Weis, 1991; Ball *et al.*, 1994; Lemos-Filho, 2000; Maxwell e Johnson, 2000), dentre eles, elevadas temperaturas, excesso de luz, excesso ou ausência de determinados nutrientes e estresse hídrico. Alterações no PSII levam à fotoinibição. E tais fenômenos são observados e estão diretamente relacionados ao estresse biótico e abiótico em plantas (Ball *et al.*, 1994).

Na fotoinibição, verifica-se diminuição no rendimento quântico da fotossíntese, detectadas a partir de alterações na emissão de fluorescência (Barber e Anderson, 1992). A clorofila é um pigmento complexado com proteínas imersas nas membranas dos tilacóides, cuja energia de excitação é direcionada para os centros de reação e posteriormente convertidas em energia química (ATP e NADPH) que é requerida para a redução do carbono

no ciclo de Calvin (Taiz e Zaiger, 2004). A luz absorvida pelas moléculas da clorofila, a princípio, deveria ser utilizada para o processo fotossintético, no entanto, parte dessa luz é dissipada como calor ou reemitida como fluorescência (Krause e Weis, 1991). Como esses processos ocorrem mutuamente, modificações na dissipação de calor e na eficiência fotoquímica podem ser mensuradas pela fluorescência da clorofila (Maxwell e Johnson, 2000). Dessa maneira, alterações da fluorescência refletem as condições do PSII (Genty *et al.*, 1989; Krause e Weis, 1991; Ball *et al.*, 1994). A taxa de variação da fluorescência máxima da clorofila (F_v/F_m), que representa o rendimento quântico potencial do PSII, é mensurado pela eficiência máxima da energia de excitação capturada quando o centro de reação do PSII está ativo. Os valores de 0,8 – 0,83 são característicos para plantas C3 sem condições de estresse e adaptadas previamente ao escuro (Krause e Weis, 1991; Ball *et al.*, 1994).

O óxido nítrico (NO) é uma espécie reativa de oxigênio que desempenha um papel crítico nas plantas sob condições de estresse abiótico (Neill *et al.*, 2008). Isso foi demonstrado com o pré-tratamento de raízes de *Cassia tora* L. com um doador de NO, cuja presença reduziu o acúmulo de Al nos ápices radiculares (Wang e Yang, 2005). Hsu e Kao (2004) observaram que a senescência de folhas de arroz causada pelo ácido abscísico, induzido pela presença de H₂O₂ e pela peroxidação de lipídios foi revertido pela presença de um doador de NO. Após o tratamento com herbicidas, a síntese de clorofila, a atividade de enzimas antioxidantes e a expressão de genes ligados ao estresse oxidativo em algas verdes apresentaram resultados de reversão e melhora do estresse quando as algas foram submetidas ao tratamento concomitante com NO (Qian *et al.*, 2009). Farooq *et al.*, (2009) observaram que plantas de arroz, submetidas a estresse hídrico, reverteram positivamente suas condições de desenvolvimento quando receberam aspersão foliar de doador de NO e quando as sementes foram imersas em solução contendo NO. Além disso, recentemente, foi demonstrado que a germinação de sementes e o crescimento inicial de raízes de arroz necessitam de NO quando essas se encontram sob estresse por Al (Marciano *et al.*, 2010).

Como radical livre que se difunde facilmente, o NO reage com componentes intra e extracelulares, podendo ativar e inibir enzimas, regular fatores de transcrição e canais transportadores de íons, interferindo em processos de desenvolvimento e condições de estresse biótico e abiótico (Neill *et al.*, 2002; Wendehenne *et al.*, 2004; Lindermayr *et al.*, 2005; Neill *et al.*, 2008).

O presente estudo buscou a elaboração de um modelo que proporcionasse a translocação de Al para a parte aérea de duas cultivares de arroz com tolerância diferencial ao Al. Para validar tal modelo, foi realizada a quantificação do conteúdo de Al na parte aérea de ambas as cultivares. Em seguida, foram avaliadas as alterações morfológicas, citotóxicas, e ultraestruturais, como o intuito de verificar alterações na estrutura foliar provocadas pela presença desse metal. No intuito de verificar os efeitos diretos do Al no aparato fotossintético de plantas jovens de arroz, foram avaliados os rendimentos quânticos potencial, efetivo e o conteúdo de pigmentos cloroplastídicos. Para verificar se o papel do NO e se a sua presença poderia reverter a toxicidade provocada por esse metal nas folhas foram avaliados parâmetros fotossintéticos das cultivares submetidas ao estresse por Al. Dessa forma, foi avaliada a tolerância diferencial ao Al em duas cultivares de arroz sob tratamento com doador de NO.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e indução do estresse por alumínio

Sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) das cultivares Comum Branco (tolerante ao alumínio) e IAC 1289 (sensível ao alumínio) (Vasconcelos *et al.*, 2002a) foram desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio (0,5%) por 10 min. As sementes foram lavadas 10 vezes com água destilada e deionizada e germinadas em câmara de germinação a 30°C em fotoperíodo de 12h por 72h. Sementes uniformemente germinadas foram transferidas para tubos de ensaio (100 mL), crescidas durante 21 dias, para que as folhas se tornassem fotossinteticamente ativas, sob 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz, a 16 h de fotoperíodo em condições de hidroponia, em solução nutritiva descrita por Furlani e Furlani (1988) (Tabela 1). Após 21 dias de crescimento, as raízes das plântulas foram lavadas com água destilada e deionizada e colocadas na solução de tratamento para indução do estresse por Al. As plântulas usadas como controle foram cultivadas em solução de 200 μM CaCl_2 , pH 4,0 e os tratamentos com Al foram cultivados em solução contendo 200 μM CaCl_2 , pH 4,0 com concentrações de 160 μM e 500 μM de AlCl_3 , as quais disponibilizam no meio Al^{3+} livre. Tais doses foram previamente testadas para o teste de toxicidade. De metade das plantas foram retirados 1 cm da extremidade das raízes com lâmina de bisturi, imersas em água destilada e deionizada para evitar cavitação no cilindro central. Esse procedimento foi realizado a cada 24 horas durante 5 dias de incubação em meio de cultivo, uma vez que esse período permitiu a distinção visual entre a cultivar tolerante e a sensível. A outra metade das plantas permaneceu com as raízes intactas durante os 5 dias de tratamento. Após o período de incubação, as plantas foram coletadas para as posteriores análises. Os experimentos foram realizados com um total de dez replicatas para cada tratamento.

Tabela 1 Composição da solução nutritiva para cultivo e crescimento de plântulas de arroz Al-sensível e Al-tolerante, durante o período de 21 dias para posterior indução de estresse por Al.

Solução	Componente	g/L estoque	mL/L solução
1	Nitrato de Cálcio (4H ₂ O)	270,0	1,2
	Nitrato de Amônio	33,8	
2	Cloreto de potássio	52,8	0,9
	Sulfato de potássio	44,0	
	Nitrato de potássio	24,6	
3	Nitrato de Magnésio (6H ₂ O)	142,6	0,6
4	Fosfato de Potássio	17,6	0,1
5	Sulfato ferroso (7H ₂ O)	24,1	0,3
	Na EDTA	25,1	
6	Cloreto de Manganês (4H ₂ O)	2,34	0,3
	Ácido bórico	2,04	
	Sulfato de Zinco (7H ₂ O)	0,88	
	Sulfato de Cobre (5H ₂ O)	0,2	
	Molibdato de Sódio (2H ₂ O)	0,26	

Fonte: Furlani e Furlani (1988)

Microscopia de luz

A microscopia de luz foi utilizada com o intuito de verificar a presença de tilos nos elementos traqueais das raízes de plantas tolerantes e sensíveis de arroz, que possivelmente poderia impedir a translocação de Al^{3+} da solução para a parte aérea. Além disso, a técnica foi utilizada para verificar alterações na anatomia foliar de plantas jovens de arroz sensíveis e tolerantes tratadas com diferentes concentrações de Al^{3+} (0 - 500 μM). Para as análises foram cultivadas 10 repetições para cada tratamento. Após o cultivo de 21 dias em solução nutritiva (Furlani e Furlani, 1988), raízes intactas de plantas de arroz Al-sensível e Al-tolerante foram coletadas, no tempo 0 a 1cm do ápice radicular como controle e raízes cortadas a 1 cm do ápice após 24h e 48hs em solução de CaCl_2 (200 μM) foram coletadas para verificar a formação de tilos e determinar a posição de cortes que permitiriam expor o cilindro central à solução com Al. Amostras de raízes e folhas foram fixadas em mistura de Karnovsky (Karnovsky, 1965) por 24 horas, desidratadas em série etílica e incluídas em resina hidroxietilmetacrilato (Leica). Cortes transversais e longitudinais (5 μm) foram obtidos em micrótomo e corados com Azul de Toluidina 0,05%, pH 4,3 (O'Brien *et al.*, 1964).

Quantificação de alumínio em folhas de plântulas de arroz

Amostras de folhas, submetidas às diferentes concentrações de Al (0 – 500 μM Al^{3+}) e sementes das cultivares em estudo foram secadas à 60°C por 72h em estufa com circulação forçada de ar até atingirem massa constante. As amostras (em torno de 80 - 300 mg) foram trituradas e transferidas para tubos de polytetrafluoroetileno (TFM) e em seguida foram adicionados 5,0 mL de HNO_3 , 2,0 mL de água deionizada e 1,0 mL de 30% H_2O_2 (v/v). Os tubos foram colocados em forno microondas (Ethos 1, Milestone, Sorisole, Italy) e as amostras foram submetidas ao seguinte programa de aquecimento: 12 min a P = 400 W e T = 150°C; 3 min a P = 800 W e T = 180°C; e 30 min de ventilação. Após o resfriamento das amostras, o volume foi ajustado para 14 mL com água

desionizada. A concentração de Al em todas as amostras foi determinada por espectrometria de absorção atômica com chama. Foram utilizadas nove amostras para cada tratamento.

Microscopia eletrônica

Para microscopia eletrônica de transmissão, as amostras foliares foram fixadas em mistura de Karnovsky (Karnovsky, 1965) por 24 horas, pós-fixadas em tetróxido de ósmio (1%, tampão fosfato 0,1M, pH 7,2) e processadas segundo métodos usuais (Roland, 1978), utilizando resina de araldite. As secções ultrafinas (60 – 50 nm) foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinadas em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai-G12 Spirit (Fei Company) a 80kV. Essa metodologia foi utilizada com o intuito de verificar alterações ultraestruturais no mesofilo de plântulas de arroz Al-sensível e Al-tolerante tratadas com diferentes concentrações de Al³⁺ (0 - 500 µM).

Determinação do conteúdo de pigmentos cloroplastídicos

Em cada tratamento, com nove plântulas, foram retirados nove discos foliares (Ø = 0.5 cm) da região mediana do limbo foliar da primeira folha expandida, sendo cada disco retirado de uma plântula da repetição, totalizando nove repetições para cada tratamento. Em seguida, os discos foliares foram macerados em almofariz com o auxílio de um pistilo. Os pigmentos foram extraídos com solução aquosa de 80% acetona (v/v; 10 mL). O homogeneizado foi centrifugado a 2500 rpm por 5 min e o sobrenadante coletado para determinação do conteúdo de carotenóides (470 nm), clorofila a (646 nm) e clorofila b (663 nm) de acordo com o procedimento proposto por Lichtenthaler (1987).

Medidas da fluorescência da clorofila a

As medidas da fluorescência da clorofila *a* foram avaliadas em cada tratamento após 21 dias de crescimento e 5 dias de incubação com e sem Al. As medições foram realizadas na região mediana da primeira folha expandida e, portanto, fotossinteticamente ativa. Os valores do rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m) foram determinados em cada uma das 10 repetições de cada tratamento, em folhas previamente adaptadas ao escuro por 30 min, utilizando um medidor de fluorescência modulada (Mini-PAM, H. Walz, Effeltrich, Germany). A eficiência fotossintética foi determinada conforme Genty *et al.*, (1989) através da fórmula $\Delta F / F'm = (F'm - F) / F'm$, onde F é a fluorescência da clorofila na amostra adaptada à luz e $F'm$ a máxima fluorescência da amostra adaptada à luz, com o pulso saturante.

Eficiência fotossintética na presença de NO

Plântulas de arroz, com parte das raízes removidas foram tratadas com diferentes concentrações de Al^{3+} (0-500 μM) durante 5 dias. Nesse período, 10 plantas de cada tratamento foram submetidas ao tratamento com um doador de NO. Para isso, foi borrifada, nas folhas, uma solução de S-nitrosoglutationa (GSNO) a 150 μM a cada 24 h, a partir do início do tratamento com Al^{3+} . O tratamento com GSNO foi realizado no começo da noite para evitar a fotodecomposição dessa substância. As plantas controles foram borrifadas com H_2O deionizada, no mesmo momento que as demais plantas foram tratadas com o doador de NO.

O rendimento quântico potencial do fotossistema II (PSII) (F_v/F_m) e a eficiência fotossintética foi calculada usando a fórmula $\Delta F/F'm = (F'm - F) / F'm$, onde F é a quantidade da fluorescência emitida pela folha adaptada à luz e $F'm$, a máxima fluorescência emitida pela folha adaptada à luz com um pulso de saturação de luz (duração de $\sim 4000 \mu mol m^{-2} s^{-1}$, 800 ms) (Genty *et al.*, 1989). As medidas foram tiradas da porção central da primeira folha expandida de cada repetição dos respectivos tratamentos após os 5 dias de tratamento, usando um aparelho de análise da fluorescência (Mini-PAM, H. Walz, Effeltrich, Germany).

RESULTADOS

Efeito citotóxico do alumínio

O estresse por alumínio induziu efeitos de citotoxicidade em folhas de plantas com parte das raízes retiradas e também em plantas intactas em diferentes extensões. Os efeitos citotóxicos em plantas intactas sensíveis ao Al levaram ao enrolamento e amarelamento das folhas a partir do tratamento com 160 μM de Al^{3+} , sendo agravado no tratamento com 500 μM de Al^{3+} . Sob o mesmo tratamento, as plantas tolerantes intactas mantiveram suas folhas verdes e bastante expandidas. Em contraste com esses resultados, plantas sensíveis que tiveram suas raízes cortadas e tratadas com 500 μM de Al^{3+} apresentaram clorose, acompanhada de manchas escuras e necróticas, além de pronunciado enrolamento e ressecamento das folhas. Efeito semelhante, porém com menor grau de intensidade foi observado nas tolerantes que tiveram parte de suas raízes cortadas (Figura 1). Comparado com as plantas controle, onde as raízes foram mantidas intactas, leves sintomas de amarelamento e necrose das folhas foram verificados nos tratamentos com Al^{3+} a 160 μM . Esses resultados são compatíveis com os resultados obtidos na análise de pigmentos fotossintéticos posteriormente descritos.

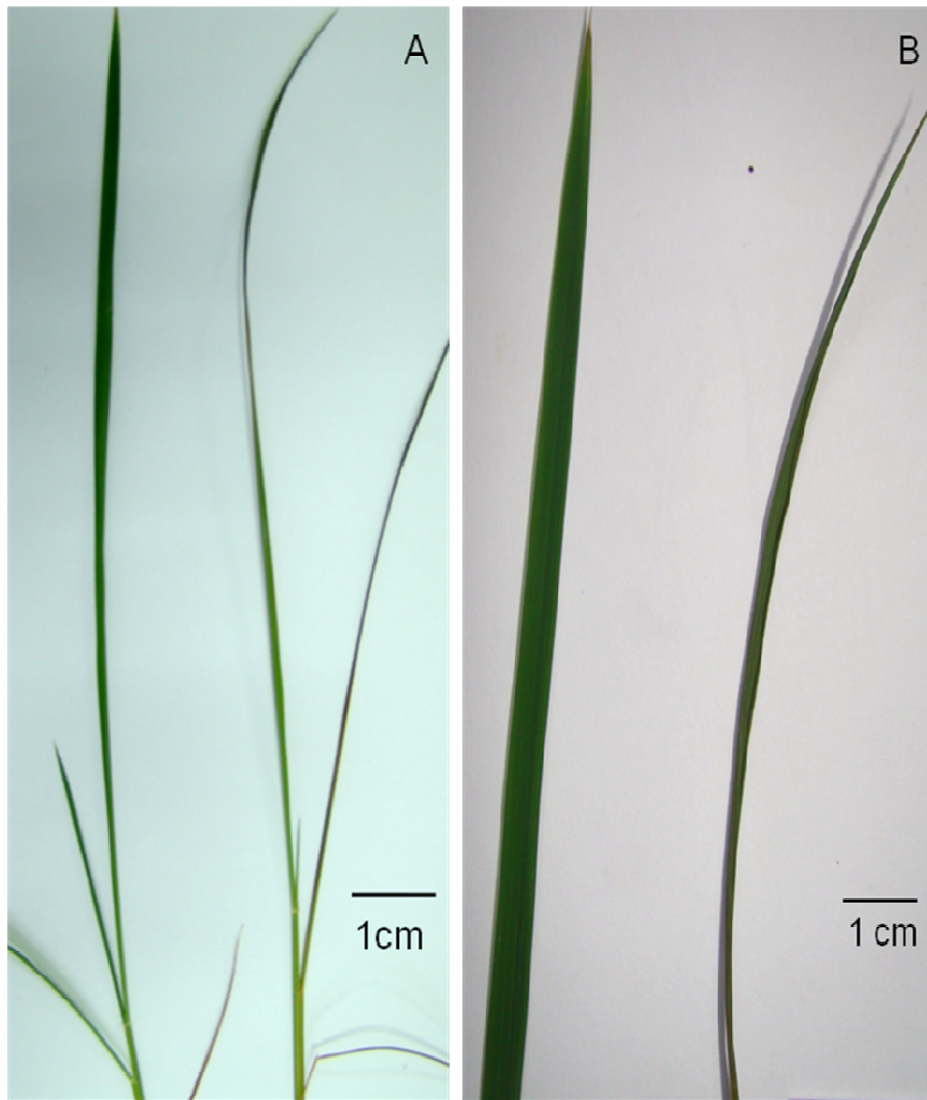


Figura 1 Efeito do Al^{3+} em plântulas de arroz Al-tolerante com raízes parcialmente removidas (cultivar Comum Branco). **A.** À esquerda, planta Al-tolerante sem tratamento com Al (controle) com pigmentação verde e com folhas expandidas. À direita, planta Al-tolerante tratada com $500\mu\text{M}$ de Al, apresentando folhas enroladas e escuras, características de decomposição de pigmentos fotossintéticos. **B.** À esquerda, detalhe da folha expandida controle utilizada nas análises fotossintéticas. À direita, detalhe da folha enrolada e necrótica no tratamento com $500\mu\text{M}$ de Al.

Organização estrutural

A região apical das raízes de ambas as cultivares foi avaliada para determinar a posição dos cortes necessários para expor o cilindro central e, conseqüentemente, eliminar a barreira imposta pela endoderme. Por meio destas análises observou-se que a 1 cm do ápice, as raízes apresentaram endoderme completamente diferenciada (Fig. 2 A). Para excluir a possibilidade de crescimento de células parenquimáticas no interior dos vasos, ou seja, a formação de tilos, seções transversais e longitudinais foram analisadas. Na região próxima ao corte (1 mm) não há formação de tilos em ambas as cultivares (Fig. 2 A-B), mesmo quando decorridas 48 horas do corte. A organização estrutural das raízes mostrou-se similar para ambas as cultivares, sobretudo na região do cilindro central; a cultivar IAC apresenta raízes de menor diâmetro e vasos aparentemente de menor calibre, embora estes parâmetros não tenham sido avaliados.

Nas folhas observou-se a ocorrência de manchas necróticas (5 dias após o início dos tratamentos), nas concentrações acima de 160 μM para ambos os tratamentos, sendo que tais manchas apresentavam-se mais evidentes nas plantas Al-sensíveis. Seções transversais obtidas da região mediana da lamina foliar mostram, para ambas as cultivares, ocorrência de necrose, sobretudo nos bordos foliares (Figs. 2 D), as quais atingiram maiores extensões do limbo na concentração de 500 μM de Al. Quando submetidas à remoção do ápice radicular e na presença de 500 μM de Al, os danos observados foram mais severos, atingindo os elementos traqueais de ambas as cultivares. Nesta condição, o lume dos elementos traqueais apresentou a formação de precipitado, aparentemente provocando oclusão dos mesmos (Fig. 2 D).

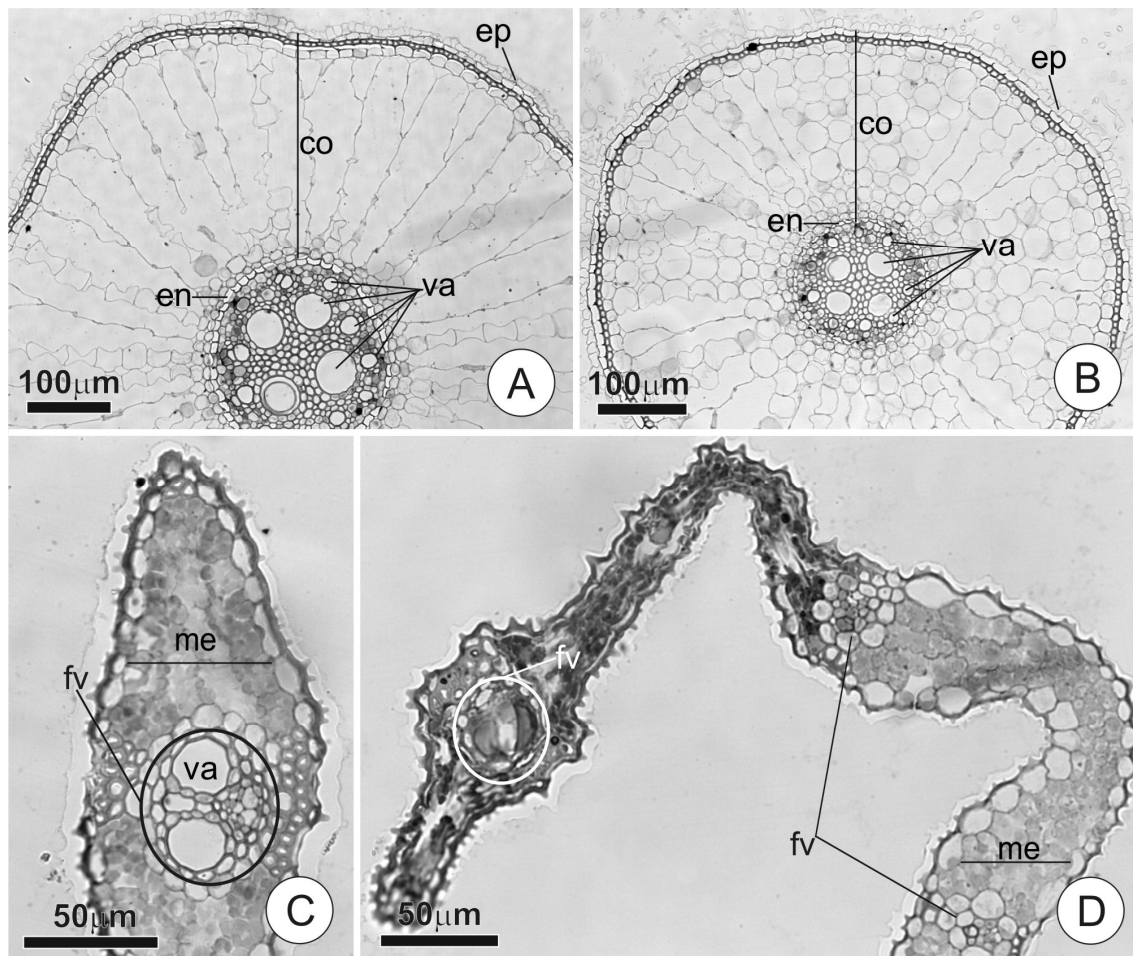


Figura 2 A-D. Organização estrutural de raízes e lâmina foliar de *Oryza sativa* L. Al-tolerante e Al-sensível. **A.** Seção transversal de raiz próximo à superfície de corte promovido para remoção do ápice, decorridas 24 horas do corte; Al-tolerante (cv Comum Branco). Notar endoderme distinta e o aspecto normal dos elementos de vaso. **B.** Seção transversal de raiz próximo à superfície de corte promovido para remoção do ápice, decorridas 48 horas do corte; Al-sensível (cv IAC). Notar endoderme distinta e o aspecto normal dos elementos de vaso. **C.** Detalhe do bordo foliar, em secção transversal, de plântulas Al-tolerante, na ausência de Al. Observar tecidos de aspecto normal e vasos desobstruídos. **D.** Detalhe do bordo foliar, em secção transversal, cv. Al-tolerante, na presença de $500 \mu\text{M Al}^{3+}$ e com ápices radiculares removidos. Observar necrose ampla em todo o bordo. No detalhe é possível perceber a

oclusão de vasos, por formação de precipitado. (co - córtex; en - endoderme; ep - epiderme; fv - feixe vascular; me - mesofilo; va - elementos de vaso).

Quantificação de alumínio em folhas de plântulas de arroz

Os tratamentos com alumínio induziram alterações morfológicas nas folhas, tais como enrolamento e amarelamento inicial, acompanhados de posterior necrose. Essas análises são evidenciadas a partir das alterações estruturais visualizadas na figura 2. Dessa forma, a avaliação do conteúdo de alumínio na parte aérea se faz importante na medida em que permite verificar se os efeitos causados por esse metal são diretos ou indiretos.

A tabela 2 apresenta o resultado da quantificação de Al nas folhas. A concentração desse metal nas folhas de plantas tratadas com alumínio e intactas foram menores que 18,0 e 120,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ de Al^{3+} na massa seca para as plantas Al-sensível e Al-tolerante, respectivamente. Não foi observada diferença significativa das folhas de plantas intactas para as plantas controle em ambos os tratamentos. A concentração de Al^{3+} nesses grupos foi menor que 20,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ de massa seca. Por outro lado, diferenças significativas foram observadas quando os ápices e parte das raízes foram retirados nos tratamentos com Al^{3+} (Tabela 2). A concentração de Al nas folhas de plantas com parte das raízes retiradas, na cultivar sensível, foi 5,5 vezes maior em 500 $\mu\text{M Al}^{3+}$ em relação às tratadas com 160 $\mu\text{M Al}^{3+}$. As concentrações de Al nas folhas de plantas Al-tolerantes foram 3,5 vezes maior a 500 $\mu\text{M Al}^{3+}$ que em plantas tratadas com 160 $\mu\text{M Al}^{3+}$. Plantas que tiveram parte de suas raízes removidas, independentemente da tolerância diferencial entre cultivares, acumularam mais Al nas folhas (até 128 vezes mais) quando comparadas com as plantas intactas.

A tabela 3 apresenta o resultado da quantificação do conteúdo de Al^{3+} em sementes de arroz Al-tolerante e Al-sensível. As cultivares apresentaram baixo conteúdo de Al^{3+} em relação às plântulas tratadas com Al nas concentrações de 160 e 500 $\mu\text{M Al}^{3+}$. Porém, são próximos aos valores obtidos nas plântulas controle (Tabela 2).

Tabela 2 Quantificação foliar de Al^{3+} em folhas de plântulas de arroz Al-tolerante (Comum Branco) e Al-sensível (IAC 1289) intactas ou após remoção de parte das raízes cultivadas na presença de Al^{3+} .

Plantas intactas		
Tratamento	Al-sensível ($\mu\text{g g}^{-1}$ MS)	Al-tolerante ($\mu\text{g g}^{-1}$ MS)
Controle	15,2 ± 3,9	28,1 ± 8,6
160 $\mu\text{M Al}$	14,2 ± 2,2	56,6 ± 15,4
500 $\mu\text{M Al}$	18,7 ± 12,2	118,8 ± 3,4
Tratamento	Plantas sem parte das raízes	
Controle	25,7 ± 9,0	29,2 ± 8,8
160 $\mu\text{M Al}$	708,5 ± 112,5	903,2 ± 297,3
500 $\mu\text{M Al}$	3.853,9 ± 369,2	3.197,5 ± 441,6

*MS: massa seca.

Tabela 3 Quantificação de Al³⁺ em sementes de arroz Al-tolerante (Comum Branco) e Al-sensível (IAC 1289).

Al-sensível ($\mu\text{g g}^{-1}$ MS)	Al-tolerante ($\mu\text{g g}^{-1}$ MS)
7,5 \pm 1,7	10,8 \pm 8,8

*MS: massa seca.

Avaliação da ultraestrutura em folhas de plântulas de arroz

Aspectos ultraestruturais do mesofilo de plântulas controle

Na ausência de alumínio na solução de cultivo e com 200 μM CaCl_2 , tanto a cv. Comum Branco (Al-tolerante) quanto a cultivar IAC 1289 (Al-sensível) apresentaram, nas células do mesofilo foliar, características ultraestruturais comuns a células de mesofilo da maioria das *Poaceae*, sem nenhuma alteração morfológica aparente. Ambas as cultivares apresentaram mesofilo composto por células parenquimáticas de parede primária de espessura uniforme, dotada de dobras invaginantes (Fig. 3 A). Nestas células, o núcleo é conspícuo e predominantemente globoso e o citoplasma vacuolado e rico em plastídios. Dentre as organelas predominam vacúolos, cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos (Fig. 3 B, 3 E).

De modo similar ao observado para as demais organelas, não foram observadas diferenças marcantes entre cloroplastos das cultivares em estudo, quando na ausência de alumínio na solução controle.

Os cloroplastos apresentam estroma denso e sistema de membranas bastante desenvolvido, formando tilacóides intergranais e grana conspícuos, os quais são formados por número variável de tilacóides granais. Os grana apresentam disposição aleatória, não sendo possível observar um eixo de simetria (Fig. 3 B-F). Observou-se, ainda, a presença de grãos de amido e inclusões osmiofílicas no interior dos plastídios; os grãos de amido, numerosos, mostram-se compactos e de formato característico.

As mitocôndrias, de formas variadas, apresentam cristas bem desenvolvidas e estão, frequentemente justapostas aos cloroplastos e peroxissomos (Fig. 3 B, 3 D-E). Inclusões lipídicas, na forma de gotas dispersas no citosol, por vezes atingem volumes expressivos, embora não tenha sido possível quantificar de modo a comparar as cultivares.

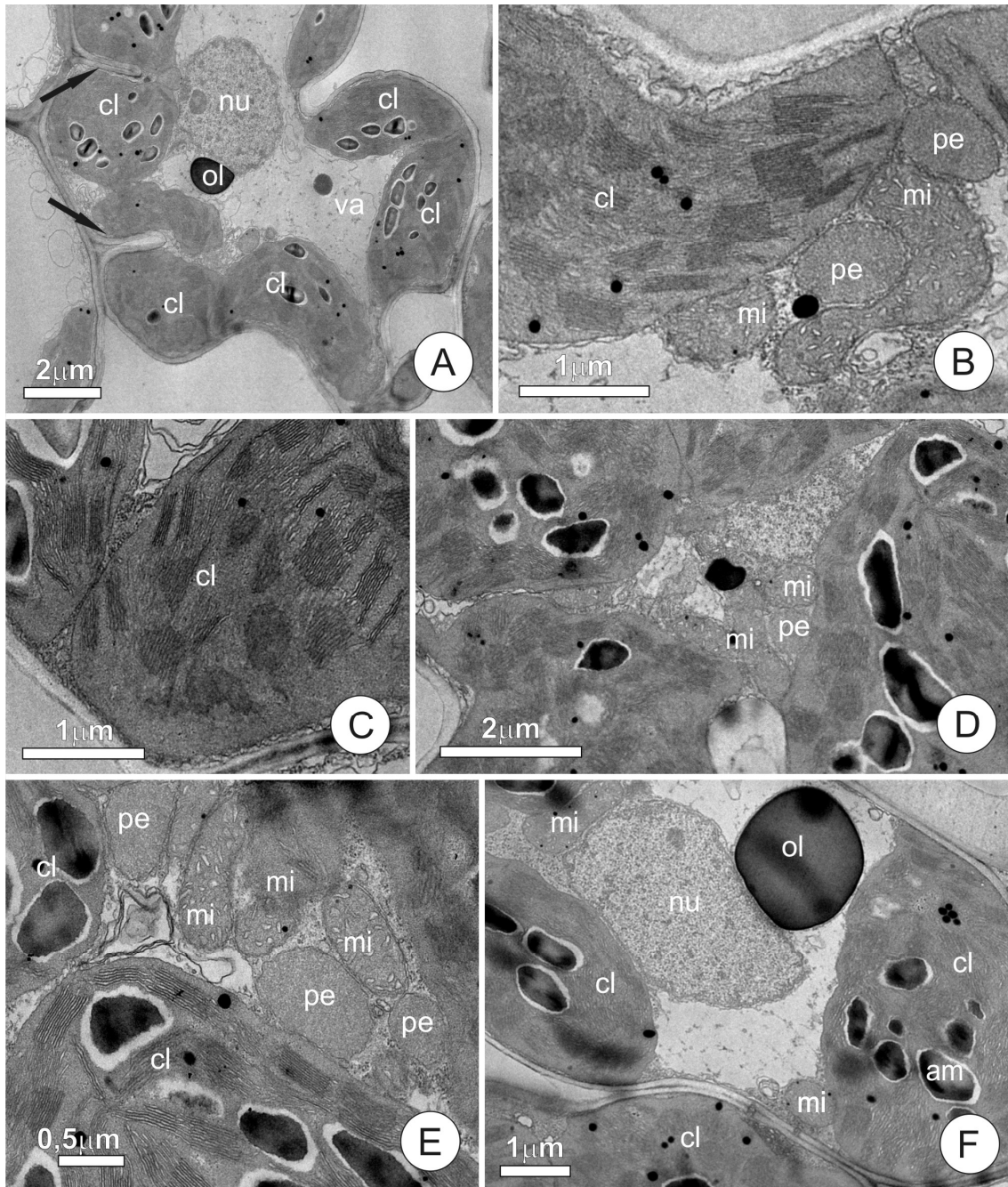


Figura 3 A-F. Aspectos ultraestruturais do mesofilo de *Oryza sativa* L., cultivado em solução sem alumínio (controle) e com raízes intactas. **A-C**, Al-tolerante (cv. Comum Branco). **A.** Aspecto geral de células do mesofilo, as setas indicam invaginações da parede celular. **B.** Detalhe do citoplasma periférico, mostrando justaposição entre mitocôndrias, peroxissomos e cloroplastos. **C.** Detalhe de cloroplasto, notar a elevada densidade do estroma e padrão de organização do sistema de membranas. **D-F.** Al-sensível (cv IAC).

D. Detalhe do citoplasma, mostrando cloroplastos e peroxissomos justapostos a mitocôndrias. **E.** Detalhe das mitocôndrias, notar cristas desenvolvidas. **F.** Aspecto geral de células do mesofilo, observar gota de óleo dispersa no citosol e cloroplasto com grãos de amido.

(am - grão de amido; cl - cloroplasto; mi - mitocôndria; nu - núcleo; ol - gota de óleo; pe - peroxissomo).

Aspectos ultraestruturais do mesofilo de plântulas submetidas a 160µM de Al

Quando submetidos a 160 µM de Al, as cultivares apresentaram diferenças na organização estrutural das células do mesofilo. Na cultivar Al-tolerante (Comum Branco) as características citoplasmáticas foram similares ao observado no controle, sem alterações perceptíveis nas organelas, com destaque para o aspecto íntegro destas (Figs. 4 A-C). Por outro lado, na cultivar Al-sensível (IAC) observou-se ocorrência de células com ruptura e vesiculação da membrana plasmática (Fig. 4 D). Nos cloroplastos observou-se ocorrência de rupturas no envelope plastidial (Fig. 4 E), perda de densidade do estroma e dilatação dos tilacóides, bem como ausência marcante de amido (Fig. 4 D-E). Merece destaque o fato de que células com estas alterações morfológicas foram observadas ao lado de células nas quais a integridade de membranas foi preservada (Fig. 4 D). As células cujo sistema de membrana manteve-se íntegro também manifestaram alterações, sobretudo nos plastídios. Nestas células, os plastídios apresentam projeções preenchidas por estroma; tais projeções mostram aspecto filamentar nas secções analisadas (Fig. 4 F). As projeções dos plastídios não raro englobam mitocôndrias, assemelhando-se a fagossomos (Fig. 4 G). Quando no interior destas bolsas formadas pela projeção do envelope plastidial, algumas mitocôndrias mostraram sinais de incorporação no estroma, com aparente junção de membranas e continuidade entre o estroma das duas organelas (Fig. 4 H).

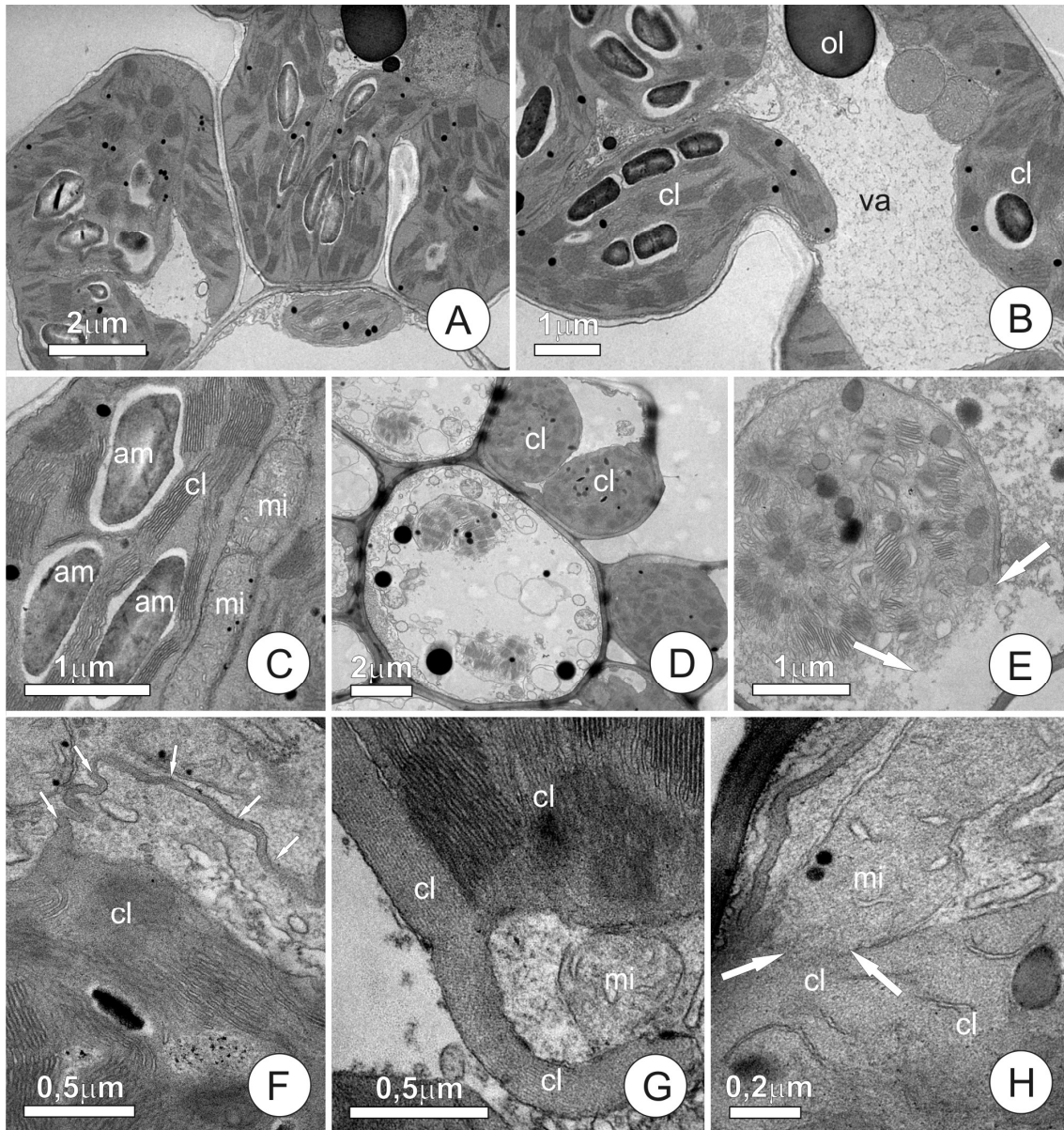


Figura 4 A-H. Aspectos ultraestruturais do mesofilo de *Oryza sativa* L., cultivado em solução com $160\mu\text{M}$ Al com raízes intactas. **A-C**, Al-tolerante (cv. Comum Branco). **A.** Aspecto geral de células do mesofilo, apresentando-se integras, com invaginações da parede celular e cloroplastos com elevada densidade do estroma e padrão de organização do sistema de membranas. **B.** Detalhe do vacúolo e cloroplastos íntegros e gota de óleo dispersa no citosol. **C.** Detalhe de cloroplasto, notar a presença de amido e aspecto normal no padrão de organização do sistema de membranas. **D-H.** Al-sensível (cv. IAC). **D.** Aspecto geral de células do mesofilo com ruptura e vesiculação da membrana ao lado de células integras. Notar ruptura do envelope plastidial, perda de

densidade do estroma e dilatação dos tilacóides. **E.** Detalhe de cloroplasto, setas indicam ruptura da membrana do cloroplasto, perda de densidade do estroma e dilatação dos tilacóides. **F.** Detalhe de células do mesofilo, observar sistema de membranas integro, porém com alterações nos plastídios. Setas indicam alça formada pelo cloroplasto de aspecto filamentar preenchidos pelo estroma. **G.** Detalhe de cloroplasto formado alça sobre mitocôndria. **H.** Detalhe de mitocôndria e cloroplasto, setas indicam aparente junção entre mitocôndria e cloroplasto, notar a descontinuidade da membrana mitocondrial o estroma comum a ambas as organelas.

(am - grão de amido; cl - cloroplasto; mi - mitocôndria; ol - gota de óleo; va - vacúolo).

Aspectos ultraestruturais do mesofilo de plântulas submetidas a 500 μ M de Al

Nesta concentração, os efeitos do Al na organização estrutural das células que compõem o mesofilo foram expressivos, com respostas em ambas as cultivares. Tanto a Al-tolerante quanto a Al-sensível mostraram células necróticas e células com manutenção de integridade de membranas, as quais foram estudadas em detalhe. Em ambas as cultivares, nas células vivas, o núcleo permaneceu íntegro (Fig. 5 A), assim como as organelas citoplasmáticas. Observou-se vesiculação no citoplasma e formação de corpos multilamelares (Fig. 5 C).

Na cultivar tolerante, as alterações dos cloroplastos, já descritas para a cv. sensível, na concentração de 160 μ M Al, apareceram, embora pouco frequentes. Nesta cultivar, a formação das projeções plastidiais mostrou-se menos intensa, com alças menores (Figs. 5 A-B) e os tilacóides granais mostraram-se pouco evidentes, desorganizados e por vezes curvos. No espaço periplasmático a formação de precipitado elétron-denso foi marcante em muitas células (Fig. 5 C).

Na cultivar sensível, o padrão de respostas celulares manteve-se similar ao da concentração anterior, com expressiva vesiculação no citoplasma (Fig. 5 D), entretanto, nesta cultivar o número de células necróticas mostrou-se superior ao observado na concentração anterior. Nos cloroplastos as alterações estruturais foram similares às descritas na concentração anterior (Figs. 5 E-F); as mitocôndrias apresentaram um menor número de cristas (Fig. 5 F).

Plantas que tiveram o ápice radicular suprimido, com a consequente remoção da barreira endodérmica, apresentaram, nesta mesma concentração de alumínio, alterações morfológicas mais evidentes em ambas as cultivares. Na cultivar Al-tolerante, observou-se intensa vesiculação em todo o citoplasma, aparente redução no número de mitocôndrias e a formação das projeções plastidiais (Figs. 6 A-B). Nos cloroplastos, além da formação de projeções, observou-se descontinuidade de tilacóides e desorganização dos tilacóides

granais, resultando em dificuldade de identificar tais estruturas; em alguns cloroplastos a região dos grana mostrou-se circular e mais elétron-densa (Fig. 6 C). Merece destaque a expressiva redução no número de grãos de amido nos cloroplastos, os quais tornaram-se raros. A presença de precipitado elétron-denso na região periplasmática, mais intensa que na concentração anterior, foi observada em células necróticas (Fig. 6 C).

A cultivar Al-sensível, também sem parte das raízes, apresentou o mesmo conjunto de alterações descritas para a Al-tolerante (Figs. 6 D-F). Nos cloroplastos a desorganização do sistema de membranas pareceu mais severa, com a formação de inúmeros corpos elétron-densos nos locais correspondentes aos grana; a redução no número de grãos de amido foi marcante. Observou-se, ainda, a formação de corpos osmiofílicos na matriz citoplasmática (Fig. 6 F).

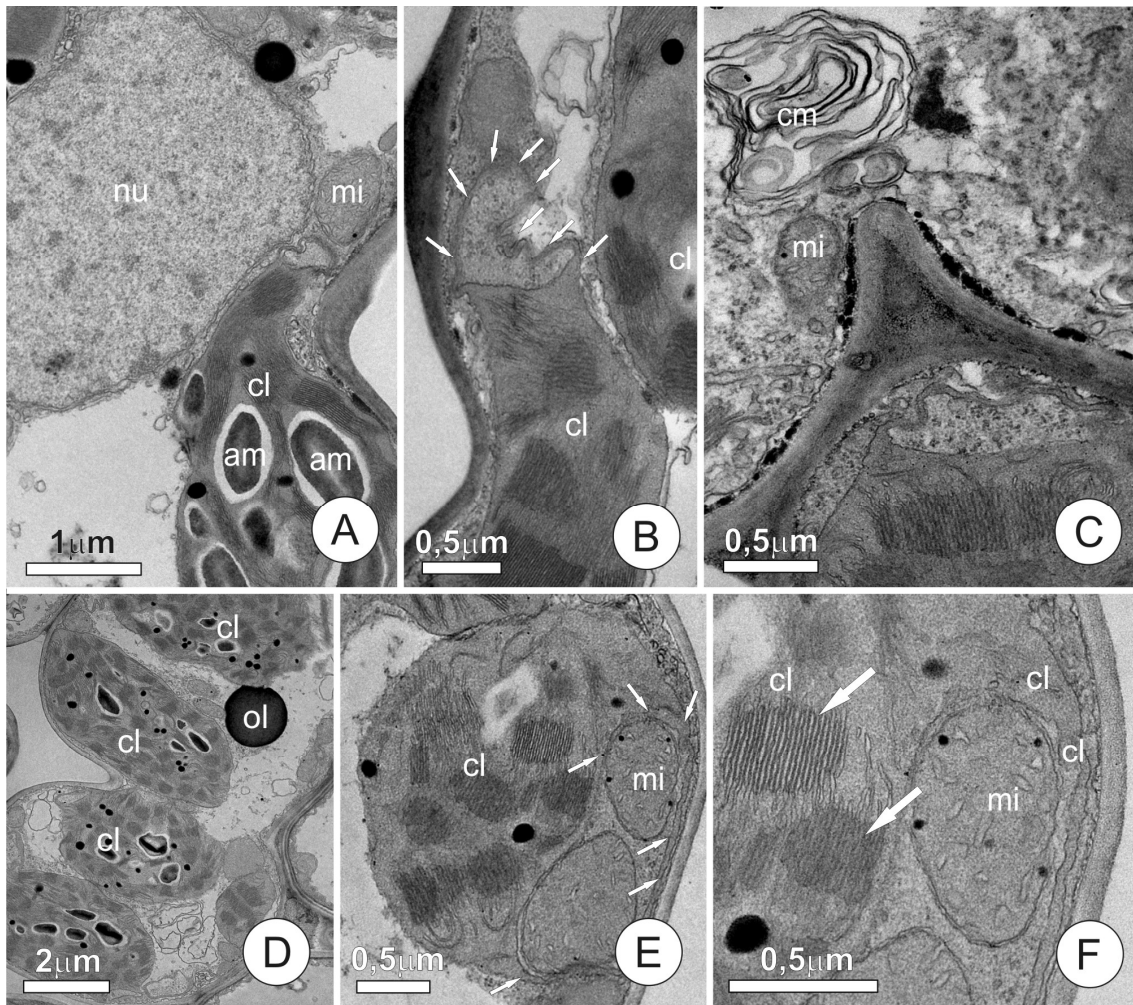


Figura 5 A-F. Aspectos ultraestruturais do mesofilo de *Oryza sativa* L., cultivado em solução com 500 μ M Al e raízes intactas. **A-C**, Al-tolerante (cv. Comum Branco). **A.** Célula de mesofilo, notar núcleo íntegro e cloroplasto, apresentando grãos de amido e pequena projeção sobre mitocôndria. **B.** Detalhe do cloroplasto, onde setas indicam alça formada pelo cloroplasto sobre mitocôndria (aspecto de fagossomo). **C.** Espaço periplasmático, observar corpos multilamelares, vesiculação no citoplasma e formação de precipitado elétron-denso. **D-F.** Al-sensível (cv. IAC). **D.** Célula do mesofilo, notar aparente vesiculação no citoplasma. **E.** Detalhe de cloroplasto e mitocôndria, setas indicam alça formada pelo cloroplasto englobando a mitocôndria (aspecto de fagossomo). **F.** setas indicam grana de aspecto normal (acima) e desorganizado abaixo, notar perda de densidade do estroma e formação de

projeção do cloroplasto, envolvendo mitocôndria. Mitocôndrias com menor número de cristas.

(am - grão de amido; cl - cloroplasto; cm - corpos multilamelares; mi - mitocôndria; nu - núcleo; ol - gota de óleo).

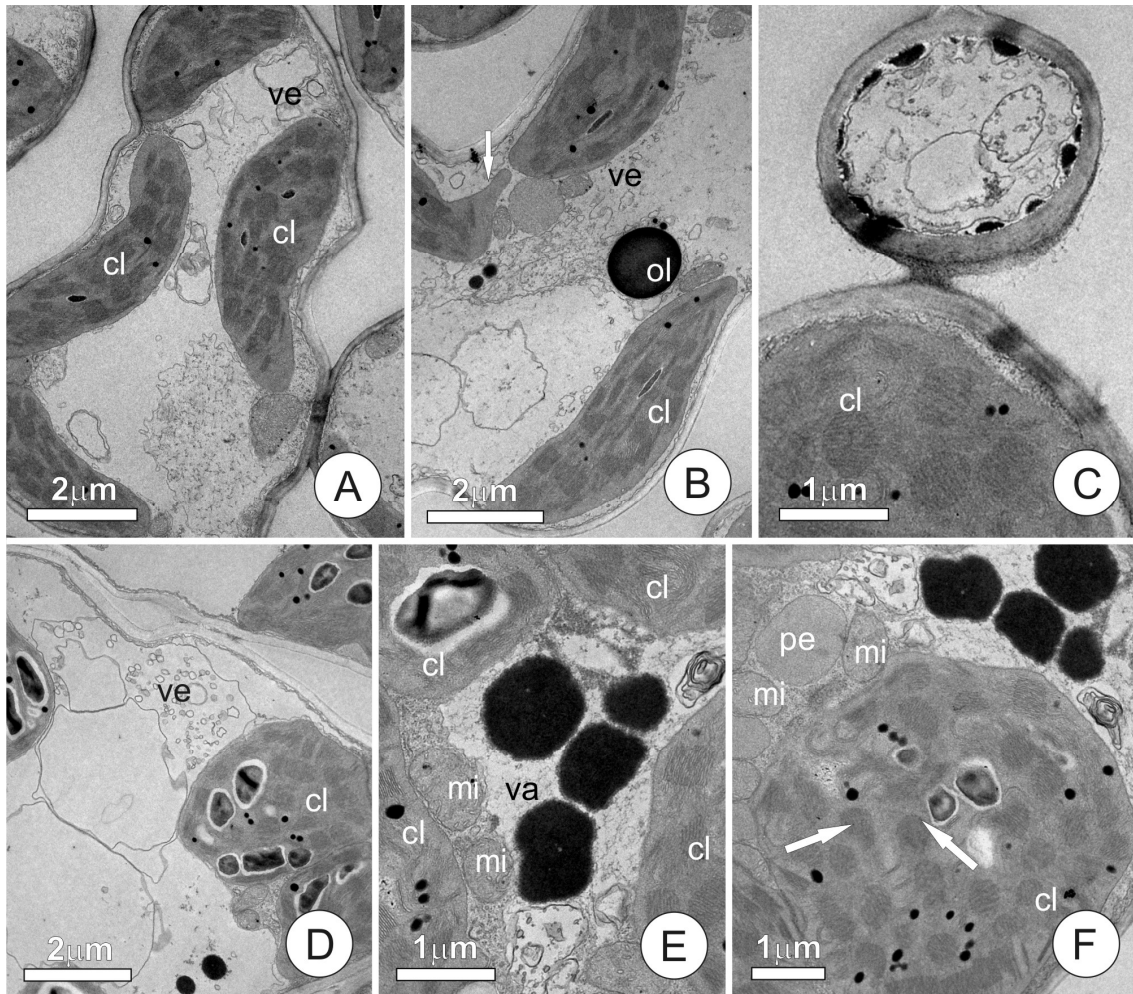


Figura 6 A-F. Aspectos ultraestruturais do mesofilo de *Oryza sativa* L., cultivado em solução com 500 μM Al^{3+} e com ápices radiculares removidos. **A-C**, Al-tolerante (cv. Comum Branco). **A.** Aspecto geral de célula do mesofilo, notar vesiculação citoplasmática e diminuição do número de mitocôndrias. **B.** Célula de mesofilo, setas indicam início de formação de alça no cloroplasto, citosol vesiculado e formação de gota de óleo. **C.** Aspecto geral de células do mesofilo, observar célula necrótica com deposição de precipitado elétron-denso e vesiculação. Cloroplasto com redução de deposição de amido. **D-F.** Al-sensível (cv. IAC). **D.** Aspecto geral de célula do mesofilo, notar intensa vesiculação e aspecto necrótico. **E.** Detalhe de célula do mesofilo, observar corpos osmiofílicos no vacúolo, corpos multilamelares e vesiculação. **F.** Cloroplasto mostrando grana de aspecto desorganizado (seta) e grãos de amido de tamanho reduzido.

(cl - cloroplasto; mi - mitocôndria; pe - peroxissomo; ol - gota de óleo; va - vacúolo; ve - vesículas).

Determinação do conteúdo de pigmentos cloroplastídicos

A análise de pigmentos cloroplastídicos realizada corrobora os resultados de citotoxicidade provocados pelo Al^{3+} e observados na figura 1. O conteúdo de clorofila *a* e *b* sofreram decréscimo significativo ($P \leq 0,05$) quando as plantas foram tratadas com diferentes concentrações de Al^{3+} (Figs. 7 A-B). Os níveis constitutivos dos dois tipos de clorofila foram maiores na cultivar Al-tolerante, se comparado com a cultivar sensível. O conteúdo de clorofila *a* na cultivar tolerante se apresentou inalterado após o tratamento com Al^{3+} na concentração de 500 μM . No controle, os níveis de carotenóides nas plântulas Al-tolerantes foram elevados assim como nas plântulas Al-sensíveis ($P \leq 0,05$; Fig. 7 C). Na cultivar sensível, ao contrário da cultivar tolerante, a remoção de parte das raízes levou ao acúmulo tanto de clorofila *a* quanto de carotenóides ($P \leq 0,05$). Os níveis de carotenóides diminuíram nas folhas de plântulas sensíveis tratadas com 160 μM Al^{3+} com parte das raízes removidas quando elevada concentração desse cátion metálico (500 μM) induziu o acúmulo de carotenóides ($P \leq 0,05$; Fig. 7). O acúmulo de carotenóides nas plântulas sensíveis sem parte das raízes, tratadas com 500 μM Al^{3+} resultou em um aumento da razão carotenóides/clorofila (Fig. 7 E). A razão clorofila *a/b* foi constante nas plântulas controle, no entanto com significativa redução em ambas as cultivares sem parte das raízes ($P \leq 0,05$; Fig. 7D).

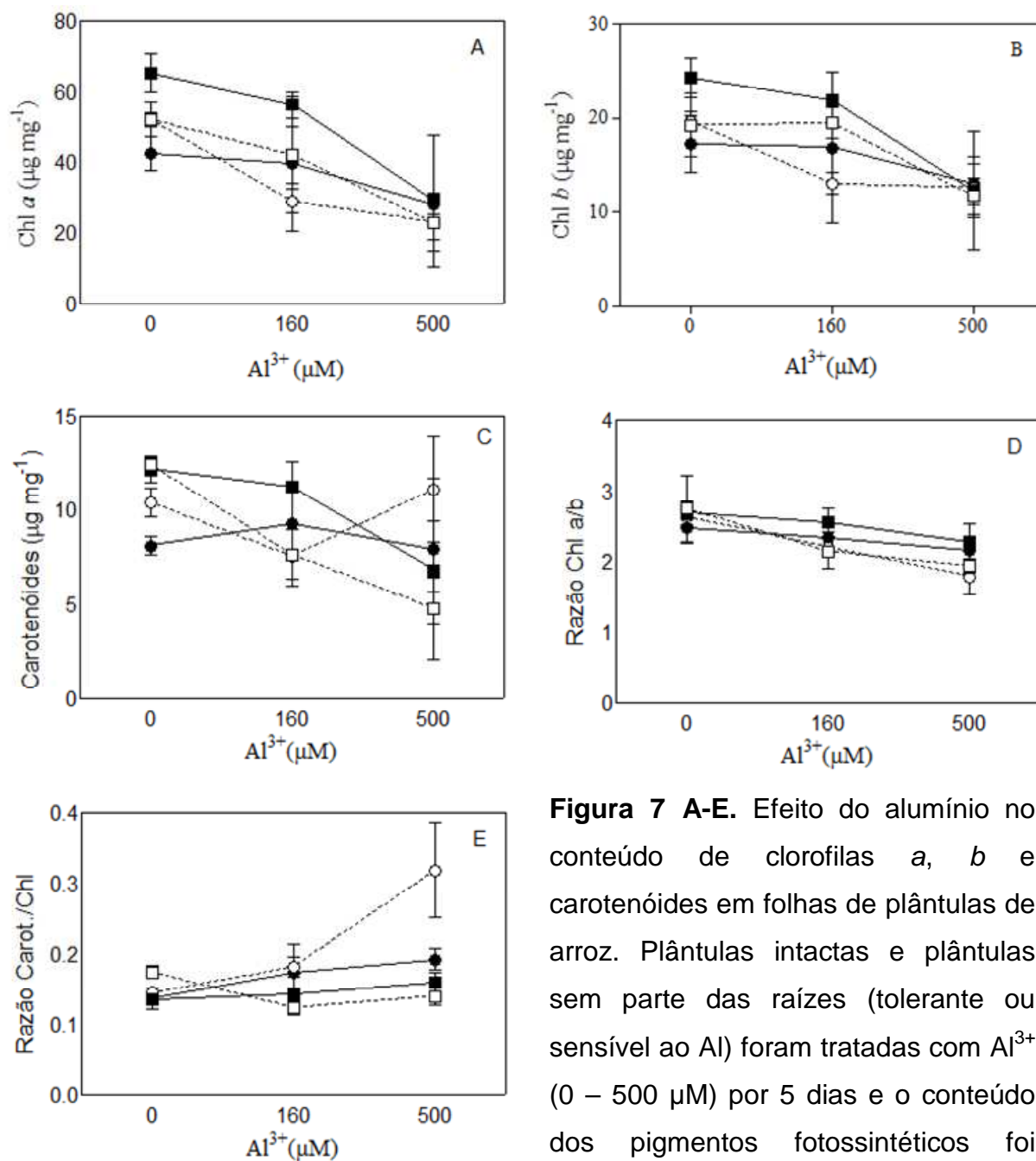


Figura 7 A-E. Efeito do alumínio no conteúdo de clorofilas *a*, *b* e carotenóides em folhas de plântulas de arroz. Plântulas intactas e plântulas sem parte das raízes (tolerante ou sensível ao Al) foram tratadas com Al³⁺ (0 – 500 μM) por 5 dias e o conteúdo dos pigmentos fotossintéticos foi avaliado, sendo 10 repetições por tratamento. **(A)** Clorofila *a*, **(B)** Clorofila *b*, **(C)** Carotenóides, **(D)** Razão Clorofila *a/b*, **(E)** Razão Carotenóides/Clorofila total. ●- Al-sensível; ○- Al-sensível sem raiz; ■- Al-tolerante; □- Al-tolerante sem raiz.

Medida da fluorescência da clorofila a

Os parâmetros fotossintéticos foram avaliados em folhas de plântulas de arroz para verificar os possíveis efeitos diretos do Al na fisiologia foliar. Tal análise permitiu contrastar a tolerância diferencial de duas cultivares de arroz como previamente determinado baseado no sistema de estudo de raízes descrito.

A figura 8 apresenta os efeitos do Al^{3+} no transporte de elétrons no fotossistema II (PSII). Plantas sensíveis tratadas com diferentes concentrações de Al^{3+} e com parte das raízes removidas exibiram significativa redução no rendimento quântico potencial (Fv/Fm). Em contraste com esses resultados, os valores de Fv/Fm em folhas de plantas Al-tolerantes sem parte das raízes não foram afetadas pela presença do Al^{3+} mesmo na concentração mais elevada 500 μM ($P \leq 0,05$; Fig. 8). Somente na concentração mais elevada de Al^{3+} (500 μM) foi possível reduzir significativamente o rendimento quântico efetivo ($\Delta F/F'm$) em plântulas sensíveis sem parte das raízes. A razão $\Delta F/F'm$ decresceu 50% durante tal tratamento (Fig. 8 B). O tratamento com Al^{3+} não exibiu efeito na razão $\Delta F/F'm$ em plantas tolerantes desprovidas de parte de suas raízes. Tanto a razão Fv/Fm quanto a $\Delta F/F'm$ foram pouco afetadas pelo tratamento com Al^{3+} em plantas intactas (Figs. 8 A-B).

A figura 9 mostra o efeito direto do Al no transporte de elétrons do fotossistema II (PSII) em plântulas de arroz sem parte das raízes, tratadas com Al^{3+} , na presença e ausência de doador de NO. Plântulas que não receberam aspersão de doador de NO (GSNO), apresentaram redução no transporte de elétrons para o PSII (Fv/Fm) na concentração de 500 μM de Al. Tanto plântulas sensíveis quanto tolerantes, na concentração de 500 μM de Al apresentaram redução do rendimento quântico potencial (Fv/Fm) mesmo após a aspersão do doador de NO (GSNO). O tratamento com 500 μM de Al diminuiu de maneira significativa o rendimento quântico efetivo ($\Delta F/F'm$) das plântulas sensíveis. Tal redução não foi observada para as plântulas tolerantes sob as mesmas condições de estresse. As plântulas sensíveis, ao serem tratadas com doador de NO apresentaram recuperação significativa do rendimento quântico efetivo

$(\Delta F/F'm)$, permitindo assim reversão parcial do estresse fotossintético ocasionado pelo Al^{3+} (Fig. 9 B).

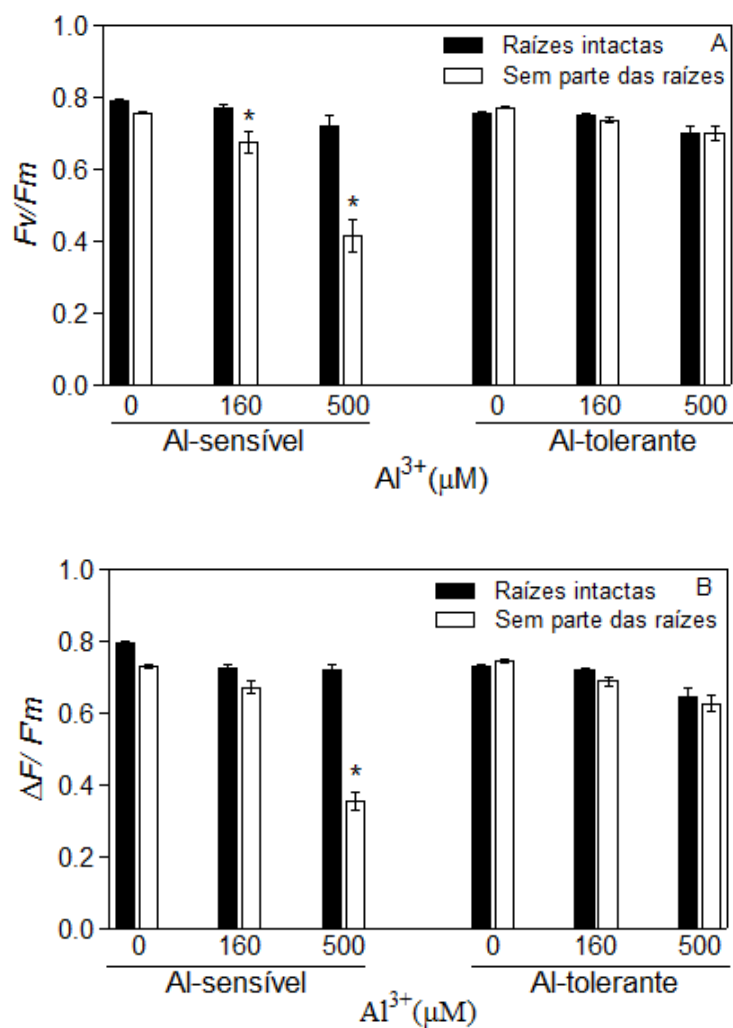


Figura 8 A-B. Efeito do Al^{3+} no fotossistema II (PSII). Plantas intactas ou sem parte das raízes (tolerante ou sensível ao Al) tratadas com Al^{3+} (0 – 500 μM). Parâmetros fotossintéticos obtidos de 10 repetições por tratamento. **(A)**, rendimento quântico potencial do PSII (F_v/F_m); **(B)**, rendimento quântico efetivo ($\Delta F/F_m$). * Diferença significativa em relação aos demais tratamentos. Teste de Tukey.

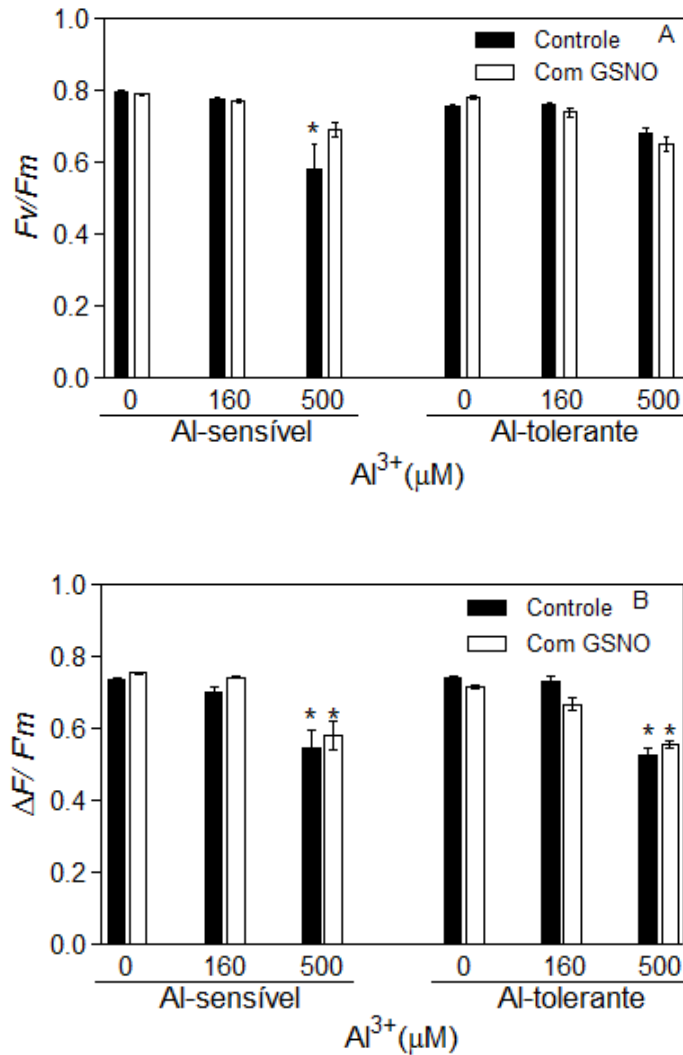


Figura 9 Efeito do tratamento com doador de NO (GSNO) no fotossistema II (PSII) de plantas sem parte das raízes, tratadas com Al³⁺. Plantas sem parte do sistema radicular (tolerante ou sensível ao Al) foram tratadas com Al³⁺ (0 – 500 μM). Parâmetros fotossintéticos obtidos de 10 repetições por tratamento. **(A)**, rendimento quântico potencial do PSII (F_v/F_m); **(B)**, rendimento quântico efetivo ($\Delta F/F'_m$).

DISCUSSÃO

O presente trabalho evidencia alterações morfológicas (Figura 1) que indicaram a translocação de Al para a parte aérea. Tal fato, ocorreu em função da exposição dos elementos traqueais à solução com Al^{3+} a partir dos corte efetuados no sistema radicular das plântulas em estudo. As plântulas tratadas com diferentes concentrações de Al^{3+} apresentaram clorose e necroses seguidas de enrolamento das folhas, características de estresse abiótico promovido pelo Al^{3+} (Moustakas *et al.*, 1996 e 1997; Jansen *et al.*, 2000; Peixoto *et al.*, 2000 Vasconcelos *et al.*, 2002a, b ; Jiang *et al.*, 2008). A partir dessas análises, os estudos posteriores buscaram comprovar a presença de Al^{3+} na parte aérea, assim como seus efeitos morfofisiológicos.

Os resultados deste trabalho indicaram que a retirada do ápice radicular resulta em um eficiente sistema de translocação de Al^{3+} para a parte aérea (Tabela 2). Esse dado confirma a análise estrutural das raízes cortadas, já que a região de corte das mesmas não apresentou formação de tilo, mesmo decorridas 48 horas de experimento (Fig. 2 A-B), ao contrário de relatos de diversos estudos (Bergamin *et al.*, 1995; Souza e Maringone, 2008; Carneiro e Cruz, 2009). Trabalho semelhante foi realizado para permitir a ascensão de potássio para a parte aérea em *Gleditsia triacanthos* L. (Hong e Sucoff, 1976).

Os mecanismos que impedem o deslocamento do Al^{3+} para a parte aérea puderam ser destacados pelos resultados da quantificação de Al^{3+} na parte aérea. As plântulas intactas das cultivares Al-tolerante e Al-sensível exibiram baixas concentrações de Al nas folhas ($15,2 \pm 3,9$ a $56,6 \pm 15,4 \mu\text{g g}^{-1}$ MS) após o tratamento com $160 \mu\text{M Al}^{3+}$, reforçando a característica de tolerância dessas plantas a esse metal (Tabela 2). Surpreendentemente, as concentrações de Al nas folhas de plantas intactas Al-tolerantes tratadas com $500 \mu\text{M Al}^{3+}$ foi 6,4 vezes maior que o observado nas sensíveis sob as mesmas condições (Tabela 2). A cultivar de arroz Al-tolerante Comum Branco possui fatores morfológicos distintos, tais como, folhas glabras e é uma planta de sequeiro, adaptada a solos secos. Como consequência, as taxas de transpiração são mais elevadas (França *et al.*, 2011), o que possivelmente

possibilitou a absorção de Al e eventual translocação desse metal para as folhas. O aumento da translocação de Al para as folhas das plântulas tolerantes e intactas causou alterações fenotípicas menos críticas, se comparado às Al-sensíveis, demonstrando que essas plantas são previamente capazes de prevenir os efeitos citotóxicos do Al. Além disso, esses resultados confirmam os mecanismos de resistência e exclusão de Al efetivos descritos na literatura (Bennet *et al.*, 1985; Clune e Copeland, 1999; Vasconcelos *et al.*, 2002a, b; Ciamporová, 2002; Doncheva *et al.*, 2005; Hossain *et al.*, 2006) já que em plântulas dos grupos controle e tratadas com diferentes concentrações que foram mantidas intactas continham baixos níveis de Al nas folhas (Tabela 2). Os valores de Al presentes nas plântulas controle, provavelmente, são provenientes das sementes e/ou de contaminações do ar e possíveis traços de Al^{3+} presentes nos reagentes (Kopittke *et al.*, 2010). As análises quantitativas das sementes de arroz revelaram níveis de Al^{3+} em torno de $7,5 \pm 1,7 \mu g g^{-1}$ para a cultivar sensível e $10,8 \pm 8,8 \mu g g^{-1}$ para a cultivar tolerante (Tabela 3). Tais análises também podem indicar a possível origem dos valores de Al encontrados nas plântulas controle.

Estudo recente mostrou que uma cultivar Al-tolerante de trigo acumulou $9,3 \pm 0,3 \mu g g^{-1}$ de Al na massa seca nas folhas após 24 h de tratamento em que as raízes permaneciam imersas em solução com $185 \mu M AlCl_3$ (Silva *et al.*, 2010). As plantas Al-sensíveis exibiram $17,7 \pm 14,5 \mu g.g^{-1}$ de Al na massa seca das folhas em plantas submetidas as mesmas condições experimentais (Silva *et al.*, 2010). O presente estudo corrobora dados obtidos por Silva *et al.* (2010). A excisão de parte das raízes de ambas as cultivares de arroz permitiu maior translocação de Al para a parte aérea (Tabela 2). Comparações entre as Al-tolerantes com retirada parcial das raízes e as Al-sensíveis com $500 \mu M Al^{3+}$ mostraram que as últimas acumularam 20% a mais de Al^{3+} ($P \leq 0,05$) nas folhas que as primeiras sob as mesmas condições (Tabela 2). Isso indica a tolerância diferencial entre essas cultivares, bem caracterizada em estudos com o sistema radicular, e agora, aplicado para a parte aérea quando a barreira física (ápice radicular) é removida. De fato, os níveis de Al nas plântulas tolerantes desprovidas de parte de suas raízes foi 27-vezes maior

que nas intactas, enquanto as plântulas sensíveis sem parte das raízes exibiram níveis de Al^{3+} 206 vezes maiores que as mesmas plantas com raízes intactas (tratamento com $500 \mu\text{M Al}^{3+}$; Tabela 2).

Após a quantificação do conteúdo de Al^{3+} na parte aérea, foram realizadas análises estruturais para verificar alterações anatômicas provocadas pela presença do metal nas folhas. Como esperado, nas seções transversais foliares (Fig. .2 C-D) da cultivar Al-tolerante na ausência de Al, observou-se aspecto normal sem obstrução dos vasos. Já nas plantas da mesma cultivar, tratadas com Al e com os ápices radiculares removidos, foram observadas obstruções dos vasos com formação de precipitado e necrose no bordo foliar. Estudos com efeitos indiretos do Al em *Capsicum annuum* L. mostraram redução da espessura e tamanho do mesofilo relacionados à diminuição do tamanho das células de folhas tratadas com o metal, assim como redução do tamanho das células guarda dos estômatos da face abaxial (Konarska, 2010). As alterações observadas em neste estudo apresentam-se mais severas, caracterizando processo semelhante à senescência, como observado por Zhang *et al.* (2010). A absorção de Al no sistema radicular de plantas está diretamente ligada à possibilidade da formação de complexos metálicos com compostos extracelulares (Li *et al.*, 2000). Esse fator torna difícil a avaliação e a distinção do conteúdo de Al do apoplasto em relação ao simplasto.

A determinação da concentração de Al no xilema de plantas hiperacumuladoras é utilizada como um indicador de absorção de Al no sistema radicular (Haridasan, 2008). Em contraste, plantas não acumuladoras são capazes de evitar a translocação de Al das raízes para a parte aérea por meio de eficientes mecanismos de exclusão, tais como, a complexação de Al com ácidos orgânicos e macromoléculas da parede celular, assim como a formação de precipitados no citosol (Bennet *et al.*, 1985; Clune e Copeland, 1999; Vasconcelos *et al.*, 2002a, b; Ciamporová, 2002; Doncheva *et al.*, 2005; Hossain *et al.*, 2006).

A entrada de alumínio, tanto em plantas hiperacumuladoras quanto em não acumuladoras também depende da capacidade de permitir a passagem desse metal pela hidrofóbica estria de Caspary presente na endoderme

(Rengel e Reid, 1997). Ademais, o alumínio é tóxico para a maioria das plantas (Delhaize *et al.*, 1993a, b; Yamamoto *et al.*, 2001; Kochian *et al.*, 2002). No entanto, estudos recentes demonstram que espécies de Vochysiaceae nativas do cerrado, acumulam Al nos cloroplastos, sem dano aparente de tais organelas (de Andrade *et al.*, 2010). Além disso, este mesmo metal foi considerado elemento benéfico para as mesmas plantas em baixas concentrações (White e Brown, 2010) assim como em *Qualea cordata* Spreng., acumuladora de Al, também da família Vochysiaceae (Alvim, 2010).

Os dados apresentados na literatura para plantas nativas mostram resposta contrária à observada para plantas cultivadas sob estresse por Al. No presente estudo, foram observados danos significativos na ultraestrutura do mesofilo de plântulas de arroz, incluindo danos severos à estrutura cloroplastídica e às mitocôndrias (Fig. 4, 5 e 6). No entanto, plântulas de arroz Al-tolerante, em concentrações intermediárias de Al (160 μ M), e sob concentração elevada (500 μ M), sem remoção de parte das raízes, não apresentaram danos aparentes na estrutura celular (Fig. 4 e 5). Esses dados são similares aos obtidos por de Andrade *et al.* (2010) em estudos com plantas nativas de cerrado e hiperacumuladoras de Al.

Embora alterações na disposição dos tilacóides granais, resultando em diferentes planos de orientação de grana em cada cloroplasto tenham sido atribuídas ao efeito de alumínio (Moustakas *et al.*, 1996 e 1997), no presente caso os resultados obtidos indicam que a disposição aleatória dos grana resulta do efeito de baixa intensidade luminosa (200 μ mol m⁻² s⁻¹) a que as folhas foram submetidas durante o período experimental (Fig. 3). Cloroplastos adaptados a sombra apresentam grana maiores e dispostos de modo irregular (Chow *et al.*, 1988).

Em *Thinopyrum bessarabicum* (Poaceae) Moustakas *et al.*, (1997) relatam a ocorrência de dilatação e distensão de cloroplastos, em resposta ao alumínio. Segundo estes autores, tais modificações seriam a causa de alterações na permeabilidade de membrana destas organelas e seriam efeito indireto do alumínio, uma vez que este não fora detectado na parte aérea. Decréscimo no desempenho fotossintético de plantas submetidas ao Al poderia

ser resultante destas alterações estruturais nos cloroplastos (Moustakas *et al.*, 1997). Ciamporová (2002) relatou alterações ultraestruturais, tais como desorganização do citoesqueleto, induzidas pela presença do Al, diretamente ligadas a ultraestrutura do ápice radicular. Foram relacionadas também alterações ultraestruturais nas raízes que levam à tolerância ao Al em trigo (Li *et al.*, 2008).

Análise ultraestrutural de mitocôndrias do mesofilo foliar de *Arabidopsis*, concomitante com técnica de fluorescência por microscopia confocal, e estudos da ativação de enzimas do tipo caspase mitocondrial, indicam que o Al induz o inchaço mitocondrial provocado pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Isso levou a disfunções mitocondriais, além de alteração da posição e forma dessas organelas (Li e Xing, 2011). A matriz mitocondrial é hipertônica em relação ao espaço intermembranas e ao citoplasma. Danos na membrana externa, provocados pela presença de espécies reativas de oxigênio, levam ao aumento do volume mitocondrial, devido ao influxo de líquido citoplasmático para a matriz mitocondrial. Esse processo promove o extravasamento de proteínas mitocondriais, dentre elas o citocromo c, que ativa caspases que levam ao processo de apoptose. O NO, participa da via de sinalização para inibição do estresse oxidativo, o que impede a apoptose, diminuindo os sintomas de estresse provocados por fatores abióticos (Hour *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011)

O presente estudo possibilitou observar redução no número de cristas mitocondriais, que foram bastante evidentes na cultivar Al-sensível a partir do tratamento com 160 μM de Al (Fig. 4 D-H) e na cultivar tolerante se manifestou de forma expressiva no tratamento com 500 μM de Al (Fig. 5 A-C). Tais alterações não foram observadas nas plântulas-controle em ambas as cultivares (Fig. 3). Destruições das cristas mitocondriais e distúrbios na estrutura lamelar de cloroplastos foram observados em *Capsicum annuum* L. tratada com Al (Konarska, 2010). Li e Xing (2011) apresentam ainda a ativação de caspases presentes no protoplasto, na presença de espécies reativas de oxigênio, que induzem a morte celular programada em função da fitotoxicidade provocada pelo Al. No tratamento com 160 μM de Al, com raízes intactas, não

foram encontradas alterações ultraestruturais nas células do mesófilo das plantas Al-tolerante (Fig. 4 A-C). Porém, nas Al-sensíveis, nas mesmas condições, houve células com vesiculações e necroses (Fig. 4 D-H) características de células em processo de morte celular programada (Li e Xing, 2011), ao lado de células íntegras, mas com projeções anômalas de aspecto filamentar (Fig. 4 D-H). Outro aspecto visualizado na cultivar IAC 1289 com 160 μM de Al e raiz intacta foi a formação de alças nos cloroplastos, englobando mitocôndrias, como em fagocitose e aparente ligação entre o estroma e a matriz mitocondrial. Alterações ultraestruturais em cloroplastos, com rompimento de membranas e extravasamento do estroma são observados quando plantas de trigo são submetidas a estresse com zinco e a elevadas temperaturas (Peck e McDonald, 2010). Porém, poucos relatos (Moustakas *et al.*, 1996, 1997; Konarska, 2010; Li e Xing, 2011) tratam de alterações ultraestruturais em folhas relacionadas ao Al. Nas plantas tratadas com 500 μM de Al, com raízes intactas (Fig. 5), foram observadas as mesmas alterações descritas acima para ambas as cultivares. Porém verificou-se alterações mais expressivas na cultivar sensível (Fig. 5 D-F) que apresentou projeções plastidiais mais intensas, com alças maiores, tilacóides granais mais desorganizados, mais curvos e vesiculação citoplasmática mais intensa, em relação à tolerante (Fig. 5 A-C). Já em plantas de ambas as cultivares, que tiveram parte das raízes removidas e tratadas com 500 μM de Al, apresentaram sintomas drásticos, com expressiva vesiculação e redução do número de grãos de amido (Fig. 6 A-F).

Conforme esperado, a desorganização do sistema de membranas apresentou-se mais intenso na cultivar Al-sensível, e com a formação de corpos elétron-densos no local dos grana e na matriz citoplasmática (Fig. 6 D-F). Desorganização nas membranas dos tilacóides, destruição das mesmas, assim como alterações no formato dos cloroplastos estão diretamente relacionados ao processo natural de senescência em arroz (Zhang *et al.*, 2010). Esses dados indicam que a presença direta do alumínio no mesófilo leva a alterações ultraestruturais e a indução de processos de morte celular programada em plantas cultivadas, tais como descritos por Li e Xing (2011). No

entanto, ainda se fazem necessários maiores estudos, em especial com plantas hiperacumuladoras, para entender os mecanismos de tolerância dessas plantas, que não apresentam sintomas drásticos como nas sensíveis, quando na presença de Al. Além disso, esses estudos permitirão a elaboração de técnicas de melhoramento de plantas para que as mesmas suportem concentrações elevadas de alumínio, mantendo a produtividade primária.

Após observar danos ultraestruturais provocados pela presença de Al^{3+} no mesofilo das plântulas em estudo, foram realizadas análises fisiológicas para verificar alterações provocadas pela presença do Al no aparato fotossintético. Nessas análises, elevados níveis de clorofila *a* foram encontrados nas folhas de plântulas-controle intactas Al-tolerantes em comparação com as Al-sensíveis (Fig. 7 A). Isso indica que as plantas tolerantes normalmente apresentam melhor performance fotossintética em relação às sensíveis. Resultados similares foram obtidos para a cultivar Al-tolerante tratadas com $160 \mu\text{M Al}^{3+}$ (Fig. 7 A-B). A cultivar Al-tolerante com parte das raízes retiradas exibiu conteúdo de clorofila *a* similar àquele das sensíveis sob as mesmas condições de estresse por Al. Contudo, os níveis de clorofila *a* decresceram quando comparados com os níveis de clorofila *b* (Fig. 7 A-B). Isso sugere a ocorrência de *photobleaching* (Peixoto *et al.*, 2002), fenômeno caracterizado pela redução da fluorescência como consequência da dependência de luz do fluoróforo.

Decréscimo no conteúdo de clorofila *a* foi verificado em plântulas de citrus (*Citrus grandis*), submetidas ao estresse por Al (Jiang *et al.*, 2009). Esse mesmo estudo quantificou Al na parte aérea em plantas submetidas a $1,2 \text{ mM}$ de Al e não encontrou quantidades significativas desse metal nas folhas e no caule, porém demonstrou que o aumento na disponibilidade de fósforo no solo permitiu a recuperação das plantas submetidas ao estresse. Em plantas de soja (*Glycine max* L.), tratadas com Al e com redução da disponibilidade de cálcio, também foram observadas alterações nas proteínas do complexo-antena, assim como a diminuição do conteúdo de clorofila *a* e aumento do conteúdo de clorofila *b*, promovido pela conversão desses pigmentos, levando ao processo de senescência (Milivojevic e Stojanovic, 2003). Em contrapartida,

decréscimo de clorofila *b* em plantas sob tratamento com Al foi associado ao funcionamento de proteção do complexo antena, sob tratamento de Al contra fotoinibição e danos na ultraestrutura (Maxwell e Johnson, 2000). O aumento no nível de carotenóides em plantas sensíveis tratadas com 500 μM Al^{3+} , bem como a elevada razão carotenóides/clorofilas (Fig. 7 D-E) sugere proteção do aparato fotossintético contra o estresse oxidativo. Os conteúdos de clorofila e carotenóides são os primeiros a serem afetados quando o PSII se encontra sob estresse (Peixoto *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2008). Consequentemente, a atividade fotossintética é reduzida pela diminuição da taxa de transporte de elétrons (ETR) no PSII, bloqueando esse centro de reação (Moustakas *et al.*, 1996).

As alterações verificadas no conteúdo de carotenóides e clorofilas também podem ser associadas com decréscimos da razão F_v/F_0 (variação da fluorescência/fluorescência inicial) (Pereira *et al.*, 2000). As diminuições dos níveis do rendimento quântico inicial (razão F_v/F_m ; Fig. 8 A) indicam progressiva fotoinibição em plantas sensíveis com remoção parcial das raízes e tratadas com Al, mas o mesmo não ocorreu com as tolerantes sob as mesmas condições. Resultados similares, porém com raízes intactas e o efeito indireto do Al, foram obtidos por Jiang *et al.* (2008) com *Citrus*, em que reduções na taxa de transporte de elétrons do PSII resultaram na fotoinibição em plantas sensíveis ao Al. Assim, o estresse por Al diminui a capacidade global do acceptor de elétrons nas folhas do PSII para o fotossistema I (PSI) (Jiang *et al.*, 2008).

Análises fotossintéticas de duas cultivares de mirtilo, (*Vaccinium corymbosum* L.) submetidas ao estresse indireto por Al apresentaram diferença no rendimento quântico potencial, seguido por modificações no conteúdo de clorofilas *a* e *b* e de carotenóides, após 20 dias de exposição ao Al^{3+} em solução (Reyes-Diaz *et al.*, 2010). Esses parâmetros foram utilizados pelos autores para caracterização de tolerância ao Al. Ao analisar o aparato fotossintético de algas (*Euglena gracilis* e *Chlamydomonas acidophila*) submetidas ao Al^{3+} , foram observadas reduções no transporte de elétrons do PSII, sendo que *E. gracilis* foi mais afetada do que *C. acidophila* (Perreault *et*

al., 2010). Isso leva a crer a existência de sistemas fotossintéticos com tolerância diferencial ao Al em diferentes organismos. Baseado nesses estudos, a tolerância ao Al em arroz na cultivar Comum Branco, bem caracterizada pelos estudos do sistema radicular (Vasconcelos *et al.*, 2002a), parece ser também expresso na parte aérea uma vez que a razão F_v/F_m nessa planta não foi significativamente afetada pelo tratamento com Al (Fig. 8 A) (Force *et al.*, 2003). Significativa redução do rendimento quântico efetivo ($\Delta F/F'm$) ocorreu nas plântulas Al-sensível desprovidas de parte das raízes e tratadas com 500 μM Al, o qual causou significativa redução na performance fotossintética dessas plantas (Fig. 8 B). Esse resultado permite demonstrar que a sensibilidade ao Al na cultivar de arroz IAC 1289 não é restrita somente ao sistema radicular. Moustakas *et al.* (1996) relataram em seus estudos que plantas de *Thinopyrum bessarabicum* apresentaram decréscimo de dissipação de energia do PSII quando as raízes dessas plantas foram tratadas com Al. Dessa forma, a tolerância ao Al dessa cultivar de arroz parece estar relacionada a mecanismos fotoquímicos mais eficientes para absorção de luz pela clorofila *a*.

Alguns estudos descrevem os efeitos deletérios do Al na atividade fotossintética de várias espécies de plantas após o tratamento das raízes com esse metal (Moustakas *et al.*, 1996, 1997; Peixoto *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2008). Porém, em uma espécie de *Vochysiaceae*, nativa do Cerrado brasileiro, hiperacumuladoras de Al, estocam esse metal na parte aérea, mais especificamente nos cloroplastos, sem sofrerem danos aparentes em sua estrutura fotossintética (de Andrade *et al.*, 2011). Neste trabalho, o impacto direto do Al^{3+} na fotossíntese foi verificado nos conteúdos de pigmentos do cloroplasto e nas alterações promovidas por esse metal no aparato fotossintético.

A presença do NO favoreceu a recuperação da atividade fotossintética nas plantas Al-sensíveis ao Al. Plantas sensíveis sem parte das raízes e tratadas com Al retornaram seu rendimento quântico potencial aos níveis normais após a exposição das folhas ao doador de NO (GSNO) (Fig. 9 A). Isso indica que a planta Al-sensível foi capaz de manter o transporte de elétrons no

PSII mesmo quando submetidos a elevadas concentrações de Al^{3+} . Diversas proteínas presentes nos cloroplastos, alvo de S-nitrosilação são reguladas em meio reduzido (Zang *et al.*, 2002; Motohashi *et al.*, 2001; Marcus *et al.*, 2003, Lindermayr *et al.*, 2005), proporcionado pela presença de GSNO como doador de NO. Condições oxidantes inibem a atividade da Rubisco e estimulam sua degradação, que em muitas ocasiões foram inibidas por agentes redutores (Mehta *et al.*, 1992; Desimone *et al.*, 1996), tais como o NO. Relacionado ainda ao aparato fotossintético, proteínas do PSII são ativadas na presença de NO. Isso porque, a fosforilação das proteínas D1 e D2 do centro de reação do PSII, assim como suas subunidades, são estimuladas em condições de elevada redução (Carlberg *et al.*, 1999). Além disso, e ainda mais relevante para o presente estudo, Takahashi e Yamasaki (2002) elucidaram de maneira elegante a reversão da inibição da fosforilação nos cloroplastos pela presença do NO. A toxicidade por cádmio em plantas de arroz foi evitada pelo NO, inibindo a degradação da clorofila (Hsu e Kao, 2004).

Os dados deste trabalho demonstraram que a tolerância ao Al em plantas de arroz é também expressa na parte aérea como observado pela capacidade do aparato fotossintético em suportar o estresse provocado pelo Al translocado das raízes para a parte aérea quando parte das raízes foi removida. De fato, plantas de arroz desprovidas de parte das raízes mostraram ser um modelo adequado para estudos dos efeitos diretos do Al no aparato fotossintético das folhas. Assim, o desenvolvimento dessa metodologia simples e prática permite a exploração de novas possibilidades de trabalho que buscam entender os efeitos diretos do Al na fisiologia foliar de plântulas de arroz, assim como de outras plantas cultivadas ou acumuladoras do metal.

Além disso, os resultados permitiram demonstrar que o NO desempenha importante papel na prevenção da fotoinibição em plantas de arroz tratadas com Al. Plantas tolerantes possuem mecanismos efetivos para suportar o estresse por Al, no entanto, não foi observado efeito positivo para essas plantas após o tratamento com GSNO. Dessa forma, o estudo aqui presente traz novas perspectivas para estudos moleculares e mecanismos bioquímicos

que levam à tolerância ao Al, incluindo aquelas plantas que são hiperacumuladoras.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O presente trabalho contribuiu de maneira significativa para a abertura de novas possibilidades para a pesquisa *in vivo* de transporte de substâncias, tais como compostos orgânicos e inorgânicos, metais pesados, e compostos xenobióticos, na medida em que cria um modelo prático e simples de transporte de substâncias para a parte aérea. Tal modelo permitirá estudos na Biologia Vegetal para ampliação dos conhecimentos sobre determinados compostos na parte aérea, possibilitando a seleção de cultivares fotossinteticamente tolerantes a determinadas substâncias, assim como alterações genéticas em espécies cultivadas.

Os dados apresentados suportam a importância das raízes como barreira física e que apresenta mecanismos de resistência e de exclusão efetivos para impedir a translocação de Al para a parte aérea.

Os resultados permitem concluir que a presença direta do alumínio nas folhas causa efeitos prejudiciais na estrutura foliar, tais como clorose, enrolamento e necrose, além de alterações no aparato fotossintético, levando a danos ultraestruturais severos. Tais danos levaram a com formações de alças nos cloroplastos e a união dos mesmos à mitocôndrias, fenômenos provocados por tal metal são inéditos na literatura. O alumínio na parte aérea provocou concomitantemente a redução no transporte de elétrons para o fotossistema II e na eficiência fotossintética, a degradação de clorofila e aumento da síntese de carotenóides. Além disso, a tolerância diferencial das plantas estudadas permitiu verificar que a resistência dessas plantas em relação ao Al não é restrita ao sistema radicular. Portanto, análises bioquímicas, tais como a atividade enzimática da RUBISCO ou de outras enzimas envolvidas na fotossíntese, e análises de compostos capazes de precipitar o Al nas células do mesofilo são importantes vias para o melhor entendimento dos dados aqui obtidos.

As análises com NO em plantas submetidas ao estresse por Al corroboram dados presentes na literatura que relatam a importância dessa molécula na reversão do estresse abiótico, na medida em que as plantas que

receberam NO apresentaram reversão parcial do estresse provocado pelo AI. Além disso, os dados obtidos trazem novas evidências sobre a tolerância diferencial das plantas estudadas, já que as plantas sensíveis responderam de forma mais evidente a presença do NO em relação às tolerantes.

Portanto, o presente estudo cria novas perspectivas para a elucidação do papel do NO sobre o estresse abiótico, em especial na parte aérea, em sistemas *in vivo*. Análises bioquímicas e genéticas, tais como estudos da expressão gênica, com a construção de bibliotecas de subtração, além de estudos da atividade de enzimas envolvidas em estresse abiótico e na fotossíntese, utilizando o modelo estudado permitirão compreender a resposta de genes envolvidos no estresse por AI com expressão estimulada ou inibida na presença de NO em plantas cultivadas e naquelas acumuladoras de AI.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alvim MN (2006) Importância da idade da semente e avaliação da sensibilidade diferencial em genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.) sob estresse de alumínio. Dissertação de Mestrado. UFMG, 73p.

Alvim MN (2010) Respostas fisiológicas de *Qualea cordata* Spreng. (Vochysiaceae) relacionadas ao efeito benéfico do acúmulo tecidual de Al. Tese de Doutorado. UFMG, 75p.

Ball MC, Butterworth JA, Roden JS, Christian R, Egerton JJG (1994) Applications of chlorophyll fluorescence to forest ecology. *Australian Journal Plant Physiology*, 1994:311–319.

Barber J, Anderson B (1992) Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis. *Trends in Biochemical Science*, 17:61–66.

Beemster GTS, Baskin TI (1998) Analysis of cell division and elongation underlying the developmental acceleration of root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 116(4): 1515–1526

Bennet RJ, Breen CM, Bandu V (1985) Aluminum toxicity and regeneration of the root cap - preliminary evidence for a golgi-apparatus derived morphogen in the primary root of *Zea mays*. *South African Journal of Botany*, 51(5): 363–370.

Bergamin Filho A, Kimati H, Amorim L (1995) Manual de fitopatologia. São Paulo: Agronômica Ceres, 1: 417–453.

Bhuja P, McLachlan K, Stephens J, Taylor G (2004) Accumulation of 1,3- β -D-glucans, in response to aluminum and cytosolic calcium in *Triticum aestivum*. *Plant Cell Physiology*, 45(5):543–549.

Carlberg I, Rintamaki E, Aro EM, Andersson B (1999) Thylakoid protein phosphorylation and the thiol redox state. *Biochemistry*, 38: 3197–3204.

Carneiro CE, Cruz JL (2009) Caracterização anatômica de órgãos vegetativos do mamoeiro. *Ciência Rural*, 39 (3): 918–921.

Chen LS, Qi YP, Liu XH (2005a) Effects of aluminum on light energy utilization and photoprotective systems in citrus leaves. *Annals of Botany*, 96:35–41.

Chen LS, Qi YP, Smith BR, Liu XH (2005b) Aluminum-induced decrease in CO₂ assimilation in citrus seedlings is unaccompanied by decreased activities of key enzymes involved in CO₂ assimilation. *Tree Physiology*, 25:317–324.

Chow WS, Qian L, GoodChild DJ, Anderson JM (1988) Photosynthetic acclimation of *Alocasia macrorrhiza* (L.) G. Don to growth irradiance: structure, function and composition of chloroplasts. In: *Ecology of Photosynthesis in Sun and Shade*. Eds. Evans JR, von Caemmerer S, Adams III WW. CSIRO, Melbourne, 107–122.

Ciamporová M (2002) Morphological and structural responses of plant roots to aluminium at organ, tissue, and cellular levels. *Biologia Plantarum*. 45(2):161–171.

Clune TS e Copeland L (1999) Effects of aluminium on canola roots. *Plant and Soil*, 216: 27–33.

de Andrade LRM, Barros LMG, Echevarria GF, Amaral LIV, Cotta MG, Rossatto DR, Haridasan M, Franco AC (2011) Al-hyperaccumulator Vochysiaceae from the Brazilian Cerrado store aluminum in their chloroplasts without apparent damage. *Environmental and Experimental Botany*, 70 (1): 37–42.

Delhaize E, Craig S, Beaton CD, Bennet AJ, Jagadish VC, Randal PI (1993a) Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). Uptake and distribution of aluminum in root apices. *Plant Physiology*, 103:315–321.

Delhaize E, Ryan PR, Randall PJ (1993b) Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). Aluminum-stimulated excretion of malic-acid from root apices. *Plant Physiology*, 103(3): 695–702.

Delima ML, Copeland L (1994) Changes in the ultrastructure of the root-tip of wheat following exposure to aluminum. *Australian Journal of Plant Physiology*, 21(1): 85–94.

Doncheva S, Amenos M, Poschenrieder C, Barcelo J (2005) Root cell patterning: a primary target for aluminium toxicity in maize. *Journal of Experimental Botany*, 56: 1213–1220.

Desimone M, Henke A, Wagner E (1996) Oxidative stress induces partial degradation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in isolated chloroplasts of barley. *Plant Physiology*, 111: 789–796.

Embrapa Arroz e Feijão (2007) Arroz: Cultivares de arroz. Disponível em <<http://www.cnpaf.embrapa.br/arroz/index.htm>> Acesso em: 12 set. 2007.

FAO (2010) Disponível em <<http://www.fao.org/economic/est/publications/rice-publications/rice-market-monitor-rmm/en/>> Acesso em: 20 nov. 2010.

Farooq M, Basra SMA, Wahid A, Rehman H (2009) Exogenously applied nitric oxide enhances the drought tolerance in fine grain aromatic rice (*Oryza sativa* L.) *Journal of Agronomy and Crop Science*, 195: 254–261.

Force L, Critchley C, van Rensen JJS (2003) New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants - 1. The effect of illumination on the fluorescence parameters of the JIP-test. *Photosynthesis Research*, 78:17–33.

França MGC, Zimmer-Prado LM, Lemos JP, Ranieri BD, Vale FHA (2011) Morphophysiological differences in leaves of *Lavosiera campos-portoana* (Melastomataceae) enhance higher drought tolerance in water shortage events. *Journal of Plant Research* (*in press*)

Furlani AMC, Furlani PR (1988) Composição e pH de soluções nutritivas para estudos fisiológicos e seleção de plantas em condições nutricionais adversas. Boletim técnico. Instituto Agronômico de Campinas, 34p. In: Zonta E (2003) Estudo de tolerância ao alumínio em arroz de sequeiro e seus efeitos sobre a interface solo-planta. Tese (Doutorado). UFRRJ, 139p.

Genty B, Briantais JM, Baker NR (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* 990:87–92. In: Cheng L, Fuchigami LH, Breen PJ (2001) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron-transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Journal of Experimental Botany*, 52:1865– 1872.

Godbold DL, Jentschke G, Marschner P (1995) Solution pH modifies the response of norway spruce seedlings to aluminum. *Plant and Soil*, 171:175 – 178.

Haridasan M (2008) Nutritional adaptation of native plants of the cerrado biome in acid soils. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 20(3): 183–195.

Hodson MJ, Wilkins DA (1991) Localization of aluminium in the roots of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst) inoculated with *Paxillus involutus* Fr. *New Phytologist*, 118:273 – 278.

Hossain AKMZ, Koyama H, Hara T (2006) Growth and cell wall properties of two wheat cultivars differing in their sensitivity to aluminum stress. *Journal of Plant Physiology*, 163(1): 39–47.

Hong SG, Sucoff E (1976) Effects of kinetin and root tip removal on exudation and potassium (Rubidium) transport in roots of honey locust. *Plant Physiology* 57, 230–236.

Hour MJ, Yang JS, Chen TL, Chen KT, Kuo SC, Chung JG, Lu CC, Chen CY, Chuang YH (2011) The synthesized novel fluorinated compound (LJJ-10) induces death receptor- and mitochondria-dependent apoptotic cell death in the human osteogenic sarcoma U-2 OS cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(7): 2709–2721.

Hsu YT, Kao CH (2004) Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. *Plant Growth Regulation*, 42:227–238.

Jansen S, Broadley MR, Robbrecht E, Smets E (2002) Aluminum hyperaccumulation in angiosperms: a review of its phylogenetic significance. *The Botanical Review*, 68(2): 235–269.

Jiang H-X, Chen L-I, Zheng J-G, Han S, Tang N, Smith Br (2008) Aluminum-induced effects on photosystem II photochemistry in *Citrus* leaves assessed by the chlorophyll a fluorescence transient. *Tree Physiology*, 28:1863–1871.

Jiang HX, Tang N, Zeng JG, Li Y, Chen L-I (2009) Phosphorus alleviates aluminum-induced inhibition of growth and photosynthesis in *Citrus grandis* seedlings. *Physiologia Plantarum*, 137: 298–311.

Karnovsky MJ. (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of light osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 27: 137–138.

Kochian LV, Pence NS, Letham DLD, Pineros MA, Magalhaes JV, Hoekenga OA, Garvin DF (2002) Mechanisms of metal resistance in plants: aluminum and heavy metals. *Plant and Soil*, 247: 109–119.

Konarska, A (2010) Effects of aluminum on growth and structure of red pepper (*Capsicum annuum* L.) leaves. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32 (1): 145–151.

Kopittke P M, Blamey FPC, Asher CJ, Menzies NW (2010) Trace metal phytotoxicity in solution culture: a review. *Journal of Experimental Botany*, 61 (4): 945–954.

Krause GH, Weis E (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42:313–349.

Lemos-Filho JP (2000) Fotoinibição em três espécies do cerrado (*Annona crassifolia*, *Eugenia dysenterica* e *Campomanesia adamantium*) na estação seca e na chuvosa. *Revista brasileira de Botânica*, 23(1): 45–50.

Li XF, Ma JF, Hiradate S, Matsumoto H (2000) Mucilage strongly binds aluminum but does not prevent roots from aluminum injury in *Zea mays*. *Physiologia Plantarum*, 108(2): 152–160.

Li Y, Yang GX, Luo LT, Ke T, Zhang JR, Li KX, He GY (2008) Aluminium sensitivity and tolerance in model and elite wheat varieties. *Cereal Research Communications*, 36 (2): 257–267.

Li Z, Xing D (2011) Mechanistic study of mitochondria-dependent programmed cell death induced by aluminium phytotoxicity using fluorescence techniques. *Journal of Experimental Botany*, 62(1): 331–343.

Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids - pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in enzymology*, 148: 350–382.

Lindermayr C, Saalbach G, Durner J (2005) Proteomic Identification of S-Nitrosylated Proteins in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 137: 921–930.

Ma JF (2000) Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants. *Plant and Cell Physiology*, 41: 383–390.

Ma JF, Shen R, Nagao S, Tanimoto E (2004) Aluminum targets elongating cells by reducing cell wall extensibility in wheat roots. *Plant Cell Physiology*, 45:583–589.

Marciano DPRO, Ramos FT, Alvim MN, Magalhaes JR, França MGC (2010) Nitric oxide reduces the stress effects of aluminum on the process of germination and early root growth of rice. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 173: 885–891.

Maxwell K, Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51:659–668.

Marcus Y, Altman-Gueta H, Finkler A, Gurevitz M (2003) Dual role of cysteine 172 in redox regulation of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase activity and degradation. *Journal of Bacteriology*, 185: 1509–1517.

Mehta RA, Fawcett TW, Porath D, Mattoo AK (1992) Oxidative stress causes rapid membrane translocation and in vivo degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Journal of Biological Chemistry*, 267: 2810–2816.

Milivojevic D, Stojanovic D (2003) Role of calcium in aluminum toxicity on content of pigments and pigment-protein complex of soybean. *Journal of Plant Nutrition*, 26 (2): 341–350.

Motohashi K, Kondoh A, Stumpp MT, Hisabori T (2001) Comprehensive survey of proteins targeted by chloroplast thioredoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 11224–11229.

Moustakas M, Ouzounidou G, Eleftheriou EP, Lannoye R (1996) Indirect effects of aluminium stress on the function of the photosynthetic apparatus. *Plant Physiology and Biochemistry*, 34:553–560.

Moustakas M, Eleftheriou EP, Ouzounidou G (1997) Short-term effects of aluminium at alkaline pH on the structure and function of the photosynthetic apparatus. *Photosynthetica*, 34:169–177.

Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst RD, Hancock JT (2002) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1237–1247.

Neill S, Barros R, Bright J, Desikan R, Hancock J, Harrison J, Morris P, Ribeiro D, Wilson I (2008) Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 59:165–176.

O'Brien TP, Feder N, McCully ME (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *Protoplasma*, 59: 368–373.

Peck AW, McDonald GK (2010) Adequate zinc nutrition alleviates the adverse effects of heat stress in bread wheat. *Plant and Soil*, 337:355–374.

Peixoto PHP, Da Matta FM, Cambraia J (2002) Responses of the photosynthetic apparatus to aluminum stress in two sorghum cultivars. *Journal of Plant Nutrition*, 25:821–832.

Pellet DM, Grunes DL, Kochian LV (1995) Organic-acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L). *Planta*, 196(4): 788–795.

Pereira WE, de Siqueira DL, Martinez CA, Puiatti M (2000) Gas exchange and chlorophyll fluorescence in four citrus rootstocks under aluminium stress. *Plant Physiology*, 157(5): 513–520.

Perreault F, Dewez D, Fortin C, Juneau P, Diallo A, Popovic R (2010) Effect of aluminum on cellular division and photosynthetic electron transport in *Euglena gracilis* and *Chlamydomonas acidophila*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29 (4): 887–892.

Pietraszewska TM (2001) Effect of aluminium on plant growth and metabolism. *Acta Biochimica Polonica*, 48:673–686.

Qian H, Chen W, Li J, Wang J, Zhou Z, Liu W, Fu Z (2009) The effect of exogenous nitric oxide on alleviating herbicide damage in *Chlorella vulgaris*. *Aquatic Toxicology*, 92: 250–257.

Ramos FT (1999) Uso de corantes e técnicas microscópicas para avaliação da sensibilidade diferencial em genótipos de arroz sobre estresse de Al. Tese de Mestrado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 126 p.

Rengel Z, Reid RJ (1997) Uptake of aluminium by plant cells. *Plant and Soil*, 192 (1): 31–35.

Reyes-Diaz M, Inostroza-Blancheteau C, Millaleo R, Cruces E, Wulff-Zottele C, Alberdi M, Mora MD (2010) Long-term Aluminum Exposure Effects on Physiological and Biochemical Features of Highbush Blueberry Cultivars *Journal of American Society for Horticultural Science*, 135(3): 212–222.

Roland AM (1978) General preparations and staining of thin sections. In: *Electron microscopy and cytochemistry of plant cells*. Hall J.L. Elsevier, New York, 1–62.

Ryan PR, TomasoD, J Mand Kochian LV (1993) Aluminum toxicity in roots: an investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. *Journal of Experimental Botany*, 44:437–446.

Ryan PR, Delhaize E, Randall PJ (1995) Characterization of Al-stimulated efflux of malate from the apices of Al-tolerant wheat roots. *Planta*, 196(1): 103–110.

Samuels TD, Kucukakyuz K, RinconZachary M (1997) Al partitioning patterns and root growth as related to Al sensitivity and Al tolerance in wheat. *Plant Physiology*, 113(2): 527–534.

Silva S, Pinto-Carnideb O, Martins-Lopesb P, Matos M, Guedes-Pinto H, Santos C (2010) Differential aluminium changes on nutrient accumulation and root differentiation in an Al sensitive vs. tolerant wheat. *Environmental and Experimental Botany*, 68:91–98.

Sivaguru M, Horst WJ (1998) The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize. *Plant Physiology*, 116: 155–163.

Souza VL e Maringoni AC (2008) Análise ultraestrutural da interação de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em genótipos de feijoeiro. *Summa Phytopathology*, 34 (4): 318–320.

Takahashi S, Yamasaki H (2002) Reversible inhibition of photophosphorylation in chloroplasts by nitric oxide. *FEBS Letters*, 512:145–148.

Taiz L, Zeiger E (2004) *Fisiologia vegetal*. 3.ed. Porto Alegre: Artmed. 2004. 719p.

Uexküll HR and Mutert E (1995) Global extent, development and economic impact of acid soils. *Plant and Soil*, 171: 1–15.

Vasconcelos SS, Rossiello ROP, Jacob-Neto J (2002a) Parâmetros morfológicos para estabelecer tolerância diferencial à toxicidade de alumínio em cultivares de arroz. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 37(3):357–363.

Vasconcelos SS, Jacob-Neto J, Rossiello ROP (2002b) Differential root responses to aluminum stress among Brazilian rice genotypes. *Journal of Plant Nutrition*, 25:655–669.

Wang Y-S, Yang Z-M (2005) Nitric Oxide Reduces Aluminum Toxicity by Preventing Oxidative Stress in the Roots of *Cassia tora* L. *Plant Cell Physiology*, 46:1915–1923.

Wendehenne D, Durner J, Klessig DF (2004) Nitric oxide signalling and plant defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 7:449–455.

White PJ, Brown PH (2010) Plant nutrition for sustainable development and global health. *Annals of Botany*, 105:1073–1080.

Wu CL, Huang AC, Yang JS, Liao CL, Lu HF, Chou ST, Ma CY, Hsia TC, Ko YC, Chung JG (2011) Benzyl Isothiocyanate (BITC) and Phenethyl Isothiocyanate (PEITC)-Mediated Generation of Reactive Oxygen Species Causes Cell Cycle Arrest and Induces Apoptosis via Activation of Caspase-3, Mitochondria Dysfunction and Nitric Oxide (NO) in Human Osteogenic Sarcoma U-2 OS Cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 29(8): 1199–1209.

Yamamoto Y, Kobayashi Y, Matsumoto H (2001) Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. *Plant Physiology*, 125:199–208.

Zhang GC, Taylor GJ (1990) Kinetics of aluminum uptake in *Triticum-aestivum* L. – identity of the linear-phase of aluminum uptake by excised roots of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive cultivars. *Plant Physiology*, 94(2): 577–584.

Zhang MP, Zhang CJ, Yu GH, Jiang YZ, Strasser RJ, Yuan ZY, Yang XS, Chen GX (2010) Changes in chloroplast ultrastructure, fatty acid components of thylakoid membrane and chlorophyll a fluorescence transient in flag leaves of a super-high-yield hybrid rice and its parents during the reproductive stage. *Journal of Plant Physiology*, 167(4): 277–285.

Zheng SJ, Yang JL (2005) Target sites of aluminum phytotoxicity. *Biologia Plantarum*, 49(3): 321–331.