**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Cálcio e boro aliviam a toxidez por H^+ e Al^{3+} e suprimem a indução de guaiacol peroxidase em raízes do cultivar Micro-Tom de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.): possível envolvimento da parede celular

Lucas Diego Figueiredo

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas

**Piracicaba
2013**

Lucas Diego Figueiredo
Bacharel em Ciências Biológicas

Cálcio e boro aliviam a toxidez por H^+ e Al^{3+} e suprimem a indução de guaiacol peroxidase em raízes do cultivar Micro-Tom de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.): possível envolvimento da parede celular

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **VICTOR ALEXANDRE VITORELLO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas

**Piracicaba
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Figueiredo, Lucas Diego

Cálcio e boro aliviam a toxidez por H^+ e Al^{3+} e suprimem a indução de guaiacol peroxidase em raízes do cultivar Micro-Tom de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.): possível envolvimento da parede celular / Lucas Diego Figueiredo. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2013.
91 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Acidez 2. Alumínio 3. Guaiacol peroxidase 4. Pectina 5. Viabilidade celular
6. Crescimento radicular 7. SHAM I. Título

CDD 635.642
F475c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

A Deus e a todos que fazem parte de minha vida,
hoje e sempre,
dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao apoio e suporte familiar e pela confiança em mim depositada por minha namorada.

A minha filha Gabriela, que mesmo na distância faz parte de meus pensamentos diários.

Aos amigos de laboratório, Rodrigo Ruiz Romero e Jonathas Pereira das Graças, sempre dispostos a discussões.

Ao Jonathas Pereira das Graças pelo apoio na condução dos trabalhos.

A Dra. Lucia Mattiello pela co-orientação e apoio científico.

A amizade e influência da Dra. Lucélia Borgo.

As companhias de laboratório Jamille Santos, Naiara Célda e Sabrina Helena da Cruz Araujo.

A técnica do laboratório de Biologia Celular e Molecular, Mariana Belloti.

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

Ao acolhimento, companheirismo e mais que tudo aos amigos da República Popular Democrática Lesma Lerda.

A sabedoria e conhecimento, ao apoio e dedicação, ao amigo e orientador, Prof. Dr. Victor Alexandre Vitorello.

Muito obrigado!

EPÍGRAFE

“As explicações de qualquer fenômeno devem assumir apenas as premissas estritamente necessárias à explicação do mesmo, eliminando todas as que causariam qualquer diferença aparente nas predições da hipótese ou teoria.”

William de Ockham

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO	21
2.1 Efeitos da ação dos íons H^+ e Al^{3+} sobre o desenvolvimento radicular	21
2.1.1 O cálcio na parede celular	24
2.1.2 O boro na parede celular	25
2.1.3 Cálcio e boro no alívio da toxidez por alumínio	26
2.2 O uso do Micro-Tom	27
3 OBJETIVOS	29
3.1 Objetivos gerais	29
3.2 Objetivos específicos:	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Material vegetal e condução das plântulas	31
4.2 Soluções de tratamento	32
4.2.1 Solução controle e tamponamento de pH	32
4.2.2 Tratamentos com cálcio	32
4.2.3 Tratamentos com boro	32
4.2.4 Tratamentos com cálcio e boro	32
4.2.5 Tratamentos com Al^{3+}	32
4.3 Análise do crescimento radicular	33
4.4 Análise da viabilidade celular	33
4.4.1 Absorção de azul de Evan's	33
4.4.2 Localização de dano celular por fluoresceína e iodeto de propídio	34
4.5 Atividade de peroxidase (GPOX)	34
4.6 Análise estatística	35
5 RESULTADOS	37
5.1 Efeitos da acidez sobre raízes de Micro-Tom	37

5.2 O cálcio alivia os efeitos deletérios da acidez e toxidez por alumínio.....	41
5.2.1 Efeito do cálcio sobre o crescimento radicular.....	41
5.2.2 Efeito do cálcio sobre a viabilidade celular	44
5.2.3 Efeito do cálcio na atividade de guaiacol peroxidase (GPOX)	48
5.2.4 Correlação entre viabilidade celular e atividade de GPOX	49
5.3 O Boro na proteção radicular quando submetida à acidez e alumínio.....	50
5.3.1 Efeitos do boro no crescimento radicular.....	50
5.3.2 Efeitos do boro sobre a viabilidade celular	52
5.3.3 Efeitos do boro sobre a atividade GPOX	53
5.3.4 Correlação entre viabilidade celular e atividade de GPOX	54
5.4 Efeito entre cálcio e boro juntos no alívio à acidez e na toxidez por Al^{3+} .	55
5.4.1 Crescimento radicular	55
5.4.2 Viabilidade celular.....	57
5.4.3 Atividade guaiacol peroxidase	58
5.4.4 Possível envolvimento das peroxidases classe III e o dano à membrana	59
6 DISCUSSÃO	61
6.1 Efeitos da acidez sobre as raízes de Micro-Tom e o papel de peroxidases	61
6.2 Atuação do cálcio no alívio da acidez e toxidez por alumínio	63
6.3 Boro protege as raízes contra a perda na viabilidade e indução da peroxidase	65
6.4 Cálcio e boro suprimem a indução de GPOX mantendo a viabilidade celular	67
7 CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS.....	73
BIBLIOGRAFIA CONSULTADA.....	85
APÊNDICES	87

RESUMO

Cálcio e boro aliviam a toxidez por H^+ e Al^{3+} e suprimem a indução de guaiacol peroxidase em raízes do cultivar Micro-Tom de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.): possível envolvimento da parede celular

Solos ácidos cobrem cerca de 30% das áreas agricultáveis do mundo. Nestes solos, geralmente ocorrem baixas concentrações de cátions como cálcio e magnésio, enquanto a acidez ($pH < 5,5$) promove a solubilização de Al^{3+} . A exposição de raízes a pH ácido e/ou ao Al^{3+} inibe o crescimento radicular, reduz a viabilidade de células do ápice, promove estresse oxidativo, e pode causar desarranjos na parede celular. Na parede, é provável que tanto o H^+ como o Al^{3+} atuem sobre a pectina, comprometendo a sua estrutura e funcionalidade. Por outro lado, peroxidases classe III (GPOX) parecem desempenhar um papel central nas modificações da parede celular, são induzidas por H^+ e Al^{3+} e algumas isoformas são associadas à pectina. O objetivo deste trabalho foi caracterizar as respostas radiculares da cultivar Micro-Tom de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) à toxidez por H^+ e Al^{3+} e avaliar a capacidade do cálcio e do boro em aliviar esta toxidez com relação à inibição do crescimento radicular, queda na viabilidade celular e alterações na atividade de GPOX. Em raízes expostas a pH 4,0, após 30 min já foi possível observar a redução na viabilidade de células do ápice, avaliada através da absorção de azul de Evans. Observou-se elevação significativa na atividade de GPOX após 2 h de tratamento a pH 4,0. Apesar da defasagem na sua indução em relação à queda na viabilidade celular, a atividade de GPOX parece ser um melhor indicador da ação de H^+ . O uso do inibidor da GPOX (SHAM; ácido salicilhidroxâmico) indicou que estas enzimas desempenham um papel no sentido de impedir maiores danos às células por pH baixo. O cálcio (10 mM) aliviou totalmente a toxidez por H^+ (pH 4,0 e 4,5) e Al^{3+} (10 μM) em relação a crescimento radicular e viabilidade celular. O boro (30 μM) aliviou totalmente a toxidez por H^+ e Al^{3+} em relação a viabilidade celular, mas aliviou apenas parcialmente ou em nada a inibição do crescimento radicular por H^+ ou Al^{3+} , respectivamente. Tanto o cálcio quanto o boro suprimiram totalmente a indução da atividade de GPOX. O cálcio e o boro apresentaram interação positiva sobre o crescimento radicular a pH 5,8 e 4,5, mas não na presença de Al^{3+} e nem em relação à viabilidade celular ou atividade de GPOX. De modo geral, encontrou-se boa correlação entre viabilidade celular e atividade de GPOX. Tomado no seu conjunto, os dados evidenciam um papel importante de GPOX na toxidez por H^+ e Al^{3+} e sugerem que, apesar de distintos, a toxidez por estes íons possivelmente apresentam alguns aspectos e mecanismos em comum. Também corroboram outros trabalhos que evidenciam a ação destes íons sobre a parede celular, em particular a matriz pectica. Estudos futuros deverão examinar se a GPOX que é induzida por H^+ e Al^{3+} está associada à pectina da parede.

Palavras-chave: Acidez; Alumínio; Guaiacol peroxidase; Pectina; Viabilidade celular; Crescimento radicular; SHAM

ABSTRACT

Calcium and boron alleviate H^+ and Al^{3+} toxicity and suppress the induction of guaiacol peroxidase in roots of Micro-Tom cultivar of tomato (*Solanum lycopersicum* L.): possible involvement of the cell wall

Acid soils cover about 30% of the arable land in the world. These soils usually have low concentrations of cations, such as calcium and magnesium, whereas the low pH (pH <5.5) increases the solubility of Al^{3+} . Exposure of roots to low pH and/or Al^{3+} inhibits root growth, reduces cell viability of the root apex, promotes oxidative stress, and can cause rearrangements in the cell wall. It is likely that both H^+ and Al^{3+} act on pectin of the cell wall, affecting its structure and functionality. On the other hand, class III peroxidases (GPOX) appear to play a role in modifications of the cell wall, are induced by H^+ and Al^{3+} and some isoforms are associated with pectin. The aim of this study was to characterize the responses of roots of the Micro-Tom cultivar of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) to the toxicity of H^+ and Al^{3+} and evaluate the ability of calcium and boron to alleviate this toxicity with respect to inhibition of root growth, decrease in cell viability and changes in the activity of GPOX. In roots exposed to pH 4.0, after 30 min it was already possible to observe a decrease in cell viability at the apex, as assessed by the uptake of Evans blue. We observed a significant increase in GPOX activity after 2 h of treatment at pH 4.0. Despite the lag in their induction in relation to the decrease in cell viability, GPOX activity seems to be a better indicator of the action of H^+ . The use of inhibitors of GPOX activity indicates that these enzymes play a role in preventing further damage to cells by low pH. Calcium (10 mM) completely alleviated H^+ (pH 4.0 or 4.5) and Al^{3+} (10 mM) toxicity with respect to root growth and cell viability. Boron (30 mM) completely alleviated H^+ and Al^{3+} toxicity with respect to cell viability, but only partly alleviated or had no effect on the inhibition of root growth by H^+ or Al^{3+} , respectively. Both calcium and boron completely suppressed the induction of GPOX activity. Calcium and boron displayed a positive interactive effect on root growth at pH 5.8 and 4.5, but not in the presence of Al^{3+} and not in relation to cell viability or GPOX activity. In general, good correlations were found between cell viability and GPOX activity. Taken together, the data indicate a significant role of GPOX activity in the toxicity of H^+ and Al^{3+} and suggest that although different, the toxicity of these ions possibly share some common aspects and mechanisms. The data also corroborates other studies that indicate the cell wall as a target of toxicity, particularly the pectic matrix. Further studies should examine whether GPOX activity, which is induced by H^+ and Al^{3+} is associated with pectin in the wall.

Keywords: Acidity; Aluminum; Guaiacol peroxidase; Pectin; Cell viability; Root growth; SHAM

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

GPOX	- guaiacol peroxidase
FDA	- diacetato de fluoresceína
PI	- Iodeto de propídio
pCMB	- p-cloromercuriobenzoato
ROS	- espécies reativas de oxigênio
RG-II	- polímero de carboidratos componente da parede celular primária, ramnogalacturôna II
SHAM	- Ácido salicilhidroxâmico

1 INTRODUÇÃO

Os solos com pH abaixo de 5,5 são considerados ácidos e constituem cerca de 30% das áreas agricultáveis do mundo (UEXKULL; MUTER, 1995). A maior parte destes solos está situada em países da América do Sul, Sudeste Asiático e África Central, nos quais a produção agrícola é à base da economia. Além da acidez, outros problemas relacionados a estes solos é a redução na disponibilidade de cátions como magnésio, cálcio e potássio (MARSCHNER, 1991) e a alta solubilização de alumínio que adquire a forma do íon hexahidratado $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$, também denominado simplesmente de Al^{3+} (VITORELLO; CAPALDI; STEFANUTO, 2005). Estes fatores, em seu conjunto, resultam na redução do crescimento radicular e afeta o desenvolvimento da planta.

A toxicidade pelo alumínio tem sido bastante estudada (HORST; WANG; ETICHA, 2010; KOCHIAN; HOEKENGA; PINEROS, 2004; VITORELLO; CAPALDI; STEFANUTO, 2005) mas ainda é pouco compreendida. Por sua vez, está claro que o pH baixo em si inibe marcadamente o crescimento radicular (KOYAMA; TODA; HARA, 2001; LAGER et al., 2010; YANG et al., 2005), mas este fato parece ser pouco apreciado, pois ainda existem poucos estudos sobre a fitotoxicidade por H^+ e os mecanismos envolvidos são menos conhecidos ainda (VITORELLO; CAPALDI; STEFANUTO, 2005).

Existem algumas características em comum entre a toxicidade por H^+ e Al^{3+} . Sabe-se que tanto o Al^{3+} (MA et al., 2004) quanto o H^+ (KOYAMA; TODA; HARA, 2001; SHABALA; NEWMAN, 1997) afetam principalmente células que estão expandindo, ou seja, onde a parede está sofrendo modificações. No caso do Al, estudos mais detalhados identificaram que as células mais sensíveis se localizam na parte distal da zona de transição do ápice das raízes (SIVAGURU et al., 1999). Outra característica é que a toxicidade de ambos é altamente dependente da força iônica e da presença de Ca^{2+} e, em menor grau, de outros cátions (DELHAIZE; RYAN, 1995; KINRAIDE; RYAN; KOCHIAN, 1992; KOYAMA; TODA; HARA, 2001). Por fim, existem diversas evidências na literatura de que tanto o H^+ quanto o Al^{3+} afetam a parede celular (HORST; WANG; ETICHA, 2010; KOYAMA; TODA; HARA, 2001). Mais recentemente, estas evidências tem sido reveladas por estudos do perfil de expressão de genes induzidas por pH baixo (LAGER et al., 2010) e pelo Al^{3+} (MARON et al., 2008; MATTIELLO et al., 2010).

O Al^{3+} pode se localizar em sítios na parede celular causando desarranjos à parede e afetando assim a sua estabilidade, principalmente sobre a matriz péctica (BIBIKOVA et al., 1998; KOYAMA; TODA; HARA, 2001; MATOH; KOBAYASHI, 1998). Esse efeito pode ser visualizado em pêlos radiculares em crescimento que se rompem ao serem expostos a $\text{pH} < 4,5$ (BIBIKOVA et al., 1998; MONSHAUSEN et al., 2007) enquanto que pêlos que já cessaram o seu crescimento não são afetados. Em sua revisão, HORST et al. (2010) mostram a capacidade de o Al^{3+} interagir com a parede celular alterando e modificando sua composição, tanto na produção de celulose quanto na matriz péctica.

Outras respostas às injúrias causadas pela acidez e pelo Al^{3+} são a peroxidação lipídica e danos à membrana celular (YAMAMOTO; KOBAYASHI; MATSUMOTO, 2001; YIN et al., 2010). Estes são efeitos relacionados com o afrouxamento das ligações da parede celular pela ação de íons H^+ sendo que o Al^{3+} poderá se ligar a estes sítios no apoplasto (MIMMO; MARZADORI; GESSA, 2008). A interação do Al^{3+} com a membrana celular pode causar redução na fluidez desta, o que pode resultar em outros efeitos como a inibição de canais de cálcio (revisto por HORST; WANG; ETICHA, 2010). PAVLOVKIN et al. (2009) demonstraram os efeitos do baixo pH e Al^{3+} sobre o potencial de membrana em *Lotus corniculatus*, onde também foi identificado um efeito dose dependente de Al^{3+} sobre o crescimento radicular em pH 4,0. Observaram também que ocorre maior despolarização nas células do ápice radicular quando submetidas ao Al^{3+} .

A célula vegetal possui mecanismos de resposta perante estresses, dentre eles, a modulação oxidativa da parede que envolve reações com espécies reativas de oxigênio (ROS) (MONSHAUSEN et al., 2007; SAGI; FLUHR, 2006). As ROS são um grupo de moléculas (O_2^- , H_2O_2 , $^{\bullet}\text{OH}$) que possuem a capacidade de abstrair elétrons de outras moléculas, danificando-as, tornando-as instáveis e até mesmo reativas. As ROS possuem funções de defesa biótica e abiótica assim como têm a capacidade de atuar como moléculas sinalizadoras (revisado por APEL; HIRT, 2004). Embora quase sempre as espécies reativas sejam vistas como uma resposta a um estímulo, elas são produzidas normalmente por diferentes vias metabólicas e existe um balanço entre produção e consumo pelos *scavengers*. Quando ocorre perturbação por algum estresse este balanço pode ser comprometido e ocorrer superprodução de espécies reativas (CHEESEMAN, 2007; CHO et al., 2011; İŞERI et al., 2011; MANDAL; DAS; MISHRA, 2011; MINIBAEYVA; GORDON, 2003).

Peroxidases fazem parte de uma classe enzimática possuidora de um grupo heme com a capacidade de utilizar peróxidos na catálise de algumas reações oxidativas. Em plantas, as peroxidases de classe III estão envolvidas em processos fisiológicos ligados à parede celular (PASSARDI; PENEL; DUNAND, 2004; PASSARDI et al., 2004). Diversos trabalhos têm demonstrado que tanto a acidez como o Al^{3+} induz a atividade das peroxidases classe III (MA; GAO; ZHANG, 2012; YAMAMOTO; KOBAYASHI; MATSUMOTO, 2001; ZELINOVÁ et al., 2010). No entanto, ainda não está claro qual o papel destas enzimas na toxidez por estes íons. TAMÁS et al. (2003) encontraram uma correlação positiva entre a atividade de peroxidases e a inibição do crescimento radicular causados por Al^{3+} e propuseram que as peroxidases desempenham algum papel nesta inibição do crescimento radicular. Em trabalho subsequente, este grupo propôs que a inibição do crescimento radicular foi causada pela morte de células resultante da produção de H_2O_2 pelas peroxidases (ŠIMONOVÍČOVÁ et al. 2004).

HOSSAIN et al. (2005) demonstrou que o CaCl_2 alivia os efeitos do Al^{3+} sobre o crescimento radicular e reduz a atividade da peroxidase em trigo. O boro também possui a capacidade aliviar os efeitos do Al^{3+} em raízes de trigo e possui efeito sinérgico quando utilizado em combinação com cloreto de cálcio (HOSSAIN; ASGAR; et al., 2005). Tanto o cálcio como o boro são essenciais na formação e manutenção da parede celular, interagindo com os ácidos galacturônicos da matriz péctica (COSGROVE, 2005). Deve-se mencionar que as peroxidases podem se associar com a fração péctica da parede celular (KUKAVICA et al., 2012). Assim, por influenciar nas propriedades da pectina é provável que tanto o cálcio como o boro possam afetar a atividade destas enzimas.

Dessa forma, analisamos o comportamento do crescimento radicular, viabilidade celular e atividade das peroxidases classe III frente ao pH ácido com e sem a presença de Al^{3+} , sendo estes fatores limitantes para o desenvolvimento agrícola. Avaliamos a atuação do cloreto de cálcio e do boro no alívio das respostas as injúrias das raízes de Micro-Tom através da avaliação da viabilidade celular e modulação oxidativa sobre a parede celular.

2 REVISÃO

2.1 Efeitos da ação dos íons H^+ e Al^{3+} sobre o desenvolvimento radicular

Solos ácidos ocorrem naturalmente seja em função de sua gênese ou devido a fatores naturais de entrada de ácidos nítricos e sulfúricos pela atmosfera ou mesmo por questões antropogênicas. A ação dos prótons sobre o solo eleva os níveis de alumínio na forma de Al^{3+} e do manganês, o que promove toxidez as plantas, assim como altera a disponibilidade de outros minerais, reduzindo a sua absorção (MARSCHNER, 1995). O trabalho de ARNON & JOHNSON (1941) demonstra os efeitos nocivos do pH sobre o desenvolvimento radicular de tomate (*Lycopersicum esculentum*), alface (*Lactuca sativa*) e grama de Bermudas (*Cynodon dactylon*) em diferentes condições de pH, demonstrando que tanto a acidez quanto a alcalinidade no solo interferem no crescimento radicular e na disponibilidade de minerais para nutrição vegetal demonstrando que os efeitos da acidez são mais acentuados que os da alcalinidade.

O crescimento radicular depende, em grande parte, da expansão celular. A região de alongamento celular é o principal sítio de ação deletéria pelo pH ácido, o que causa redução no crescimento radicular (KOYAMA; TODA; HARA, 2001; YIN et al., 2010), esses danos são causados devido à atividade de H^+ . Quando submetida à acidez, a parede celular de toda a raiz estará exposta, levando a membrana e elementos do citoesqueleto a interagir com H^+ do meio, ocasionando alterações estruturais (VITORELLO; CAPALDI; STEFANUTO, 2005).

Foi observado comportamento diferenciado entre fava (*Vicia faba* L.) e milho quanto a resposta do crescimento radicular em diferentes tratamento com pH. O milho apresenta redução linear no crescimento radicular até pH 3,5, enquanto que a fava apresenta uma abrupta redução no crescimento ao abaixar o pH até 5,0 seguida de redução linear até pH 3,5 (YAN; SCHUBERT; MENGEL, 1992), isso mostra que o milho é menos sensível que a fava. Os autores demonstraram ainda que em pH 4,0 ocorre maior respiração e produção de ATP pelas raízes de milho, como reposta a remoção de íons H^+ intracelular, nos primeiros 45 minutos de tratamento. Em *Arabidopsis thaliana* as alterações sobre a parede celular ocorrem nos primeiros 20 minutos do tratamento com pH ácido e Al^{3+} sendo que os primeiros efeitos encontrados foram alterações no efluxo de hidrogênio e nos canais de

potássio, acompanhado pela alteração no potencial de membrana das células (BOSE et al., 2010).

Em *A. thaliana* o baixo pH reduz o crescimento radicular e aumenta o dano celular em raízes que estão se alongando em duas horas de tratamento e a aplicação de CaCl_2 alivia estes efeitos (KOYAMA; TODA; HARA, 2001). A redução no crescimento ocorre provavelmente devido a ação de íons H^+ sobre a parede celular ser o deslocamento de cátions da parede celular, tornando-a mais negativa em sua carga e causando desarranjos. Se a concentração de Ca^{2+} for suficiente para evitar esse deslocamento, temos o alívio da acidez (KINRAIDE, 1998).

Expansinas são proteínas presentes na parede celular que atuam sobre as fibras celulósicas causando o seu afrouxamento, mas sem apresentar atividade hidrolítica (COSGROVE, 2000a). Quando a parede celular de hipocótilo de pepino é testada quanto a sua extensibilidade, o pH ácido causa uma rápida extensão, comparado ao pH fisiológico. Este efeito ocorre devido ao afrouxamento das fibras celulósicas. Quando tratadas termicamente para inativar as expansinas, não ocorre extensão do hipocótilo nem afrouxamento das ligações celulósicas (COSGROVE, 1997a). MCQUEEN-MASON et al. (1992) demonstra que estas expansinas possuem ação em pH inferior a 5,0. Essa ação em ambientes ácidos ocorre devida à extensão ácida da parede celular, permitindo movimentações entre as fibras celulósicas, alterando as ligações não covalentes entre os polímeros, sem degradar ou quebrar a parede celular, permitindo a sua extensão/afrouxamento (COSGROVE, 1997b, 1998; MCQUEEN-MASON; COSGROVE, 1995).

Tanto a acidez como a toxidez por alumínio apresentam algumas semelhanças, como redução do crescimento radicular e redução da viabilidade e ambos ocorrem sobre a zona de alongamento celular (SIVAGURU; HORST, 1998). Os efeitos tóxicos do Al^{3+} vão além destes, sendo capaz de alterar a morfologia celular agindo diretamente sobre o citoesqueleto (SIVAGURU et al., 1999), atuar sobre a membrana plasmática enrijecendo-a e alterando o funcionamento dos canais iônicos (HORST; WANG; ETICHA, 2010), agindo sobre organelas como os microtubulos (KOCHIAN, 1995) e alterando a produção de pectina e o seu grau de metilação (ETICHA; STASS; HORST, 2005; VAN; KURAISHI; SAKURAI, 1994).

Um efeito notável do Al^{3+} à célula vegetal é a capacidade de bloquear os canais de Ca^{2+} e K^+ (HUANG et al., 1996; JONES; KOCHIAN; GILROY, 1998; KAWANO et al., 2004; LIU; LUAN, 2001; RENGEL; ELLIOTT, 1992) e ativar canais

de ânions (KOLLMEIER et al., 2001; RYAN et al., 1997) levando à despolarização da membrana plasmática (BOSE et al., 2010; PAVLOVKIN et al., 2009; SIVAGURU et al., 2003).

Outra ação a ser citada, é a perda na capacidade de a parede celular se alongar, com a ligação do Al^{3+} , ocorre aumento na produção de pectina não metilada (e/ou provoca a sua demetilação) aumentando a carga negativa da parede (ETICHA; STASS; HORST, 2005; VAN; KURAISHI; SAKURAI, 1994). A redução na carga como consequência da demetilação das homogalacturonas da parede celular primária, reduz a força mecânica, em caules de *A. thaliana* (HONGO et al., 2012). A presença do Al^{3+} no apoplasto em contato com a membrana plasmática altera a sua viscosidade e também promove a perda na elasticidade da parede em alongamento, em *Triticum aestivum* L., seja no cultivar sensível ou no resistente (MA et al., 1999, 2004).

Apesar de diversos trabalhos relatarem os efeitos nocivos do Al^{3+} as células vegetais, KINRAIDE (1993) demonstrou que o Al^{3+} em subdoses (inferior a 1 μM) a pH 4,2, é capaz de aumentar o crescimento radicular de *Triticum aestivum* L. quando comparado ao pH 4,2 sem Al^{3+} . Esse fenômeno ocorre pela mesma razão com que o cálcio e outros cátions aliviam o efeito do pH ácido: se ligando aos pontos da parede celular que foram quebrados pelos íons H^+ . Mas esse não é um fenômeno universal e ocorre apenas quando o Al^{3+} encontra-se em dosagem extremamente baixa, o que não deve ser confundido com plantas que são tolerantes a esse metal, como *Brachiaria sp.* (OSAKI; WATANABE; TADANO, 1997).

Além dos efeitos supracitados, a elevação na atividade das peroxidases classe III também ocorre quando plantas são submetidas a pH ácido e Al^{3+} (LAZOF; HOLLAND, 1999; MA; GAO; ZHANG, 2012; MARTINS et al., 2011; ŠIMONOVÍČOVÁ et al., 2004; TAMÁS et al., 2005; XUE; TAO; YANG, 2008). A elevação na atividade desta enzima provoca enrijecimento da parede celular lignificando-a (IIYAMA; LAM; STONE, 1994; MCLUSKY et al., 1999; MINIBAEYVA; GORDON, 2003) provavelmente em resposta a um *burst* oxidativo causado pelas injúrias.

As peroxidases pertencem a uma classe de enzimas que reduzem o H_2O_2 pela oxidação de algum substrato. Dentre estas enzimas, as peroxidases classe III são liberadas para o apoplasto sendo chamadas peroxidases de parede (CESARINO et al., 2012; PASSARDI et al., 2005). Estas peroxidases são

multifuncionais e seu funcionamento sobre a parede ainda não é totalmente elucidada. Paradoxalmente, possuem tanto a capacidade de promover o rompimento de ligações entre os polissacarídeos, afrouxando a parede e facilitando o alongamento celular, como também promovem a oxidação de compostos fenólicos presentes na parede celular lignificando e enrijecendo o tecido (KUKAVICA et al., 2012; PASSARDI; PENEL; DUNAND, 2004).

As peroxidases podem se ancorar a parede através de ligações iônicas ou covalentes ou ainda estar solúveis no apoplasto (QUIROGA et al., 2000), podem ainda interagir com a matriz polissacarídica através de interação de Van der Waals, pontes de hidrogênio ou por interações hidrofóbicas (JAMET et al., 2006). A forma como as peroxidases se ligam a parede celular, parece estar relacionada com a sua ação, pois apresenta diferentes propriedades de acordo com o modo como se ligam, podendo atuar no consumo ou produção de peróxido (KUKAVICA et al., 2012).

2.1.1 O cálcio na parede celular

A parede celular primária é constituída por cerca de 90% de polissacarídeos, que possuem uma porção péctica (20-35% do peso fresco da parede) e outra de hemicelulose (ROSE, 2003). A porção hemicelulósica da parede celular é formada pela ligação de celulose a polissacarídeos a base de glucanos, xilanos e mananos enquanto que a matriz péctica tem sua formação baseada em ácidos galacturônicos (COSGROVE, 2005; SOUZA et al., 2012). A celulose é formada pelo complexo celulose sintase enquanto que a matriz péctica tem formação no complexo de Golgi que será liberada no apoplasto. Essas duas frações irão interagir entre si formando ligações cruzadas entre elas no apoplasto. SOUZA et al. (2012) mostrou que a hemicelulose de cana-de-açúcar é formada por arabinoxilano, ligado tanto a β -glucano como a xiloglucanos. A celulose é formada por ligações β -1, 4-glucano, enquanto a pectina possui ligações α -1, 4- ligadas a ácidos galacturônicos e pequenas partes de ramnose (POPPER; SADLER; FRY, 2003; WILLATS et al., 2001).

O boro participa de ligações cruzadas entre ácidos galacturônicos (RG-II) regulando a porosidade da matriz péctica (COSGROVE, 2005; WILLATS et al., 2001), enquanto o cálcio atua na manutenção da integridade estrutural da parede celular. As ligações covalentes feitas durante a formação da matriz péctica indica que o boro está associado aos resíduos apiosídicos da cadeia RG-II, enquanto que

o cálcio participa do ancoramento da homogalacturonas (COSGROVE, 2005; VINCKEN et al., 2003).

O cálcio (Ca^{2+}) presente no tecido celular vegetal encontra-se em sua maior parte localizado na parede celular (CLARKSON, 1984). Este íon apresenta a capacidade de aliviar os efeitos de redução do crescimento radicular em pH ácido, na presença de metais tóxicos e em ambiente salino (HOSSAIN; OHNO; et al., 2005; SILVA; MORAES; SOUZA, 2011; TIAN et al., 2011; TUNA et al., 2007). Embora o Ca^{2+} possua tais propriedades, são poucos (ou nenhum) os trabalhos que relacionam a redução nos danos com a atividade peroxidase.

Já foi demonstrado que no estresse salino a peroxidase nos tecidos das folhas de milho (*Zea mays* L. cv G.S. 646; Galilee-Seeds, Haifa, Israel) não apresenta alteração quanto a sua atividade após 18 horas de tratamento. Contudo ocorreu elevação na atividade das peroxidases apoplásticas quando as plantas submetidas a estresse salino foram suplementadas com 5 mM de Ca^{2+} (SHORESH; SPIVAK; BERNSTEIN, 2011). Os autores atribuíram esse efeito de elevação na atividade enzimática, ao fato de em estresse salino ocorrer remoção de cátions de cálcio da parede, com a suplementação de Ca^{2+} a solução, irá ocorrer maior complexação do cálcio aos pectatos, permitindo maior ancoramento das peroxidases apoplásticas à parede celular.

Existem três possíveis mecanismos de alívio do Ca^{2+} sobre os efeitos de acidez e toxidez por Al^{3+} (KINRAIDE, 1998). Um deles é pela remoção do cátion tóxico da parede celular pelo Ca^{2+} . Outro é sua ligação ao sítio de onde o cátion foi removido e o outro, é pela interação entre o Ca^{2+} e a parede celular ser mais específicas que as do elemento por ele removido, impedindo a sua ligação.

2.1.2 O boro na parede celular

A influência do boro sobre o crescimento e desenvolvimento radicular é conhecida a longo tempo, como nos trabalhos de ALBERT; WILSON (1961), HOAGLAND; ARNON (1950), JOHNSTON; DORE (1929), ODHNOFF (1957). Assim como o cálcio, o boro está presente principalmente na parede celular (cerca de 97-98% do boro absorvido) (HU; BROWN; LABAVITCH, 1996). O boro complexa-se espontaneamente com compostos da parede com grupo diol na posição *cis* na proporção de até 90% do boro celular. Pela regressão entre a quantificação de boro na parede celular e a quantia de polissacarídeos presente na RG-II, foi demonstrado

que não há formação de dímeros RG-II sem boro e da mesma forma não haverá boro ligado à parede celular sem a formação destes dímeros, isto para 24 espécies de plantas superiores (MATOH; KAWAGUCHI; KOBAYASHI, 1996).

Um dos primeiros trabalhos utilizando boro e Al^{3+} em uma dicotiledônea pertence a STASS, KOTUR e HORST (2007). Os autores demonstraram que os sintomas causados pelo Al^{3+} são semelhantes aos causados pela deficiência de boro, como redução do crescimento radicular, lesões e formação de calose, sendo que ocorre reversão pela adição de 50 μM boro à solução. Efeito esse provável devido ao boro reduzir a carga negativa da parede

A mobilidade do boro no floema da planta é baixa sendo considerado que depois que ocorre a sua complexação a parede celular sua movimentação é restrita a áreas próximas (BROWN; SHELP, 1997; SHELP et al., 1995). YU et al. (2009) avaliou diferentes formas de adicionar o boro para aliviar a toxidez por Al^{3+} em ervilhas (*Pisum sativum*). Ao realizar pré-tratamento com 50 μM de boro dois dias antes de trata-la com Al^{3+} ocorreu redução de aproximadamente metade na absorção de Al^{3+} pela parede celular, indicando que o boro inibe os efeitos nocivos do Al^{3+} evitando que este se ligue e acumule-se na parede celular, devido ao boro ter reduzido às cargas negativas da parede celular.

2.1.3 Cálcio e boro no alívio da toxidez por alumínio

Existe ainda a possibilidade de o cálcio e o boro atuarem sinergicamente no alívio dos efeitos tóxicos causados pelo Al^{3+} . Este efeito provavelmente é devido às interações químicas que ocorrem entre o cálcio e o boro com a parede celular, fato demonstrado quando é feita a quantificação na parede celular de raízes de trigo tratadas com 40 μM de boro e 2500 μM de cloreto de cálcio ser maior que o controle. Esse resultado é mantido ao adicionar Al^{3+} à solução indicando que ocorre redução da interação do Al^{3+} à parede celular (HOSSAIN; ASGAR; et al., 2005).

KOYAMA et al. (2001) trabalharam com diferentes cátions e encontraram que os cátions com maiores valências apresentam melhores efeitos no alívio dos efeitos deletérios provocados pelo baixo pH e que, a combinação de Ca^{2+} e boro apresentou sendo mais efetivo no alívio, indicando que os efeitos deletérios provavelmente ocorrem em função das alterações que ocorrem na matriz péctica.

2.2 O uso do Micro-Tom

MEISSNER (2002) propõem o tomateiro em miniatura, Micro-Tom (*Solanum lycopersicum* L.) como modelo genético devido a suas características de cultivo serem semelhantes ao de *Arabidopsis thaliana*, em especial quanto ao seu tempo de vida completo com produção de sementes de 70 à 90 dias, tamanho do substrato podendo ser de 50 à até 200 mL e facilidade em obter novos mutantes através de cruzamentos. O padrão morfogenético existente no tomateiro, o coloca como um modelo adicional de dicotiledôneas frente a *A. thaliana* (PRATT et al., 1997).

Este cultivar pode crescer com uma densidade de até 1357 plantas.m⁻² e em condições ideais, seus frutos amadurecem em 70 dias após a germinação. Com isso temos milhares de plantas em três ou quatro gerações, facilitando a condução de sítios-secundários de mutações. Estes fatores só veem a contribuir para o uso desta cultivar em estufas (EMMANUEL; LEVY, 2002).

CAMPOS et al. (2010) em uma breve revisão sobre o uso do Micro-Tom como planta modelo demonstram os potenciais que esta cultivar apresenta na descoberta de funções e mecanismos hormonais, levando a possíveis descobertas de interações quanto a respostas. MONTEIRO et al. (2012) realizaram um estudo amplo sobre a caracterização do Micro-Tom e seus mutantes hormonais quanto ao status oxidativo e atividade enzimática relacionada, assim como a caracterização histológica de folhas e raízes.

As sementes utilizadas em nossos experimentos, foram cedidas pelo Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal da ESALQ, sob coordenação do Prof. Dr. Lázaro Eustáquio Pereira Peres.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Este trabalho teve como objetivo a caracterização das respostas radiculares da cultivar Micro-Tom de tomateiro a toxidez por H^+ e Al^{3+} e a avaliação da capacidade do cálcio e do boro em aliviar esta toxidez quanto à inibição do crescimento radicular, queda na viabilidade celular e alterações na atividade das peroxidases classe III.

3.2 Objetivos específicos:

- Determinar curvas de resposta do crescimento radicular em diferentes valores de pH, em função de concentrações variáveis de cálcio e boro;
- Realizar uma análise temporal das variações na viabilidade celular das raízes e da atividade de GPOX em raízes submetidas à acidez;
- Analisar o crescimento radicular, na presença de Al^{3+} e a efetividade do Ca^{2+} e do boro no alívio dos efeitos deletérios;
- Avaliar a viabilidade celular e a modulação da atividade de GPOX em raízes submetidas a diferentes valores de pH, na presença ou não de Al^{3+} e a capacidade do Ca^{2+} e do boro em promover o alívio;
- Avaliar o papel da GPOX na interação da parede celular com o dano por H^+ .

4 MATERIAL E MÉTODOS

Todo o trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), Piracicaba, São Paulo.

4.1 Material vegetal e condução das plântulas

Foi utilizado como modelo experimental a cultivar Micro-Tom de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom) e a desinfestação das sementes foi feita em hipoclorito de sódio comercial a 10% com algumas gotas de detergente, sob agitação por 15 minutos, seguido por três lavagens com água destilada de cinco minutos cada. Após as lavagens, as sementes foram germinadas em água destilada em incubadora com agitação (100 rpm) a 28°C por 48 h no escuro.

Após a germinação, as plântulas com raiz de tamanho uniforme (1-2 cm), foram distribuídas em frascos de erlenmeyer (10 plantas por repetição de cada tratamento) com solução de tratamento (volume final de 30 mL) e aeradas constantemente por uma bomba de diafragma para aquário. Os frascos foram cobertos de modo a ficarem totalmente no escuro. Trabalhando com plantas germinadas há 48 h foi obtido pequena variabilidade no comprimento e crescimento radicular, uma vez que a nutrição destas ocorre principalmente por suas reservas, facilitando a caracterização dos tratamentos (Figura 1).

Figura 1 - Sementes de Micro-Tom após dois dias de germinação, antes de iniciar os tratamentos

4.2 Soluções de tratamento

4.2.1 Solução controle e tamponamento de pH

O maior tempo experimental utilizado foi de 24 h. Desse modo, a solução de tratamento controle consistiu apenas de 1 mM de tampão homopipes (CAS: 202185-84-0) a pH 5,8 e 0,5 mM de CaCl_2 . Além do pH 5,8, foram usados tratamentos a pH 4,0 e 4,5, em solução igual ao do controle. O ajuste do pH de cada solução de tratamento foi feito na solução estoque de homopipes (10 mM) utilizando ácido clorídrico (HCl). Foi demonstrado por BORGIO (2010) que o uso de homopipes não afeta o crescimento de cultura de células de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) BY-2.

4.2.2 Tratamentos com cálcio

Para avaliar os efeitos do Ca^{2+} nas respostas das raízes a pH ácido, após as 48 h de germinação as plântulas foram colocadas nas soluções de tratamento contendo de 0,5 a 20 mM de CaCl_2 a pH 5,8, 4,5 ou 4,0, durante até 24 h.

4.2.3 Tratamentos com boro

Para avaliar os efeitos do boro nas respostas das raízes a pH ácido, as sementes germinadas foram distribuídas nas soluções com diferentes concentrações de boro (0 – 40 μM H_3BO_3) (YU et al., 2009) em 0,5 mM de CaCl_2 nos tratamentos com pH 5,8 ou 4,5 ou 4,0.

4.2.4 Tratamentos com cálcio e boro

Foi verificado se o cálcio e boro, quando utilizando em conjunto, possuem efeito aditivo no alívio dos efeitos deletérios provocados pela acidez e pela toxidez por Al^{3+} . Para isso foi utilizada a concentração de 10 mM de CaCl_2 e 30 μM de boro.

4.2.5 Tratamentos com Al^{3+}

O Al^{3+} foi utilizado na forma de AlCl_3 em solução estoque com pH 4,0, o que garante a não precipitação do alumínio e também que ele se apresenta na forma de Al^{3+} . Nos tratamentos utilizou-se a concentração final de 10 μM , por ser efetivo em reduzir pela metade o crescimento radicular.

4.3 Análise do crescimento radicular

A análise do crescimento radicular foi feita utilizando imagens digitais obtidas com uma câmera fotográfica Sony Cyber-shot DSC-S730 das plântulas antes e após 24 h de tratamento. Foi utilizado o programa ImageJ (ABRÀMOFF; MAGALHÃES; RAM, 2004) (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) e uma régua colocada ao lado das plântulas serviu de escala nas imagens. As medições iniciais e finais do comprimento radicular foram realizadas, e pela diferença entre elas, determinou-se o crescimento radicular. Utilizando 10 plantas por repetição, determinamos a média de crescimento. Foram feitas 3 repetições e calculado a média e o erro padrão entre elas.

Foi calculado o crescimento radicular relativo, onde a referência (100%) para cada pH foi o crescimento em 0,5 mM de CaCl_2 , naquele mesmo pH.

4.4 Análise da viabilidade celular

Após os tratamentos, a viabilidade das células das raízes foi avaliada por dois modos, através da absorção de azul de Evan's pelas células danificadas, ou utilizando iodeto de propídio (CAS: 25535-16-4) e diacetato de fluoresceína (CAS: 596-09-8).

4.4.1 Absorção de azul de Evan's

Para verificar como os tratamentos alteraram a viabilidade celular, foram feitas avaliações da absorção de azul de Evan's. Após o tratamento as raízes foram imersas em 5 mL de azul de Evan's (0,25%: p/v) por 10 minutos, seguido por três lavagens com água destilada de 3 minutos cada. As raízes coradas e lavadas foram observadas em estereoscópio Leica S8 APO equipado com uma câmera digital Leica DFC290 e um módulo de medição LAS Leica Measure (YAMAMOTO; KOBAYASHI; MATSUMOTO, 2001).

Além da avaliação visual, foi feita a quantificação do azul de Evan's absorvido pelas raízes utilizando 0,5 cm do ápice de 10 raízes. Estas foram colocadas em frasconetes de 1,5 mL, podendo ser congeladas com nitrogênio líquido e mantidas a -20°C para posterior análise. A extração do corante absorvido pelas células mortas ou danificadas foi feita adicionando 700 μL de dimetilsulfóxido – DMSO – por uma hora e a leitura foi feita em espectrofotômetro com comprimento de onda de 600 nm,

de acordo com JACYN BAKER e MOCK (1994) e ŠIMONOVÍČOVÁ et al. (2004), com algumas modificações.

4.4.2 Localização de dano celular por fluoresceína e iodeto de propídio

Também foi avaliada a localização do dano celular utilizando iodeto de propídio (PI) e diacetato de fluoresceína (FDA) (CORRALES; POSCHENRIEDER; BARCELÓ, 2008; KOYAMA; TODA; HARA, 2001). Esta análise foi feita preparando uma solução 12 μ M de FDA e 7 μ M de PI, onde as raízes foram imersas e após 3 minutos foram enxaguadas com água deionizada.

O FDA é permeável à membrana e, após entrar em uma célula viável, ocorre a hidrólise dos grupos acetato, pela ação de esterases não específicas, formando a fluoresceína, que absorve luz com comprimento de onda a 475 nm e emite fluorescência verde a 540 nm. A fluorescência foi visualizada utilizando o conjunto de filtros L5 (excitação BP 480/40 nm, espelho dicróico 505 nm e emissão BP 527/30 nm, Leica) no microscópio de fluorescência LEICA DM6000B, e as imagens capturadas com o uso do software LAS AF. O iodeto de propídio atravessa as membranas lesadas e se liga às fitas de DNA e/ou RNA das células danificadas, emitindo fluorescência vermelha no comprimento de onda de 625 nm quando excitado a 530 nm. A fluorescência foi visualizada utilizando o conjunto de filtros N21 (excitação BP 525/60 nm, espelho dicróico 580 nm e emissão LP 590 nm, Leica) (JONES; SENFT, 1985).

4.5 Atividade de peroxidase (GPOX)

As peroxidases classe III atuam na modulação oxidativa da parede e em processos de enrijecimento e afrouxamento desta (PASSARDI; PENEL; DUNAND, 2004; PASSARDI et al., 2005).

Para avaliar a atividade desta classe de enzima foi utilizado como substrato o guaiacol. Por questões históricas e principalmente por este substrato ser comumente utilizado nos ensaios destas peroxidases, na literatura, é comum denominar estas enzimas de guaiacol peroxidases (GPOX). O ensaio de atividade consistiu na utilização de peróxido de hidrogênio, o qual é utilizado pela enzima para oxidar o guaiacol (CAS: 90-05-1), formando um composto de cor âmbar, o tetraguaiacol, que absorve a luz no comprimento de onda de 470 nm (AMAKO; CHEN; ASADA, 1994; DOERGE; DIVI; CHURCHWELL, 1997; MIKA; LU, 2003). A atividade da enzima é

expressa como o consumo de guaiacol por minuto por miligrama de tecido, com estequiometria de quatro moléculas de guaiacol para cada tetraguaiacol formado, foi utilizado o valor do coeficiente de extinção molar de $26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, seguindo os parâmetro do fabricante (Sigma-Aldrich).

As raízes (10 por repetição) foram removidas dos tratamentos e lavadas em água deionizada, e 0,5 cm dos ápices foram cortados e colocados em frasconetes com 50 μM de pCMB (CAS: 59-85-8), que é um inibidor de ascorbato peroxidase, em tampão fosfato (50 mM, pH 7,0) (AMAKO; CHEN; ASADA, 1994). Após cinco minutos de incubação, foi adicionado 1 mM de guaiacol e 2 mM de peróxido de hidrogênio, iniciando a reação. Após 10 minutos de reação foram realizadas as leituras em espectrofotômetro com comprimento de onda de 470 nm.

Foi avaliado se a inibição da atividade das peroxidases classe III pela aplicação de 0,5 mM de ácido salicilhidroxiâmico (SHAM) (DUNAND; CRÈVECOEUR; PENEL, 2007) comprometeu a viabilidade celular, nos tratamentos com pH 5,8, 4,5 e 4,0 com diferentes tempos de exposição.

4.6 Análise estatística

Foi avaliada a normalidade das variáveis pelo teste de Cochran seguido pela análise de variância (ANOVA) com duas ou três variáveis. Foram feitos os testes de Duncan para avaliar as diferenças entre o crescimento radicular nos tratamentos com Al^{3+} . Para as demais variáveis foi utilizado teste de Tukey, inclusive para análise da interação entre cálcio e boro. Foi utilizado o software Statistica 7.0 para as análises estatísticas. As regressões foram feitas utilizando o Excel 2010 e analisadas pelo teste de Durbin-Watson no Statistica 7.0.

5 RESULTADOS

5.1 Efeitos da acidez sobre raízes de Micro-Tom

A exposição de raízes de Micro-Tom a pH 4,0 com 0,5 mM de CaCl_2 promoveu perda na viabilidade no ápice radicular principalmente sobre a zona de alongamento celular, como pode ser observado na Figura 2 utilizando azul de Evan's para identificar as células que foram lesadas. Embora tenhamos encontrado que a exposição das raízes por 6 h a pH 4,0 com 0,5 mM de CaCl_2 promoveu perda na viabilidade, não identificamos com qual rapidez ocorre. Fazendo a quantificação de azul de Evan's absorvido pelas células lesadas utilizando DMSO como solvente, realizamos a quantificação deste corante em diferentes tempos de tratamento.

Figura 2 - Viabilidade celular em ápice radicular de Micro-Tom após 6 h de exposição a pH 4,0 em 0,5 mM de CaCl_2 e 1 mM de homopipes. A avaliação da viabilidade foi feita utilizando azul de Evan's, que penetra nas membranas lesadas e/ou rompidas corando estas células de azul e indica que os danos são mais pronunciados na região de alongamento celular.

A absorção de azul de Evan's foi utilizada como indicativo de dano celular e com 30 minutos de tratamento em pH 4,0, já ocorreram danos suficientes para apresentar uma diferença significativa em relação ao pH 5,8 (Figura 3). As raízes tratadas com pH 4,0 apresentaram elevação crescente na quantificação de azul de Evan's e com 6 h de tratamento a quantidade de azul de Evan's absorvido pelas raízes em pH 4,0 foi 10 vezes maior que em pH 5,8, sendo este o tempo utilizado para avaliação da viabilidade das raízes nos tratamentos.

Figura 3 - Quantificação de azul de Evan's nos ápices radiculares de Micro-Tom expostas a pH 4,0 e 5,8, em solução com 0,5 mM de CaCl_2 e 1 mM de tampão homopipes, em diferentes tempos de tratamento. Barras representam erro padrão (n=20)

Como ocorrem alterações na atividade das peroxidases classe III em raízes expostas a acidez (MARTINS et al., 2011), foram feitas análises da atividade destas enzimas, utilizando o guaiacol como substrato (MÄIKINEN; TENOVUO, 1982). Investigamos com qual velocidade a atividade de guaiacol peroxidase (GPOX) foi induzida pela exposição das raízes à pH 4,0. A análise da atividade GPOX no tempo revelou que a indução em sua atividade ocorre entre 2 e 3 h de tratamento com pH 4,0. A atividade da GPOX se eleva continuamente por até 8 h de tratamento, onde ocorre a maior atividade da enzima, sendo que com 12 horas de tratamento há uma pequena redução em sua atividade (Figura 4). As peroxidases de parede promovem a oxidação de substratos reduzindo o H_2O_2 . Sua função pode ser de enrijecimento da parede celular (MATSUMOTO; MOTODA, 2012) ou de afrouxamento (LISZKAY; KENK; SCHOPFER, 2003). Estes processos ocorrem devido à presença de diferentes isoformas das peroxidases de parede (KUKAVICA et al., 2012).

Figura 4 - Quantificação da atividade de guaiacol peroxidase (GPOX) nos ápices radiculares de Micro-Tom expostas a pH 4,0 e 5,8, em solução com 0,5 mM de CaCl₂ e 1 mM de tampão homopipes, em diferentes tempos de tratamento. Barras representam erro padrão (n=20)

Foi observado que a exposição a pH 4,0 resultou em perda da viabilidade nas raízes de Micro-Tom e que quanto maior o tempo de tratamento, maiores são os danos, utilizando a quantificação de azul de Evan's. De forma semelhante houve indução na atividade GPOX após os danos se iniciarem, isto é, a perda na viabilidade iniciou-se com 30 min de tratamento com pH 4,0 e a atividade GPOX foi induzida após 2 h de tratamento. Fazendo a correlação entre a perda na viabilidade e a atividade GPOX, obtemos uma boa relação entre eles, sendo este um indício de que a indução na atividade GPOX ocorreu em função de alterações na parede celular promovida pela ação dos íons H⁺ que levou a perda na viabilidade (Figura 5). Este é um indício de que a elevação na atividade das peroxidases de parede poderia estar ocorrendo em resposta aos danos celulares evitando que haja maior perda na viabilidade enrijecendo a parede.

Figura 5 - Correlação entre absorção de azul de Evan's e atividade de guaiacol peroxidase (GPOX), representada pela equação $y = 13,712x - 0,1597$ com $R^2 = 0,9592$, nos ápices radiculares de Micro-Tom expostas a pH 4,0 e 5,8, em solução com 0,5 mM de CaCl_2 e 1 mM de tampão homopipes, em diferentes tempos de tratamento. Barras representam erro padrão (n=20)

Buscando conhecer se a atividade GPOX desempenhou algum papel na perda da viabilidade, foi empregado 0,5 mM de ácido salicilhidroxâmico (SHAM), que é um inibidor destas enzimas e feita análise da viabilidade das raízes de Micro-Tom pela absorção de azul de Evan's utilizando as soluções com pH 5,8, 4,5 e 4,0 com 0,5 mM de CaCl_2 . A inibição das peroxidases de parede pelo SHAM em solução com pH 5,8, não promoveu alteração na viabilidade celular por até três horas de tratamento. Em pH 4,5, houve redução na viabilidade das raízes em função da inibição das peroxidases classe III por SHAM já com 1 h de tratamento, sendo 1,7 vezes maior que no controle sem inibição e após 3 h de exposição, o acréscimo na quantificação de azul de Evan's foi de 2,4 vezes. Este efeito foi mais acentuado a pH 4,0, onde a absorção de azul de Evan's na presença de SHAM com apenas uma hora de tratamento apresentou valor 3 vezes maior (Figura 6), sendo o valor semelhante ao encontrado com 3 h de tratamento sem o inibidor.

Figura 6 - Efeito da utilização de 0 (-) ou 0,5 mM de SHAM (+) sobre a viabilidade das raízes de Micro-Tom com diferentes tempos de exposição em solução com 0,5 mM de CaCl_2 e 1 mM de homopípes (pH 5,8 ou 4,5 ou 4,0). A viabilidade foi avaliada através da absorção de azul de Evan's pelas células lesadas nas raízes submetidas aos tratamentos

5.2 O cálcio alivia os efeitos deletérios da acidez e toxidez por alumínio

5.2.1 Efeito do cálcio sobre o crescimento radicular

A inibição do crescimento radicular é um dos primeiros indicativos de que as raízes estão sofrendo algum estresse, seja ele salino, hídrico, por deficiência de algum nutriente ou presença de um metal tóxico, e ocorre principalmente pela inibição do alongamento celular (DÍAZ et al., 2011; İŞERI et al., 2011; KOYAMA; TODA; HARA, 2001; LUKASZEWSKI; BLEVINS, 1996; VAN; KURAISHI; SAKURAI, 1994; YAN; SCHUBERT; MENGEL, 1992).

A Figura 7-A ilustra o crescimento radicular de Micro-Tom após 24 h de tratamento, em função da concentração de CaCl_2 em pH 5,8, 4,5 e 4,0. Observou-se que em pH 5,8 e 4,5 o crescimento radicular foi pouco alterado pelo aumento na concentração de Ca^{2+} . O tratamento com pH 4,0 promove cerca de duas vezes a redução no crescimento radicular. A utilização de Ca^{2+} para aliviar os efeitos deletérios do pH 4,0 sobre o crescimento radicular, mostrou-se efetivo já com apenas 1 mM, melhorando o crescimento em mais de uma vez e meia, porém a

utilização de 10 mM que fez o crescimento radicular igualar-se ao controle (APÊNDICE A). O crescimento radicular relativo, para cada pH, mostra que o tratamento com 10 mM de CaCl_2 em pH 4,0 aumentou cerca de duas vezes e meia o crescimento radicular comparado ao 0,5 mM de CaCl_2 do pH 4,0 (Figura 7-B).

Dessa forma, foi determinado que as concentrações utilizadas para avaliar os demais parâmetros seriam o controle com 0,5 mM e 10 mM de CaCl_2 .

Figura 7 - A – Crescimento radicular e B – CRR (crescimento relativo radicular) de Micro-Tom após 24 h de tratamentos com diferentes concentrações de CaCl_2 e 1 mM de tampão homopipes em pH 5,8, 4,5 e 4,0. Barras representam erro padrão (n=30)

Existem trabalhos que mostram que 5 μM de Al^{3+} já é o suficiente para produzir efeitos tóxicos sobre a raiz suficiente para reduzir o crescimento radicular a 20% (LAZOF; HOLLAND, 1999), porém a avaliação do crescimento radicular de Micro-Tom submetido a diferentes concentração de Al^{3+} revelou que 10 μM promoveu a redução no crescimento em 50% (resultados não apresentados). Foi avaliado o crescimento radicular de plantas de Micro-Tom expostas por 24 h a 10 μM de Al^{3+} e se o Ca^{2+} possui a capacidade de aliviar seus efeitos deletérios.

Em pH 4,5, com 10 μM de Al^{3+} , as raízes de Micro-Tom apresentaram redução no seu crescimento, sendo 1,3 vezes menor que na sua ausência. Em pH 4,0 o crescimento radicular foi duas vezes menor que no controle e a presença de Al^{3+} não provocou redução significativa (Figura 8). Ao suplementar 10 mM de CaCl_2 à solução ácida, ocorreu alívio de seus efeitos deletérios, promovendo o crescimento radicular em 1,3 vezes no pH 4,5 e em quase 2,3 vezes no pH 4,0. Quando avaliado se 10 mM de CaCl_2 aliviaria os efeitos da toxidez causada por Al^{3+} , observa-se que ocorreu inibição dos efeitos negativos da presença de Al^{3+} e promoção do crescimento radicular em duas vezes no pH 4,0 e em 1,8 no pH 4,5.

Figura 8 - Crescimento radicular de Micro-Tom após 24 h de tratamento com 0,5 mM ou com 10 mM de CaCl_2 e 1 mM de tampão homopipes, expostas a 0 ou 10 μM de AlCl_3 . Barras representam erro padrão ($n=30$). Foi realizado o teste de Duncan para os tratamentos. Letras diferentes representam diferença entre os tratamentos ($\alpha=0,05$)

5.2.2 Efeito do cálcio sobre a viabilidade celular

Uma vez que com 6 h de tratamento já ocorrem danos às raízes de Micro-Tom (Figura 3), foi feita a avaliação desta viabilidade nas raízes submetidas aos tratamentos com pH 5,8, 4,5 e 4,0 na presença de 10 μM de Al^{3+} ou em sua ausência. Foi avaliado ainda se 10 mM de CaCl_2 aliviou os efeitos deletérios apresentados. Essas avaliações foram feitas através da análise da absorção de azul de Evan's e pela fluorescência com fluoresceína e iodeto de propídio.

As raízes do controle – pH 5,8 em 0,5 mM de Ca^{2+} - apresentaram-se viáveis e a suplementação de 10 mM de Ca^{2+} não comprometeu a sua viabilidade (Figura 9; Figura 10 e 11 A, D). No tratamento ácido, os danos foram mais visíveis em pH 4,0 (Figura 10 e 11 C) que em pH 4,5 (Figura 10 e 11 B). A quantificação de azul e Evan's em pH 4,5, apresentou valores iguais ao do controle (Figura 9) enquanto que em pH 4,0 essa quantificação foi cinco vezes e meia maior que em pH 5,8 com 0,5 mM de CaCl_2 . A suplementação de 10 mM de CaCl_2 as soluções ácidas, revelou redução nos danos (Figura 10 e 11 E-F) e uma redução na absorção de azul de Evan's de quase 4,3 vezes no pH 4,0. Não houve alteração no pH 4,5.

A presença de 10 μM de Al^{3+} promoveu danos mais severos às raízes de Micro-Tom expostas a pH 4,5 (Figura 10 e 11 M) e elevou a absorção de azul de Evan's em 2,8 vezes. Embora tenha ocorrido ampliação dos danos causados pelo pH 4,0 na presença de Al^{3+} (Figura 10 e 11 N) a quantificação do azul de Evan's absorvido, não apresentou aumento. Quando suplementado 10 mM de CaCl_2 aos tratamentos com 10 μM de Al^{3+} , notou-se redução das injúrias (Figura 10 e 11 O-P) e redução na absorção de azul de Evan's, sendo esta redução em pH 4,5 de 1,3 vezes e no pH 4,0 de 1,7 vezes (Figura 9).

Figura 9 - Quantificação de azul de Evan's nos ápices radiculares de Micro-Tom após 6 h de tratamento com 0,5 mM ou com 10 mM de CaCl_2 e 1 mM de tampão homopipes, expostas a 10 μM de AlCl_3 ou na sua ausência. Barras representam erro padrão ($n=30$). Foi feita análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística ($\alpha=0,05$)

Figura 10 - Viabilidade celular em ápice radicular de Micro-Tom após 6 h de exposição aos tratamentos. A avaliação da viabilidade foi feita utilizando azul de Evan's, que penetra nas membranas lesadas e/ou rompidas corando estas células de azul. A-C=raízes tratadas com 0,5 mM de CaCl_2 e 1 mM de tampão homopipes (respectivamente nos pHs 5,8, 4,5 e 4,0); D-F= raízes tratadas com 10 mM de CaCl_2 e 1 mM de tampão homopipes (respectivamente nos pHs 5,8, 4,5 e 4,0); G-I=raízes tratadas com 0,5 de CaCl_2 , 30 μM de H_3BO_3 e 1 mM de tampão homopipes (respectivamente nos pHs 5,8, 4,5 e 4,0); J-L=raízes tratadas com 10 mM de CaCl_2 , 30 μM de H_3BO_3 e 1 mM de tampão homopipes (respectivamente nos pHs 5,8, 4,5 e 4,0); M-N=raízes tratadas com 0,5 mM de CaCl_2 , 10 μM de Al^{3+} e 1 mM de tampão homopipes (respectivamente nos pHs 5,8, 4,5 e 4,0); O-P= raízes tratadas com 10 mM de CaCl_2 , 10 μM de Al^{3+} e 1 mM de tampão homopipes (respectivamente nos pHs 5,8, 4,5 e 4,0); Q-R=raízes tratadas com 0,5 de CaCl_2 , 30 μM de H_3BO_3 , 10 μM de Al^{3+} e 1 mM de tampão homopipes (respectivamente nos pHs 5,8, 4,5 e 4,0); S-T=raízes tratadas com 10 mM de CaCl_2 , 30 μM de H_3BO_3 , 10 μM de Al^{3+} e 1 mM de tampão homopipes (respectivamente nos pHs 5,8, 4,5 e 4,0). As barras representam 500 μm .

Figura 11 - Viabilidade celular em ápice radicular de Micro-Tom após 6 h de exposição aos tratamentos. A avaliação da viabilidade foi feita utilizando duplo corante fluorescente, diacetato de fluoresceína (FDA), com fluorescência verde indicando células viáveis e iodeto de propídio (PI), com fluorescência vermelha indicando células lesadas. A-C=raízes tratadas com 0,5 mM de CaCl_2 e 1 mM de tampão homopipes (respectivamente nos pHs 5,8, 4,5 e 4,0); D-F= raízes tratadas com 10 mM de CaCl_2 e 1 mM de tampão homopipes (respectivamente nos pHs 5,8, 4,5 e 4,0); G-I=raízes tratadas com 0,5 mM de CaCl_2 , 30 μM de H_3BO_3 e 1 mM de tampão homopipes (respectivamente nos pHs 5,8, 4,5 e 4,0); J-L=raízes tratadas com 10 mM de CaCl_2 , 30 μM de H_3BO_3 e 1 mM de tampão homopipes (respectivamente nos pHs 5,8, 4,5 e 4,0); M-N=raízes tratadas com 0,5 mM de CaCl_2 , 10 μM de Al^{3+} e 1 mM de tampão homopipes (respectivamente nos pHs 5,8, 4,5 e 4,0); O-P= raízes tratadas com 10 mM de CaCl_2 , 10 μM de Al^{3+} e 1 mM de tampão homopipes (respectivamente nos pHs 5,8, 4,5 e 4,0); Q-R=raízes tratadas com 0,5 mM de CaCl_2 , 30 μM de H_3BO_3 , 10 μM de Al^{3+} e 1 mM de tampão homopipes (respectivamente nos pHs 5,8, 4,5 e 4,0); S-T=raízes tratadas com 10 mM de CaCl_2 , 30 μM de H_3BO_3 , 10 μM de Al^{3+} e 1 mM de tampão homopipes (respectivamente nos pHs 5,8, 4,5 e 4,0). As barras representam 250 μm

5.2.3 Efeito do cálcio na atividade de guaiacol peroxidase (GPOX)

Sabendo que com oito horas de tratamentos em pH 4,0 ocorreu o pico de atividade GPOX (Figura 4), foram feitas as análises sobre o comportamento desta enzima nos tratamentos expostos ou não a 10 μM de Al^{3+} e o efeito da suplementação de 10 mM de CaCl_2 . A atividade GPOX se elevou mais de três vezes e meia em pH 4,0 e 1,6 vezes em pH 4,5, comparado ao controle. Quando foi suplementado 10 mM de CaCl_2 as soluções ácidas, ocorreu redução na atividade da GPOX em mais da metade em pH 4,5 e em mais de duas vezes e meia em pH 4,0, fazendo com que os valores fossem iguais ao controle (Figura 12).

A presença de 10 μM de Al^{3+} promoveu elevação de 1,6 vezes na atividade da GPOX em pH 4,5. Embora tenha ocorrido elevação na atividade GPOX em pH 4,0 na presença de 10 μM de Al^{3+} , ela não foi significativa. Da mesma forma que ocorreu redução nos danos causados pela acidez e pela presença de Al^{3+} quando houve suplementação de 10 mM de CaCl_2 , a atividade GPOX também se manteve com valores baixos como no controle, isto é, houve redução de quase 75% na atividade da enzima em pH 4,0 e de 73% em pH 4,5.

Figura 12 - Quantificação na atividade de guaiacol peroxidase (GPOX) nos ápices radiculares de Micro-Tom após 8 h de tratamento na em 0,5 mM ou com 10 mM de CaCl_2 e 1 mM de tampão homopipes, tratadas com 10 μM de AlCl_3 ou na sua ausência. Barras representam erro padrão (n=20). Foi feita análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística ($\alpha=0,05$)

5.2.4 Correlação entre viabilidade celular e atividade de GPOX

Embora os dados obtidos na absorção de azul de Evan's foram com 6 h de exposição e os para GPOX foram com 8 h de exposição, percebe-se uma relação entre eles, ou seja, nos tratamentos onde ocorreram maiores danos, existe maior atividade da enzima, assim foi feita uma análise de correlação entre estes dados (Figura 13). Essa correlação indica que existe aumento na atividade da enzima quando os danos se estendem e que a redução nos danos pelo uso de 10 mM de CaCl_2 reduziu esta atividade (APÊNDICE B).

Figura 13 - Correlação entre atividade guaiacol peroxidase (GPOX) após 8 h de exposição e absorção de azul de Evan's após 6 h de exposição, utilizando os tratamentos com 0,5 mM e 10 mM de CaCl_2 , em pH 5,8, 4,5, e 4,0 na presença de 10 μM de AlCl_3 ou em sua ausência. (n=20)

5.3 O Boro na proteção radicular quando submetida à acidez e alumínio

5.3.1 Efeitos do boro no crescimento radicular

Avaliou-se o crescimento radicular de plantas de Micro-Tom em diferentes concentrações de H_3BO_3 em pH 5,8, 4,5 e 4,0. Embora ocorra uma tendência em estimular o crescimento radicular das plantas expostas a pH 5,8 quando foi suplementado boro, esse acréscimo não foi significativo. Em pH 4,5, a adição de boro a solução, não alterou o crescimento radicular e o manteve com valores próximos ao controle. Os efeitos deletérios causados pelo pH 4,0 reduzem o crescimento radicular em mais de 70%, quanto ao controle e a adição de boro, mesmo em concentrações pequenas (10 μM), mostrou uma melhora no crescimento radicular em 54% mas foi a adição de 30 μM de boro que mostrou ser mais efetiva no alívio dos efeitos deletérios, provendo acréscimo no crescimento radicular em mais de 60% (Figura 14 A). A análise do crescimento relativo das raízes submetidas a pH 4,0, revelou que o aumento no crescimento radicular com 30 μM de boro foi cerca de duas vezes e meia maior que no tratamento sem adição de boro (Figura 14 B), enquanto que nos tratamentos com pH 5,8 e 4,5 as alterações não foram significativas.

Figura 14: A – Crescimento radicular e B – CRR (crescimento relativo radicular) de Micro-Tom após 24 h de tratamentos com diferentes concentrações de H_3BO_3 em pH 5,8, 4,5 e 4,0, em solução com 0,5 mM de CaCl_2 e 1 mM de tampão homopipes. Barras representam erro padrão (n=30)

Observou-se que a adição de 30 μM de boro estimulou o crescimento das raízes expostas a pH 5,8 em 23% e para o pH 4,0 esse estímulo foi de 2,6 vezes, enquanto que no pH 4,5 não houve alteração. A presença de Al^{3+} reduziu o crescimento radicular em cerca de 30%, no tratamento com pH 4,5 e não alterou o crescimento em pH 4,0. O boro aliviou os efeitos da acidez sobre o crescimento

radicular, porém quando analisado a sua capacidade de aliviar o efeito deletério causado pela exposição a Al^{3+} , foi observado que ele não foi efetivo (Figura 15).

Figura 15 - Crescimento radicular de Micro-Tom após 24 h de exposição com 0,5 mM de CaCl_2 e 1 mM de tampão homopipes, com 30 μM ou sem H_3BO_3 , expostas a 10 μM de AlCl_3 ou na sua ausência. Barras representam erro padrão ($n=30$). Foi realizado o teste de Duncan para os tratamentos. Letras diferentes representam diferença entre os tratamentos ($\alpha=0,05$)

5.3.2 Efeitos do boro sobre a viabilidade celular

A análise da viabilidade celular revelou que o boro é efetivo na redução dos danos causado pela acidez, reduzindo a absorção de azul de Evan's em pH 4,0 em 3,2 vezes. A presença de Al^{3+} não apenas reduziu o crescimento radicular em pH 4,5 como também aumentou a severidade dos danos (Figura 9 e 10 M) e aumentou a absorção de azul de Evan's (Figura 16). Os efeitos deletérios causados pela presença de Al^{3+} foram aliviados pela suplementação de 30 μM de boro, reduzindo o azul de Evan's absorvido em 1,7 vezes em pH 4,0 e em 1,3 vezes para pH 4,5 (Figura 16).

Figura 16 - Quantificação de azul de Evan's nos ápices radiculares de Micro-Tom após 6 h de tratamento com de 0,5 mM de CaCl₂ e 1 mM de tampão homopipes, com 30 μM ou sem H₃BO₃, expostas a 10 μM de AlCl₃ ou na sua ausência. Barras representam erro padrão (n=30). Foi feita análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística (α=0,05)

5.3.3 Efeitos do boro sobre a atividade GPOX

O tratamento com pH baixo eleva a atividade GPOX em 1,6 vezes no pH 4,5 em relação ao controle e em 3,5 vezes no pH 4,0. A suplementação de 30 μM de boro revelou que os efeitos causados pelo tratamento ácido foram aliviados, não somente quanto ao dano celular ou o crescimento radicular, mas também reduzindo a atividade GPOX ao nível obtido pelo controle, pH 5,8 com 0,5 mM de CaCl₂, para o pH 4,5 e reduzindo em mais da metade a atividade GPOX em pH 4,0 (Figura 17). Embora a suplementação de 30 μM boro não tenha sido efetiva no alívio dos efeitos deletérios causados pela presença de Al³⁺ quanto ao crescimento radicular, se mostrou efetivo na redução dos danos (Figura 16) e reduzindo a atividade da GPOX pela metade em pH 4,0 e em 1,8 vezes no pH 4,5 (Figura 17).

Figura 17 - Quantificação da atividade de guaiacol peroxidase (GPOX) nos ápices radiculares de Micro-Tom após 8 h de tratamento com 0,5 mM de CaCl_2 e 1 mM de tampão homopipes, com 30 μM ou H_3BO_3 , expostas a 10 μM de AlCl_3 ou na sua ausência. Barras representam erro padrão ($n=20$). Foi feita análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística ($\alpha=0,05$)

5.3.4 Correlação entre viabilidade celular e atividade de GPOX

Após a observação de que existe correlação entre o dano celular e atividade GPOX (Figura 5 e 13), foi investigada se o alívio aos efeitos deletérios causados pela acidez e pela presença de Al^{3+} apresentado pelo boro são correlacionado a atividade GPOX. Nota-se que a redução nos danos leva a redução na atividade da enzima, com valor de $R^2=0,8186$ (Figura 18, APÊNDICE C), mesmo com os dados tendo sido coletados com diferentes tempos de exposição.

Figura 18 - Correlação entre atividade guaiacol peroxidase (GPOX) após 8 h de exposição e absorção de azul de Evan's após 6 h de exposição, utilizando os tratamentos com 0,5 mM CaCl_2 , com 30 μM ou na ausência de H_3BO_3 , em pH 5,8, 4,5, e 4,0 na presença de 10 μM de AlCl_3 ou em sua ausência. (n=20)

5.4 Efeito entre cálcio e boro juntos no alívio à acidez e na toxidez por Al^{3+}

5.4.1 Crescimento radicular

Observou-se que as raízes em pH 5,8 suplementadas com 30 μM de boro, apresentaram maior crescimento que no controle em cerca de 25% enquanto que a suplementação de 10 mM de CaCl_2 não alterou o crescimento. Quando foi suplementado ambos, o crescimento radicular teve um aumento superior a 37%. As raízes tratadas com pH 4,5 não apresentaram alteração significativa no seu crescimento quando suplementado boro ou cálcio, porém quando ambos são utilizados, houve um acréscimo de uma vez e meia no crescimento radicular, comparado ao pH 4,5 apenas com 0,5 mM de CaCl_2 , sendo este valor significativamente superior ao controle. Os efeitos deletérios causados pelo tratamento com pH 4,0, foram aliviados tanto pela suplementação de boro (44% superior) quanto pela suplementação por Ca^{2+} (55% superior) sendo este valor significativamente igual ao controle. A suplementação de cálcio e boro a solução com pH 4,0, embora tenha aliviado os efeitos deletérios, esse alívio não foi superior ao obtido pela suplementação de 10 mM de CaCl_2 individualmente (Figura 19 A).

A presença de Al^{3+} reduziu o crescimento das raízes submetidas a pH 4,5 em em 30%, mas não das submetidas a pH 4,0. A suplementação de 30 μM de boro não apresentou melhora significativa no crescimento, enquanto que quando o cálcio foi utilizado, o crescimento radicular foi duas vezes maior que no tratamento com 0,5 mM de CaCl_2 na presença de Al^{3+} em pH 4,0, esse crescimento foi 2,3 vezes maior quem em pH 4,0 (Figura 19 B).

A suplementação de cálcio e boro a solução ácida com Al^{3+} apresentou uma tendência ao alívio em pH 4,0 (2,6 vezes maior que no tratamento com 0,5 mM de CaCl_2 na presença de Al^{3+}), porém não foi estatisticamente significativa.

Figura 19 - Crescimento radicular de Micro-Tom após 24 h de tratamentos com 0,5 mM ou 10 mM de CaCl_2 e 1 mM de tampão homopipes, com 30 μM ou sem H_3BO_3 , tratadas com 10 μM de AlCl_3 (B) ou na sua ausência (A). Barras representam erro padrão (n=30). Letras diferentes representam diferença entre os tratamentos segundo o teste de Tukey ($\alpha=0,05$)

5.4.2 Viabilidade celular

A análise da absorção de azul de Evan's pelas raízes de Micro-tom tratadas com pH 5,8 mostrou que indiferente a suplementação de boro ou cálcio ou ambos na solução, a viabilidade celular não foi alterada, o mesmo é válido para o pH 4,5. O tratamento com pH 4,0 apresentou uma redução de aproximadamente três vezes na absorção de azul de Evan's quando o boro ou o cálcio foi suplementado. Quando ambos foram suplementados a solução, essa redução foi menor, 2,3 vezes, porém não houve diferença estatística entre os valores obtidos (Figura 9 e 10 S-T; Figura 20). O uso de solução com 10 mM de cloreto de cálcio e 30 μ M de boro para aliviar as injúrias causadas por estes estresses se mostrou mais efetivo no alívio a acidez do que no alívio a toxidez por Al^{3+} . Diferente do obtido no crescimento radicular, a análise quantitativa dos danos celulares, revela que embora ocorra uma melhora significativa, não é diferente da suplementação de cloreto de cálcio ou boro separadamente (Figura 20), principalmente na presença de Al^{3+} .

Figura 20 - Quantificação de azul de Evan's nos ápices radiculares de Micro-Tom após 6 h de tratamentos com 0,5 mM ou 10 mM de CaCl_2 e 1 mM de tampão homopipes, com 30 μ M ou sem H_3BO_3 , expostas a 10 μ M de AlCl_3 ou na sua ausência. Barras representam erro padrão (n=30). Foi

feita análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística ($\alpha=0,05$)

5.4.3 Atividade guaiacol peroxidase

O possível efeito aditivo do uso em conjunto de cloreto de cálcio e boro sobre a atividade GPOX foi avaliado. No tratamento com 10 mM de cloreto de cálcio e 30 μM de boro, houve grande redução na atividade da GPOX em pH 4,0, mas não tanto em pH 4,5 (Figura 21 A). A exposição das raízes a Al^{3+} acarreta num acréscimo a atividade GPOX e o uso de cloreto de cálcio e boro, promove a redução na atividade desta enzima, porém a redução é significativamente menor quando utilizado apenas o CaCl_2 (Figura 21 B).

Figura 21 - Quantificação da atividade de guaiacol peroxidase nos ápices radiculares de Micro-Tom após 24 h de tratamentos com 0,5 mM ou 10 mM de CaCl_2 e 1 mM de tampão homopipes, com 30 μM ou sem H_3BO_3 , expostas a 10 μM de AlCl_3 ou na sua ausência. Barras representam erro padrão ($n=20$). Foi feita análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística ($\alpha=0,05$)

5.4.4 Possível envolvimento das peroxidases classe III e o dano à membrana

Demonstrado um possível envolvimento dos danos à membrana a atividade GPOX, foi feita a correlação entre os dados de viabilidade e atividade GPOX entre todos os tratamentos. Nota-se aumento na atividade GPOX conforme ocorre aumento aos danos a membrana. Essa correlação pode estar deslocada, por termos trabalhados com tempos diferentes, uma vez que foram feitas com a repetição dos dados de viabilidade e GPOX. Ainda assim foi obtido o valor de $R^2=0,6316$ (Figura 22, APÊNDICE D).

Figura 22 - Correlação entre atividade guaiacol peroxidase (GPOX) após 8 h de exposição e absorção de azul de Evan's após 6 h de exposição, utilizando os tratamentos com 0,5 mM e 10 mM de CaCl_2 , com 30 μM ou na ausência de H_3BO_3 , em pH 5,8, 4,5, e 4,0 expostos ou não a 10 μM de AlCl_3 . (n=20)

6 DISCUSSÃO

6.1 Efeitos da acidez sobre as raízes de Micro-Tom e o papel de peroxidases

Foi mostrado que com 30 minutos de tratamento a pH 4,0 já havia ocorrido alterações na viabilidade celular, nos ápices radiculares de Micro-Tom (Figura 3). Esses danos ocorreram principalmente na zona de alongamento celular (Figura 2), à semelhança do que foi demonstrado por outros autores (SIVAGURU; HORST, 1998; KOYAMA; TODA; HARA, 2001). Poucos trabalhos examinaram a questão do tempo requerido para promover injúrias por pH baixo. Esta informação é importante, pois pode auxiliar no entendimento do papel de outros processos induzidos por H^+ no desenvolvimento de sua toxidez. KOYAMA et al. (2001) encontraram resultados semelhantes em termos de perda de viabilidade de células, mas os resultados apresentados foram unicamente qualitativos, através de imagens. Estes autores trataram raízes de *A. thaliana* a um pH mais elevado, de 4,5 e em solução contendo menos cálcio (0,1 mM).

Os efeitos do pH sobre o comportamento do crescimento radicular é conhecido desde trabalhos como de ARNON e JOHNSON (1941). Em solos ácidos, além do pH baixo, a redução no crescimento ocorre por diversos fatores, como redução na disponibilidade de nutrientes, solubilização de metais tóxicos (MARSCHNER, 1995) e alterações na morfologia da parede celular (VITORELLO; HAUG, 1996). Sabe-se também que solos ácidos reduzem o crescimento radicular e promovem danos celulares (KOYAMA; TODA; HARA, 2001; LAGER et al., 2010; YANG et al., 2005).

GRAÇAS (2013) mostrou que para raízes de Micro-Tom, com 13 dias de desenvolvimento, o crescimento radicular é pouco afetado por valores de pH entre 5,8 e 5,4, porém entre os valores de pH de 5,4 a 4,0, há uma redução linear no crescimento radicular de plantas cultivadas com 0,5 mM de $CaCl_2$ e 1 mM de tampão homopipes.

Os danos causados pelo H^+ provavelmente ocorrem pela sua ação sobre a parede celular, embora de uma maneira ainda não totalmente elucidada. Pensa-se que os íons H^+ promovem algum tipo de desarranjo na parede celular (LAGER et al., 2010; MONSHAUSEN et al., 2007), talvez causado pelo deslocamento de cátions pelos íons H^+ (KINRAIDE, 1998). Soluções de baixa força iônica favoreceriam as interações entre os prótons e os polissacarídeos da parede.

Um motivo pelo qual os danos ocorrem na zona de alongamento celular seria devido ao fato das células estarem se expandindo nessa região, de modo que a parede celular em formação teria sua estrutura enfraquecida. Somado a isso, as expansinas que são proteínas de parede com capacidade de afrouxarem a parede primária, possuem sua atividade aumentada em ambiente ácido (COSGROVE, 2000a, 2000b). Assim, em seu conjunto, um maior afrouxamento e enfraquecimento da parede, promovido pelo pH baixo, pode resultar no rompimento de células, como é o caso de pelos radiculares (BIBIKOVA et al., 1998; MONSHAUSEN et al., 2007; SARDINHA, 2010). Em células que expandem de modo difuso, pode ser que ocorram micro-rupturas de difícil detecção, podendo ser esta a razão dos danos celulares serem pronunciados em ambiente ácido e ocorrerem tão rapidamente.

A atividade da GPOX não foi estimulada por pH 4,0 tão rapidamente quanto ocorreu a queda na viabilidade das células do ápice radicular. Observou-se elevação significativa na atividade de GPOX somente após duas horas de tratamento a pH 4,0 (Figura 4), enquanto que os danos celulares foram constatados a partir de 30 min (Figura 3). Apesar da defasagem temporal, encontrou-se uma elevada correlação entre a atividade de GPOX e a perda na viabilidade (Figura 5). Isto sugere que as peroxidases foram induzidas em resposta aos danos celulares

No trabalho de KOYAMA et al. (2001), especulou-se sobre a ação dos íons H^+ alterar a estabilidade da matriz péctica. HONGO et al. (2012) demonstraram que a perda na função da pectina metil esterase (PME), leva a formação de um tecido frouxo. Embora não seja totalmente elucidado como as peroxidases são ancoradas ao apoplasto, existem evidências de que necessitam de uma carga negativa na matriz péctica para que ocorra o seu ancoramento (KUKAVICA et al., 2012). A demetilação do tecido, seja por perda na função da PME ou pela ação de prótons, causa afrouxamento do tecido e aumento na carga negativa da parede, como o ancoramento das peroxidases é dependente da carga da parede, esta pode ser a razão de ocorrer aumento na atividade da GPOX.

As peroxidases classe III são induzidas por diversos fatores de estresse e por diversos metais (JOUILLI; BOUAZIZI; EL FERJANI, 2011). No caso do estresse por pH baixo aqui descrito, as peroxidases podem ter sido induzidas no sentido de contrapor os desarranjos e o possível afrouxamento da parede causado pela ação dos íons H^+ . Neste sentido, é interessante observar que em raízes tratadas a pH 4,5 (0,5 mM de $CaCl_2$) não houve perda de viabilidade de células (Figura 12) mas houve

indução de peroxidases (Figura 12). Considerando isto e a correlação que foi encontrada entre a perda de viabilidade de células da raiz e a atividade de GPOX (Figura 13), foi examinado se a inibição da enzima pelo SHAM (DUNAND; CRÈVECOEUR; PENEL, 2007) resultaria em alguma alteração nos danos celulares causados pelo pH baixo. Observou-se que a exposição das raízes de Micro-Tom a SHAM (0,5 mM) em pH 5,8 não afetou a viabilidade das células após até 3 h de tratamento (Figura 6). Já em pH 4,5, a inibição das peroxidases resultou em uma tendência de elevação da absorção de azul de Evan's (redução na viabilidade celular). Em pH 4,0, o SHAM promoveu grandes aumentos na absorção de azul de Evan's, já com 1 h de tratamento, igualando-se ao valor alcançado em 3 h de exposição ao pH 4,0 sem o inibidor (Figura 6).

Desta forma, as peroxidases desempenham um papel no sentido de evitar maiores danos às células por pH baixo. Além disto, por apresentarem uma resposta que acompanha de perto a absorção de azul de Evan's pelas raízes, são bons indicadores de danos celulares.

6.2 Atuação do cálcio no alívio da acidez e toxidez por alumínio

O crescimento radicular é utilizado como indicativo do comportamento de plantas submetidas a diferentes estresses (AQUEA et al., 2012; CHO et al., 2011; LUKASZEWSKI; BLEVINS, 1996; PAVLOVKIN et al., 2009). Encontramos que a exposição a pH 4,0 com 0,5 mM de CaCl_2 reduziu o crescimento radicular de Micro-Tom, enquanto que em pH 4,5, essa inibição foi menor (Figura 7). O aumento na concentração de Ca^{2+} nas raízes expostas a pH 5,8 e 4,5 alterou pouco ou nada o crescimento radicular, porém, em pH 4,0, uma elevação relativamente pequena na concentração de Ca^{2+} (de 0,5 para 1,0 mM) aliviou substancialmente a inibição do crescimento radicular (Figura 7). Isto foi semelhante ao encontrado por HOSSAIN et al. (2005), que com 2,5 mM de Ca^{2+} aliviou os efeitos do alumínio em raízes de cultivar sensível de trigo. Com 10 mM de CaCl_2 houve alívio total dos efeitos da acidez (pH 4,0) sobre o crescimento radicular (Figura 7; APÊNDICE A). Este efeito sobre o crescimento radicular pode ser reflexo da redução dos danos no ápice radicular (Figura 9 e 10 D-F; Figura 11), mantendo a zona de alongamento celular viável.

O cálcio é um metal da família dos alcalino-terrosos. Está localizado na célula vegetal principalmente na parede celular, interagindo com a matriz péctica da parede

celular primária (BOYER, 2009). Possui a capacidade de aliviar os efeitos de acidez e toxidez por Al^{3+} em plantas como mirtilo (*Vaccinium corymbosum* L.), trigo, feijão (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Talismã) (HOSSAIN; OHNO; et al., 2005; REYES-DÍAZ et al., 2011; SILVA; MORAES; SOUZA, 2011).

O Al^{3+} pode interagir com a parede celular e com a membrana celular. A sua interação com a membrana celular provoca alteração em sua fluidez e permeabilidade (revisto por HORST; WANG; ETICHA, 2010), e por esta razão pode levar a ampliação dos danos celulares (Figura 9 e 10 M-N; Figura 11) e a redução do crescimento radicular. Estes efeitos do Al^{3+} ficaram evidenciados quando as raízes de Micro-Tom foram tratadas com este íon a pH 4,5, na presença de 0,5 mM de CaCl_2 . Na ausência de Al^{3+} , as raízes não apresentaram reduções na viabilidade das células e o crescimento foi pouco inibido, mas na presença do Al^{3+} tanto o crescimento radicular (Figura 8) quanto à viabilidade das células foram significativamente reduzidas (Figura 9 e 10 M; Figura 11). Além disto, a exposição ao Al^{3+} em pH 4,5 aumentou ainda mais a atividade de GPOX (Figura 12). Suportado pelo trabalho de TAMÁS et al. (2003), que trabalhando com cevada sensível e resistente ao Al^{3+} , encontrou que na cultivar sensível em pH 4,5 na presença de alumínio, ocorre elevação na atividade da GPOX em 6 vezes, após 24 h de tratamento e é correlacionado com a redução no crescimento. Os autores ainda discutem sobre a inibição do crescimento radicular ser em função do enrijecimento do tecido provido pela lignificação.

Em pH 4,0, o Al^{3+} não reduziu o crescimento radicular (Figura 8), não aumentou os danos às raízes em termos de absorção de azul de Evan's e também não aumentou a atividade da GPOX em relação ao tratamento a pH 4,0 na ausência de Al^{3+} . Isto provavelmente foi devido ao tratamento a pH 4,0, por si só, já ser bastante severo, de modo que a adição de Al^{3+} não aumentou os efeitos tóxicos sobre as raízes.

Da mesma forma que no tratamento a pH 4,0 o emprego de 10 mM de CaCl_2 reverteu completamente os efeitos tóxicos do Al^{3+} , seja em pH 4,5 ou em pH 4,0, tanto em relação ao crescimento radicular (Figura 8) quanto com relação à diminuição da viabilidade celular (Figura 9 e 10 O-P; Figura 11). A suplementação de 10 mM de CaCl_2 também suprimiu a indução na atividade da GPOX (Figura 12).

Um dos possíveis mecanismos de alívio é pelo fato de o Ca^{2+} interagir eletrostaticamente com a parede celular reduzindo então a sua carga, isso inibe a

interação de outros íons a parede evitando o desarranjo da parede celular. De forma similar, a ligação do Ca^{2+} aos grupos carboxílicos dos ácidos poligacturônicos da pectina impede que outros íons a ela se liguem (KINRAIDE, 1998). Ao interagir com a parede o cálcio reduz sua negatividade da superfície celular e evita que o Al^{3+} se ligue à parede, evitando também seu contato com a membrana o que reduz os danos mantendo íntegra a membrana celular e a parede (HORST; WANG; ETICHA, 2010; SIVAGURU et al., 2003; YAMAMOTO; KOBAYASHI; MATSUMOTO, 2001). Outra explicação para o alívio da toxidez por Al^{3+} , é que o aumento na concentração de Ca^{2+} eleva a força iônica da solução, o que reduz a atividade de Al^{3+} (REYES-DÍAZ et al., 2011). O alívio dos efeitos da acidez e da toxidez por Al^{3+} pode ser explicado também pelo fato de o Ca^{2+} ser responsável pela integridade da parede celular (COSGROVE, 2005; TIAN et al., 2011).

Foi observado que o Ca^{2+} evitou os danos causados pela acidez e pela toxidez do Al^{3+} e impediu a elevação na atividade da GPOX (Figura 13). Como os possíveis mecanismos para alívio da acidez e pela toxidez do Al^{3+} envolvendo Ca^{2+} ocorrem sobre a parede celular e como a GPOX (peroxidase classe III) provavelmente estaria agindo sobre a parede, as evidências apontam para uma possível ação do Ca^{2+} sobre a parede celular para impedir a formação de danos, evitando assim a elevação da atividade enzimática (APÊNDICE B).

6.3 Boro protege as raízes contra a perda na viabilidade e indução da peroxidase

O boro é um elemento essencial para formação da parede celular (BLEVINS; LUKASZEWSKI, 1998; BROWN et al., 2002; BROWN; HU, 1997) e existem diversos estudos sobre os efeitos de sua deficiência (CAKMAK; RÖMHELD, 1997; GUPTA et al., 1985; KOUCHI; KUMAZAWA, 1975, 1976a, 1976b) ou sobre a toxidez quando em excesso (AQUEA et al., 2012; DÍAZ et al., 2011; DURSUN et al., 2010; NABLE; BA; PAULL, 1997; REID et al., 2004). Na matriz péctica o boro se liga aos ácidos urônicos da matriz da parede celular, atua como regulador do tamanho dos poros da parede celular e é responsável pela metil-esterificação dos ácidos galacturônicos (RIDLEY; NEILL; MOHNEN, 2001; WILLATS et al., 2001) enrijecendo a parede e tornando os poros da parede celular menores. Cerca de 97% do boro presente nas células vegetais está localizado na parede celular, interagindo com a matriz péctica da parede celular primária (HU; BROWN, 1994; MATOH; KAWAGUCHI;

KOBAYASHI, 1996). Foi encontrado que o boro possui a capacidade de aliviar a toxidez do Al^{3+} em ervilhas e feijão (STASS; KOTUR; HORST, 2007; YU et al., 2009).

Ao examinar o efeito do boro sobre o crescimento radicular, foi encontrado que este mineral é essencial ao desenvolvimento das raízes de Micro-Tom, uma vez que, a suplementação de 30 μM de boro a solução com pH 5,8 promoveu o crescimento. Em pH 4,5, não ocorreu promoção no crescimento radicular pela presença de boro, mas em pH 4,0, foi encontrado que em doses baixa já existe pequeno alívio nos efeitos da acidez (Figura 14 A). O boro não foi capaz de reverter totalmente os efeitos deletérios da acidez sobre o crescimento radicular, mas em pH 4,0 com 30 μM , ele aumentou o crescimento radicular em cerca de duas vezes e meia, comparado ao pH 4,0 sem boro.

A exposição de raízes de Micro-Tom ao Al^{3+} apresentou redução do crescimento em pH 4,5, mas não em pH 4,0. O uso de 30 μM de boro não foi efetivo no alívio dos efeitos deletérios sobre o crescimento radicular (Figura 15), diferente do encontrado por STASS et al. (2007), com 50 μM de boro aliviou os efeitos negativos sobre o crescimento de raízes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) tratadas com pH 4,5 na presença de 20 μM de Al^{3+} .

Raízes de Micro-Tom expostas a pH 4,0, apresentaram danos sobre a zona de alongamento celular e a suplementação de boro nesta solução, mostrou que o boro evitou as injúrias (Figura 9 e 10 G-I; Figura 16) e manteve íntegra as raízes em pH 4,5. O boro pode impedir a ação dos íons H^+ sobre a parede celular ao interagir com a parede, promovendo a metil-esterificação dos ácidos urônicos da matriz péctica, reduzindo a porosidade da parede e assim reduzindo o influxo de solução para as células (ETICHA; STASS; HORST, 2005). Existe também a explicação de que a redução na carga negativa da parede devido a interação do boro a parede, impedirá que outros íons interagisse à ela. A presença de Al^{3+} reduziu a viabilidade celular nas raízes, quando em pH 4,5 e a suplementação de 30 μM de boro, embora não tenha aliviado os efeitos sobre o crescimento radicular, foi efetivo na proteção aos danos, mesmo em pH 4,0 (Figura 9 e 10 M; Q-R; Figura 16).

A exposição à acidez e ao Al^{3+} apresentou redução na viabilidade e elevação na atividade GPOX. O emprego de 30 μM de boro reduziu o dano celular provocado pela acidez e pelo Al^{3+} e inibiu a elevação da atividade da GPOX nestes tratamentos (Figura 17), mesmo com as raízes exposta a pH 4,0 e ao Al^{3+} não apresentando

alteração na atividade GPOX. Notou-se que em pH 4,5, como as injúrias são menores, a presença de Al^{3+} se torna mais agravante que em pH 4,0, assim, percebeu-se que o aumento na quantificação de azul de Evan's em pH 4,5 na presença de alumínio, é acompanhada pela elevação na atividade GPOX (Figura 16, 17 e 18). A redução nos danos e a supressão da atividade GPOX pode ser devido a capacidade de o boro ligar-se aos ácidos urônicos e reduzir a carga negativa existente na proximidade da superfície das células da parede evitando a ligação de Al^{3+} à parede (ISHII et al., 1999; O'NEILL et al., 2004; STASS; KOTUR; HORST, 2007).

O boro foi efetivo no alívio aos danos pela acidez e por Al^{3+} e em inibir a indução da atividade GPOX nestes tratamentos mesmo com o crescimento radicular não sendo aliviado na presença de Al^{3+} . Uma possível razão para isso é que o boro controla a abertura dos poros da parede celular através da formação de dímeros com RG-II e controla a porosidade da parede, a presença de outros cátions aumentaria a formação destes dímeros (BROWN et al., 2002) e tornaria a parede celular mais rígida, dificultando o alongamento celular. Desse modo observa-se uma efetiva redução no dano às raízes de Micro-Tom nos tratamento com 30 μM de boro e a redução na atividade GPOX (Figura 18; APÊNDICE D), mas não a melhora no crescimento radicular. Como o boro é constituinte da parede celular, este é um indício de que a ação em reduzir os danos à membrana nos tratamentos com acidez e/ou Al^{3+} provido pelo boro é por alterações na parede celular.

6.4 Cálcio e boro suprimem a indução de GPOX mantendo a viabilidade celular

Foi observada uma melhora no crescimento radicular de trigo, submetido a estresse por Al^{3+} utilizando cloreto de cálcio e boro conjuntamente (HOSSAIN; ASGAR; et al., 2005). Sendo ambos constituintes da parede celular vegetal (MATOH; KOBAYASHI, 1998) e atuando no alívio ao estresse por acidez e Al^{3+} , foram avaliadas as alterações no crescimento radicular, na viabilidade radicular e atividade a GPOX.

Foi observado uma promoção no crescimento radicular em Micro-Tom, quando submetidas ao tratamento com 10 mM de CaCl_2 e 30 μM de boro em pH 5,8 e 4,5 (Figura 19 A), demonstrando um efeito aditivo no alívio aos efeitos da acidez sobre o crescimento radicular, tal qual foi encontrado por HOSSAIN et al. (2005).

Não foi encontrado efeito aditivo quando em pH 4,0, embora tenha ocorrido alívio total dos efeitos deletérios. O tratamento com Al^{3+} reduziu o crescimento radicular de Micro-Tom e o emprego de 10 mM de CaCl_2 e 30 μM de boro proveu melhora significativa, porém, diferente dos resultados obtidos por HOSSAIN et al. (2005), não encontramos uma interação positiva no alívio (Figura 19 B). Era esperado que o uso de Ca^{2+} e boro juntos no alívio da toxidez por Al^{3+} provesse maior crescimento radicular que o obtido utilizando estes separados. Ocorreu alívio no crescimento radicular semelhante àquele produzido pela solução apenas com 10 mM e a adição de 30 μM pouco alterou a resposta.

A quantificação de azul de Evan's das raízes de Micro-Tom revelou que a suplementação de Ca^{2+} e boro a solução, reduziu as injúrias causadas pelo tratamento ácido, seja utilizando separadamente ou em conjunto (Figura 20 A). A exposição a pH 4,5 na presença de Al^{3+} revelou que ampliação nos danos e que o emprego de Ca^{2+} e boro, independente ou em conjunto, promoveu uma melhora na viabilidade, embora nota-se tendência na maior viabilidade celular quando são utilizados em conjunto (Figura 20 B).

O tratamento ácido promoveu aumento na atividade GPOX, assim como a presença de Al^{3+} em pH 4,5. A suplementação de Ca^{2+} e/ou boro impediu essa elevação, de modo desigual, uma vez que a utilização de Ca^{2+} sozinho apresentou redução maior que a redução apresentada pela suplementação de boro ou pelo uso de ambos (Figura 21). A redução nas injúrias causadas pela acidez e pela presença de Al^{3+} e a supressão da atividade da GPOX encontrada pela suplementação de Ca^{2+} e boro a solução, apresentou uma correlação, assim os tratamentos que possuem maiores danos, apresentam maior atividade GPOX (Figura 22, APÊNDICE E). Como tanto o cálcio e o boro são constituintes da parede celular, essa correlação apresenta que a elevação na atividade GPOX pode ser um indicativo de dano celular nas primeiras horas de tratamento, em resposta ao possível desarranjo provocado pela ação dos íons H^+ .

Quando foi feita a análise de interação entre Ca^{2+} e boro, foram feitas algumas observações, que embora subjetivas foram de importância, pois refletem um parâmetro de difícil estudo. Notou-se que as raízes tratadas com pH 4,0 possuem grande flexibilidade tornando-se moles. A suplementação de Ca^{2+} ou boro, mantém as raízes com as características normais, como no controle a pH 5,8 com 0,5 mM de CaCl_2 , porém a suplementação de Ca^{2+} e boro a solução, seja em pH

5,8, 4,5 ou 4,0, reduz a flexibilidade das raízes, tornando-as rígidas. Esse fato foi principalmente observado em pH 5,8 e paradoxalmente, essas raízes apresentaram o maior crescimento radicular.

7 CONCLUSÕES

A acidez pode gerar efeitos deletérios sobre raízes de Micro-Tom, em termos de viabilidade celular e de crescimento radicular, de forma tão severa quanto à exposição ao Al^{3+} .

A redução na viabilidade das células do ápice radicular com exposição a pH 4,0 ocorre rapidamente (30 min), sendo o primeiro efeito observável da ação de H^+ sobre as raízes neste valor de pH, e ocorre principalmente na região de alongamento celular.

A guaiacol peroxidase parece desempenhar um papel no sentido de evitar maiores danos às células por pH baixo. Apesar de ter apresentado um atraso na sua indução em relação à queda na viabilidade celular, durante a exposição a pH 4,0, a atividade de peroxidase parece ser um bom indicador da ação de H^+ , provavelmente melhor até do que a viabilidade celular, pois na exposição a pH 4,5 não houve alteração na viabilidade celular, mas houve indução da atividade de GPOX. Ou seja, considerando a hipótese de que a parede celular é o principal alvo da ação de H^+ , a perda de viabilidade seria o resultado final destes danos, enquanto que a atividade de GPOX seria uma resposta às alterações na parede mesmo antes que estas chegassem a comprometer a integridade da célula.

O cálcio aliviou a toxidez pelo H^+ , em particular a pH 4,0, sendo que melhorias substanciais já ocorreram com aumentos relativamente pequenos na concentração Ca^{2+} (de 0,5 a 1 mM). Para a reversão total da toxidez a pH 4,0, foi necessário uma concentração de 10 mM CaCl_2 , o qual também foi suficiente para reverter os efeitos tóxicos do Al^{3+} , tanto em pH 4,5 quanto em pH 4,0. A exposição ao Al^{3+} em pH 4,5 aumentou os danos em relação ao pH 4,5 sem Al^{3+} , em termos de crescimento radicular e redução de viabilidade celular, e também aumentou a atividade de GPOX. O aumento na concentração de Ca^{2+} foi capaz de suprimir a indução de GPOX, tanto pela ação de H^+ quanto pela de Al^{3+} , sendo que encontrou-se boa correlação entre viabilidade celular e atividade de GPOX.

A presença de boro foi exigido para maximizar o crescimento radicular, mesmo a pH 5,8 em experimentos de curta duração. O boro aliviou parcialmente a inibição do crescimento radicular pela exposição a pH 4,0, mas não aliviou a inibição do crescimento radicular pelo Al^{3+} . Por outro lado, o boro impediu reduções na viabilidade de células e suprimiu a indução de GPOX tanto pela exposição a pH 4,0

quanto pelo Al^{3+} em pH 4,5 ou 4,0, o que ficou refletido na boa correlação encontrada entre viabilidade celular e atividade de GPOX. As diferenças entre o cálcio e boro, no alívio da inibição do crescimento radicular por H^+ e Al^{3+} , são provavelmente reflexo dos mecanismos distintos de ação destes dois elementos na parede celular.

O cálcio e o boro apresentaram interação positiva sobre o crescimento radicular a pH 5,8 e 4,5, mas não na presença de Al^{3+} e nem em relação à viabilidade celular ou atividade de GPOX.

Tomado no seu conjunto, os dados evidenciam um papel importante de GPOX na toxidez por H^+ e Al^{3+} e sugerem que, apesar de distintos, a toxidez por estes íons apresentam aspectos e possivelmente alguns mecanismos em comum. Também corroboram outros trabalhos que evidenciam a ação destes íons sobre a parede celular, em particular a matriz péctica.

As alterações causadas pela ação dos íons H^+ e Al^{3+} sobre a parede e a membrana celular assim como as repostas induzidas por tais modificações, poderão ser exploradas em estudos futuros, identificando se a elevação na atividade GPOX ocorre em resposta aos danos e se o alívio destes efeitos, pelo cálcio e boro, é devido a sua localização na parede celular.

REFERÊNCIAS

ABRÀMOFF, M.D.; MAGALHÃES, P.J.; RAM, S.J. Image Processing with ImageJ **Biophotonics International**, Danville, v. 11, n. 7, p. 36-42, 2004.

ALBERT, L.; WILSON, C. Effect of boron on elongation of tomato root tips. **Plant**

AMAKO, K.; CHEN, G.; ASADA, K. Separate Assays Specific for Ascorbate Peroxidase and Guaiacol Peroxidase and for the Chloroplastic and Cytosolic Isozymes of Ascorbate Peroxidase in Plants. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 35, n. 3, p. 497-504, 1994.

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

AQUEA, F.; FEDERICI, F.; MOSCOSO, C.; VEJA, A.; JULLIAN, P.; HASELOFF, J.; ARCE-JOHNSON, A. A molecular framework for the inhibition of Arabidopsis root growth in response to boron toxicity. **Plant, Cell and Environment**, Chichester, v. 35, n. 4, p. 719-734, Apr. 2012.

ARNON, D.; JOHNSON, C. Influence of hydrogen ion concentration on the growth of higher plant under controlled conditions. **Plant Physiology**, Rockville, p. 525-539, 1941.

BIBIKOVA, T.N.; JACOB, T.; DAHSE, I.; GILROY, S. Localized changes in apoplastic and cytoplasmic pH are associated with root hair development in Arabidopsis thaliana. **Development**, Cambridge, v. 125, n. 15, p. 2925-2934, Aug. 1998.

BLEVINS, D.G.; LUKASZEWSKI, K.M. Boron in Plant Structure and Function. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 49, p. 481-500, jun. 1998.

BORGIO, L. **Caracterização e possível papel da modulação oxidativa da parede celular em alterações na sensibilidade de células de tabaco cv. BY-2 a pH baixo durante a retomada do ciclo celular**. 2011. 85p. Tese (Doutorado Biologia na Agricultura e Meio Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

BOSE, J.; BABOURINA, O.; SHABALA, S.; RENGEL, Z. Aluminum-dependent dynamics of ion transport in Arabidopsis: specificity of low pH and aluminum responses. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 139, n. 4, p. 401-412, 1 Aug. 2010.

BOYER, J.S. Cell wall biosynthesis and the molecular mechanism of plant enlargement. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 36, n. 5, p. 383, 2009.

BROWN, P.H.; BELLALLOUI, N.; WIMMER, M.A.; BASSIL, E.S.; RUIZ, J.; HU, H.; PFEFFER, H.; DANNEL, F.; RÖMHELD, V. Boron in Plant Biology. **Plant Biology**, Chichester, v. 4, n. 2, p. 205-223, Mar. 2002.

BROWN, P.H.; SHELPS, B.J. Boron mobility in plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 193, p. 85-101, 1997a.

BROWN, P.; HU, H. Does boron play only a structural role in the growing tissues of higher plants? **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 196, p. 211-215, 1997b.

CAKMAK, I.; RÖMHELD, V. Boron deficiency-induced impairments of cellular functions in plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 193, p. 71-83, 1997.

CAMPOS, M.L.; CARVALHO, R.F.; BENEDITO, V.A.; PERES, L.E.P. Small and remarkable: The Micro-tom model system as a tool to discover novel hormonal functions and interactions. **Plant Signaling & Behavior**, Austin, v. 5, n. 3, p. 267-270, 2010.

CESARINO, I.; ARAÚJO, P.; LEME, A.F.P.; CRESTE, S.; MAZZAFERA, P. Suspension cell culture as a tool for the characterization of class III peroxidases in sugarcane. **Plant Physiology and Biochemistry**, Cedex, v. 62C, p. 1-10, 6 Nov. 2012.

CHEESEMAN, J.M. Hydrogen Peroxide and Plant Stress : A Challenging Relationship. **Plant Stress**, Middlesex, v. 1, n. 1, p. 4-15, 2007.

CHO, S.-C.; CHAO, Y.-Y.; HONG, C.-Y.; KAO, C.H. The role of hydrogen peroxide in cadmium-inhibited root growth of rice seedlings. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 66, n. 1, p. 27-35, 16 Sept. 2011.

CLARKSON, D.T. Calcium transport between tissues and its distribution in the plant. **Plant, Cell and Environment**, Chichester, v. 7, p. 449-456, 1984.

CORRALES, I.; POSCHENRIEDER, C.; BARCELÓ, J. Boron-induced amelioration of aluminium toxicity in a monocot and a dicot species. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 165, n. 5, p. 504-513, Jan. 2008.

COSGROVE, D.J. Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 13, p. 171-201, jan. 1997a.

COSGROVE, D.J. Relaxation in a high-stress environment: the molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. **The Plant Cell**, Rockville, v. 9, n. 7, p. 1031-1041, Jul. 1997b.

COSGROVE, D.J. Update on Cell Growth Cell Wall Loosening by Expansins. **Plant Physiology**, Rockville, v. 118, p. 333-339, 1998.

COSGROVE, D.J. Expansive growth of plant cell walls. **Plant Physiology and Biochemistry**, Cedex, v. 38, n. 1/2, p. 109-124, 2000a.

COSGROVE, D.J. Loosening of plant cell walls by expansins. **Nature**, London, v. 407, n. 6802, p. 321-326, 21 Sept. 2000b.

COSGROVE, D.J. Growth of the plant cell wall. **Nature reviews**, London, v. 6, n. 11, p. 850-861, Nov. 2005.

DELHAIZE, E.; RYAN, P.R. Aluminum Toxicity and Tolerance in Plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 107, n. 2, p. 315-321, Febv. 1995.

DÍAZ, M.; BASTÍAS, E.; PACHECO, P.; TAPIA, L.; MARTÍNEZ-BELLESTA, M.C.; CARVAJAL, M.; Characterization of the Physiological Response of the Highly-Tolerant Tomato Cv. "Poncho Negro" To Salinity and Excess Boron. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 34, n. 9, p. 1254-1267, Jun. 2011.

DOERGE, D.R.; DIVI, R.L.; CHURCHWELL, M.I. Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases. **Analytical Biochemistry**, Philadelphia, v. 250, n. 1, p. 10-7, 15 Jul. 1997.

DUNAND, C.; CRÈVECOEUR, M.; PENEL, C. Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in *Arabidopsis* root and their influence on root development: possible interaction with peroxidases. **The New Phytologist**, Oxford, v. 174, n. 2, p. 332-341, Jan. 2007.

DURSUN, A.; TURAN, M.; EKINCI, M.; GUNES, A.; ATAOGU, N.; ESRINGU, A.; YILDIRIM, E. Effects of Boron Fertilizer on Tomato, Pepper, and Cucumber Yields and Chemical Composition. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, Philadelphia, v. 41, n. 13, p. 1576-1593, 30 Jun. 2010.

EMMANUEL, E.; LEVY, A.A. Tomato mutants as tools for functional genomics. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 5, n. 2, p. 112-117, Apr. 2002.

ETICHA, D.; STASS, A.; HORST, W.J. Cell-wall pectin and its degree of methylation in the maize root-apex : significance for genotypic differences in aluminium resistance. **Plant, Cell and Environment**, Chichester, v. 28, p. 1410-1420, 2005.

GRAÇAS, J.P. **Alívio do estresse por baixo pH na raiz do cultivar Micro-Tom de tomateiro via exposição gradual ou tratamento hipo-osmótico prévio: possível papel de modificações na parede celular**. 2013. 95p. (Mestrado Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agronomia "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013

GUPTA, U.C., JAM, Y.W., CAMPBELL, C.A., LEYSHON, A.J., NICHOLAICHUCK, W. Boron toxicity and deficiency: a review. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, v. 65, n. 3, p. 381-409, 1985.

HOAGLAND, D.; ARNON, D. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment Station**, California, circular 347. 1950.

HONGO, S.; SATOO, K.; YOKOYAMA, R.; NISHITANI, K. Demethylesterification of the primary wall by PECTIN METHYLESTERASE35 provides mechanical support to the *Arabidopsis* stem. **The Plant Cell**, Rockville, v. 24, p. 2624-2634, Jun. 2012.

HORST, W.J.; WANG, Y.; ETICHA, D. The role of the root apoplast in aluminium-induced inhibition of root elongation and in aluminium resistance of plants: a review. **Annals of Botany**, Oxford, v. 106, n. 1, p. 185-197, Jul. 2010.

HOSSAIN, A.K.M.; OHNO, T.; KOYAMA, H.; HARA, T. Effect of Enhanced Calcium Supply on Aluminum Toxicity in Relation to Cell Wall Properties in the Root Apex of Two Wheat Cultivars Differing in Aluminum Resistance. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 276, n. 1/2, p. 193-204, Oct. 2005.

HOSSAIN, A.K.M.; ASGAR, M.A.; HOSSAIN, M.A.; TOSAKI, T.; KOYAMA, H.; HARA, T. Boron-Calcium Synergically Alleviates Aluminum Toxicity in Wheat Plants (*Triticum aestivum* L.). **Soil Science and Plant Nutrition**, Singapore, v. 51, n. 1, p. 43-49, Feb. 2005.

HU, H.; BROWN, P.H. Localization of Boron in Cell Walls of Squash and Tobacco and Its Association with Pectin (Evidence for a Structural Role of Boron in the Cell Wall). **Plant Physiology**, Rockville, v. 105, n. 2, p. 681-689, Jun. 1994.

HU, H.; BROWN, P.H.; LABAVITCH, J.M. Species variability in boron requirement is correlated with cell wall pectin. **Journal Of Experimental Botany**, Oxford, v. 47, n. 295, p. 227-232, 1996.

HUANG, J.W.; PELLET, D.M.; PAPERNIK, L.A.; KOCHIAN, L.V. Aluminum Interactions with Voltage-Dependent Calcium Transport in Plasma Membrane Vesicles Isolated from Roots of Aluminum-Sensitive and -Resistant Wheat Cultivars. **Plant Physiology**, Rockville, v. 110, n. 2, p. 561-569, Feb. 1996.

IYAMA, K.; LAM, T.; STONE, B.A. Covalent Cross-Links in the Cell Wall. **Plant Physiology**, Rockville, v. 104, n. 2, p. 315-320, Feb. 1994.

IKEGAWA, H.; YAMAMOTO, Y.; MATSUMOTO, H. Responses to aluminium of suspension-cultured tobacco cells in a simple calcium solution. **Soil Science and Plant Nutrition**, Singapore, v. 46, n. 2, p. 503-514, 2000.

İŞERİ, Ö.D.KÖRPE, D.A.; YURTCU, E.; SAHIN, F.I.; HABERAL, M. Copper-induced oxidative damage, antioxidant response and genotoxicity in *Lycopersicum esculentum* Mill. and *Cucumis sativus* L. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 30, n. 9, p. 1713-1721, Sept. 2011.

ISHII, T.; MATSUNAGA, T.; PELLERIN, P.; O'NEILL, M.A.; DARVILL, A.; ALBERSHEIN, P. The Plant Cell Wall Polysaccharide Rhamnogalacturonan II Self-assembles into a Covalently Cross-linked Dimer. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 274, n. 19, p. 13098-13104, 1999.

JACYN B., C.; MOCK, N.M. An improved method for monitoring cell death in cell suspension and leaf disc assays using evans blue. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 39, n. 1, p. 7-12, Oct. 1994.

JAMET, E., CANUT, H., BOUDART, G., PONT-LEZICA, R.F. Cell wall proteins: a new insight through proteomics. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 11, p. 33–39. 2006.

JOHNSTON, E.S.; DORE, W. The influence of boron on the chemical composition and growth of the tomato plant. **Plant Physiology**, Rockville, v. 4, n. 1, p. 31-62, 1929.

JONES, D.L.; KOCHIAN, L.V; GILROY, S. Aluminum Induces a Decrease in Cytosolic Calcium Concentration in BY-2 Tobacco Cell Cultures 1. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, p. 81-89, 1998.

JONES, K.H.; SENFT, J.A. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, Thousand Oaks, v. 33, n. 1, p. 77-79, 1 Jan. 1985.

JOUILI, H.; BOUAZIZI, H.; EL FERJANI, E. Plant peroxidases: biomarkers of metallic stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 33, n. 6, p. 2075-2082, 18 May. 2011.

KAWANO, T.; KADONO, T.; FUMOTO, K.; LAPEYRIE, F.; KUSE, M.; ISOBE, M.; FURUICHI, T.; MUTO, S. Aluminum as a specific inhibitor of plant TPC1 Ca^{2+} channels. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Maryland Heights, v. 324, n. 1, p. 40-45, 5 Nov. 2004.

KINRAIDE, T. Three mechanisms for the calcium alleviation of mineral toxicities. **Plant Physiology**, Rockville, v. 118, n. 2, p. 513-520, Oct. 1998.

KINRAIDE, T.B. Aluminum enhancement of plant growth in acid rooting media. A case of reciprocal alleviation of toxicity by two toxic cations. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 4, n. 88, p. 619-625, 1993.

KINRAIDE, T.B.; RYAN, P.R.; KOCHIAN, L.V. Interactive effects of Al, H^+ , and other cations on root elongation considered in terms of cell-surface electrical potential. **Plant physiology**, v. 99, n. 4, p. 1461-8, ago. 1992.

KOCHIAN, L. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 46, p. 237-260, 1995.

KOCHIAN, L.V; HOEKENGA, O.A; PINEROS, M.A. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 459-93, Jan. 2004.

KOLLMEIER, M.; DIETRICH, P.; BAUER, C.S.; HORST, W.J.; HEDRICH, R. Aluminum activates a citrate-permeable anion channel in the aluminum-sensitive zone of the maize root apex. A comparison between an aluminum- sensitive and an aluminum-resistant cultivar. **Plant Physiology**, Rockville, v. 126, n. 1, p. 397-410, May 2001.

KOUCHI, H.; KUMAZAWA, K. Anatomical responses of root tips to boron deficiency. II. Effect of boron deficiency on the cellular growth and development in root tips. **Soil Science and Plant Nutrition**, Singapore, v. 21, n. 2, p. 137-150, 1975.

KOUCHI, H.; KUMAZAWA, K. Anatomical responses of root tips to boron deficiency. I. Effects of boron deficiency on elongation of root tips and their morphological characteristics. **Soil Science and Plant Nutrition**, Singapore, v. 21, n. 1, p. 21-28, 1976a.

KOUCHI, H.; KUMAZAWA, K. Anatomical responses of root tips to boron deficiency. III. Effect of boron deficiency on sub-cellular structure of root tips, particularly on morphology of cell wall and its related organelles. **Soil Science and Plant Nutrition**, Singapore, v. 22, n. 1, p. 53-71, 1976b.

KOYAMA, H.; TODA, T.; HARA, T. Brief exposure to low-pH stress causes irreversible damage to the growing root in *Arabidopsis thaliana*: pectin-Ca interaction may play an important role in proton rhizotoxicity. **Journal Of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 355, p. 361-8, Feb. 2001.

KUKAVICA, B.M.; VEIJOVIC-JOOVANOVIC, S.D.; MENCKHOFF, L.; LÜTHJE, S. Cell wall-bound cationic and anionic class III isoperoxidases of pea root: biochemical characterization and function in root growth. **Journal Of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, n. 12, p. 4631-4645, Jul. 2012.

LAGER, I.; ANDRÉASSON, O.; DUNBAR, T.L.; ANDREASSOMN, E.; ESCOBAR, M.A.; RASMUSSEN, A.G. Changes in external pH rapidly alter plant gene expression and modulate auxin and elicitor responses. **Plant, Cell and Environment**, Chichester, v. 33, p. 1513-1528, 2010.

LAZOF, D.B.; HOLLAND, M.J. Evaluation of the aluminum-induced root growth inhibition in isolation from low pH effects in *Glycine max*, *Pisum sativum* and *Phaseolus vulgaris*. **Australian Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v. 26, p. 147-157, 1999.

LENOBLE, M.; BLEVINS, D.; MILES, R. Prevention of aluminium toxicity with supplemental boron. II. Stimulation of root growth in an acidic, high- $\bullet$ aluminium subsoil. **Plant, Cell and Environment**, Chichester, v. 19, p. 1143-1148, 1996.

LISZKAY, A.; KENK, B.; SCHOPFER, P. Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. **Planta**, Heidelberg, v. 217, n. 4, p. 658-667, ago. 2003.

LIU, K.; LUAN, S. Internal aluminum block of plant inward K(+) channels. **The Plant Cell**, Rockville, v. 13, n. 6, p. 1453-65, Jun. 2001.

LUKASZEWSKI, K.M.; BLEVINS, D.G. Root Growth Inhibition in Boron-Deficient or Aluminum-Stressed Squash May Be a Result of Impaired Ascorbate Metabolism. **Plant Physiology**, Rockville, v. 112, n. 3, p. 1135-1140, Nov. 1996.

MA, B.; GAO, L.; ZHANG, H. Aluminum-induced oxidative stress and changes in antioxidant defenses in the roots of rice varieties differing in Al tolerance. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 31, p. 687-696, 2012.

MA, J.F.; YAMAMOTO, R.; NEVINS, D.J.; MATSUMOTO, H.; BROWN, P.H. Al Binding in the Epidermis Cell Wall Inhibits Cell Elongation of Okra Hypocotyl. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 40, n. 5, p. 549-556, 1 Jan. 1999.

MA, J.F.; SHEN, R.; NAGAO, S.; TANIMOTO, E. Aluminum targets elongating cells by reducing cell wall extensibility in wheat roots. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 45, n. 5, p. 583-589, May 2004.

MÄIKINEN, K.K.; TENOVUO, J. Observations on the Use of Guaiacol and 2,2'-Azino-di (3-Acid) as Peroxidase Substrates. **Analytical Biochemistry**, Philadelphia, v. 108, p. 100-108, 1982.

MANDAL, S.; DAS, R.K.; MISHRA, S. Differential occurrence of oxidative burst and antioxidative mechanism in compatible and incompatible interactions of *Solanum lycopersicum* and *Ralstonia solanacearum*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Cedex, v. 49, n. 2, p. 117-123, Feb.. 2011.

MARON, L.G.; KIRST, M.; MAO, C.; MILNER, M.J.; MENOSSI, M.; KOCHIAN, L.V. Transcriptional profiling of aluminum toxicity and tolerance responses in maize roots. **The New Phytologist**, Oxford, v. 179, n. 1, p. 116-128, Jan. 2008.

MARSCHNER, H. Mechanisms of adaptation of plants to acid soils. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 134, p. 1-20, 1991.

MARSCHNER, H. **Mineral Nutrition of Higher Plants**. 2. ed. London. Academic Press, 1995. 889p.

MARTINS, N.; GONÇALVES, N.; PALMA, T.; ROMANO, A. The influence of low pH on in vitro growth and biochemical parameters of *Plantago almogravensis* and *P. algarbiensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 107, n. 1, p. 113-121, May,. 2011.

MATOH, T.; KAWAGUCHI, S.; KOBAYASHI, M. Ubiquity of a Borate-Rhamnogalacturonan II Complex in the Cell Walls of Higher Plants. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 37, n. 5, p. 636-640, Jul.1996.

MATOH, T.; KOBAYASHI, M. Boron and Calcium, Essential Inorganic Constituents of Pectic Polysaccharides in Higher Plant Cell Walls. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 111, p. 179-190, 1998.

MATSUMOTO, H.; MOTODA, H. Aluminum toxicity recovery processes in root apices. Possible association with oxidative stress. **Plant Science**, Shannon, v. 185-186, p. 1-8, April 2012.

MATTIELLO, L.; KIRST, M.; DA SILVA, F.; R.; JORGE, R.A.; MENOSSE, M. Transcriptional profile of maize roots under acid soil growth. **BMC Plant Biology**, London, v. 10, p. 196, Jan. 2010.

MCLUSKY, S.R.; BENNETT, M.H.; BEALE, M.H.; LEWIS, M.J.; GASKIN, P.; MANSFIELD, J.W. Cell wall alterations and localized accumulation of feruloyl-3-methoxytyramine in onion epidermis at sites of attempted penetration by *Botrytis allii* are associated with actin polarisation, peroxidase activity and suppression of flavonoid biosynthesis. **The Plant Journal**, Oxford, v. 17, n. 5, p. 523-534, 1999.

MCQUEEN-MASON, S.; COSGROVE, D.J. Expansin Mode of Action on Cell Walls. **Plant Physiology**, Rockville, v. 107, p. 87-100, 1995.

MCQUEEN-MASON, S.; DURACHKO, D. M.; COSGROVE, D. J. Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 4, p. 1425-1433, Nov. 1992.

MEISSNER, R. A new model system for tomato genetics. **The Plant Journal**, Oxford, v. 12, n. 6, p. 1465-1472, 2002.

MIKA, A.; LU, S. Properties of Guaiacol Peroxidase Activities Isolated from Corn Root Plasma Membranes. **Plant Physiology**, Rockville, v. 132, n. July, p. 1489-1498, 2003.

MIMMO, T.; MARZADORI, C.; GESSA, C E. Does the degree of pectin esterification influence aluminium sorption by the root apoplast? **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 314, n. 1/2, p. 159-168, July 2008.

MINIBAEYVA, F.V; GORDON, L.K. Superoxide Production and the Activity of Extracellular Peroxidase in Plant Tissues under Stress Conditions. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v. 50, n. 3, p. 459-464, 2003.

MONSHAUSEN, G.B.; BIBIKOVA, T.N.; MESSERLI, M.A.; GILRY, S. Oscillations in extracellular pH and reactive oxygen species modulate tip growth of *Arabidopsis* root hairs. **Proceedings National Academy of Sciences**, Washington, v. 104, n. 52, p. 20996-1001, Dec.. 2007.

MONTEIRO, C.C.; ROLÃO, M.B.; FRNACO, M.R.; PETERS, L.P; CIA, M.C.; CAPALDI, F.R.; CARVALHO, R.F.; GRATÃO, P.L.; ROSSI, M.; MATINELLI, A.P.; PERES, L.E.P. AZEVEDO, R.A. Biochemical and histological characterization of tomato mutants. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 2, p. 573-585, Jun. 2012.

NABLE, R.O.; BA, G.S.; PAULL, J.G. Boron toxicity. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 193, p. 181-198, 1997.

O'NEILL, M.A.; ISHII, T.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.G. Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 109-139, Jan. 2004.

ODHNOFF, C. Boron Deficiency and Growth. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 10, n. 5, p. 984-1000, Dec.. 1957.

OSAKI, M.; WATANABE, T.; TADANO, T. Beneficial effect of aluminum on growth of plants adapted to low pH soils. **Soil Science and Plant Nutrition**, Singapore, v. 43, n. 3, p. 551-563, 1997.

PASSARDI, F.; LONGET, D.; PENEL, C.; DUNAND, C. The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. **Phytochemistry**, Kidlington, v. 65, n. 13, p. 1879-1893, jul. 2004.

PASSARDI, F.; COSIO, C.; PENEL, C.; DUNAND, C. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 24, n. 5, p. 255-265, Jul. 2005.

PASSARDI, F.; PENEL, C.; DUNAND, C. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 9, n. 11, p. 534-540, Nov. 2004.

PAVLOVKIN, J.; PAL'OVE-BALANG, P.; KOLAROVIC, L.; ZELINOVÁ, V. Growth and functional responses of different cultivars of *Lotus corniculatus* to aluminum and low pH stress. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 166, n. 14, p. 1479-1487, 15 Sept. 2009.

POPPER, Z.A.; SADLER, I.H.; FRY, S.C. α -d-Glucuronosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-l-galactose, an unusual disaccharide from polysaccharides of the hornwort *Anthoceros caucasicus*. **Phytochemistry**, Kidlington, v. 64, n. 1, p. 325-335, Sept. 2003.

PRATT, L.H.; CORDONNIER-PRATT, M.-M.; KELMENSEN, P.M.; LAZAROVA, G.I.; KUBOTA, T.; ALBA, R.M. The phytochrome gene family in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **Plant, Cell and Environment**, Chichester, v. 20, n. 6, p. 672-677, Jun 1997.

QUIROGA, M., DE FORCHETTI, S.M., TALEISNIK, E., TIGIER, H.A. Tomato root peroxidase isoforms: kinetic studies of the coniferylalcohol peroxidase activity, immunological properties and role in salt stress. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 158, p. 1007-1013. 2001.

REID, R.J.; HAYES, J.E.; STANGOULIS, J.C.R.; GRAHAM, R.D. A critical analysis of the causes of boron toxicity in plants. **Plant, Cell and Environment**, Chichester, v. 27, n. 11, p. 1405-1414, Oct. 2004.

RENGEL, Z.; ELLIOTT, D.C. Mechanism of Aluminum Inhibition of Net $^{45}\text{Ca}^{2+}$ Uptake by *Amaranthus* Protoplasts. **Plant Physiology**, Rockville, v. 98, n. 2, p. 632-638, Feb. 1992.

REYES-DÍAZ, M.; MERIÑO-GERGICHEVICH, C.; ALARCÓN, E.; ALBERDI, M.; HORST, W.J. Calcium sulfate ameliorates the effect of aluminum toxicity differentially in genotypes of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Valdivia, v. 11, n. 4, p. 59-78, 2011.

RIDLEY, B.L.; NEILL, M.A.O.; MOHNEN, D. Pectin s: structure, biosynthesis and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, Kidlington, v. 57, p. 929-967, 2001.

ROSE, J.K.C. **The Plant Cell Wall**. Oxford: John Wiley, 2003. 400p.

RYAN, P.R.; SKERRETT, M.; FINDLAY, G.P.; DELHAIZE, E.; TYERMAN, S.D. Aluminum activates an anion channel in the apical cells of wheat roots. **Proceedings National Academy of Sciences**, Washington, v. 94, n. 12, p. 6547-6552, Jun. 1997.

SAGI, M.; FLUHR, R. Production of Reactive Oxygen Species by Plant NADPH oxidase. **Plant Physiology**, Rockville, v. 141, p. 336-340, 2006.

SARDINHA, E.C.Z. **Respostas de pêlos radiculares de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom) submetidos a pH baixo e hip-osmolaridade**. 2010. 86p. Tese (Doutorado Biologia na Agricultura e no Meio Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

SHABALA, S.; NEWMAN, I. Proton and calcium flux oscillations in the elongation region correlate with root nutation. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 100, n. 4, p. 917-926, 1997.

SHELP, B.J.; MARENTES, E.; KITHEKA, A.M.; VIVEKANANDAN, P. Boron mobility in plants. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 94, p. 356-361, 1995.

SHORESH, M.; SPIVAK, M.; BERNSTEIN, N. Involvement of calcium-mediated effects on ROS metabolism in the regulation of growth improvement under salinity. **Free Radical Biology and Medicine**, Philadelphia, v. 51, n. 6, p. 1221-1234, Sept. 2011.

SILVA, S.D.A.; MORAES, W.B.; SOUZA, G.S. de. Doses de cálcio no crescimento do feijoeiro cultivado em solução nutritiva , na presença de alumínio Doses of calcium in the growth of the bean plant cultivated in nutritive solution , in the presence of aluminum. **IDESIA**, Cabria, v. 29, n. 3, p. 53-58, 2011.

ŠIMONOVICHOVÁ, M.; HUTTOVÁ, J.; MISTRÍK, I.; ŠIROKÁ, B.; TAMÁS, L. Root growth inhibition by aluminum is probably caused by cell death due to peroxidase-mediated hydrogen peroxide production. **Protoplasma**, Vienna, v. 224, p. 91-98, 2004.

SIVAGURU, M.; BALUŠKA, F.; VOLKMANN, D.; FELLE, H.H.; HORST, W.J. Impacts of aluminum on the cytoskeleton of the maize root apex. Short-term effects on the distal part of the transition zone. **Plant Physiology**, Rockville, v. 119, p. 1073-1082, 1999.

SIVAGURU, M.; PIKE, S.; GASSMANN, W.; BASKIN, T.I. Aluminum rapidly depolymerizes cortical microtubules and depolarizes the plasma membrane:

evidence that these responses are mediated by a glutamate receptor. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 44, n. 7, p. 667-675, Jul. 2003.

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

SOUZA, A.P.; LEITE, D.C.C.; PATTAIL, S.; HAHN, M.G.; BUCKERIDGE, M.S. Composition and Structure of Sugarcane Cell Wall Polysaccharides: Implications for Second-Generation Bioethanol Production. **BioEnergy Research**, New York, DOI 10.1007/s12155-012-9268-1, published online, 6 nov. 2012.

STASS, A.; KOTUR, Z.; HORST, W.J. Effect of boron on the expression of aluminium toxicity in *Phaseolus vulgaris*. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 131, p. 283-90, Oct. 2007.

TAMÁS, L.; BUDÍKOVÁ, S.; HUTTOVÁ, J.; MISTRÍK, I.; ŠIMONOVÍČOVÁ, M.; ŠIROKÁ, B.; Aluminum-induced cell death of barley-root border cells is correlated with peroxidase- and oxalate oxidase-mediated hydrogen peroxide production. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 24, n. 3, p. 189-194, Jul. 2005.

TIAN, S.; LU, L.; ZHANG, J.; WANG, K.; BROWN, P.; HE, Z.; LIANG, J.; YANG, X. Calcium protects roots of *Sedum alfredii* H. against cadmium-induced oxidative stress. **Chemosphere**, Kidlington, v. 84, n. 1, p. 63-69, Jun. 2011.

TUNA, A.L.; KAYA, C.; ASHRAF, M.; ALTUNLU, H.; YOKAS, I.; YAGMUR, B. The effects of calcium sulphate on growth, membrane stability and nutrient uptake of tomato plants grown under salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 59, n. 2, p. 173-178, Mar. 2007.

UEXKULL, V.H.R.; MUTER, E. Global extent, development and economic impact of acid soils. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 171, p. 1-15, 1995.

VAN, H.L.; KURAISHI, S.; SAKURAI, N. Aluminum-Induced Rapid Root Inhibition and Changes in Cell-Wall Components of Squash Seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v. 106, n. 3, p. 971-976, Nov. 1994.

VIESTRA, R.; HAUG, A. The effect of Al^{3+} on the physical properties of membrane. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Maryland Heights, v. 84, n. 1, p. 138-143, 1978.

VINCKEN, J.-P.; SCHOLS, H.A.; OOMEN, R.J.F.J.; McCANN, M.C.; ULVSKOV, P.; VORAGEN, A.G.J.; VISSER, R.G.F. If Homogalacturonan Were a Side Chain of Rhamnogalacturonan I. Implications for Cell Wall Architecture. **Plant Physiology**, Rockville, v. 132, p. 1781-1789, Aug. 2003.

VITORELLO, V.A.; HAUG, A. Short-term aluminium uptake by tobacco cells: Growth dependence and evidence for internalization in a discrete peripheral region. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 97, n. 3, p. 536-544, 1996.

VITORELLO, V.; CAPALDI, F.; STEFANUTO, V. Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campinas, v. 17, n. 1, p. 129-143, 2005.

WILLATS, W.G.; McCARTNEY, L.; MACKIE, W.; KNOX, P. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 47, n. 1/2, p. 9-27, Sept. 2001.

XUE, Y.J.; TAO, L.; YANG, Z.M. Aluminum-induced cell wall peroxidase activity and lignin synthesis are differentially regulated by jasmonate and nitric oxide. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 56, n. 20, p. 9676-9684, Oct.. 2008.

YAMAMOTO, Y.; KOBAYASHI, Y.; DEVI, S.R.; RIKIISHI, S.; MATSUMOTO, H. Aluminum Toxicity Is Associated with Mitochondrial Dysfunction and the Production of Reactive Oxygen Species in Plant Cells. **Plant Physiology**, Rockville, v. 128, p. 63-72, 2002.

YAMAMOTO, Y.; KOBAYASHI, Y.; MATSUMOTO, H. Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, n. 1, p. 199-208, Jan. 2001.

YAN, F.; SCHUBERT, S.; MENGEL, K. Effect of Low Root Medium pH on Net Proton Release, Root Respiration, and Root Growth of Corn (*Zea mays* L.) and Broad Bean (*Vicia faba* L.). **Plant Physiology**, Rockville, v. 99, n. 2, p. 415-421, Jun. 1992.

YANG, J.L.; ZHENG, S.J.; HE, Y.F.; MATSUMOTO, H. Aluminium resistance requires resistance to acid stress: a case study with spinach that exudes oxalate rapidly when exposed to Al stress. **Journal Of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 414, p. 1197-203, Apr. 2005.

YIN, L.; MANO, J.; WANG, S.; TSUJI, W.; TANAKA, K. The involvement of lipid peroxide-derived aldehydes in aluminum toxicity of tobacco roots. **Plant Physiology**, Rockville, v. 152, n. 3, p. 1406-1417, Mar. 2010.

YU, M.; SHEN, R.; XIAO, H.; XU, M.; WANG, H.; WANG, H.; ZENG, Q.; BIAN, J. Boron alleviates aluminum toxicity in pea (*Pisum sativum*). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 314, n. 1/2, p. 87-98, July 2009.

ZELINOVÁ, V.; MISTRÍK, I.; PAL'OVE, P.; TAMÁS, L. Peroxidase activity against guaiacol, NADH, chlorogenic acid, ferulic acid and coniferyl alcohol in root tips of *Lotus japonicus* and *L. corniculatus* grown under low pH and aluminium stress. **Biologia**, Bratislava, v. 65, n. 2, p. 279-283, Feb. 2010.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

AHAMMED, G.J.; GAO, C.-J.; OGWENO, J.O.; ZHOU, Y.-H.; XIA, X.-J.; MAO, W.-H.; SHI, K.; YU, J.-Q. Brassinosteroids induce plant tolerance against phenanthrene by enhancing degradation and detoxification in *Solanum lycopersicum* L.

Ecotoxicology and Environmental Safety, Maryland Heights, v. 80, p. 28-36, Jun. 2012.

HAYASHI, T. XYLOGLUCANS IN THE PRIMARY CELL WALL. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 40, p. 139-168, 1989.

HINSINGER, P.; PASSARDI, C.; TANG, C.; JAILLARD, B. Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints : A review. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 248, p. 43-59, 2003.

KOBAYASHI, M.; NAKAGAWA, H.; ASKA, T.; MATOH, T. Borate-rhamnogalacturonan II bonding reinforced by Ca²⁺ retains pectic polysaccharides in higher-plant cell walls. **Plant Physiology**, Rockville, v. 119, n. 1, p. 199-204, Jan. 1999.

MIMMO, T.; MARZADORI, C.; GESSA, C.E. Does the degree of pectin esterification influence aluminium sorption by the root apoplast? **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 314, n. 1/2, p. 159-168, July 2008.

WALTER, A.; SILK, W. K.; SCHURR, U. Environmental effects on spatial and temporal patterns of leaf and root growth. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 60, p. 279-304, Jan. 2009.

APÊNDICES

APÊNDICE A

pH	[Ca ²⁺]	Crescimento (mm)	A	B
pH 5,8	1 mM Ca	11,11337	****	
pH 5,8	0,5 mM Ca	10,82000	****	
pH 5,8	10 mM Ca	10,76787	****	
pH 4,0	10 mM Ca	10,41440	****	
pH 4,5	1 mM Ca	10,41060	****	
pH 5,8	20 mM Ca	10,24303	****	
pH 4,5	10 mM Ca	9,64127	****	
pH 4,5	5 mM Ca	9,43640	****	
pH 4,5	0,5 mM Ca	9,27407	****	
pH 5,8	5 mM Ca	9,24967	****	
pH 4,5	20 mM Ca	9,18297	****	
pH 4,0	5 mM Ca	8,95653	****	
pH 4,0	20 mM Ca	8,76857	****	****
pH 4,0	1 mM Ca	7,34207	****	****
pH 4,0	0,5 mM Ca	4,64363		****

Apêndice A: Tabela com os valores de crescimento radicular em plantas de Micro-Tom submetidas por 24 h a pH 5,8 ou 4,5 ou 4,0, com diferentes concentrações de CaCl₂. Foi realizado análise de variância seguida pelo teste de Tukey (n=30). Letras diferentes representam diferença estatística ($\alpha=0,05$).

APÊNDICE B

	Sums of Squares	df	Mean Squares	F	p-level	Durbin- Watson dW
Regress.	0,025003	1	0,025003	38,75625	0,000007	
Residual	0,011613	18	0,000645			
Total	0,036616					
Estimate						2,034693

Apêndice B: Tabela de ANOVA para correlação entre atividade guaiacol peroxidase (GPOX) após 8 h de exposição e absorção de azul de Evan's após 6 h de exposição, utilizando os tratamentos com 0,5 mM e 10 mM de CaCl_2 , em pH 5,8, 4,5, e 4,0 na presença de 10 μM de AlCl_3 ou em sua ausência. (n=20). $dU < dW < 4-dU$, portanto os resíduos são independentes ($\alpha=0,05$).

APÊNDICE C

	Sums of Squares	df	Mean Squares	F	p-level	Durbin- Watson Dw
Regress.	0,034296	1	0,034296	81,21871	0,000000	
Residual	0,007601	18	0,000422			
Total	0,041897					
Estimate						2,346423

Apêndice C: Tabela de ANOVA para correlação entre atividade guaiacol peroxidase (GPOX) após 8 h de exposição e absorção de azul de Evan's após 6 h de exposição, utilizando os tratamentos com 0,5 mM CaCl_2 , com 30 μM ou na ausência de H_3BO_3 , em pH 5,8, 4,5, e 4,0 na presença de 10 μM de AlCl_3 ou em sua ausência. (n=20). $dU < dW < 4-dU$, portanto os resíduos são independentes ($\alpha=0,05$).

APÊNDICE D

	Sums of Squares	df	Mean Squares	F	p-level	Durbin- Watson dW
Regress.	0,030634	1	0,030634	65,15955	0,000000	
Residual	0,017865	38	0,000470			
Total	0,048499					
Estimate						2,195173

Apêndice D: Tabela de ANOVA para correlação entre atividade guaiacol peroxidase (GPOX) após 8 h de exposição e absorção de azul de Evan's após 6 h de exposição, utilizando os tratamentos com 0,5 mM e 10 mM de CaCl_2 , com 30 μM ou na ausência de H_3BO_3 , em pH 5,8, 4,5, e 4,0 expostos ou não a 10 μM de AlCl_3 . (n=20). $dU < dW < 4-dU$, portanto os resíduos são independentes ($\alpha=0,05$).