



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**EFEITO DA TOXICIDADE DO ALUMÍNIO SOBRE A  
RESPOSTA ANTIOXIDANTE ENDÓGENA EM TRÊS  
GENÓTIPOS DE AVEIA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Aniélen Dutra da Silva**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2016**

**EFEITO DA TOXICIDADE DO ALUMÍNIO SOBRE A RESPOSTA  
ANTIOXIDANTE ENDÓGENA EM TRÊS GENÓTIPOS DE AVEIA**

**Aniélen Dutra da Silva**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica do Centro de Ciências Naturais e Exatas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**

**Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciane Belmonte Pereira**  
**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Rosa Chitolina Schetinger**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2016**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Silva, Aniélen Dutra da  
Efeito da toxicidade do alumínio sobre a resposta  
antioxidante endógena em três genótipos de aveia / Aniélen  
Dutra da Silva.- 2016.  
45 f.; 30 cm

Orientadora: Luciane Belmonte Pereira  
Coorientadora: Maria Rosa Chitolina Schetinger  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica  
Toxicológica, RS, 2016

1. Avena sativa L 2. Alumínio 3. Enzimas antioxidantes  
4. Estresse oxidativo I. Pereira, Luciane Belmonte II.  
Schetinger, Maria Rosa Chitolina III. Título.

---

© 2016

Todos os direitos autorais reservados a Aniélen Dutra da Silva. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: [anielen.dutra@gmail.com](mailto:anielen.dutra@gmail.com)

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:  
Bioquímica Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITO DA TOXICIDADE DO ALUMÍNIO SOBRE A RESPOSTA  
ANTIOXIDANTE ENDÓGENA EM TRÊS GENÓTIPOS DE AVEIA**

elaborada por

**Aniélen Dutra da Silva**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Luciane Belmonte Pereira**  
(Presidente/ Orientadora - UFSM/ IFSC)

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vania L. Loro**  
(1º membro da banca - UFSM)

---

**Prof. Dr. Roberta Schmatz**  
(2º membro da banca - UFSM)

Santa Maria, 10 de agosto de 2016.

***Dedico esta dissertação às pessoas mais importantes da minha vida:***

*meus pais Cleidimar e Otonio e ao meu irmão Otonio  
que nunca mediram esforços para investir  
nos meus sonhos e sempre estiveram ao meu lado  
me dando apoio e amor incondicional.  
Vocês são a razão para que eu continue em frente!*

## **AGRADECIMENTOS**

O maior agradecimento faço aos meus pais Cleidimar e Otonio e ao meu irmão Otonio, por todo o apoio, atenção, amor e carinho dedicados a mim durante todo o período de minha formação acadêmica. Só tenho a dizer que amo infinitamente vocês e sem vocês ao meu lado nada teria sido possível, pois tenho em vocês exemplos de pessoas, além de serem meu porto seguro. Agradeço também a todos os amigos e a minha família que de uma forma ou outra fazem parte dessa conquista e sempre estiveram ao meu lado.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luciane Belmonte Pereira e a minha co-orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Rosa Chitolina Schetinger, primeiramente pela confiança em mim depositada e por ter aceitado essa orientação. Obrigada por todo o carinho e atenção que dedicaram a mim nessa jornada, além dos ensinamentos, experiências e conhecimentos compartilhados.

Agradeço aos professores, colegas e amigos do ENZITOX, vocês fazem parte desse momento. Obrigada pelo carinho, pela força, pelas trocas de conhecimento e experiências, pelo companheirismo e momentos inesquecíveis que passamos juntos.

Ao Grupo de Pesquisa em Fisiologia de Plantas de Interesse Agrobiológico, pela oportunidade dada pelo Prof. Dr. Fernando Teixeira Nicoloso e pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciane Almeri Tabaldi para que realizasse minha pesquisa e por todas as colaborações realizadas a essa pesquisa. Não posso deixar de agradecer aos colegas e amigos do grupo que são parte muito importante nessa conquista, sem o apoio, paciência, ensinamentos, carinho e alegria de vocês eu não teria realizado esse trabalho.

Obrigada Ruziele de Q. Sandri, Aline Mânica, Miriam da Silva Tavares, Nathieli Bianchin Bottari, Letícia Frizzo Ferigolo, Diéssica P. Dalenogare, Mariane Comiran, Karine P. Reichert, Luana P. Pelinson e Anderson Marques, vocês não sabem o quanto foram e são importantes para que esse momento fosse possível. Não posso deixar de agradecer alguém que entrou em minha vida no momento decisivo desse mestrado e me deu todo o apoio e carinho possível, me ajudando a passar por essa etapa, obrigada Rodrigo G. Cordeiro por estar ao meu lado, Te Amo.

Agradeço à Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica (PPGBTX) e à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte institucional e financeiro concedidos.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Ninguém é tão grande que não possa aprender, nem tão pequeno que não possa ensinar.”.*

*(Esopo)*

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica  
Universidade Federal de Santa Maria

### **EFEITO DA TOXICIDADE DO ALUMÍNIO SOBRE A RESPOSTA ANTIOXIDANTE ENDÓGENA EM TRÊS GENÓTIPOS DE AVEIA**

Autora: Aniélen Dutra da Silva  
Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Luciane Belmonte Pereira  
Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Maria Rosa Chitolina Schetinger  
Santa Maria, 10 de agosto de 2016.

O Al é um metal que apresenta efeito tóxico no crescimento de plantas em solos ácidos. Nesses solos, com pH abaixo de 5,5, o Al encontra-se na forma trivalente  $Al^{3+}$ , a qual pode comprometer o crescimento radicular, além de afetar processos fisiológicos e bioquímicos das plantas. As culturas cereais são bastante afetadas por essa toxicidade, sendo a aveia uma das espécies que apresenta maior tolerância para se desenvolver em solos ácidos. Dessa maneira, o objetivo desse estudo foi avaliar e comparar as respostas do sistema antioxidante de três genótipos de aveia *in vitro* e verificar se esses parâmetros tem papel importante no mecanismo de tolerância a presença do alumínio para cada genótipo. Para o estudo foram selecionados duas cultivares comerciais de aveia (URS Charrua e URS Guria) e uma cultivar com características de tolerância bem estabelecidas (UFRGS 17), obtidas através do Programa de Melhoramento de Aveia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Esses genótipos foram expostos a 740  $\mu M$  de Al durante cinco dias, mantidos em sala de crescimento com temperatura e luminosidade controladas. O experimento constituiu-se de seis grupos, UFRGS 17 controle (CTL), URS Charrua CTL e URS Guria CTL que não foram expostos ao Al e de UFRGS 17 Al, URS Charrua Al e URS Guria Al que foram expostos à presença do Al. Cada grupo apresentava quatro replicatas com 80 plântulas cada. Após o período de 5 dias as plantas foram coletadas e separadas em parte aérea e raiz, para a realização das análises de atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase, guaiacol peroxidase, além de verificar a concentração de pigmentos e os níveis de peroxidação lipídica e peróxido de hidrogênio. Foi possível observar que a concentração de pigmentos não foi alterada em nenhum genótipo na presença ou não de Al. Porém houve uma redução na atividade da enzima CAT nos genótipos UFRGS 17 e URS Charrua em folha e URS Charrua em raiz. A enzima SOD apresentou uma redução na atividade nos genótipos UFRGS 17, URS Charrua e URS Guria em folha e URS Charrua e URS Guria em raiz. Já a enzima GPOX não sofreu alterações com a exposição ao metal. Os níveis de peroxidação lipídica e peróxido de hidrogênio também não sofreram mudanças significativas com a exposição a toxicidade do Al. Pode-se sugerir que a enzima GPOX está atuando para a manutenção dos níveis de  $H_2O_2$  e de peroxidação lipídica, visto que essa enzima desempenha importante papel em estresses causados por metais, quando a CAT, por exemplo, tem sua atividade reduzida pela toxicidade do metal. Torna-se importante considerar que os genótipos responderam de forma diferente a exposição ao Al, o que demonstra que os mecanismos de tolerância não ocorrem da mesma forma, além disso, outras enzimas do sistema antioxidante podem estar atuando para o controle do estresse oxidativo e outros mecanismos podem estar atuando frente a toxidez do Al.

**Palavras-chave:** *Avena sativa* L. Alumínio. Enzimas antioxidantes. Estresse oxidativo.



## ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree  
Post-Graduating Program in Biological Sciences (Toxicological Biochemistry)  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### EFFECT OF Al TOXICITY ON ENDOGENOUS ANTIOXIDANT RESPONSE IN THREE OAT GENOTYPES.

Author: Aniélen Dutra da Silva  
Advisor: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciane Belmonte Pereira  
Co-advisor: Maria Rosa Chitolina Schetinger  
Santa Maria, August 10, 2016.

Aluminum (Al) is a metal that presents toxic effect on plant growth in acidic soils. In these soils, with pH under 5.5, Al can be found in its trivalent form ( $Al^{3+}$ ), which might compromise the root growth, as well as affect the plant physiological and biochemical processes. Cereal crops are highly affected by this toxicity, being *Avena spp* one of the most tolerant species to develop in acidic soils. Thus, the objective of this research was to evaluate and compare antioxidant system responses of three oat genotypes in vitro and verify if these parameters have an important participation on aluminum presence tolerance mechanism for each genotype. For this study, two commercial cultivars of oat (URS Charrua and URS Guria) and a known tolerant cultivar (UFRGS17) were selected through a program called *Programa de Melhoramento de Aveia* of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). These genotypes were exposed to 740  $\mu$ M of Al during five days and maintained in a growth room under controlled temperature and luminosity. The experiment consisted of six groups: UFRGS 17 control (CTL), URS Charrua CTL and URS Guria CTL were not exposed to Al; UFRGS 17 Al, URS Charrua Al and URS Guria Al were exposed to Al. Each group presents four replicates with eighty seedlings. After a period of five days, the plants were collected and separated in shoots and roots for the analysis of CAT, SOD, GPOX, pigment content, lipid peroxidation and  $H_2O_2$  levels. Pigment concentration did not present changes in all genotypes, either in presence or lack of Al. However, CAT and SOD enzyme activities were reduced in Al presence and GPOX activity, presenting no changes in Al presence or absence. However, there was a reduction on CAT enzyme activity, on genotypes UFRGS 17 and URS in shoots and URS Charrua in roots. SOD enzyme presented a reduction on activity in UFRGS 17, URS Charrua e URS Guria shoots genotypes and URS Charrua e URS Guria in roots. On the other hand, GPOX enzyme was not suffered any changes with metal exposure. Lipid peroxidation and  $H_2O_2$  levels had no alterations after the exposure to metal. GPOX could act maintaining  $H_2O_2$  and lipid peroxidation levels, because its enzyme plays an important role in stress by metals when CAT, for example, has its activity reduced by metal toxicity. It is important to consider that genotypes responded in different forms to Al exposure, which demonstrates that tolerance mechanisms used for each genotype do not occur similarly. Moreover, other antioxidant system enzymes can be acting to control the oxidative stress, along with other mechanisms that can be acting under Al- toxicity.

**Keywords:** *Avena sativa L.* Aluminum. Antioxidant enzymes. Oxidative stress.

## LISTA DE FIGURAS

### Manuscrito

- Figura 1.** Effect of Al exposed (740 $\mu$ M/L) on chlorophyll content in oat shoots.....35
- Figura 2.** Antioxidant activity in shoots and roots of oat after exposure to Al (740  $\mu$ M/L) during 5 days.....36
- Figura 3.** Hydrogen peroxide and lipid peroxidation levels in shoots and roots of oat with or without exposure to Al (740  $\mu$ M/L) during 5 days .....37

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

<b>AL</b>	– Alumínio
<b>APX</b>	– Ascorbato Peroxidase
<b>ATP</b>	– Adenosina Trifosfato
<b>CAPES</b>	– Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
<b>CAT</b>	– Catalase
<b>CNPQ</b>	– Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
<b>DNA</b>	– Ácido Desoxiribonucleico
<b>ERO</b>	– Espécies Reativas ao Oxigênio
<b>GPOX</b>	– Guaiacol Peroxidase
<b>RNA</b>	– Ácido Ribonucleico

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	14
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	14
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	14
<b>3</b>	<b>DESENVOLVIMENTO</b> .....	15
<b>3.1</b>	<b>Revisão da Literatura</b> .....	15
<b>3.2</b>	<b>Manuscrito</b> .....	24
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	38
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	39

## APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito, o qual se encontra no item Manuscrito. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências encontram-se no próprio manuscrito e representam a íntegra deste estudo.

O item Conclusões encontra-se no final desta dissertação e apresenta interpretações e comentários gerais sobre o manuscrito contido neste trabalho.

As bibliografias referem-se somente às citações que aparecem nos itens introdução e revisão da literatura desta dissertação.

O manuscrito está estruturado de acordo com as normas da revista científica para o qual foi submetido: *Biometals*.

# 1 INTRODUÇÃO

Pesquisas são desenvolvidas com várias culturas agrícolas, buscando compreender os mecanismos que estão envolvidos na capacidade que algumas plantas possuem de se desenvolver em solos com altas concentrações de alumínio (Al). Dentre essas culturas os cereais são o grande foco das pesquisas, pois são amplamente afetados pela toxicidade desse metal. Um cereal que apresenta grande tolerância ao Al, ou seja, grande habilidade de se desenvolver em solos ácidos, com alta concentração de alumínio é a aveia (NAVA et al., 2006).

Este cereal tem alto teor proteico e pode ser utilizado tanto na alimentação animal, quanto na alimentação humana, além disso, pode ser utilizado em cobertura de solo, o que auxilia no enriquecimento com compostos nitrogenados. A *Avena sativa* tem sido amplamente estudada na busca de esclarecimentos dos mecanismos de tolerância e de genes que possam estar envolvidos nesse processo, ou que possam ser afetados pela toxicidade do metal (CASTILHOS et al., 2011; PEREIRA et al., 2013).

O Al é um dos elementos mais presentes no solo na forma de complexos como, por exemplo, o hidróxido de alumínio. Porém, em condições de solos ácidos esse metal pode adotar sua forma solúvel  $Al^{3+}$ , que pode ser extremamente tóxico para o desenvolvimento de plantas no solo. Ocasionalmente comprometimento na produtividade em lavouras, além da redução do crescimento de raiz, o que irá limitar a busca de água e nutrientes pela planta, danificar o sistema fotossintético, alterar a homeostase celular e levar, de forma indireta, a uma condição de estresse oxidativo (HARTWIG et al., 2007; CHEN et al., 2010; PEREIRA et al., 2013).

Os processos de melhoramento genético passam por pesquisas que buscam descrever os meios de ocorrência dessa tolerância e quais os genes podem estar envolvidos. Visando selecionar as características que tornam as plantas mais aptas a se desenvolver em diferentes condições ambientais. Nesse sentido, essa pesquisa busca comparar os mecanismos antioxidantes de duas cultivares comerciais de aveia a resposta antioxidante de um cultivar Al-tolerante já conhecido. Dessa forma é possível verificar se o sistema antioxidante tem participação crucial na tolerância ao Al nessas plantas.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

O objetivo desse estudo foi avaliar as respostas do sistema antioxidante dos genótipos de aveia UFRGS 17, URS Charrua e URS Guria e compará-las, além de verificar qual a importância desses parâmetros no mecanismo de tolerância à presença do alumínio para cada genótipo *in vitro*.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Quantificar a concentração de pigmentos fotossintéticos em genótipos de aveia UFRGS 17, URS Charrua e URS Guria, expostos ao alumínio.
- Avaliar o status antioxidante através das enzimas catalase, superóxido dismutase e guaiacol peroxidase nos genótipos de aveia UFRGS 17, URS Charrua e URS Guria, expostos ao alumínio.
- Determinar os níveis de peroxidação lipídica em genótipos de aveia UFRGS 17, URS Charrua e URS Guria, após a exposição a concentração de 740  $\mu\text{M}$  de alumínio.
- Comparar as respostas nos diferentes genótipos e verificar se seguem o padrão de classificação morfológica de tolerância ao Al dos mesmos.

## 3 DESENVOLVIMENTO

### 3.1 Revisão da Literatura

As cultivares de aveia lançadas nas décadas de 1950, 1960 e no início de 1980, assim como as primeiras cultivares introduzidas no Brasil, apresentavam características de plantas essencialmente forrageiras, com ciclo de desenvolvimento tardio, baixo rendimento e qualidade de grãos, quando comparadas com as cultivares desenvolvidas na década de 1990 (BARBOSA NETO et al., 2000). Desde então, este cereal tem recebido grande atenção quanto a sua aplicabilidade como alimento de excelência para o consumo humano, em função de apresentar uma composição química e estrutural do grão única dentre todos os cereais. De acordo com Hawerth et al. (2014), os cultivares de aveia representam uma excelente alternativa de diversificação e contribuição para a efetividade econômica do sistema produtivo.

A aveia (*Avena spp.*), pertencente à família *Poaceae*, subfamília *Poideae*, tribo *Avenae*, apresenta diversas espécies, como aveia branca (*Avena sativa L.*), tendo evidências de surgimento na Ásia e Oriente Médio (HAWERROTH et al., 2014). Inicialmente a aveia era considerada uma planta invasora em lavouras de trigo (*Triticum spp.*) e cevada (*Hordeum spp.*). Conforme essas espécies foram levadas a ambientes mais frios e úmidos, a aveia foi ganhando competitividade, sendo então domesticada como lavoura alternativa, conquistando espaço como uma importante cultura para a subsistência humana e animal (COFFMAN, 1961).

A aveia representa uma das principais forrageiras anuais utilizadas na formação de pastagens no período de outono/inverno, sendo cultivada de forma isolada ou associada com outras espécies forrageiras de clima temperado, em função da sua alta capacidade de produção de matéria seca, qualidade da forragem, resistência ao pisoteio e baixo custo de produção (MACARI et al., 2006). Na alimentação animal, são utilizadas como forragem verde de elevada qualidade nutricional, como por exemplo feno e silagem, assim como na utilização como ração, mantendo a produção leiteira e de carne na estação fria. No sul do Brasil e em partes do sudeste e centro-oeste, a aveia é cultivada como espécie produtora de grãos e de



palha para a cobertura do solo, hábito esse que favorece a implantação das culturas de estação quente sob sistema de semeadura direta (CECCON et al., 2004).

O Brasil se tornou um produtor de grãos de qualidade, em função dos bons resultados alcançados com o melhoramento da aveia branca, o que refletiu no surgimento de indústrias de pequeno porte, que atuam na transformação e no processamento dos grãos para a elaboração de produtos destinados à dieta humana (FEDERIZZI et al., 2005). Muitas pesquisas têm buscado a redução do ciclo de desenvolvimento da cultura da aveia, para um melhor ajuste na inclusão dessa espécie ao sistema de cultivo adotado no Brasil, permitindo que as lavouras de estação fria completem seu ciclo até o período preferencial de instalação da cultura subsequente de estação quente (HARTWIG et al., 2007). Atualmente, tornou-se crescente a demanda por cultivares elite com elevado rendimento e qualidade de grãos, resistentes e tolerantes a estresses bióticos e abióticos, evidenciando a adaptabilidade e a estabilidade nos diferentes ambientes de cultivo brasileiros (HAWERROTH et al., 2014). A aveia branca é considerada mais tolerante ao alumínio que muitas outras culturas cereais, tais como trigo, milho e cevada (NAVA et al., 2006).

O alumínio é um dos elementos químicos mais abundantes da terra, estando presente na forma de minerais secundários que dão origem aos solos (MIGUEL et al., 2010). Em torno de 1,7 bilhões de hectares de solo, distribuídos em diversas regiões do mundo, contém a forma tóxica do alumínio e 43% dessas áreas estão localizadas nos trópicos. (PANDEY et al., 1994). A maioria dos solos utilizados na produção agrícola ao redor do mundo são ácidos e com baixa fertilidade natural (WANG et al., 2013). Estima-se que 30 – 50% dos solos potencialmente aráveis para práticas agrícolas são ácidos (TARKALSON et al., 2006; von UEXKÜLL; MUTERT 1995).

Considerado o terceiro elemento químico mais frequente na composição do solo, em situação de pH abaixo de 5,5, onde geralmente está presente em concentrações na faixa de 10 a 350 mmol.L<sup>-1</sup> (MACHADO, 1997). Nesse pH, o alumínio encontra-se solúvel no solo em sua forma trivalente (Al<sup>3+</sup>) extremamente tóxica, seus efeitos tóxicos inibem o crescimento e o desenvolvimento das raízes, alterando a absorção de água e nutrientes, e por consequência o desenvolvimento das plantas é afetado (KOCHIAN, 1995; HARTWIG et al., 2007; KOBAYASHI et al., 2013; MERINO-GERGICHEVIC et al., 2010; RYAN et al., 2011; CHEN et al., 2012). Além disso, o Al pode causar danos na parte aérea das plantas, onde pode afetar a membrana dos tilacóides e a cadeia transportadora de elétrons, e ainda diminuir a absorção de luz em função de reduzir a concentração de pigmentos fotossintéticos (CHEN et al., 2010).

Apesar de não ser um metal de transição, o Al apresenta atividade pró-oxidante através da formação de radicais semi-reduzidos de superóxido com alumínio (EXLEY, 2004). Esse metal é também relatado como agente causador da desestruturação das membranas plasmáticas (ZHANG et al., 1997), por proporcionar a formação de EROs (espécies reativas de oxigênio) (DONG et al., 2002). A produção de EROs é uma característica comum de diversos estresses, incluindo a toxicidade de alumínio, a qual causa danos para as células das plantas (TAMÁS et al., 2004). Portanto, o estresse oxidativo é um importante componente de reação da planta ao alumínio (JONES et al., 2000).

O estresse oxidativo compreende um estado com uma elevada produção de EROs, quando os mecanismos celulares pró-oxidantes superam os antioxidantes. As espécies reativas de oxigênio incluem radicais livres e outras moléculas (MARRONI, 2002), que resultam da excitação do elétron externo, formando oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ), ou de uma adição de elétrons sucessiva ao oxigênio molecular produzindo  $\text{O}_2^{\circ-}$  (radical superóxido),  $^{\circ}\text{OH}$  (radical hidroxila) e  $\text{H}_2\text{O}_2$  (peróxido de hidrogênio) (RESENDE et al., 2003).

O radical superóxido pode ser produzido por meio de vários mecanismos, na planta, como pela ativação de NADPH-oxidases/sintetases ligadas à membrana, peroxidases da parede celular, lipoxigenases e como resultado da transferência de elétrons da mitocôndria ou do cloroplasto. É possível oxidar-se várias moléculas orgânicas, como o ascorbato, ou atuar como redutor de metais como  $\text{Fe}^{3+}$ , nas reações de Haber-Weiss ou Fenton (BREUSEGEM et al., 2001). Além do superóxido, os radicais hidroxila ( $^{\circ}\text{OH}$ ) são radicais potencialmente fortes e com alta afinidade a biomoléculas no seu sítio de produção (POSCHENRIEDER et al., 2008). A dismutação do radical  $\text{O}_2^{\circ-}$ , catalisado pela enzima superóxido dismutase, resulta na produção de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Essa reação é a principal fonte dessa espécie reativa (MITTLER, 2002; CHAFFAI et al., 2005). O oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ) é altamente destrutivo, reage com a maioria das moléculas biológicas, sendo gerado predominantemente nos cloroplastos através da transferência de energia de uma clorofila foto-excitada, para o elétron do oxigênio molecular (MITTLER, 2002; GIANNAKOULA et al., 2007).

Como o acúmulo das EROs pode resultar em prejuízos consideráveis, a célula dispõe de vários mecanismos para destoxificar eficientemente as mesmas. Esses mecanismos de proteção foram desenvolvidos pelas plantas durante o processo de evolução, para controlar os níveis dessas moléculas e anular essa toxicidade. Moléculas antioxidantes, enzimas e um sistema mais complexo de detoxificação podem estar envolvidos na proteção celular contra as

EROs. Conhecidas como “*scavengers*”, várias enzimas reguladoras impedem a ação tóxica das EROs à célula vegetal (BOWLER, 1992; MITTLER, 2002).

Apesar disso, as EROs podem agir como moléculas sinalizadoras ativando múltiplas respostas de defesa (BREUSEGEM et al., 2001; NETO et al., 2005, GADJEV et al., 2006). Experimentos com adição de  $H_2O_2$  em tecidos foliares ou sua indução endógena, demonstraram que esse atua como um sinal de indução para a expressão de genes referentes à catalase, ascorbato peroxidase e glutathione peroxidase. Além disso, o aumento de EROs estimula a biossíntese e aumento de atividade de componentes antioxidantes (SOARES; MACHADO, 2007), tais como as enzimas antioxidantes catalases, superóxido dismutases (MITTLER, 2002) e peroxidases (WELINDER, 1992), as quais reduzem as EROs. Em contrapartida, se a redução completa não ocorrer, o excesso de EROs pode dar origem ao estresse oxidativo (MITTLER, 2002).

A catalase apresenta a atividade de converter  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$ , além de estarem presentes nos peroxissomos e glioxissomas. Estas são as principais enzimas de detoxificação do  $H_2O_2$  em plantas, sendo divididas em três classes distintas. As pertencentes a classe I removem o  $H_2O_2$  produzido durante a fotorrespiração em tecidos fotossintéticos. Já aquelas pertencentes a classe II são produzidas em tecidos vasculares, podendo exercer uma função de lignificação, mas sua exata função biológica permanece desconhecida. Na classe III se encontram as catalases presentes abundantemente em sementes e plantas jovens, cuja atividade está relacionada à remoção do  $H_2O_2$  produzido durante a degradação dos ácidos graxos no glioxissoma (BREUSEGEM et al., 2001, RESENDE et al., 2003).

As superóxido dismutases são metaloenzimas (SANTOS et al., 2000; MORAN et al., 2003) que apresentam importante ação na tolerância ao estresse em plantas, além de atuar como primeira linha de defesa frente aos efeitos tóxicos dos elevados níveis de EROs. As superóxido dismutases podem ser classificadas em três grupos, de acordo com seu metal cofator, sendo eles; Cu/Zn-SOD (cobre/zinco), Mn-SOD (Manganês) e Fe-SOD (Ferro), os quais se localizam em diferentes compartimentos celulares (Mittler, 2002). Os Cu/Zn-SOD são encontradas no citosol e em cloroplastos (DEL RÍO, 2002), os Mn-SOD estão presentes nas mitocôndrias de células eucariontes e em peroxissomos (DEL RÍO, 2003), e o Fe-SOD estão associados a compartimentos dos cloroplastos (ALSCHER et al., 2003).

A regulação dessas enzimas está associada ao combate do estresse oxidativo, seja biótico ou abiótico, tendo um papel crucial na sobrevivência das plantas em ambientes de estresse (HARINASUT et al., 2003). A superóxido dismutase atua de forma ativa na remoção do  $O_2^{\bullet-}$  gerado através de diferentes processos do metabolismo celular, tais com o transporte

de elétrons na mitocôndria e cloroplasto (MITTLER, 2002). A redução na atividade da SOD leva a um aumento simultâneo do acúmulo de  $O_2^{\bullet-}$ . O radical superóxido é um dos principais oxidantes responsáveis pela peroxidação de lipídeos e conseqüentemente aumento na permeabilidade das membranas (INZÉ; MONTAGU, 1995).

As peroxidases são enzimas usualmente expressas em diversas isoformas (DEL RÍO, 2006), atuando em diversos processos fisiológicos, incluindo detoxificação de  $H_2O_2$  (FOYER; NOCTOR, 2005), construção e diferenciação da parede celular (MITTLER, 2002) e resposta da planta ao estresse (APEL; HIRT, 2004; MAHAJAN; TUTEJA, 2005). Essas enzimas são classificadas, em diferentes grupos, de acordo com sua função e localização celular (KHAN; SINGH, 2008), as peroxidases que oxidam guaiacol são chamadas de guaiacol peroxidases (GPOX) e estão localizadas no citosol, vacúolo, parede celular, apoplasto e no meio extracelular. As enzimas que apresentam preferência pelo ácido ascórbico são chamadas de ascorbato peroxidases (APX) e estão presentes nos cloroplastos e no citosol (GILL et al., 2011). A guaiacol peroxidase atua na biossíntese de lignina e na defesa frente ao estresse pela degradação de  $H_2O_2$  (ASADA, 1999). Sua atividade pode variar consideravelmente de acordo com a espécie de planta e com as condições de estresse a que a planta é exposta (GILL; TUTEJA, 2010).

Além das defesas antioxidantes, as plantas tolerantes ao Al podem desenvolver-se satisfatoriamente na presença deste elemento, através da utilização de algumas estratégias para minimizar os danos da toxicidade. Pode-se destacar a capacidade dos tecidos de evitar o dano fisiológico do alumínio, através da compartimentalização do elemento (DARKÓ et al., 2004) complexando o  $Al^{3+}$  em organelas específicas da planta, principalmente nos vacúolos (HARTWIG et al., 2007), isolando partes afetadas com a produção de calose (SILVA et al., 2012), ou secretando os ácidos orgânicos que são substâncias capazes de quelar o elemento fora da raiz, evitando a entrada do mesmo nas células radiculares (KOCHIAN et al., 2005; RYAN; DELHAIZE, 2010; RYAN et al., 2011; WANG et al., 2013). Todas estas estratégias demandam gasto energético e suas respostas são variáveis entre cultivares de uma mesma espécie. A identificação de plantas tolerantes a presença do alumínio e a compreensão dos mecanismos dessa tolerância tem sido o foco de diversos estudos (KOCHIAN et al., 2005, CRESTANI et al., 2011; HERVÉ et al., 2015).

A secreção de ácidos orgânicos é um mecanismo de resistência ao alumínio predominante em cereais. Os ácidos orgânicos secretados ligam-se ao alumínio fora da raiz, evitando que o mesmo entre nas células radiculares (KOCHIAN et al., 2005; RYAN; DELHAIZE, 2010). Além disso, formas queladas de alumínio são menos tóxicas para o

crescimento da planta quando comparadas às formas iônicas. Trabalhos com várias espécies já têm demonstrado os principais ácidos orgânicos presentes nos mecanismos de complexação do Al, que permitem que as plantas cresçam em solos ácidos. Na aveia, os principais ácidos relacionados com o processo de exsudação na raiz são o citrato e o malato (ZHENG et al., 1998; HARTWIG et al., 2007).

Em muitas plantas que crescem em ambientes ácidos, o alumínio permanece na parede celular da raiz. Este pode ser o maior sítio de acúmulo do alumínio, sendo que esta ligação limita o movimento do alumínio no simplasma (YAMAMOTO et al., 2003). O alumínio liga-se principalmente à celulose, componente da parede celular, porém essas interações permanecem pouco exploradas (JANSEN et al., 2002). O transporte de alumínio para a parte aérea ocorre via xilema, porém, as paredes do xilema apresentam uma alta capacidade de troca de cátions, o que causa um retardo no movimento dos cátions de alumínio (DELHAIZE et al., 2009).

As plantas acumuladoras de alumínio apresentam uma alta concentração deste metal na parte aérea sem efeitos prejudiciais, sugerindo que o alumínio seja transportado através da membrana plasmática pelo simplasma (SILVA et al., 2006). A principal diferença entre plantas que acumulam alumínio e as que o excluem pode estar relacionada a permeabilidade das células da endoderme. A endoderme de plantas não acumuladoras limita a entrada do alumínio para o cilindro central. Entretanto, a endoderme de plantas acumuladoras não oferece essa limitação (JANSEN et al., 2002).

O processo de internalização do alumínio tem a hipótese de que após a entrada do metal no citoplasma ocorra a formação de agregados de alumínio com ácido orgânico, proteínas ou outros ligantes e a compartimentalização do alumínio no vacúolo (KOCHIAN, 1995; MA et al., 2001). Os ácidos orgânicos são importantes nesse processo, pois se ligam ao mesmo e impedem que este possa se ligar a outras biomoléculas (MA et al., 2001; DELHAIZE et al., 2001). O alumínio tem uma forte afinidade com compostos doadores de oxigênio como o fosfato inorgânico, ATP, RNA, DNA, proteínas, ácidos carboxílicos e fosfolípidos. Os mecanismos de detoxificação interna são pré-requisitos para a tolerância ao alumínio em plantas que acumulam este metal.

A resistência ao alumínio é um traço que pode ser controlado por um ou mais genes e vários genes menores (POSCHENRIEDER et al., 2008). A genética da resistência ao alumínio tem sido foco de vários estudos em diferentes espécies agrícolas importantes. A tolerância ao alumínio em *Arabidopsis thaliana* é controlada por dois diferentes genes (LARSEN, 1998; EZAKI et al., 2000). Além disso, esses dois genes controlam dois

mecanismos distintos: (I) A liberação de ácidos orgânicos que se ligam ao alumínio e previnem sua captação pela raiz e (II) O aumento do pH ao redor do ápice da raiz, que diminui a concentração de alumínio tóxico. Assim, é improvável que a resistência ao alumínio seja o resultado de um único mecanismo em todas as espécies vegetais (KOCHIAN, 1995; POSCHENRIEDER et al., 2008; DELHAIZE et al., 2009).

Diversas pesquisas demonstram os diferentes níveis de tolerância de espécies de aveia frente a toxicidade do alumínio, seja na busca de compreender os mecanismos de tolerância utilizados pela planta, ou na busca de genes relacionados a capacidade da planta de se desenvolver na presença desse metal. Em pesquisa realizada por Nava et al. (2006), foi possível concluir que a tolerância é conferida por um gene dominante, além de não haver influências do mesmo nos parâmetros de rendimento e qualidade dos grãos. Silva et al. (2006), avaliaram 10 cultivares de aveia branca recomendadas para o cultivo no sul do Brasil, quanto a sua tolerância ao alumínio utilizando cultivo hidropônico. Para o estudo utilizou-se doses de 10, 15 e 20 mg L<sup>-1</sup> de alumínio na solução, concluindo que as doses de 15 e 20 mg L<sup>-1</sup> de alumínio em solução nutritiva foram eficientes na identificação de genótipos de aveia tolerantes e sensíveis, com as cultivares UPF 17, UFRGS 20 e URS 21 apresentando elevada tolerância.

A avaliação de caracteres de parte aérea e raiz também é uma forma de classificar diferentes genótipos como tolerantes ou sensíveis a presença do alumínio. Buscando caracterizar genótipos de aveia quanto a tolerância ao alumínio, Silva et al. (2007) classifica as cultivares UPF 16, URS 21, UFRGS 14, UPF 19 e UFRGS 17 como tolerantes, efetuando a medida de retomada de crescimento da raiz para tanto. Crestani et al. (2011) utiliza o mesmo parâmetro para classificar genótipos de aveia branca em diferentes doses de alumínio, obtendo como tolerantes as cultivares UFRGS 14, ALBASUL e BARBARASUL.

Castilhos et al. (2011) realizou experimentos hidropônicos em que avalia o recrescimento de raiz em populações F2 derivadas de UFRGS17 × UPF91A1100-1-4, utilizando uma concentração de 740 µM de alumínio. Além do recrescimento, a acumulação de alumínio no ápice radicular, a atividade de enzimas antioxidantes, o conteúdo de tióis não proteicos, a concentração de ácido ascórbico, superóxido e peróxido de hidrogênio foram avaliados. A partir das avaliações, concluiu que a tolerância em UFRGS17 e UPF91A1100-1-4 é conferida pelo mesmo gene. Os autores sugerem que, possivelmente, o gene de tolerância ao alumínio codifica diversos componentes, como fatores de transcrição, que quando induzidos por alumínio, podem ativar diversas vias, tais como o sistema antioxidante.

Visando analisar os efeitos da toxicidade do alumínio na atividade de enzimas antioxidantes, Pereira et al. (2011) verificou a atividade das enzimas CAT, SOD e APX, bem como a peroxidação lipídica, conteúdo de peróxido de hidrogênio, níveis de ácido ascórbico, tióis não-proteicos e conteúdo de alumínio. Esses parâmetros foram avaliados em três genótipos de aveia branca, cultivados em ágar acrescido de diferentes concentrações de alumínio, durante cinco dias. Os genótipos foram previamente classificados, morfológicamente, como tolerante, intermediário e sensível (UFRGS 17, UFRGS 280 e UFRGS 930598) por Federizzi et al. (2000). Os resultados encontrados para a atividade do sistema antioxidante corroboraram com os descritos por Federizzi et al. (2000) em relação à classificação dos genótipos.

Hervé et al. (2013), avaliaram genótipos elite de aveia que ainda não haviam sido estudados em relação a sua tolerância ao alumínio. Para tanto, utilizou-se como parâmetro comparativo os genótipos UFRGS 17 (tolerante) e UFRGS 930598 (sensível). O parâmetro avaliado para classificar as cultivares foi o recrescimento de raiz, que foi avaliado nas UFRGS 057005-1 e UFRGS 057022-2, e as cultivares comerciais URS Guria, URS Torena, URS Penca, URS Guará, URS Charrua, URS Tarimba, URS Taura, URS Guapa e URS 21. Os resultados demonstraram que a cultivar URS Charrua foi o mais tolerante, seguido por URS Guapa e URS Tarimba, que demonstraram tolerância superior a UFRGS 17. Já os genótipos URS Tarimba, URS Guará, URS 21, UFRGS 057022-2, URS Taura e URS Guria foram considerados tolerantes ao  $Al^{3+}$ , visto que não diferiram do controle tolerante UFRGS 17.

Em experimento de hidroponia, Pereira et al. (2013), demonstraram a velocidade de ativação das enzimas antioxidantes, em genótipos de aveia branca expostos a toxicidade do alumínio. No genótipo sensível as enzimas CAT, APX, e SOD foram ativadas somente em 24h e 36h. Já nos genótipos tolerante e intermediário, essas enzimas foram ativadas em 12h, 24h e 36h de exposição ao metal. Os genótipos diferem quanto ao tipo de antioxidante e sua velocidade de ativação do sistema antioxidante, sugerindo uma variação na capacidade de os mesmos controlarem o estresse oxidativo, o qual resulta na variação da sensibilidade e tolerância ao alumínio.

Considerando as limitações para cultivos em solos ácidos, a utilização de cultivares tolerantes ao  $Al^{3+}$  se torna uma estratégia mais efetiva para a produção nessa condição. Diversas pesquisas visando a seleção de genótipos com essa capacidade são desenvolvidas para um melhor entendimento dos processos relacionados a habilidade dessas plantas em se desenvolver na presença desse metal. A caracterização da tolerância geralmente é feita utilizando-se caracteres morfológicos, porém as respostas fisiológicas e bioquímicas da planta

tem influência direta no processo de crescimento e desenvolvimento, evitando danos que possam ser ocasionados pelo acúmulo de EROs, o que caracteriza o estresse oxidativo. Esse estudo visa avaliar a resposta do sistema antioxidante frente a toxidez do  $\text{Al}^{3+}$  de cultivares comerciais de aveia, comparado a um genótipo tolerante a presença deste metal, através de uma exposição *in vitro*, com condições controladas.



## 3.2 Manuscrito

**Influence of Al toxicity on the antioxidant endogenous activity of *Avena sativa L.***  
*in vitro*

Submetido à revista: *Biometals*

**Influence of Al toxicity on antioxidant enzyme activity of *Avena sativa* L. *in vitro***

Aniélen Dutra da Silva<sup>e</sup>, Maria Rosa C. Schetinger<sup>a</sup>, Ruziele de Quadros Sandri<sup>c</sup>, Miriam da Silva Tavares<sup>d</sup>, Leticia Frizzo Ferigolo<sup>c</sup>, Mariana Sauzen Alves<sup>a</sup>, Fernando Teixeira Nicoloso<sup>b</sup>, Luciane Almeri Tabaldi<sup>b</sup>, Vera Maria Morsch<sup>a</sup>, Luciane Belmonte Pereira<sup>f\*</sup>

a-Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

b-Departamento de Biologia, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

c-Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

d-Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

e-Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

f-Instituto Federal de Santa Catarina (Instituto Federal de Santa Catarina, Campus Xanxerê, 89820000, Xanxerê, SC, Brazil.

\* Corresponding author: Luciane Belmonte Pereira

E-mail address: [luciane.belmonte@ifsc.edu.br](mailto:luciane.belmonte@ifsc.edu.br)

Phone/fax: 55(49)34417923

### ABSTRACT

Aluminum shows toxic effects on plants in acidic soils and can play an indirect influence on oxidative stress. Moreover, this metal affects physiological and biochemical processes leading to a reduction in crop production. Thus, the aim of this study was to evaluate the aluminum toxicity on antioxidant enzymes and the relation to tolerance in three genotypes of *Avena sativa L.* in vitro. For this study, two commercial cultivars of oat (URS Charrua and URS Guria) and one tolerant cultivar (UFRGS17) were used.  $\text{AlCl}_3$  were added in the growth medium at 740  $\mu\text{M}$  of aluminum during five days. After this time, catalase, superoxide dismutase, and guaiacol peroxidase were analyzed in shoots and roots of seedlings. Therefore, pigment contents, lipid peroxidation and  $\text{H}_2\text{O}_2$  levels were determined. Aluminum exposure did not alter pigment concentration in all genotypes analyzed. Although catalase and superoxide dismutase enzyme activity showed a reduction in aluminum presence, no changes were observed on guaiacol peroxidase activity in aluminum presence or absence. Metal exposure did not affect lipid peroxidation and no changes in  $\text{H}_2\text{O}_2$  levels were observed. Based on the results, the aluminum had influence on antioxidant enzyme activities, even with no relation between antioxidant response and aluminum tolerance in the genotypes analyzed.

**Keywords:** Aluminum, oat, antioxidant enzymes, lipid peroxidation.

## 1. Introduction

Acid soils are abiotic stress forms that present negative impact on main agricultural crops, especially those that produce grains. Such behavior is evidenced and widely discussed in literature (Hartwig et al. 2007). The toxic effects of Aluminum (Al) are able to inhibit the root growth and development, change their water and nutrient absorption (Kochian, 1995; Hartwig et al. 2007) and decrease chlorophyll (Chl) and carotenoids (Car) concentration in leaves (Chen et al. 2005; Peixoto et al. 2002). In addition, they can lead to oxidative stress by indirect form (Yamamoto et al. 2003). As Al toxicity site is located in the root apex, researches about Al tolerance are focused on this zone (Ryan; Ditomaso; Kochian, 1993; Sivaguru et al. 1999).

Al is considered the third chemical element most frequently found in soil composition, which is present in concentrations between 10 and 350 mmol. L<sup>-1</sup> (Machado, 1997). When pH is below 5.5, Al is soluble in the soil in its trivalent form (Al<sup>3+</sup>), which is extremely toxic (Kochian, 1995; Hartwig et al. 2007).

*Avena sativa L.* is a grain-producing crop that presents high Al tolerance (Nava et al. 2006; Oliveira et al. 2005; Sanchez-Chacon et al. 2000; Wagner et al. 2001). This cereal is widely used for feeding due to its high protein content and it can be used for ground covering (Ceccon et al. 2004). Through some experiments using Al treatment, Pereira et al. (2013) showed that this metal toxicity was able to reduce the root growth in oat genotypes. The rapid response of root indicates that Al inhibits root cells expansion and elongation at first, and then it reduces the cellular division (Kochian, 1995; Matsumoto, 2000). Some tolerance mechanisms of plants to Al are already known and can be divided into two groups: a) mechanisms to put out Al after absorption or to prevent Al entrance through root; b) internal detoxification mechanisms that complex Al in specific organelles, mostly in vacuoles (Hartwig et al. 2007). Organic acid secretion is a mechanism of Al tolerance that is prevalent in cereals. Those acids bind to Al outside the root and consequently it prevents this metal from getting into the root (Kochian et al. 2005; Ryan & Delhaize, 2010).

Previous researches have classified some oat genotypes related to Al tolerance and demonstrated that the activity of some antioxidant enzymes, such as catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and ascorbate peroxidase are tolerant dependent (Pereira et al. 2011; Pereira et al. 2013). Several factors are involved in plant response to Al toxicity, such as enzyme activity, gene expression, morphological and physiological changes. Al tolerance is a limiting factor for crops in acid soils, where this metal is soluble and can be very toxic.

Hence, understanding the physiological and biochemical responses of plant exposure to Al is essential for agriculture development, with the aim of selecting the most appropriate cultivars to crop in acid soils, as in southern Brazil soils. This study aims to investigate the influence of Al exposure in antioxidant enzyme activity of two commercial cultivars (URS Charrua and URS Guria) when compared to cultivar with known Al tolerance (UFRGS 17) *in vitro*.

## 2. Material and methods

### 2.1. Plant materials and experimental conditions

The experiment was conducted in Biotechnology of Plants Laboratory, from Department of Biology at Universidade Federal de Santa Maria, RS, BR. Three genotypes of *Avena sativa L.* were used (UFRGS 17, URS Charrua and URS Guria). Seeds underwent a cleaning process with 0.1% mercuric chloride for 1 minute and a series of milli-Q water wash was performed.

After cleaning process, seeds were allocated in petri dishes with germitest paper, which was humidified with distilled water and kept in controlled temperature in a dark spot during 24 hours. Next, they were transferred to a light spot during 48 hs for seedling germination.

Two treatments were settled down: T1- Al absence (Control) and T2 - 740  $\mu\text{M}$  of Al (Al), and the pH was adjusted to 4.5 (Castilhos et al. 2011, Hervé et al. 2013). The addition of Al dose was in  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  form. Metal concentration calculation was based just on Al content in the salt. Seedlings were inoculated in test tubes with 10 mL of agar medium without nutrient addition, according to Pereira et al. (2010).

Plants were kept in a growth room with controlled temperature ( $25^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ ) and photoperiod of 16 hours with light intensity of  $35 \text{ lm.s/m}^2$  provided by a white light lamp. Samples were collected on the fifth experiment day and then seedlings were separated in shoots and roots for analysis. The experimental design was completely randomized, consisting of four replications, each of them containing 80 seedlings.

## 2.2 Pigment measurement

Pigment concentration (chlorophylls and carotenoids) was determined according to method of Hiscox and Israelstam (1979) and was estimated using the formula of Lichtenthaler (1987). Shoot samples were incubated with dimethyl sulfoxide (DMSO) at  $65^\circ\text{C}$  until the tissue became depigmented. Solution absorbance was read at 470, 645 and 663  $\text{nm}$  to determine the content of Car, Chl A and Chl B. Chl content is expressed as  $\text{mg.g}^{-1}$  of fresh weight.

## 2.3 Enzymatic Assay

Shoots and roots were homogenized, according to Zhu et al. (2004), in 0.05M sodium phosphate buffer with the addition of 1mM EDTA and 1% Triton X -100 using 1g of frozen tissue sample in 3mL of buffer. The homogenate was centrifuged at  $13.000\text{g}$  for 20 min at  $4^\circ\text{C}$ . The supernatant was used for enzyme activity analysis and protein quantification.

### 2.3.1. Catalase (CAT)

Catalase activity was analyzed by modified method of Aebi (1984) in shoots and roots, through  $\text{H}_2\text{O}_2$  (hydrogen peroxide) consumption monitoring by measuring the absorbance decrease at 240  $\text{nm}$ . The reaction contained  $\text{H}_2\text{O}_2$  15 mM,  $\text{KPO}_4$  50 mM buffer (pH 7.0) and 30 mL of the sample analyzed. The activity was expressed in  $\Delta\text{E}/\text{min}/\text{mg}$  protein.

### 2.3.2. Superoxide dismutase (SOD)

SOD enzyme activity was determined in shoot and root samples as Giannopolitis and Ries (1977) methodology. A mix consisting of 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.8), 13 mM methionine, 0.1  $\mu\text{M}$  EDTA, Nitroblue tetrazolium (NBT) 75  $\mu\text{M}$  and 2  $\mu\text{M}$  riboflavin was used for reaction. This mix was added to each sample and then exposed to light (15 watts lamp) for 10 minutes. During this reaction, blue formazan formation from NTB occurred and the absorbance was read at 560  $\text{nm}$ . Results were expressed as U SOD/mg protein, where one unit of SOD is the amount of enzyme able to inhibit 50 % of NBT photoreduction (Beauchamp and Fridovich, 1971).

### 2.3.3. Guaiacol peroxidase (GPOX)

Guaiacol peroxidase activity was assayed in shoots and roots, over  $\text{H}_2\text{O}_2$  consumption monitoring by absorbance decrease at 470  $\text{nm}$ , in reaction containing  $\text{H}_2\text{O}_2$  3 mM, guaiacol 15 mM, potassium phosphate buffer 100 mM (pH 6.5) and 50 mL of sample to be analyzed, according to Zeraik et al. (2004). The activity was expressed as  $\mu\text{mol tetraguaiacol min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  protein.

#### **2.4. Determination of hydrogen peroxide levels**

Concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the shoot and root sample was determined following the method of Loreto and Velikova (2001). Samples were homogenized with 0.1 % TCA, and then the homogenate was centrifuged at 10.000g for 15 minutes at 4°C. Hydrogen peroxide concentration was obtained by reaction absorbance with 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) and 1M potassium iodide, at 390 nm and comparing to a standard curve. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content was expressed as µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/g fresh weight.

#### **2.5. Determination of lipid peroxidation (TBARS)**

Lipid peroxidation levels were verified according to the method of El- Moshaty et al. (1993), by quantifying the malondialdehyde (MDA) concentration, which is the product of lipid peroxidation, through reaction with thiobarbituric acid (TBA). Shoot and root samples were subjected to homogenization process with 0.2M citrate phosphate buffer (pH 6.5) containing 0.5 % Triton X -100. Equal volume of sample and reagent, 20 % TCA containing 0.5 % TBA, was used. Subsequently, samples with the reagent were left in water bath at 95°C during 40 minutes. At the end of incubation period, they were immediately transferred to cooling for 15 minutes. After that, the samples were centrifuged at 10,000g for 10 minutes. Then, the supernatant was read at 532 nm and 600 nm absorbance. The concentration of MDA (Malondialdehyde) in sample was expressed as ηM MDA/mg protein.

#### **2.6 Protein determination**

Protein content was determined using the Coomassie Blue procedure, according to Bradford (1976), which uses bovine serum albumin as standard. Values are expressed in mg/g fresh tissue.

#### **2.7 Statistical analysis**

Results are expressed in mean ± SD, four independent replicates were considered. Data were analyzed using two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc. Differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

### **3. Results**

Statistical analysis considered two factors: Difference among cultivars and response of each genotype in presence or absence of Al. When both factors in plants were affected by Al, there was an interaction.

#### **3.1. Pigments measurement**

Genotypes exposure to 740µM of Al (UFRGS 17 Al, URS Charrua Al and URS Guria Al) presented no significant differences in content of Carotenoids (Fig. 1A), Chlorophyll A (Fig. 1B), Chlorophyll B (Fig. 1C) and total chlorophyll (Fig.1D) when compared to control (UFRGS 17 CTL, URS Charrua CTL and URS Guria CTL). In addition, there were no differences between genotypes within each treatment.

#### **3.2. Antioxidant enzyme activities**

Presence of Al decreased significantly oat shoot CAT activity ( $p < 0.0001$ ). Genotypes UFRGS 17 Al and URS Charrua Al reduced CAT activity by 52% and 50%, respectively in relation to its control (UFRGS 17 CTL, URS Charrua CTL) (Fig. 2A). It might be observed that within each treatment, there were no differences among genotypes in shoots. Al exposure decreased CAT activity in roots (Fig. 2B), which presents an interaction of factors analyzed ( $p < 0.0008$ ). Also, URS Charrua Al had a reduction of enzyme activity to 72% when compared to control (URS Charrua CTL). Therefore, in root control there were significant differences among genotypes. The URS Charrua CTL presented higher enzyme activity than UFRGS 17 CTL (121%) and URS Guria CTL (85%).

SOD activity in oat leaves, shown in figure 2C, presented an interaction ( $p < 0.01$ ). Data revealed a decrease in SOD activity in shoots (Fig. 2C) by 61% in UFRGS 17 Al, 80% in URS Charrua Al and 54% in URS Guria Al when compared to their controls (UFRGS 17 CTL, URS Charrua CTL and URS Guria). Genotypes differed in shoot control, URS Charrua CTL and URS Guria CTL had an enzyme activity of 56% and 33% lower than UFRGS 17 CTL, respectively. Root SOD activity also showed interaction among the factors evaluated ( $p < 0.0005$ ). There was a reduction in enzyme activity in oat roots (Fig. 2D) for URS Charrua Al (50%) and URS Guria Al (68%) when compared to control (URS Charrua CTL and URS Guria CTL). However, UFRGS 17 Al showed a rise of 242% in SOD activity in comparison to UFRGS 17 CTL. The enzyme activity in roots in absence of Al was lower in UFRGS 17 (63%) than URS Charrua and URS Guria than UFRGS 17. On the other hand, the SOD activity in UFRGS 17 Al was higher than URS Charrua (148%) and URS Guria (297%) in presence of aluminum.

GPOX activity of seedlings (Fig. 2E) in leaves showed no difference in genotypes comparison in each treatment (presence or absence of aluminum) ( $p > 0.05$ ), similarly to treatments when compared to each genotype. There were significant differences ( $p < 0.0002$ ) among genotype responses in roots (Fig. 2F) in absence of Al: URS Guria presented higher GPOX activity than UFRGS 17 (131%) and URS Charrua (75%). Similar results were observed in Al presence. URS Guria showed higher enzyme activity than other genotypes. However, there were no changes in root enzyme activity when each genotype was compared both in absence and presence of Al.

### 3.3. Lipid peroxidation and hydrogen peroxide levels

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MDA content in shoots of seedlings (Fig. 3A and 3C) did not show significant differences ( $p > 0.05$ ) in relation to the presence of Al when compared to control in each genotype, or when genotypes were compared to each other in presence or not of Al. It was also verified in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content of roots (Fig. 3B). Nevertheless, MDA content showed an increase just in URS Guria Al when compared to URS Guria CTL ( $p < 0.01$ ), other comparisons in these samples revealed no substantial difference.

## 4. Discussion

Results indicated constant chlorophyll content in presence of Al. Besides, other studies show that Al may reduce the amount of almost all organic nutrients of plants (Matsumoto, 2000) and this reduction can be related to the inhibition of ALA-D activity (Pereira et al., 2006). Using similar dose, Ziaei et al. (2014) found a pigment decrease, mainly in chlorophyll A, chlorophyll B, and total chlorophyll in two varieties of sunflower. The same situation was demonstrated by Karimaei (2016) with spinach and Al, which presented chlorophyll content decrease as Al dose increases. We can suggest that in this work, plants can present an external detoxification mechanism that was proposed by Pereira et al. (2011) for UFRGS 17. On the other hand, the exposure time may not have been enough for Al to cause damage in leaf cells, because in vitro growth system does not permit more time of exposure due limit of growth.

Major ROS-scavenging enzymes in seedlings include SOD and CAT (Willekens, 1997). The balance between SOD and CAT activities in cells is crucial for determining the steady-state level of superoxide radicals and hydrogen peroxide (Bowler et al. 1992). Data of this study were similar to those found by Castilhos et al. (2011), which showed that the Al exposure provoked a decrease in CAT activity. In his research, this author suggests that although high CAT activity in shoots can be more important in ROS reduction produced by photosynthesis, CAT may be responsible for the removal of ROS excess during stress. Moreover, along the time

CAT activity was verified by Pereira et al.(2013) and this enzyme showed higher activity after Al exposure in roots for 12h, 24h and 36h, and in shoots for 24h and 36h. Considering that higher oxidative status occurred in the first hours of Al exposure, low enzyme activity may indicate that it was controlled and other mechanisms were activated (Castilhos et al. 2011).

This study reveals that guaiacol peroxidase presented an increase in URS Guria under Al stress conditions. This enzyme activity increase in response to Al toxicity happens in the study of Hossain et al. (2005), who suggest that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> degradation may occur due to peroxidase activation (GPOX, CA-POX) rather than CAT and APX activities during Al stress. Sharma and Dubey stated that Al stress can cause an enhancement in peroxidase activity and suggested an important role of peroxidases in removing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> excess produced under Al toxicity. Some authors reported that involvement of guaiacol peroxidase in oxidative stress caused by metal is very important (Cuypers et al.2002; Verma and Dubey 2003).

The exposure of 740µM Al decreased SOD activity in shoots and roots of *Avena sativa* L. in most genotypes. However, UFRGS 17 (Al-tolerant) shows an increase in roots in presence of Al. Similar results show high SOD activity in UFRGS 17 with or without Al in shoots and roots, and enzyme activity decrease in sensitive seedlings (Pereira et al. 2011).

A common feature of several stresses including Al toxicity is perturbation of cell redox homeostasis and, as a consequence, the enhanced production of reactive oxygen species (ROS). No effect about Al toxicity could be observed in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content of shoots and roots in this study. In Castilhos et al. (2011) research, the same Al dose showed slight differences among seedlings of oat exposed or not to Al. Nonetheless, the exposure to Al increases the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content in oat in same rate as Al dose (Pereira et al. 2011). Lipid peroxidation levels showed no changes in exposure to Al in genotypes, similar results were found by Castilhos et al. (2011). No effect of Al presence in this parameter with Al doses variation was found by Pereira et al. (2011) in tolerant genotype.

The URS Charrua and URS Guria can be rated as Al-tolerant, because they presented similar antioxidant response to UFRGS 17, and have already presented significant capacity of root regrowth in another research (Hervé et al. 2013). Three genotypes demonstrated efficient antioxidant system, which kept the peroxide levels similar to control group as well as lipid peroxidation levels. Notwithstanding, the pathways of oxidative stress control could be performed through other antioxidant mechanisms, since some enzymes did not present activity changes in seedling exposure to Al toxicity.

In conclusion, the data from this study indicate that Al tolerance had different mechanisms in *Avena sativa* L shoots and roots in different genotypes. Each genotype presented different antioxidant mechanism, since activated enzymes for each genotype were not the same. , but all genotypes presented a response to oxidative stress keeping the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels similar to control situation. However, we can suggest that the antioxidant system is not the main mechanism used by these plants in Al tolerance.

#### **Acknowledgements**

The authors would like to thank the Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support; Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Laboratório de Enzimologia Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) for the opportunity and infrastructure to develop this research and Programa de Melhoramento de Aveia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) for seeds loaning for the experiments.



## 5. References

- AEBI H (1984) Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105:121-126.
- BEAUCHAMP C, FRIDOVICH I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochemistry* 8(44):276–287.
- BOWLER C, CAMP VW, MONTAGU V, INZÉ D (1992) Superoxide Dismutase and Stress Tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43:83-116.
- BRADFORD M (1976) A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:p.248-250.
- BREUSEGEM FV, VRANOVÁ E, DAT JF, INZÉ D (2001) The Role of Active Oxygen Species in Plant Signal Transduction. *Plant Science* 161:405-414.
- CASTILHOS G, FARIAS JG, SCHNEIDER AB, OLIVEIRA PH, NICOLOSO FT, SCHETINGER MRC, DELATORRE CA (2011) Aluminum-Stress Response in Oat Genotypes with Monogenic Tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 74:114-121.
- CECCON G, GRASSI FILHO H, BICUDO SJ (2004) Rendimento de Grãos de Aveia Branca (*Avena sativa* L.) em Densidades da Plantas e Doses de Nitrogênio. *Ciência Rural* 34(6):1723-1729.
- CHAFFAI R, MARZOUK B, FERJAN E (2005) Aluminum Mediates Compositional Alterations of Polar Lipid Classes in Maize Seedlings. *Phytochemistry* 66:1903-1912.
- CHEN L.S, QI YP, LIU XH (2005) Effects of aluminum on light energy utilization and photoprotective systems in citrus leaves. *Ann Bot* 96:35-41.
- CUYPERS A, VANGRONSVELD J, CLIJSTERS H (2002) Peroxidases in roots and primary leaves of *Phaseolus vulgaris*, copper and zinc phytotoxicity: a comparison. *J Plant Physiol* 159:869–876.
- DRÖGE W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* 82:47- 85.
- EL-MOSHATY FIB, PIKE SM, NOVACKY AJ, SEHGAL OP (1993) Lipid peroxidation and superoxide production in cowpea (*Vigna unguiculata*) leaves infected with tobacco ringspot virus or southern bean mosaic virus. *Physiological Molecular Plant Pathology* 43:109– 119.
- GADJEV I, VANDERAUWERA S, GECHEV TS, LALOI C, MINKOV IN, SHULAEV V, APEL K, INZE D, MITTLER R, BREUSEGEM FV (2006) Transcriptomic Footprints Disclose Specificity of Reactive Oxygen Species Signaling in Arabidopsis. *Plant Physiology* 141:436–445.
- GIANNOPOLITIS CN, RIES SK (1977) Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings. *Journal of Plant Physiology* 48(59):315-318.
- HARTWIG I, OLIVEIRA AC, CARVALHO FIF, BERTAN I, SILVA JAG, SCHMIDT DAM, VALÉRIO IP, MAIA LC, FONSECA DAR, REIS CES (2007) Associated Mechanisms of Al Tolerance in Plants. *Semina: Ciências Agrárias* 28(2):219-228.
- HISCOX JD, ISRAELSTAM GE (1979) A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Can J Bot* 57: 1132–1134.
- HERVÉ CB, CALAI FA, NAVA IC, DELATORRE CA (2013) Al tolerance in elite Brazilian oat germplasm. *Ciência Rural* 43(8):1364-1370.
- HOSSAIN MA, HOSSAIN AKMZ, KIHARA T, KOYAMA H, HARA T (2005) Al-Induced Lipid Peroxidation and Lignin Deposition Are Associated with an Increase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Generation in Wheat Seedlings. *Soil Science and Plant Nutrition* 51(2):223-230.

- KARIMAEI M, POOZESH V (2016) Effects of Al toxicity on plant height, total chlorophyll (Chl a+b), potassium and calcium contents in spinach (*Spinacia oleracea L.*). *Intl J Farm & Alli Sci* 5(2):76-82.
- KOCHIAN LV (1995) Cellular Mechanisms of Aluminum Toxicity and Resistance in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 46(1):237-260.
- KOCHIAN LV, HOEKENGA OA, PIÑEROS MA (2004) How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of Al tolerance and phosphorous efficiency. *Annu Rev Plant Biol* 55:459-493.
- KOCHIAN LV, PIÑEROS MA, HOEKENGA OA (2005) The Physiology, Genetics and Molecular Biology of Plant Aluminum Resistance and Toxicity. *Plant and Soil* 274:175-195.
- LICHTENTHALER HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol* 148:350-382.
- LORETO F, VELIKOVA V (2001) Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Plant Physiology* 127:1781-1787.
- MACHADO PLOA (1997) Considerações gerais sobre a toxicidade do alumínio nas plantas. *EMBRAPA CNPS* 22p.
- MATSUMOTO H (2000) Cell biology of Al toxicity and tolerance in higher plants. *International Review Cytology* 200:1-46.
- MITTLER R (2002) Oxidative Stress, Antioxidants and Stress Tolerance. *Trends in Plant Science* 7(9):405-410
- NAVA IC, DELATORRE CA, DE LIMA DUARTE IT, PACHECO MT, FEDERIZZE LC (2006) Inheritance of Aluminum Tolerance and its Effects on Grain Yield and Grain Quality in Oats (*Avena sativa L.*). *Euphytica* 148:353-358.
- NETO ADA, PRISCO JT, FILHO JE, MEDEIROS JVR, FILHO EG (2005) Hydrogen Peroxide Pre-Treatment Induces Salt-Stress Acclimation in Maize Plants. *Journal of Plant Physiology* 162:1114-1122.
- OLIVEIRA PH, FEDERIZZI LC, MILACH SCK, GOTUZZO C, SAWASATO JT (2005) Inheritance in oat (*Avena sativa L.*) of tolerance to soil Al toxicity. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 5:125-133.
- PEIXOTO PH, DA MATTA FM, CAMBRAIA J (2002) Responses of the photosynthetic apparatus to aluminum stress in two sorghum cultivars. *J Plant Nutr* 25:821-832.
- PEREIRA LB, TABALDI LA, GONÇALVES JF, JUCOSKI GO, PAULETTO MM, WEIS SN, NICOLOSO FT, BORHER D, ROCHA JBT, SCHETINGER MRC (2006) Effect of Al on d-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) and the development of cucumber (*Cucumis sativus L.*). *Environ Exp Bot* 57:106-115.
- PEREIRA LB, MAZZANTI CMA, GONÇALVES JF, CARGNELUTTI D, TABALDI LA, BECKER AG, CALGAROTO NS, FARIAS JG, BATTISTI V, BOHRER D, NICOLOSO FT, MORSCH VM, SCHETINGER MRC (2010) Al-induced oxidative stress in cucumber. *Plant Physiology and Biochemistry* 48:683-689.
- PEREIRA LB MAZZANTI CMA, CARGNELUTTI D, ROSSATO LV, GONÇALVES JF, CALGAROTO N, DRESSLER V, NICOLOSO FT, FEDERIZZI LC, MORSCH VM, SCHETINGER MRC (2011) Differential Responses of Oat Genotypes: Oxidative Stress Provoked by Aluminum. *Biometals* 24(1):73-83.
- PEREIRA LB, CARGNELUTTI D, ROSSATO LV, GONÇALVES JF, TABALDI LA, SCHMATZ R, VIEIRA JM, DRESSLER V, NICOLOSO FT, FEDERIZZI LC, MORSCH VM, SCHETINGER MRC (2013) Differential Speed of Activation in Antioxidant System in Three Oat Genotypes. *Journal of Inorganic Biochemistry* 128:202-207.

- RYAN PR, DITOMASO JM, KOCHIAN LV (1993) Al toxicity in roots – An investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. *Journal of Experimental Botany* 44(2):437-446.
- RYAN PR, DELHAIZE E (2010) The Convergent Evolution of Aluminum Resistance in Plants Exploits a Convenient Currency. *Functional Plant Biology* 37:275–284.
- SANCHEZ-CHACON CD, FEDERIZZI LC, MILACH, SCK, PACHECO MT (2000) Variabilidade genética e herança da tolerância à toxicidade do alumínio em aveia. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 35:1797–1808.
- SCHÜTZENDÜBEL A, POLLE A (2005) Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany* 53:1351–1365.
- SHARMA P, DUBEY RS (2007) Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of Al. *Plant Cell Rep* 26:2027–2038.
- SOARES MAS, MACHADO OLT (2007) Defesa de Plantas: Sinalização Química e Espécies Reativas de Oxigênio. *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas* 1(1):9-19.
- VERMA S, DUBEY RS (2003) Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Sci* 164:645–655.
- VON UEXKÜLL HR, MUTERT E (1995) Global extent, development and economic impact of acid soils. *Plant and Soil* 171:1–15.
- WAGNER CW, MILACH SCK, FEDERIZZI LC (2001) Genetic inheritance of Al tolerance in oat. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 1:22–26.
- WILLEKENS H (1997) Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defense in C-3 plants. *Embo J* 16:4806-4816.
- YAMAMOTO Y, MATSUMOTO H, DEVI SR (2003) An intracellular mechanism of Al tolerance associated with high antioxidant status in cultured tobacco cells. *Journal of Inorganic Biochemistry* 97:59-68.
- ZERAIK AE, SOUZA FS, FATIBELLO-FILHO O (2004) Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. *Química Nova* 31:731-734.
- ZHANG YH, ZHANG ZP, GUO TR (2007) Physiological changes in barley plants under combined toxicity of Al, copper and cadmium. *Colloids and Surfaces* 57:182-188.
- ZHU Z, WEI G, LI J, QIAN Q, YU J (2004) Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Science* 167:527-533.
- ZIAEI N, REZAIATMAND Z, RANJBAR M (2014). Study of Al Toxicity on Photosynthetic Pigment, Soluble Sugars and Proline Contents in Two Sunflower Varieties. *Reserarch on Crop Ecophysiology* 9(1):p.105 – 113.

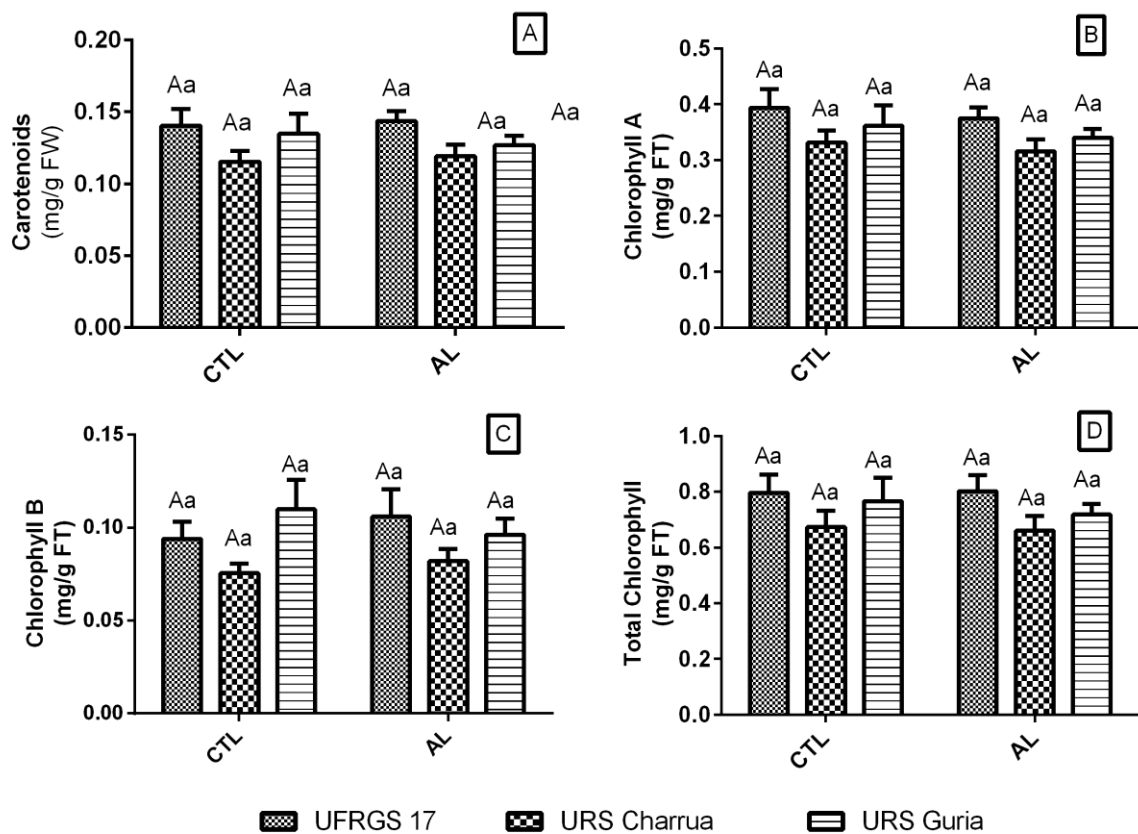


Figure 1. Effect of Al exposure (740 μM/L) on chlorophyll content in oat shoots (A) Carotenoids, (B) chlorophyll A, (C) chlorophyll B and (D) total chlorophyll levels. Data represent the mean ± SD of three different replicates. Different letters indicate statistical differences at  $p < 0.05$ . Capital letters compare genotypes within each group. Small letters compare each genotype between treatments (CTL X Al).

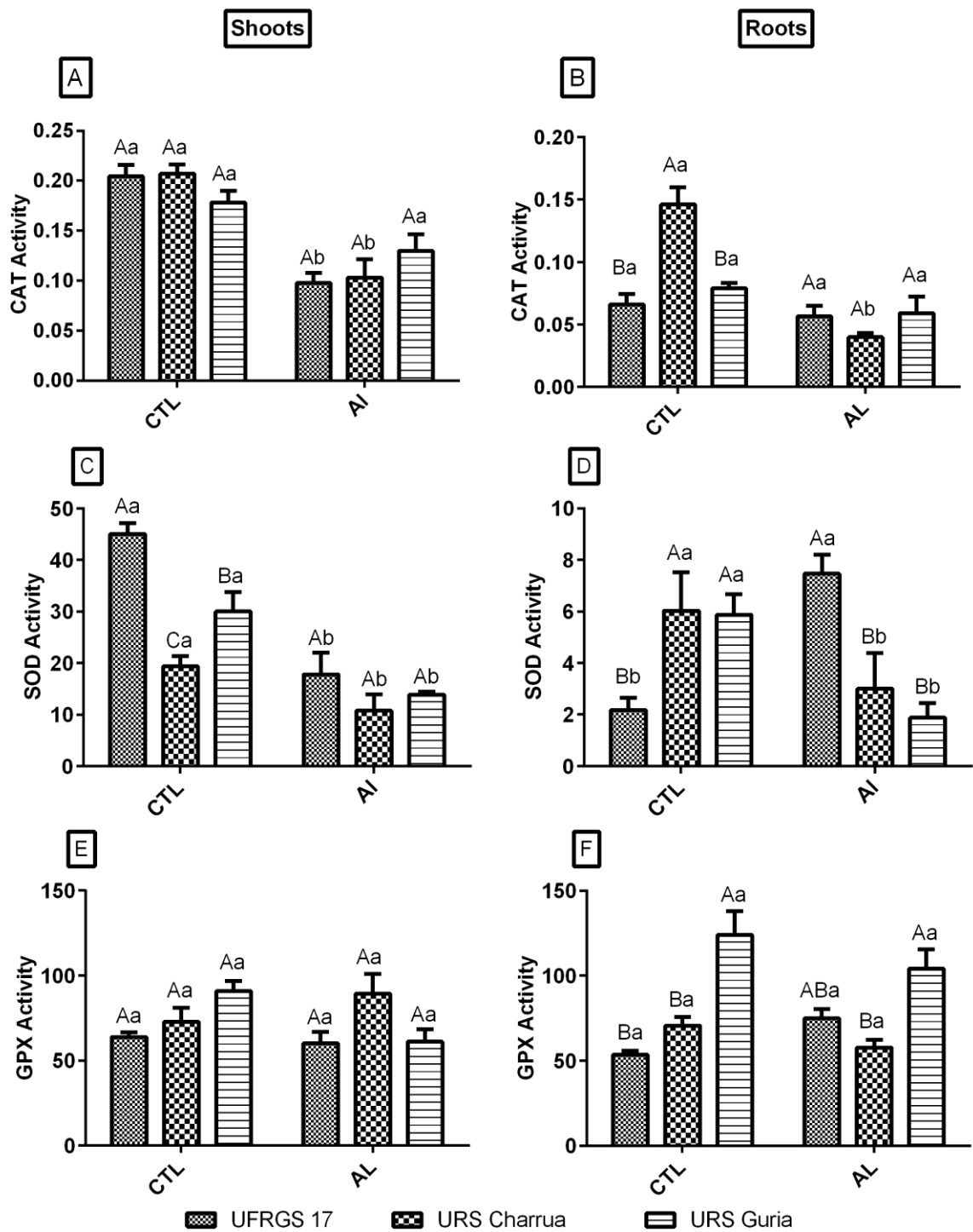


Figure 2. Antioxidant activity in oat shoots and roots after exposure to Al (740  $\mu$ M/L) during 5 days: (A) CAT, (B) SOD, (C) GPOX. Data represent the mean  $\pm$  SD of three different replicates. Different letters indicate statistical differences at  $p < 0.05$ . Capital letters compare genotypes within each group. Small letters compare each genotype between treatments (CTL X AL).

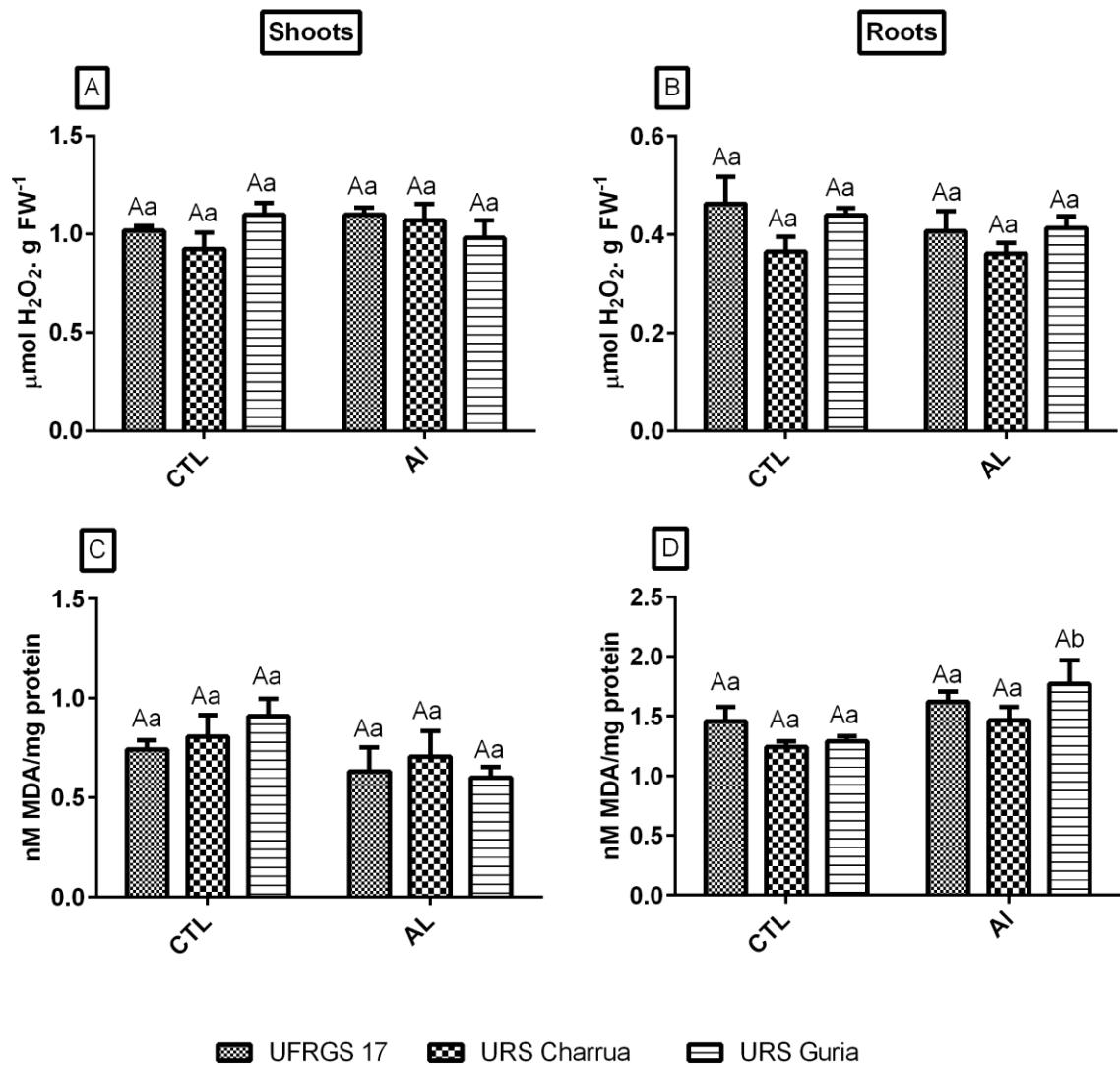


Figure 3. Hydrogen peroxide and lipid peroxidation levels in oat shoots and roots with or without exposure to Al (740  $\mu\text{M/L}$ ) during 5 days (A)  $\text{H}_2\text{O}_2$  in shoots, (B)  $\text{H}_2\text{O}_2$  in roots, (C) lipid peroxidation in shoots, (D) lipid peroxidation in roots. Data represent the mean  $\pm$ SD of three different replicates. Different letters indicate statistical differences at  $p < 0.05$ . Capital letters compare genotypes within each group. Small letters compare each genotype between treatments (CTL X Al).

### 3 CONCLUSÕES

1. As concentrações de pigmentos não foram alteradas nas plantas quando expostas ao alumínio, em relação as plantas que não foram expostas ao metal. Considerando que literatura demonstra que a toxicidade do Al ocasiona redução na concentração de pigmentos em folhas, pode-se concluir que o tempo de exposição não tenha sido suficiente para que esses danos ocorressem, ou os mecanismos de tolerância foram eficientes em evitar a entrada do Al pela raiz.
2. A atividade das enzimas CAT e SOD foi reduzida na presença de Al em folhas e raízes, levando-nos a sugerir que o metal possa estar inibindo a atividade das enzimas por competir pelos grupos -SH das mesmas. Além disso, essa atividade pode estar sendo compensada pela atividade de outras enzimas antioxidantes não analisadas nesse estudo. A enzima GPOX demonstra a viabilidade dessa possibilidade, visto que é conhecida por atuar em estresses ocasionados por metais quando enzimas como CAT e APX estão inibidas, e nesse estudo não apresentou redução da atividade quando as plantas foram submetidas a toxicidade do Al.
3. Os níveis de peroxidação lipídica não apresentaram diferenças significativas entre os genótipos quando expostos ao alumínio, bem como os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Pode-se observar, através desses dados, que o sistema antioxidante se mostra eficiente em controlar essas variáveis nos três genótipos.
4. As respostas frente a toxidez do Al diferiram entre os genótipos, demonstrando que a tolerância de cada um é conferida por diferentes mecanismos, que não envolvem somente o sistema antioxidante. Cada genótipo responde de formas diferentes a exposição ao alumínio, levando a supor que a resposta é dependente das características de cada genótipo, e não é uma característica generalizada de plantas tolerantes. Visto isso, torna-se extremamente importante prosseguir com investigações em níveis moleculares para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na tolerância, além de possibilitar a seleção dos caracteres mais benéficos para diferentes culturas.

## REFERÊNCIAS

- ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role of Superoxide Dismutases (SODs) in Controlling Oxidative Stress in Plants. **Journal of Experimental Botany**. v. 53, p. 1331-1341, 2002.
- APEL, K.; HIRT, H. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. **Annual Review of Plant Biology**. v. 55, p. 373-399, 2004.
- ASADA, K. The Water-Water Cycle in Chloroplasts: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v. 50, p. 601-639, 1999.
- BARBOSA NETO, J. F.; MATIELLO, R. R.; CARVALHO, F. I. F.; OLIVEIRA, J. M. S.; PEGORARO, D. G.; SCHNEIDER, F.; SORDI, M. E. B.; VACARO, E. Progresso Genético no Melhoramento da Aveia-Branca no Sul do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 35, n. 8, p. 1605-1612, 2000.
- BOWLER C.; CAMP, V. W.; MONTAGU, V.; INZÉ, D. Superoxide Dismutase and Stress Tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v. 43, p. 83-116, 1992.
- BREUSEGEM, F. V.; VRANOVÁ, E.; DAT, J. F.; INZÉ, D. The Role of Active Oxygen Species in Plant Signal Transduction. **Plant Science**. v. 161, p. 405-414, 2001.
- CASTILHOS, G.; FARIAS, J. G.; SCHNEIDER, A. B.; OLIVEIRA, P. H.; NICOLOSO, F. T.; SCHETINGER, M. R. C.; DELATORRE, C. A. Aluminum-Stress Response in Oat Genotypes with Monogenic Tolerance. **Environmental and Experimental Botany**. v. 74, p. 114-121, 2011.
- CECCON, G.; GRASSI FILHO, H.; BICUDO, S. J. Rendimento de Grãos de Aveia Branca (*Avena sativa L.*) em Densidades da Plantas e Doses de Nitrogênio. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 34, n. 6, p. 1723-1729, 2004.
- CHAFFAI, R.; MARZOUK, B.; FERJAN, E. Aluminum Mediates Compositional Alterations of Polar Lipid Classes in Maize Seedlings. **Phytochemistry**. v. 66, p. 1903-1912, 2005.
- CHEN, L.; QI, Y.; JIANG, H.; YANG, L.; YANG, G. Photosynthesis and Photoprotective Systems of Plants in Response to Aluminum Toxicity. **African Journal of Biotechnology**. v. 9, n. 54, p. 9237-9247, 2010.



CHEN, R. F.; ZHANG, F. L.; ZHANG, Q. M.; SUN, Q. B.; DONG, X. Y.; SHEN, R. F. Aluminium–phosphorus Interactions in Plants Growing on Acid Soils: Does Phosphorus Always Alleviate Aluminium Toxicity? **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 92, p. 995-1000, 2012.

COFFMAN, F. A. Oats and Oat Improvement. Madison: **American Society of Agronomy**. 650 p., 1961.

CRESTANI, M.; SILVA, J. A. G.; TESSMANN, E. W.; MEZZALIRA, I.; OLIVEIRA, A. C.; CARVALHO, F. I. F. A Proposal for Aluminum Tolerance Selection in White Oat under Hydroponic Conditions. **Journal of Crop Science and Biotechnology**. v. 14, n. 1, p. 71-77, 2011.

DARKO, E.; AMBRUS, H.; STEFANOVITS-BÁNYAI, E.; FODOR, J.; BAKOS, F.; BARNABÁS, B. Aluminum Toxicity, Al Tolerance and Oxidative Stress in an Al-sensitive Wheat Genotype and in Al-tolerant Lines Developed by in Vitro Microspore Selection. **Plant Science**. v. 166, p. 583-591, 2004.

DEL RÍO, L. A.; CORPAS, F. J.; SANDALIO, L. M.; PALMA, J. M.; GÓMEZ, M.; BARROSO, J. B.; Reactive Oxygen Species, Antioxidant Systems and Nitric Oxide in Peroxisomes. **Journal of Experimental Botany**. v. 53, p. 1255-1272, 2002.

DEL RIO, L. A.; SANDALIO, L. M.; ALTOMARE, D. A.; ZILINSKAS, B. A. Mitochondrial and Peroxisomal Manganese Superoxide Dismutase: Differential Expression During Leaf Senescence. **Journal of Experimental Botany**. v. 54, p. 923-933, 2003.

DEL RIO, L.A.; SANDALIO, L. M.; CORPAS, F. J.; PALMA, J. M.; BARROSO, J. B. Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species in Peroxisomes. Production, Scavenging, and Role in Cell Signaling. **Plant Physiology**. v. 141, p. 330-335, 2006.

DELHAIZE, E.; RYAN, P. R.; RAMAN, H.; GUPTA, S.; HORST, W. J. A. Second Mechanism for Aluminum Resistance in Wheat Relies on the Constitutive Efflux of Citrate from Roots. **Plant Physiology**. v. 149, p. 340-351, 2009.

DELHAIZE, E.; RYAN, R. P.; MA, F. J. Aluminum Tolerance in Plants and the Complexing Role of Organic Acids. **Trends in Plant Science**. v. 6, p. 273-278, 2001.

DONG, B.; SANG, W. L.; JIANG, X.; ZHOU, J. M.; KONG, F. X.; HU, W.; WANG, L. S. Effects of Aluminum on Physiological Metabolism and Antioxidant System of Wheat (*Triticum aestivum* L.). **Chemosphere**, v. 47, p. 87-92, 2002.

EZAKI, B.; GARDNER, R. C.; EZAKI, Y.; MATSUMOTO, H. Expression of Aluminum-induced Genes in Transgenic Arabidopsis Plants Can Ameliorate Aluminum Stress and/or Oxidative Stress. **Plant Physiology**. v. 122, p. 657-665, 2000.

FEDERIZZI, L. C.; MILACH, S. C. K.; PACHECO, M. T.; BARBOSA NETO, J. F.; SERENO, M. J. C. M. Melhoramento da Aveia. Em: BOREM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, p. 141-169,. 2005.

FOY, C. D. Physiological Effects of Hydrogen, Aluminum, and Manganese Toxicities in Acid Soil. Em: Soil Acidity and Liming. ADAMS, F. (ed.). **American Society of Agronomy**, Madison, p. 57-97, 1984.

FOY, C. D.; FLEMING, A. L. The Physiology of Plant Tolerance to Excess Available Aluminum and Manganese in Acid Soils. In: JUNG, G. A. Crop Tolerance to Suboptimal Land Condition. Madison: **Soil Science Society of American**, p. 301-338, 1978.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox Homeostis and Antioxidant Signaling: a Metabolic Interface Between Stress Perception and Physiological Responses. **Plant Cell**. v. 17, p. 1866-1875, 2005.

GADJEV, I.; VANDERAUWERA, S.; GECHEV, T. S.; LALOI, C.; MINKOV, I. N.; SHULAEV, V.; APEL, K.; INZE, D.; MITTLER, R.; BREUSEGEM, F. V. Transcriptomic Footprints Disclose Specificity of Reactive Oxygen Species Signaling in Arabidopsis. **Plant Physiology**. v. 141, p. 436-445, 2006.

GIANNAKOULA, A. Aluminum Tolerance in Maize is Correlated with Increased Levels of Mineral Nutrients, Carbohydrates and Proline, and Decreased Levels of Lipid Peroxidation and Al Accumulation. **Journal of Plant Physiology**. v. 165, p. 385-396, 2008.

GILL, S. S.; KHAN, N. A.; ANJUM, N. A.; TUTEJA, N. Amelioration of Cadmium Stress in Crop Plants by Nutrients Management: Morphological, physiological and biochemical aspects. **Plant Stress**. v. 5, p. 1-23, 2011.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive Oxygen Species and Antioxidant Machinery in Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 48, p. 909-930, 2010.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine, 3. ed. New York: **Oxford Science Publications**, 1999.

HARINASUT, P.; POONSOPA, D.; ROENGMONGKOL, K.; CHAROENSATAPORN, R. Salinity Effects on Antioxidant Enzymes in Mulberry Cultivar. **Science Asia**. v. 29, p. 109-113, 2003.

HARTWIG, I.; SILVA, J. A. G.; CARVALHO, F. I. F.; OLIVEIRA, A. C.; BERTAN, I.; VALÉRIO, I. P.; SILVA, G. O.; RIBEIRO, G.; FINATTO, T.; SILVEIRA, G. Variabilidade Fenotípica de Caracteres Adaptativos da Aveia Branca (*Avena sativa L.*) em Cruzamentos Dialélicos. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 37, n. 2, p. 337-345, 2007.

HAWERROTH, M. C.; BARBIERI, R. L.; DA SILVA, J. A. G.; CARVALHO, F. I. F. DE; OLIVEIRA, A. C. Importância e Dinâmica de Caracteres na Aveia Produtora de Grãos. **Embrapa Clima Temperado**. Pelotas, RS, 2014.

INZÉ, D.; MONTAGU, M. V. Oxidative Stress in Plants. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 6, p. 153-158, 1995.

JANSEN, S.; BROADLEY, M. R.; ROBBRECHT, E.; SMETS, E. Aluminum Hyperaccumulation in Angiosperms: A review of its phylogenetic significance. **The Botanical Review**. v. 68, p. 235-269, 2002.

JONES, A. Does the Plant Mitochondrion Integrate Cellular Stress and Regulate Programmed Cell Death? **Trends Plant Science**. v. 5, p. 273-278, 2000.

KHAN, N. A.; SINGH, S. Abiotic Stress and Plant Responses, **IK International**, New Delhi, 2008.

KINRAIDE, T. B. Identity of the Rhizotoxic Aluminum Species. **Plant and Soil**. v. 134, p. 167-178, 1991.

KOBAYASHI, Y.; KOBAYASHI, Y.; WATANABE, T.; SHAFF, J. E.; OHTA, H.; KOCHIAN, L. V.; WAGATSUMA, T.; KINRAIDE, T. B.; KOYAMA, H. Molecular and Physiological Analysis of Al<sup>3+</sup> and H<sup>+</sup> Rhizotoxicities at Moderately Acidic Conditions. **Plant Physiology**. v. 163, p. 180-192, 2013.

KOCHIAN, L. V. Cellular Mechanisms of Aluminum Toxicity and Resistance in Plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v. 46, n. 1, p. 237-260, 1995.

KOCHIAN, L. V.; PIÑEROS, M. A.; HOEKENGA, O. A. The Physiology, Genetics and Molecular Biology of Plant Aluminum Resistance and Toxicity. **Plant and Soil**. v. 274, p. 175-195, 2005.

LARSEN, P. B.; TAI, C. Y.; STENZELER, L.; DEGENHARDT, J.; HOWELL, S. H.; KOCHIAN, L. V. Aluminum Resistant Arabidopsis Mutants that Exhibit Altered Patterns of Aluminum Accumulation and Organic Acid Release from Roots. **Plant Physiology**. v. 117, p. 9-18, 1998.

MA, J. F.; RYAN, P. R.; DELHAIZE, A. Aluminium Tolerance in Plants and the Complexing Role of Organic Acids. **Trends in Plant Science**. v. 6, n. 6, p. 273-278, 2001.

MACARI, S.; ROCHA, M. G.; RESTLE, J.; PILAU, A.; FREITAS, F. K.; NEVES, F. P. Avaliação da Mistura de Cultivares de Aveia Preta (*Avena strigosa Schreb*) com Azevém (*Lolium multiflorum Lam.*) sob Pastejo. **Ciência Rural**. v. 36, p. 910-915, 2006.

MACHADO, P. L. O. A. Considerações Gerais Sobre a Toxicidade do Alumínio nas Plantas. **EMBRAPA CNPS**. Rio de Janeiro: 22 p. 1997.

MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, Salinity and Drought Stresses: an Overview, **Archives of Biochemintry and Biophysics**. v. 444, p. 139-158, 2005.

MARRONI, N. P. Estresse Oxidativo e Antioxidante. **Ed. Ulbra**. Canoas, p. 27-38, 2002.

MERÍÑO-GERGICHEVIC, C.; ALBERDI, M.; IVANOV, A. G.; REYES-DIAZ, M.  $Al^{3+}$  –  $Ca^{2+}$  Interaction in Plants Growing in Acid Soils: Al-phytotoxicity Response to Calcareous Amendments. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**. v. 10, p. 217-243, 2010.

MIGUEL, P. S. B. et al. Efeitos Tóxicos do Alumínio no Crescimento das Plantas: Mecanismos de Tolerância, Sintomas, Efeitos Fisiológicos, Bioquímicos e Controles Genéticos. **CES Revista**. v. 24, p. 13-29, 2010.

MITTLER, R. Oxidative Stress, Antioxidants and Stress Tolerance. **Trends in Plant Science**. v. 7, p. 405-410, 2002.

MORAN, J. F.; JAMES, E. K.; RUBIO, M. C.; SARATH, G.; KLUCAS, R. V.; BECANA, M. Functional Characterization and Expression of a Cytosolic Iron-Superoxide Dismutase from Cowpea Root Nodules. **Plant Physiology**. v. 133, p. 773-82, 2003.

NAVA, I.C.; DELATORRE, C.A.; DE LIMA DUARTE, I.T.; PACHECO, M.T.; FEDERIZZE, L.C. Inheritance of Aluminum Tolerance and its Effects on Grain Yield and Grain Quality in Oats (*Avena sativa L.*). **Euphytica**. v.148, p.353–358, 2006.

NETO, A. D. A.; PRISCO, J. T.; FILHO, J. E.; MEDEIROS, J. V. R.; FILHO, E. G. Hydrogen Peroxide Pre-Treatment Induces Salt-Stress Acclimation in Maize Plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, p. 1114-1122, 2005.

OSAKI, M.; WATANABE, T.; TADANO, T. Beneficial Effect of Aluminum on Growth of Plants Adapted to Low pH Soils. **Plant Nutrition**. v. 43, p. 551-563, 1997.

PANDEY, S.; CEBALHOS, H.; GRANADOS, G.; KNAPP, E. Genetics of tolerance to soil acidity in tropical maize. **Crop Sci.** v. 34, p. 1511-1514, 1994.

PEREIRA, L. B.; CARGNELUTTI, D.; ROSSATO, L. V.; GONÇALVES, J. F.; TABALDI, L. A.; SCHMATZ, R.; VIEIRA, J. M.; DRESSLER, V.; NICOLOSO, F. T.; FEDERIZZI, L. C.; MORSCH, V. M.; SCHETINGER, M. R. C. Differential Speed of Activation in Antioxidant System in Three Oat Genotypes. **Journal of Inorganic Biochemistry.** v. 128, p. 202-207, 2013.

PEREIRA, L. B.; MAZZANTI, C. M. DE A.; CARGNELUTTI, D.; ROSSATO, L. V.; GONÇALVES, J. F.; CALGAROTO, N.; DRESSLER, V.; NICOLOSO, F. T.; FEDERIZZI, L. C.; MORSCH, V. M.; SCHETINGER, M. R. C. Differential Responses of Oat Genotypes: Oxidative Stress Provoked by Aluminum. **Biometals.** v. 24, n. 1, p. 73-83, 2011.

POSCHENRIEDER, C.; GUNSÉ, B.; CORRALES, I.; BARCELÓ, J. A Glance Into Aluminum Toxicity and Resistance in Plants. **Science of the Total Environment.** v. 400, p. 356-368, 2008.

PUTHOTA, V.; CRUZ-ORTEGA, R.; JOHNSON, J.; OWNBY, J. N. An Ultrastructural Study of the Inhibition of Mucilage Secretion in the Wheat Root Cap by Aluminum. **Plant soil interactions at low pH.** p. 779-787, 1991.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies Ativas de Oxigênio na Resposta de Defesa de Plantas à Patógenos. **Fitopatologia Brasileira,** v. 28, p. 123-130, 2003.

RYAN, P. R.; DELHAIZE, E. The Convergent Evolution of Aluminum Resistance in Plants Exploits a Convenient Currency. **Functional Plant Biology.** v. 37, p. 275-284, 2010.

RYAN, P. R.; TYERMAN, S. D.; SASAKI, T.; FURUICHI, T.; YAMAMOTO, Y.; ZHANG, W. H.; DELHAIZE, E. The Identification of Aluminum-Resistance Genes Provides Opportunities for Enhancing Crop Production on Acid Soils. **Journal of Experimental Botany,** v. 62, p. 9-20, 2011.

SANTOS, R.; HÉROUART, D.; PUPPO, A.; TOUATI, D. Critical Protective Role of Bacterial Superoxide Dismutase in Rhizobium-Legume Symbiosis. **Molecular Microbiology.** v. 38, p. 750-759, 2000.

SILVA, A. L. S.; SPERLING, P.; HORST, W.; FRANKE, S.; OTT, C.; BECKER, D. A. Possible Role of Sphingolipids in the Aluminum Resistance of Yeast and Maize. **Journal of Plant Physiology.** v. 163, p. 26-38, 2006

SILVA, J. A. G.; CARVALHO, F. I. F.; COIMBRA, J. L. M.; VIEIRA, E. A.; BENIN, G.; OLIVEIRA, A. C.; FINATTO, T.; BERTAN, I.; SILVA, G. O.; CORREA, M. R. Tolerância ao Alumínio em Cultivares de Aveia Branca Sob Cultivo Hidropônico. **Bragantia**. v. 66, n. 4, p. 587-593, 2007.

SILVA, S.; RODRIGUEZ, E.; PINTO-CARNIDE, O.; MARTINS-LOPES, P.; MATOS, M.; GUEDES-PINTO, H.; SANTOS, C. Zonal Responses of Sensitive vs. Tolerant Wheat Roots During Al Exposure and Recovery. **Journal of Plant Physiology**. v. 169, p. 760-769, 2012.

SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de Plantas: Sinalização Química e Espécies Reativas de Oxigênio. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 9-19, 2007.

TAMÁS, L.; SIMONOMICOVÁ, M.; HUTTOVÁ, J.; MISTRÍK, I. Aluminium Stimulated Hydrogen Peroxide Production of Germinating Barley Seeds. **Environmental and Experimental Botany**. v. 51, p. 281-288, 2004.

TARKALSON, D. D.; PAYERO, J. O.; HERGERT, G. W.; CASSMAN, K. G. Acidification of Soil in a Dry Land Winter Wheat-Sorghum/ Corn-Fallow Rotation in the Semiarid U.S. Great Plains. **Plant and Soil**. v. 283, p. 367-379, 2006.

VON UEXKÜLL, H. R.; MUTERT, E. Global Extent, Development and Economic Impact of Acid Soils. **Plant and Soil**. v. 171, p. 1-15, 1995.

WANG, Y.; XU, H.; KOU, J.; SHI, L.; ZHANG, C.; XU, F. Dual Effects of Transgenic *Brassica napus* Over Expressing CS Gene on Tolerances to Aluminum Toxicity and Phosphorus Deficiency. **Plant and Soil**, v. 362, p. 231-246, 2013.

WELINDER, K.G. Superfamily of Plant, Fungal and Bacterial Peroxidases. **Current Opinion in Structural Biology**. v.2, p.388-393, 1992.

YAMAMOTO, Y.; MATSUMOTO, H.; DEVI, S. R. An Intracellular Mechanism of Aluminum Tolerance Associated with High Antioxidant Status in Cultured Tobacco Cells. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 97, p. 59-68, 2003.

ZHANG, G. Alteration of Plasma Membrane Lipids in Aluminum-Resistant and Aluminum-Sensitive Wheat Genotypes in Response to Aluminum Stress. **Physiologia Plantarum**, v. 99, p. 302-308, 1997.

ZHENG, S. J.; MA, J. F.; MATSUMOTO, H. Continuous Secretion of Organic Acids is Related to Aluminum Resistance During Relatively Long-Term Exposure to Aluminum Stress. **Physiologia Plantarum**. v. 103, p. 209-214, 1998.