

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

IRANY RODRIGUES PRETTI

**“Análise da expressão gênica e atividade enzimática antioxidante
em *Passiflora edulis* SIMS sob diferentes concentrações de
alumínio”**

Vitória – ES
2012

IRANY RODRIGUES PRETTI

“Análise da expressão gênica e atividade enzimática antioxidante em *Passiflora edulis* SIMS sob diferentes concentrações de alumínio”

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal (PPGBV) da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Biologia Vegetal, na área de concentração Fisiologia Vegetal, linha de pesquisa em Fisiologia Molecular de Plantas.

Orientador: DSc. Maria do Carmo Pimentel Batitucci

Vitória – ES

2012

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida.

Ao CNPq e à CAPES que financiaram esta pesquisa.

À minha orientadora Maria do Carmo, pela oportunidade de realizar este estudo ao seu lado, admirada por mim como exemplo de profissional e pessoa. Obrigada por todas as vezes que me ajudou a encontrar soluções para os obstáculos que encontrei, por me acalmar e por ser muito mais que uma orientadora.

À minha família pelo incentivo, especialmente à minha vó.

Ao Vau, pela paciência de sempre e por ser quem eu posso contar independente da situação. Sempre ouvindo lamentações, dúvidas, angústias e mesmo assim me encorajou a continuar, além de ter carregado alguns baldes de solução nutritiva. Você foi minha força! Muito Obrigada!

À Tati e Raquel, por todo o tempo que estivemos juntas, por tudo que aprendi com vocês e por tanto trabalho dividido. Vocês tornaram essa caminhada um pouco mais fácil e divertida. Não sei se teria chegado ao final, e bem, não fosse vocês ao meu lado. Valeu muito a pena!

À Anny, minha amiga, que me incentivou desde o começo, inclusive na inscrição do mestrado. Obrigada por todo ensinamento das técnicas e protocolos. Você é uma das responsáveis por essa conquista!

Ao Clayton e Rodolfo, por todas as vezes que nos ajudaram com os experimentos, carregando solução nutritiva, transportando nitrogênio líquido ou pela companhia, nos propiciando trabalhar até tarde no laboratório.

Aos colegas do laboratório, especialmente Ju e Luciano, pelas dicas e disponibilidade de ajuda.

Ao Sr. Rael, pela doação de sementes de *P. edulis*.

Ao Gleidson, pela grande ajuda na lavagem de toda aquela areia.

Aos colegas da botânica, que em vários momentos mostraram-se sempre dispostos a contribuir com este trabalho.

Aos professores responsáveis pelo NGACB por terem cedido o espaço para que os estudos moleculares fossem realizados.

À Juliana Freitas que me ajudou muito, me ensinou e tirou muitas dúvidas, sempre torcendo para que os protocolos funcionassem.

Ao Ricardo, pela agilidade e disponibilidade em ajudar nos trâmites burocráticos da secretaria.

À professora Diolina Moura Silva, pelo empréstimo do laboratório de Fisiologia Vegetal.

Ao professor Márcio Alves Ferreira, pela participação na banca examinadora como avaliador externo.

À professora Renata Venturim Fontes, pela participação na banca examinadora como avaliadora interna.

Muito obrigada a todos vocês!

*“É melhor tentar, que preocupar-se e ver a vida passar. É
melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo
nada até o final”.*

Martin Luther King

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** (a) Plântulas de *P. edulis* com 5 cm em média e (b) vasos contendo uma planta de *P. edulis* acomodados na casa de vegetação.....28
- Figura 2:** Esquema de repetições para extração de RNA de plantas de *P. edulis*.....32
- Figura 3:** Potencial hídrico (Ψ) em plantas de *P. edulis* cv. FB100 submetidas a quatro tratamentos ao longo do tempo: controle, controle pH 4, 0,2mM de Al e 2mM de Al. As barras representam o erro padrão da média de três repetições. Os valores são médias (\pm erro padrão) de três plantas por tratamento.....40
- Figura 4:** Potencial hídrico (Ψ) em plantas de *P. edulis* cv. FB200 submetidas a quatro tratamentos ao longo do tempo: controle, controle pH 4, 0,2mM de Al e 2mM de Al. As barras representam o erro padrão da média de três repetições. Os valores são médias (\pm erro padrão) de três plantas por tratamento.....41
- Figura 5:** Perfis de expressão de *Cat* nas cultivares de *P. edulis* FB100 e FB200, nas três coletas: Tempo Zero, coleta 5 dias e coleta 10 dias, em PCR's de diferentes ciclos. (a) Expressão de *Cat* FB100 TZ/coleta 5 dias; (b) Expressão de *Cat* FB200 TZ/coleta 10 dias; (c) Expressão de *Cat* FB100 TZ/coleta 5 dias; (d) Expressão de *Cat* FB200 TZ/coleta 10 dias.....42
- Figura 6:** Perfis de expressão de *Sod* nas cultivares de *P. edulis* FB100 e FB200, nas três coletas: Tempo Zero, coleta 5 dias e coleta 10 dias, em PCR's de diferentes ciclos. (a) Expressão de *Sod* FB100 TZ/coleta 5 dias; (b) Expressão de *Sod* FB200 TZ/coleta 10 dias; (c) Expressão de *Sod*

FB100 TZ/coleta 5 dias; (d) Expressão de *Sod* FB200 TZ/coleta 10 dias.....43

Figura 7: Perfis de expressão de 18S nas cultivares de *P. edulis* FB100 e FB200, nas três coletas: Tempo Zero, coleta 5 dias e coleta 10 dias, em PCR's de diferentes ciclos. (a) Expressão de 18S FB100 TZ/coleta 5 dias; (b) Expressão de 18S FB200 TZ/coleta 10 dias; (c) Expressão de 18S FB100 TZ/coleta 5 dias; (d) Expressão de 18S FB200 TZ/coleta 10 dias.....44

Figura 8: Expressão relativa de *Cat* em *P.edulis* FB100, em PCR's de diferentes ciclos. (a) Expressão relativa com 32 ciclos. (b) Expressão relativa com 25 ciclos. (c) Expressão relativa com 20 ciclos. As barras representam o erro padrão da média. Os valores são médias de 3 repetições.....46

Figura 9: Expressão relativa de *Cat* em *P.edulis* FB200, em PCR's de diferentes ciclos. (a) Expressão relativa com 32 ciclos. (b) Expressão relativa com 25 ciclos. (c) Expressão relativa com 20 ciclos. As barras representam o erro padrão da média. Os valores são médias de 3 repetições.....48

Figura 10: Expressão relativa de *Sod* em *P.edulis* FB100, em PCR's de diferentes ciclos. (a) Expressão relativa com 32 ciclos. (b) Expressão relativa com 25 ciclos. As barras representam o erro padrão da média. Os valores são médias de 3 repetições.....49

Figura 11: Expressão relativa de *Sod* em *P.edulis* FB200, em PCR's de diferentes ciclos. (a) Expressão relativa com 32 ciclos. (b) Expressão relativa com 25 ciclos. As barras representam o erro padrão da média. Os valores são médias de 3 repetições.....50

Figura 12:	Atividade enzimática de CAT em <i>P. edulis</i> . (a) Atividade de CAT na cv FB100. (b) Atividade de CAT na cv FB200. Os valores são médias de 5 repetições.....	52
Figura 13:	Atividade da enzima SOD em de plantas de <i>P. edulis</i> . (a) Atividade enzimática na cv FB100. (b) Atividade enzimática na cv FB200. Os valores são médias de 5 repetições.....	53
Figura 14:	Atividade da enzima APX em de plantas de <i>P. edulis</i> . (a) Atividade enzimática na cv FB100. (b) Atividade enzimática na cv FB200. Os valores são médias de 5 repetições.....	54
Figura 15:	Quantificação de proteínas solúveis totais em plantas de <i>P.edulis</i> . (a) Conteúdo de proteínas na cv FB100. (b) Conteúdo de proteínas na cv FB200. Os valores são médias de 5 repetições.....	55
Figura 16:	Perfis de expressão de <i>P. edulis</i> FB200 com PCR's de diferentes ciclos.(a) Expressão de Cat após 32, 25, 20 e 15 ciclos. (b) Expressão de Sod após 32, 25 e 20 ciclos. (c) Expressão de 18S após 32, 25, 20 e 15 ciclos.....	57
Figura 17:	Expressão relativa de <i>P.edulis</i> FB200 em campo. (a) Expressão relativa de Cat com 32, 25 e 20 ciclos. (b) Expressão relativa de Sod com 32 e 25 ciclos.....	58
Figura 18:	Atividade enzimática de CAT em <i>P. edulis</i> FB200 cultivado em campo. Os valores são médias de 5 repetições.....	59
Figura 19:	Atividade enzimática de SOD em <i>P. edulis</i> FB200 cultivado em campo. Os valores são médias de 5 repetições.....	59
Figura 20:	Atividade enzimática de APX em <i>P. edulis</i> FB200 cultivado em campo. Os valores são médias de 5 repetições.....	60

Figura 21: Quantificação de proteínas solúveis totais em plantas de *P.edulis* FB200 cultivado em campo. Os valores são médias de 5 repetições.....60

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1:	Composição da solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950).....	29
Tabela 2:	Resultado de análise de água utilizada no preparo de solução nutritiva.....	30
Tabela 3:	Sequências dos <i>primers</i> utilizados no estudo de expressão gênica.....	33
Tabela 4:	Componentes e concentrações da reação padrão (mix) para <i>PCR</i>	34
Tabela 5:	Sequências dos <i>primers</i> desenhados para o estudo da expressão gênica.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS

Al	Alumínio
µm	Micromolar
APX	Peroxidase do ascorbato
CAT	Catalase
cv.	Cultivar
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FB 100	Cultivar Maguary do maracujazeiro
FB 200	Cultivar Yellow Master do maracujazeiro
Há	Hectare(s)
INCAPER	Instituto Capixaba de Assistência Técnica e Extensão Rural
Min	Minuto(s)
mM	Milimolar
Pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da Polimerase, do inglês: " <i>Polymerase Chain Reaction</i> "
RT-PCR	Reação em cadeia de transcrição reversa da Polimerase, do inglês: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction"
s	Segundo(s)
Seag	Secretaria Estadual de Agricultura, Abastecimento, Aqüicultura e Pesca
SOD	Superóxido dismutase
ton	Toneladas
ψ_w	Potencial hídrico

RESUMO

O maracujazeiro é cultivado em quase todo o território brasileiro. O Estado do Espírito Santo atualmente ocupa o quarto lugar em produção no país. A produção capixaba, de *Passiflora edulis*, está em expansão, tendo em vista que nos últimos anos houve um aumento na área plantada de maracujazeiro de 500 ha, em 1990, para 2.429 ha, em março de 2008, atingindo em dezembro de 2010, 2.800 ha plantados. Contudo, a maior parte da produção capixaba ainda se concentra na região norte do Estado, com destaque para os municípios de Jaguaré e Sooretama. Apesar dos números mostrarem avanços na produção dessa frutífera, o Espírito Santo é caracterizado por solos ácidos e alto teor de alumínio. Dentre as respostas desencadeadas pela exposição ao alumínio estão: inibição do crescimento radicular, inibição da divisão celular, deficiência de nutrientes, além da ativação de rotas de sinalização e alterações em nível de proteínas e transcritos de RNA. Dessa forma, torna-se fundamental o estudo de componentes do sistema de defesa antioxidativo do maracujazeiro cultivado sob exposição ao alumínio. As EROs podem representar grave ameaça à célula, sendo uma das respostas aos estresses ambientais, como a toxidez por alumínio. Contudo, poucos trabalhos têm relatado os efeitos do Al na parte aérea da planta. Por isso, o objetivo deste trabalho foi verificar a resposta o sistema antioxidante de *P.edulis* sob tais condições. O estudo do estresse oxidativo induzido por alumínio demonstrou que a expressão do gene Cat e Sod foi aumentada nas plantas em solução nutritiva, e somente na cv. FB100 esse aumento foi acompanhado pelo incremento da atividade enzimática de SOD, o que indica maior eficiência desta na remoção de EROs. As plantas cultivadas em campo demonstraram que a expressão das enzimas antioxidantes na lavoura com alto teor de alumínio não estava ativada no momento da coleta, apesar da elevada atividade de SOD e APX. Esta resposta possivelmente foi determinada pelo tempo prolongado ao qual as plantas estavam expostas ao estresse.

Palavras-chave: Maracujazeiro, alumínio, mRNA, proteômica, catalase, peroxidase do ascorbato, superóxido dismutase.

ABSTRACT

The passion fruit is cultivated in almost all the Brazilian territory. The Espírito Santo State currently ranks fourth in production in the country. The production of Espírito Santo, *Passiflora edulis*, is expanding, given that in recent years there has been an increase in planted area of 500 ha of passion, in 1990 to 2,429 ha in March 2008, reaching 2010 in December, 2800 ha planted. However, most of the production in Espírito Santo is still concentrated in the northern region of the state, especially the municipalities of the Jaguaré and Sooretama. While the numbers show progress in the production of fruit, the Espírito Santo is characterized by acidic soils and high aluminum content. Among the responses triggered by exposure to aluminum are: inhibition of root growth, inhibition of cell division, nutrient deficiency, and the activation of signaling pathways and changes in level of protein and RNA transcripts. Thus, it becomes important to study the components of the antioxidant defense system in plants undergoing exposure to aluminum. The ROS can pose serious threat to the cell, one of the responses to environmental stresses such as toxic aluminum. However, few studies have reported the effects of Al on the plant canopy. Therefore, the objective of this study was to evaluate the response of the antioxidant system *P.edulis* under such conditions. The study of the oxidative stress induced by aluminum showed that the CAT and SOD gene expression was increased in plants in the nutrient solution and only cv. FB100 this increase was accompanied by increment enzymatic activity of SOD, indicating the higher efficiency of the removal of ROS. Plants grown in the field showed that the expression of antioxidant enzymes in the crop with high aluminum content was not activated at the time of collection, despite the high activity of SOD and APX. This response was possibly determined by the extended time to which the plants were exposed to stress.

Keywords: Passion fruit, aluminium, mRNA, proteomics, catalase, ascorbate peroxidase, superoxide dismutase.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 <i>Passiflora edulis</i> SIMS.....	16
1.2 TOXIDEZ DE ALUMÍNIO.....	19
1.3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	22
1.4 ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	24
1.5 EXPRESSÃO GÊNICA.....	25
2 OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVO GERAL	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	288
3.1 MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO	288
3.2 CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS AVALIADAS.....	31
3.2.1 Potencial Hídrico (ψ_w)	311
3.2.2 Expressão gênica	311
3.2.2.1 Extração de RNA.....	31
3.2.2.2 Transcrição reversa.....	32
3.2.2.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	33
3.2.2.4 Desenho de <i>primers</i> e PCR semi-quantitativa.....	35
3.2.2.5 Sequenciamento	36
3.2.3 Atividade Enzimática	366
3.2.3.1 Obtenção do extrato protéico bruto	36
3.2.3.2 Determinação do conteúdo de proteínas solúveis totais	37
3.2.3.3 Atividade da Catalase.....	38
3.2.3.4 Atividade da Peroxidase do Ascorbato.....	38
3.2.3.5 Atividade da Superóxido Dismutase.....	39
3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA	400
4 RESULTADOS	400
4.1 EXPERIMENTO 1 - CASA DE VEGETAÇÃO	40
4.1.1 Potencial hídrico (ψ_w)	40
4.1.2 Expressão gênica	41
4.1.3 Sequenciamento	51
4.1.4 Atividade enzimática	52

4.1.5	Quantificação de proteínas solúveis totais	55
4.2	EXPERIMENTO 2- CAMPO	56
4.2.1	Expressão gênica	56
4.2.2	Atividade enzimática	59
4.2.3	Quantificação de proteínas solúveis totais	60
5	DISCUSSÃO	61
6	CONCLUSÕES	67
7	REFERÊNCIAS	68
	ANEXO I	76
	ANEXO II	77

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Passiflora Edulis* SIMS

O maracujazeiro é pertencente à ordem Violales e à família Passifloraceae, que compreende 18 gêneros e aproximadamente 400 espécies (CUNHA & BARBOSA, 2002), destas, pelo menos 120 tem o Brasil como centro de origem (BERNACCI et al., 2003). É uma planta trepadeira glabra. As raízes são do tipo axial, o caule é cilíndrico ou angulado, raramente quadrangular, em geral estriado longitudinalmente. As gavinhas são modificações foliares, que servem para prender a planta a suportes. As folhas são alternas, geralmente simples, inteiras ou lobadas, raramente compostas, os pecíolos podem ou não apresentar glândulas nectaríferas que variam de tamanho, número e forma. Estas glândulas ocorrem na margem da bráctea ou na parte dorsal da folha, sendo uma característica importante para a classificação taxonômica. As estípulas são variáveis quanto à forma e bordo, e também são úteis para classificar espécie. As flores reúnem-se em inflorescências e são hermafroditas, actinomorfas, geralmente isoladas ou aos pares nas axilas foliares. O fruto apresenta pericarpo carnoso, indeiscente e várias sementes que caracterizam uma baga, não dividida em lóculos. As sementes são compridas lateralmente, com testa reticulada ou verrugosa, cobertas por arilo saciforme, suculento e colorido (VANDERPLANK, 1996).

Devido à diversidade de cores da casca dos frutos de *Passiflora edulis* há uma variação em sua designação taxonômica. Em 1932, Otto Degener sugeriu que o maracujá-amarelo teria se originado através de melhoramento genético na Austrália, denominando-o como *P. edulis* forma *flavicarpa*. Todavia, a distinção estabelecida para o reconhecimento da forma - cor do fruto, glândulas nas sépalas e corona maior e arroxeadas - não se sustenta, pois essas glândulas são comuns na espécie, e a corona tem grande variação de cores, independentemente da cor do fruto. Além disso, o fato de que a coloração externa do fruto ser um caráter de herança complexa e sem dominância, resulta na existência de várias cores intermediárias, e dificulta o reconhecimento das cores extremas. Assim, deve-se utilizar *Passiflora edulis* SIMS, para toda e qualquer planta e cor de fruto do maracujá-azedo,

associando-se a elas um nome de cultivar para as seleções (BERNACCI et al., 2008).

Apesar da grande variabilidade genética, representada pela biodiversidade nativa, 95% da área plantada de maracujá no Brasil corresponde a *Passiflora edulis*, devido à qualidade dos frutos, vigor, suculência e produção (MELETTI & BRÜCKNER, 2001). A produção brasileira de maracujá adquiriu expressão econômica há pouco mais de 25 anos, inicialmente pelo incentivo da agroindústria e, em seguida, pela crescente demanda no mercado de frutas frescas. Atualmente, o maracujazeiro é cultivado em quase todo o território nacional (MELETTI, 2005).

A cadeia produtiva do maracujá apresenta importância crescente na economia brasileira, criando empregos no meio rural e urbano e gerando divisas por meio da exportação de sucos. O maracujá apresenta características interessantes do ponto de vista sócio-econômico, no que concerne à geração de emprego, ocupação de mão-de-obra e a estabilização do fluxo de renda, uma vez que é colhido diversas vezes e de forma continuada por safra, contribuindo para fixação da população no campo, reduzindo o êxodo rural (LEITE et al,1994).

Até o ano de 2009, o Brasil foi maior produtor e maior consumidor mundial de maracujá, sendo a produção dessa frutífera responsável pela colheita em 2009, de mais de 700 mil toneladas em uma área de aproximadamente 50 mil hectares. Entretanto, o país deixou de ser grande exportador para ser importador e, atualmente, o Brasil compra polpa para a fabricação de néctar. O estado do Espírito Santo, com 42 mil toneladas ocupa o quarto lugar em produção, sendo precedido pela Bahia, com 322 mil toneladas, Ceará com 129 mil toneladas e Sergipe com 44 mil toneladas, neste mesmo ano (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2011).

O Estado do Espírito Santo possui condições de clima e solo propícias para o plantio do maracujazeiro, o qual apresenta desenvolvimento satisfatório em regiões com temperatura média entre 23 e 25°C, baixa umidade relativa do ar, alta luminosidade (fotoperíodo superior a 11 horas luz) e ausência de geadas e ventos fortes (COSTA et al., 2008b). Com isso, a produção capixaba, principalmente do maracujá-amarelo

ou maracujá-azedo, *Passiflora edulis* SIMS, está em expansão, tendo em vista que nos últimos anos houve um aumento na área plantada de maracujazeiro de 500 ha, em 1990, para 2.429 ha, em março de 2008 (IBGE, 2008), atingindo em dezembro de 2010, 2.800 ha plantados. Contudo, a maior parte da produção capixaba ainda se concentra na região norte do Estado, com destaque para os municípios de Jaguaré e Sooretama (INCAPER, 2010).

O mercado de suco e de fruta “*in natura*” tem crescido substancialmente nos últimos anos, apresentando, por consequência, uma evolução da área cultivada com elevação da produção, quando comparada com as décadas anteriores (COSTA et al., 2008a) devido à sua adaptação às condições climáticas de diferentes regiões e a sua boa rentabilidade (INCAPER, 2007).

As perspectivas de médio e longo prazo para os produtores de maracujá para fins agroindustriais no Espírito Santo são bastante positivas, em razão do parque agroindustrial instalado no Estado, a exemplo do Pólo de *Passiflora edulis* do Espírito Santo, instituído em 2004 pelo Governo do Estado, por meio da Secretaria Estadual de Agricultura (Seag) e do Instituto Capixaba de Pesquisa Agropecuária (Incaper), tem estimulado a expansão da área plantada e a diversificação da agricultura e também da tendência de expansão do mercado mundial da polpa e do suco. Além disso, uma nova área de abrangência de produção de maracujá foi criada no Sul do Estado, devido à localização estratégica e às condições de clima e solo propícias ao cultivo da fruta (INCAPER, 2010).

De acordo com dados do INCAPER (2010), no Brasil tem aumentado o consumo de bebidas à base de frutas, com destaque para o maracujá, um dos sabores preferidos dos consumidores. No Espírito Santo, de dezembro de 2007 a outubro de 2009, somente para indústria foram comercializadas 1,8 mil toneladas de maracujá, o que gerou uma renda de 1,2 milhão.

A correta seleção de cultivares para um determinado ambiente de cultivo e sistema de produção é de suma importância para uma boa produtividade. Contudo, a seleção de forma adequada não é suficiente para o sucesso da cultura. É

necessário, além disso, que a cultivar tenha características que atendam às exigências de comerciantes e consumidores (FREIRE FILHO et al., 2000).

É crescente a necessidade de desenvolvimento de estudos sobre a fisiologia de frutíferas visando o prolongamento da vida pós-colheita dos frutos, aumento da produtividade, bem como conhecer os níveis de sensibilidade e tolerância aos diferentes estresses ambientais, tais como toxidez de alumínio, seca, alagamento, salinidade e potencial sensibilidade às doenças. Visto que a fruticultura corresponde à importante atividade na economia do Espírito Santo, o estabelecimento de genótipos de *Passiflora edulis* melhor adaptados as condições de cultivo do Estado é fundamental para um aumento da produtividade desses frutos.

Duas cultivares de *Passiflora edulis* SIMS foram avaliadas neste trabalho: FB100 e FB200. O maracujá FB200, também conhecido como "YELLOW MASTER", tem como principal destinação o mercado de frutos "in natura". Seus frutos apresentam tamanho e cor uniformes, além de apresentar a casca mais espessa, o que proporciona maior resistência durante o transporte. Seu rendimento de suco situa-se em torno de 36% do peso médio do fruto de 240 gramas, enquanto o brix tem média de 14,0º e o potencial produtivo é aproximadamente 50 ton/ha/ano. Por outro lado, a cultivar FB100, conhecida como "MAGUARY", tem a finalidade de suprir a indústria de sucos. É uma variedade resultante de 20 anos de melhoramento genético, de boa qualidade produtiva e frutos desuniformes em tamanho, forma e cor. Possui alto rendimento de suco (cerca de 42%). A polpa apresenta cor amarelo-alaranjado com brix em média de 15,0º. O potencial produtivo é, também, em torno de 50 ton/ha/ano, sendo o peso médio do fruto de 120 gramas (VIVEIRO FLORA BRASIL, 2008).

1.2 TOXIDEZ DE ALUMÍNIO

Entre os fatores do ambiente prejudiciais ao desenvolvimento das culturas, o alumínio (Al) presente na solução do solo representa um dos principais agentes responsáveis pela redução da produtividade (PANDA & MATSUMOTO, 2007; VOSS et al., 2006; CANÇADO et al., 2001), principalmente por causar inibição do crescimento radicular (GIANNAKOULA et al., 2008), além da redução na absorção

de água (ZHENG & YANG, 2005). Ao mesmo tempo, o Al é o metal mais abundante da crosta terrestre e, em concentrações da ordem de micromolares, provoca alterações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas em plantas de diversas culturas, cujos efeitos nocivos e de severidade variam de acordo com a espécie e a cultivar (KOCHIAN et al., 2004).

Plantas afetadas pelo Al frequentemente apresentam sintomas de deficiência de nutrientes, tais com fósforo (P), cálcio (Ca), magnésio (Mg), potássio (K) e molibdênio (Mo), devido à interferência do Al nos processos de absorção, transporte e uso destes nutrientes (FREITAS et al., 2006; BASSO et al., 2003;). A disponibilidade de P para as plantas é altamente afetada em situação de pH baixo, visto que os óxidos e hidróxidos de Al têm uma capacidade de reter este elemento muito maior que as argilas (BISSINI et al., 2006). A inibição da absorção de Ca provocada pela presença do Al tóxico ocorre de forma rápida e reversível, podendo estar associada a mudanças da homeostase celular e bloqueio de canais de Ca na membrana plasmática, afetando processos como mitose, citocinese, geotropismo, crescimento polar, correntes citoplasmáticas e sinalização celular (KOCHIAN, 1995).

Estudos têm indicado que interações do Al com elementos envolvidos na transdução de sinais responsáveis pela comunicação da célula com o ambiente são eventos primários da toxidez causada pelo Al, ocasionando rápidas disfunções metabólicas na planta (JONES & KOCHIAN, 1995). Além disto, o Al também possui efeitos prejudiciais sobre moléculas de ácidos nucléicos, principalmente por modificar a conformação espacial da dupla hélice devido a interações com as cargas residuais dos grupamentos fosfato, reduzindo ou inibindo a divisão celular (FOY et al., 1978).

Na parede celular, o Al pode promover o aumento na síntese de lignina, resultante da injúria nas células, prejudicando o processo de alongação radicular (SASAKI et al., 1996). Este íon metálico ainda interfere na permeabilidade da membrana plasmática por provocar alterações na fluidez e na densidade do empacotamento dos fosfolipídios, resultante da ligação eletrostática de formas catiônicas de Al a regiões polares dos fosfolipídeos, ou à interação com proteínas de membrana (RENGEL, 1996).

Contudo, poucos trabalhos têm relatado os efeitos do Al na parte aérea da planta. Segundo RYAN et al. (1993), as plantas começam a apresentar os danos induzidos pelo Al, na parte aérea, após maior tempo de exposição ao estresse, sendo que estes danos parecem ser consequência dos ocorridos nas raízes.

O alumínio em níveis tóxicos está presente em 50% das áreas com potencial agrícola do mundo, além disso, a acidez nos solos tem se agravado com o extensivo uso de fertilizantes derivados de amônia (ZHANG et al., 2007). No Brasil, a expansão do plantio direto nas áreas formadas por latossolos e argissolos, nos quais a aplicação do calcário para correção da acidez é realizada superficialmente, aumenta a importância de cultivares tolerantes à toxicidade do alumínio, em razão do menor tempo de resposta para adequação do pH e consequente diminuição da toxicidade do alumínio (CAIRES et al., 2008). De modo geral, o Al em teores tóxicos pode estar localizado em todo o perfil do solo e sua neutralização é temporariamente obtida com a calagem apenas na camada arável, devido à baixa mobilidade dos corretivos aplicados ($\text{CaCO}_3 + \text{MgCO}_3$, CaO , CaOH) e ao elevado custo da correção em profundidade (CANÇADO et al., 2001).

A toxidez causada pelo alumínio é acentuada para plantas cultivadas em solos ácidos, principalmente em pH abaixo de 5,0. Em soluções ácidas ($\text{pH} < 5,0$) o Al se apresenta na forma $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$, caracteristicamente tóxica para as plantas (BEUTLER et al., 2001). Porém, se ocorre o aumento do pH, esta molécula sofre hidrólise, com a formação dos complexos mononucleares $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ e $\text{Al}(\text{OH})_3$ (ROSSIELLO & JACOB NETTO, 2006). Em pH neutro é formada a gibsita, $\text{Al}(\text{OH})_3$, relativamente insolúvel, e no pH comumente estabelecido no citoplasma da célula ($\text{pH} 7,4$), o íon aluminato, $\text{Al}(\text{OH})_4^-$, é a forma dominante (KOCHIAN, 1995).

Magnago et al. (2010) relataram que no município de Vila Velha/ES os solos, predominantemente latossolos, apresentam pH bastante ácido com consequente disponibilização de íons Al^{3+} . Da mesma forma, Effgen et al. (2008) estudando os atributos químicos do solo do município de Jerônimo Monteiro/ES, também encontraram alto teor Al e baixo pH. Visto que o baixo pH e a alta concentração de Al são condições encontradas no solo do Espírito Santo, torna-se fundamental conhecer o comportamento de espécies cultivadas sob estas condições, afim de

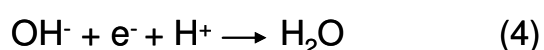
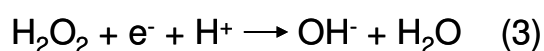
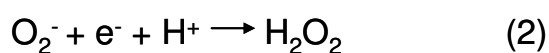
estabelecer genótipos de *Passiflora edulis* melhor adaptados as condições de cultivo no estado do Espírito Santo e promover aumento da produtividade dessa frutífera.

1.3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

O oxigênio molecular (O_2) é o principal acceptor biológico de elétrons e tem papel fundamental nas funções celulares. Entretanto, junto às propriedades benéficas do O_2 , ocorre a formação das espécies reativas de oxigênio (EROs), como o superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^\cdot). Situações de estresse podem intensificar a produção de EROs, aumentando a oxidação dos componentes celulares, o que pode causar danos ao organismo. Nesse caso, as EROs funcionam com sinalizadores de uma resposta aos mais diversos estresses (MITTLER et al, 2004), como a toxidez por alumínio.

Mesmo sob condições ideais, EROs são formadas em muitos processos metabólicos, incluindo os que ocorrem nos cloroplastos, nas mitocôndrias e nos sistemas de transporte de elétrons através das membranas. A imposição a estresses bióticos ou abióticos podem elevar a concentração de EROs excessivamente, causando danos oxidativos em nível celular (SHIGEOKA et al., 2002). As EROs tem efeitos desastrosos em macromoléculas celulares, como DNA, RNA, proteínas e lipídeos. Induzem a peroxidação lipídica causando danos irreversíveis na estrutura da membrana e em sua integridade funcional (SMIRNOFF, 1993).

Superóxido de Oxigênio (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^\cdot) são produzidos por sucessivas reduções univalentes do oxigênio (SMIRNOFF, 1993):



Contudo, as EROs são consideradas como “subprodutos inevitáveis” do metabolismo aeróbico, sendo continuamente produzidos e removidos das células por mecanismos não enzimáticos e enzimáticos (MITLER, 2002). Estes últimos incluem: catalases, peroxidases e superóxido-dismutases, que convertem EROS em espécies menos reativas (SCANDALIOS, 2005).

A formação de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) ocorre na fotossíntese durante o processo de dissipação de energia de moléculas de clorofila excitadas associadas ao fotossistema II (MÜLLER et al., 2001). Os radicais superóxido podem ser produzidos espontaneamente durante a etapa fotoquímica da fotossíntese, através da transferência direta de um elétron de moléculas associadas ao fotossistema I para o oxigênio molecular (APEL & HIRT, 2004). Os radicais superóxido gerados podem originar o H_2O_2 espontaneamente ou pela reação catalisada pela SOD. O peróxido de hidrogênio é quebrado em água e oxigênio molecular pela catalase, enzima localizada nos peroxissomos e glioxissomos. No cloroplasto essa função é da enzima peroxidase do ascorbato, que possui isoformas para agir também no citosol. O H_2O_2 e o O_2^- são comparativamente menos danosos que outras EROs, porém podem gerar espécies extremamente reativas, como os radicais hidroxílicos (ARORA et al., 2002).

O alumínio, bem como outros fatores, induz a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), levando a oxidação de biomoléculas (YAMAMOTO et al., 2002). A peroxidação lipídica é considerada um evento secundário e posterior à ação do Al (YAMAMOTO et al., 2001). Evidências que reforçam esta hipótese estão pautadas em correlações estabelecidas entre a exposição ao Al e aumento na produção de EROs, maior atividade de algumas enzimas e, ou concentração de metabólitos. No entanto, ainda não está perfeitamente esclarecido o mecanismo pelo qual o Al intensifica a formação de EROs (DARKÓ et al., 2004).

1.4 ENZIMAS ANTIOXIDANTES

A catalase (EC 1.11.1.6) é uma enzima tetramérica que contém um grupamento heme em cada subunidade (HORVÁTH et al., 2002) e é encontrada em todos os organismos aeróbicos. A catalase (CAT) decompõe H_2O_2 , produzido durante a fotorrespiração (QURESHI et al, 2007) e a β -oxidação de ácidos graxos, em água e oxigênio molecular. As CATs estão localizadas predominantemente nos peroxissomos, não sendo encontradas nos cloroplastos (RESENDE et al., 2003). Por causa de sua larga distribuição, conservação evolutiva e capacidade de degradar rapidamente o peróxido de hidrogênio, a CAT foi de extrema importância nos sistemas que evoluíram para permitir que organismos pudessem habitar ambientes aeróbicos (SCANDALIOS, 2005). Devido as diferentes afinidades de CATs (baixa afinidade, mM) e APXs (alta afinidade, μ M) pelo H_2O_2 , as CATs são responsáveis pela remoção do excesso de EROs, ao passo que as APXs atuam na modulação fina de EROs (MITLER, 2002).

Os genes *Cat* respondem diferencialmente a vários estresses conhecidos que geram EROS (SCANDALIOS, 2005). As plantas possuem várias isoformas de CAT presentes nos peroxissomas e glioxissomas. Podem ser divididas em três classes: catalases da classe 1 removem o H_2O_2 produzido durante a fotorrespiração em tecidos fotossintéticos; catalases da classe 2 são produzidas em tecidos vasculares e podem exercer uma função de lignificação mas, sua exata função biológica permanece desconhecida; e na classe 3 estão as catalases presentes abundantemente em sementes e plantas jovens, e cuja atividade está relacionada à remoção do H_2O_2 produzido durante a degradação dos ácidos graxos no glioxissoma (BREUSEGEM et al., 2001).

As peroxidases participam de alguns processos fisiológicos como lignificação, suberização, catabolismo de auxina, tolerância à salinidade, mecanismos de defesa contra patógenos e herbivoria (HIRAGA et al., 2001). As peroxidases são proteínas do grupo heme que catalisam a oxidação de grande variedade de substratos através da reação com peróxido de hidrogênio. Além de maior distribuição na célula, as peroxidases apresentam menor massa molecular que as CATs, o que contribui para sua maior mobilidade entre os compartimentos celulares (YOSHIDA et al., 2003).

Pouco se conhece a respeito da indução de peroxidases por metais, mas o aumento na atividade destas enzimas é uma resposta a maioria dos metais que podem causar danos (FANG & KAO, 2000).

A peroxidase do ascorbato (APX - EC 1.11.1.7) usa o ascorbato como doador de elétrons específico para reduzir H_2O_2 à água e oxigênio molecular, com concomitante geração de monodehidroascorbato. O monodehidroascorbato é espontaneamente degradado em ascorbato e dehidroascorbato. O monodehidroascorbato é também diretamente reduzido à ascorbato por ação de NADPH, dependente de monodehidroascorbato redutase (ASADA, 1997).

As superóxido dismutases (SOD - EC 1.15.1.1) são metaloenzimas responsáveis pela dismutação do radical O_2^- em H_2O_2 e oxigênio molecular. As SODs apresentam-se na forma de 3 isoenzimas, de acordo com o íon metálico constituinte do grupo prostético: Mn-SOD, Cu/Zn-SOD e Fe-SOD (ARORA et al., 2002). Essas formas isoenzimáticas são encontradas em diferentes compartimentos celulares: Mn-SOD é encontrada nas mitocôndrias e peroxissomos, Fe-SOD principalmente nos cloroplastos e Cu/Zn-SOD nos cloroplastos, citosol e possivelmente, no espaço extracelular (ALSCHER et al., 2002).

O peróxido de hidrogênio, formado pela dismutação espontânea do radical superóxido ou pela reação catalisada pelas SODs é eliminado do metabolismo celular por ação de enzimas CATs e APXs (ARORA et al., 2002). Dessa forma, a atividade balanceada das referidas enzimas torna-se crucial na manutenção dos níveis de O_2^- e H_2O_2 (MITLER, 2002).

1.5 EXPRESSÃO GÊNICA

O acúmulo de EROs como resposta a condições de estresse ocorre pela falta de capacidade de desintoxicação inata ou pela inibição de enzimas de desintoxicação, como a catalase (JONES et al., 2006). A primeira hipótese tem sido mais aceita em razão das contundentes evidências de aumento na expressão de genes que codificam proteínas do sistema de defesa antioxidante quando da exposição ao Al

(EZAKI et al., 2000). Estes genes codificam enzimas como catalase, peroxidase do ascorbato e superóxido dismutase.

Em *Arabidopsis thaliana* foi observado que o alumínio induz a expressão de genes ligados ao estresse oxidativo, que constitui um importante componente das respostas das plantas a níveis tóxicos de alumínio (CORRALES et al, 2008) por ocasionar a ativação de enzimas antioxidantes. A identificação de genes e proteínas regulados por H₂O₂ é um passo importante para os procedimentos que possam conferir tolerância para múltiplos estresses (SCANDALIOS, 2005).

Análises quantitativas de ácido nucléico têm tido relevância em muitos campos de pesquisa, sendo as medidas de expressão gênica extensivamente monitoradas em respostas biológicas a vários estímulos (HUANG et al., 1995).

A técnica do PCR semi-quantitativo compreende importante ferramenta no estudo da expressão gênica. Essa técnica é baseada na comparação dos níveis de amplificação em PCR's com números de ciclos diferentes, sendo uma rápida e confiável maneira de quantificar determinado mRNA presente em pequena quantidade na amostra (REY et al., 2000).

Para o estudo da expressão de genes de plantas expostas ao Al é indispensável que o RNA extraído seja íntegro, pois a *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) é o mais sensível método de detecção de seqüências de RNA mensageiro (mRNA). A técnica é complexa, com problemas associados a sua sensibilidade, reprodutibilidade e especificidade, os quais podem ser consequência de uma amostra inicial de RNA limitada ou de baixa qualidade. Este estudo em plantas pode ser tecnicamente dificultado devido a grande quantidade de compostos presentes nesses organismos (MEISEL et al., 2005), Estes compostos possuem tendência de precipitarem juntamente com o RNA por propriedades físico-químicas similares, afetando a qualidade e a quantidade das amostras (ASIF et al., 2000). Além disso, as ribonucleases (RNAses) endógenas reduzem a integridade do RNA. A extração de RNA requer o rompimento das células, fazendo com que essas enzimas, retidas no interior das organelas, extravasem e reajam com ácidos nucléicos, polissacarídeos e polifenóis, formando complexos insolúveis (AZEVEDO

et al., 2003)., reduzindo a qualidade do produto final da extração. Folhas de *P. edulis* são ricas em compostos secundários como flavonóides, alcalóides, glicosídeos cianogênicos, monoterpênóides e saponinas (LORENZI & MATOS, 2002), que dificultam o processo de extração de RNA, principalmente por desencadearem processos oxidativos.

As implicações da toxicidade de Al para o estresse oxidativo têm sido bastante investigadas em raízes de diversas espécies vegetais (BOSCOLO et al. 2003). Entretanto, poucas informações estão disponíveis quanto aos danos induzidos por Al nos tecidos foliares. Nesse sentido, o presente trabalho teve por objetivo investigar possíveis mudanças na atividade enzimática e expressão de genes em folhas de maracujazeiro quando da exposição ao Al.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a resposta do sistema antioxidante do maracujazeiro (*Passiflora edulis* SIMS) sob diferentes concentrações de Al em solução nutritiva e em campo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se diferentes concentrações de Al em solução por 10 dias podem afetar o potencial hídrico das cultivares FB 100 e FB 200 em solução nutritiva;
- Identificar possíveis efeitos isolados do pH ácido em *P.edulis* cultivado em solução nutritiva;
- Avaliar o padrão de expressão relativa dos transcritos dos genes *cat*, *apx* e *sod* em maracujá cultivado em solução nutritiva e em campo;
- Desenhar *primers* específicos para os genes em estudo, a partir de sequências obtidas com *primers* inespecíficos;
- Analisar o comportamento enzimático (CAT, APX E SOD) relacionado ao estresse oxidativo em resposta a exposição ao alumínio;

- Utilizar os resultados gerados como indicadores de genótipos de *Passiflora edulis* melhor adaptados as condições de cultivo do Estado.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Experimento 1: Casa de vegetação

O experimento foi realizado em casa de vegetação com controle de temperatura, localizada no campus de Goiabeiras da Universidade Federal do Espírito Santo/UFES (20°18'52''S e 40°19'06''W). Foram utilizadas sementes de *Passiflora edulis* SIMS cv. FB 100 ("Maguary") e FB200 ("Yellow Master"). As sementes foram esterilizadas com solução de ácido clorídrico 5% por 15 min, lavadas em água corrente e embebidas com água por 12h. Foi realizada a semeadura das sementes em areia lavada e esterilizada com solução de ácido clorídrico 5% por 1h. A germinação ocorreu após 15 dias (Figura 1a). Quando as plântulas atingiram 5 cm de comprimento, em média, foram transplantadas para vasos de capacidade de 4,5L preenchidos com areia de quartzo lavada. Cada unidade experimental foi definida como um vaso contendo uma planta, sendo 5 repetições por tratamento, totalizando 158 plantas (Figura 1b). Estas foram regadas, três vezes por semana, com 200 mL de solução nutritiva modificada (HOAGLAND & ARNON, 1950) 1/2 força (tabela 1), mantidas sob temperatura de 28 °C (± 2) e fotoperíodo natural.

a)



b)



FIGURA 1: (a) Plântulas de *P. edulis* com 5 cm em média; (b) Vasos contendo uma planta de *P. edulis* acomodados na casa de vegetação.

TABELA 1: Composição da solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950).

Componente	Peso molecular	Concentração na solução nutritiva
KH ₂ PO ₄	136,09g	4mM
KNO ₃	101,11g	4mM
MgCl ₂ .6H ₂ O	203,33g	1mM
MgSO ₄ .7H ₂ O	246,49g	3mM
CaCl ₂ .2H ₂ O	147,02g	3mM
NaNO ₃	84,99g	2mM
NH ₄ NO ₃	80,04g	1mM
H ₃ BO ₃	61,83g	0,0092mM
ZnSO ₄ .7H ₂ O	287,54g	0,0003mM
CuSO ₄ .5H ₂ O	249,68g	0,00006mM
MnCl ₂ .4H ₂ O	197,91g	0,00036mM
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	241,95g	0,00012mM
Fe-EDTA	-----	0,0038mM
CaSO ₄	172,17g	1,2mM

A indução ao estresse iniciou quando as plantas atingiram 45 dias após o transplante e teve a duração de 10 dias. Os tratamentos foram: controle (pH 6-6,5); controle pH 4; 0,2mM Al³⁺ (pH 6-6,5) e 2mM de Al³⁺ (pH 6-6,5). O Al foi adicionado na forma de AlCl₃. Durante o tratamento, as plantas receberam 200 mL de solução nutritiva acrescida de solução de Al-EDTA com o objetivo de disponibilizar todo o Al adicionado. Os sais AlCl₃ e EDTA foram utilizados em quantidades equimolares para a preparação da solução de Al-EDTA (MENDHAM et al., 2002). O pH das soluções nutritivas foram ajustados com solução de HCl ou NaOH.

A água utilizada na preparação da solução nutritiva aplicada nas plantas durante o experimento foi enviada para análise no Laboratório de Análise Agronômica e Ambiental - Fullin/Linhares-ES (Tabela 2).

TABELA 2: Resultado de análise de água utilizada no preparo de solução nutritiva.

Parâmetro	Amostra de água
Condutividade elétrica dS/m	0,09
pH	6
Razão de Adsorção de Sódio	0,29
Ferro reduzido (mg/L)	Nd
Ferro oxidado (mg/L)	Nd
Ferro total (mg/L)	0,06
Sódio (meq/L)	0,16
Cloro (meq/L)	0,1
Carbonato (CO_3^{-2}) (MG/L)	Nd
Dureza (CaCO_3) (mg/L)	32,47
Bicarbonato (HCO_3^{-2}) (mg/L)	Nd
Sulfato (SO_4^{-2})	0,22
Fosfato (PO_4^{-2}) (mg/L)	0,09
Potássio (mg/L)	1,8
Cálcio (meq/L)	0,51
Magnésio (meq/L)	0,14
Boro (mg/L)	0,02
Manganês (mg/L)	0,01
Zinco (mg/L)	0,01
Cobre (mg/L)	0,01
Alumínio (mg/L)	0,08
Nitrogênio (mg/L)	0,38

As folhas coletadas para análise, nos tempos 0h, 2dias, 5dias e 10dias, foram instantaneamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultra-freezer à -80°C .

Experimento 2: Campo

Para a determinação do teor de nutrientes presentes nas lavouras, amostras de solo de cada lavoura foram coletadas e levadas para análise em laboratório especializado Fullin/Linhares-ES (Anexo I).

O experimento foi realizado em três lavouras de em média um ano de idade localizadas no município de Jaguaré/ES, nas quais através de análise de solo, foram encontradas diferentes concentrações de Al, sendo elas 0 de Al (pH 6), 0,33 mM de Al (pH 5,6) 2,66 mM de Al (pH 4,7). Segundo o sistema UTM (WGS84) de coordenadas, as fazendas se localizam a X: 0390038 Y: 7903486 e a 52 m do nível do mar (lavouras 0 Al pH 6 e 0,33 Al pH 5,6) e a X: 0387968 Y: 7901355 a 2m do nível do mar (lavoura 2,66 mM pH 4,7).

3.2 CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS AVALIADAS

3.2.1 Potencial Hídrico (ψ_w)

O potencial hídrico foi medido na antemanhã, entre 5 e 6h, utilizando-se uma bomba de pressão do tipo Scholander. As medidas foram realizadas em três folhas por tratamento. Todas as análises foram realizadas na terceira ou quarta folha, a partir do ápice em direção a base, consideradas jovens e completamente expandidas. As plantas foram retiradas da casa de vegetação ao final da tarde anterior a cada coleta de dados.

3.2.2 Expressão gênica

3.2.2.1 Extração de RNA

Para o estudo da expressão gênica realizou-se extração de RNA das amostras de folhas das cultivares FB100 e FB200 de *Passiflora edulis* coletadas em tempo zero, 5 dias e 10 dias. O material vegetal foi pulverizado em almofariz de porcelana e pistilo com nitrogênio líquido. Aproximadamente 100mg de tecido vegetal pulverizado foi reservado em microtubo tipo *ependorf* e armazenado em ultra-freezer à -80 °C. Foi organizado um esquema de repetições em 3 *pools*, cada um contendo 4 amostras diferentes (Figura 2), utilizados em todos os tratamentos, com intuito de redução do erro experimental.

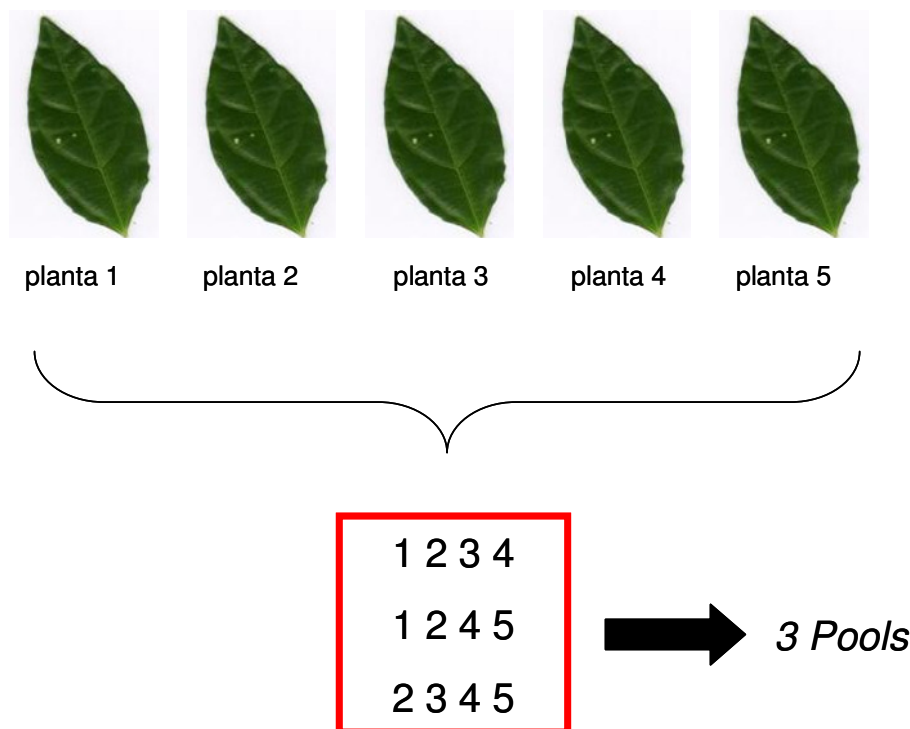


FIGURA 2: Esquema de repetições para extração de RNA de plantas de *P. edulis*.

Para a extração de RNA total, utilizou-se o TRIzol *Reagent* (Invitrogen®), segundo recomendações do fabricante. O RNA resultante foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop 3300 Thermo Scientific (260nm e a 280nm), submetido à corrida em gel de agarose (2%) corado com GelRed™ (BIOTIUM™) e visualizado em transiluminador-UV. As amostras de RNA foram tratadas com *DNase I AmpGrade* (Invitrogen®), a fim degradar qualquer fragmento de DNA pré-existente.

3.2.2.2 Transcrição reversa

O RNA extraído de amostras submetidas a tratamento com TRIzol foi utilizado para a RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) tendo como controle o gene constitutivo da unidade ribossomal 18S, para teste de amplificação.

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir do poli T do RNA, com oligoDT como *primer* (iniciador), a enzima transcriptase reversa e desoxirribonucleotídeos provenientes do kit *GoScript™* (Promega®), além do tratamento com RNase para purificação do produto final da reação. As reações para a transcrição foram

realizadas segundo as instruções do fabricante. As amostras de cDNA foram quantificadas em NanoDrop 3300 (Thermo Scientific) (260nm e a 280nm) e diluídas em água livre de nucleases para a padronização da concentração de 500ng.µL⁻¹.

3.2.2.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a amplificação de DNA, a partir dos fragmentos de cDNA obtidos, foram sintetizados *primers* para cada gene que se desejava analisar, como apresentado na tabela 3.

TABELA 3- Sequências dos *primers* utilizados no estudo de expressão gênica.

<i>Primer</i>	Sequência senso	Sequência antisenso	Referência
<i>18s</i>	5'-TGACGGAAGAATTAGGGTTCG-3'	5'-GACTTGCCCTCCAATGGATC-3'	AZEVEDO, 2008
<i>Cat</i>	5'-CTGCTGGAAACTATCCTGAGTG-3'	5'-ATTGACCTCTTCATCCCTGTG-3'	BALESTRASSE et al., 2008
<i>Apx</i>	5'-GCATGGCACTCTGCTGGTAC-3'	5'-GAGAAATATGCTGOGGATGA-3'	KAWAKAMI et al., 2002
<i>Sod</i>	5'-CTACGTCGCCAACTACAACAAG-3'	5'-GTAGTACGCATGCTCCCAGAC-3'	BAEK & SKINNER, 2005

O *primer 18s*, correspondente ao gene da subunidade ribossomal 18s, foi utilizado como controle interno. Os *primers Cat*, *Apx* e *Sod*, foram utilizados a fim de amplificar fragmentos dos genes *Cat*, *Apx* e *Sod*, que codificam as proteínas Catalase, Peroxidase do Ascorbato e Superóxido Dismutase, respectivamente. A escolha dos *primers* foi realizada a partir de levantamento bibliográfico e a seleção deu-se por meio do alinhamento desses *primers* com sequências depositadas no *GeneBank* (NCBI), através do programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool – NCBI).

As concentrações dos componentes da *Polymerase Chain Reaction (PCR)* foram testadas e uma reação padrão (*mix*), mostrada na tabela 4, foi estabelecida e utilizada para amplificação com todos os *primers*.

TABELA 4: Componentes e concentrações da reação padrão (*mix*) para *PCR*.

Componentes	Volume (μL)	Concentração Final
Tampão <i>PCR</i> (10X)	2,5	1x
MgCl_2 (50mM)	1,5	3 Mm
dNTP mix (10mM cada)	1,0	2,5 Mm
Água Ultrapura Autoclavada	17,7	40 μM
<i>Primer</i> senso	0,5	0,2 pmol/ μL
<i>Primer</i> antisenso	0,5	0,2 pmol/ μL
cDNA (500ng/ μl)	1,0	20 ng/ μL
<i>Taq DNA Polymerase</i> (5U/ μl)	0,3	1,5U/reação
Volume Final	25	

Foram utilizados em todas as *PCR*'s o tampão *PCR* (*Invitrogen*®), MgCl_2 (*Invitrogen*®), dNTP *mix* (*Invitrogen*®) e *TaqPolimerase Platinum* (*Invitrogen*®), segundo instruções do fabricante. As condições de *PCR*, perfil de reação, foram diferenciadas de acordo o *primer* utilizado, sendo realizadas em termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (*Applied Biosystems*™).

O *primer 18s* foi submetido à desnaturação inicial à 95°C por 1 min e 30 s, seguida de 32 ciclos de: desnaturação à 95°C por 1 min e 10 s, anelamento à 53°C por 1 min e extensão à 72°C por 1 min e 45 segundos. A etapa de extensão final foi à 72°C por 5 minutos (AZEVEDO, 2008).

Para o *primer Cat*, a amplificação dos fragmentos de cDNA deu-se segundo as condições de 94°C por 1 min para desnaturação inicial, e 32 ciclos a 94°C por 30 s,

54°C por 1 min e 72°C por 1 min, com uma extensão final a 72°C por 7 min (BALESTRASSE et al, 2008).

Para *Sod* foi promovida a extensão do fragmento a partir de 3 minutos de desnaturação inicial à 95°C, 32 ciclos de 15s a 95°C, 20s a 54°C, e 17s a 72°C, com extensão final a 72°C por 7min (BAEK & SKINNER, 2005).

O fragmento produzido pelo *primer Apx* originou-se nas condições de 94°C por 2 min e 32 ciclos de 94°C por 15s, 45°C por 30s, 72°C por 1 min, e extensão final de 7 min a 72°C (KAWAKAMI et al, 2002, com modificações).

3.2.2.4 Desenho de *primers* e PCR semi-quantitativo

A partir das sequências obtidas pela amplificação com os *primers Sod* e *Cat* foram desenhados *primers* específicos para esses genes. Com esse objetivo foram utilizados os programas *Primer 3* e *Gene Runner* (Tabela 5).

TABELA 5: Sequências dos *primers* desenhados para o estudo da expressão gênica.

<i>Primer</i> específico	Sequência senso	Sequência antisenso
<i>Cat</i>	5'-GTCAACCCGCAAACCCACAA-3'	5'-ACACCCATAGGCACCGTCT-3'
<i>Sod</i>	5'-TCCAACCCGATAACTGTG -3'	5'-TCTGGTGACGAAGGGAGC -3'

Com o objetivo de analisar a expressão dos genes por RT-PCR semi-quantitativo, além do número de ciclos descritos no item anterior, cada um dos *primers* foi submetido a perfil de reação com 25, 20 e 15 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão. Os produtos amplificados foram submetidos à corrida em gel de agarose 2%, corados com GelRed™ (BIOTIUM™) e visualizados em transiluminador UV. Os géis foram fotografados e as bandas de DNA analisadas com o programa ImageJ.

3.2.2.5 Sequenciamento

Os fragmentos de DNA obtidos dos PCR's realizados foram sequenciados a fim de que fosse confirmada por alinhamento a identidade dos mesmos. O sequenciamento das amostras foi realizado no Núcleo de Genética Animal e Conservação da Biodiversidade – UFES, utilizando o sequenciador automático de DNA *Applied Biosystems* modelo 310.

As amostras de DNA amplificado foram purificadas com a enzima *Exosap (Invitrogen)*, na proporção de 1µL de enzima para cada 10µL de produto de PCR. A reação de purificação foi realizada a 37 °C por 30min, seguida por etapa a 80 °C por 15min. Na reação de seqüenciamento, os DNA-moldes (1µL) foram marcados utilizando-se 0,64µL de primer 5µM, sendo utilizado um por vez, 3,5µL de tampão, 0,5µL de reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 (Applied Biosystems)*, completando-se o volume final de 10µL com água ultrapura. As reações de purificação e sequenciamento foram realizadas em termociclador *Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems™)*. As etapas da reação de seqüenciamento foram as seguintes: desnaturação inicial a 96 °C por 1 min seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 s, 50 °C por 5 s e 60 °C por 4 min. Após marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol e lavagem com etanol 70 %. Os produtos precipitados foram submetidos à secagem por 5min a 95 °C. As seqüências foram analisadas pelo *Applied Biosystems DNA Sequencing Analysis Software v. 5.1*.

3.2.3 Atividade Enzimática

3.2.3.1 Obtenção do extrato protéico bruto

Para as análises da atividade das enzimas antioxidantes foram retiradas a primeira folha jovem completamente expandida de cinco plantas de cada tratamento. No momento da coleta, cada folha foi imediatamente embalada em papel alumínio, congelada em nitrogênio líquido e armazenada em ultra-freezer a -80 °C. Para obtenção do extrato protéico, foram macerados em almofariz 0,2 g de tecido foliar

com 2%(p/v) de polivinilpolipirrolidona (PVPP). Em seguida, foi acrescentado 1500µL de solução de extração contendo: 750µL de tampão fosfato de potássio 100mM (pH 6,8), 15µL de EDTA 10 mM, 150µL de ácido ascórbico 100mM e 585µL de água ultra pura. Os restos celulares foram removidos por centrifugação por 15 min a 13000g a 4°C em centrífuga refrigerada. O sobrenadante foi coletado, armazenado em um *ependorf* e congelado em ultra-freezer a -80°C. Este extrato foi utilizado nas análises de atividade enzimática e quantificação de proteínas solúveis totais.

3.2.3.2 Determinação do conteúdo de proteínas solúveis totais

Para a determinação do conteúdo proteínas solúveis totais foi utilizada a metodologia proposta por Bradford (1976), utilizando-se uma curva padrão de BSA.

Para o preparo de cada 100mL do reagente de cor, 10mg de Coomassie Brilliant Blue G250 foi dissolvido em 4,7mM de etanol absoluto. À mistura, foram adicionados 10mL de ácido fosfórico (H₃PO₄ 85% p/v) e completou-se o volume para 100mL com água deionizada. A solução obtida foi filtrada com papel de filtragem média no dia de cada leitura. O reagente de cor foi mantido em frasco escuro em geladeira.

Para a obtenção da curva padrão, foram preparados seis tubos de ensaio contendo 5 mL de reagente de cor e, nos tubos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 foram acrescentados respectivamente 100µL, 80 µL, 60 µL, 40 µL, 20µL e 0 µL de água ultra pura e 0µL, 20µL, 40µL, 60µL, 80µL, 100µL de solução de Bovine Serum Albumine (BSA) na concentração de 1mg/mL. Os tubos foram vortexados e incubados à temperatura ambiente por 5 min. As amostras foram lidas em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis) a 595 nm utilizando-se o tubo 1 como branco.

O resultado das leituras de cada amostra foram plotados em um gráfico para a obtenção de uma fórmula de regressão linear. Os valores das leituras em espectrofotômetro foram aplicados nesta fórmula para obtenção do conteúdo de proteínas em cada amostra.

3.2.3.3 Atividade da Catalase

Para a determinação da atividade bruta da catalase foram adicionados 25µL do extrato protéico bruto e 200 µL de H₂O₂ 250 mM a um tubo de ensaio contendo 1,775 mL água ultra pura e 2mL de tampão fosfato 100mM (pH 6,8).A temperatura foi mantida constante por imersão dos tubos de ensaio em banho-maria a 28°C. As amostras tiveram a absorbância monitorada em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis) a 240 nm durante 1 min e 30 s, em intervalos 15 em 15 s (HAVIR & MCHALE, 1987). A atividade bruta da catalase foi calculada baseando-se no coeficiente de extinção molar do H₂O₂ (0,036 umol cm⁻¹) e expressa em µmol H₂O₂ min⁻¹ mg⁻¹ proteína (ANDERSON et al, 1995), considerando-se que 1 U de CAT é a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 mol de H₂O₂ em 1 min.

A atividade específica foi determinada dividindo-se o valor da atividade bruta da catalase pelo conteúdo de proteínas solúveis totais obtido em cada amostra.

3.2.3.4 Atividade da Peroxidase do Ascorbato

Para a determinação da atividade bruta da Peroxidase do Ascorbato foi adicionado 50µL do extrato bruto, 200 µL de H₂O₂ 2mM a um tubo de ensaio contendo 1,775 mL água ultra pura, 2mL de tampão fosfato 100mM (pH 6,8) e 200µL de ácido ascórbico 10mM, mantido em temperatura constante por imersão em banho-maria a 28°C. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis) a 290nm, durante 1 min, com intervalos de 15 em 15s. Para a determinação da atividade da enzima foi utilizado o coeficiente de extinção molar do ascorbato de 0,0028 umol cm⁻¹ e o resultado expresso em µmol ascorbato min⁻¹ mg⁻¹ proteína, considerando que 1 U de APX é a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 mol de ascorbato em 1 min (NAKANO & ASADA, 1981).

A atividade específica foi determinada dividindo-se o valor da atividade bruta da peroxidase do ascorbato pelo conteúdo de proteínas solúveis totais obtido em cada amostra.

3.2.3.5 Atividade da Superóxido Dismutase

Para a determinação da atividade bruta da SOD foi preparado meio de reação da enzima contendo 1,5mL de tampão fosfato de potássio 100mM pH 7,5; 780µL de metionina 13mM; 60 µL de riboflavina 2mM; 60 µL de EDTA 0,1mM; 320 µL de água deionizada e 225 µL de NBT 75 µM. Estes volumes correspondem a 1 tubo de ensaio, o volume final do coquetel foi obtido pela multiplicação dos volumes pelo número de amostras. A metionina, a riboflavina e o NBT foram preparados no escuro e mantidas em recipientes envolvidos em papel alumínio a fim de evitar fotorredução, sendo que o NBT foi preparado no momento da incubação. Um tubo de ensaio foi identificado como branco claro, no qual foi adicionado 50 µl de água ultra-pura ao invés da amostra. Três tubos por tratamento foram envolvidos em papel alumínio e identificados como brancos do escuro, nos quais foram adicionados 50 µl de amostra. Das três medidas foi obtida uma média para branco do escuro. Nos demais tubos, foram adicionados 50 µl de amostra. Os tubos branco claro e demais tubos do claro foram levados à uma câmara de fotorredução (uma caixa de isopor fechada revestida internamente por papel alumínio e uma lâmpada fluorescente de 15W) e foram mantidos por 30 minutos. A reação foi identificada com a mudança da coloração do branco claro de transparente para azul-arroxeadado, indicando a máxima redução do NBT à formazana azul). Foi realizada leitura em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis) a 560 nm.

A atividade da SOD foi calculada segundo a fórmula:

$$\text{SOD} = (A/(a-b)) \cdot 1$$

Onde:

A = absorvância do tubo sem amostra (branco claro)

a = médias das absorvâncias dos tubos contendo as amostras

b = média das absorvâncias dos tubos do escuro

Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (BEAUCHAMP & FRIDOVICH, 1971).

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial quatro (tratamentos) x duas (cultivares) x cinco ou três (repetições). Os resultados referentes aos dados paramétricos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando-se o programa ASSISTAT versão 7.6.

4 RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO 1 - CASA DE VEGETAÇÃO

4.1.1 Potencial hídrico (ψ_w)

O potencial hídrico não diferiu significativamente entre os tratamentos ao longo do tempo na cv. FB100, o que indica que os tratamentos impostos por 10 dias não provocaram alteração no teor de água das plantas.

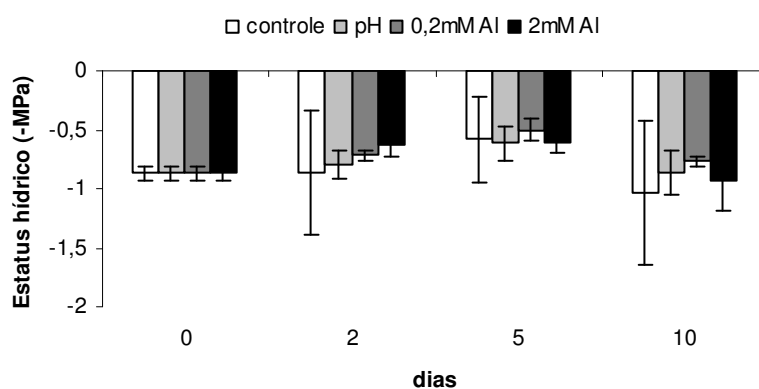


FIGURA 3: Potencial hídrico (Ψ_w) em plantas de *P. edulis* cv. FB100 submetidas a quatro tratamentos ao longo do tempo: controle, controle pH 4, 0,2mM de Al e 2mM de Al. As barras representam o erro padrão da média de três repetições por tratamento.

As plantas da cv. FB200 aos 5 dias, demonstraram que no tratamento 2mM de Al houve aumento do potencial hídrico em comparação ao controle do dia. Aos 2 e 10 dias não foram observadas diferenças.

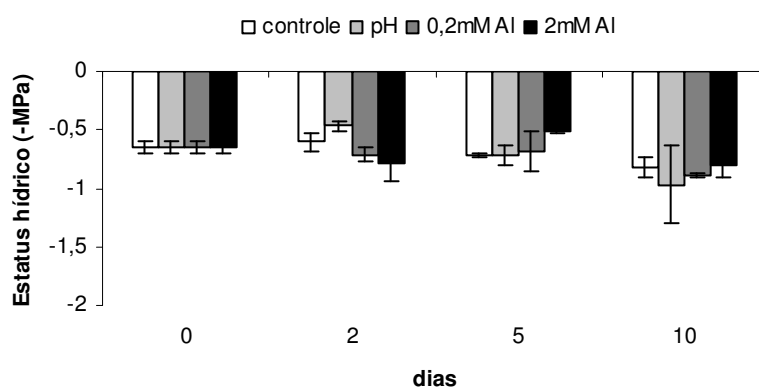


FIGURA 4: Potencial hídrico (Ψ_w) em plantas de *P. edulis* cv. FB200 submetidas a quatro tratamentos ao longo do tempo: controle, controle pH 4, 0,2mM de Al e 2mM de Al. As barras representam o erro padrão da média de três repetições por tratamento.

4.1.2 Expressão gênica

A partir da visualização dos perfis de expressão (géis) pode-se inferir o nível de amplificação para cada gene em determinado tratamento, no entanto, constitui uma análise subjetiva. Por esse motivo, foram realizadas análises de densitometria com base na intensidade das bandas de DNA, sendo a expressão relativa determinada amostra igual ao número de pixels da referida banda dividido pelo número de pixels da respectiva banda controle de amplificação, neste caso, 18S. Assim, serão descritos os resultados da expressão relativa e os géis serão apenas apresentados (Figuras 5, 6 e 7).

Siglas foram definidas para a apresentação dos resultados: TZ – tempo zero; CII – controle da coleta 5 dias; CIII – controle da coleta 10 dias; CN - controle negativo; PII – tratamento pH 4 da coleta 5 dias; PIII – tratamento pH 4 da coleta 10 dias; B – tratamento 0,2mM de Al; A – tratamento 2mM de Al.

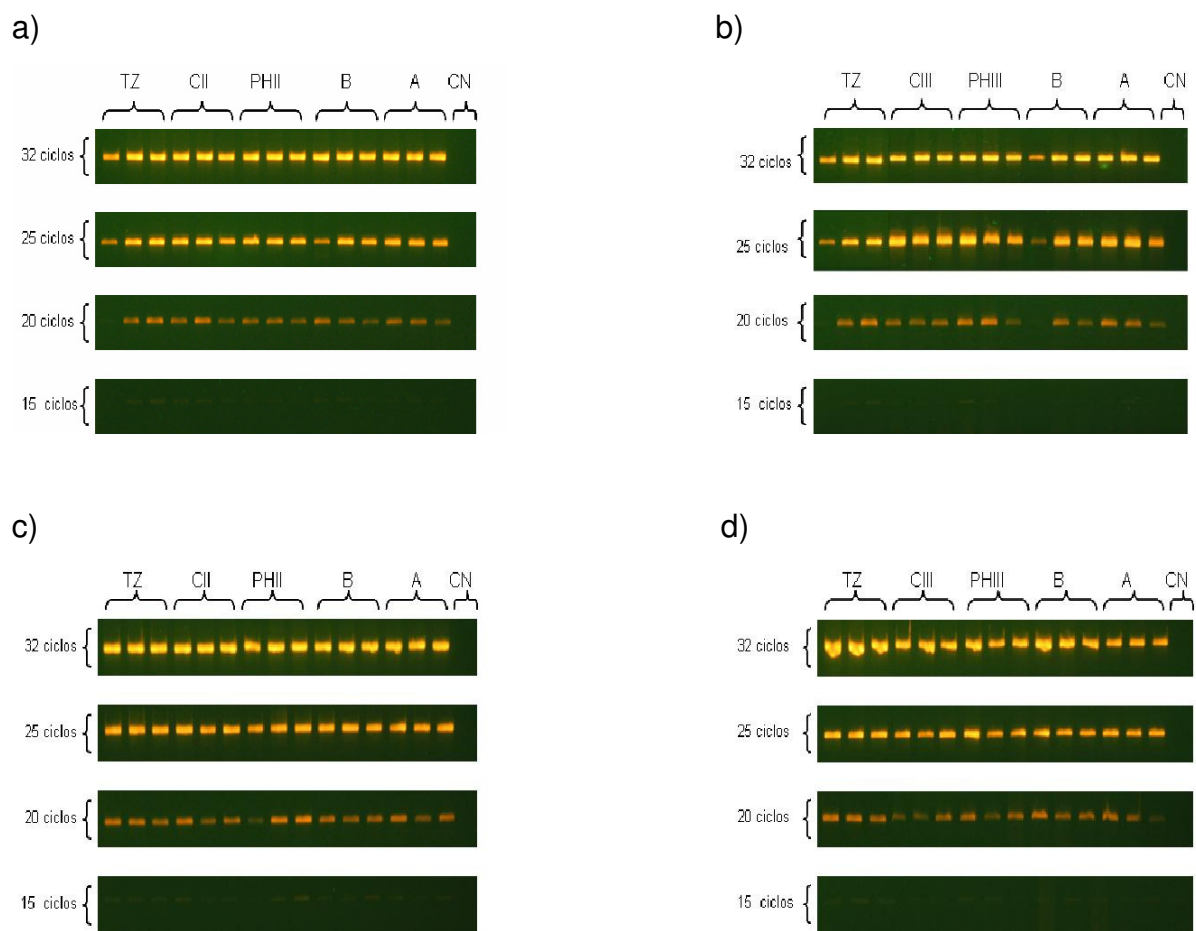


FIGURA 5: Perfis de expressão de Cat nas cultivares de *P. edulis* FB100 e FB200, nas três coletas: Tempo Zero, coleta 5 dias e coleta 10 dias, em PCR's de diferentes ciclos. (a) Expressão de Cat FB100 TZ/coleta 5 dias; (b) Expressão de Cat FB200 TZ/coleta 10 dias; (c) Expressão de Cat FB100 TZ/coleta 5 dias; (d) Expressão de Cat FB200 TZ/coleta 10 dias.

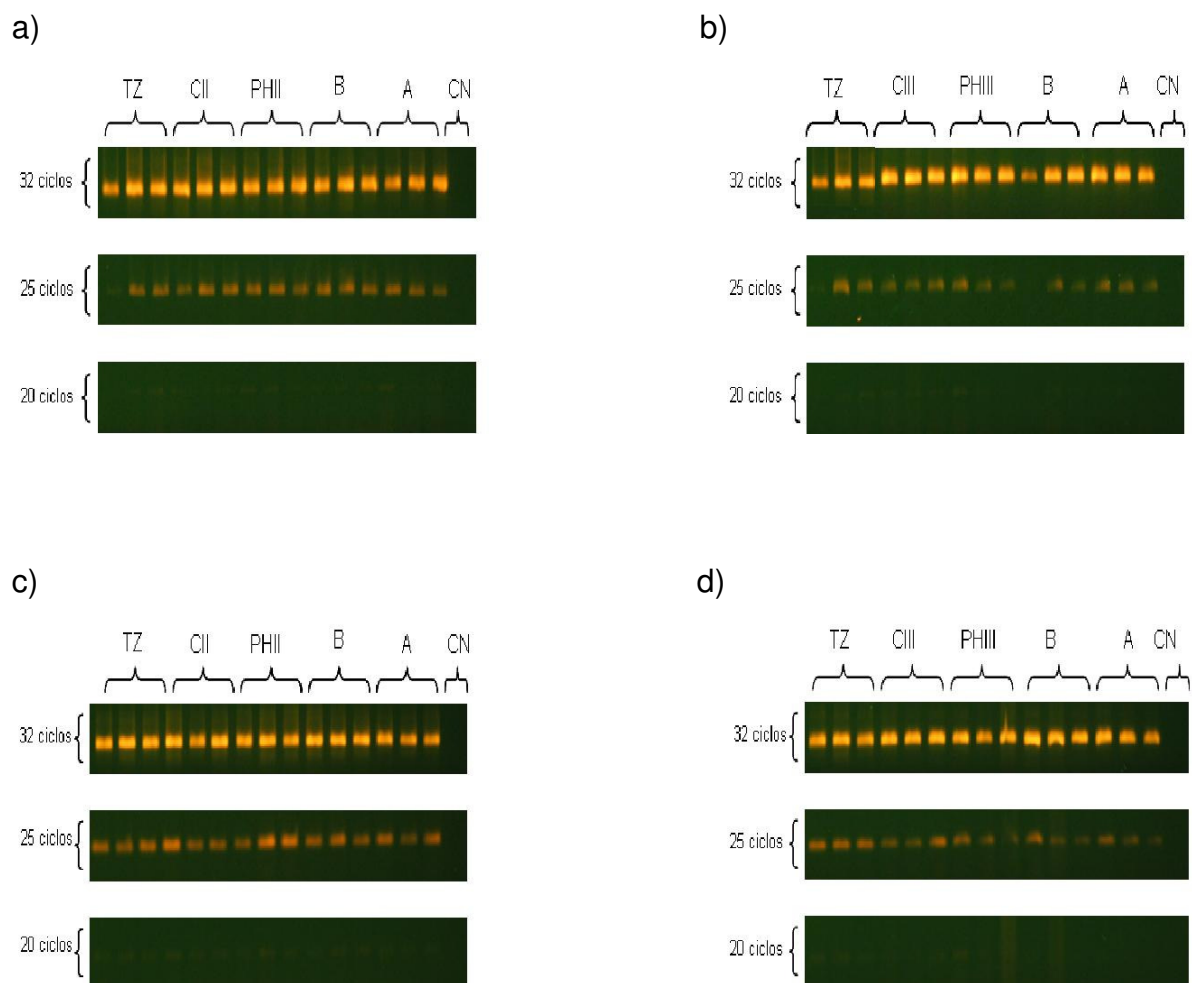


FIGURA 6: Perfis de expressão de Sod nas cultivares de *P. edulis* FB100 e FB200, nas três coletas: Tempo Zero, coleta 5 dias e coleta 10 dias, em PCR's de diferentes ciclos. (a) Expressão de Sod FB100 TZ/coleta 5 dias; (b) Expressão de Sod FB200 TZ/coleta 10 dias; (c) Expressão de Sod FB100 TZ/coleta 5 dias; (d) Expressão de Sod FB200 TZ/coleta 10 dias.

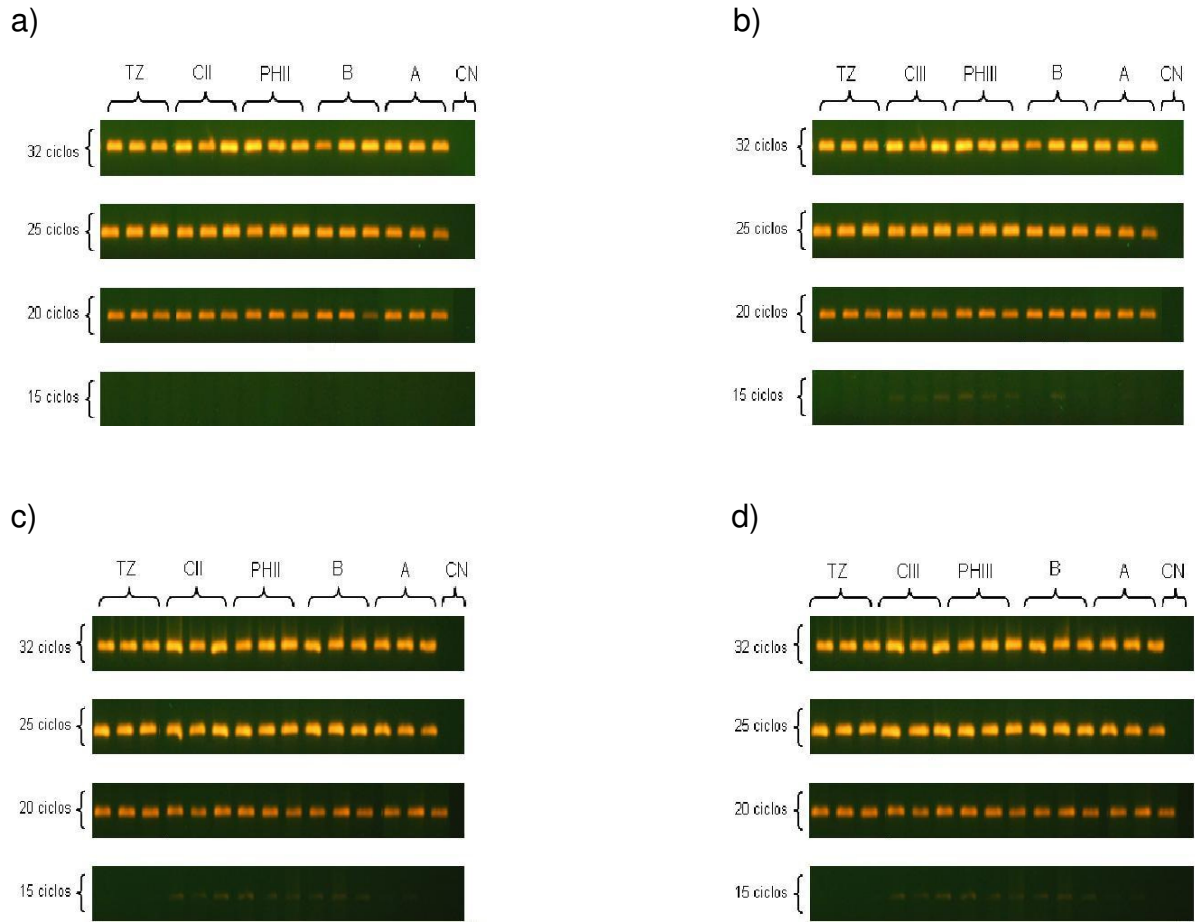
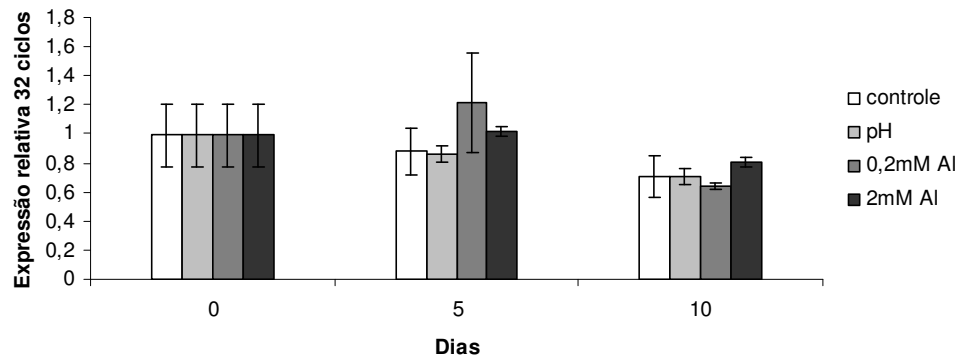


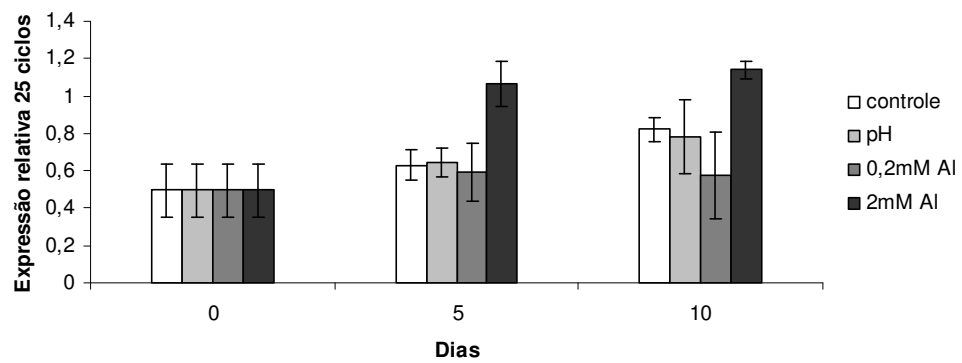
FIGURA 7: Perfis de expressão de 18S nas cultivares de *P. edulis* FB100 e FB200, nas três coletas: Tempo Zero, coleta 5 dias e coleta 10 dias, em PCR's de diferentes ciclos. (a) Expressão de 18S FB100 TZ/coleta 5 dias; (b) Expressão de 18S FB200 TZ/coleta 10 dias; (c) Expressão de 18S FB100 TZ/coleta 5 dias; (d) Expressão de 18S FB200 TZ/coleta 10 dias.

Na expressão relativa de *Cat* cv. FB100 com 32 ciclos, os tratamentos não diferem do controle na coleta de 5 e 10 dias (Figura 8a). Com 25 ciclos, a expressão de *Cat* nas plantas do tratamento 2mM de Al apresentou-se elevada quando comparada com o controle do dia e demais tratamentos, tanto na coleta de 5 dias quanto na coleta de 10 dias (Figura 8b). Na PCR de 20 ciclos, não existe diferença significativa entre os tratamentos e o controle na expressão relativa de *Cat* (Figura 8c). Na PCR de 15 ciclos a amplificação é muito reduzida, o que impossibilitou a comparação entre as amostras.

a)



b)



c)

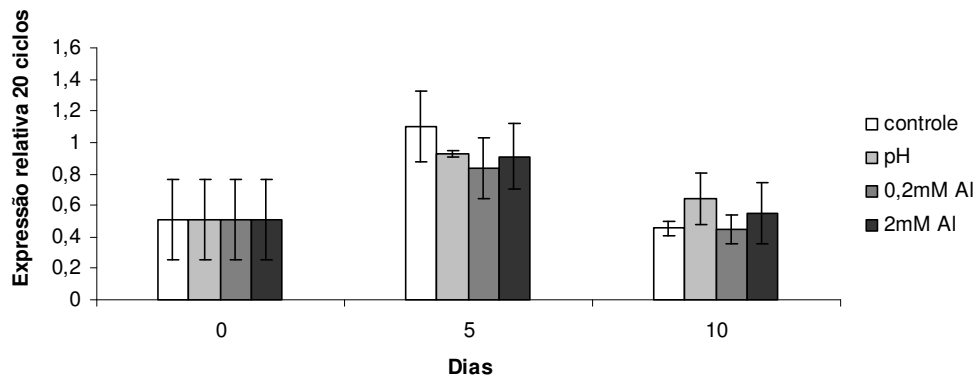
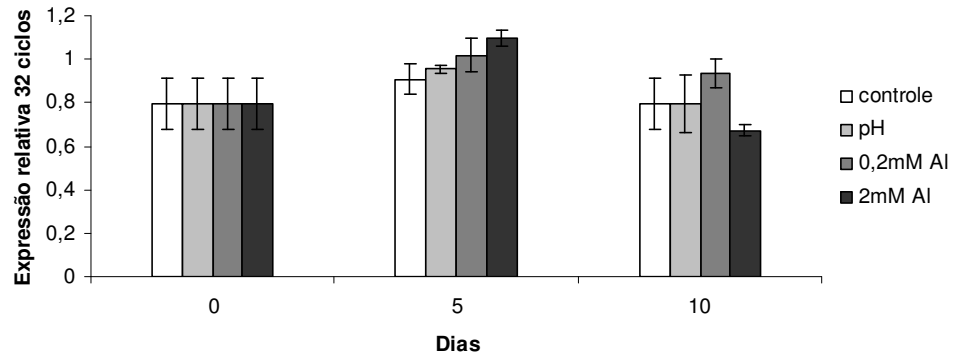


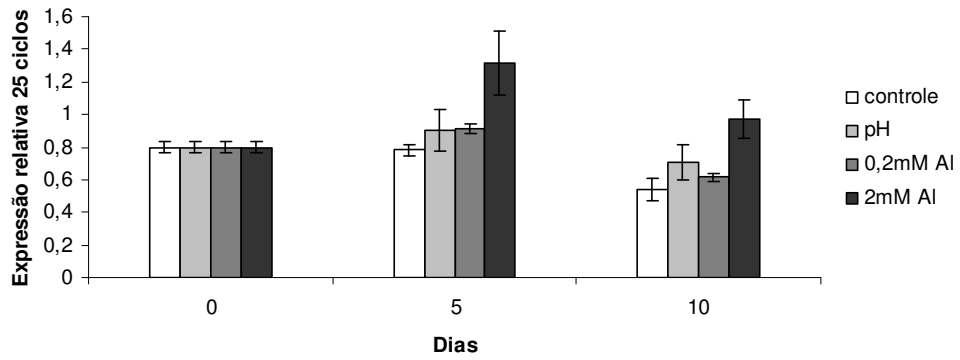
FIGURA 8: Expressão relativa de *Cat* em *P.edulis* FB100, em PCR's de diferentes ciclos. (a) Expressão relativa com 32 ciclos. (b) Expressão relativa com 25 ciclos. (c) Expressão relativa com 20 ciclos. As barras representam o erro padrão da média. Os valores são médias de 3 repetições.

A cv. FB200 de *P. edulis* aos 5 dias de tratamento, com 32 ciclos, indicou que o nível de amplificação de *Cat* nas plantas que receberam a maior dose de Al (2mM) foi maior que o controle do dia, ao passo que aos 10 dias os tratamentos não mostraram diferenças em relação ao controle (Figura 9a). Na PCR de 25 ciclos, os tratamentos que receberam Al apresentaram maiores níveis de amplificação que o controle do dia, sendo que o tratamento 2mM exibiu expressão de *Cat* ainda maior que o tratamento com 0,2mM de Al, aos 5 dias. Na coleta de 10 dias, apenas o tratamento com 2mM de Al indicou aumento na expressão do gene *Cat* (Figura 9b). Com 20 ciclos os tratamentos não exibiram diferença na expressão relativa em comparação ao controle ao longo do tempo (Figura 9c). Na PCR de 15 ciclos a amplificação mostra-se bastante reduzida, o que impossibilita a análise densitométrica.

a)



b)



c)

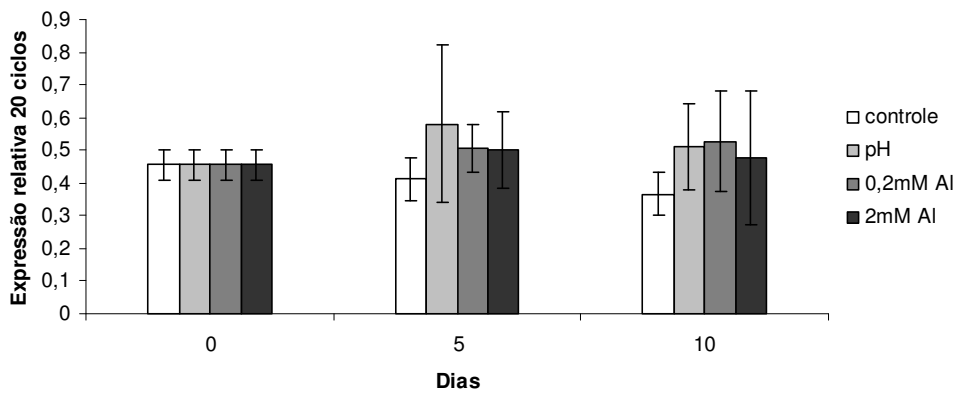
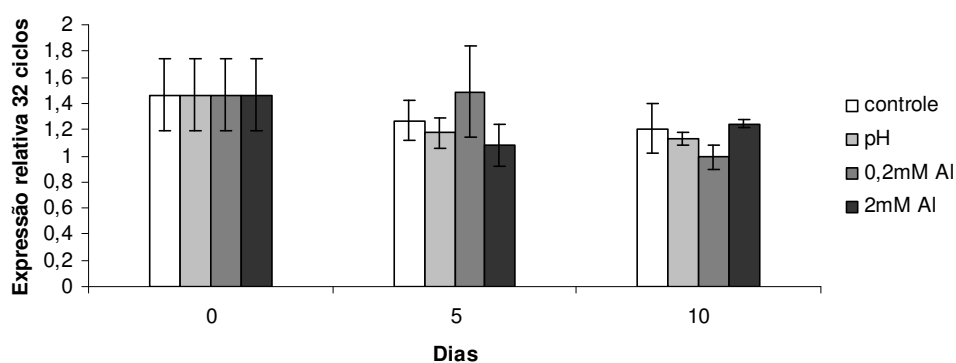


FIGURA 9: Expressão relativa de Cat em *P.edulis* FB200, em PCR's de diferentes ciclos. (a) Expressão relativa com 32 ciclos. (b) Expressão relativa com 25 ciclos. (c) Expressão relativa com 20 ciclos. As barras representam o erro padrão da média. Os valores são médias de 3 repetições.

A expressão de Sod 32 ciclos cv. FB100 não apresentou diferença entre os tratamentos nas coletas de 5 e 10 dias (Figura 10a). Para a mesma cultivar, aos 25 ciclos, a expressão aos 5 dias mostrou-se elevada em relação ao TZ e ainda, as plantas tratadas com Al exibiram maior nível de amplificação que o controle do dia. Aos 10 dias, as plantas tratadas com a concentração mais baixa de alumínio apresentaram amplificação menor que o controle, ao passo que as plantas tratadas com a concentração mais alta de alumínio mostraram nível de expressão maior que o controle e os demais tratamentos (Figura 10b). Nas PCR's de 20 e 15 ciclos a análise por densitometria foi inviabilizada pela reduzida amplificação.

a)



b)

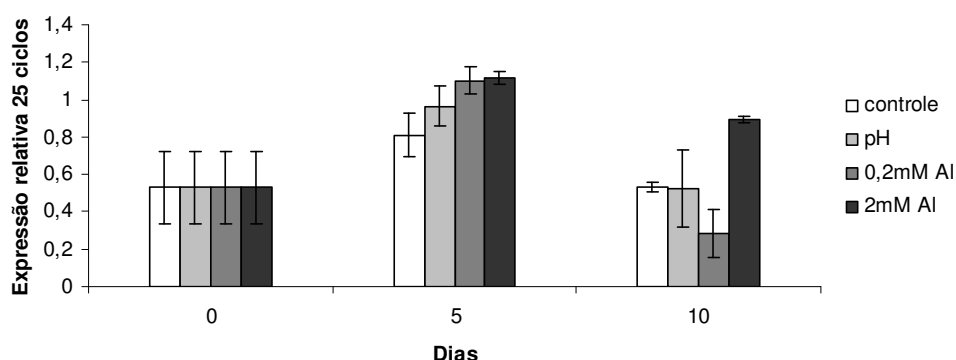
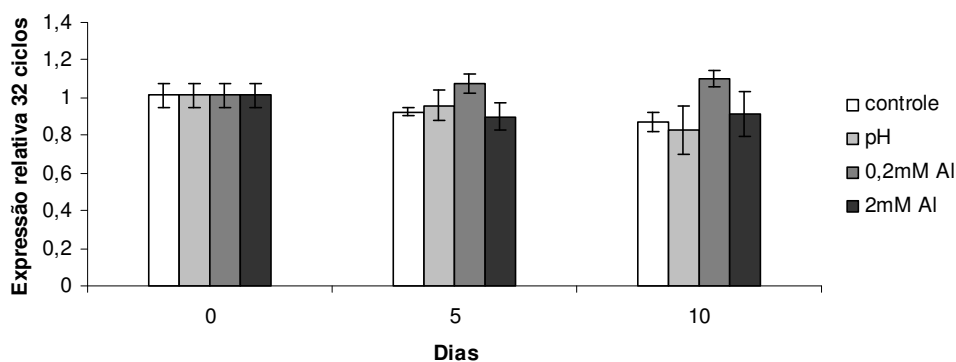


FIGURA 10: Expressão relativa de Sod em *P.edulis* FB100, em PCR's de diferentes ciclos. (a) Expressão relativa com 32 ciclos. (b) Expressão relativa com 25 ciclos. As barras representam o erro padrão da média. Os valores são médias de 3 repetições.

A cv. FB200 de *P.edulis* 32 ciclos mostrou expressão elevada de *Sod*, em relação ao controle do dia, das plantas do tratamento 0,2mM de Al aos 5 e 10 dias (Figura 11a). Com 25 ciclos, as plantas não apresentaram diferença significativa na expressão do gene *Sod* dos tratamentos e seus respectivos controles (Figura 11b). Nas PCR's de 20 e 15 ciclos não foi possível comparação entre as amostras pela reduzida amplificação.

a)



b)

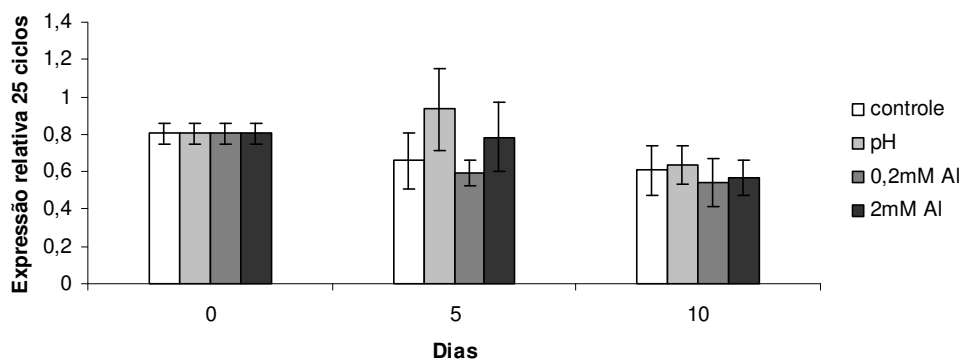


FIGURA 11: Expressão relativa de *Sod* em *P.edulis* FB200, em PCR's de diferentes ciclos. (a) Expressão relativa com 32 ciclos. (b) Expressão relativa com 25 ciclos. As barras representam o erro padrão da média. Os valores são médias de 3 repetições.

4.1.3 Sequenciamento

A sequência de DNA obtida a partir de amplificação do cDNA com o *primer* 18S apresentou similaridade de 99% com sequências de RNA ribossomal 18S de 48 espécies de plantas, dentre elas: *Ixiolirion tataricum*, *Gladiolus illyricus*, *Hesperocallis undulata*, *Triplostegia glandulifera* e *Polyosma sp.*

A sequência de cDNA obtida a partir do *primer* Cat (329pb) apresentou porcentagens de homologia com os genes: 80% com o gene Cat1 da espécie *Brassica juncea* e 80% com o gene Cat3 também da espécie *Brassica juncea*.

A sequência de cDNA obtida a partir do *primer* Sod (371pb) teve homologia com o gene *MnSOD* com variações nas porcentagens entre as espécies: 83% com *Pistacia vera* e *Camellia sinensis*, 82 % *Vitis vinifera*, 81% com *Glycine max* e 80% com *Oryza sativa*.

A sequência de cDNA obtida a partir do *primer* Sod específico (172pb) teve homologia com o gene *MnSOD* das espécies: 88% com *Eichhornia crassipes* e 85% com *Prunus persica*.

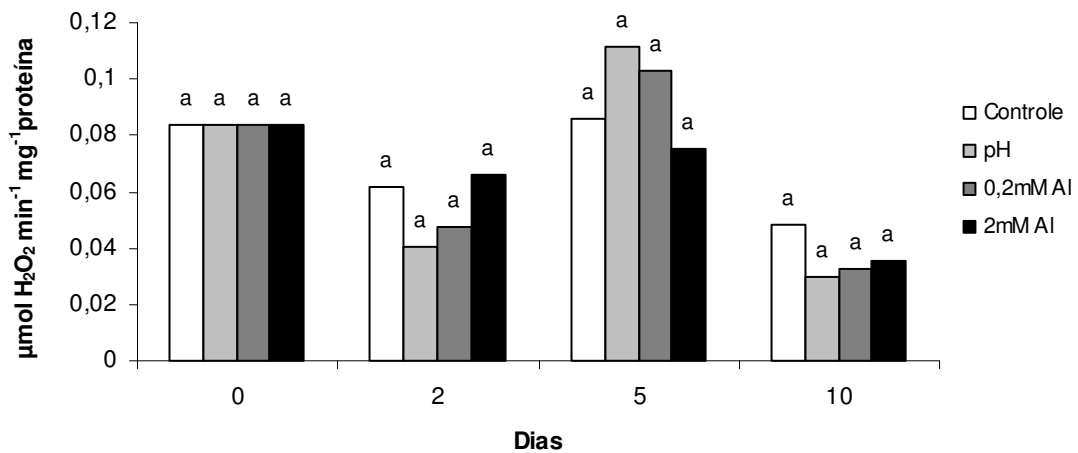
A sequência obtida a partir do *primer* Apx não apresentou alinhamento satisfatório com sequências de Apx de outras espécies vegetais. Dessa forma, este *primer* não foi submetido ao estudo por PCR semi-quantitativo.

Esses resultados confirmam que os *primers* utilizados alcançaram com sucesso, a exceção do *primer* Apx, o objetivo de amplificar as sequências desejadas.

4.1.4 Atividade enzimática

Na cv FB100, a atividade enzimática de CAT não apresentou diferença entre os tratamentos e respectivos controles em todas as coletas (Figura 12a). Por conseguinte, também não foram observadas diferenças na atividade da enzima CAT para a cv FB200 nas coletas de 2, 5 e 10 dias (Figura 12b).

a)



b)

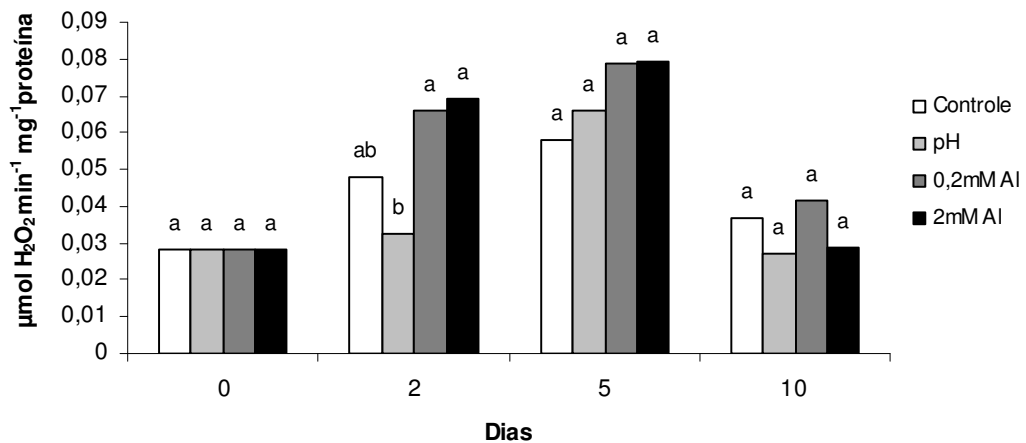


FIGURA 12: Atividade enzimática de CAT em *P. edulis*. (a) Atividade de CAT na cv FB100. (b) Atividade de CAT na cv FB200. Os valores são médias de 5 repetições.

A enzima SOD na cv FB100 mostrou atividade aumentada nas plantas tratadas com a concentração mais baixa de alumínio aos 10 dias (Figura 13a). Na cv FB200, a quantidade de SOD foi mantida semelhante ao controle ao longo do tempo de tratamento (Figura 13b).

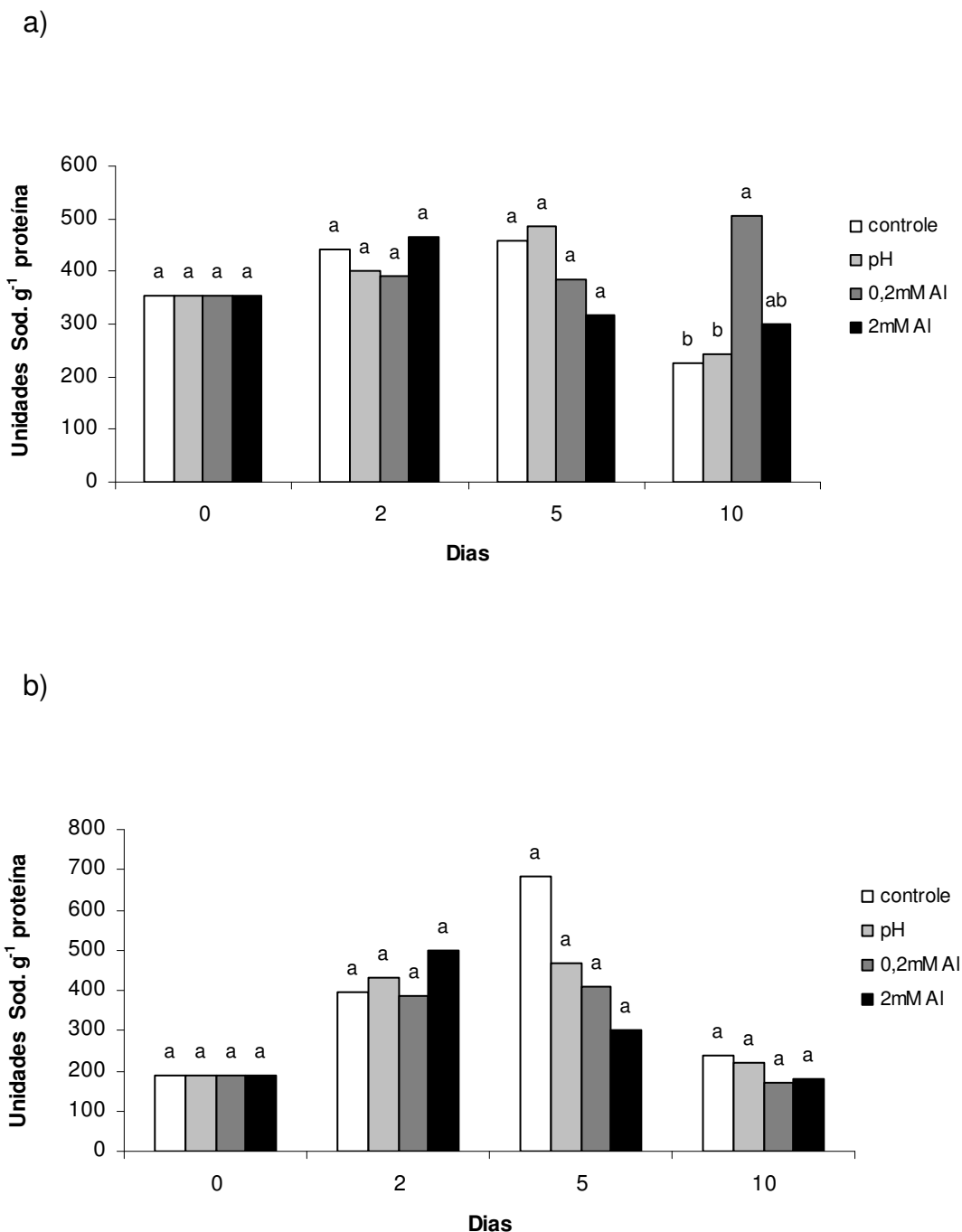


FIGURA 13: Atividade da enzima SOD em de plantas de *P. edulis*. (a) Atividade enzimática na cv FB100. (b) Atividade enzimática na cv FB200. Os valores são médias de 5 repetições.

A enzima APX em *P.edulis* cv FB100 não apresentou diferença em sua atividade entre as plantas tratadas e seus controles em todas as coletas, contudo a atividade de APX mostra-se diferente entre o tratamento pH 4 e o tratamento 2mM de Al, com maior atividade neste último (Figura 14a). As plantas da cv FB200 também exibem atividade de APX semelhante aos seus respectivos controles (Figura 14b).

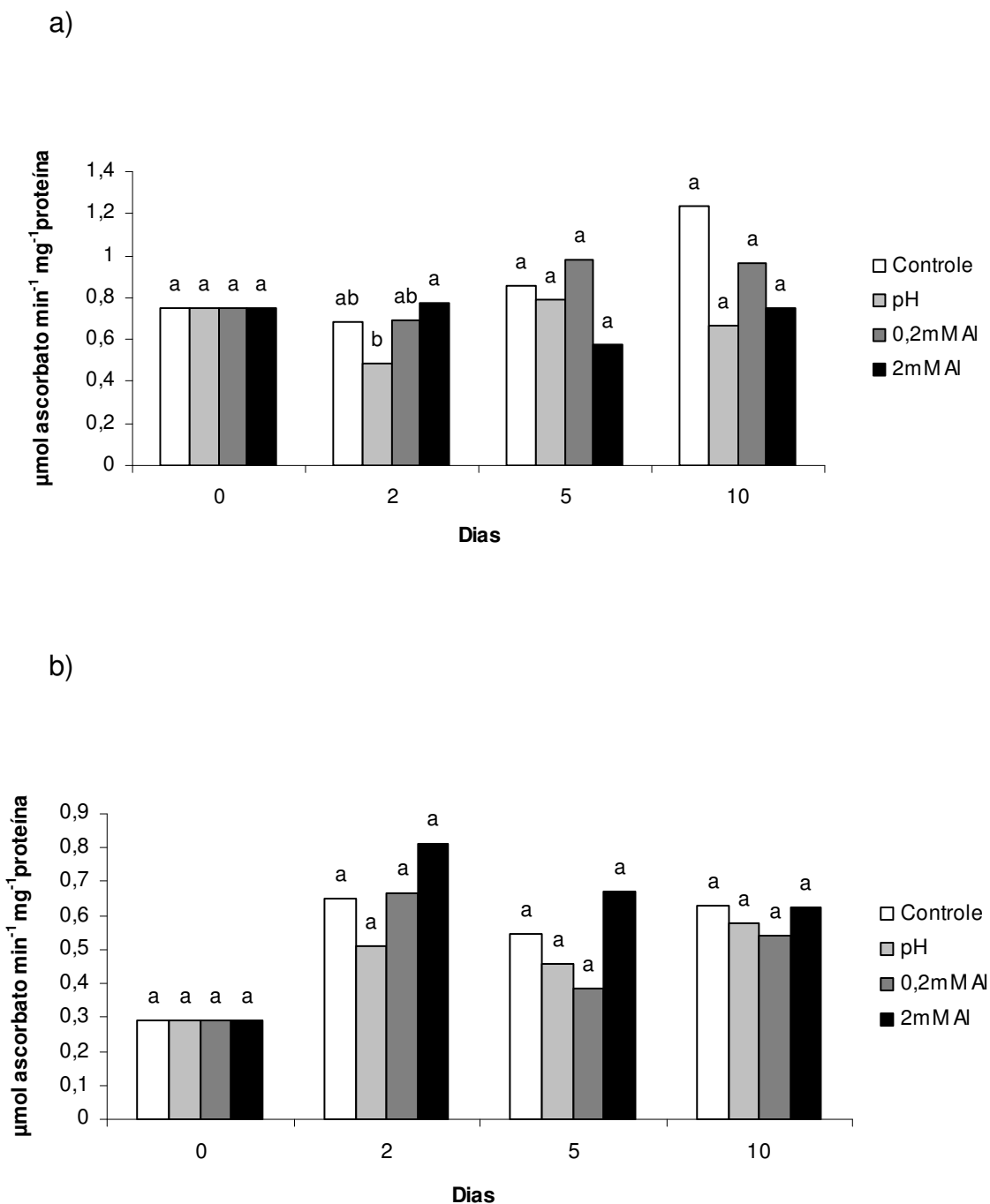


FIGURA 14: Atividade da enzima APX em de plantas de *P. edulis*. (a) Atividade enzimática na cv FB100. (b) Atividade enzimática na cv FB200. Os valores são médias de 5 repetições.

4.1.5 Quantificação de proteínas solúveis totais

O conteúdo de proteínas solúveis totais não foi alterado pela imposição dos tratamentos por 10 dias, em ambas cultivares testadas (Figuras 15a e 15b).

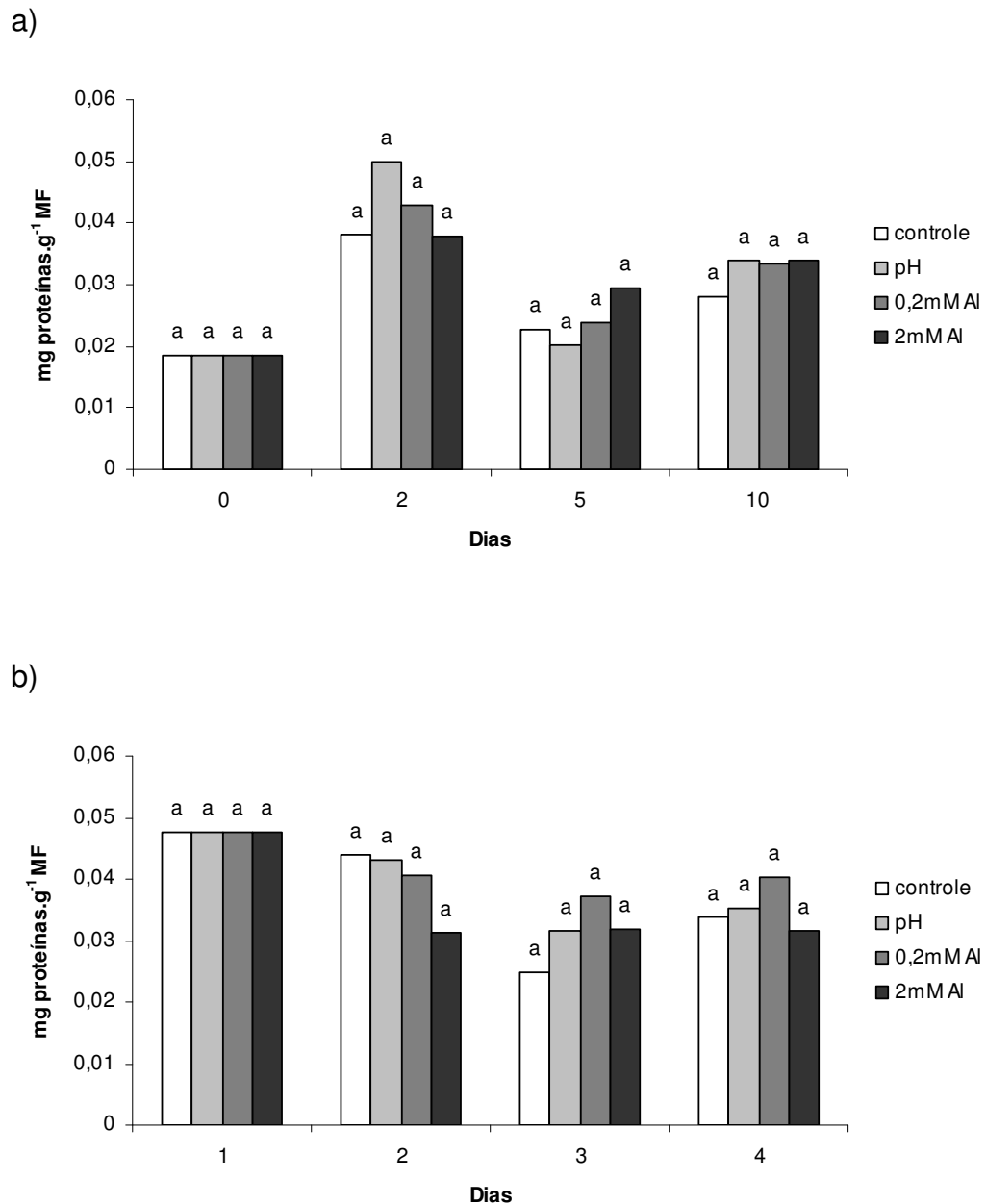


Figura 15: Quantificação de proteínas solúveis totais em plantas de *P.edulis*. (a) Conteúdo de proteínas na cv FB100. (b) Conteúdo de proteínas na cv FB200. Os valores são médias de 5 repetições.

4.2 EXPERIMENTO 2- CAMPO

4.2.1 Expressão gênica

Para apresentação dos resultados definiu-se campo 0 como lavoura controle, campo 1 como lavoura com 0,33mM de Al no solo, campo 8 como lavoura com 2,6 de Al no solo e CN (controle negativo) na qual a reação de PCR deu-se sem amostra.

O perfil de expressão de *Cat* é mostrado na figura 16a, na qual pode-se observar a expressão de forma diferenciada comparando-se os campos 0 e 1 em relação ao campo 8, não ocorrendo diferença significativa na expressão entre os campos 0 e 1. O gene *Cat* teve a expressão diminuída quando comparado com os demais campos inclusive na PCR de 32 ciclos. Dessa forma, a expressão relativa de *Cat* foi menor no campo 8 e não houve diferença significativa entre os campos 0 e 1, seja na PCR de 32, 25 ou 20 ciclos (Figura 17a). A PCR de 15 ciclos mostrou-se bastante reduzida, o que impossibilitou a comparação no tocante à expressão relativa.

No perfil de expressão de *Sod*, conforme Figura 16b, pode-se observar que os campos 0 e 1 apresentam maior nível de expressão que o campo 8, ao passo que os campos 0 e 1 não exibem diferença significativa no nível de amplificação. Logo, a expressão relativa de *Sod* foi menor no campo 8 e não foi observada diferença na expressão entre os campos 0 e 1, com 32 e 25 ciclos (Figura 17b). As PCR's de 20 e 15 ciclos mostraram-se bastante reduzidas, por esse motivo não foi possível calcular a expressão relativa.

O *primer* 18s, utilizado como controle de reação, originou *amplicon* de 190pb em todas as amostras de forma uniforme, demonstrando que a expressão deste gene não está sujeita a regulação por imposição do estresse. Houve esperada redução no nível de amplificação conforme o decréscimo no número de ciclos das PCR's (Figura 16c). A uniformidade da expressão das bandas do controle de reação indica que não ocorreu interferência da qualidade das amostras ou reagentes utilizados nas PCR's. A expressão relativa de *Cat* e *Sod* foi obtida

pela divisão do número de pixels das bandas em estudo pelo número de pixels das bandas controle (18S).

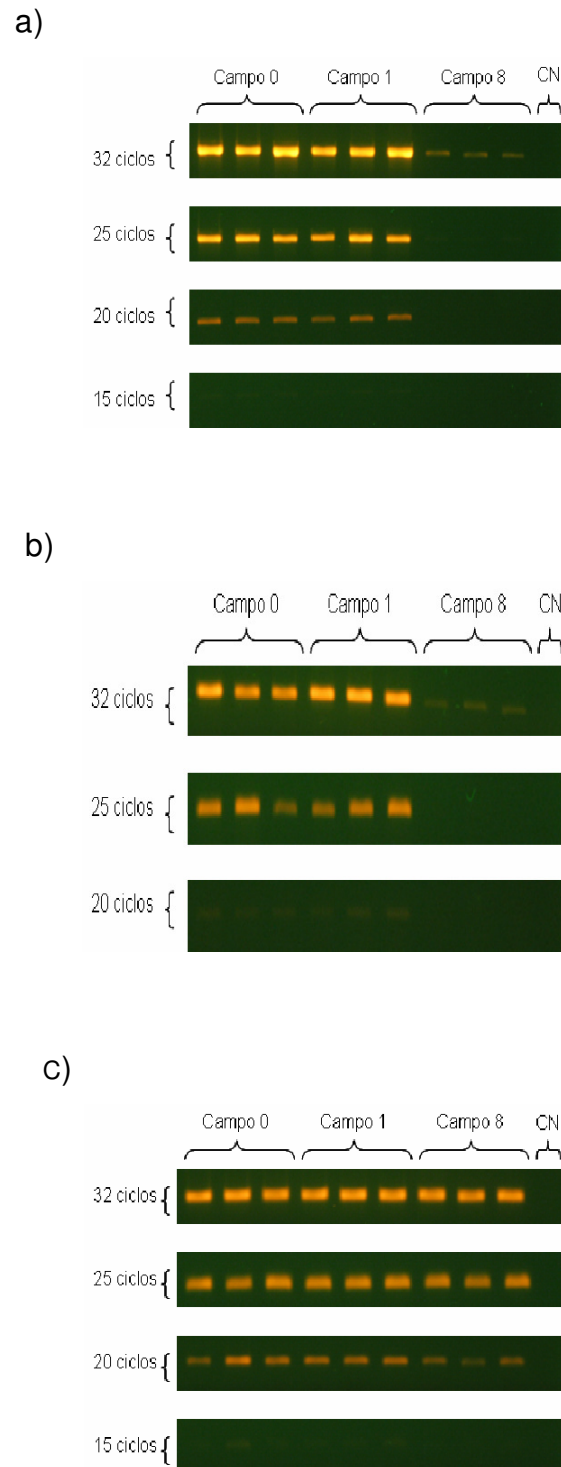
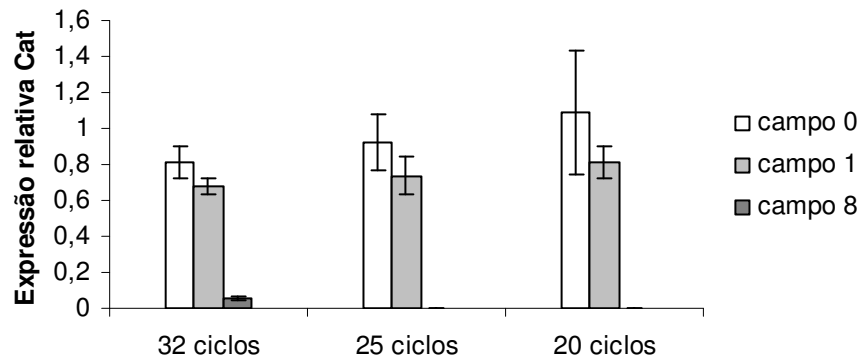


FIGURA 16: Perfis de expressão de *P. edulis* FB200 com PCR's de diferentes ciclos.(a) Expressão de Cat após 32, 25, 20 e 15 ciclos. (b) Expressão de Sod após 32, 25 e 20 ciclos. (c) Expressão de 18S após 32, 25, 20 e 15 ciclos.

a)



b)

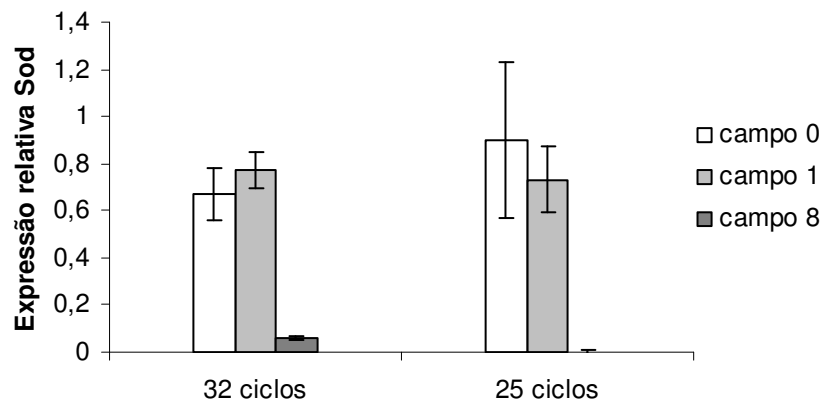


FIGURA 17: Expressão relativa de *P.edulis* FB200 em campo. (a) Expressão relativa de Cat com 32, 25 e 20 ciclos. (b) Expressão relativa de Sod com 32 e 25 ciclos.

4.2.2 Atividade enzimática

A atividade enzimática de CAT não apresentou diferença significativa entre os campos em estudo (Figura 18).

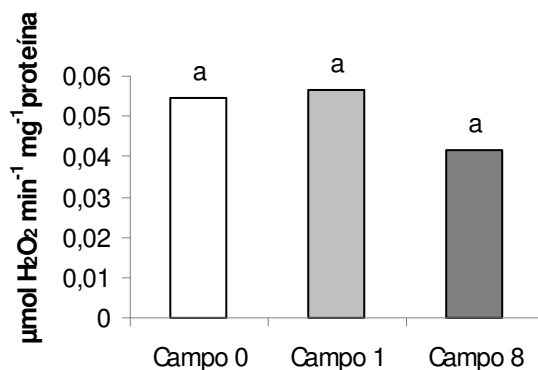


FIGURA 18: Atividade enzimática de CAT em *P. edulis* FB200 cultivado em campo. Os valores são médias de 5 repetições.

A enzima SOD apresentou maior atividade em plantas de *P. edulis* no campo 8 em relação aos demais campos. Não foram observadas diferenças na atividade de SOD entre os campos 0 e 1 (Figura 19).

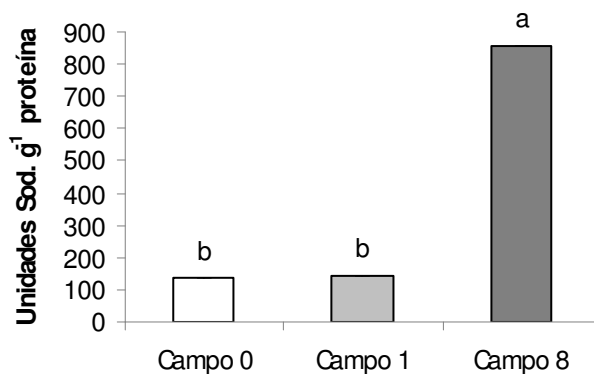


FIGURA 19: Atividade enzimática de SOD em *P. edulis* FB200 cultivado em campo. Os valores são médias de 5 repetições.

A enzima APX apresentou maior atividade no campo 8 quando comparado com os demais campos em estudo. Não houve diferença significativa na atividade de APX entre os campos 0 e 1 (Figura 20).

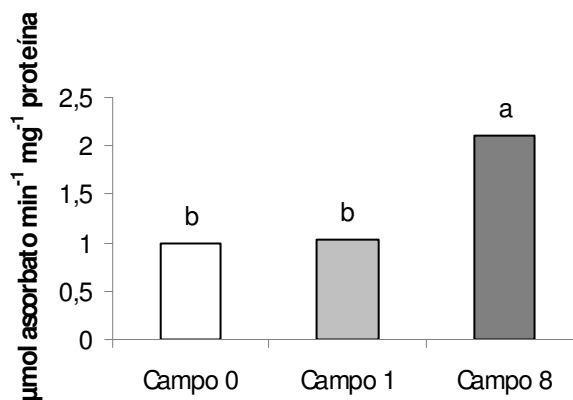


FIGURA 20: Atividade enzimática de APX em *P. edulis* FB200 cultivado em campo. Os valores são médias de 5 repetições.

4.2.3 Quantificação de proteínas solúveis totais

O campo 8 apresentou menor quantidade de proteínas solúveis totais que os demais campos, sendo que estes não apresentaram diferença significativa entre si no conteúdo de proteínas (Figura 21).

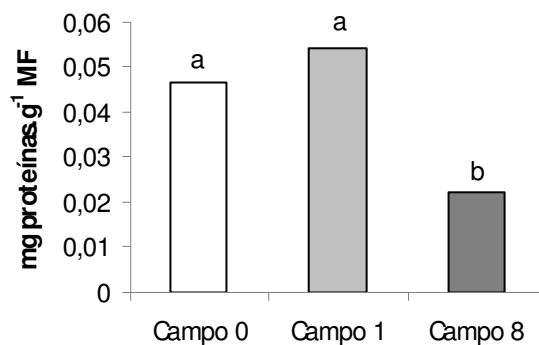


FIGURA 21: Quantificação de proteínas solúveis totais em plantas de *P.edulis* FB200 cultivado em campo. Os valores são médias de 5 repetições.

5 DISCUSSÃO

Os possíveis efeitos de deficiência hídrica na planta podem ser provocados pelo aumento da acidez e disponibilidade de alumínio para o sistema radicular o que pode resultar em menor capacidade de absorção de água e absorção dos nutrientes do solo pelas plantas (ZHENG & YANG, 2005; ZHANG et al., 2007). Estes efeitos são observados como consequência da inibição do crescimento das raízes (BEUTLER et al., 2001). Entretanto, de maneira geral, os resultados obtidos no presente estudo indicam que não houve modificação significativa no potencial hídrico foliar do maracujazeiro. Contudo, pode ser observado em ambas cultivares que existe uma tendência de no primeiro momento o potencial hídrico diminuir, seguindo-se uma fase de aumento do potencial e posterior restabelecimento da condição inicial. Segundo Larcher (2006), o estresse visto como evento dinâmico apresenta três fases sequenciais características: fase de alarme, fase de resistência e fase final. Durante a fase de alarme ocorre perda da estabilidade inicial das funções, na fase de resistência o vegetal tende a uma normalização, que na fase final, no caso de estresse moderado ou temporário, pode levar ao aumento da resistência.

O alumínio em níveis tóxicos pode ainda induzir danos causados por estresse oxidativo, como resultado do aumento na produção e acúmulo de EROS (PEREIRA et al., 2010). Estas controlam muitos processos vitais nos organismos vegetais, entretanto sendo moléculas tóxicas, podem causar injúrias nas células (MITLER et al., 2002; MITLER et al., 2004), como a oxidação de membranas lipídicas, proteínas e ácidos nucleicos, além da interferência em processos fisiológicos como a fotossíntese e a respiração (SCANDALIOS, 2005). Além disso, estudos mostram que o Al pode induzir a expressão de genes contra seu efeito tóxico, estes genes são responsáveis principalmente pela produção de enzimas relacionadas ao sistema de defesa antioxidativo das plantas (EZAKI et al., 2000; RODRIGUES-MILLA et al., 2002).

A enzima CAT está diretamente envolvida no controle dos danos causados por H_2O_2 . No presente estudo com amostras provenientes do cultivo em casa de

vegetação, o nível de transcrição de *Cat* cv. FB100 mostrou-se elevado no tratamento 2mM de Al, em ambas coletas, 5 e 10 dias, com 25 ciclos.

Na cv. FB200, os transcritos *Cat* exibiram maior amplificação no tratamento com 2mM de Al, na coleta de 5 dias, PCR de 32 ciclos. Também houve aumento na PCR de 25 ciclos, em ambos tratamentos, na coleta de 5 dias e, somente no tratamento 2mM de Al, na coleta de 10 dias. Essa elevação dos níveis de transcritos da *Cat* pode refletir uma resposta primária da célula ao estresse promovido pelo alumínio. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Balestrasse et al.(2008), nos quais ocorreu a elevação dos níveis de transcritos *Cat* em nódulos de soja sob estresse por cádmio. Em *Ulva fascinata*, Sung et al. (2009) relataram aumento na amplificação de genes *Cat* quando da imposição de estresse salino. Panda et al. (2010) demonstraram aumento na expressão relativa de *Cat*, em raiz de *Pisum sativum*, proporcional ao aumento da concentração e tempo de exposição ao alumínio.

As amostras do campo exibiram comportamento bastante diferenciado. Nestas o nível de transcritos *Cat* do campo 8 (2,6mM de Al) mostrou-se reduzido em comparação aos demais campos, nas PCR's de 32 e 25 ciclos. Estes resultados corroboram os encontrados por Panda et al.(2010), nos quais a amplificação de *Cat* em folhas de *Pisum sativum* decresceu quando da exposição ao alumínio na medida em que se prolongou o tempo de exposição, mesmo em altas concentrações do agente estressor e ainda, neste caso a queda na expressão de *Cat* foi acompanhada pelo acréscimo de amplificação de *Apx*.

Os resultados obtidos com expressão relativa de *Sod* cv. FB100, em casa de vegetação, demonstram que a amplificação foi maior nas plantas tratadas com alumínio (0,2mM e 2mM de Al) na coletas de 5 dias, já aos 10 dias somente o tratamento 2mM de Al exibiu maior nível de transcritos, com 25 ciclos. Para a cv. FB200, os resultados mostram que o nível de expressão foi aumentado nas plantas tratadas com a menor concentração de alumínio (0,2mM). Smeets et al. (2008) também encontraram resultados semelhantes quanto a expressão de Cu-ZnSOD em folhas de *Arabidopsis thaliana*, com redução do nível destes transcritos com o

aumento da concentração de cádmio. Panda et al. (2010) relataram acréscimo no nível de expressão de diferentes tipos de SODs em *Pisum sativum*.

É interessante notar que em cv. FB200, na coleta de 10 dias, o tratamento com 0,2mM de Al expressou níveis de mRNA menores dos encontrados no controle, o que pode indicar que essa concentração baixa de alumínio foi benéfica para a planta, pela possível redução na produção de EROs. Alguns autores apontam essa ação benéfica do alumínio em baixas concentrações, como Salvador et al. (2000), que observaram que concentrações até 10mg.L⁻¹ de alumínio foram benéficas para o desenvolvimento de mudas de goiabeira (*Psidium guajava* L.).

As amostras provenientes do campo demonstraram que a expressão relativa de *Sod* foi diminuída no campo 8 (2,6mM de Al), nas PCR's de 32 e 25 ciclos. Panda et al.(2010) observaram que o nível de transcritos Fe-SOD em folhas de *Pisum sativum* decresceu com o aumento da concentração de alumínio. Segundo Alscher et al. (2002), as SODs constituem a primeira linha de defesa contra as EROs, eliminando a radical superóxido do metabolismo celular.

Como as plantas do campo estavam expostas ao alumínio por um tempo maior, visto que as lavouras tinham, em média, um ano de idade, é provável que esse tempo prolongado de exposição tenha contribuído para a menor expressão de *Cat* e *Sod*, mesmo no campo experimental com maior concentração de alumínio, provavelmente por elas serem as duas enzimas de atuação imediata quando da imposição de um estresse (SCANDALIOS, 1993). Possivelmente, devido ao maior tempo em que as plantas estavam expostas ao alumínio, as enzimas de defesa primária (*Sod* e *Cat*) já estavam disponíveis, e essa disponibilidade pode funcionar como *feedback* negativo no controle transcricional.

Catalases são enzimas que convertem H₂O₂ em oxigênio molecular e água, porém possuem baixa afinidade ao substrato (MITLER, 2002). Em *P. edulis* cultivado em solução nutritiva não houve diferença significativa na atividade de CAT, em ambas as cultivares, apesar de os níveis de transcritos terem sido aumentados. Boscolo et al. (2003) relataram que não ocorreram mudanças na atividade de CAT em milho exposto à toxicidade de alumínio.

O radical considerado mais reativo à catalase é o O_2^- que pode atravessar facilmente membranas, representando assim, o principal agente inibidor dessa enzima (SHIMIZU et al., 1984). Para as amostras de *P.edulis* cultivadas em solução nutritiva, a inibição de CAT pode ser atribuída ao radical O_2^- , pois nessas amostras, aos 10 dias de exposição ao alumínio, não houve aumento de CAT, ao passo que foi observado um incremento na atividade de SOD, em baixa concentração de alumínio.

No caso das amostras do campo, a atividade da CAT foi mantida, em todos os tratamentos. Da mesma forma é provável que o radical O_2^- tenha provocado inibição da atividade de CAT na lavoura com maior concentração de alumínio, uma vez que a atividade de SOD neste mesmo campo mostrou-se bastante elevada.

As amostras da cv. FB100 provenientes do cultivo em solução nutritiva demonstram que ocorreu acréscimo na atividade de SOD em baixa concentração de alumínio e, quando as plantas foram expostas a 2mM de Al houve um retorno da atividade de SOD aos níveis basais, equiparando-se ao controle. Pereira et al.(2010) também observaram acréscimo na atividade de SOD em *Cucumis sativus* em baixas concentrações de alumínio e em altas concentrações (2mM), esses autores observaram decréscimo na atividade de SOD. No presente estudo, o decréscimo na atividade de SOD pode indicar excesso de peróxido no tecido foliar, visto que as atividades de CAT e APX foram mantidas semelhantes ao controle.

O peróxido de hidrogênio tem a capacidade de inativar enzimas pela oxidação dos grupos tiol (BOWLER et al.,1992). Além disso, o peróxido é uma ERO bastante estável e o aumento de sua síntese tem sido demonstrado como resposta a diversos tipos de estresses (DUBEY & SHARMA, 2004). As amostras de *P. edulis* cultivado em campo demonstram maior atividade de SOD na lavoura com 2,6mM de Al (campo 8). Resultado semelhante foi encontrado por Tariq-Aftab et al.(2010), no qual a atividade SOD foi aumentada na presença de alumínio.

Cultivares tolerantes tendem a aumentar sua atividade enzimática antioxidante. Meriga et al., (2004) relataram que, em arroz, a cv tolerante teria um sistema de remoção de EROs mais eficiente. O aumento da atividade de enzimas antioxidantes também tem sido relacionado como sendo um mecanismo à tolerância ao Al em

algumas variedades de milho e trigo (BOSCOLO et al., 2003; MA et al., 2007). Em nosso estudo, a elevação dos níveis de transcritos acompanhada do incremento na atividade de SOD, fato ocorrido apenas na cv FB100, pode indicar que essa cultivar apresenta sistema de defesa contra EROs mais eficiente, o que lhe confere maior tolerância ao estresse por alumínio que a cv FB200.

As APX participam da via alternativa de destruição do H_2O_2 , a via das peroxidases, sendo também enzimas que convertem peróxido em O_2 e água, porém o fazem utilizando o ascorbato como doador de elétrons (PEREIRA et al., 2011). No presente trabalho, as plantas cultivadas em solução nutritiva não exibiram mudanças na atividade enzimática de APX, em ambas cultivares. González-Santana et al. (2012) também observaram que não houve mudança na atividade de APX em folhas e raízes de *Conostegia xalapensis* submetidas a estresse por alumínio. De forma semelhante, Panda et al. (2010) demonstraram que atividade de APX não exibiu diferença em raiz de ervilha exposta a alumínio.

Nas plantas cultivadas em campo foi observado incremento na atividade de APX no campo 8 (2,6mM de Al). Porcel & Ruiz-Lozano (2004) relataram aumento na atividade de APX e redução na atividade de CAT em soja sob déficit hídrico. Da mesma forma, Silva et al. (2010), em estudos de danos oxidativos por restrição hídrica em pinhão-manso, demonstraram incremento na atividade de APX com concomitante decréscimo da atividade de CAT, situação similar aos resultados encontrados no presente estudo. Os estresses abióticos podem induzir incremento na expressão gênica e na atividade de APX, a fim de compensar as deficiências na atividade de CAT (PALATNIK et al., 2002).

O conteúdo de proteínas totais das plantas cultivadas em solução nutritiva não apresentou diferença em relação ao controle, em todas as coletas e em ambas cultivares. O que indica que a exposição ao alumínio não ocasionou alterações no conteúdo de proteínas totais. Já as plantas cultivadas em campo apresentaram diferença significativa em relação ao campo controle, com a redução no conteúdo de proteínas totais no campo 8 (maior concentração de Al). A redução das proteínas na lavoura 8 pode estar relacionada à tentativa de diminuição dos danos oxidativos provocados pelo possível aumento de EROs, já que este corresponde ao campo

com maior concentração de alumínio. Tal comportamento pode indicar que houve uma reestruturação na maquinaria protéica, com redução na produção de diversas proteínas e aumento na tradução de outras, envolvidas na defesa antioxidativa da célula, como a APX e a SOD.

6 CONCLUSÕES

- ❖ Nas duas cultivares, de modo geral, o conteúdo de água das plantas de *P. edulis* não foi modificado em nenhuma das condições testadas.
- ❖ Nas duas cultivares, nas amostras de casa de vegetação, o nível de transcrição de Cat mostrou-se elevado no tratamento de 2mM de alumínio. Enquanto as amostras do campo exibiram comportamento bastante diferenciado, com redução do nível de transcritos Cat no campo 8.
- ❖ Em ambas cultivares, nos experimentos de casa de vegetação, de modo geral, a expressão de Sod foi aumentada pela imposição dos tratamentos com alumínio.
- ❖ Nas amostras provenientes do campo, a expressão relativa de Sod foi diminuída, apenas na lavoura 8.
- ❖ Em *P. edulis* cultivado em solução nutritiva não houve diferença na atividade de CAT e APX, em ambas as cultivares.
- ❖ As amostras da cv. FB100 (casa de vegetação) indicam que houve excesso de peróxido no tecido foliar;
- ❖ No caso das amostras do campo, a atividade da CAT foi mantida, em todos os tratamentos e a atividade de SOD e APX, no campo 8, mostraram-se bastante elevadas.
- ❖ Apenas as plantas cultivadas no campo de maior concentração de alumínio apresentaram redução no conteúdo de proteínas totais, o que pode estar relacionado à tentativa de diminuição dos danos oxidativos.
- ❖ Devido à maior expressão e atividade da enzima SOD, em plantas cultivadas em casa de vegetação, a cv. FB100 mostrou-se mais tolerante à imposição do estresse por alumínio que a cv. FB200.

7 REFERÊNCIAS

ANDERSON, M.D.; PRASAD, T.K.; STEWART, C.R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. **Plant Physiology**, v.109, p.1247-1257, 1995.

ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA. Ed. Gazeta, 2011.

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.

ASADA, K. The role of ascorbate peroxidase and monodehydroascorbate reductase in H₂O₂ scavenging in plants. In: SCANDALIOS, J.G. **Oxidative stress and molecular biology of antioxidant defenses**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, p.715-735, 1997.

ASIF, M.H.; DHAWAN, P.; NATH, P. A sample procedure for the isolation of high quality RNA from ripening banana fruit. **Plant Molecular Biology Reporter**. v.18, p.109-115, 2000.

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

ARORA, A.; SAIRAM, R.K.; SRIVASTANA, G.C. Oxidative stress and antioxidative system in plants. **Current Science**, v.82, p.1227-1238, 2002.

AZEVEDO, H.; LINO-NETO, T.; TAVARES, R.M. An improved method for high quality RNA isolation from needles of adult maritime pine trees. **Plant Molecular Biology Reporter**. v.21, p.333-338, 2003.

AZEVEDO, M. L. **Extração de RNAs e perfil transcricional de enzimas que participam da degradação de parede celular em pêssegos cv. Chiripá após armazenamento**. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, 2008.

BAEK, K. & SKINNER, Z. D. Differential expression of manganese superoxide dismutase sequence variants in near isogenic lines of wheat during cold acclimation. **Plant Cell Reports**, v.25, n. 3, p.223-230, 2005.

BALESTRASSE, K. B.; YANNARELLI, G. G.; NORIEGA, G. O.; BATLLE, A.; TOMARO, M. L. Heme oxygenase and catalase gene expression in nodules and roots of soybean plants subjected to cadmium stress. **Biometals**, v.21, p.433-441, 2008.

BASSO, L. H. M.; GONÇALVES, A. N.; SILVEIRA, L. V. A.; LIMA, G. P. P. Efeito do alumínio no crescimento de brotações de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivadas in vitro. **Scientia Forestalis**, n. 63, p. 167-177, 2003.

BEAUCHAMP, C.O. & FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and assays applicable to acrylamide gels. **Annual Biochemical**, v.44, p.276–287, 1971.

BERNACCI, L.C.; SOARES-SCOTT, M. D.; JUNQUEIRA, N. T. V.; PASSOS, I. R. S.; MELETTI, L. M. M. *Passiflora edulis* SIMS: The correct taxonomic way to cite the yellow passion fruit (and others colors). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, v. 30, n. 2, p.566-576, 2008.

BERNACCI, L.C.; VITTA, F.A.; BAKKER, Y.V. Passifloraceae. In: WANDERLEY, M.G.L.; SHEPHERD, G.J.; GIULIETTI, A.M.; MELHEM, T.S. **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: RiMa/FAPESP, 2003. v. 3, p. 247-274.

BEUTLER, A.N.; FERNANDES, L.A.; FAQUIN, V. Efeito do alumínio sobre o crescimento de duas espécies florestais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.25, p. 923-928, 2001.

BISSINI, C. A.; MEURER, E. J.; BOHNEN, H. Solos ácidos e afetados por sais. In: MEURER, E. J. **Fundamentos de química do solo**. 3 ed. Porto Alegre: Evangraf, 2006. p. 181-205.

BOSCOLO, P.R.S; MENOSSI, M.; JORGE, R.A. Aluminium induced oxidative stress in maize. **Phytochemistry**, v.62,p.188-189, 2003.

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.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BREUSEGEM, F.V.; VRANOVÁ, E.; DAT, J.F.; INZÉ, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, n.161, p.405-414, 2001.

CAIRES, E.F.; GARBUIO, F.J.; CHURKA, S.; BARTH, G.; CORRÊA, J.C.L. Effects of soil acidity amelioration by surface liming on no-till corn, soybean, and wheat root growth and yield. **European Journal of Agronomy**, v.28, p.57-64, 2008.

CANÇADO, G.M.A.; LOPES, M.A.; PAIVA, E. Genética e bioquímica da tolerância de plantas ao alumínio. In: SIQUEIRA, J.O. et al. **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Lavras: UFLA/DCS, 2001. p363-388.

CORRALES, I.; POSCHENRIEDER, C.H.; BARCELÓ, J. Boron-induced amelioration of aluminum toxicity in a monocot and a dicot species. **Journal Plant Physiology**, v.165, p504-513, 2008.

COSTA, A.F.S.; COSTA, A.N.; VENTURA, J.A.; FANTON, C.J.; LIMA, I.M.; CAETANO, L.C.S.; SANTANA, E.N. **Recomendações técnicas para o cultivo do maracujazeiro**. Vitória, ES. Incaper. 2008a. 56 p.

COSTA, A.F.S.; LIMA, I.M.; COSTA, A.N.; TARDIN, F.D.; COSTA, A. **Aspectos físico-químicos do solo e sua influência na produtividade da cultura do maracujazeiro em solos de tabuleiro no norte do Espírito Santo**. XX Congresso Brasileiro de Fruticultura: 54th Annual Meeting of the Inter-american Society for Tropical Horticulture. Vitória-ES, 2008b.

CUNHA, M. A.; BARBOSA, L. V. Aspectos Botânicos. In: LIMA, A.A. **Maracujá – Produção e Aspectos Técnicos**. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília. 2002. p.12-15.

DARKÓ, E.; AMBRUS, H.; STEFANOVITS-BÁNYAI, E.; FODOR, J.; BAKOS, F.; BARNABÁS, B. Aluminium toxicity, Al tolerance and oxidative stress in Al-sensitive wheat genotype and in Al-tolerant lines developed by in vitro microspore selection. **Plant Science**, v.166, p.583-591, 2004.

DUBEY, R.S. & SHARMA, P. Ascorbate peroxidase from rice seedlings: properties of enzyme isoforms, effects of stresses and protective roles of osmolytes. **Plant Science**, v.167, p.541-550, 2004.

EFFGEN, T. A. M.; PASSOS, R. R.; LIMA, J. S. S.; BORGES, E. N.; DARDENGO, M. C. J. D; REIS, E. F. Atributos químicos do solo e produtividade de lavouras de cafeeiro *conilon* submetidas a diferentes tratos culturais no sul do estado do espírito santo. **Bioscience Journal**, v. 24, n. 2, p. 7- 18, 2008.

EZAKI, B.; GARDNER, R.C.; EZAKI, Y.; MATSUMOTO, H. Expression of aluminium-induced genes in transgenic *Arabidopsis* plants can ameliorate Al stress and/or oxidative stress. **Plant Physiology**, v.122, p.657-665, 2000.

FANG, W.C. & KAO, C.H. Enhanced peroxidase activity in rice leaves in response to excess iron, copper and zinc. **Plant Science**, v.158, p.71-76, 2000.

FOY, C.D.; CHANEL, R.L.; WHITE, M.C. The physiology of metal toxicity in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.29, p.511-566, 1978.

FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; SANTOS, A. A. dos. Cultivares de caupi para a região Meio-Norte do Brasil. In: CARDOSO, M. J. **A cultura do feijão caupi no Meio-Norte do Brasil**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2000. 264p. (Embrapa Meio-Norte. Circular Técnica, 28).

FREITAS, F. A.; KOPP, M. M.; SOUSA, R. O.; ZIMMER, P. D.; CARVALHO, F. I. F.; OLIVEIRA, A. C. Absorção de P, Mg, Ca e K e tolerância de genótipos de arroz submetidos a estresse por alumínio em sistemas hidropônicos. **Ciência Rural**, v.36, n.1, p.72-79, 2006.

GIANNAKOULA, A.; MOUSTAKAS, M.; MYLONA, P.; PAPADAKIS, I.; YUPSANIS, T. 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.

GONZÁLEZ-SANTANA, I. H.; MARQUEZ-GUZMANB, J.; CRAM-HEYDRICHG, S.; CRUZ-ORTEGA, R. *Conostegia xalapensis* (Melastomataceae): an aluminum accumulator plant. **Physiologia Plantarum**, v.144, p.134-145, 2012.

HAVIR, E.A. & MCHALE, N.A. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **Plant Physiology**, v.84, p.450-455, 1987.

HIRAGA, S., SASAKI, K., ITO, H., OHASHI, Y. & MATSUI, H. A large family of class III plant peroxidases. **Plant Cell Physiology**, v.42, n.5, p.462-468, 2001.

HOAGLAND, D.; ARNON, D. The water culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment Station**, v.347, p.1–32, 1950.

HORVÁTH, E.; SZALAI, G.; PÁL, M.; PÁLDI, E.; JANDA, T. Differences between the catalase isozymes of maize (*Zea mays* L.) in respect of inhibition of various phenolics compounds. **Acta Biologica Szegediensis**, v.46, p.33-34, 2002.

HUANG, S.K.; H.Q. XIAO; T.J. KLEINE; G. PACIOTTI; MARSH, D.G.; LICHTENSTEIN, L.M.; LIU, M.C. IL-13 expression at the sites of allergen challenge in patients with asthma. **Journal of Immunology**, v.155, p2688-2694, 1995.

IBGE. Maracujá. In: GCEA/ES. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. p.27, 2008.

INCAPER. **Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural**. Incaper em revista. Ano 1, n.1, jan/dez. 2010.

INCAPER. **Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural**. Espírito Santo: 2007. Disponível em: <http://www.INCAPER.es.gov.br/?a=noticias/2007/agosto/noticias_20_08_2007>. Acesso em 05 de maio de 2010.

JONES, D.L.; BLANCAFLOR, E.B.; KOCHIAN, L.V.; GILROY, S. Spatial coordination of aluminium uptake, production of reactive oxygen species, callose production and wall rigidification in maize roots. **Plant , Cell and Environment**, v.29, p.1309-1318, 2006.

JONES, D.L.; KOCHIAN, L.V. Aluminum inhibition of the inositol 1,4,5- triphosphate signal transduction pathway in wheat roots: a role in aluminum toxicity? **Plant Cell**, v.7, p.1913–22,1995.

KAWAKAMI, S.; MATSUMOTO, Y.; MATSUNAGA, A.; MAYAMA, S.; MIZUNO, M. Molecular cloning of ascorbate peroxidase in potato tubers and its response during storage at low temperature. **Plant Science**, v.163, n.4, p.829-836, 2002.

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 Plant Biology**, v.55, p.459–93, 2004.

KOCHIAN, K.V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and tolerance in plants. **Annual Review Plant Physiology Molecular Biology**, v. 46, p.237-60, 1995.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. RiMa, São Carlos-SP, Brasil, 550p. 2006.

LEITE, R.S. da S.; BLISKA, F.M. da M.; GARCIA, A.E.B. Aspectos econômicos da produção e mercado. *In*: ITAL. Instituto de Tecnologia de Alimentos (Campinas, SP). **Maracujá: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos**. Campinas: ITAL, 1994. 267p.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002.

MA, B.H.; WAN, J.M.; SHEN, Z.G. H₂O₂ production and antioxidant responses in seeds and early seedlings of two different rice varieties exposed to aluminium. **Plant Growth Regulation**, v.52, p.91-100, 2007.

MAGNAGO, L. F. S.; MARTINS, S. V.; SCHAEFER, C. E. G. R.; NERI, A. V. Gradiente fitofisionômico-edáfico em formações florestais de Restinga no Sudeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.24, n.3, p.734-746, 2010.

MEISEL, L.; FONSECA, B.; GONZÁLEZ, S. A rapid and efficient method for purifying high quality total RNA from peaches (*Prunus persica*) for functional genomics analyses. **Biology Research**, v. 38, p.83-88, Glasgow 2005.

MELETTI, L.M.M. & BRÜCKNER, C.H. Melhoramento Genético. *In*: BRÜCKNER, C.H.; PIKANÇO, M.C. **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria e mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. p. 345-385.

MELETTI, L. M. M. Maracujá-roxo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, v.27 n.2, 2005.

MENDHAM, J.; DENNEY, R. C.; BARNES, J. D.; THOMAS, M. J. K. **VOGEL: Análise química quantitativa**. 6^a ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos. Editora S.A., 2002, 212p.

MERIGA, B.; REDDY, K.; RAO, K.R.; REDDY, L.A.; KISHOR, P.B.K. Aluminium-induced production of oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA damage in seedlings of rice (*Oryza sativa*). **Journal of Plant Physiology**, v.161, p.63-68, 2004.

MITLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v.7, p.405-410, 2002.

MITLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen gene network in plants. **Trends in Plant Science**, v.9, n.10, 2004.

MÜLLER, P.; LI, X.P.; NIYOGI, K.K. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. **Plant Physiology**, v.125, p.1558-1566, 2001.

NAKANO, Y. & ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

PALATNIK, J.F.; VALLE, E.M.; FEDERICO, M.L.; GOMEZ, L.D.; MELCHIORRE, M.N.; PALEO, A.D.; CARRILLO, N.; ACEVEDO, A. Status of antioxidant metabolites and enzymes in a catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.). **Plant Science**, n.162, 363–371, 2002.

PANDA, S. K. & MATSUMOTO, H. Changes in antioxidant gene expression and induction of oxidative stress in pea (*Pisum sativum* L.) under Al stress. **Biometals**, v.23, p.753–762, 2010.

PANDA S.K. & MATSUMOTO, H. Molecular physiology of aluminum toxicity and tolerance in plants. **Botany Review**, v.73, p.326-47, 2007.

PEREIRA, L. B., MAZZANTI, C. M. 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, p.73-83, 2011.

PEREIRA, L. B. ; MAZZANTI, C. M. A.; GONÇALVES, J. F.; CARGNELUTTI, D.; TABALDI, L. A.; BECKER, A. G.; CALGAROTO, N. S.; FARIAS, J. G.; BATTISTI, V.; BOHRER, D.; NICOLOSO, F. T.; MORSCH, V. M.; SCHETINGER, M. R. C. Aluminum-induced oxidative stress in cucumber. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.48, p.683-689, 2010.

PORCEL, R.; RUIZ-LOZANO, J. M. Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 403, p. 1743–1750, 2004.

QURESHI, M.I.; ABDIN, M.Z.; QADIR, S.; IQBAL, M. Lead induced oxidative stress and metabolic alterations in *Cassia angustifolia* Vahl. **Biology Plantarum**, v. 51, p121-128, 2007.

RENGEL, Z. Uptake of aluminium by plant cells. **New Phytologist**, Oxford, v. 134, n. 3, p. 389-406, 1996.

RESENDE, M.L.V.; SALGADO, S.M.L.; CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.123-130, 2003.

REY, J.M.; PUJOL, P.; CALLIER, P.; CAVAILLES, V.; FREISS, G.; MAUDELONDE, T.; BROUILLET, J.P. Semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to evaluate the expression patterns of genes involved in the oestrogen pathway. **Journal of Molecular Endocrinology**, n.24, p.433–440, 2000.

RODRIGUEZ-MILLA, M.A.; BUTLER, E.; RODRIGUEZ HUETE, A.; WILSON, C.F.; ANDERSON, O.; GUSTAFSON, J.P. Expressed sequence tag-based gene

expression analysis under aluminium stress in rye. **Plant Physiology**, v.130, p.1706–1716, 2002.

ROSSIELLO, R. O. P. & JACOB NETTO, J. Toxidez por alumínio em plantas: novos enfoques para um velho problema. In: FERNANDES, M. S. **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, 2006. p. 376-418.

RYAN, P.R.; DITONASO, J.M.; KOCHIAN, L.V. Aluminium toxicity in roots: an investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. **Journal Experimental Botany**, v.44, p.437-446, 1993.

SALVADOR, J. O.; MOREIRA, A.; MALAVOLTA, E.; CABRAL, C. P. Influência do alumínio no crescimento e na acumulação de nutrientes em mudas de goiabeira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 24:787-796, 2000.

SASAKI, M.; YAMAMOTO, Y.; MATSUMOTO, H. Lignin deposition induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum*) roots. **Physiologia Plantarum**, Oxford, v. 96, n. 2, p. 193-198, 1996.

SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38. p. 995-1014. 2005.

SHIGEOKA, S.; ISHIKAWA, T.; TAMOI, M.; MIYAGAWA, Y.; TAKEDA, T.; YABUTA, Y.; YOSHIMURA, K. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal of Experimental Botany**, v.53, n.372, p.1305-1319, 2002.

SHIMIZU, N.; KOBAYASHI, K.; HAYASHI, K. The reaction of superoxide radical with catalase. **Journal of Biology Chemistry**, v.259, p.4414-4418, 1984.

SILVA, E.V; FERREIRA-SILVA, S.L.; FONTENELE, A.V.; RIBEIRO, R.V.; VIEGAS, R.A.; SILVEIRA, J.A.G. Photosynthetic changes and protective mechanisms against oxidative damage subjected to isolated and combined drought and heat stresses in *Jatropha curcas* plants. **Journal of Plant Physiology**, n.167, p.1157–1164, 2010.

SMEETS K, RUYTINX J, SEMANE B, BELLEGHEM FV, REMAN T, SANDEN SV, VANGRONSVELD J, CUYPERS A. Cadmium induced transcriptional and enzymatic alterations related to oxidative stress. **Environmental and Experimental Botany** 63:1–8, 2008.

SMIRNOFF, N. The role of active oxygen in the response to water deficit and desiccation. **New Phytologist**, v.125, p.27–58, 1993.

SUNG, M.S.; HSU, Y.T.; HSU, Y.T.G; WU, T.M.; LEE, T.M. Hypersalinity and Hydrogen Peroxide Upregulation of Gene Expression of Antioxidant Enzymes in *Ulva fasciata* Against Oxidative Stress. **Marine Biotechnology**, n.11, p.199–209, 2009.

TARIQ-AFTAB, M.; MASROOR, A.; KHAN, M.; IDREES, M.; NAEEM, M. effects of aluminium exposures on growth, photosynthetic efficiency, lipid peroxidation,

antioxidant enzymes and artemisinin content of *Artemisia annua* L. **Journal of Phytology**, , v.2, n.8, p. 23–37, 2010.

VANDERPLANK, J. **Passionflowers**. Massachusetts: MIT Press, 1996. 224 p.
VIVEIRO FLORA BRASIL, 2008. Acessado em 08/09/2010. Disponível em:<
<http://www.viveiroflorabrasil.com.br/variedade.html>>.

VOSS, M.; SOUZA, C. N. A.; BAIER, A. C.; NASCIMENTO JÚNIOR, A.; BOFF, T.
Método de avaliação de tolerância à toxidez de alumínio em trigo, em condições de hidroponia, na Embrapa Trigo. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 16p. Documentos Online 67. 2006. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do67.htm>. Acesso em: 13 abr. 2011.

ZHANG, J.J.; HE, Z.H.; TIAN, H.; ZHU, G.H.; PENG, X. X. Identification of aluminium-responsive gene in rice cultivars with different aluminium sensitivities. **Journal of Experimental Botany**, v.58, p.2269-2278, 2007.

ZHENG, S.J.; YANG, J.L. Target sites of aluminum phytotoxicity. **Biologia Plantarum**, v.49, p.321-331, 2005.

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**, v.128, p.63-72, 2002.

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

YOSHIDA, K.; KAOTHIEEN, P.; MATSUI, T.; SHINMYO, A. Molecular biology and application of plant peroxidase genes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n.60, p.665-670, 2003.

ANEXO I – ANÁLISE DE SOLO

Resultado da análise de solo de lavouras de maracujazeiro FB 200 cultivado em campo.

	Valores de Referência	0 Al pH 6,0 (campo 0)	0,33mM Al pH 5,6 (campo 1)	2,6mM Al pH 4,7 (campo 8)
Fósforo (mg dm ⁻³)	10 - 20	11	35	10
Potássio (cmol)	60 - 150	30	68	37
Cálcio (cmol)	1,5 - 4,0	2,3	1,4	1
Magnésio (cmol)	0,6 - 1,0	0,5	0,3	0,2
Matéria Orgânica (dag Kg ⁻¹)	1,6 - 3,0	1,6	1,5	2,1
Sódio mg dm ⁻³	40 - 80	15	29	17
Relação Ca/Mg	-	4,6	4,7	5
Relação Ca/K	-	29,9	8	10,5
Relação Mg/K	-	6,5	1,7	2,1
Sat. Ca na CTC (%)	25	56,4	36,1	18,9
Sat. Mg na CTC (%)	6	12,3	7,7	3,8
Sat. K na CTC (%)	20	1,9	4,5	1,8
Índice saturação Na (%)	>20	1,6	3,2	1,2
Soma de Bases (cmol)	2,1 - 5,0	2,9	1,9	1,3
CTC efetiva (cmol)	2,6- 6,0	2,9	2	2,1
CTC a pH 7,0 (cmol)	4,6 - 10	4,1	3,9	5,3
Sat. Alumínio (%)	21-40	0	5	38
Saturação de bases (%)	51-70	70,6	48,4	24,5

ANEXO II – ANÁLISE DE NUTRIENTES FOLIARES

Resultados da análise de nutrição mineral de folhas de maracujazeiro FB 200 cultivadas em lavouras com diferentes concentrações de Al no solo.

	Valor de referência	Controle (campo 0)	0,33mM Al pH 5,6 (campo 1)	2,6mM Al pH 4,7 (campo 8)
Nitrogênio	43 - 55	62,3	61,67	54,81
Fósforo	2,3 - 2,7	4,11	6,26	2,49
Potássio	20 - 30	16,88	25,00	20,63
Cálcio	19 - 25	22,63	22,00	27,23
Magnésio	1,9 - 2,4	3,62	3,56	4,50
Enxofre	3,2 - 4,0	6,24	4,96	5,11
Ferro	120 - 200	172	150	150
Zinco	25 - 60	44	52	38
Cobre	20 - 35	14	48	30
Manganês	40 - 250	223	326	94
Boro	40 - 100	36	31	45
Relação N/P	18,5 - 20,5	15,2	9,9	22,0
Relação N/K	1,8 - 2,1	3,7	2,5	2,7
Relação N/S	13,4 - 13,8	10,0	12,4	10,7
Relação N/Mg	22,5 - 23	17,3	17,1	12,2
Relação N/Cu	1,8 - 2,8	4,6	1,3	1,8
Relação N/B	0,55 - 1,10	1,7	2,0	1,2
Relação P/Mg	1,1 - 1,2	1,1	1,7	0,6
Relação P/Zn	0,05 - 0,10	0,09	0,12	0,07
Relação P/Cu	0,07 - 0,10	0,30	0,13	0,08
Relação K/Ca	1,0 1,2	0,7	1,1	0,8
Relação K/Mg	10,5 - 12,5	4,7	6,9	4,6
Relação K/Mn	0,2 - 0,5	0,08	0,08	0,22
Relação Ca/Mg	10 - 10,5	6,3	6,1	6,0
Relação Ca/Mn	0,1 - 0,5	0,10	0,07	0,29
Relação Fe/Mn	1,0 - 3,0	0,77	0,46	1,59