**EFEITO DO ALUMÍNIO NA FISIOLOGIA E BIOQUÍMICA DE
BROTAÇÕES DE *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*
CULTIVADAS *IN VITRO***

LÚCIA HELENA MENEGON BASSO
Engenheira Florestal

Orientador: Prof. Dr. ANTONIO NATAL GONÇALVES

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de Concentração: Ciências Florestais.

PIRACICABA
Estado de São Paulo – Brasil
Outubro – 2000

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Basso, Lúcia Helena Menegon.

Efeito do alumínio na fisiologia e bioquímica de brotações de *Eucalyptus grandis* X
E. urophylla cultivadas *in vitro* / Lúcia Helena Menegon Basso. - - Piracicaba, 2000.
67 p.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2000.
Bibliografia.

1. Cultivo "in vitro" 2. Efeito do estresse 3. Eucalipto 4. Fisiologia florestal 5.
Nutrição vegetal 6. Química do solo 7. Sistema radicular I. Título

CDD 634.9734

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

“Se se aspira a ser um mestre numa arte, toda a vida deve ser dedicada a esta, não numa compulsiva prática específica, mas numa *transformação da própria pessoa em instrumento* da prática dessa arte, mantendo as qualidades da mesma através de todas as fases da vida.

O presente da liberdade não é uma dádiva, mas sim a oportunidade de ter uma oportunidade.”

C. Castañeda

A Deus

Por esta oportunidade,

OFEREÇO

**A todos aqueles que, por algum motivo,
não puderam estudar,**

DEDICO

Agradecimentos

Ao Professor Dr. Antonio Natal Gonçalves, pela orientação e confiança.

Ao curso de Pós-Graduação em Ciências Florestais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pela oportunidade de estudo.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Professor Dr. Marcílio de Almeida e à Professora Dra. Adriana Pinheiro Martinelli Rodriguez pelas sugestões apresentadas ao trabalho.

À Professora Dra. Giuseppina Pace Pereira Lima, do Departamento de Química e Bioquímica da UNESP – Botucatu/SP, pelas valiosas sugestões e orientações dos dados bioquímicos.

Ao Professor Dr. Paulo Roberto Rodrigues Ramos, do Departamento de Biofísica da UNESP – Botucatu/SP, ao técnico de laboratório Edson Marcelo Bruder e a amiga Adriana Piccinin, pelo convívio e ajuda durante a fase experimental deste trabalho.

À Professora Dra. Liciane Vaz Arruda Silveira Chalita, do Departamento de Matemática e Estatística da UNESP – Botucatu/SP pela orientação estatística.

Aos amigos Marta Regina Almeida Muniz – a “Sheilinha” – e Ronaldo Luiz Vaz Arruda Silveira, presentes em todos os momentos do curso de Mestrado, pelo apoio, carinho e atenção que sempre me dedicaram.

Aos amigos Edson Namita Higashi e Gustavo Maia Souza pelas valiosas sugestões e incentivo.

Aos amigos e companheiros de turma do Curso de Pós-Graduação da ESALQ, pelos momentos alegres, jamais esquecidos...

Aos funcionários do Departamento de Ciências Florestais e do IPEF, especialmente Rogério Oliveira Naressi, pelo convívio e amizade no decorrer do curso de Pós-Graduação.

Ao técnico do laboratório de Fisiologia das Árvores, José Roberto Romanini, pelo auxílio e amizade.

Aos colegas do laboratório de Fisiologia das Árvores, Angela Ferrari, Beatriz de Matteo, Cantídio Gouvêa, Fábio Silva, Flávia Capaldi, Marília Cantarelli, Sandra Arruda e Vanderlei Stefanuto, pelo convívio, incentivo e otimismo.

Aos colegas do curso de pós-graduação da UNESP – Botucatu/SP, especialmente Adriana Francisco, Fedra Quijano, Gilda Mogor, Isabela Piza, Stela Vilhena e Tatiany Barata, pelo convívio durante a fase experimental deste trabalho.

A meus pais José e Virgínia (*in memoriam*) e irmãos Ângela e Fernando pelo apoio e compreensão.

A todos que me ajudaram, direta ou indiretamente,

Meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xii
RESUMO.....	xiii
SUMMARY.....	xiv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Alumínio e seus efeitos nas plantas.....	3
2.2 Interação fósforo-fosfatase ácida-alumínio.....	7
2.3 Fosfatase ácida.....	8
2.4 Poliaminas.....	10
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Material.....	16
3.1.1 Material utilizado.....	16
3.1.2 Condições de crescimento da cultura.....	16
3.1.3 Meio de cultura.....	17
3.2 Delineamento experimental.....	18
3.3 Métodos.....	19
3.3.1 Análise do equilíbrio químico do meio de cultura.....	19
3.3.2 Matéria fresca e matéria seca.....	19
3.3.3 Atividade da fosfatase ácida por eletroforese de isoenzimas.....	19
3.3.3.1 Condições da corrida eletroforética.....	20
3.3.3.2 Coloração das enzimas.....	20
3.3.3.3 Análise dos géis.....	21
3.3.4 Teor de poliaminas.....	21
3.3.5 Teor de proteínas solúveis totais.....	22

3.3.6	Análise da concentração dos nutrientes no material vegetal.....	22
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1	Modificações químicas do meio de cultura.....	23
4.2	Teor dos nutrientes no material vegetal.....	24
4.3	Matéria seca x período de coleta.....	33
4.4	Atividade da fosfatase ácida por eletroforese de isoenzimas.....	37
4.5	Teor de Poliaminas.....	40
4.6	Teor de proteína.....	45
5	CONCLUSÕES.....	47
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
	ANEXOS.....	62

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Estrutura de algumas di- e poliaminas encontradas em plantas.....	12
2 Representação esquemática da síntese de putrescina e poliaminas.....	13
3 Composição do meio Gonçalves (1980).....	17
4 Concentração de alumínio no tecido vegetal de brotações de <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. urophylla</i> , durante o período de cultivo.....	25
5 Concentração dos macronutrientes no tecido vegetal de brotações de <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. urophylla</i> cultivadas em meio de cultura Gonçalves (1980), durante o período de cultivo.....	29
6 Concentração dos micronutrientes no tecido vegetal de brotações de <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. urophylla</i> cultivadas em meio de cultura Gonçalves (1980), durante o período de cultivo.....	32
7 Curva de crescimento das brotações de <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. urophylla</i> submetidas aos tratamentos com $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ durante o período de cultivo.....	34
8 Brotações de <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. urophylla</i> cultivadas <i>in vitro</i> , em meio de cultura Gonçalves (1980), com adição de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em diferentes épocas de desenvolvimento.....	36
9 Eletroforese de isoenzimas (Fosfatase Ácida E. C. 3.1.3.2) presente nas brotações de <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. urophylla</i> cultivadas em meio de cultura Gonçalves (1980).....	37
10 Atividade enzimática da ACP total em brotações de <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. urophylla</i> cultivadas meio de cultura Gonçalves (1980) com adição de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ durante o período de cultivo.....	39
11 Cromatografia de camada delgada de poliaminas dansiladas em brotações de <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. urophylla</i> cultivadas em meio de cultura Gonçalves (1980), com adição de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2$	40

12	Acúmulo de putrescina em brotações de <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. urophylla</i> cultivadas em meio Gonçalves (1980) submetidas a estresse nutricional ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).....	42
13	Acúmulo de espermidina em brotações de <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. urophylla</i> cultivadas em meio Gonçalves (1980) submetidas a estresse nutricional ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).....	43
14	Acúmulo de espermina em brotações de <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. urophylla</i> cultivadas em meio Gonçalves (1980) submetidas a estresse nutricional ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).....	44
15	Teor de proteínas solúveis totais em brotações de <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. urophylla</i> submetidas aos tratamentos com $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em diferentes épocas de desenvolvimento.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1 Valores de pH medidos durante os 28 dias de cultivo <i>in vitro</i>	23
2 Coeficientes de correlações entre as doses de alumínio no meio de cultura e os teores dos nutrientes no tecido vegetal de brotações de <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. urophylla</i> , durante o período de cultivo (macronutrientes).....	24
3 Coeficientes de correlações entre as doses de alumínio no meio de cultura e os teores dos nutrientes no tecido vegetal de brotações de <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. urophylla</i> , durante o período de cultivo (micronutrientes).....	30
4 Comparação de médias do peso de matéria seca expressa em grama em brotações de <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. urophylla</i> , submetidas aos tratamentos com alumínio, em diferentes épocas de desenvolvimento.....	66
5 Comparação de médias da atividade da ACP total presente nas brotações de <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. urophylla</i> , submetidas aos tratamentos com alumínio, em diferentes épocas de desenvolvimento.....	66
6 Comparação de médias do teor de putrescina expressa em µmoles Put/g matéria fresca em brotações de <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. urophylla</i> , submetidas aos tratamentos com alumínio, em diferentes épocas de desenvolvimento.....	66
7 Comparação de médias do teor de espermidina expressa em µmoles Spd/g matéria fresca em brotações de <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. urophylla</i> , submetidas aos tratamentos com alumínio, em diferentes épocas de desenvolvimento.....	67
8 Comparação de médias do peso de matéria seca expressa em grama em brotações de <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. urophylla</i> , submetidas aos tratamentos com alumínio, em diferentes épocas de desenvolvimento.....	67

9	Comparação de médias do teor de proteínas solúveis totais expressa em mg de proteína/g de matéria fresca em brotações de <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. urophylla</i> , submetidas aos tratamentos com alumínio, em diferentes épocas de desenvolvimento.....	67
---	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

P_i	Ânion ortofosfato
E.C. 3.1.3.2	Enzima Fosfatase Ácida
ODC	Ornitina Descarboxilase
ADC	Arginina Descarboxilase
SAMDC	S-Adenosilmetionina Descarboxilase
SPD Sintetase	Espermidina sintetase
SPM Sintetase	Espermina sintetase
PUT	Putrescina
SPD	Espermidina
SPM	Espermina
GABA	γ -Aminobutírico
IAA	Ácido Indol Acético
BAP	Benzil Amino Purina
$AlCl_3$	Tricloreto de Alumínio

EFEITO DO ALUMÍNIO NA FISIOLOGIA E BIOQUÍMICA DE BROTAÇÕES DE *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* CULTIVADAS *IN VITRO*

Autora: Lúcia Helena Menegon Basso

Orientador: Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves

RESUMO

A atividade florestal é destinada a solos de baixa fertilidade, muitas vezes na presença de elementos considerados tóxicos para as plantas, como o alumínio, levando a baixo pH do solo e prejudicando a disponibilidade de outros nutrientes minerais.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do alumínio na fisiologia e bioquímica de brotações de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, cultivadas *in vitro*, consistindo-se de parte aérea pouco desenvolvida e ausência de sistema radicular.

O experimento foi delineado inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e quatro repetições por tratamento. Cada tratamento correspondeu a 0; 0,25; 0,5 e 1,0 mM de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. As coletas foram realizadas aos 4, 8, 12, 16, 20, 24 e 28 dias de cultivo, avaliando-se a concentração dos nutrientes no material vegetal após o período de cultivo, a curva de crescimento do clone, atividade da enzima fosfatase ácida, o efeito do alumínio no metabolismo das poliaminas (putrescina, espermidina e espermina) e quantificação do teor de proteínas solúveis totais.

Pela análise dos resultados, pode-se concluir que a adição de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ alterou o meio de cultura, indisponibilizando principalmente os nutrientes cálcio, fósforo e potássio, reduzindo a absorção dos mesmos pela planta e com isso, alterou o metabolismo celular, principalmente em processos altamente dependentes destes elementos, ocasionando perdas de estrutura, maior atividade de fosfatase ácida, acúmulo de poliaminas e redução do teor de proteínas solúveis totais.

O estudo mostrou que usando a técnica de cultivo *in vitro* é possível estudar os mecanismos de adaptação das plantas a solos que contém problemas com toxidez de alumínio.

**EFFECTS OF ALUMINUM ON THE PHYSIOLOGY
AND BIOCHEMISTRY OF SHOOTS OF *Eucalyptus grandis* x
E. urophylla CULTIVATED *IN VITRO***

Author: Lúcia Helena Menegon Basso

Adviser: Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves

SUMMARY

The forest activity is generally developed in low fertility soils, usually with mineral toxicity, mainly aluminum, low soil pH changes in the availability of other mineral nutrients.

The aim of this work was to evaluate the effects of aluminum on the physiology and biochemistry of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* epicormic shoots cultivated *in vitro*.

The trial was established using a statistical design completely randomized, with four treatments, four replicates for all evaluated variables. Each treatment corresponded to 0; 0.25; 0.5 and 1.0 mM of $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. The data were collected at 4, 8, 12, 16, 20, 24 and 28 days of culture, evaluating the mineral nutrient content, the clone relative growth rate, the acid phosphatase activity, the polyamines contents (putrescine, spermidine and spermine) and total soluble protein content.

The analysis of the results showed that the addition of the $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ changed the culture medium, reduced calcium, phosphate and potassium availability and absorption. The cell metabolism was changed mainly in process highly dependent on these nutrients, leading to structural losses, higher acid phosphatase activity, increase in polyamines content and reduced total soluble protein content.

1 INTRODUÇÃO

O eucalipto cresce em condições variadas de clima, altitude e tipo de solos. Com estas características, é considerado muito produtivo devido seu rápido crescimento, ampla adaptabilidade e variedade de subprodutos (Furze & Cresswell, 1985; Ouyang & Peng, 1990; Warrag et al. 1990; Watt et al. 1991).

Em geral, a atividade florestal é destinada a solos de menor fertilidade, possuindo níveis de elementos considerados tóxicos para as plantas. Dentre estes elementos, o alumínio se destaca, colaborando com a diminuição do pH do solo e prejudicando a disponibilidade de alguns elementos fundamentais na nutrição mineral das plantas (Malavolta et al. 1997).

A insuficiência na quantidade de um determinado elemento químico essencial para a vida da planta, ou combinações que o tornem pouco disponível, provoca distúrbios no metabolismo, que podem ser evidenciados externamente, através da diminuição no crescimento, clorose foliar ou outras anomalias (Epstein, 1975). Teores elevados de alumínio diminuem a disponibilidade de fósforo, afetando o metabolismo da enzima fosfatase ácida (Bielecki, 1973; McLachlan, 1976; Helal, 1990; Duff, 1991). O papel da fosfatase ácida não está bem estabelecido, mas é possível que esta enzima seja um agente de transporte do fósforo inorgânico ou hidrolizando os fósforos esterres no meio, transformando o fósforo não disponível em fósforo inorgânico (Bielecki, 1973).

Outras vias metabólicas podem sofrer efeitos tóxicos devido às deficiências nutricionais causadas pela presença de alumínio no solo. Dentre estas, destacam-se as vias de poliaminas, que apresentam importante papel no crescimento e desenvolvimento de todos os organismos vivos, tendo considerável potencial na regulação da morfogênese em cultura de células podendo também estimular o crescimento de plantas (Minocha et al.

1996). Dentre os vários papéis sugeridos pelas poliaminas, destaca-se a resposta ao estresse como uma ativa área da pesquisa (Galston, 1989; Flores, 1991). O metabolismo das poliaminas é influenciado por alterações que ocorrem na planta, quando suas células são submetidas a estresses nutricionais, ou são expostas a baixos valores de pH, poluentes ambientais, entre outros (Flores, 1991).

Como o alumínio interfere em grande número de processos metabólicos, este trabalho teve por objetivo avaliar alguns parâmetros fisiológicos e bioquímicos em brotações de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em resposta aos tratamentos com diferentes doses de alumínio, através das seguintes etapas:

- 1 análise da concentração dos nutrientes no material vegetal após o período de cultivo;
- 2 observação do crescimento de brotações de eucalipto cultivadas em diferentes doses de alumínio;
- 3 avaliação da atividade da enzima Fosfatase Ácida (E.C.3.1.3.2);
- 4 verificação do efeito do alumínio no metabolismo das poliaminas: putrescina, espermidina e espermina;
- 5 quantificação do teor de proteínas solúveis totais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Alumínio e seus efeitos nas plantas

Plantas nativas ou cultivadas existem em condições de solo que podem conter níveis fitotóxicos de metais, incluindo Al, Pb, Cd, Zn, Hg, Cu, Cr, Fe, Mn e Ni. Existe um grande número de diferentes sintomas de toxidez expressados durante diferentes estádios, de acordo com nível e grau de adaptação a ambientes de estresse. Geralmente alguns sintomas da toxidez por alumínio aparecem após curto período (Rengel, 1996).

Qualquer elemento, macro ou micronutriente pode tornar-se tóxico quando presente no tecido da planta em concentração ou teor suficientemente alto. Os elementos classificados como tóxicos, entre os quais se incluem alguns metais pesados, prejudicam o crescimento e produção, mesmo quando presentes em teores relativamente baixos. Em condições naturais, possivelmente o elemento tóxico mais típico seja o alumínio (Al) (Malavolta, 1994).

O alumínio é um metal muito abundante na crosta terrestre e é encontrado sob diferentes formas como aluminossilicatos insolúveis ou óxidos (Foy et al. 1978; Delhaize & Ryan, 1995; Larsen et al. 1996; Degenhardt et al. 1998).

Atualmente, a toxidez por alumínio tem se tornado uma importante área da pesquisa agrônômica e florestal. Quando solubilizados em solos ácidos (processo intensificado pelo baixo valor do pH), o alumínio é tóxico para muitas plantas (Conner & Meredith, 1985; Koyama et al. 1988); esta toxidez pode ser causada mesmo em pequenas concentrações do elemento (Delhaize & Ryan, 1995). Isto limita a produtividade em solos que compreendem grandes áreas cultiváveis do mundo, particularmente nos trópicos e

subtropicos e em casos extremos, é um fator limitante da produção de alimentos em países em desenvolvimento (Ryan et al. 1993; Rengel, 1996; Zheng et al. 1998).

Kinraide et al. (1985) comentaram que a toxidez parece ser determinada pela disponibilidade de algumas formas de alumínio nas raízes das plantas, como Al^{3+} , $\text{Al}(\text{OH})_2^+$, $[\text{Al}(\text{OH})_3]^\downarrow$, AlF^{2+} , AlSO_4^+ , AlCl_3 , Al-Org. Estas formas podem ocorrer devido à alta concentração do alumínio e por complexos como quelação com fosfatos e ácidos orgânicos. A principal forma fitotóxica do alumínio, em solução ácida ($\text{pH}_{(\text{H}_2\text{O})} < 5,0$) é o Al^{3+} (Foy et al. 1978; Kinraide, 1991; Delhaize & Rayan, 1995).

O conhecimento da química do alumínio em solos ácidos é de grande interesse, principalmente devido aos fatores nocivos do íon Al^{3+} no crescimento vegetal. É difícil prever a especiação do alumínio quando este é adicionado em soluções (incluindo soluções completas de nutrientes) que contenham ligantes como fosfatos ou sulfatos. Em determinadas circunstâncias, muito do alumínio adicionado pode existir como polímeros, precipitados ou complexos que podem ter pequena influência na expressão da toxicidade (Tice et al. 1992).

A toxidez por alumínio em solos ácidos é de especial importância devido à destruição dos componentes de ecossistemas florestais, em condições específicas. Isto reduz a produção de biomassa e o crescimento das árvores, reprimindo e degradando a microflora. Distúrbios no ecossistema, causados naturalmente, ou provocados pelo homem, freqüentemente intensificam o estresse ambiental, reduzindo o vigor das árvores. O alto nível de alumínio induzido pela deposição ácida tem sido apontado como a maior causa do declínio e morte das árvores. Em geral, a concentração do alumínio no solo depende da acidez e pode tornar-se suficientemente alta para causar fitotoxidez em muitas árvores, quando o valor de pH estiver inferior a 4,0. Entretanto, a relação entre a acidificação do solo, conteúdo de alumínio e declínio das árvores é também afetada por outros fatores, incluindo o local e a espécie (Roy et al. 1988).

Lawrence et al.¹, citados por Minocha et al. (1997), propuseram que o alumínio é mobilizado no solo mineral e transportado para o chão da floresta em uma forma reativa através do biociclo e movimento da água. O alumínio reativo compete por sítios trocáveis

¹ LAWRENCE, G. B.; DAVID, M. B.; SHORTLE, W. C. A new mechanism for calcium loss in forest-floor soils. *Nature*, 373, p.162-165, 1995.

de cálcio, aumentando a lixiviação dos minerais do solo juntamente com o fluxo de água diminuindo a disponibilidade de cálcio para as raízes. A detecção rápida de mudanças na composição química do solo e as alterações resultantes nos processos bioquímicos e fisiológicos nas plantas, antes que apareçam os sintomas visíveis de deficiência, pode ser chave para o sucesso, contribuindo para diminuir riscos ecológicos.

Os sintomas de injúria por alumínio não são sempre facilmente identificáveis. Em algumas plantas, os sintomas foliares assemelham-se àqueles da deficiência de fósforo. Em outros, a toxidez por alumínio aparece como uma indução da deficiência de cálcio ou magnésio (Roy et al. 1988).

Em geral, o alumínio interfere na fixação do fósforo em formas menos disponíveis no solo, promove alteração na divisão celular em raiz, diminui a respiração radicular, interfere com certas enzimas ligadas a deposição de polissacarídeos na parede celular, modifica a absorção, transporte e uso de elementos (Ca, Mg, P, K) e água pelas plantas. O maior sintoma de toxidez por alumínio é a inibição do crescimento da raiz, em diferentes mecanismos, incluindo interações do alumínio com a parede celular, membrana plasmática ou simplasto radicular, inibição da aquisição de água e outros nutrientes minerais (Roy et al. 1988; Kochian, 1995).

Segundo Foy et al. (1978), as lesões radiculares causadas pela toxidez por alumínio podem causar a dilaceração da função e estrutura da membrana, interromper a síntese de DNA e mitose, comprometer a permeabilidade da parede celular e promover distúrbios na assimilação e metabolismo mineral.

Roy et al. (1988), afirmaram que o local inicial de absorção é usualmente a ponta da raiz, juntamente com a secreção mucilaginosa cobrindo as células da epiderme. A superfície da raiz é coberta com mucilagem, consistindo de um material gelatinoso principalmente de polissacarídeos. A mucilagem oferece uma proteção para a toxidez ao alumínio, principalmente devido à abundância em que existe na extremidade da raiz. A mucilagem se liga relativamente a grandes quantidades de alumínio e se for removida, pode contribuir significativamente para aumentar a quantidade total de alumínio no interior da raiz (Rengel, 1996). Em tecidos intactos, muitos íons alumínio estão unidos a substâncias pécticas da parede celular, uma parte aos ácidos nucleicos e outra à membrana celular. O alumínio pode entrar na planta pelas células meristemáticas, via córtex, passando pela

barreira da endoderme. Sendo um cátion polivalente, obedece principalmente caminhos apoplásticos de transporte através das células corticais, mas pode também entrar através da plasmalema.

O alumínio também causa prejuízos morfológicos a outras partes da planta. Ele afeta a fotossíntese, pela diminuição do conteúdo de clorofila e redução do fluxo de elétrons. Reduz a atividade respiratória, pela diminuição metabólica da energia requerida. A síntese de proteína é diminuída provavelmente devido a alterações na distribuição dos ribossomos no retículo endoplasmático (Roy et al. 1988). O alumínio promove inibição da função secretória do Complexo de Golgi, reduzindo a incorporação de sacarose nas paredes celulares (Huck, 1972). De acordo com Kochian (1995), o encurtamento e engrossamento das raízes e pêlos radiculares indicam que o Al^{3+} induz alterações no arranjo dos microfilamentos e microtúbulos (citoesqueleto), os quais direcionam o transporte das vesículas secretoras do Complexo de Golgi para a superfície celular.

O alumínio interfere na absorção, transporte e uso de vários elementos essenciais, incluindo Cu, Zn, Ca, Mg, Mn, K, P e Fe. Excesso de alumínio reduz a absorção de certos elementos e aumenta a absorção de outros (Roy et al. 1988). De acordo com Alam (1981), o alumínio compete com o potássio pelo sítio de absorção na raiz dependendo de sua concentração, reduzindo o conteúdo de K^+ na raiz e outras partes da planta. O papel do alumínio e sua interação com elementos nutrientes foi, por muitos anos, uma parte dos estudos da nutrição das plantas.

Apesar da importância agrônômica e florestal deste problema, pouco se conhece sobre os mecanismos fundamentais da resistência das plantas à toxidez ao alumínio (Larsen et al. 1998). A tolerância é controlada por diferentes genes agindo através de distintos caminhos bioquímicos em diferentes plantas. A tolerância ao alumínio tem sido associada com mudanças no pH na região da raiz, capacidade de troca de cátion radicular, eficiência na absorção e metabolismo do P, Ca, Mg, e Fe, atividade da fosfatase e concentração de ácidos orgânicos (Foy, 1988).

A base fisiológica da reação da planta ao alumínio e sua respectiva tolerância não é facilmente compreendida (Bennet & Breen, 1991), sendo que o exato mecanismo fisiológico da toxidez ou tolerância, são bastante discutidos na literatura. Em muitas plantas a tolerância ao alumínio parece estar associada com a eficiência do uso de fósforo. Foy et

al. (1978), comentaram que certos cultivares de trigo, tomate e milho tolerantes ao alumínio, também apresentam tolerância a baixos níveis de fósforo na solução nutritiva.

O alumínio não é, geralmente, considerado um elemento favorável ao crescimento das plantas, entretanto, em algumas condições, baixa concentração deste elemento pode aumentar o crescimento ou produzir outros efeitos desejáveis. Plantas que têm mostrado crescimento positivo ao alumínio são: arroz (3 mg.L^{-1}), eucalipto (1 mg.L^{-1}), chá (27 mg.L^{-1}), milho ($3,5 \text{ mg.L}^{-1}$) e trigo (3 mg.L^{-1}) (Mullette, 1975; Howeler & Cadavid, 1976; Matsumoto et al. 1976).

2.2 Interação fósforo-fosfatase ácida-alumínio

Um dos mais importantes nutrientes minerais para o crescimento vegetal é o fósforo, sendo um dos elementos minerais mais translocado na planta. O acúmulo de fósforo nas raízes das plantas que crescem em solos ácidos e seu conseqüente sintoma de deficiência nutricional, foi associado com interações entre alumínio e fósforo (Clarkson, 1967). O ânion ortofosfato é a forma do fósforo preferencialmente assimilada pelas plantas que adquirem seus nutrientes minerais diretamente do ambiente. O fósforo inorgânico não tem apenas papel vital funcional na transferência de energia e regulação metabólica, mas também é importante constituinte da estrutura de muitas biomoléculas, e portanto, a assimilação de fósforo inorgânico, seu armazenamento e metabolismo, é de considerável relevância para o crescimento e desenvolvimento da planta. A eficiente aquisição e utilização de fósforo requer uma classe de enzimas, conhecidas como fosfatases (Duff et al. 1994).

A presença de íons alumínio na solução nutriente afeta fortemente a absorção de fósforo pela raiz, sua incorporação nos componentes orgânicos, o transporte do fósforo e sua síntese orgânica (Clarkson, 1967).

Klimashevskii & Bernatskaya (1973) comentaram que existe uma correlação entre a atividade enzimática no tecido radicular, síntese de proteínas e absorção de elementos nutrientes. A hipótese é de que o sistema enzimático da ATPase, que participa do processo de transformação de energia para o trabalho de transporte de íons, é a energia base do transporte ativo. Entretanto, existem poucas informações sobre o efeito das condições de

nutrição mineral na atividade enzimática no sistema radicular. Isto particularmente se aplica a ATPase e fosfatase ácida, que fazem parte da absorção primária de substâncias e transporte de metabólitos através das membranas.

Trull et al. (1997) avaliando a produção de fosfatase ácida em *Arabidopsis thaliana*, constataram que a enzima foi mais produzida em resposta à deficiência de fósforo.

Menck (1996) estudando o crescimento e a atividade da fosfatase ácida de plântulas de progênes de *Eucalyptus grandis* em diferentes doses de fósforo *in vitro*, verificou que houve correlações de variáveis de crescimento *in vitro* com variáveis de crescimento em campo quanto à classificação da estabilidade fenotípica e que, as progênes de estabilidade superior apresentaram comportamento esperado, isto é, maior atividade da enzima fosfatase ácida.

2.3 Fosfatase Ácida

A fosfatase ácida é um monoéster-ortofosfórico-fosfohidrolase (E.C.3.1.3.2) (Alfenas, 1998), pertence ao grupo das estereases, que são enzimas específicas para hidrolisar ligações ésteres (Dixon & Webb, 1964).

Fosfatases ácidas ocorrem em tecidos animais, plantas, bactérias e leveduras e a reação de transformação do fósforo não disponível em fósforo inorgânico baseia-se em:

Em células animais, a fosfatase está isolada em uma organela característica, os lisossomos e estes não existem em células vegetais. Em tecidos de plantas, as fosfatases ácidas estão presentes, sendo ou não específicas em diferentes substratos. Em tecidos vegetais maduros, ela está presente nos vacúolos, juntamente com enzimas hidrolíticas, provavelmente localizada no interior da membrana celular. Durante a senescência esta enzima se localiza no citoplasma.

As fosfatases têm sido tradicionalmente classificadas como sendo fosfatases alcalinas ou ácidas, de acordo com seu pH ótimo para catalizar reações (com valores superiores ou inferiores a pH 7,0 (Duff et al. 1994).

Helal (1990) sugeriu que a atividade da fosfatase é um fator significante da eficiência nutricional quando o fornecimento de fósforo é limitado. Esta significância ainda não está bem definida, entretanto, raízes de plantas com alta atividade de fosfatase, obviamente têm o potencial de utilizar o fósforo orgânico do solo.

Duff et al. (1991) comentaram que a presença de fosfatase ácida intra e extra celular é componente integral da resposta da planta à deficiência de fósforo inorgânico (Pi), que comumente ocorre ao acaso e que a regulação desta enzima é, portanto, crítica para a sobrevivência da planta.

Teores elevados de alumínio diminuem a disponibilidade do fósforo, prejudicando o metabolismo energético da planta. A absorção de fósforo é disponibilizada pela presença da enzima fosfatase ácida. O grupo das fosfatases representam enzimas adaptativas e sua atividade pode ser utilizada para aproveitar o fósforo existente em situação de baixa disponibilidade (Bielecki, 1973; McLachlan, 1976; Helal, 1990; Duff et al. 1991).

As mudanças na atividade de fosfatase são características de cada variedade e podem também estar associadas à desigual permeabilidade das células da raiz expostas ao alumínio (Klimashevskii & Bernatskaya, 1973).

Ascenio (1997) comentou que a atuação da fosfatase ácida em raízes pode potencialmente liberar o fósforo de solos orgânicos. Um estudo da proporção da atividade enzimática de *Euphorbia heterophylla* e *Cajanus cajan*, mostrou ser maior nas plantas onde a deficiência de fósforo era maior.

Menck (1996) e Trull et al. (1997), estudando a produção de fosfatase ácida, constataram que houve maior produção da enzima quando as plantas eram expostas à deficiência de fósforo.

Gakuru & Lefebvre (1991) avaliaram a atividade da fosfatase ácida em raízes de milho tratadas com solução contendo doses crescentes de alumínio. A atividade da fosfatase ácida na raiz foi aumentada nos tratamentos que receberam alumínio quando comparadas ao controle e foi observada correlação entre a atividade da enzima e a tolerância ao alumínio durante ensaio de campo.

Zaini & Mercado (1985a) estudando dois cultivares de arroz *in vitro* observaram que a atividade da fosfatase ácida apresentou-se inversamente proporcional à absorção e

concentração de fósforo na solução e que a variedade mais eficiente na utilização do fósforo foi a resistente ao alumínio (quando cultivadas em solo contendo altos níveis de alumínio, onde o fósforo é usualmente indisponível) e dependeu consideravelmente da fosfatase presente na raiz e sua superior habilidade para utilizar o fósforo quando este apresenta-se limitado para absorção.

Zaini & Mercado (1985b) estudando interações de nutrientes e atividade da fosfatase em plântulas de arroz, observaram que a indisponibilidade do fósforo foi induzida pela alta concentração de alumínio e que a atividade da enzima foi aumentada com a deficiência do fósforo inorgânico (Pi) e inversamente, esta atividade foi diminuída pelo suprimento suficiente de fósforo.

A atividade da fosfatase ácida provavelmente depende de fatores como espécie de planta, tecido, idade e concentração de fósforo no meio de crescimento.

2.4 Poliaminas

As poliaminas foram descobertas por Antoni Van Leeuwenhoek em 1677, analisando cristais de fosfato de espermina em sêmem humano (Smith, 1985) e somente duzentos e cinquenta anos depois a estrutura destas substâncias foi estabelecida como espermina e espermidina (Williams-Ashman, 1989).

O termo poliamina é usado para se referir genericamente à putrescina, espermidina, espermina, outras aminas e vários compostos derivados, no sentido restrito, significando apenas as aminas primárias que apresentam mais de dois grupos amina, como a espermidina e espermina. A putrescina, espermidina e espermina são as poliaminas mais comuns em plantas (Figura 1). Outros compostos de aminas primárias podem ser encontrados em plantas, como a cadaverina (Flores, 1990).

A diamina putrescina e a triamina espermidina são provavelmente sintetizadas por todos os organismos. Embora a função específica destes componentes não seja completamente compreendida, estudos recentes têm demonstrado que as poliaminas são exigidas para o crescimento normal e desenvolvimento tanto em procariontes como eucariontes (Kuehn, 1990). Tabor & Tabor (1984) observaram células mutantes de

procariontes, eucariontes e vegetais superiores, que não apresentavam a capacidade de biossintetizar poliaminas, eram incapazes de desenvolverem-se normalmente.

Muitos dos papéis atribuídos às poliaminas são o controle do ciclo celular, divisão e regulação da morfogênese em cultura de células de tecidos (Flores, 1991; Galston & Kaur-Sawhney, 1995).

As poliaminas espermidina, espermina e suas diaminas precursoras, como a putrescina, desempenham vital papel como moduladores de inúmeros processos biológicos de ativação de enzimas e manutenção do balanço iônico, através da regulação do crescimento e desenvolvimento da planta (Adiga & Prasad, 1985). Bouchereau et al. (1999) comentaram que as poliaminas são pequenas aminas alifáticas que estão presentes em todas as células vegetais e que elas freqüentemente ocorrem naturalmente como bases moleculares livres, mas podem também estar associadas a pequenas moléculas como ácidos fenólicos (em forma conjugada) e também a macromoléculas como proteínas.

A biossíntese de poliaminas em células vegetais ocorre através da participação de pelo menos cinco enzimas: Ornitina Descarboxilase (ODC) e Arginina Descarboxilase (ADC), catalizando a formação da putrescina; S-Adenosilmetionina Descarboxilase (SAMDC), responsável pela remoção de CO₂ presente no S-Adenosil Metionina; Espermidina Sintetase (SPD Sintetase) e Espermina Sintetase (SPM Sintetase) atuando na transferência do radical aminopropil necessário na síntese de SPD e SPM (Bagni & Torrigiani, 1992).

A putrescina normalmente provém do aminoácido arginina, através de dois principais caminhos: via Ornitina Descarboxilase (ODC) ou via Arginina Descarboxilase (ADC) e Agmatina. Essas duas vias apresentam distribuições em tecidos diferentes e diferentes regulações. A ADC está associada geralmente à resposta ao estresse, enquanto ODC associa-se ao ciclo celular e à divisão celular (Sena & Castro, 1996). Quando a via ADC é ativada, ocorre a formação de agmatina, que posteriormente é hidrolizada a N-Carbamilputrescina e posteriormente ocorre a formação de putrescina. A arginina também pode ser convertida a Ornitina, catalizada pela Arginase e posteriormente ocorre a formação de putrescina. A putrescina é usualmente convertida em espermidina (SPD) e espermina (SPM) por sucessivas adições de grupos aminopropil de S-Adenosilmetionina (SAM), catalizada pela SPD sintetase e SPM sintetase, respectivamente (Tiburcio et al.

1997) (Figura 2). A putrescina pode também ser desviada em outros caminhos metabólicos terminando em produtos como γ -Aminobutírico (GABA), pirrolina, vários alcalóides, conjugados com ácidos fenólicos e conjugados com proteínas (Smith, 1985; Galston, 1989).

As poliaminas estão relacionadas com a regulação da função dos ácidos nucleicos e também se fazem presentes na interação com membranas. Estas amins são conhecidas como estimuladoras do crescimento de uma ampla variedade de tecidos, e assim parece que elas podem ser, dependendo da concentração, limitantes do crescimento. O conhecimento da regulação dos mecanismos, bem como os níveis destas amins *in vivo* é de fundamental importância para se entender o controle do crescimento. Estudos em cultura de tecidos de plantas demonstraram que as poliaminas seriam estimuladoras do crescimento de explantes de *Helianthus tuberosus* (Smith, 1985). Numerosas investigações, têm mostrado uma estreita relação entre poliaminas e o crescimento das plantas, e muitas vezes, as poliaminas são apontadas como as responsáveis por esclarecer a ação dos hormônios durante o crescimento.

Putrescina:	$\text{H}_2\text{N} - (\text{CH}_2)_4 - \text{NH}_2$
Cadaverina:	$\text{H}_2\text{N} - (\text{CH}_2)_5 - \text{NH}_2$
Espermidina:	$\text{H}_2\text{N} - (\text{CH}_2)_4 - \text{NH} - (\text{CH}_2)_3 - \text{NH}_2$
Espermina:	$\text{H}_2\text{N} - (\text{CH}_2)_3 - \text{NH} - (\text{CH}_2)_4 - \text{NH} - (\text{CH}_2)_3 - \text{NH}_2$

Figura 1 - Estrutura de algumas di- e poliaminas encontradas em plantas (Flores, 1990)

Figura 2 - Representação esquemática da síntese de putrescina e poliaminas. Abreviações: ADC = Arginina Descarboxilase; ARGinase = Arginase; ODC = Ornitina Descarboxilase; NCP = N-Carbamilputrescina; SAM = S-Adenosilmetionina; SAMDC = SAM- Descarboxilase; dcSAM = SAM descarboxilada; SPDsintetase = Espermidina Sintetase; SPMsintetase = Espermina Sintetase; ARG = Arginina; ORN = Ornitina; PUT = Putrescina; SPD = Espermidina; SPM = Espermina. (Tiburcio et al. 1997).

As poliaminas têm uma alta afinidade por várias substâncias ácidas como fosfolípeos, ácidos nucleicos e resíduos de proteínas ácidas. Os principais sítios de ligação subcelular de poliaminas são: RNA ribossomo e transportador, DNA nuclear e organelar, parede celular e membranas. Em plantas, a putrescina, espermidina e espermina têm sido encontradas em ribossomos e em complexos com RNA ribossômico e RNA transportador. Numerosos estudos têm mostrado a interação e estabilização de DNA pelas poliaminas bem como sua ligação com estas macromoléculas. Em plantas, tal informação é escassa, mas a ocorrência de espermidina e espermina em cromatina isolada de milho já foi relatada (Tiburcio et al. 1990).

Outros estudos têm mostrado que as poliaminas podem se ligar às cargas negativas de extremidades de grupos fosfolipídicos ou outros sítios aniônicos de membranas, alterando as suas características de estabilidade e permeabilidade. A espermidina e espermina podem interagir com membranas pela inibição dos movimentos dos fosfolípeos ou pela estabilização molecular dos tilacóides de cloroplastos, retardando

perda de clorofila em tecidos de folhas senescentes. (Popovic et al. 1979; Sena & Castro, 1996).

O crescimento e desenvolvimento de plantas em ambientes controlados, ciclos de luz e temperatura, podem alterar o ritmo destes organismos. As poliaminas aparentemente agem como moduladores de crescimento e desenvolvimento de plantas e estes fatores podem alterar o metabolismo de poliaminas. A luz pode regular o efeito de poliaminas em diferentes plantas, bem como em seus órgãos. As plantas são expostas continuamente a mudanças ambientais (estresses bióticos e abióticos). Luz, temperatura, água e distribuição de nutrientes, podem estar ou não disponíveis e estes fatores têm sido o maior impacto para o crescimento e produtividade vegetal (Bouchereau et al. 1999).

Alterações drásticas podem ocorrer no metabolismo das poliaminas quando as plantas são submetidas a estresses abióticos. Embora as significâncias funcionais destas respostas não sejam completamente compreendidas, está claro que a maior mudança no metabolismo das poliaminas pode ocorrer quando as células da planta estão necessitando de nutrientes, ou expostas a baixos valores de pH, choque osmótico, estresse ácido, exposição a poluentes ambientais ou a baixas temperaturas (Galston, 1983; Shortle & Smith, 1988). O metabolismo das poliaminas também pode ser afetado quando as plantas são expostas a estresse bióticos envolvendo em geral, exposição da planta a fungos patogênicos e viroses (Flores, 1991).

O alumínio pode alterar o metabolismo de poliaminas, pois interfere sobre os cátions, causando prejuízo para as células vegetais, através da interação com macromoléculas sensíveis. Isto resulta na inibição do crescimento radicular, divisão celular, síntese de DNA, biomassa requerida e altura de plântulas, que são regulados pelas poliaminas (Minocha et al. 1992).

A amina putrescina pode se acumular em plantas sob condições de deficiências de potássio ou magnésio, acúmulo este que parece ser de ocorrência generalizada entre as espécies vegetais (Basso, 1974). A carência de potássio induziu o acúmulo da amina putrescina nas folhas de diversas plantas, conforme relatado pelo trabalho pioneiro de Richards & Coleman (1952) em cevada, por Crocomo et al. (1974 b) em *Phaseolus vulgaris*, por Crocomo & Basso (1974 a) em *Sesamum* e em *Musa* sp por Zaidan et al. (1999). O acúmulo de putrescina na deficiência de potássio pode ser explicado pelo

mecanismo proposto por Coleman & Richards (1956), admitindo-se que a falta de potássio altera o balanço interno entre cátions e ânions e com isso, ocorreria um aumento da acidez do suco celular. Estes autores sugeriram que o acúmulo de putrescina operaria como um mecanismo interno de compensação para manter o pH a um valor fisiologicamente adequado. Smith (1984) comenta que até 30% do déficit de cátion devido a deficiência de potássio, poderia ser balanceado pela putrescina. Portanto, o efeito da putrescina na manutenção do pH celular é um dos mecanismos de atuação da putrescina e poliaminas em geral, fornecendo informações relevantes para os estudos de nutrição mineral.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Química e Bioquímica e no Laboratório de Fracionamento de Proteínas pertencentes ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista / UNESP- Campus de Botucatu, em parceria com o Laboratório de Fisiologia das Árvores (Lafisa) do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ-USP em Piracicaba-SP.

3.1 Material

3.1.1 Material utilizado

O material vegetal utilizado foi um clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivado *in vitro*, fornecido pelo Lafisa, o qual foi multiplicado durante 30 dias, para obtenção de quantidades suficientes de brotações para o início do experimento.

3.1.2 Condições de crescimento da cultura

As brotações utilizadas constituíram-se de parte aérea pouco desenvolvida, ausência de sistema radicular e a cultura permaneceu em condições ambientais para o crescimento à temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 1000 lux, fornecida por luz branca fria localizada 30 cm acima do nível de cada prateleira, provenientes de 2 lâmpadas de 110W cada uma, modelo H.O , marca Phillips.

3.1.3 Meio de cultura

O meio de cultura básico utilizado no cultivo das brotações foi o proposto por Gonçalves (1980) acrescido de IAA a $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ e 6 BAP a $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ (Figura 3), com pH ajustado a 5,8 antes da inclusão de alumínio.

Macronutrientes	mg L⁻¹
NH ₄ NO ₃	800,0
KNO ₃	1000,0
KH ₂ PO ₄	170,0
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	236,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	250,0
Micronutrientes	mg L⁻¹
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
Na ₂ EDTA	37,3
H ₃ BO ₃	6,2
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,03
MnSO ₄ .5H ₂ O	1,7
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,25
ZnSO ₄ .7H ₂ O	3,0
KI	0,75
Vitaminas	mg L⁻¹
Meso-Inositol	100,0
Tiamina	5,0
Piridoxina	0,5
Ácido Nicotínico	0,5
Pantotenato de Cálcio	1,0
Cisteína	2,5
Outros	g L⁻¹
Sacarose	30,0
Ágar	5,0

Figura 3 - Composição do meio Gonçalves (1980)

Diferentes doses de alumínio foram adicionadas ao meio de cultura, sob a forma de AlCl₃.6 H₂O nas seguintes concentrações, representando os tratamentos:

Controle - Meio de cultura completo na ausência de AlCl₃.6H₂O;

Trat. 1 – $6,75 \text{ mg Al L}^{-1}$ de solução ou $0,25 \text{ mM}$ de AlCl₃.6H₂O;

Trat. 2 – $13,5 \text{ mg Al L}^{-1}$ de solução ou $0,50 \text{ mM}$ de AlCl₃.6H₂O;

Trat. 3 – $27,0 \text{ mg Al L}^{-1}$ de solução ou $1,00 \text{ mM}$ de AlCl₃.6H₂O.

Este cálculo foi realizado levando-se em consideração apenas a concentração de alumínio presente no $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Houve a necessidade de se trabalhar com meio de cultura líquido, não sendo portanto, utilizado o ágar, pois ao se adicionar $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, o valor de pH diminuiu, estabilizando-se a 3,5; 3,3 e 3,1 respectivamente para os tratamentos Trat 1; Trat 2 e Trat 3, não permitindo a gelificação do meio de cultura. O valor de pH para o tratamento controle foi 5,2 (após autoclavagem). Utilizou-se manta acrílica para servir de sustentação das brotações.

Em cada recipiente foram colocados 50 ml do meio de cultura, e 4 brotações de eucalipto.

3.2 Delineamento experimental

O experimento foi instalado em delineamento experimental inteiramente casualizado, 4 tratamentos (4 doses de Al) e 4 repetições para todos os parâmetros medidos. As coletas foram realizadas aos 4, 8, 12, 16, 20, 24 e 28 dias de cultivo, para avaliação dos parâmetros: matéria fresca, matéria seca, atividade da fosfatase ácida por eletroforese de isoenzimas, teor de poliaminas e teor de proteínas solúveis totais.

Utilizou-se o modelo matemático para experimentos em parcelas subdivididas em delineamento inteiramente casualizado, dado por:

$$y_{ijk} = \mu + t_i + (tr)_{ij} + t'_k + (tt')_{ik} + e_{ijk}$$

$$\text{com: } i = 1, \dots, 7; \quad j = 1, \dots, 4; \quad k = 1, \dots, 4;$$

sendo:

y_{ijk} o valor observado correspondente à combinação da i-ésima coleta e a k-ésima dose de alumínio na j-ésima repetição;

t_i efeito da i-ésima coleta;

$(tr)_{ij}$ é o efeito da interação da i-ésima coleta com j-ésima repetição; é usado como resíduo (Resíduo A) a nível de parcela (coleta), $(tr)_{ij} \sim N(0, \theta^2_{ij})$;

$t'k$ é o efeito da k-ésima dose de alumínio;

$(tt')_{ik}$ é o efeito da interação entre i-ésima coleta e k-ésima dose de alumínio;

e_{ijk} é o erro experimental associado a y_{ijk} , é usado como resíduo a nível de subparcela (dose), $e_{ijk} \sim N(0, \theta_{ij}^2)$.

3.3 Métodos

3.3.1 Análise do equilíbrio químico do meio de cultura

Para verificar o equilíbrio químico do meio de cultura utilizou-se o programa Geochem (Mattigod & Sposito, 1979). Os dados foram inseridos no programa Geochem em concentração molar de cada metal e ligante do meio de cultura utilizado no trabalho. Os valores de pH do meio, para cada tratamento foram também medidos e adicionados ao programa.

3.3.2 Matéria fresca e matéria seca

Amostras das brotações foram pesadas obtendo-se a matéria fresca e posteriormente secas em estufa de circulação forçada (50°C) até peso constante, obtendo-se a matéria seca, a qual foi submetida à análise da concentração de nutrientes. A matéria fresca e matéria seca foram expressas em g. Com os valores da matéria seca plotou-se o gráfico da curva de crescimento das brotações e o programa utilizado foi o Origin 4.0.

3.3.3 Atividade da fosfatase ácida por eletroforese de isoenzimas

As brotações de eucalipto foram maceradas em almofariz gelado, em proporção de 1 grama / 2 ml de solução extratora nº. 1 de Alfenas et al. (1991). O macerado foi centrifugado a 10.000 rpm / 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi armazenado em eppendorf a - 80°C. Aliquotas de 40 µl foram pipetadas em “wicks” de 15 x 6 mm.

Uma amostra controle foi utilizada em cada gel, cuja extração foi feita com material vegetal *in vitro* na proporção de 1 grama / 2 ml de solução extratora, armazenada em seguida em N₂ líquido, evitando-se perdas na atividade enzimática.

3.3.3.1 Condições da corrida eletroforética

Géis contendo 2/3 de penetrose de milho e 1/3 de amido (Sigma), em concentração final de 12%, foram resfriados, sendo posteriormente cortados ao meio e colocados os “wicks” (papel de filtro embebido com as amostras), sequencialmente com as amostras. Em uma das extremidades, foi colocado um “wick” com bromofenol para marcação da distância de migração.

A corrida foi realizada em geladeira, deixando 30 minutos iniciais para retirada dos “wicks” e seguindo a corrida até uma migração do marcador com aproximadamente 8 cm. O tempo de corrida foi padronizado para todas as coletas (4 horas de corrida).

3.3.3.2 Coloração das enzimas

Secções de 5 mm de espessura foram coradas, conforme protocolo de Alfenas et al. (1991).

Fosfatase Ácida (ACP) – E.C. 3.1.3.2

α -naftil fosfato ácido de sódio	0,04g
Fast Garnet GBC salt	0,04g
MgCl ₂ (1%)	2 ml

Tampão acetato de Na 0,1M

Incubou-se o gel no escuro à 30 – 37°C, até aparecerem as bandas, descartando a solução de coloração e fixando o gel em solução de glicerol a 10%. Foi padronizado para a ACP um tempo de coloração de 1 hora.

3.3.3.3 Análise dos géis

Os géis foram fotografados em VDS (Amersham Pharmacia Biotech), e analisadas as imagens com suas formas alélicas e respectivas atividades expressas como mobilidade relativa (R_f) e índice de densidade óptica através da densitometria do gel, com o programa software Image Master VDS, versão 2,0 da Amersham Pharmacia Biotech (1995, 1996).

3.3.4 Teor de poliaminas

A análise de poliaminas foi realizada de acordo com o método utilizado por Lima (1994). Amostras do material fresco foram coletadas, pesadas e homogeneizadas em 1 ml de ácido perclórico gelado a 5% (100 mg/ml), centrifugadas a 10.000 rpm por 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante contendo poliaminas livres foi acondicionado em frascos plásticos e armazenado a - 80°C, para posterior análise. Desta solução, alíquotas de 200 µl foram transferidas para tubos de ensaio, juntamente com 400 µl de cloreto de dansil (5mg/ml de acetona) e 200 µl de solução de NaHCO₃ saturada, ficando a mistura por 16 horas à temperatura ambiente e no escuro. Acrescentou-se 100 µl de prolina (100 mg/ml de água destilada) e esta solução foi mantida por 30 minutos no escuro à temperatura ambiente. Adicionou-se 400 µl de benzeno à mistura e posterior homogeneização por agitação mecânica durante 30 segundos. Foram retiradas alíquotas da fase orgânica, as quais foram submetidas à cromatografia em camada delgada.

As placas de sílica gel (60 G) foram ativadas a 100°C por 2 horas. Os solventes cromatográficos empregados foram obtidos através da mistura clorofórmio:triethylamina (20:1) para separação das poliaminas putrescina, espermidina e espermina.

A separação cromatográfica (uma hora, 25°C) foi acompanhada mediante iluminação da placa com luz ultra-violeta. Ao final, a placa foi retirada e seca por 60 minutos.

As poliaminas foram quantificadas por espectroscopia de fluorescência VDS (Amersham Pharmacia Biotech).

3.3.5 Teor de proteínas solúveis totais

Extratos obtidos para atividade de fosfatase ácida por isoenzimas foram utilizados para determinação de proteínas solúveis totais de acordo com o método de Bradford, (1976), utilizando caseína como padrão, e leitura a 595 nm em espectrofotômetro (Ultrospec 2000 – UV/ Visível, Amersham Pharmacia Biotech). O teor de proteína foi expresso em mg de proteína/g de peso fresco.

3.3.6 Análise da concentração dos nutrientes no material vegetal

As determinações dos elementos químicos do material vegetal foram realizadas no laboratório do Departamento de Solos e Nutrição de Plantas da ESALQ - USP.

As amostras foram as mesmas utilizadas para obtenção da curva de crescimento, sendo que o material vegetal foi acondicionado em frascos de vidro. As amostras (brotações de eucalipto) foram secas em estufa de circulação forçada à temperatura de 50°C, posteriormente moídas e submetidas às digestões nítrico perclórica e sulfúrica, onde foram determinadas as concentrações dos elementos nos extratos obtidos, segundo a metodologia descrita por Sarruge & Haag (1974).

As determinações de nitrogênio foram realizadas através do método analítico do micro Kjeldahl. Para o fósforo, as determinações foram feitas por colorimetria pelo método vanado-molibdato de amônio enquanto que os teores de potássio, cálcio, magnésio, cobre, ferro, manganês e zinco foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica. As determinações de enxofre foram feitas por turbidimetria da suspensão de sulfato de bário. Boro foi determinado pelo método da azometina H (Malavolta et al. 1997).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Modificações químicas do meio de cultura

A adição de doses crescentes de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ causou alterações no pH do meio de cultura. Inicialmente houve grande redução do pH nos tratamentos T₁ (pH 3,5), T₂ (pH 3,3) e T₃ (pH 3,1), e a partir do quarto dia de coleta apresentaram valores mais altos (Tabela 1). Observou-se que não houve diferença entre os valores de pH dos tratamentos e do controle.

Tabela 1 - Valores de pH do meio de cultura Gonçalves (1980) durante os 28 dias de cultivo *in vitro*.

<i>Dose Al</i>	Valor de pH nos dias de coleta						
	4	8	12	16	20	24	28
0	4,7	4,8	4,8	4,6	4,6	4,7	4,7
6,75	4,5	4,6	4,7	4,5	4,6	4,5	4,6
13,5	4,1	4,5	5,1	5,7	4,7	4,8	4,5
27,0	4,0	4,3	5,2	5,3	5,2	4,9	5,3

A absorção de nutrientes altera a composição do meio (Conner & Meredith, 1984) e isto permite uma faixa acima da qual o pH tende a subir sem precipitação do alumínio, o que pode explicar os valores do pH medidos após o quarto dia de coleta.

A simulação do balanço químico dos elementos no meio de cultura, realizado pelo programa Geochem, em função das alterações do pH sugere que o fósforo poderá tornar-se menos disponível para as plantas em função de sua ligação com o alumínio. Em relação aos demais nutrientes, a simulação não indicou grandes modificações em suas disponibilidades (Anexo 1).

O programa Geochem avalia o balanço químico dos macro e micronutrientes, porém não permite a inclusão dos hormônios, vitaminas e açúcares que são também componentes do meio de cultura. Os resultados poderiam ser diferentes com a inclusão dos mesmos, mas como modelo teórico, foi possível simular e comparar as condições de balanço químico do meio quando se adicionou $\text{AlCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$.

4.2 Teor dos nutrientes no material vegetal

Os resultados das análises dos teores de nutrientes no material vegetal encontram-se no Anexo 2.

Na Tabela 2 são apresentados os coeficientes de correlações de Pearson entre as doses de alumínio na solução e a concentração dos macronutrientes nas brotações de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. Como era de se esperar, o aumento das doses de alumínio no meio de cultura proporcionou aumento nas concentrações de alumínio no tecido vegetal, para as brotações cultivadas em meio de cultura contendo $\text{AlCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (Figura 4).

Tabela 2 - Coeficientes de correlações entre as doses de alumínio no meio de cultura e os teores dos nutrientes no tecido vegetal de brotações de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, durante o período de cultivo.

N	P	Macronutrientes			
		K	Ca	Mg	S
-0,09	-0,57	-0,56	-0,64	-0,48	-0,50
n.s.	**	**	**	**	**

** significativo a 1% de probabilidade; n.s. não significativo

A Figura 5 mostra a concentração dos macronutrientes que apresentaram valores significativos pela correlação de Pearson presente no tecido vegetal durante o período de cultivo. As correlações mostraram que o aumento das doses de alumínio proporcionou menor concentração de Ca, P e K no tecido vegetal, sendo o efeito mais pronunciado no caso do cálcio (Tabela 2).

Figura 4 – Concentração de alumínio no tecido vegetal de brotações de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, durante o período de cultivo.

Os resultados estão de acordo com Roy et al. (1988) e Kochian (1995), pois segundo estes autores, o alumínio interfere na absorção, transporte e uso de elementos (Ca, Mg, P e K) podendo comprometer também, a aquisição de água pelas plantas.

As concentrações de Ca foram maiores nas plantas cultivadas na ausência de alumínio em relação à adição deste elemento no meio. A presença de alumínio reduziu a concentração de Ca no tecido devido ambos os íons competirem pelo mesmo sítio do carregador ativo no processo de absorção, ocorrendo uma inibição competitiva do alumínio com o Ca (Lindberg, 1990; Malavolta et al. 1997).

A inibição da absorção de cálcio pelo alumínio é citada em várias revisões (Foy et al. 1978; Roy et al. 1988; Taylor, 1988). O cálcio desempenha muitos efeitos no crescimento e desenvolvimento da planta: altera a resposta geotrópica, a fotossíntese e outros processos fisiológicos como a divisão celular, movimentos citoplasmáticos e o aumento do volume celular. O cálcio é essencial para manter a integridade estrutural das membranas e das paredes celulares. Além disso, o cálcio se combina com as calmodulinas, modulando a atividade de enzimas e de proteínas não enzimáticas. Nos solos ácidos são conhecidos os efeitos prejudiciais dos altos níveis de alumínio. Sabe-se que esse elemento interfere com o cálcio: o alumínio pode mudar a estrutura e o funcionamento das calmodulinas alterando processos que dela dependem, como mecanismos transportadores de cálcio, modificando seu nível no citoplasma (Malavolta et al. 1997). O cálcio é um

nutriente extremamente importante na nutrição das plantas. Grande parte dele está localizado nas folhas, sendo que as mais velhas apresentam os maiores conteúdos. É muito importante no desenvolvimento e funcionamento das raízes e necessário à formação de folhas normais. Segundo Coelho (1988), a translocação de carboidratos e proteínas e seu armazenamento, durante a formação da semente, são influenciados pelo cálcio. A deficiência de cálcio na planta produz um crescimento irregular das folhas, resultando em folhas com margem de natureza restrita. O crescimento das raízes, tanto no sentido longitudinal, como no lateral, é prejudicado.

Kinraide & Parker (1987) observaram em plantas de trigo que o alumínio estabelece competição com o cálcio pelos sítios ativos externos de ligação na parede celular. Estudos realizados por Foy et al. (1969) e Furlani & Clark (1981) indicaram que plantas expostas ao alumínio acumulam menos cálcio.

A adição de alumínio na solução resultou numa menor concentração de P no tecido durante todo o período de cultivo (de 8 a 20 dias mais acentuado). Este efeito deve-se a uma insolubilização do H_2PO_4^- pela presença de alumínio, formando fosfato de alumínio, menos disponível para as plantas, mas neste caso, de acordo com Malavolta et al. (1997), houve uma inibição não competitiva, na qual o inibidor combina-se com o sítio não ativo do carregador, não podendo ser anulada. A inibição pode induzir deficiência de um dado elemento, assim, um excesso de alumínio no meio, pôde causar deficiência de Ca, K, Mg e P para as plantas.

Freqüentemente os sintomas da fitotoxicidade do alumínio assemelham-se àqueles da deficiência de fósforo (Foy et al. 1978; Foy 1988). Em algumas espécies vegetais a tolerância ao excesso de alumínio tem sido relacionada à habilidade em absorver e utilizar o fósforo.

O P é absorvido predominantemente na forma iônica de H_2PO_4^- . O fósforo da planta se encontra em vários grupos: o DNA e o RNA, ácidos desoxiribonucléico e ribonucléico, P-lipídico, ésteres e Pi. A função do fósforo é alterada na presença de alumínio, uma vez que ocorre rápida ligação deste elemento com o P, alterando sua disponibilidade para as plantas. Assim, o metabolismo celular é afetado, normalmente resultando em danos irreversíveis já que a ligação do alumínio com o fósforo ocorre na forma de inibição não competitiva, não podendo ser desfeita.

Estes resultados estão de acordo com o trabalho pioneiro de Clarkson (1967), que detectou que a presença de íons alumínio afeta fortemente a absorção de fósforo e sua incorporação nos compostos orgânicos. Os resultados concordam ainda com Kochian (1995), o qual afirmou que o alumínio interfere na fixação do fósforo em formas menos disponíveis no solo ou na raiz da planta, e no seu interior, altera o metabolismo como divisão celular da raiz, diminuição da respiração radicular, além de interferir na absorção, transporte e uso de vários elementos essenciais.

Comportamento semelhante foi observado para o K e Mg, onde as concentrações destes elementos foram maiores nas gemas mantidas em tratamento omissivo em alumínio. Dessa forma, a presença de alumínio também reduziu a concentração de K e Mg no tecido vegetal, mostrando que o efeito do íon alumínio sobre a absorção de Ca, K e Mg ocorre na forma de inibição competitiva, uma vez que estes cátions competem pelo mesmo sítio ativo do carregador (Malavolta et al. 1997).

O potássio atua em processos osmóticos, na síntese e manutenção de proteínas, na abertura e fechamento dos estômatos, na permeabilidade da membrana, no controle do pH, embora não se conheça com clareza o modo como tudo isso ocorre. A indisponibilização do potássio pela adição de alumínio pode resultar em complexas alterações celulares, uma vez que o potássio é um ativador enzimático por excelência. Além disso, um dos sintomas de carência de potássio é o acúmulo de putrescina, indicadora de estresse nutricional (Flores, 1990).

Houve ainda decréscimo na concentração de S e Mg no tecido foliar com o aumento das doses de alumínio no meio de cultura.

O efeito da redução de enxofre no tecido deve-se provavelmente à adição de cloro na forma de $\text{AlCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, sendo caracterizado por uma inibição competitiva entre SO_4^{2-} e Cl^- . O enxofre é constituinte dos aminoácidos, cisteína e metionina. As proteínas são os compostos nos quais, a maior parte do enxofre se incorpora. Portanto, a adição de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ reduziu a concentração do enxofre no tecido foliar devido a presença de Cl^- , e não propriamente devido à presença de alumínio. Assim os efeitos na inibição da absorção do enxofre ocorreram devido aos aumentos de cloreto na solução. Para o cloro exercer suas funções na planta, em geral, não são necessários mais do que 100 mg K^{-1} de matéria seca. Entretanto, o tecido vegetal pode apresentar valores de 20-200 vezes maior, sendo isto um

indicativo de que o cloro não chega a ser tóxico em concentrações relativamente altas (Malavolta et al. 1997). Silveira (2000) também verificou efeito do cloro na absorção de S em 4 progênies de *Eucalyptus grandis*, em condições de casa de vegetação, e observou que o KCl adicionado à solução nutritiva, reduziu a concentração de enxofre no tecido vegetal.

O papel do magnésio na vida da planta refere-se à sua presença na clorofila, além de participar como ativador de muitas enzimas entre outras funções. A molécula da clorofila, componente que dá coloração verde às plantas, contém 2,7% de magnésio, sendo um aparte muito pequena de magnésio contida nas folhas (Coelho, 1988). Quase todas as enzimas fosforilativas (incorporação ou transferência de Pi) dependem da presença do magnésio. A transferência de energia é fundamental nos processos da fotossíntese (fases luminosa e escura), respiração (glicólise e ciclo dos ácidos tricarboxílicos), reações de síntese de compostos orgânicos (carboidratos, lipídeos, proteínas), absorção iônica e trabalho mecânico. A absorção do H_2PO_4 é máxima na presença de Mg^{2+} e esse papel de “carregador do fósforo” se explica possivelmente pela sua participação na ativação de ATPases da membrana implicadas na absorção iônica (Malavolta et al. 1997). Coelho (1988) explicou que o magnésio também se encontra relacionado com o transporte de carboidrato das folhas para o caule das plantas. O baixo conteúdo de carboidratos observado em algumas plantas é devido à baixa atividade fotossintética, por insuficiente suprimento de magnésio. Nota-se que a presença de alumínio altera a disponibilidade de alguns nutrientes diretamente, mas neste caso, a presença de alumínio indisponibilizou o Mg^{2+} que indiretamente alterou a absorção de fósforo na forma de H_2PO_4 , provomendo, dessa forma, menor crescimento além de clorose, como pode ser observado na Figura 8 (fotos A, B, C, D, E, F, G, H).

Fósforo

Potássio

Cálcio

Magnésio

Enxofre

Figura 5 - Concentração dos macronutrientes no tecido vegetal de brotações de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivadas em meio de cultura Gonçalves (1980), durante o período de cultivo.

Na Tabela 3 são apresentados os coeficientes de correlações de Pearson entre as doses de alumínio na solução e a concentração dos micronutrientes nas brotações de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. Houve diferença significativa apenas para os elementos Fe e Mn. O elemento útil (Na) também apresentou valor significativo.

A Figura 6 mostra a concentração dos micronutrientes que apresentaram valores significativos pela correlação de Pearson presentes no tecido vegetal durante o período de cultivo.

As concentrações de Fe foram maiores nas brotações cultivadas no tratamento controle (omisso em $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) acentuadamente entre os dias 12 e 24. Para as brotações mantidas na presença de alumínio, ocorreu redução na concentração de Fe durante todo o período de cultivo, fato que também se deve à inibição competitiva entre o alumínio e o Fe pelo mesmo sítio do carregador ativo, no processo de absorção.

O ferro exerce muitas funções na vida da planta. Atua como transportador de elétrons durante o processo de respiração, participa da formação da clorofila e de enzimas que operam na assimilação e na fixação biológica do N. A absorção do ferro é influenciada por outros cátions como K, Ca e Mg. Neste caso, a presença de alumínio altera a disponibilidade de alguns nutrientes resultando, indiretamente, na diminuição da concentração de ferro na planta conforme sugere Malavolta et al. (1997).

Tabela 3 - Coeficientes de correlações entre as doses de alumínio no meio de cultura e os teores dos nutrientes no tecido vegetal de brotações de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, durante o período de cultivo.

B	Cu	Micronutrientes		Zn	Elemento Útil (Na)
		Fe	Mn		
-0,01	0,06	-0,47	-0,47	0,20	-0,40
n.s.	n.s.	*	*	n.s.	*

* significativo a 5% de probabilidade; n.s. não significativo

A concentração de Mn no tecido foliar parece ter sido pouco afetada pela presença de alumínio no meio de cultura, embora as brotações submetidas aos tratamentos com alumínio tenham apresentado variações nos teores de Mn durante o período de cultivo.

O manganês ocorre no solo na forma de óxidos e de hidróxidos, de solubilidades variáveis. É encontrado também nos materiais orgânicos não decompostos incorporados ao

solo, tornando-se possivelmente disponíveis às plantas mediante decomposição desses materiais pelos microorganismos do solo. O pH do solo é um fator primário responsável pela quantidade de manganês disponível às plantas. De acordo com Coelho (1988), não se conhece muito bem a função do manganês na planta, admitindo-se que tenha participação nas reações de óxido-redução. Sua deficiência determina um limitado desenvolvimento da clorofila na planta, isto é, clorose, embora ele não seja um constituinte da clorofila. O sintoma mais comum de deficiência de manganês é clorose das folhas mais jovens. As nervuras permanecem verdes, mas o tecido entre elas fica verde-pálido a esbranquiçado. Outros sintomas são a falta de florescimento e o retardamento no crescimento. Excesso de manganês pode reduzir o crescimento e causar efeitos tóxicos às plantas, pois induz clorose, provavelmente pela inativação do ferro devido a oxidação pelo manganês. Toxidez de manganês tem sido observada em algumas plantas que crescem em solos extremamente ácidos.

O Na foi encontrado em maiores quantidades nas brotações cultivadas na ausência de alumínio, mas quando na presença deste elemento, sua concentração no tecido vegetal foi pouco alterada.

Figura 6 - Concentração dos micronutrientes no tecido vegetal de brotações de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivadas em meio de cultura Gonçalves (1980), durante o período de cultivo.

O sódio é absorvido ativamente como Na^+ e de um modo geral, favorece a absorção do K^+ . Dentro de limites menores ou maiores, o Na, dependendo da espécie vegetal, pode substituir o K em funções não específicas, tendendo a acumular-se até concentrações mais altas no vacúolo, em substituição do K vacuolar, quando o suprimento deste é limitado. Assim, a importância do Na está na substituição do potássio em sua contribuição ao potencial de soluto e conseqüentemente na geração do turgor celular (Malavolta et al. 1997).

4.3 Matéria seca x período de coleta

Os resultados obtidos para a porcentagem de matéria seca, pelo teste de Tukey encontram-se na Tabela 4, no Anexo 3.

A curva de crescimento apresentou três estádios distintos. Observa-se que existe um período inicial, aproximadamente 8 dias, em que o crescimento é lento, seguido de uma fase de rápido aumento de peso seco até o décimo sexto dia de cultivo, e finalmente a estabilização chegando a um decréscimo na acumulação de matéria seca (Figura 7).

A interpretação fisiológica destas diferentes fases do crescimento, de acordo com Magalhães (1979) está no conceito de que, inicialmente, a planta depende das reservas da semente para a produção dos órgãos que compõem a plântula; após o desenvolvimento do sistema radicular e a emergência das folhas, os processos anabólicos, dependentes da fotossíntese, se traduzem por um rápido crescimento; atingido o tamanho definitivo, a planta inicia uma fase de senescência, que se reflete na paralização da produção de matéria orgânica. A curva de crescimento das brotações apresentou comportamento semelhante ao descrito acima. O eucalipto cultivado *in vitro* apresenta, na curva de crescimento, todas estas fases, com duração de aproximadamente 21 dias, pois a partir disso, não ocorrem incrementos consideráveis e as plântulas podem até apresentar reduções de matéria seca em virtude de iniciarem o processo de senescência.

Os resultados da curva de crescimento das brotações submetidas aos tratamentos com diferentes doses de alumínio mostraram que houve crescimento para todos os tratamentos, durante o período de cultivo (Figura 7).

Figura 7 - Curva de crescimento das brotações de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* submetidas aos tratamentos com $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ durante o período de cultivo.

O crescimento das brotações, em geral, apresentou um gradiente de vigor inverso ao aumento da dose de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ no meio de cultura. As brotações cultivadas na presença de alumínio mostraram alterações estruturais na parte aérea, sendo que estas obtiveram maiores incrementos de matéria seca. Entretanto, provavelmente, a entrada de alumínio ocasionou danos ao funcionamento celular, levando à redução na organização dos tecidos e com isso ocorreu perda da estrutura, o que pode ser verificado pela Figura 8. Pelas fotos, pode-se observar melhor o desenvolvimento das brotações pertencentes ao tratamento controle (fotos A e B), sendo que para os demais tratamentos, o alumínio aparentemente alterou o desenvolvimento da parte aérea (fotos C, D, E, F, G e H). Isto sugere que houve, provavelmente, um aumento de matéria seca em detrimento da desorganização dos tecidos, como resposta ao estresse.

Resultados semelhantes foram encontrados por Souza et al. (1999a e b) verificando que plântulas de eucalipto submetidas a estresse (hídrico) também apresentaram maior acúmulo de matéria seca e perda de estrutura. Em outras espécies, o estresse hídrico

também promoveu uma redução no espessamento do mesofilo em videira (Dami & Hughes, 1995), em trigo (Zagdanska & Kozdoj, 1994). Em *Pinus sylvestris* e *Picea abies*, o efeito do déficit hídrico incluiu a plasmólise do mesofilo (Palomaki et al., 1995).

Figura 8 –Brotações de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivadas *in vitro*, em meio de cultura Gonçalves (1980), com adição de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em diferentes épocas de desenvolvimento.

4.4. Atividade da fosfatase ácida por eletroforese de isoenzimas

A análise eletroforética mostrou que o material vegetal utilizado possuía 5 bandas em todos os tratamentos durante todo o período do experimento. As bandas foram denominadas ACP₁, ACP₂, ACP₃, ACP₄ e ACP₅, conforme Figura 9.

Os resultados obtidos para a atividade da ACP total pelo teste de Tukey encontram-se na Tabela 5, no Anexo 3.

Embora tenham ocorrido algumas diferenças de intensidade de cada banda ao longo dos 28 dias de cultivo, nenhum padrão de resposta foi observado em relação aos diferentes tratamentos.

Figura 9 – Eletroforese de isoenzimas (Fosfatase Ácida E.C.3.1.3.2) presente nas brotações de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivadas em meio de cultura Gonçalves (1980). A escala à esquerda da figura corresponde à razão de mobilidade da corrida eletroforética. (Os números de 1 a 4 representam as repetições das brotações mantidas no tratamento controle. De 5 a 8 as repetições das brotações mantidas no tratamento com 6,75 mg Al L⁻¹. Os números 9 e 10 são amostras-teste. De 11 a 14 estão as repetições das brotações mantidas no tratamento com a dose 13,5 mg Al L⁻¹. Os números 15 a 18 são as repetições das brotações pertencentes ao tratamento com a dose 27,0 mg Al L⁻¹.)

Como não houve diferença genética na expressão das bandas para a fosfatase ácida, o comportamento da ACP total foi analisado através da somatória das intensidades ópticas de todas as bandas em cada período de coleta.

Os géis mostraram intensidades da enzima fosfatase ácida proporcionalmente às doses de AlCl₃.6H₂O, caracterizadas pelo escurecimento do gel. Isso mostra que a enzima apresentou maior atividade para favorecer a absorção do fósforo em situação de baixa

disponibilidade, isto é, após a adição do alumínio. Desta forma, a deficiência de fósforo resulta em um aumento da atividade da enzima fosfatase ácida, o que permite às plantas sobreviverem em situação de baixo teor de fósforo.

A fosfatase ácida é uma enzima cuja atividade é aumentada na deficiência de fósforo em diversas espécies vegetais. O aumento da atividade da fosfatase ácida em função de doses de crescentes de alumínio na solução nutritiva concordam com Zaini & Mercado (1985a e b), que utilizando plantas de arroz, determinaram aumento da atividade da enzima quando a concentração de alumínio na solução foi elevada de 3 para 30 mg L⁻¹. Os autores explicaram que a atividade da enzima é alta quando o estado nutricional em fósforo é baixo, como neste caso, em decorrência da deficiência de fósforo, induzida pelo alumínio.

A Figura 10 mostra a atividade enzimática da ACP total em brotações de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* submetidas aos tratamentos com AlCl₃.6H₂O durante o período de cultivo. Nota-se que no quarto, oitavo e décimo-segundo dias, ocorreu baixa atividade enzimática para todos os tratamentos e a partir do décimo-segundo a atividade enzimática tende a aumentar para as brotações submetidas às maiores doses de AlCl₃.6H₂O, embora não se constate diferença significativa entre estes tratamentos, confirmando que a indisponibilização do P exige maior atividade de fosfatase ácida para garantir a sobrevivência da planta em suprimento fosfórico inadequado. O vigésimo dia caracteriza-se por uma redução da atividade enzimática com diferença significativa apenas para o tratamento com a dose 13,5 mg Al L⁻¹ sendo que os demais, não diferem entre si. No vigésimo-quarto dia apenas o tratamento com a maior dose de AlCl₃.6H₂O difere dos demais tratamentos, apresentando a maior atividade enzimática. O vigésimo-oitavo dia demonstra uma redução da atividade de fosfatase ácida possivelmente devido ao início do estágio senescente ao qual se encontram as plantas de eucalipto em cultivo *in vitro*.

Figura 10 – Atividade enzimática da ACP total em brotações de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivadas meio de cultura Gonçalves (1980) com adição de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ durante o período de cultivo.

De acordo com Koyama et al. (1988), o maior fator tóxico causado pela adição de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ é a formação de alumínio-fosfato-insolúvel e conseqüente diminuição na disponibilidade de fósforo para a planta. Tal informação é concordante com os dados apresentados no presente trabalho, o qual mostrou a indisponibilização de fósforo e outros nutrientes após a adição de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ao meio de cultura.

Segundo Klimashevskii & Bernartskaya (1973), as mudanças na atividade de fosfatase são características de cada variedade e podem também estar associadas à desigual permeabilidade das células expostas ao alumínio, o que explica a variação de atividade enzimática ocorrente neste trabalho.

Os resultados concordam ainda com o trabalho de Gakuru & Lefebvre (1991) que encontraram maiores atividades de fosfatase ácida em raízes de milho tratadas com alumínio, quando comparadas ao controle e com Silva (1997) que estudando a toxicidade de alumínio em genótipos de *Panicum maximum*, observou que a atividade da fosfatase ácida nas folhas desta gramínea mostrou incrementos com o aumento das doses de alumínio.

4.5 Teor de Poliaminas

Na Figura 11 é possível visualizar o resultado obtido das poliaminas (putrescina, espermidina e espermina) analisado em placas de sílica gel, por cromatografia de camada delgada, em brotações de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivadas em meio de cultura contendo $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ de estresse por alumínio.

Os resultados obtidos para o teor de putrescina, espermidina e espermina, pelo teste de Tukey encontram-se nas Tabelas 6, 7 e 8 no Anexo 3.

Figura 11 – Cromatografia de camada delgada de poliaminas dansiladas em brotações de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivadas em meio de cultura Gonçalves (1980), com adição de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. (O número 1 representa o padrão. Os números 2 e 3; 4 e 5; 6 e 7; 8 e 9; correspondem, respectivamente às doses 0; 6,75 mg Al L^{-1} ; 13,5 mg Al L^{-1} , 27,0 mg Al L^{-1}).

A Figura 12 mostra o teor da diamina putrescina, durante o período de cultivo, sob efeito dos diferentes tratamentos. Observa-se que na fase inicial, isto é, do quarto ao décimo segundo dia de cultivo, ocorreram maiores níveis de putrescina para as brotações mantidas no tratamento com a dose mais alta de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Brotações cultivadas na dose mais baixa de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e aquelas pertencentes ao tratamento controle, apresentaram os mais baixos teores de putrescina nestas épocas de coleta. Estes resultados podem indicar que, na presença de alumínio, ocorreu intensificação na síntese de poliaminas,

provavelmente, como um ajuste osmótico. Flores (1991) verificou que o papel específico do acúmulo de putrescina seria a manutenção do balanço cátion-ânion no tecido vegetal. O mesmo autor observou acúmulo dessa diamina como resultado da carência de potássio em espécies de mono e dicotiledôneas, e isso parece ser uma resposta universal. Resultados semelhantes foram encontrados por diversos autores como Basso (1974), Smith (1985) e Flores (1990). Malavolta et al. (1997) relataram que o alumínio interfere na absorção de K, na forma de inibição competitiva, alterando a disponibilidade do potássio no processo de absorção.

Como já mencionado, o teor de putrescina foi maior nos tratamentos utilizando as maiores doses de alumínio, conseqüentemente, os que apresentaram menores teores de potássio (Figura 12), levando a um acúmulo desta amina. Na ausência de potássio, a possível deficiência do cátion, estaria sendo compensada pela putrescina.

Watson & Malmberg (1996) apontaram que alterações nos níveis de putrescina podem ser uma das mudanças induzidas pela deficiência da nutrição mineral. Estas mudanças na composição e conteúdo de poliaminas, induzidas pela deficiência de potássio, diferem de acordo com tecido e estágio de desenvolvimento do estresse nutricional (Bouchereau et al. 1999).

Conforme relatado por Smith (1985) e Tiburcio et al. (1989, 1997), a diamina putrescina é convertida à triamina espermidina e à tetramina espermina por sucessivas transferências de grupos aminopropil. Parece que, devido à adição de $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ e a conseqüente indisponibilização de alguns nutrientes, como o cálcio e o potássio, ocorreu acúmulo de putrescina no início da fase de crescimento das brotações.

A partir do décimo segundo dia, as concentrações de putrescina apresentaram tendência de aumento até o final do período de cultivo em todos os tratamentos testados, com algumas variações relacionadas ao período de desenvolvimento das brotações, confirmando a participação das poliaminas na regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas, conforme trabalho de Adiga & Prasad (1985) e outros autores.

O acúmulo de putrescina, durante a fase de crescimento linear, também foi relatado por Aribaud et al. (1994), que observaram a biossíntese de poliaminas ocorrendo nos primeiros dias de cultivo *in vitro*, quando células de *Chrysanthemum morifolium* se multiplicavam rapidamente. Isto indicaria que a biossíntese de poliaminas ocorre

simultaneamente à condição fisiológica de intenso metabolismo, no qual a divisão celular ou a formação de órgãos estaria diretamente correlacionada.

Figura 12 – Acúmulo de putrescina em brotações de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivadas em meio Gonçalves (1980) submetidas a estresse nutricional ($\text{AlCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$). Expresso em $\mu\text{moles Put/g}$ matéria fresca.

Minocha et al. (1996) avaliaram o efeito de diferentes doses de alumínio em cultura de *Picea rubens* cultivadas *in vitro* e verificaram que todos os níveis de alumínio inibiram o crescimento e aumentaram os níveis de putrescina.

Shortle & Smith (1988) sugeriram que o alumínio poderia causar diminuição dos teores de cálcio e manganês. Esta deficiência poderia ser a causa da indução e/ou biossíntese de putrescina e espermidina no tecido foliar, como também relatado por Lima (1994) avaliando poliaminas em calos de arroz sob efeito de diferentes níveis de cálcio. Não está claro se as mudanças no metabolismo de poliaminas são as principais respostas para este estresse ou se são causadas indiretamente via efeitos do estresse em outros processos fisiológicos. De acordo com Galston (1989), a deficiência de manganês e cálcio induzem a um aumento no nível de putrescina, mas estas elevações são pequenas e de lenta ocorrência.

Com relação aos teores de espermidina e espermina (Figuras 13 e 14), nota-se que foram maiores do que os encontrados para a putrescina, para as brotações mantidas nas

doses 13,5 e 27,0 mg Al L⁻¹, na fase inicial do crescimento da cultura (Figuras 12 e 13). Isto sugere que provavelmente, a putrescina foi rapidamente metabolizada, suprimindo a carência de íons K⁺ e ocorreu então, a conversão de putrescina em espermidina. Este aumento de espermidina pode ser devido ao ajuste metabólico resultante do processo de crescimento em condições de deficiência nutricional. Como já relatado anteriormente, de acordo com Bouchereau et al. (1999) e Faust & Wang (1993) possivelmente, durante o período de adaptação metabólica à deficiência de K⁺, a espermidina desempenha papel na estabilização de membranas. Assim, os altos níveis de espermidina e espermina observados neste trabalho (maiores dos que encontrados para putrescina), também poderiam ser resultado da estabilização das membranas.

O mecanismo pelo qual as poliaminas exercem sua função na membrana é pela formação de complexos com os fosfolipídeos, os quais seriam responsáveis pela redução da fluidez (Roberts et al. 1983). Foi relatado por Bouchereau et al. (1999) que as poliaminas são moléculas carregadas positivamente em pH fisiológico, ligando-se fortemente às cargas negativas dos fosfolipídeos e muitas proteínas e estas interações iônicas, de acordo com Jacob & Stetler (1991), seriam importantes na regulação da estrutura e função biológica, mantendo, desta forma, a integridade da membrana.

Figura 13 – Acúmulo de espermidina em brotações de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivadas em meio Gonçalves (1980) submetidas a estresse nutricional (AlCl₃.6H₂O). Expresso em µmoles Spd/g matéria fresca.

A função do metabolismo de poliaminas (espermidina e espermina) nas plantas tem sido tópico de numerosos estudos (Slocum et al. 1984). Poliaminas são policátions altamente protonados, ligando-se a poliânions importantes, como DNA, RNA e resíduos protéicos. Devido às ligações das poliaminas com poliânions, aquelas substâncias podem afetar a síntese e atividade de macromoléculas e parcialmente, os processos de mitose e meiose (Galston & Kaur-Sawhney, 1987). Em cultura de tecidos, bem como em protoplastos de aveia, a adição de poliaminas ao meio estimula a mitose (Slocum et al. 1984).

Figura 14 – Acúmulo de espermina em brotações de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivadas em meio Gonçaves (1980) submetidas a estresse nutricional ($\text{AlCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$). Expresso em $\mu\text{moles Spm/g}$ matéria fresca.

Existem divergentes opiniões com relação às poliaminas em muitas áreas da fisiologia vegetal, no que se refere a seu efetivo papel e consequentemente sua categoria não está ainda definida (se atuam ou não como reguladores vegetais). O papel das poliaminas e seus efeitos, indicam que há necessidade de maiores estudos.

4.6 Teor de proteína

Observando-se a Figura 15 nota-se que o teor de proteínas solúveis totais entre o oitavo e décimo sexto dia foi maior nas brotações pertencentes ao tratamento controle. Este período corresponde à fase exponencial ou período linear de crescimento (Magalhães, 1979) onde ocorreu um rápido crescimento das brotações para todos os tratamentos até atingirem um tamanho “definitivo”.

Os resultados obtidos para o teor de proteínas solúveis totais pelo teste de Tukey encontram-se na Tabela 9 no Anexo 3.

Figura 15 – Teor de proteínas solúveis totais em brotações de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* submetidas aos tratamentos com $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em diferentes épocas de desenvolvimento.

O teor de proteínas e RNA são componentes celulares que podem ser relacionados com o crescimento (DOUGALL, 1972). Ao comparar a curva de crescimento das brotações de eucalipto (Figura 7) com o teor de proteínas (Figura 15), observa-se que praticamente em todos os tratamentos, a fase de crescimento linear está entre o oitavo e décimo-segundo dia, período de maior acúmulo de proteínas solúveis totais nas brotações mantidas em tratamento omissa em $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Observa-se o oposto no tratamento com a

maior dose de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, que nesta mesma fase apresentou menores teores de proteínas solúveis totais.

A partir do vigésimo-quarto dia, o controle difere dos demais e apresenta maior teor de proteínas solúveis totais, seguido pelo tratamento com $6,75 \text{ mg Al L}^{-1}$, que também difere dos outros tratamentos. As doses $13,5$ e $27,0 \text{ mg Al L}^{-1}$ não diferem entre si mas diferem dos demais tratamentos, apresentando os menores teores de proteínas.

O desequilíbrio provocado ao meio de cultura com a adição de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, conforme já mencionado, indisponibilizou, direta ou indiretamente alguns nutrientes, mas parece que a indisponibilização do potássio, refletiu no aparecimento de outros efeitos como é o caso do acúmulo das poliaminas e redução do teor de proteínas solúveis totais, processos altamente influenciados pela presença ou ausência do íon K^+ .

Segundo Evans & Sorger (1966) estudos da deficiência de potássio indicaram que tal elemento esteja comprometido em vários processos metabólicos como acúmulo de aminoácidos, amidas e redução dos teores de proteína. Basso (1974) também sugeriu que a deficiência de potássio ou magnésio compromete a síntese protéica diretamente no processo de incorporação de aminoácidos em peptídeos. Estes resultados concordam com Flores (1990), que comentou que a deficiência de potássio em algumas plantas leva a um rápido desaparecimento de proteínas.

A indisponibilização de alguns nutrientes resultou em um decréscimo no teor de proteínas, principalmente em decorrência da indisponibilização de Ca, Mg e K.

A ausência de macronutrientes como o cálcio, resulta numa degradação de proteínas e parece que este elemento é capaz de manter os teores de RNA e proteína quando em níveis adequados para *Lemma minor*, como relatado por Trewavas (1970, 1972).

De acordo com Malavolta et al. (1997) a presença de alumínio pode inibir a absorção de outros íons, como o Mg. Este elemento desempenha importante função nas vias metabólicas como a glicólise, ciclo de Krebs e via pentose fosfato. A adição de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ indisponibilizou o Mg e a deficiência deste elemento possivelmente tenha reduzido a atividade estas vias metabólicas, como o ciclo de Krebs e também pode ter resultado numa alteração na biossíntese de proteínas, pois de acordo com Webster (1961) e Boulter (1970), o Mg é necessário para a síntese protéica, pois é cofator de diversas enzimas.

5 CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos, pode-se concluir, apesar de algumas variações, que nas condições estudadas, a adição de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ interferiu na fisiologia e bioquímica de brotações de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*.

A indisponibilização de nutrientes como cálcio, fósforo e potássio causada pela adição de doses crescentes de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ao meio de cultura, alterou o metabolismo celular, principalmente em processos altamente dependentes destes elementos, ocasionando perdas de estrutura, maior atividade de fosfatase ácida, acúmulo de poliaminas e redução do teor de proteínas solúveis totais.

Deve-se ressaltar que em nenhuma situação as brotações possuíam sistema radicular desenvolvido, desta forma, os resultados apresentados resumem-se a situação de cultivo *in vitro*, porém indicando formas de resposta ao estresse por alumínio.

O estudo mostrou que usando a técnica de cultura *in vitro* é possível estudar os mecanismos de adaptação das plantas a solos que contém problemas com toxidez de alumínio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADIGA, P. R.; PRASAD, G. L. Biosynthesis and regulation of polyamines in higher plants. In: GALSTON, A. W.; SMITH, T. A. **Polyamines in plants**. The Netherlands: Martinus Nijhoff/ Dr W. Junk Publishers, Dordrecht, 1985. p.3-24.
- ALAM, S. M. Influence of aluminum on plant growth and mineral nutrition of barley. **Communications in soil Science and Plant Analysis**, v.12, p.121-38, 1981.
- ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins; fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, 1998. 574p.
- ALFENAS, A. C.; PETERS, I.; BRUNE, W. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: UFV, 1991, 242p.
- ASCENIO, J. Root secreted acid phosphatase kinetics as a physiological marker for phosphorus deficiency. **Journal of Plant Nutrition**, v.20, n.1, p.9-26, 1997.
- ARIBAUD, M.; CARRÉ, M.; MARTIN-TANGUY, J. Polyamine metabolism and *in vitro* cell multiplication and differentiation in leaf explants of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. **Plant Growth Regulation**, v.15, p.143-155, 1994.

- BAGNI, N.; TORRIGIANI, P. Polyamines: A New Class of Growth Substances. In: KARSSSEN, C. M.; VAN LOON, L. C.; VREUGDENHIL, D. **Progress in Plant Growth Regulation**, Kluwer Academic Publishers, p.264-275, 1992.
- BASSO, L. C. Formação de di- e poliaminas em plantas deficientes em potássio e magnésio. Piracicaba, 1974, 40p. Dissertação (M.S.). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- BASSO, L. C.; SMITH, T.A. Effect of mineral deficiency on amine formation in higher plants. **Phytochemistry**, v.13, p.875-933, 1974.
- BENNET, R. J.; BREEN, C. M. The aluminum signal: New dimensions to mechanisms of aluminum tolerance. **Plant and Soil**, v.134, p.153-66, 1991.
- BIELESKI, R.L. Phosphate pools, phosphate transport and phosphate availability. **Annual Review of Plant Physiology**, v.24, p.225-252. 1973.
- BOUCHEREAU, A.; AZIZ, A.; LARHER, F.; MARTIN-TNGUY, J. Polyamines and environmental challenges: recent development. **Plant Science**, v.140, p.103-25, 1999.
- BOUTLER, D. Protein synthesis in plants. **An. Rev. Pl. Physiol.**, v.21, p.93-114, 1970.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p.248-254, 1976.
- CLARKSON, D. T. Interactions between aluminium and phosphorus on root surfaces and cell wall material. **Plant and Soil**, v.27, n.3, p.347-56, 1967.

- COELHO, F. S. **Fertilidade do Solo**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1988. 384p.
- COLEMAN, R. G.; RICHARDS, F. J. Physiological studies in plant nutrition: XVIII – Some aspects of nitrogen metabolism in barley and other plants in relation to potassium deficiency. **Annals of Botany**, v.20, n.2, p.393-409, 1956.
- CONNER, A. J.; MEREDITH, C. P. Simulating the mineral environment of aluminium toxic soils in plant cell culture. **Journal of Experimental Botany**, v.36, n.167, p. 870-880, 1985.
- CONNER, A. J.; MEREDITH, C. P. An improved polyurethane support system for monitoring growth in plant cell cultures. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.3, p.59-68, 1984.
- CROCOMO, O. J.; CATTINI, M. A.; ZAGO, E. A. Acúmulo de aminas e aminoácidos em relação ao nível de potássio em folhas de feijão (*Phaseolus vulgaris*). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v.17, n.1, p.93-102, 1974 b.
- CROCOMO, O. J.; BASSO, L. C. Accumulation of putrescine and related aminoacids in potassium deficient *Sesamun*. **Phytochemistry**, v.13, p.2659-2665, 1974 a.
- DAMI, I.; HUGHES, H. Leaf anatomy and water loss of in vitro PEG-treated valiant grape. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.42, n.2, p.179-184, 1995.
- DEGENHARDT, J.; LARSEN, P. B.; HOWELL, S. H.; KOCHIAN, L. V. Aluminum resistance in the *Arabidopsis* mutant alr-104 is caused by a aluminum-induced increase in rhizosphere pH. **Plant Physiology**, v.117, p.19-27, 1998.

- DELHAIZE, E.; RYAN, P. R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiology**, v.107, p.315-21, 1995.
- DIXON, M.; WEBB, E.C. **Enzymes**. 2.ed., New York: Academic Press, 1964. 950p.
- DOUGALL, D. K. Cultivation of plant cells. In: ROTHBLAT, G. H.; CRISTOFALO, V. J. (Eds) **Growth, nutrition and metabolism of cell in culture**. New York: Academic Press, 1972, p.371-406.
- DUFF, S.M.G.; SARATH, G.; PLAXTON, W.C. The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism **Physiologia Plantarum**, v.90, p.791-800, 1994.
- DUFF, S.M.G.; PLAXTON, W.C.; LEFEBVRE, D.D. Phosphate starvation response in plant cells: *De novo* synthesis and degradation of acid phosphatases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.88, p. 9538 - 9542, 1991.
- EPSTEIN, E. **Nutrição mineral das plantas: princípios e perspectivas**. São Paulo: EDUSP, 1975. 344p.
- EVANS, H. J.; SORGER, G. J. Role of Mineral Elements with Emphasis on The Univalent Cations. **Annual Review of Plant Physiology**, v.17, p.47-76, 1966.
- FAUST, M.; WANG, S. Y. Polyamines in horticulturally import plants. **Horticultural Reviews**, Janck, F. Wiley, J. & Sons, Inc, N.Y. v.14, p.333-356, 1993.
- FLORES, H. E. Changes in polyamine metabolism in response to abiotic stress. In: SLOCUM, R. D.; FLORES, H. E. **Biochemistry and physiology of polyamines in plants**. Boca Raton: CRC, 1991. cap.15, p.213-228.

- FLORES, H. E. Polyamines and Plant Stress. In: ALSCHER, R. G.; CUMMING, J. R. **Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanisms**. New York: Wiley-Liss, 1990. cap.10, p.217-239.
- FOY, C. D. Plant adaptation to acid, aluminum-toxic soils. **Commun. In Soil Sci. Plant Anal.**, v.19, p.959-987, 1988.
- FOY, C. D.; CHANEY, R. L.; WHITE, M. C. The physiology of metal toxicity in plants. **Annual Review Plant Physiology**, v.29, p.511-66, 1978.
- FOY, C. D.; FLEMING, A. L.; ARMIGER, W. H. Aluminum tolerance of soybean varieties in relation to calcium nutrition. **Agronomy Journal**, v.61, p.505-511, 1969.
- FURLANI, P. R.; CLARK, R. B. Screening sorghum for aluminum tolerance in nutrient solution. **Agronomy Journal**, v.73, p.587-594, 1981.
- FURZE, M. J.; CRESSWELL, C. F. Micropropagation of *Eucalyptus grandis* and *nitens* using tissue culture techniques. **South African Forestry Journal**, v.135, p.20-23, 1985.
- GAKURU, S.; LEFEBVRE, C. Acid phosphatase: screening Zairian *Zea mays* varieties for aluminium tolerance. **Cereal Research Communications**, v.19, n.4, p.477-481, 1991. Resumo em **CAB Abstract** on CD-Rom, 1993-Dec.1994
- GALSTON, A. W.; KAUR-SAWHNEY, R. Other Hormonal Compounds: Polyamines as Endogenous Growth Regulators. In: DAVIES, P. J. **Plant Hormones**. New York: Kluwer Academic Publishers, 1995, cap."C", p.158-178.

GALSTON, A. W.; KAUR-SAWHNEY, R. Polyamines as a endogenous growth regulators. In: Davies, P. Y. (Ed). *Plant hormones and their role in plant growth and development*. London: Kluwer Academ. Publishers, 1987.

GALSTON, A. W. Polyamines and plant response to stress. In: BACHRACH, U.; HEIMER, Y. M. **The physiology of polyamines**. New York: CRC Press, 1989. cap.7, p.99-106.

GALSTON, A. W. Polyamines as Modulators of Plant Development. **BioScience**, v.33, n.6, p.382-388, 1983.

GONÇALVES, A. N. Reversion to juvenility and cloning of *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake in cell and tissue culture systems. In: SIMPÓSIO IUFRO EM MELHORAMENTO GENÉTICO E PRODUTIVIDADE DE ESPÉCIES FLORESTAIS DE RÁPIDO CRESCIMENTO, Águas de São Pedro, 15-30. Agosto. 1980

HELAL, H.M. Varietal differences in root phosphatase activity as related to the utilization of organic phosphates. **Plant and Soil**, v.123, p.161-163, 1990.

HOWELER, R. H.; CADAVID, L. F. Screening of rice cultivars for tolerance to Al-toxicity in nutrient solutions as compared with a field screening method. **Agron. J.** v.68, p.551-555, 1976.

HUCK, M. G. Impairment of sucrose utilization for cell wall formation in the roots of aluminum damaged cotton seedlings. **Plant and Cell Physiology**, v.13, p.7-14, 1972.

- JACOB, S. T.; STETLER, D. A. Polyamines and RNA synthesis. In: BACHRACH, U.; HEIMER, Q. M. (Eds) **The physiology of polyamines**. v.1. Boca Raton: CRC Press, FL, 1991, p.133-140.
- KINRAIDE, T. B. Identity of the rhizotoxic aluminium species. **Plant and Soil**, v.134, p.167-78, 1991.
- KINRAIDE, T. B.; ARNOLD, R. C.; BALIGAR, V. C. A rapid assay for aluminum phytotoxicity at submicromolar concentrations. **Physiologia Plantarum**, v.65, p.245-50, 1985.
- KINRAIDE, T. B.; PARKER, D. K. Cation amelioration of aluminum toxicity in wheat. **Plant Physiology**, v.83, p.546-551, 1987.
- KLIMASHEVSKII, E. L.; BERNATSKAYA, M. L. Activity of ATPase and acid phosphatase in growth zones of the roots of two varieties of pea having different sensitivity to Al-ion toxicity. **Soviet Plant Physiology**, v.20, p.201-4, 1973.
- KOCHIAN, L. V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.46, p.237-60, 1995.
- KOYAMA, H.; OKAWARA, R.; OJIMA, K.; YAMAYA, T. Re-evaluation of characteristics of a carrot cell line previously selected as aluminum-tolerant cells. **Physiologia Plantarum**, v.74, p.683-87, 1988.
- KUEHN, G.D.; RODRIGUES-GARAY, B.; BAGGA, S.; PHILLIPS, G.C. Novel Occurrence of Uncommon Polyamines in Higher Plants. **Plant Physiology**, v.94, p.855-857, 1990.

- LARSEN, P. B.; DEGENHARDT, J.; TAI, C.; STENZLER, L. M.; HOWELL, S. H.; KOCHIAN, L. V. Aluminum-resistant *Arabidopsis* mutants that exhibit altered patterns of aluminum accumulation and organic acid release from roots. **Plant Physiology**, v.117, p.9-18, 1998.
- LARSEN, P. B.; TAI, C.; KOCHIAN, L. V.; HOWELL, S. H. *Arabidopsis* mutants with increased sensitivity to aluminum. **Plant Physiology**, v.110, p.743-751, 1996.
- LIMA, G. P. P. Efeito do cálcio sobre o teor de poliaminas, peroxidase e nitrato redutase em calos de arroz (*Oryza sativa* L. cv IAC 4440). Botucatu, 1994, 84p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".
- LINDBERG, S. Aluminum interacts with K^+ (^{86}Rb) and $^{45}Ca^{2+}$ fluxes in three cultivars of sugar beet (*Beta vulgaris*). **Physiologia Plantarum**, v.79, p.275-282, 1990.
- MAGALHÃES, A. C. N. Análise quantitativa do crescimento. In: FERRI, M. G. **Fisiologia Vegetal 1**. São Paulo, EPU: Ed. da Universidade de São Paulo, 1979, Cap. 8, p.331-350.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do Estado Nutricional das Plantas** princípios e aplicações. 2. ed., Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319 p.
- MALAVOLTA, E. **Fertilizantes e seu Impacto Ambiental: Micronutrientes e Metais Pesados, Mitos, Mistificação e Fatos**. São Paulo: Produ Química, 1994. 153p.
- MATSUMOTO, H.; HIRASAWA, F.; MORIMURA, S.; TAKAHASHI, E. Localization of aluminum in tea leaves. **Plant Cell Physiol**, v.17, 627-631, 1976.

- MATTIGOD, S. V.; SPOSITO, G. Chemical modeling of trace metal equilibria in contaminated soil solutions using the computer program Geochem. **American Chemical Society**, v.93, p. 837-856, 1979.
- McLACHLAN, K.D. Comparative phosphorus responses in plants to a range of available phosphorus situations. **Journal of Agriculture Research**, v.27, p. 323-341, 1976.
- MENCK, A.L.M. Crescimento e atividade da fosfatase ácida de plântulas de progênes de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden em diferentes doses de fósforo in vitro. Piracicaba, 1996. 100p. Dissertação (M.S.) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- MINOCHA, R.; SHORTLE, W. C.; LAWRENCE, G. B.; DAVID, M. B.; MINOCHA, S. C. Relationships among foliar chemistry, foliar polyamines, and soil chemistry in red spruce trees growing across the northeastern United States. **Plant and Soil**, v.191, p.109-122, 1997.
- MINOCHA, R.; SHORTLE, W. C.; COUGHLIN, D. J. Jr.; MINOCHA, S. C. Effects of aluminium on growth, polyamine metabolism, and inorganic ions in suspension cultures of red spruce (*Picea rubens*). **Canadian Journal of Forest Research**, v.26, n.4, p.550-559, 1996.
- MINOCHA, R.; MINOCHA, S. C.; LONG, S. L.; SHORTLE W, C. Effects of aluminium on DNA syntesis, cellular polyamines, polyamine biosynthetic enzymes and inorganic ions in cell suspension cultures of a woody plant, *Catharanthus roseus*. **Physiologia Plantarum** v.85, p.417-424, 1992.
- MULLETTE, K. J. Stimulation of growth in *Eucalyptus* due to aluminum. **Plant Soil**, v.42, p.459-499, 1975.

OUYANG, Q.; PENG, H. *Eucalyptus*. In: CHEN, Z.; EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; SONDAHL, M. R. **Handbook of plant cell culture. Vol. 6 – Perennial crops**. New York: McGraw-Hill, 1990. p.199-215.

PALOMAKI, V.; HOLAPAINEN, J. K.; HOLAPAINEN, T. Effects of drought and waterlogging on ultrastructure of Scots pine and Norway spruce needles. *Trees: structure and function*, v.9, p.98-105, 1995.

POPOVIC, R. K.; KYLE, D. J.; COHEN, A. S.; ZALIK, S. Stabilization of thylakoid membranes by spermine during stress-induced senescence of barley leaf discs. **Plant Physiol.** v.64, p.721-726, 1979.

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

RICHARDS, F. J.; COLEMAN, R. G. Occurrence of putrescine in potassium deficient barley. **Nature**, v.170, n.4324, p.460, 1952.

ROBERTS, D. R.; WALKER, M. A.; THOMPSON, J. E.; DUMBROFF, E. B. The effects on inhibition of polyamine and ethylene biosynthesis on senescence, ethylene production and polyamine levels in cut carnations. **Plant Cell Physiology**, v.25, p.315-322, 1983.

ROY, A K.; SHARMA, A.; TALUKDER, G. Some aspects of aluminum toxicity in plants. **The Botanical Review**, v.54, n.2, p.145-178, 1988.

RYAN, P. R.; DITOMASO, J. M.; KOCHIAN, L. V. Aluminium toxicity in roots: an investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. **Journal of Experimental Botany**, v.44, n.259, p.437-46, 1993.

- SARRUGE, J. R.; HAAG, H. P. **Análises químicas em plantas**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 1974. 56p.
- SENA, J. O. A.; CASTRO, P. R. C. C. **Poliaminas: aspectos fisiológicos e importância para as plantas**. Apontamentos, n.46. Folheto, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 1996, 41p.
- SHORTLE, W. C.; SMITH, K. T. Aluminum-induced calcium deficiency syndrome in declining red spruce. **Science**, v.240, p.1017-1018, 1988.
- SLOCUM, R. D.; KAUR-SAWHNEY, R.; GALSTON, A. W. The physiology and biochemistry of polyamines in plants. **Arch. Biochem. Biophys.** V.235, p.283-303, 1984.
- SILVA, A. A. Toxicidade de alumínio em trinta genótipos de *Panicum maximum* Jacq. Cultivados em solução nutritiva. Piracicaba, 1997. 146p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- SILVEIRA, R. L. V. A. Efeito do potássio no crescimento, nas concentrações dos nutrientes nas características da madeira juvenil de progênies de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden cultivadas em solução nutritiva. Piracicaba, 2000. 169p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- SMITH, T. A. Polyamines in Plants. In: GALSTON, A. W.; SMITH, T. A. **Polyamines in Plants**. The Netherlands: Martinus Nijhoff/ Dr W. Junk Publishers, Dordrecht, 1985. Introductory Chapter.

- SMITH, T. A. Putrescine and inorganic and ions. **Recent Advances Phytochemistry**, v.18, p.7-54, 1984.
- SOUZA, G. M.; GONÇALVES, A. N.; NETO, N. B. M. Crescimento *in vitro* de progênies de *Eucalyptus camaldulensis* Dehn sob condições de deficiência hídrica. **Scientia Agrícola**, v.56, n.3, p.557-562, 1999a.
- SOUZA, G. M. GONÇALVES, A. N. ALMEIDA, M. Water defeicit in relation to leaf and stem anatomy of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. Shoots cultivated *in vitro*. **Scientia Agrícola**, v.56, n.3, p.723-731, 1999b.
- TABOR, C. W. ; TABOR, H. Polyamines. **Ann. Rev. Biochem.** v.53, p.749-790, 1984.
- TAYLOR, G. H. The physiology of aluminum tolerance in higher plants. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 19, p. 1179-1194, 1988.
- TIBURCIO, A. F.; ALTABELLA, T.; BORRELL, A.; MASGRAU,C. Polyamine metabolism and its regulation. **Physiologia Plantarum**, v.100, p.664-674, 1997.
- TIBURCIO, A. F.; KAUR-SAWHNEY, R. ; GALSTON, A. W. Polyamine Metabolism. In: MIFLIN, B. J.; LEA, P. J. **The Biochemistry of Plants**. New York: Academic Press., p.283-325, 1990.
- TICE, K. R.; PARKER, D. R.; DEMASON, D. A. Operationally defined apoplastic and symplastic aluminum fractions in root tips of aluminum-intoxicated wheat. **Plant Physiology**, v.100, p.309-18, 1992.
- TREWARAS, A. A control of protein turnover rates in *Lemna minor*. **Pl. Physiol.**, v.49, p.47-51, 1972.

- TREWAVAS, A. The turnover of nucleic acids in *Lemna minor*. **Pl. Physiol.**, v.45, p.742-751, 1970.
- TRULL, M.C.; GUILTINAN, M.J.; LYNCH, J.P.; DEIKMAN, J. The responses of wild type and ABA mutant *Arabidopsis thaliana* plants to phosphorus starvation. **Plant Cell and Environment**, v.20:, p.85-92, 1997.
- WARRAG, E. I.; LESNEY, M. S.; ROCKWOOD, D. L. Micropropagation of field tested superior *Eucalyptus grandis* hybrids. **New Forests**, v.4, p.67-79, 1990.
- WATSON, M. B.; MALMBERG, R. L. Regulation of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh arginine decarboxylase by potassium deficiency stress. **Plant Physio**, v.111, p.1077-1083, 1996.
- WATT, M. P.; BLAKEWAY, C. F.; CRESWELL, C. F.; HERMAN, B. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis*. **South African Forest Journal**, v.157, p.59-65, 1991.
- WEBSTER, G. Protein synthesis. **Annual. Review of Plant Physiology**, v.42, p.113-132, 1961.
- WILLIAMS-ASHMAN, H. G. Polyamines and Steroid Sex Hormone Action. In: BACHRACH, U.; HEIMER, Y. M. **The Physiology of Polyamines**. New York: CRC Press, 1989. Cap.1, p.4-22.
- ZAINI, Z.; MERCADO, B.T. Phosphorus nutrition and phosphatase activity of young rice plants grown in culture solution. I-Level of phosphorus and phosphatase activity of the roots. **Phillipine Agriculturist**, v.68, p.211-216, 1985a.

- ZAINI, Z.; MERCADO, B.T. Phosphorus nutrition and phosphatase activity of young rice plants grown in culture solution. II- Phosphorus Aluminium interaction and phosphatase activity of the roots. **Phillipine Agriculturist**, v.68, p. 217-224, 1985b.
- ZAGDANSKA, B.; KOZDOJ, J. Water stress induced changes in morphology and anatomy of flag leaf of spring wheat. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, v.63, n.1, p.61-66, 1944.
- ZAIDAN, H. A.; BROETTO, F.; OLIVEIRA, E.; GALLO, L. A.; CROCOMO, O. T. Influence of potassium and the nitrate/ammonium ratio on the putrescine and spermidine contents in banana vitroplants. **Journal of Plant Nutrition**, v.22, n.7, p.1123-1140, 1999.
- ZHENG, S. J.; MA, J. F.; MATSUMOTO, H. High aluminum resistance in Buckwheat. **Plant Physiology**, v.117, p.745-51, 1998.

Anexo 1 Distribuição primária dos metais e ligantes do meio de cultura Gonçalves (1980), através do programa Geochem

Meio de Cultura Gonçalves (1980)					
		Controle	Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3
Metais		-----%-----			
Ca ²⁺	livre	62,8	63,9	64,7	65,8
	com SO ₄ ²⁻	8,3	8,3	8,2	7,6
	com PO ₄ ³⁻	6,9	5,5	4,4	3,1
	com Cl ⁻	0	0,2	0,4	0,8
	com EDTA ³⁻	0,2	0	0	0
	com NO ₃ ⁻	21,8	22,1	22,3	22,7
Mg ²⁺	livre	77,5	79,5	80,6	82,2
	com SO ₄ ²⁻	8,1	8,2	8,1	7,5
	com Cl ⁻	0	0,2	0,4	0,8
	com PO ₄ ³⁻	9,1	6,8	5,5	3,9
	com NO ₃ ⁻	5,2	5,4	5,4	5,5
K ⁺	livre	90,4	90,6	90,6	90,7
	com SO ₄ ²⁻	2,3	2,3	2,2	2,1
	com Cl ⁻	0	0	0,1	0,2
	com PO ₄ ³⁻	0,6	0,4	0,3	0,2
	com NO ₃ ⁻	6,7	6,7	6,7	6,7
Na ⁺	livre	94,0	94,2	94,2	94,2
	com SO ₄ ²⁻	2,7	2,6	2,6	2,4
	com Cl ⁻	0	0,1	0,2	0,4
	com PO ₄ ³⁻	0,5	0,4	0,3	0,2
	com NO ₃ ⁻	2,8	2,8	2,8	2,8
Fe ²⁺	livre	6,8	38,6	43,6	51,0
	com SO ₄ ²⁻	0,7	4,0	4,4	4,7
	com Cl ⁻	0	0	0	0,2
	com PO ₄ ³⁻	10,9	52,3	46,8	38,6
	com EDTA ⁴⁻	80,9	1,0	0,5	0,3
	com NO ₃ ⁻	0,7	4,0	4,6	5,3
Mn ²⁺	livre	16,3	74,3	75,7	77,4
	com SO ₄ ²⁻	2,1	9,6	9,6	8,9
	com Cl ⁻	0	0	0	0,2
	com PO ₄ ³⁻	2,8	5,2	4,1	3,0
	com EDTA ⁴⁻	76,6	0,8	0,4	0,2
	com NO ₃ ⁻	2,2	10,0	10,1	10,3
Cu ²⁺	com EDTA	100,0	100,0	100,0	100,0
Zn ²⁺	com EDTA	100,0	100,0	100,0	100,0
Co ²⁺	com EDTA	99,9	67,3	49,4	32,7
	livre	0	24,2	38,0	51,9
	com SO ₄ ²⁻	0	3,9	6,0	7,5
	com PO ₄ ³⁻	0	2,1	2,6	2,5
	com NO ₃ ⁻	0	2,5	4,0	5,4

Continuação do Anexo 1

Meio de Cultura Gonçalves (1980)					
		Controle	Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3
Metais		-----%-----			
Al ³⁺	livre	0	7,3	14,5	24,5
	com SO ₄ ²⁻	0	2,4	4,7	7,2
	com Cl ⁻	0	0	0,2	0,8
	com PO ₄ ²⁻	0	54,1	62,2	58,0
	EDTA	0	35,7	18,1	9,1
	B(OH) ₄ ⁻	0	0,2	0,2	0,2
SO ₄ ²⁻	livre	65,9	64,7	63,3	60,3
	com Ca	7,2	7,2	7,1	6,6
	com Mg	7,2	7,3	7,2	6,7
	com K	19,1	18,8	18,3	17,5
	com Na	0,50	0,5	0,5	0,4
	com Fe ²⁺	0	0,3	0,4	0,4
	com Al	0	0,5	2,1	6,3
	com H ⁺	0	0,6	1,1	1,6
Cl ⁻	livre	95,8	95,7	95,5	95,0
	com Ca	0,7	0,7	0,7	0,7
	com Mg	0,7	0,8	0,8	0,8
	com K	2,7	2,7	2,7	2,7
	com Al	0	0	0,2	0,8
I ⁻	livre	100,0	100,0	100,0	100,0
NH ₄ ³⁻	com H ⁺	100,0	100,0	100,0	100,0
PO ₄ ³⁻	com Ca	5,4	4,3	3,5	2,5
	com Mg ²⁺	7,4	5,5	4,4	3,2
	com K ²⁺	5,2	3,8	3,1	2,2
	com Fe ²⁺	0,9	4,2	3,7	3,1
	com Al	0	10,8	24,8	46,1
	com H ⁺	80,9	71,3	60,4	42,9
EDTA ₄ ⁻	com Ca	1,8	0	0	0
	com Fe ²⁺	79,0	1,0	0,5	0,3
	com Mn ²⁺	7,7	0	0	0
	com Cu ²⁺	0,1	0,1	0,1	0,1
	com Zn ²⁺	10,2	10,2	10,2	10,2
	com Co ²⁺	1,1	0,7	0,5	0,4
	com Al	0	87,7	88,5	88,9
	com H ⁺	0	0	0	0,1

Continuação do Anexo 1

Meio de Cultura Gonçalves (1980)					
		Controle	Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3
Metais		-----%-----			
B(OH) ₄ ⁻	com H ⁺	100,0	99,5	99,0	97,9
	com Al	0	0,5	1,0	2,1
MoO ₄ ²⁻	livre	2,6	2,4	2,3	2,3
	com Ca ²⁺	88,5	84,5	81,6	77,8
	com Mg ²⁺	8,9	8,5	8,3	7,9
	com H ⁺	0,1	4,6	7,8	12,1
NO ₃ ⁻	livre	65,3	95,3	95,3	95,2
	com Ca ²⁺	1,1	1,1	1,1	1,1
	com Mg ²⁺	0,2	0,2	0,2	0,3
	com K ⁺	3,4	3,4	3,4	3,4

Anexo 2 Análises dos teores de nutrientes no material vegetal

Dose	Dias	N(g.kg ⁻¹)	P(g.kg ⁻¹)	K(g.kg ⁻¹)	Ca(g.kg ⁻¹)	Mg(g.kg ⁻¹)	S(g.kg ⁻¹)	B(mg.kg ⁻¹)	Cu(mg.kg ⁻¹)	Fe(mg.kg ⁻¹)	Mn(mg.kg ⁻¹)	Zn(mg.kg ⁻¹)	Na(mg.kg ⁻¹)	Al(mg.kg ⁻¹)
0	4	45,64	3,90	35,04	2,14	1,06	2,52	38,16	4,00	243,00	38,00	72,00	1380,00	67,34
0	8	43,26	4,53	65,80	2,70	1,64	2,37	77,44	3,00	258,00	46,00	78,00	1633,00	52,06
0	12	38,08	4,53	51,38	2,68	1,84	2,08	51,25	4,00	328,00	43,00	71,00	1518,00	18,94
0	16	34,58	4,16	62,02	2,64	1,74	2,41	59,11	3,00	515,00	46,00	72,00	1656,00	29,13
0	20	31,50	3,84	74,06	2,48	1,72	2,37	56,49	3,00	495,00	46,00	70,00	1679,00	16,40
0	24	31,64	3,87	38,24	2,42	1,70	1,92	55,18	2,00	264,00	44,00	72,00	1679,00	6,21
0	28	30,94	3,72	52,36	2,64	1,60	2,61	52,56	2,00	293,00	44,00	70,00	1702,00	16,39
6,75	4	42,28	3,94	33,20	1,84	1,16	2,65	35,54	3,00	359,00	31,00	88,00	1357,00	204,90
6,75	8	38,36	4,03	35,80	2,16	1,72	2,17	51,25	3,00	294,00	39,00	92,00	1357,00	204,90
6,75	12	33,18	3,46	36,78	2,36	1,60	2,43	51,25	3,00	266,00	34,00	71,00	1403,00	169,23
6,75	16	29,26	3,05	33,50	2,40	1,58	2,56	56,49	3,00	333,00	40,00	74,00	1610,00	171,78
6,75	20	31,08	2,87	35,44	2,28	1,64	2,47	60,42	2,00	223,00	35,00	67,00	1587,00	164,14
6,75	24	29,40	2,93	35,36	2,22	1,62	2,52	53,87	2,00	241,00	36,00	72,00	1449,00	176,87
6,75	28	30,10	2,93	36,32	2,50	1,74	2,28	40,78	2,00	252,00	38,00	70,00	1495,00	174,33
13,5	4	38,64	4,03	31,38	1,78	1,10	2,43	38,16	3,00	323,00	30,00	83,00	1357,00	604,82
13,5	8	39,90	3,72	37,84	2,14	1,68	2,23	57,80	3,00	285,00	37,00	89,00	1426,00	558,97
13,5	12	35,56	3,40	37,04	2,10	1,54	1,95	52,56	2,00	342,00	43,00	78,00	1334,00	508,02
13,5	16	31,36	2,68	33,48	2,14	1,60	2,50	49,94	3,00	254,00	40,00	70,00	1357,00	357,73
13,5	20	28,14	2,24	32,26	2,26	1,48	2,04	46,01	2,00	253,00	35,00	63,00	1334,00	324,62
13,5	24	28,70	2,30	32,02	2,32	1,60	2,28	51,25	2,00	218,00	42,00	62,00	1334,00	329,71
13,5	28	25,48	2,27	30,86	2,38	1,54	2,06	42,09	3,00	221,00	36,00	63,00	1288,00	329,71
27,0	4	36,12	4,13	28,64	1,60	0,92	2,26	43,40	3,00	273,00	34,00	76,00	1334,00	1435,24
27,0	8	41,72	3,65	33,24	1,80	1,18	2,15	87,91	3,00	304,00	35,00	85,00	1403,00	1384,29
27,0	12	35,84	2,93	34,76	2,18	1,28	2,27	59,11	3,00	245,00	42,00	82,00	1403,00	1193,25
27,0	16	35,98	2,30	34,48	1,94	1,36	2,26	52,56	3,00	216,00	39,00	83,00	1495,00	976,72
27,0	20	29,96	2,05	35,02	2,12	1,52	2,21	44,70	3,00	191,00	42,00	74,00	1495,00	913,04
27,0	24	31,22	2,36	37,42	2,18	1,50	2,30	51,25	3,00	221,00	45,00	70,00	1587,00	938,51
27,0	28	32,20	2,27	34,20	2,30	1,50	2,32	42,09	3,00	204,00	46,00	73,00	1495,00	913,04

Anexo 3 Teste de Tukey

Tabela 4 - Comparação de médias (*) do peso de matéria seca expressa em grama em brotações de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, submetidas aos tratamentos com alumínio, em diferentes épocas de desenvolvimento.

Dose Al	Período de Coleta (dias)						
	4	8	12	16	20	24	28
0	0,0357 ^{aB}	0,0595 ^{aB}	0,1717 ^{aA}	0,1975 ^{aA}	0,2267 ^{aA}	0,2130 ^{aA}	0,2215 ^{bA}
6,75	0,0365 ^{aC}	0,0822 ^{aC}	0,1722 ^{aB}	0,2625 ^{aA}	0,2440 ^{aAB}	0,2245 ^{aAB}	0,2462 ^{abAB}
13,5	0,0385 ^{aC}	0,0732 ^{aC}	0,1765 ^{aB}	0,2502 ^{aAB}	0,2905 ^{aA}	0,2745 ^{aA}	0,3025 ^{aA}
27,0	0,0372 ^{aC}	0,0640 ^{aC}	0,1790 ^{aB}	0,1937 ^{aAB}	0,2517 ^{aAB}	0,2720 ^{aA}	0,2604 ^{abAB}

(*) Médias seguidas da mesma letra (minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Tabela 5 - Comparação de médias (*) da atividade da ACP total presente nas brotações de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* submetidas aos tratamentos com alumínio, em diferentes épocas de desenvolvimento.

Dose Al	Período de Coleta (dias)						
	4	8	12	16	20	24	28
0	5,28 ^{aC}	4,29 ^{bC}	5,08 ^{aC}	17,00 ^{bB}	29,82 ^{aA}	36,32 ^{bA}	18,63 ^{aB}
6,75	6,96 ^{aD}	7,05 ^{abCD}	4,84 ^{aD}	15,38 ^{bC}	29,42 ^{aAB}	35,90 ^{bA}	27,32 ^{aB}
13,5	8,24 ^{aCD}	9,10 ^{abCD}	4,21 ^{aD}	41,80 ^{aA}	20,99 ^{aBC}	36,49 ^{bAB}	25,20 ^{aB}
27,0	5,71 ^{aC}	11,45 ^{aBC}	5,28 ^{aC}	58,60 ^{aA}	31,99 ^{aB}	71,97 ^{aA}	24,14 ^{aBC}

(*) Médias seguidas da mesma letra (minúscula na vertical e maiúscula na horizontal) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Tabela 6 - Comparação de médias (*) do teor de putrescina expressa em μ moles Put/g matéria fresca em brotações de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* submetidas aos tratamentos com alumínio, em diferentes épocas de desenvolvimento.

Dose Al	Período de Coleta (dias)						
	4	8	12	16	20	24	28
0	-	0,00131 ^{bC}	0,00029 ^{aC}	0,00146 ^{aBC}	0,00123 ^{aBC}	0,00396 ^{aA}	0,00262 ^{bB}
6,75	-	0,00110 ^{bC}	0,00008 ^{aC}	0,00148 ^{aBC}	0,00170 ^{aBC}	0,00476 ^{aA}	0,00342 ^{abAB}
13,5	0,00090 ^{aB}	0,00152 ^{bB}	0,00122 ^{aB}	0,00066 ^{aB}	0,00083 ^{bB}	0,00206 ^{aB}	0,00464 ^{aA}
27,0	0,00195 ^{aAB}	0,00253 ^{aAB}	0,00081 ^{aB}	0,00114 ^{aB}	0,00059 ^{bB}	0,00258 ^{aAB}	0,00401 ^{abA}

(*) Médias seguidas da mesma letra (minúscula na vertical e maiúscula na horizontal) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Continuação do Anexo 3

Tabela 7 - Comparação de médias (*) do teor de espermidina expressa em μ moles Spd/g matéria fresca em brotações de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* submetidos aos tratamentos com alumínio, em diferentes épocas de desenvolvimento.

Dose Al	Período de Coleta (dias)						
	4	8	12	16	20	24	28
0	-	0,00758 ^{abA}	0,00216 ^{abC}	0,0052 ^{aAB}	0,00332 ^{aBC}	0,00191 ^{aBC}	0,00453 ^{aAB}
6,75	-	0,00814 ^{aA}	0,00147 ^{abC}	0,00205 ^{bC}	0,00247 ^{abC}	0,00328 ^{aB}	0,00396 ^{aB}
13,5	0,0076 ^{aA}	0,00401 ^{bC}	0,00189 ^{aD}	0,00095 ^{bD}	0,00062 ^{cD}	0,00162 ^{aD}	0,00488 ^{aB}
27,0	0,00682 ^{aA}	0,00473 ^{abAB}	0,00058 ^{aE}	0,00125 ^{bCDE}	0,00105 ^{bcDE}	0,0034 ^{aBCD}	0,00358 ^{aBC}

(*) Médias seguidas da mesma letra (minúscula na vertical e maiúscula na horizontal) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Tabela 8 - Comparação de médias (*) do teor de espermina expressa em μ moles Spm/g matéria fresca em brotações de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* submetidos aos tratamentos com alumínio, em diferentes épocas de desenvolvimento.

Dose	Período de Coleta (dias)						
	4	8	12	16	20	24	28
0	0,00148 ^{bAB}	0,00348 ^{aB}	0,00622 ^{abA}	0,00187 ^{aB}	0,00101 ^{bB}	0,00077 ^{bB}	0,00472 ^{aB}
6,75	0,00288 ^{bB}	0,00322 ^{aB}	0,00248 ^{aA}	0,00110 ^{aB}	0,00093 ^{bB}	0,00057 ^{bB}	0,00512 ^{aB}
13,5	0,00389 ^{bB}	0,00197 ^{aB}	0,00915 ^{abA}	0,00257 ^{aB}	0,00337 ^{aB}	0,00479 ^{aB}	0,00362 ^{aB}
27,0	0,00739 ^{aA}	0,00178 ^{aB}	0,00334 ^{bB}	0,00420 ^{aB}	0,0044 ^{aAB}	0,00265 ^{aB}	0,00420 ^{aB}

(*) Médias seguidas da mesma letra (minúscula na vertical e maiúscula na horizontal) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Tabela 9 - Comparação de médias (*) do teor de proteínas expressa em mg de proteína/g de matéria fresca em brotações de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* submetidas aos tratamentos com alumínio, em diferentes épocas de desenvolvimento.

Período de Coleta (dias)							
Dose Al	4	8	12	16	20	24	28
0	2,5539 ^{cCD}	5,1029 ^{aAB}	3,0784 ^{bC}	4,5294 ^{aAB}	1,5686 ^{aD}	4,4608 ^{aB}	5,6765 ^{aA}
6,75	4,2794 ^{aA}	4,4559 ^{abA}	3,5735 ^{bAB}	3,1225 ^{bAB}	2,3235 ^{aB}	4,5882 ^{aA}	4,3775 ^{bA}
13,5	4,2059 ^{abAB}	3,5784 ^{bcB}	5,2794 ^{aA}	2,3627 ^{bC}	1,7745 ^{aC}	2,1275 ^{bC}	1,6275 ^{cC}
27,0	3,5049 ^{bA}	2,3824 ^{cAB}	2,9118 ^{bAB}	2,4363 ^{bAB}	1,8039 ^{aB}	3,0752 ^{abAB}	1,8569 ^{cB}

(*) Médias seguidas da mesma letra (minúscula na vertical e maiúscula na horizontal) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)