

NC 55334
Nº 53535

UNIVERSIDADE FEDERAL
RURAL DA AMAZÔNIA
BIBLIOTECA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA
MESTRADO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS

KEROLÉM PRÍCILA SOUSA CARDOSO

COMPORTAMENTO BIOQUÍMICO EM MUDAS DE CASTANHEIRA-DO-BRASIL
(*Bertholletia excelsa* Bonpl.) SUBMETIDAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES
DE ALUMÍNIO



DISSERTAÇÃO
583.76
c.268
EX:01

BELÉM
2018

KEROLÉM PRÍCILA SOUSA CARDOSO

BIBLIOTECA
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

**COMPORTAMENTO BIOQUÍMICO EM MUDAS DE CASTANHEIRA-DO-BRASIL
(*Bertholletia excelsa* Bonpl.) SUBMETIDAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES
DE ALUMÍNIO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Ciências Florestais: área de concentração Ecologia e Ecofisiologia de Árvores, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof^o. Dr. Cândido Ferreira de Oliveira Neto

Coorientadora: Dr^a. Luma Castro de Souza

BELÉM

2018

Universidade Federal Rural da Amazônia
BIBLIOTECA

Nº 97490019 Data 12/03/18

Cardoso, Kerolém Prícila Sousa

Comportamento bioquímico em mudas de castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) submetidas a diferentes concentrações de alumínio / Kerolém Prícila Sousa Cardoso. – Belém, PA, 2018.

55 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais – Ecologia e Ecofisiologia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2018.

Orientador: Cândido Ferreira de Oliveira Neto.

1. Fitotoxidez 2. Metabolismo 3. Solos ácidos 4. Pigmentos fotossintéticos I. Oliveira Neto, Cândido Ferreira de, (orient.) II. Título

CDD: 583.76.

KEROLÉM PRÍCILA SOUSA CARDOSO

**COMPORTAMENTO BIOQUÍMICO EM MUDAS DE CASTANHEIRA-DO-BRASIL
(*Bertholletia excelsa* Bonpl.) SUBMETIDAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES
DE ALUMÍNIO**


Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia como parte das exigências do Curso de Mestrado em Ciências Florestais, área de concentração Ecologia e Ecofisiologia de Árvores, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof^o. Dr. Cândido Ferreira de Oliveira Neto.


Coorientadora: Dr^a. Luma Castro de Souza

Aprovado em 23 de fevereiro de 2018


BANCA EXAMINADORA




Dr. Cândido Ferreira de Oliveira Neto - Orientador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA



Dr. Ricardo Shigueru Okumura - 1^o Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA



Dr^a Joze Melisa Nunes de Freitas - 2^o Examinadora
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA



Dr^a. Cristine Bastos do Amarante - 3^o Examinadora
MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI - MPEG

*Aos meus amados pais, os quais são meu exemplo de vida e meu porto seguro,
a quem devo tudo o que sou e o que conquistei até hoje;
À minha irmã, pelo incentivo e apoio.*

Minha vida é nada sem vocês.

DEDICO E OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde, proteção e incansáveis bênçãos dadas para que esta conquista fosse realizada e a minha Virgem Santa Maria, por interceder às minhas orações.

Aos meus pais, Marcelo Cardoso e Nazaré Cardoso, pelo exemplo de verdadeiros guerreiros, pelo apoio, todo o amor, incentivo e investimento em minha vida pessoal e carreira profissional, amo-os demais!

A minha irmã, Kamily Cardoso, pelo apoio, amor e companheirismo. Mesmo distante sempre irei amá-la!

Ao meu namorado, Rafael Pimentel, pelo amor e carinho dedicados a mim, bem como o apoio, a confiança e a parceria nos meus estudos.

A todos meus familiares, principalmente a minha avó Herminia Miranda (*in memorian*) que não está mais entre nós, no entanto, acreditava sempre no meu potencial.

A Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), pela possibilidade de realizar o curso de Pós-graduação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo apoio através da concessão da bolsa de estudos.

Ao professor/pesquisador, Dr. Cândido Ferreira de Oliveira Neto, pela orientação e exemplo de um profissional competente.

A minha coorientadora, Dr^a Luma Castro de Souza, pela dedicação e ajuda substancial nesta dissertação.

Aos meus professores, desde o ensino fundamental até a pós-graduação, os quais me formaram para o mercado de trabalho e para a vida. Minha eterna gratidão a essa profissão maravilhosa que é ser PROFESSOR.

A amiga, Ana Ecídia, pela realização das análises bioquímicas, o apoio motivacional e a alegria repassada em todos os momentos.

Aos meus queridos seguidores e companheiros do Laboratório de Estudos da Biodiversidade em Plantas Superiores (EBPS), Thays Costa, Jéssica Martins, Liliane Machado, Vitor Resende, Glauco Nogueira, Diana de Sousa, Jéssica Teixeira, Gleyce Lopes, Luciana Sousa, Welligton Barros, Juscelino Palheta e Josi Mescouto pelo incansável apoio físico e moral e a confiança na realização deste trabalho. Meu legado não seria possível sem a ajuda de vocês e, a pesquisa não seria concretizada sem o excelente trabalho em equipe.

A todos os amigos, que direta e indiretamente me ajudaram com palavras amigas, incentivos, abraços... Muito obrigada por todos que torceram e torcem por mim. Obrigada pelas amizades

que pude criar durante todos esses anos! Cada um tem uma participação especial em minha vida.

“O homem não teria alcançado o possível se, repetidas vezes, não tivesse tentado o impossível.”

- Max Weber.

“Ninguém é suficientemente perfeito, que não possa aprender com o outro e, ninguém é totalmente desprovido de valores, que não possa ensinar algo ao seu irmão.”

- São Francisco de Assis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Início da condução do experimento, mudas de <i>B. excelsa</i>	23
Figura 2. Sintomas visuais da toxidez por alumínio em mudas de <i>B. excelsa</i> a partir da terceira aplicação. (A) amarelecimento e necrose de mudas com concentrações de 20 mg L ⁻¹ de alumínio; (B) folhas enroladas em mudas com concentrações de 80 mg L ⁻¹ de alumínio; (C) ápice com má formação nas mudas com concentrações de 40 mg L ⁻¹ de alumínio.....	24
Figura 3. Sintomas visuais da toxidez por alumínio em mudas de <i>B. excelsa</i> a partir da terceira aplicação. (A) raiz da planta controle; (B) raiz de mudas com concentrações de 80 mg L ⁻¹	24
Figura 4. Valores médios de clorofila a (A), clorofila b (B), clorofilas totais (C), carotenoides (D) e antocianinas (E) em mudas de <i>B. excelsa</i> submetidas a diferentes concentrações de alumínio.....	31
Figura 5. Valores médios do vazamento de eletrólitos em raízes de mudas de <i>B. excelsa</i> submetidas a diferentes concentrações de alumínio.....	32
Figura 6. Valores médios do NO ₃ ⁻ e da atividade da redutase do nitrato em folhas (A e B) em mudas de <i>B. excelsa</i> , submetidas a diferentes concentrações de alumínio.....	33
Figura 7. Valores médios de amônio livre (A e B) e proteínas solúveis (C e D) em folhas e raízes de mudas de <i>B. excelsa</i> , submetidas a diferentes concentrações de alumínio.	35
Figura 8. Valores médios de açúcares solúveis totais (A e B) e de sacarose (C e D) em folhas e raízes de mudas de <i>B. excelsa</i> submetidas a diferentes concentrações de alumínio.....	36
Figura 9. Valores médios de açúcares redutores e não redutores em folhas (A e B) em mudas de <i>B. excelsa</i> , submetidas a diferentes concentrações de alumínio.....	37
Figura 10. Valores médios de glicina betaína nas folhas e raízes (A e B) e prolina em folhas (C) em mudas de <i>B. excelsa</i> submetidas a diferentes concentrações de alumínio.	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise físico-química do substrato.....	24
Tabela 2. Análise de variância dos valores médios do vazamento de eletrólitos em folhas de mudas de <i>B. excelsa</i> submetidas a diferentes concentrações de alumínio.....	32
Tabela 3. Análise de variância dos valores médios de nitrato (A) e redutase do nitrato (B) em raízes de mudas de <i>B. excelsa</i> submetidas a diferentes concentrações de alumínio	33
Tabela 4. Análise de variância dos valores médios de N-aminossolúveis em folhas de mudas de <i>B. excelsa</i> submetidas a diferentes concentrações de alumínio.	35
Tabela 5. Análise de variância dos valores médios de açúcares redutores e não redutores em raízes (A e B) de mudas de <i>B. excelsa</i> submetidas a diferentes concentrações de alumínio. ...	38
Tabela 6. Análise de variância dos valores médios de prolina em raízes de mudas de <i>B. excelsa</i> submetidas a diferentes concentrações de alumínio.	39
Tabela 7. Comparação de médias pelo teste de tukey a 5% de significância dos teores de alumínio em cada variável bioquímica de mudas de <i>B. excelsa</i>	55

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
1 CONTEXTUALIZAÇÃO	13
1.1 Revisão da Literatura	14
REFERÊNCIAS	18
2 COMPORTAMENTO BIOQUÍMICO EM MUDAS DE CASTANHEIRA-DO-BRASIL (<i>Bertholletia excelsa</i> Bonpl.) SUBMETIDAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ALUMÍNIO	22
2.1 Introdução	22
2.2 Material e Métodos	23
2.3 Resultados	30
2.3.1 Pigmentos fotossintéticos	30
2.3.2 Vazamento de eletrólitos	31
2.3.3 Teores de NO ₃ ⁻ e atividade da redutase do nitrato	32
2.3.4 Amônio, N-aminossolúveis e proteínas solúveis	34
2.3.5 Açúcares solúveis totais e sacarose	36
2.3.6 Açúcares redutores e não redutores	37
2.3.7 Osmólitos compatíveis	38
2.4 Discussão	40
2.5 Conclusão	46
REFERÊNCIAS	47
ANEXOS	55

RESUMO

A maioria dos solos brasileiros possuem características ácidas, e um dos elementos presentes nesse solo é o alumínio, que é tóxico às plantas, afetando o metabolismo de diversas espécies. Diante dos problemas limitantes da fitotoxidez do alumínio aos vegetais, objetivou-se neste estudo investigar o comportamento bioquímico em mudas de *Bertholletia excelsa* Bonpl. submetidas a diferentes concentrações de alumínio. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos (0 mg L⁻¹, 20 mg L⁻¹, 40 mg L⁻¹, 60 mg L⁻¹ e 80 mg L⁻¹ de Al³⁺) e sete repetições. As variáveis analisadas foram pigmentos fotossintéticos, redutase do nitrato, vazamento de eletrólitos, nitrato, amônio livre, N-aminossolúveis, proteínas solúveis, açúcares solúveis totais, açúcares redutores e não redutores, sacarose, prolina e glicina betaína. De acordo com os resultados obtidos os pigmentos fotossintéticos, nitrato, redutase do nitrato, amônio, N-aminossolúveis, açúcares solúveis totais, açúcares redutores e não redutores e sacarose reduziram com a maior concentração de alumínio no meio. O vazamento de eletrólitos demonstrou aumento assim como as proteínas solúveis, e os osmorreguladores, prolina e glicina betaína, apresentaram acréscimos sugerindo a atenuação do estresse causado pela toxidez deste metal. Apesar da influência negativa nos processos bioquímicos, a castanheira-do-brasil, apresentou mecanismos de tolerância à toxidez de alumínio, mantendo as atividades bioquímicas para o desenvolvimento vegetativo.

Palavras-chave: Fitotoxidez. Solos ácidos. Metabolismo. Pigmentos fotossintéticos.

ABSTRACT

Most Brazilian soils have acidic characteristics, and one of the elements present in this soil is aluminum, which is toxic to plants, affecting the metabolism of several species. Faced with the problems limiting the phytotoxicity of aluminum to vegetables, this study aimed to investigate the biochemical behavior in seedlings of *Bertholletia excelsa* Bonpl. subjected to different concentrations of aluminum. The experiment was conducted in a greenhouse using a completely randomized design with five treatments (0 mg L⁻¹, 20 mg L⁻¹, 40 mg L⁻¹, 60 mg L⁻¹ and 80 mg L⁻¹ of Al³⁺) and seven replicates. The analyzed variables were photosynthetic pigments, nitrate reductase, electrolyte leakage, nitrate, free ammonium, N-aminosoluble, soluble proteins, total soluble sugars, reducing and non-reducing sugars, sucrose, proline and glycine betaine. According to the results, photosynthetic pigments, nitrate, nitrate reductase, ammonium, N-aminosoluble, total soluble sugars, reducing and non-reducing sugars and sucrose reduced with the highest concentration of aluminum in the medium. Electrolyte leakage showed increase as well as soluble proteins, and the osmoregulators, proline and glycine betaine, showed increases suggesting the attenuation of the stress caused by the toxicity of this metal. Despite the negative influence on the biochemical processes, brazilian chestnut, presented mechanisms of tolerance to aluminum toxicity, maintaining the biochemical activities for the vegetative development.

Keywords: Phytotoxicity. Acid soils. Metabolism. Photosynthetic pigments.

1 CONTEXTUALIZAÇÃO

A ocorrência de fitotoxicidade por alumínio (Al) em solos ácidos é conhecida e discutida como uma das principais razões à limitação da produtividade de biomassa (LEUSCHNER et al., 2007; ALLEONI et al., 2010), ou seja, um importante fator de redução de rendimento das culturas, que se torna solúvel em sua forma iônica trivalente (Al^{3+}) causando efeitos fitotóxicos, mesmo em nível micromolar (HORST et al., 2010).

Este elemento metálico é um dos mais abundantes na crosta terrestre, atingindo cerca de 8% da superfície da Terra (KOCHIAN et al., 2004). No Brasil, 60% dos solos são ácidos e têm uma concentração elevada de Al que pode ser tóxica para o crescimento radicular, em geral, o potencial hidrogeniônico (pH) da maioria dos solos brasileiros varia entre 3,7 e 5,5, e o Al^{3+} é o cátion predominante em mais de um terço dos solos com ocorrência de pH inferior a 5,6 (ABREU JR. et al., 2003).

Na região Amazônica, grandes extensões de áreas são cobertas por solos ácidos apresentando alta saturação por alumínio, disponibilizando, assim, o Al fitotóxico na solução dos solos (FURLAN, 2014). Naturalmente ocorre o processo de acidificação do solo em que o alumínio orgânico não é tóxico, porém na sua forma monomérica inorgânica torna-se tóxico, principalmente por meio da intensificação de práticas agrícolas, pela mineração e por práticas de descartes de resíduos (VANGUELOVA et al., 2007).

O efeito deste elemento na forma tóxica causa diversos prejuízos aos vegetais, inibindo o crescimento das raízes e danificando células no ápice da raiz, levando a comprometimentos na absorção de água e nutrientes (MACÊDO et al., 2009). Além disso, o alumínio tóxico causa prejuízos à parte aérea das plantas pela consequente redução da atividade fotossintética, a qual pode estar relacionada tanto com fatores estomáticos como não estomáticos (PEIXOTO et al., 2002).

Concomitantemente, a compreensão das respostas bioquímicas é fundamental à distinção e caracterização de espécies consideradas tolerantes ao excesso de elementos fitotóxicos. Assim, a *Bertholletia excelsa* Bonpl., também conhecida como castanheira-do-brasil, castanheira-da-amazônia e castanheira-do-pará, nativa da região Amazônica, por ter grande importância nutricional e madeira torna-se fundamental em pesquisas envolvendo seu comportamento em solos ácidos e com alta saturação por alumínio (YANG, 2009).

Portanto, por ser uma espécie em constante desenvolvimento para a pesquisa com poucos aspectos bioquímicos conhecidos em solos ácidos, o presente trabalho tem como objetivo investigar o comportamento bioquímico em mudas de *Bertholletia excelsa* Bonpl.

submetidas a diferentes concentrações de alumínio, buscando responder a seguinte questão: como os componentes bioquímicos em mudas de *B. excelsa* irão reagir aos diferentes níveis de alumínio? Baseado nisso, do ponto de vista científico, serão testadas as seguintes hipóteses: (i) os níveis de fitotoxidez por alumínio não irão influenciar as respostas bioquímicas em mudas de *B. excelsa*; (ii) a toxidez por alumínio no maior nível provocará danos as variáveis bioquímicas em mudas de *B. excelsa*; (iii) as atividades dos pigmentos fotossintéticos irão reduzir com o maior nível de alumínio em mudas de *B. excelsa*; (iv) os osmorreguladores atuarão em defesa contra a fitotoxidez causada pelo alumínio na mudas de *B. excelsa*.

1.1 Revisão da Literatura

1.1.1 Alumínio no solo

A toxidez causada pela presença de alumínio no solo tem-se mostrado um grande fator limitante ao crescimento de importantes culturas em grande parte do território brasileiro, sendo associada a regiões com predominância de latossolos e argissolos, que devido à baixa troca catiônica promove uma alta saturação de alumínio (FERREIRA et al., 2006; CUNHA et al., 2014).

No decorrer do processo de formação dos solos de regiões que apresentam altas precipitações pluviométricas, os cátions sódio (Na^+), potássio (K^+), cálcio (Ca^{2+}) e magnésio (Mg^{2+}) e os ânions cloreto (Cl^-), sulfato (SO_4^{2-}) e nitrato (NO_3^-) vão sendo lixiviados e, quando a lixiviação de cátions supera a liberação por intemperização, ocorre a redução do pH, restando, assim, cátions preferenciais de maior valência como o Al^{3+} nos sítios de troca da argila e da matéria orgânica, fazendo com que o alumínio seja um dos principais componentes da acidez potencial dos solos (TEDESCO; BISSANI 2004).

O alumínio tóxico presente na solução do solo e, principalmente, os alumínio que se encontram hidratados, possuem propriedades químicas capazes, de quando em contato com a água, fazerem com que esta seja decomposta, liberando íons hidrogênio, que podem reduzir o pH do solo, mediante reação de hidrólise (LUCHESE et al., 2001).

Foy (1974) destaca fatores como pH, disponibilidade de matéria orgânica e o perfil mineral da argila que compõe o ambiente como principais agentes influenciadores a distribuição e solubilidade do alumínio no solo. Em relação à extensão territorial amazônica, observa-se uma grande parte da região composta por solos ácidos, que por sua vez reflete no

potencial agricultável apresentando baixa capacidade de troca de cátions (CTC) e por consequência alto valor de alumínio disponível no solo (MADARI et al., 2009).

Para tanto, o Al pode ser encontrado na forma tóxica para as plantas ($\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$), sendo também representado por Al^{3+} ; na forma $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$ quando o pH se eleva, sofrendo hidrólise e formando complexos mononucleares; na forma $\text{Al}(\text{OH})^3$ - gibsita - quando o pH neutro predomina, que é praticamente insolúvel no citoplasma da célula (pH 7,4), e o íon aluminato $\text{Al}(\text{OH})^4$, a qual é a forma dominante (ROSSIELLO; JACOB NETO, 2006).

1.1.2 Efeito do alumínio nas plantas

O primeiro sintoma de toxidez causado por Al^{3+} , que acontece inclusive em variedades tidas como tolerantes, porém em menor grau, é a inibição do crescimento e desenvolvimento das raízes (KOCHIAN, 1995). A partir das raízes, vários órgãos da planta são prejudicados, e as membranas do tilacóide e o transporte de elétrons podem ser afetados devido ao prejuízo causado sobre os cloroplastos pela fitoxidade por alumínio, interferindo de forma direta na taxa de assimilação de CO_2 , resultando, em grandes perdas no crescimento e produtividade das culturas (HE et al., 2011).

Um alvo potencial da ação tóxica do alumínio é a membrana plasmática, na qual o Al interage com lipídios e proteínas da membrana modificando a estrutura molecular, aumentando a densidade de empacotamento dos lipídios e, conseqüentemente, a rigidez e a fluidez da membrana (KRTKOVÁ et al., 2012). Devido a isto, ocorre o aumento na permeabilidade das membranas, tornando possível a passagem de não-eletrólitos e de permeadores lipídicos (VERSTRAETEN et al., 2002).

Logo, a negatividade da superfície da membrana plasmática é alterada pelo Al (KINRAIDE, 2006) causando rápida despolarização, a qual está relacionada possivelmente com a inibição da atividade da H^+ -ATPase, impedindo a formação e manutenção do gradiente de prótons ou ao aumento do influxo de H^+ pela membrana plasmática do meio externo para o interior da célula (BOSE et al., 2010).

A assimilação do nitrogênio (N) também pode ser afetada pela toxidade por alumínio (LI et al., 2013), reduzindo a síntese de proteínas e aminoácidos livres, com conseqüentes alterações na quantidade de açúcares e na absorção de íons minerais (ARAGÃO et al., 2011). Portanto, a fitotoxidade por alumínio é um fator abiótico que reduz drasticamente o rendimento das culturas, causando perdas econômicas e impactos negativos ao meio ambiente (PROCHNOW, 2004) devido aos íons de alumínio ocuparem posições de troca catiônica, em

superfícies eletronegativas dos colóides, substituindo os cátions removidos pela lixiviação e, potencializando, assim, os níveis tóxicos de alumínio para as plantas (RENGEL; ZHANG, 2003).

1.1.3 Mecanismos de tolerância ao alumínio

Embora tenha sido conhecido há mais de um século que o alumínio diminui o crescimento das raízes das plantas, as razões subjacentes para os seus efeitos fitotóxicos permanecem sensíveis e, os mecanismos de tolerância ao elemento pelas plantas superiores, têm sido classificados em duas categorias: exclusão e tolerância (HORST et al., 2010).

No que diz respeito aos mecanismos de exclusão, observou-se que o Al é impedido de interagir com os sítios metabólicos sensíveis ao ser imobilizado junto às cargas negativas de ácidos carboxílicos constituintes da parede celular ou ao ser precipitado em razão do aumento do pH da rizosfera (YANG et al., 2011). Em relação aos mecanismos de tolerância, embora o Al alcance o simplasma, tem sua ação fitotóxica neutralizada por enzimas (superóxido dismutase, ascorbato peroxidase e catalase) ou ainda, isolada no interior do vacúolo, local onde ocorre a complexação dos cátions tóxicos, como o Al^{3+} (FERNANDES, 2006).

Assim, vários mecanismos de tolerância têm sido sugeridos a fim de explicarem as respostas das plantas a níveis tóxicos de Al (KOCHIAN et al., 2004). Dentre estes, o mecanismo de elevação do pH na rizosfera, que reduz a disponibilidade da forma Al^{3+} , tem alcançado grande importância, especialmente depois do estudo sobre a correlação entre a tolerância ao Al e o influxo de H^+ nas extremidades das raízes (DEGENHARDT et al., 1998).

É importante ressaltar que, apesar dos termos “resistência” e “tolerância” ao Al serem frequentemente usados na literatura como sinônimos, em relação a estresses abióticos, o termo “resistência” se refere a mecanismos que impedem a entrada do Al na planta, enquanto o termo “tolerância” se refere a mecanismos que desintoxicam ou sequestram o Al internamente (DELHAIZE et al., 2007).

1.1.4 Castanheira-do-brasil em solos brasileiros

Os principais solos ácidos brasileiros pertencem a ordem dos Latossolos e Argissolos (CUNHA et al., 2014) e, os solos da região amazônica, com destaque para o Estado do Pará possuem ocorrência dominante de solos distróficos de baixa saturação por bases e alta toxicidade por alumínio, sendo ácidos, bem drenados e profundos, nos quais a complexa

formação da floresta tropical favorece a capacidade de espécies em subsistir nestes tipos de solos (LIMA et al., 2003).

Assim, a castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa* Bonpl.), única espécie do gênero *Bertholletia* da família Lecythidaceae (FERNANDES et al., 2010), é um dos principais ícones vegetais da Floresta Amazônica, devido sua importância econômica, social e ambiental e por apresentar adaptabilidade nesses solos com alta saturação por alumínio (SCOLES et al., 2016).

A produção da *Bertholletia excelsa* concentra-se em poucos estados do Brasil, o que caracteriza o extrativismo, onde o Acre, Amazonas e Pará detém cerca de 80% da produção, com ocorrência ainda nos estados de Roraima, Mato Grosso, Amapá e Rondônia, totalizando os 20% restantes (SOUZA, 2013). No Estado do Pará, a produção tem se concentrado na região de integração da Calha Norte, com destaques para os municípios de Oriximiná e de Óbidos (KRAG et al., 2015).

Portanto, a compreensão das respostas bioquímicas é fundamental à distinção e caracterização de espécies consideradas tolerantes ao excesso de elementos fitotóxicos. Assim, a *Bertholletia excelsa* Bonpl., por ter grande importância nutricional e madeireira torna-se fundamental em pesquisas envolvendo seu comportamento em solos ácidos e com alta saturação por alumínio (YANG, 2009).

1.2 Objetivos

Objetivo Geral

Investigar o comportamento bioquímico em mudas de *Bertholletia excelsa* Bonpl. submetidas a concentrações de alumínio.

Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da fitotoxicidade por alumínio no metabolismo do nitrogênio em folhas e raízes de mudas de *Bertholletia excelsa*;
- Estudar o metabolismo do carbono e os pigmentos fotossintéticos em mudas de *Bertholletia excelsa* submetidas a diferentes doses de alumínio.

REFERÊNCIAS

ABREU JUNIOR, C. H.; MURAOKA, T.; LAVORANTE, A. Relationship between acidity and chemical properties of brazilian soils. **Scientia Agricola**, v. 60, n. 2, p. 337-343, 2003.

ALLEONI, L. R. F.; CAMBRI, M. A.; CAIRES, E. F.; GARBUIO, F. J. Acidity and aluminum speciation as affected by surface liming in tropical no-till soils. **Soil Science Society of America Journal**, v. 74, n. 3, p. 1010–1017, 2010.

ARAGÃO, R. M.; SILVA, J. S.; LIMA, C. S.; SILVEIRA, J. A. G. Salinidade modula corda. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 2, p. 382-389, 2011.

BARTLEY, G. E.; SCOLNIK, P.A. Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. **Plant Cell**, v.7, n. 7, p.1027- 1038, 1995.

BOSE, J.; BABOURINA, O.; SHABALA, S.; RENGE, Z. Aluminium-induced ion transport in Arabidopsis: the relationship between Al tolerance and root ion flux. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 11, p. 3163–3175, 2010.

CUNHA, G. O. M; ALMEIDA, J. Á.; BARBOZA, B. B. Relação entre o alumínio extraível com kcl e oxalato de amônio e a mineralogia da fração argila, em solos ácidos brasileiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, n. 2, p. 1387-1401, 2014.

DEGENHARDT, J.; LARSEN, P. B.; HOWELL, S. H.; KOCHIAN, L. V. Aluminum resistance in the Arabidopsis mutant alr-104 is caused by an aluminum-induced increase in rhizosphere pH. **Plant Physiology**, v. 117, n. 1, p.19-27, 1998.

DELHAIZE, E.; GRUBER, B. D.; RYAN, P. R. The roles of organic anion permeases in aluminium tolerance and mineral nutrition. **Journal FEBS Lett**, v. 581, n. 12, p. 2255–2262, 2007.

FERNANDES, M. S. **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: SBCS, 2006. 432p.

FERNANDES, D. C.; FREITAS, J. B.; CZEDER, L. P.; NAVES, M. M. V. Nutritional composition and protein value of the baru (*Dipteryx alata* Vog.) almond from the Brazilian Savanna. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 10, p. 1650- 1655, 2010.

FERREIRA, R. P.; MOREIRA, A.; RASSINI, J. B. **Toxidez de alumínio em culturas anuais**. Embrapa Pecuária Sudeste. Documentos, 63. 35 p. 2006.

FOY, C.D. **Effects of aluminum on plant growth**. In: CARSON, E.W. (Ed). The plant root and its environment. Charlottesville, University Press of Virginia, 1974. p. 601- 642.

FURLAN, F. **Tolerância diferencial ao alumínio em plantas do gênero *Brachiaria*: morfologia de raízes, sistema antioxidante e alumínio trocável no apoplasto radicular**. 2014. 107 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de energia nuclear na agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

HE, G.; ZHANG, J.; HU, X. WU, J. Effect of aluminum toxicity and phosphorus deficiency on the growth and photosynthesis of oil tea (*Camellia oleifera* Abel.) seedlings in acidic red soils. **Acta Physiology Plant**, v. 33, n. 4, p.1285–1292, 2011.

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

KINRAIDE, T. B. Plasma membrane surface potential (ψ_{PM}) as a determinant of ion bioavailability: a critical analysis of new and published toxicological studies and a simplified method for the computation of plant ψ_{PM} . **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 12, p. 3188-3198, 2006.

KOCHIAN, L. V. Cellular mechanisms of aluminium toxicity and resistance in plant. **Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v. 46, n. 2, p. 237-260, 1995.

KOCHIAN, L. V.; HOEKENGA, O. A.; PIÑEROS, M. A. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, n. 2, p. 459–493, 2004.

KRAG, M. N.; SANTANA, A. C.; MARTINS, C. M.; VALE, R. S. Análise sistêmica do arranjo produtivo local da castanha-do-brasil na região da Calha Norte, Pará. **Revista Ciências Agrárias**, v. 59, n. 3, p. 243-251, 2015.

KRTKOVÁ, J.; HAVELKOVÁ, L.; KI REPELOVÁ, A. F. R.; VOSOLSOBE, S.; NOVOTNÁ, Z.; MARTINEC, J.; SCHWARZEROVÁ, K. R. Loss of membrane fluidity and endocytosis inhibition are involved in rapid aluminum-induced root growth cessation in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 60, n. 2, p. 88-97, 2012.

LEUSCHNER, C.; MOSER, G.; BERTSCH, C.; RODERSTEIN, M.; HERTEL, D. Large altitudinal increase in tree root/shoot ratio in tropical mountain forests of Ecuador. **Basic and Applied Ecology**, v. 8, n. 3, p. 219–230, 2007.

LIMA, J. A. S.; MENEGUELLI, N. A.; GAZEL FILHO, A. B.; PÉREZ, D.V. Agrupamento de espécies arbóreas de uma floresta tropical por características de solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n.2, p. 109-116, 2003.

LUCHESE, E. B.; FAVERO, L. O. B.; LENZI, E. **Fundamentos de química do solo**. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 182 p. 2001.

MACÊDO, C. E. C.; JAN, V. V. S.; KINET, J. M.; LUTTS, S. Effects of aluminium on root growth and apical root cells in rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. Reliability of screening tests to detect Al resistance at the seedling stage. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, n. 6, p.1255-1262, 2009.

MADARI, B. E.; MILORI, D. M. B. P.; MARTIN NETO, L.; BENITES, V. M.; CUNHA, T. J. F.; NOVOTNY, E. H.; COELHO, M. R.; SANTOS, G. A. **Matéria orgânica dos solos antrópicos da Amazônia (Terra Preta de índio): suas características e papel na sustentabilidade da fertilidade do solo**. EMBRAPA, v. 1, p. 359-417, 2009.

PEIXOTO, P. H., DA MATTA, F. M.; CAMBRAIA, J. Responses of the photosynthetic apparatus to aluminum stress in two sorghum cultivars. **Journal of Plant Nutrition**, v. 25, n. 4, p. 821–832, 2002.

ROSSIELLO, R. O. P.; JACOB NETO, J. Toxidez de alumínio em plantas: novos enfoques para um velho problema. In: FERNANDES, M.S. (Ed.) *Nutrição Mineral de Plantas*. Viçosa: **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, p. 375-418, 2006.

SCOLES, R.; CANTO, M. S.; ALMEIDA, R. G.; VIEIRA, D. P. Sobrevivência e frutificação de *Bertholletia excelsa* Bonpl. em áreas desmatadas em Oriximiná, Pará. **Floresta e Ambiente**, v. 23, n. 1, p. 555-564, 2016.

SOUZA, J. M. L. de. **Caracterização e efeitos do armazenamento de amêndoas com películas e despêculadas sobre propriedades das frações proteica e lipídica de castanha-do-brasil**. 2013. 128 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2013.

TEDESCO, M. J.; BISSANI, C. A. Acidez dos solos e seus efeitos nas plantas. In: BISSANI, C. A.; GIANELLO, C.; CAMARGO, F. A. de O.; TEDESCO, M. J. *Fertilidade dos solos e manejo da adubação de culturas*. **Porto Alegre: Gênese**, p.75-92, 2004.

VANGUELOVA, E. I.; HIRANO, Y.; ELDHUSET, T. D.; SAS-PASZT, L.; BAKKER, M. R., PÜTTSEPP, Ü.; BRUNNER, I.; LÖHMUS, K.; GODBOLD, D. Tree fine root Ca/Al molar ratio-indicator of Al and acidity stress. **Plant Biosystems**, v. 141, n. 3, p. 460-480, 2007.

VERSTRAETEN, S. V.; OTEIZA, P. I. Al³⁺-mediated changes in membrane physical properties participate in the inhibition of polyphosphoinositide hydrolysis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 408, n. 2, p. 263-271, 2002.

YANG, J. Brazilian nuts and associated health benefits: A review. **LWT – Food Science and Technology**, v. 42, n. 10, p.1573-1580, 2009.

YANG, J. L.; ZHU, X. F.; PENG, Y. X.; ZHENG, C.; LI, G. X.; LIU, Y.; SHI, Y. Z.; ZHENG, S. J. Cell wall hemicellulose contributes significantly to aluminum adsorption and root growth in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 155, n. 4, p. –1892, 2011.

2 COMPORTAMENTO BIOQUÍMICO EM MUDAS DE CASTANHEIRA-DO-BRASIL (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) SUBMETIDAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ALUMÍNIO¹

2.1 Introdução

A fitotoxicidade por alumínio é um fator abiótico que reduz drasticamente o rendimento das culturas, causando perdas econômicas e impactos negativos ao meio ambiente (Prochnow, 2004), por estar diretamente relacionado à acidez dos solos, à medida que se acidificam, íons de alumínio ocupam as posições de troca catiônica, em superfícies eletronegativas dos colóides, substituindo os cátions removidos pela lixiviação, potencializando, assim, os níveis tóxicos de alumínio (Al^{3+}) para as plantas (Rengel; Zhang, 2003).

O efeito do Al^{3+} no crescimento da parte aérea é apresentado como uma consequência dos danos promovidos no sistema radicular (Giannakoula et al., 2008) limitando o crescimento e o desenvolvimento da planta e, conseqüentemente provocando prejuízos à produção (Horst et al., 2010) devido a alteração na fisiologia do vegetal como em enzimas (Copeland; Lima, 1992), respiração (Klimashevskii et al., 1972), fosforilação dos açúcares (Clarkson, 1965), atividade de ATPases (Klimashevskii et al., 1972), teor de aminoácidos (Klimashevskii et al., 1970) e fotossíntese (Lemos Filho, 1982).

Conseqüentemente, a assimilação do nitrogênio (N) que é um macronutriente responsável por diversas funções metabólicas na planta, pode ser afetada na presença de concentrações tóxicas de Al^{3+} (Li et al., 2013). Os processos de absorção, assimilação e mobilização de N são prejudicados inviabilizando a eficiência de utilização do sistema complexo de vias metabólicas, tornando as funções ineficientes na presença do alumínio tóxico (Stitt et al., 2002).

Embora esse fator abiótico venha prejudicando o desenvolvimento das culturas, afetando seu metabolismo, um estudo realizado por Nascimento et al. (2011) verificaram que as espécies arbóreas brasileiras apresentam comportamentos adaptativos que potencializam a utilização em áreas que não apresentam condições favoráveis para outras espécies, sendo de grande importância silvicultural e econômica, tornando, assim, a *Bertholletia excelsa* Bonpl. espécie-chave para o desenvolvimento econômico, social e ambiental e com boa adaptabilidade em solos ácidos (Peres et al., 2003; Salomão, 2009).

Diante dos problemas que limitam a fitotoxicidade do alumínio aos vegetais e a importância da *Bertholletia excelsa* em solos ácidos, este estudo teve como objetivo

investigar o comportamento bioquímico em mudas de *B. excelsa* submetidas a diferentes concentrações de alumínio.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Área de estudo e condução do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação pertencente à Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA, no campus de Belém, no Estado do Pará no período de dezembro de 2017 a janeiro de 2018. A área de estudo apresenta as seguintes coordenadas geográficas: 01° 27' 21" S e 48° 30' 16" W, com altitude média de 10 m, clima Af segundo a Köppen-Geiger com temperatura média de 26,8 °C e umidade relativa do ar de 95%.

2.2.2 Material vegetal e tratamento

Plantas jovens de *B. excelsa* com onze meses de idade provenientes do viveiro Tellus localizado em Marituba-Pará, em bom estado fitossanitário e homogêneas, foram selecionadas e aclimatadas em casa de vegetação durante 20 dias em sacos de polietileno com capacidade de 2,5 L (Figura 1), contendo uma mistura de terriço e serragem (2:1 v/v) (Tabela 1). O fornecimento de água foi realizado diariamente de acordo com a capacidade dos sacos.



Figura 1. Início da condução do experimento, mudas de *B. excelsa*.

Tabela 1. Análise físico-química do substrato.

pH		C. org.	M.O	P	K	Ca	Mg	Al	H+Al
H ₂ O	KCl	g dm ⁻³	g dm ⁻³	mg dm ⁻³	mmol _c dm ⁻³				
5,76	3,9	17	31	2,9	0,6	2,2	1,2	16	51

No 21º dia após serem aclimatadas foi iniciado a aplicação do alumínio na forma de cloreto de alumínio hexahidratado ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) apresentando sintomas visuais da toxidez no 41º dia após a aclimação (Figura 2 e 3). O pH da solução nutritiva na presença de alumínio foi mantido em pH 4,8 sendo ajustado com HCl 0,1 mol L⁻¹ e NaOH 1M. As aplicações foram realizadas a cada sete dias.



Figura 2. Sintomas visuais da toxidez por alumínio em mudas de *B. excelsa* a partir da terceira aplicação. (A) amarelecimento e necrose de mudas com concentrações de 20 mg L⁻¹ de alumínio; (B) ápice com má formação nas mudas com concentrações de 40 mg L⁻¹ de alumínio; (C) folhas enroladas em mudas com concentrações de 80 mg L⁻¹ de alumínio.



Figura 3. Sintomas visuais da toxidez por alumínio em mudas de *B. excelsa* a partir da terceira aplicação. (A) raiz da planta controle; (B) raiz de mudas com concentrações de 80 mg L⁻¹.

2.2.3 Coleta e armazenamento do material

A coleta das plantas ocorreu às 04:30 h no 42º dia de experimento. A determinação do vazamento de eletrólitos (VE) e da atividade da redutase do nitrato (RN) foi feita *in vivo*, selecionando-se ainda em casa de vegetação, folhas primárias completamente expandidas de cada uma das repetições. Para os pigmentos fotossintéticos, foi selecionada uma folha primária e armazenada em freezer a -80 °C para análise.

A determinação das análises bioquímicas foi realizada a partir de folhas e raízes separadas e levadas à estufa de ventilação de ar forçada a 65 °C por 48 horas. O material seco foi triturado em moinho até a obtenção de um pó fino sendo devidamente armazenado até sua utilização nos ensaios. As análises foram realizadas no laboratório de Fisiologia Vegetal/ Estudos da Biodiversidade em Plantas Superiores, localizado no Instituto de Ciências Agrárias da UFRA.

2.2.4 Delineamento estatístico e análise dos dados

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos (0 mg L⁻¹, 20 mg L⁻¹, 40 mg L⁻¹, 60 mg L⁻¹ e 80 mg L⁻¹ de Al³⁺) e sete repetições, totalizando 35 unidades experimentais. O alumínio foi adicionado na forma de cloreto de alumínio hexahidratado 95% (AlCl₃.6H₂O).

Existindo o atendimento das pressuposições para análise de variância, os dados foram submetidos a apreciações estatísticas e as médias dos níveis de alumínio ajustadas por meio da análise de regressão, a 5% de probabilidade, utilizando-se como testes de comparação de médias, tukey a 5%, através do software SISVAR (Ferreira, 2011).

2.2.5 Análise bioquímica das amostras

2.2.5.1 Vazamento de eletrólitos

O vazamento de eletrólitos foi determinado de acordo com Blum e Ebercon (1981), com modificações, no qual foram pesados, separadamente, 100 mg de folhas e raízes de massa fresca (MF), seguindo-se de tripla lavagem com água desionizada, e posterior transferência do material vegetal para tubos de ensaio, nos quais foram adicionados 10 mL de água desionizada.

Os frascos fechados foram deixados em repouso sob temperatura ambiente (25 °C) durante 6 horas, com agitação em mesa agitadora a cada 20 minutos. Após esse período, com o auxílio de um condutivímetro, foi mensurada a condutividade elétrica da solução determinando a primeira leitura (L_1). Em seguida, os tubos foram novamente fechados e aquecidos em “banho-maria” a 100 °C, por 1 hora. Após resfriamento dos tubos de ensaio à temperatura ambiente, a condutividade elétrica do extrato foi novamente medida obtendo-se a segunda leitura (L_2), após as leituras o cálculo abaixo foi realizado:

$$VE (\%) = (L_1 / L_2) \times 100$$

2.2.5.2 Redutase do nitrato

A partir do método descrito por Hageman e Hucklesby (1971) foram pesados aproximadamente 200 mg de discos foliares e de raiz (obtida a partir de pedaços menores) MF e, colocados em tubos falcon milimetrados envoltos com papel alumínio contendo tampão fosfato de potássio a 0,1 mM, pH 7,5; KNO_3 a 50 mM; e, isopropanol a 1% (v/v). Após esta etapa, os tubos foram devidamente lacrados com um filme plástico de alta aderência (Parafilm) e infiltrados à vácuo por 2 minutos. Em seguida, foram levados ao “banho-maria” a 30 °C por 30 minutos, no escuro. Em tubo de ensaio comum, foram adicionados 2,0 mL de tampão + 1,0 mL do extrato de reação + 1,0 mL de sulfanilamida 1% + 1,0 mL de NNEDA 0,02%, deixando em repouso por 15 minutos. A absorbância foi determinada em 540 nm no espectrofotômetro com os resultados expressos em $\mu\text{moles de } NO_2^- \text{ g}^{-1} \text{ MF h}^{-1}$.

2.2.5.4 Clorofilas *a*, *b*, totais, antocianina e carotenóides

Para a determinação dos pigmentos fotossintéticos, utilizou-se o método descrito por Lichthenthaler (1987), no qual 100 mg de folha fresca de cada amostra foram pesados e macerados em almofariz contendo 3 mL de acetona 80%, posteriormente, filtrados para a retirada do resíduo. Transferiu-se o sobrenadante para um balão volumétrico de 25 mL e o volume foi aferido com acetona 80%. As leituras foram feitas em espectrofotômetro nos comprimentos de 663 nm (clarofia *a*), 647 nm (clorofila *b*), 537 nm (antocianinas) e 470 nm (carotenóides), sendo os teores de clorofilas expressos por $\mu\text{g mL}^{-1}$. Abaixo se encontra o cálculo para a determinação das clorofilas e carotenóides:

$$\text{Clorofila } a = 12,25 \times A_{663} - 2,79 \times A_{647}$$

$$\text{Clorofila } b = 21,50 \times A_{647} - 5,10 \times A_{663}$$

$$\text{Clorofilas totais} = 7,15 \times A_{663} + 18,71 \times A_{647}$$

$$\text{Carotenóides} = (1000 \times A_{470} - 1,82 \times A_{663} - 85,02 \times A_{647}) / 198$$

2.2.5.3 Determinação de nitrato

Para a determinação do nitrato (NO_3^-) utilizou-se a metodologia de Cataldo et al. (1975), na qual preparou-se em tubos de ensaio, adicionando 100 μL do extrato, a partir da massa seca (MS) e 200 μL de solução de ácido salicílico 5 % (p/v), em ácido sulfúrico concentrado. Após vigorosa agitação em agitador do tipo vortex, foram adicionados lentamente 4700 μL de NaOH 2N. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro na absorvância de 410 nm. A concentração de nitrato foi obtida a partir de uma curva padrão com concentrações crescentes de NO_3^- (0, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 $\mu\text{mol mL}^{-1}$). Os resultados foram expressos em mmol de $\text{NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ MS.

2.2.5.4 Determinação de amônio livre

O Amônio livre (NH_4^+) foi determinado utilizando-se o método segundo Weatherburn (1967), no qual alíquotas de 400 μL do extrato total, 2,5 mL da solução A (5 g de fenol + 0,025 g de nitroprussiato de sódio/ 500 mL de água destilada) e 2,5 mL da solução B (2,5 g de NaOH + 12,6 mL de hipoclorito de sódio/ 500 mL de água destilada) foram homogeneizadas e, após repouso de 40 minutos, realizou-se a leitura a 625 nm. As concentrações de amônio livre foram estimadas a partir da curva-padrão construída com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ p.a (Sigma). Os resultados foram expressos em mmol de $\text{NH}_4^+ \text{ kg}^{-1}$ MS.

2.2.5.5 Determinação de N-aminossolúveis

O método de Yemm e Cocking (1955) foi utilizado para determinar os N-aminossolúveis, no qual foram adicionados aos tubos de ensaio 500 μL do extrato, 250 μL do tampão citrato 0,2 M, 500 μL do KCN 0,2 mM e 100 μL de ninhidrina 5%, em seguida foram a “banho-maria” por 20 minutos, a 100 °C e, após este tempo, interrompida a reação resfriando os tubos em banho de gelo. Após, foram adicionados 650 μL de etanol 60% para fixar a cor desenvolvida (violeta). A leitura foi realizada em espectrofotômetro à 570 nm, e a concentração expressa em $\mu\text{mol aminoácidos (AA) g}^{-1}$ MS.

2.2.5.6 Determinação de proteínas solúveis totais

As proteínas solúveis totais foram determinadas a partir do método descrito por Bradford (1976). Em tubos de ensaio adicionou-se 100 mg MS e 5,0 mL do tampão de extração (Tris-HCl 25 mM pH 7,6). Alíquotas de 100 μ L da amostra foram homogeneizadas em 2,5 mL do reagente de Bradford. Após 15 minutos realizou-se as leituras a 595 nm e os resultados expressos em mg proteína g^{-1} MS.

2.2.5.6 Determinação de açúcares solúveis totais

O método descrito por Dubois et al. (1956) foi utilizado para a determinação de açúcares solúveis totais, no qual adicionou-se aos tubos de ensaio comuns 200 μ L do extrato, 200 μ L de fenol 5% e 1,0 mL de ácido sulfúrico concentrado, sendo agitados em agitador de tubos e em seguida deixados em repouso em bandeja contendo água à temperatura ambiente (25 °C) por 10 a 20 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro à 490nm e a concentração expressa em μ mol carboidratos g^{-1} MS.

2.2.5.7 Determinação de açúcares redutores

Para a extração, foram colocados em tubos de ensaio 20 mg de pó da matéria seca (MS), adicionando em seguida 2,5 mL de etanol (C_2H_6O) 80%. As amostras foram ao banho-maria durante 1 hora a 75 °C, com agitações a cada 15 minutos. O material foi centrifugado e o sobrenadante coletado. Todo este processo foi realizado duas vezes, reunindo assim um extrato total com volume a ser completado para 10 mL com etanol 80%.

Após a extração, adicionou-se aos tubos de ensaio comuns 500 μ L do extrato; e 500 μ L do reativo de Nelson AB ao extrato (12,5 mL do reativo A + 0,5 mL do reativo B); Os tubos foram tampados e aquecidos à 100 °C por 20 minutos, e em seguida resfriados em banho de gelo, adicionando 500 μ L da solução arsenitomolibídica e agitação em vórtex; Adição de 3,5 mL de H₂O dd e vórtex. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro à 540 nm. A concentração expressa em μ mol carboidratos g^{-1} MS.

2.2.5.8 Determinação de açúcares não redutores

O teor de açúcares não redutores foi obtido através de cálculo simples:

- Açúcares Não Redutores = Açúcares solúveis totais – Açúcares Redutores

2.2.5.9 Determinação de sacarose

Amostras de 50 mg de massa seca (MS) e em pó foram homogeneizadas em 1,5 mL de solução de MCW (metanol:clorofórmio:água 12:5:3 v/v/v) durante 30 minutos sob agitação em tubos de eppendorf de 2,0 mL; O homogeneizado foi centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos, coletado o sobrenadante e o resíduo extraído novamente com igual volume de MCW, seguindo-se nova centrifugação e coleta do sobrenadante.

Os sobrenadantes foram reunidos para obtenção do extrato total. A cada 2,0 mL do sobrenadante adicionou-se 0,5 mL de clorofórmio e 750 μ L de água desionizada, seguindo-se agitação e centrifugação (2000 rpm, 10 minutos) para a separação da fase aquosa. Em seguida, retirou-se com a pipeta de Pasteur a fração aquosa metanólica (superior) e transferiu-se para tubos de ensaio.

Os tubos com a fração aquosa metanólica foram levados ao “banho-maria” para serem aquecidos a 35 °C por volta de 30 minutos a 1 hora para evaporação do clorofórmio residual e então determinou-se o volume restante. Da fase aquosa metanólica obtida anteriormente foram tomadas alíquotas para as concentrações de sacarose segundo Van Handel (1968), com algumas modificações: a cada alíquota de 100 μ L da fase aquosa adequadamente diluída adicionou-se 100 μ L de KOH 30%. Seguindo agitação.

A mistura foi aquecida à 100 °C por 10 minutos e, após resfriamento, adicionou-se 3,0 mL de solução de antrona 0,2 % em ácido sulfúrico. A mistura foi agitada e aquecida a 40 °C por 20 minutos. Após resfriamento, agitou-se as amostras por 10 segundos e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 620 nm. E os valores expressos em mg g^{-1} MS.

2.2.5.10 Determinação de prolina

Para determinação da prolina, foram adicionados 1,0 mL de ninhidrina ácida e 1,0 mL de ácido acético glacial. Após 1 hora no “banho-maria” a 100 °C, foi interrompida a reação em banho de gelo adicionando-se 2,0 mL de tolueno. A leitura foi feita a 520 nm e as

concentrações de prolina determinadas a partir da curva-padrão com L-prolina p.a (Sigma) e os resultados expressos em $\mu\text{mol prolina g}^{-1}\text{ MS}$ (Bates et al., 1973).

2.2.5.11 Determinação de glicina-betaína

A determinação da glicina-betaína foi determinada segundo Greive e Grattan (1983), no qual foi adicionado 250 μL de H_2SO_4 2N (diluição da amostra 1:2) e 200 μL de KI-I_2 gelado, durante 16 horas a 0 °C. O precipitado foi lavado 2 vezes com 2 mL de H_2SO_4 1N gelado com centrifugações por 5 minutos a 10.000 rpm em 0 °C a cada lavagem. Após as lavagens, foi dissolvido o precipitado em 3 mL de 1,2-dicloroetano. A leitura foi feita a 365 nm e uma curva padrão de glicina-betaína foi preparada para a realização dos cálculos, sendo os resultados expressos em $\text{mmol kg}^{-1}\text{ MS}$.

2.3 Resultados

2.3.1 Pigmentos fotossintéticos

Os pigmentos fotossintéticos apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) com o aumento das concentrações de alumínio, em que a clorofila *a* mostrou decréscimos de 60%, e carotenóides em 50% (Figura 4 A e D), sendo essas variáveis ajustadas ao modelo de regressão polinomial e, clorofila *b* 59%, clorofilas totais 59%, e antocianinas 53% (Figura 4 B, C e E), sendo essas variáveis ajustadas ao modelo de regressão linear, ao comparar-se o tratamento controle com a maior concentração deste metal (80 mg L^{-1}).

Para a clorofila *a* não houve diferença significativa nos tratamentos com as concentrações de alumínio, em relação à clorofila *b* e clorofila total, o tratamento controle diferiu significativamente da maior concentração aplicada de alumínio, os carotenóides não apresentaram diferença significativa no tratamento controle, 40 mg L^{-1} e 60 mg L^{-1} e as antocianinas não apresentaram diferença significativa em todos os tratamentos (Tabela 7).

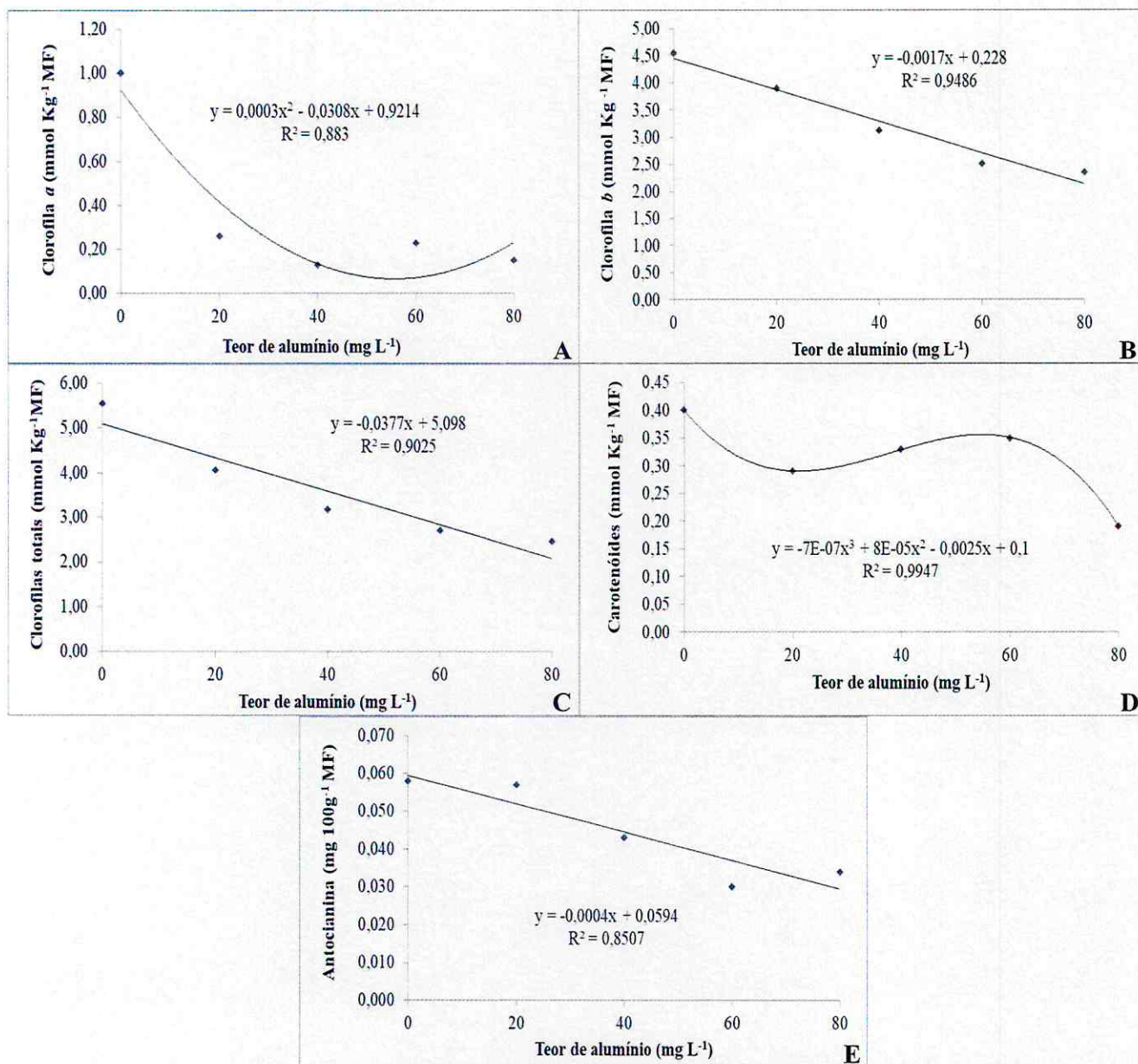


Figura 4. Valores médios de clorofila *a* (A), clorofila *b* (B), clorofilas totais (C), carotenoides (D) e antocianinas (E) em mudas de *B. excelsa* submetidas a diferentes concentrações de alumínio.

2.3.2 Vazamento de eletrólitos

O vazamento de eletrólitos nas raízes sofreu acréscimos significativos ($p < 0,05$) quando as plantas de castanheira-do-brasil foram submetidas às concentrações de alumínio, com melhor ajuste para o modelo de regressão polinomial (Figura 5), em que comparando as plantas controle com o maior nível de toxidez, observou-se um aumento de 64%. Para as

folhas, não foi observado significância a $p > 0,05$ nesta variável, apresentando um coeficiente de variância (CV) de 30,36% (Tabela 2).

De modo geral, para as folhas não foi observado diferença significativa entre os tratamentos, enquanto para a raiz, o tratamento controle diferiu estatisticamente da maior concentração de alumínio e, os tratamentos de 20 mg L^{-1} , 40 mg L^{-1} e 60 mg L^{-1} não apresentaram diferença significativa entre eles (Tabela 7).

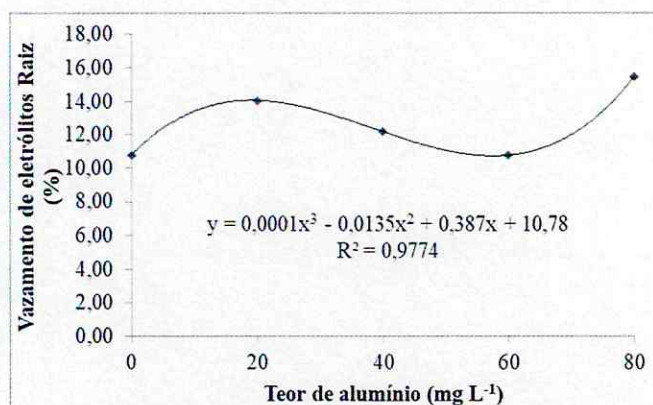


Figura 5. Valores médios do vazamento de eletrólitos em raízes de mudas de *B. excelsa* submetidas a diferentes concentrações de alumínio.

Tabela 2. Análise de variância dos valores médios do vazamento de eletrólitos em folhas de mudas de *B. excelsa* submetidas a diferentes concentrações de alumínio.

Tabela de Análise de Variância					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMENTO	4	168.395354	42.098839	1.371	0.2674
erro	30	921.105343	30.703511		
Total corrigido	34	1089.500697			
CV (%) =	30.36				
Média geral:	18.2497143	Número de observações:	35		

2.3.3 Teores de NO_3^- e atividade da redutase do nitrato

Os valores médios de nitrato nas folhas apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) de 23%, a partir do ajuste do modelo de regressão linear, quando comparados o tratamento controle com a maior concentração de alumínio (Figura 6 A), enquanto que para as raízes não

houve diferença significativa a $p > 0,05$ de nitrato nas mudas de *B. excelsa* na maior toxidez de alumínio, apresentando coeficiente de variância de 56,89% (Tabela 3 A).

A redutase do nitrato reduziu significativamente ($p < 0,05$) em 81% para folhas das mudas de *B. excelsa*, comparando-se o tratamento controle ao de maior concentração de alumínio, sendo analisada através do ajuste do modelo de regressão linear (Figura 6 B). Não houve diferença significativa desta variável nas raízes ($p > 0,05$), apresentando um CV de 37,31% (Tabela 3 B).

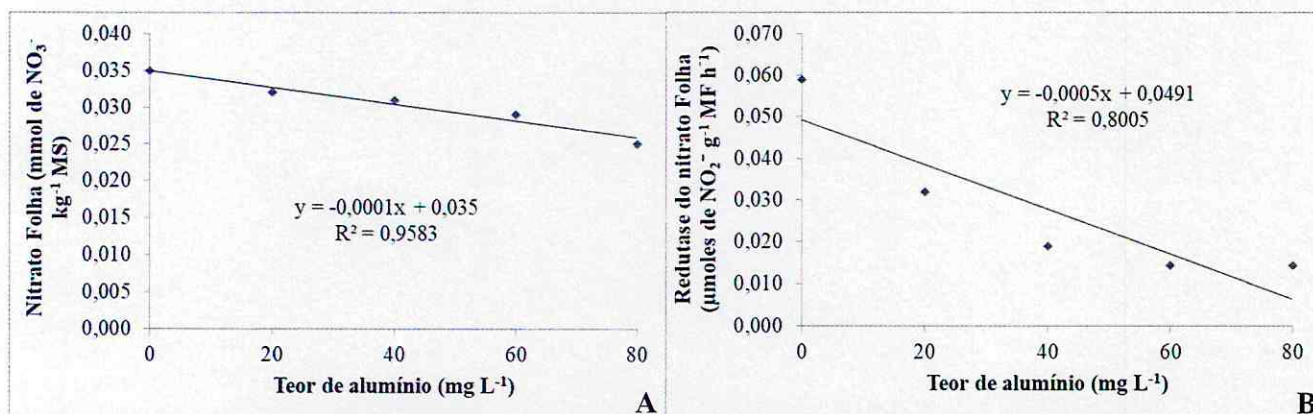


Figura 6. Valores médios do NO₃⁻ e da atividade da redutase do nitrato em folhas (A e B) em mudas de *B. excelsa*, submetidas a diferentes concentrações de alumínio.

Tabela 3. Análise de variância dos valores médios de nitrato (A) e redutase do nitrato (B) em raízes de mudas de *B. excelsa* submetidas a diferentes concentrações de

Tabela de Análise de Variância (A)

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMENTO	4	0.003896	0.000974	1.059	0.3940
erro	30	0.27601	0.000920		
Total corrigido	34	0.031498			
CV (%) =	56.89				
Média geral:	0.0533143	Número de observações:	35		

Tabela de Análise de Variância (B)

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMENTO	4	0.000086	0.000022	0.053	0.9944
erro	30	0.012110	0.000404		
Total corrigido	34	0.012196			
CV (%) =	37.31				
Média geral:	0.0538571	Número de observações:	35		

2.3.4 Amônio, N-aminossolúveis e proteínas solúveis

Para os valores médios de amônio livre houve redução significativa ($p < 0,05$) apresentando ajuste de regressão polinomial para folhas e linear para as raízes (Figura 7 A e B), diminuindo em 43% e 58%, respectivamente, quando comparados os tratamentos controle e 80 mg L⁻¹ de alumínio. A variável N-aminossolúveis apresentou redução significativa ($p < 0,05$) em modelo de regressão polinomial em 16% para as raízes em relação ao tratamento controle e o maior nível de toxidez por alumínio (Figura 7 E), não havendo significância ($p > 0,05$) desta variável nas folhas da espécie em estudo, apresentando um CV de 37,51% (Tabela 4).

As proteínas apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) de 15% e 9% para folhas e raízes, respectivamente, quando as mudas da espécie em estudo foram submetidas a maior concentração de alumínio em comparação ao tratamento controle (Figura 7 C e D). O ajuste foi estabelecido com regressão polinomial.

Em geral, o amônio livre nas folhas não apresentou diferença significativa a $p > 0,05$ de probabilidade entre os tratamentos com as concentrações de alumínio, em contraste, foram estatisticamente diferentes do tratamento controle (Tabela 7). As variáveis N-aminossolúveis e proteínas solúveis não apresentaram diferença significativa nos tratamentos para as folhas e raízes das mudas de *B. excelsa* (Tabela 7).

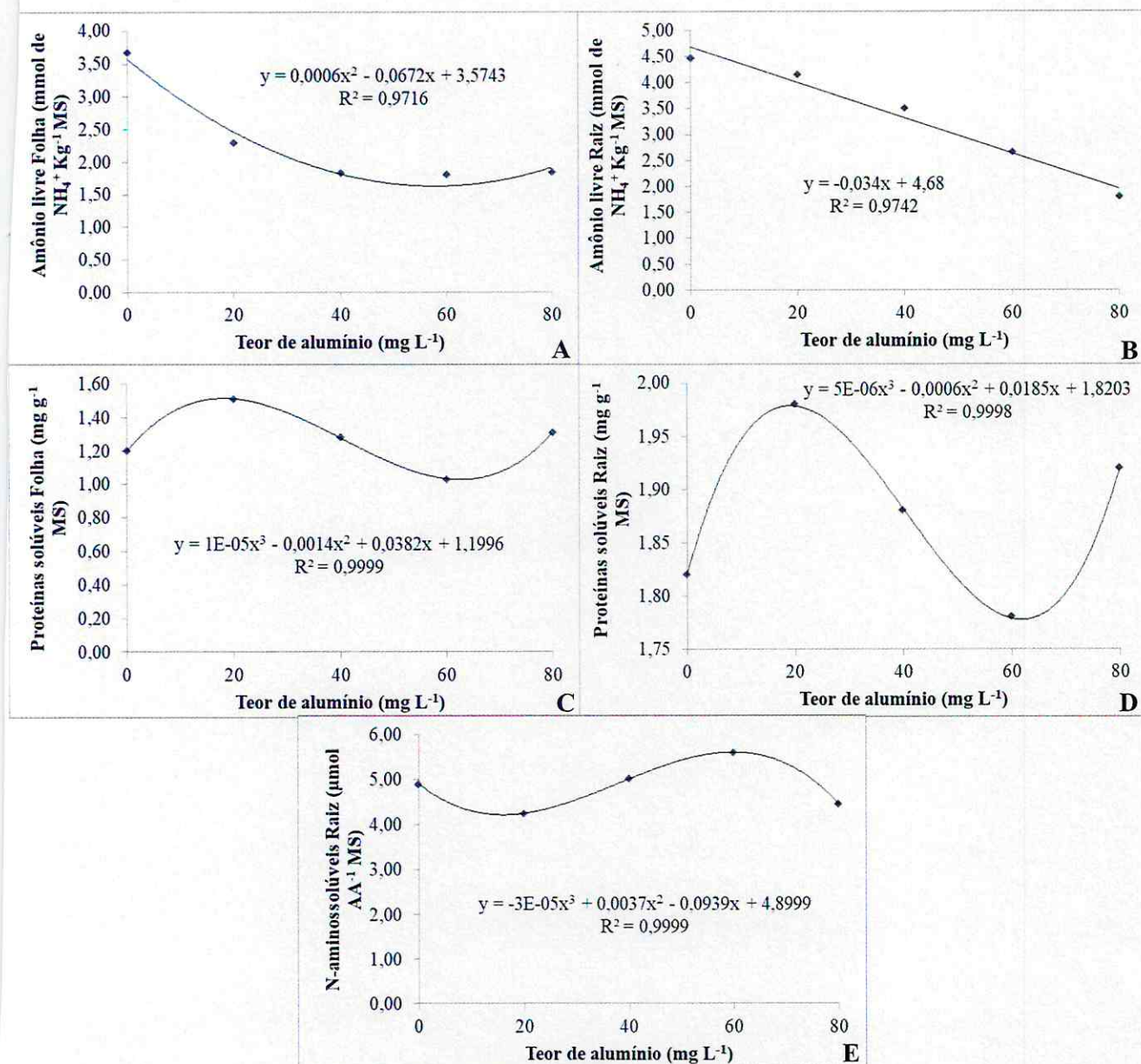


Figura 7. Valores médios de amônio livre (A e B) e proteínas solúveis (C e D) em folhas e raízes de mudas de *B. excelsa*, submetidas a diferentes concentrações de alumínio.

Tabela 4. Análise de variância dos valores médios de N-aminossolúveis em folhas de mudas de *B. excelsa* submetidas a diferentes concentrações de alumínio.

Tabela de Análise de Variância					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMENTO	4	2.936389	0.734097	0.136	0.9679
erro	30	162.455429	5.415181		
Total corrigido	34	165.391817			
CV (%) =	37.51				
Média geral:	6.2037143		Número de observações:	35	

2.3.5 Açúcares solúveis totais e sacarose

Ao comparar-se o tratamento controle ao de maior concentração de alumínio, os açúcares solúveis totais apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) de 15% para as folhas, sendo o ajuste do modelo de regressão dado pela polinomial e, 25% para as raízes, com ajuste do modelo de regressão linear (Figura 8 A e B). A sacarose demonstrou decréscimos significativos ($p < 0,05$) nas folhas em 75% e raízes em 29%, em relação ao tratamento controle e a concentração de 80 mg L^{-1} de alumínio (Figura 8 C e D).

Nas folhas, os açúcares solúveis totais não apresentaram diferença significativa entre todos os tratamentos a $p < 0,05$ de probabilidade e, nas folhas, em relação a variável sacarose, não foi observada diferença significativa nas concentrações de alumínio, sendo estas, diferentes estatisticamente do tratamento controle, no entanto, para as raízes desta mesma variável, houve diferença significativa do tratamento controle em relação à concentração de 60 mg L^{-1} de alumínio (Tabela 7).

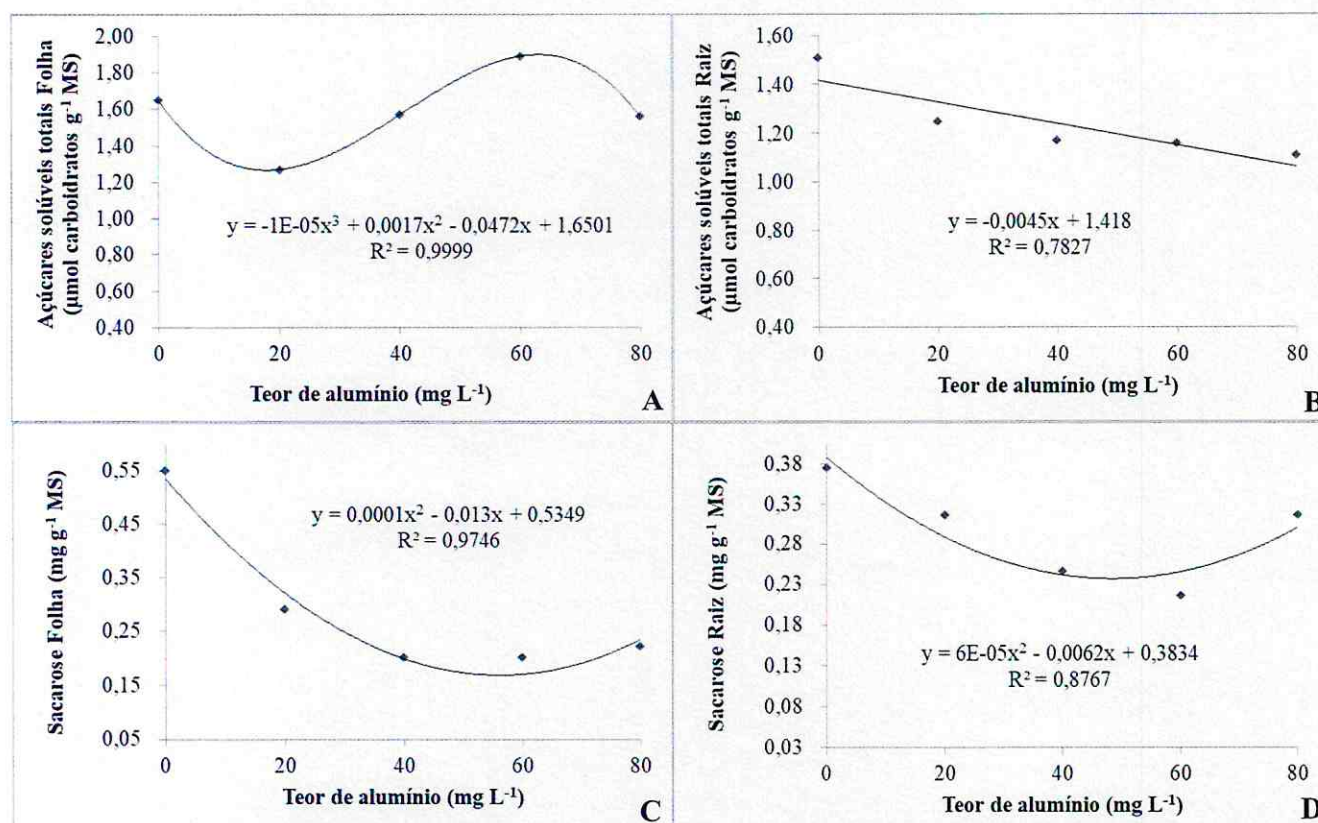


Figura 8. Valores médios de açúcares solúveis totais (A e B) e de sacarose (C e D) em folhas e raízes de mudas de *B. excelsa* submetidas a diferentes concentrações de alumínio.

2.3.6 Açúcares redutores e não redutores

Os açúcares redutores nas folhas das mudas da espécie em estudo apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) de 8%, bem como os açúcares não redutores com decréscimo de 34% (Figura 9 A e B), sendo ajustados no modelo de regressão polinomial. Para as raízes, estas variáveis não apresentaram resultados significativos ($p > 0,05$), demonstrando CV de 45,44% para os açúcares redutores e 46,82% para os não redutores (Tabela 5 A e B).

Para ambas variáveis não foi observado diferença significativa a $p < 0,05$ de probabilidade entre todos os tratamentos, porém, os açúcares redutores na raiz, apresentaram diferença significativa apenas no tratamento controle e na concentração de 60 mg L^{-1} de alumínio (Tabela 7).

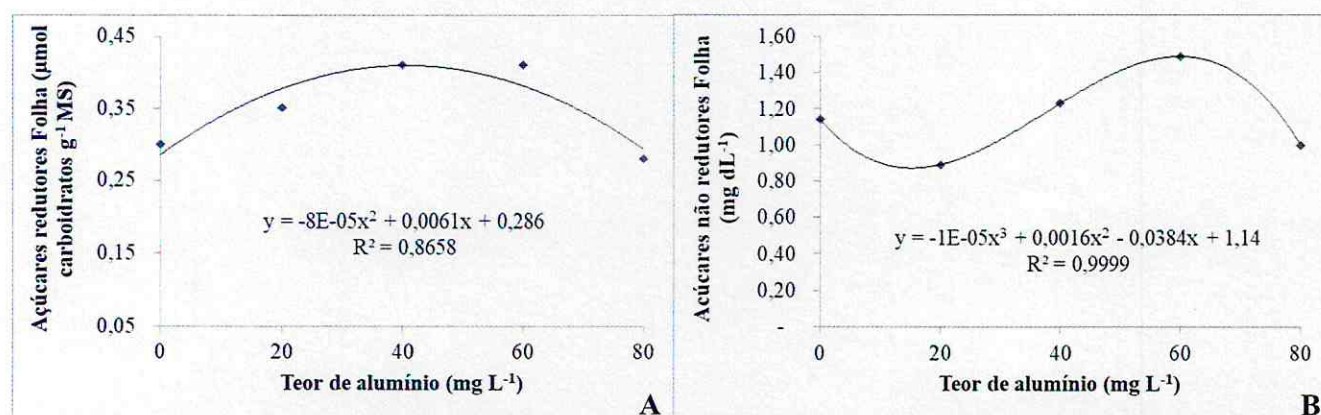


Figura 9. Valores médios de açúcares redutores e não redutores em folhas (A e B) em mudas de *B. excelsa*, submetidas a diferentes concentrações de alumínio.

Tabela 5. Análise de variância dos valores médios de açúcares redutores e não redutores em raízes (A e B) de mudas de *B. excelsa* submetidas a diferentes concentrações de alumínio.

Tabela de Análise de Variância (A)					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMENTO	4	0.154297	0.038574	1.058	0.3945
erro	30	1.094200	0.036473		
Total corrigido	34	1.248487			
CV (%) =	45.44				
Média geral:	0.4202857	Número de observações:		35	

Tabela de Análise de Variância (B)					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMENTO	4	1.029469	0.257367	2.154	0.0985
erro	30	3.584029	0.119468		
Total corrigido	34	4.613497			
CV (%) =	46.82				
Média geral:	0.7382857	Número de observações:		35	

2.3.7 Osmólitos compatíveis

As variáveis prolina e glicina betaína apresentaram acréscimos significativos ($p < 0,05$) conforme o aumento na concentração de alumínio. A glicina betaína apresentou ajuste no modelo de regressão linear, com aumento significativo ($p < 0,05$) de 28% nas folhas e 27% nas raízes das mudas de *B. excelsa*, em relação ao tratamento controle e a maior concentração do metal em estudo (Figura 10 A e B). Para a prolina, houve aumento de 85% nas folhas quando comparados o tratamento controle ao de maior concentração de alumínio, tendo ajuste no modelo de regressão linear (Figura 10 C), em contraste, esta variável não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) para as raízes, demonstrando CV de 36,95% (Tabela 6).

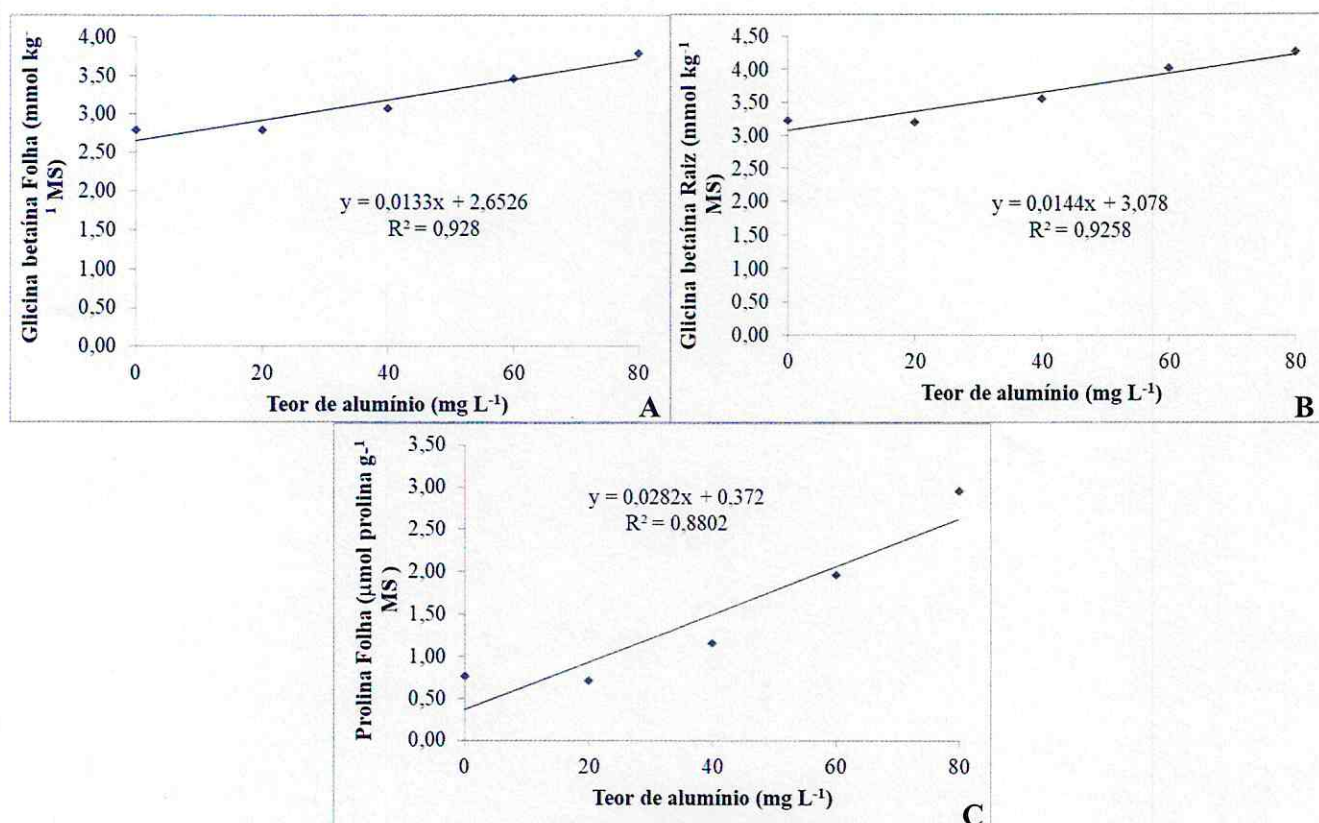


Figura 10. Valores médios de glicina betaina nas folhas e raízes (A e B) e prolina em folhas (C) em mudas de *B. excelsa* submetidas a diferentes concentrações de alumínio.

Tabela 6. Análise de variância dos valores médios de prolina em raízes de mudas de *B. excelsa* submetidas a diferentes concentrações de alumínio.

Tabela de Análise de Variância					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMENTO	4	0.460040	0.115010	0.565	0.6899
erro	30	6.106314	0.203544		
Total corrigido	34	6.566354			
CV (%) =	36.95				
Média geral:	1.2211429	Número de observações:		35	

2.4 Discussão

2.4.1 Pigmentos fotossintéticos

As alterações nos teores de clorofilas observados na Figura 4 A, B e C podem estar relacionadas ao rompimento da parede celular ocasionada pelo alumínio através do extravasamento de eletrólitos (Tabela 2), que embora não tenha sido observado diferença significativa entre todos os tratamentos na variável vazamento de eletrólitos nas folhas, a dosagem de 80 mg L⁻¹ demonstrou um maior dano (Tabela 7), apresentando, assim, a clorose e a necrose como sintomas visuais, e por conseguinte, a interferência no processo fotossintético (Mihailovic et al., 2008; Aquino et al., 2013).

As clorofilas são principais indicadores fisiológicos do estresse por toxidez de alumínio, em que foram prejudicadas pela interferência na absorção e translocação de magnésio e nitrogênio, constituintes importantes das células da clorofila (Milivojevic; Stojanovic, 2003), causados pela má formação do sistema radicular (Figura 3).

Os carotenóides possuem como principal função a fotoproteção nos tecidos fotossintéticos, minimizando danos fotooxidativos (Bartley; Scolnik, 1995), assim, mesmo apresentando decréscimos na maior dosagem de alumínio (Figura 4 D), não foi observado diferença significativa entre os tratamentos 20 mg L⁻¹, 40 mg L⁻¹ e 60 mg L⁻¹ de alumínio (Tabela 7), uma vez que teve atuação como fotoprotetor, atenuando o estresse causado nas mudas de *B. excelsa*.

As antocianinas, que constituem o grupo de pigmentos responsáveis pela coloração (Falcão et al., 2003), foram afetadas pelo alumínio devido as membranas do tilacóide e o transporte de elétrons serem influenciados pelo prejuízo nos cloroplastos pela fitoxidade por alumínio, demonstrando uma reação em cadeia, com danos à espécie (Figura 4 E).

2.4.2 Vazamento de eletrólitos

A ação tóxica do alumínio afeta principalmente a membrana plasmática, na qual o Al interage com lipídios e proteínas da membrana modificando a estrutura molecular, aumentando a densidade de empacotamento dos lipídios e, conseqüentemente, aumentando a sua permeabilidade (Krtková et al., 2012). Assim, o vazamento de eletrólitos observado neste estudo, indica a possível passagem de não-eletrólitos e de permeadores tanto nas raízes (Figura 5), quanto nas folhas (Tabela 2) das mudas de *B. excelsa*.

Segundo Yang et al. (2011) cerca de 75% de todo o alumínio adsorvido à parede celular está ligado à fração hemicelulose, logo, o alumínio liga-se a componentes da parede celular alterando sua capacidade de troca catiônica (Panda et al., 2009), pois ao se ligar a moléculas de pectina, em uma ligação mais forte e rápida do que o Ca^{2+} , podem influenciar a passagem de íons tanto para o interior quanto para o exterior das células da planta (Kochian et al. 2004).

2.4.3 Teores de nitrato (NO_3^-) e a atividade da redutase do nitrato

No presente estudo, a redução dos teores de nitrato e da atividade da redutase do nitrato nas folhas (Figura 6 A e B) das mudas de *B. excelsa*, pode ter sido ocasionada pelo pH do substrato (Santos et al., 2011), que sendo ácido, e com a presença do alumínio tóxico, reduziu a absorção de nitrato (Andrade Netto, 2005), consequentemente, a atividade da enzima redutase do nitrato pode ter sido inibida, pois o Al^{3+} causa dificuldade na captação e redução da atividade do sistema de transporte do NO_3^- (Justino et al., 2006; Cruz et al., 2011).

Segundo Vincentz et al. (1993) e Kaiser et al. (1999), com a presença de nitrato ocorre um estímulo à síntese da enzima analisada, enquanto que um estresse intenso pode reduzir sua produção de 20% a 50%, corroborando com os resultados obtidos neste estudo. Em vista disso, as raízes, apesar de não terem mostrado resultados significativos, apresentaram maiores médias de nitrato e redutase do nitrato no tratamento controle (Tabela 7), evidenciando a redução dessas variáveis nos tratamentos com as concentrações de alumínio.

Outra explicação para os resultados apresentados neste estudo, pode estar relacionada à presença de amônio (NH_4^+) no solo (Figura 7 A e B), tornando a forma de NO_3^- indisponível para os vegetais (Andrade Netto, 2005), pois em solos ácidos, o NH_4^+ , uma das principais fontes de nitrogênio, fica adsorvido às partículas coloidais, enquanto o NO_3^- , por ter carga negativa, torna-se componente da solução do solo, facilmente lixiviado, e indisponível para a absorção radicular (Cordeiro, 2004).

2.4.4 Amônio, N-aminossolúveis e proteínas solúveis

A entrada do NH_4^+ na célula ocorre por um processo de absorção passiva, ou seja, a favor do gradiente de potencial eletroquímico, através de um transportador do tipo uniporte (Souza; Fernandes, 2006). Assim, nos tratamentos com concentrações de alumínio, ocorreu a absorção do amônio, apesar da redução na maior dosagem deste metal em comparação ao

controle (Figura 7 A e B), favorecendo os processos bioquímicos posteriores das mudas de *B. excelsa*.

Assim, segundo Fernandes (2006) à medida que a planta exsuda H^+ para fora da célula ela absorve NH_4^+ para o equilíbrio eletrostático.

Além disso, a absorção de amônio pode ser atribuída à necessidade de fontes de nitrogênio, já que o nitrato apresentou inibição em sua absorção (Figura 6 A), as mudas de *B. excelsa*, absorveram o NH_4^+ por vias alternativas que pode, ainda, ser transportado por carregadores específicos através do tonoplasto e armazenados no vacúolo (Kant et al., 2007).

Após a incorporação do N inorgânico a compostos orgânicos, esses poderão ser utilizados no próprio local ou transportados através do xilema para a parte aérea, principalmente na forma de aminoácidos (Bloom et al., 1992). Nas plantas superiores, o metabolismo dos carboidratos e dos aminoácidos é co-regulado (Ferrario-Méry et al., 1998), possibilitando a conversão do nitrogênio em aminoácidos, através de esqueletos de carbono provenientes do metabolismo dos carboidratos (Heldt, 2005).

Isto pode explicar o fato dos teores de N-aminossolúveis terem reduzido simultaneamente com os açúcares solúveis totais tanto nas folhas (Figura 8 A e Tabela 4) como nas raízes (Figura 7 A e 8 B), sendo componentes importantes no controle do pH citosólico (Gilbert et al., 1998), na manutenção da homeostase iônica, da relação carbono/nitrogênio (C/N) e na estabilização de macromoléculas, membranas e organelas (Bohnert; Shen 1999; Bray et al. 2000).

Por conseguinte, o aumento na produção de proteínas solúveis em plantas expostas ao Al é sugerido por meio do aumento na expressão de genes relacionados direta ou indiretamente com a tolerância ao alumínio (Ma et al., 2001; Yang et al., 2007), ainda, observa-se, neste trabalho, uma possível relação entre as variações nos teores de proteínas solúveis (Figura 7 C e D) e de N-aminossolúveis (Figura E e Tabela 4) indicando uma relação causa-efeito de biossíntese protéica ou de proteólise (Kováčik et al., 2010).

2.4.5 Açúcares solúveis totais e sacarose

Os açúcares solúveis totais são considerados uma categoria importante de solutos compatíveis, os quais são acumulados como resposta a estress ao Al^{3+} (Jouve et al., 2004). No entanto, na dosagem de 80 mg L^{-1} de alumínio, as concentrações de açúcares solúveis totais apresentaram redução nas folhas e nas raízes (Figura 8 A e B) das mudas de *B. excelsa*,

provavelmente em decorrência da baixa atividade fotossintética, considerando os valores apresentados pelos pigmentos fotossintéticos nessa mesma dosagem (Figura 4).

A sacarose e hexoses, principais açúcares solúveis, são considerados sinalizadores metabólicos de controle de relações fonte-dreno e de efeitos de integração ambiental com o metabolismo da planta (Paul; Pellny, 2003) e, em situação de estresse, o metabolismo dos carboidratos é alterado, podendo, algumas vezes, ser convertido a outros açúcares como a sacarose (Lee et al., 2008).

No presente estudo houve aumento da sacarose a partir da dosagem de 60 mg L⁻¹ de alumínio nas mudas de *B. excelsa* (Figura 8 C e D), sendo possivelmente explicado devido, a sacarose ser, para vários vegetais, o principal açúcar exportado dos locais de síntese (folhas) para as regiões de consumo (caule, gemas vegetativas, raízes e órgãos reprodutivos) a fim de ser utilizada no crescimento (Chaves Filho; Seraphin, 2001).

É possível explicar em partes, que o comportamento de acréscimos na variável sacarose, deve-se também, à sua biossíntese que foi promovida pela maior atividade da enzima sacarose fosfato sintase que atua na célula fotossintética localizada no citosol, com a função de proteger a integridade de membranas e proteínas (Hoekstra et al, 2001).

Ainda, Lee et al. (2008) afirmam que o acúmulo de açúcares solúveis verificados durante o estresse por alumínio, potencializa-se mais em função da hidrólise de amido, através da enzima α e β -amilase em açúcares, podendo ser quebrados e então transportados para os diversos drenos, na forma de sacarose.

2.4.5 Açúcares redutores e não redutores

Embora as variáveis de açúcares redutores e não redutores nas folhas e nas raízes das mudas de *B. excelsa*, não tenham apresentado diferença significativa nos tratamentos (Tabela 7), provavelmente, inibiu a atividade da enzima chave na fosforilação de hexoses (Clarkson, 1966), haja vista, a hidrólise de sacarose libera hexoses que podem ser utilizadas fornecendo açúcares redutores para o processo de ajustamento osmótico (Kingston-Smith et al., 1999).

Outra explicação para a redução da variável açúcares redutores pode ser devido a exsudação de glicose e frutose pelas raízes das mudas que receberam a maior dosagem de alumínio como forma de tolerância ao estresse sofrido pela planta ou devido a interferência do Al³⁺ na absorção, transporte e uso de Mg²⁺ (Freitas et al., 2006), indicando que para as condições deste experimento, a espécie em estudo mostrou-se adaptativa, proporcionando mecanismos de tolerância ao estresse causado pelo alumínio.

Para os açúcares não redutores, é possível explicar a leve redução na maior dosagem de alumínio nas folhas e raízes (Figura 9 B e Tabela B), pela redução de açúcares solúveis totais (Figura 8 A e B), sugerindo que, apesar dos decréscimos, não houve significância, fomentando a atuação dos mecanismos de defesa a fim de preservarem a integridade celular de proteínas, enzimas e membranas, para a continuidade das atividades vitais, constituindo estratégias adaptativas aos múltiplos efeitos causados pela fitotoxicidade de alumínio (Abdul Jaleel et al., 2007).

2.4.6 Osmólitos compatíveis

Os acréscimos dos osmólitos compatíveis conforme aumento das concentrações de alumínio (Figura 10), foi essencial na atenuação do estresse causado por este metal nas mudas de *B. excelsa*, uma vez que estão envolvidas na indução de tolerância a estresses osmóticos (Filippou et al., 2013). Em situações de estresse, o teor de prolina tende a acumular em células vegetais para ser usada como energia após o fim do estresse, com a redistribuição de nitrogênio e carbono e para a recuperação de atividades fisiológicas na planta (Hemaprabha et al., 2013).

A prolina atua como osmorregulador (Queiroz et al., 2010; Cia et al., 2012), assim, a maior concentração de prolina nas folhas e nas raízes (Figura 10 C e Tabela 6) das mudas submetidas a maior dosagem de alumínio, provém, possivelmente, da biossíntese e do seu acúmulo no vacúolo ou citosol a fim de manter as funções celulares (Kavikishor et al., 2005). Ainda, segundo Silveira et al. (2002), existem evidências de que a biossíntese desse aminoácido poderia estar também associada à regulação do pH citosólico ou mediação do incremento da razão $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, influenciando o fluxo de carbono devido à via oxidativa da pentose fosfato.

O aumento da concentração da variável glicina betaína em mudas de *B. excelsa* em condição de estresse por alumínio pode estar associado ao mecanismo de defesa e proteção do metabolismo vegetal (Carlin; Santos, 2009), uma vez que a principal função consiste em proteger as membranas dos tilacóides para manter a eficiência fotoquímica na fotossíntese, com uma possível proteção fotossintética (Ashraf; Foolad, 2007), apesar deste mecanismo não ter sido suficiente para evitar danos aos pigmentos fotossintéticos deste estudo.

Os efeitos nocivos da fitotoxicidade por alumínio não causaram danos severos às mudas de *B. excelsa* no período estudado, assim, mesmo com reduções de algumas variáveis

bioquímicas na presença da dosagem de 80 mg L^{-1} , os osmólitos compatíveis e demais defesas da planta, conferiram maior estabilidade ao metabolismo da *B. excelsa*.

2.5 Conclusão

Embora o alumínio tenha reduzido as variáveis de pigmentos fotossintéticos, nitrato, atividade da redutase do nitrato, amônio, N-aminossolúveis, açúcares solúveis totais, açúcares redutores e não redutores e sacarose, influenciando o comportamento bioquímico das mudas de *B. excelsa* na maior concentração de Al^{3+} , aumentou as proteínas solúveis e fomentou a atuação dos osmorreguladores na defesa da toxidez, possibilitando a *B. excelsa* o desenvolvimento de mecanismos de tolerância ao alumínio, para manter as atividades bioquímicas.

REFERÊNCIAS

- Abdul Jaleel C, Manivannan P, Kishorekumar A, Sankar B, Gopi R, Somasundaram R, Panneerselvam R (2007) Alterations in osmoregulations, antioxidant enzymes and indole alkaloid levels in *Catharanthus roseus* exposed to water defi cit. *Coll and Surf B: Bioint* 59: 150-157.
- Andrade Netto JF. Atividade das enzimas redutase do nitrato e glutamina sintetase em cafeeiro arábica. 2005. 60 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- Aquino EL, Santos ADS, Souza GD, Silva PCC (2013) Plantas de amendoim (*Arachis hypogaeae* L.) submetidas à diferentes doses de alumínio em solução nutritiva. *Encic Bio* 9: 1698-1714.
- Ashraf M, Foolad MR (2007) Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Envir Exp Bot* 59: 206-216.
- Bartley GE, Scolnik PA (1995) Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *Plant Cell* 7: 1027-1038.
- Bates L, Waldren RP, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39: 205-207.
- Bohnert HJ, Shen B (1999) Transformation and compatible solutes. *Sci Hort* 78: 237– 260.
- Bloom AJ, Sukrapanna SS, Warner RL (1992) Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. *Plant Physi* 99: 1294-1301.
- Blum A, Ebercon A (1981) Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat. *Crop Sci* 21: 43-47.
- Bradford M (1976) A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

- Carlin SD, Santos DMM (2009) Indicadores fisiológicos da interação entre déficit hídrico e acidez do solo em cana-de-açúcar. *Pesq Agrop Bras* 44: 1106-1113.
- Cataldo DA, Haroon M, Schrader LE, Youngs VL (1975) Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Commun Soil Sci Plant Anal* 6: 71-80.
- Cia MC, Guimarães ACR, Medici LO, Chabregas SM, Azevedo RA (2012) Antioxidant responses to water deficit by drought-tolerant and – sensitive sugarcane varieties. *Annals Appl Bio* 161: 313-324.
- Copeland L, Lima ML (1992) The effect of aluminum on Enzyme activities in wheat roots. *J Plant Physiol* 140: 641-645.
- Cordeiro L (2004) Fixação do nitrogênio. In: Kerbauy, G. B. *Fisiologia vegetal*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 452 p.
- Cunha GOM, Almeida JÁ, Barboza BB (2014) Relação entre o alumínio extraível com kcl e oxalato de amônio e a mineralogia da fração argila, em solos ácidos brasileiro. *Rev Bras Ciên Solo* 38: 1387-1401.
- Chaves Filho AT, Seraphin ES (2001) Alteração no potencial osmótico e teor de carboidratos solúveis em plantas jovens de lobeira (*Solanum lycocarpum* St.-Hil.) em resposta ao estresse hídrico. *Rev Bras Bot* 24: 199-204.
- Clarkson DT (1966) Effect of aluminum on the uptake and metabolism of phosphorus by barley seedlings. *Plant Phys* 41: 65-72.
- Cruz FJR, Lobato AKS, Costa RCL, Lopes MJS, Neves HKB, Neto CFO, Silva MHL, Filho BGS, Junior JAL, Okumura RS (2011) Aluminum negative impact on nitrate reductase activity, nitrogen compounds and morphological parameters in sorghum plants. *Aust J Crop Sci* 5: 641-645.
- Dubey RS (1999) Protein Synthesis by Plants Under Stressful Conditions. In: PESSARAKLI, M. (ED.). *Handbook of plant and crop stress*, Tukson: Marcel Dekker, Inc., p.365-397. 1999.

- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28: 350-356.
- Falcão LD, Barros DM, Gauche C, Luiz MTB (2003) Copigmentação intra e intremolecular de antocianinas: uma revisão. *CEPPA* 21: 351-366.
- Ferreira DF (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência Agrotec* 35: 1039-1042.
- Fernandes MS (2006) *Nutrição mineral de plantas*. SBCS, 432p.
- Filippou P, Antoniou C, Fotopoulos V (2013) The nitric oxide donor sodium nitroprusside regulates polyamine and proline metabolism in leaves of *Medicago truncatula* plants. *Free Rad Biol Med* 56: 172-183.
- Freitas FA, Kopp MM, Sousa RO, Zimmer PD, Carvalho FIF, Oliveira AC (2006) Absorção de P, Mg, Ca e K e tolerância de genótipos de arroz submetidos a estresse por alumínio em sistemas hidropônicos. *Ciênc Rur* 36: 72-79.
- Giannakoula A, Moustakas M, Mylona P, Papadakis I, Yupsanis T (2008) Aluminum tolerance in maize is correlated with increased levels of mineral nutrients, carbohydrates and proline, and decreased levels of lipid peroxidation and Al accumulation. *Journal of Plant Physiology* 165: 385-396.
- Gilbert GA, Gadush MV, Wilson C, Madore MA (1998) Amino acid accumulation in sink and source tissues of *Coleus blumei* Benth. during salinity stress. *J Exp Bot* 49: 107-114.
- Greive CM, Grattan SR (1983) Rapid assay for determination of water-soluble quaternary amino compounds. *Plant Soil* 70: 303-307.
- Hageman RH, Hucklesby DP (1971) Nitrate reductase from higher plants. *Methods Enzymol* 17: 491-503.

- Heldt HW (2005) Plant biochemistry. 3th ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 522 p.
- Hemaprabha G, Swapna S, Lavanya DL, Sajtha B, Venkataramana S (2013) Evaluation of Drought Tolerance Potential of Elite Genotypes and Progenies of Sugarcane (*Saccharum sp.* hybrids). Sugar Tech: 15: 9-16.
- Hoekstra FA, Golovina EA, Buitink J (2001) Mechanism of plant desiccation tolerance. Trends Plant Sci 6: 431-438.
- Horst WJ, Wang Y, Eticha D (2010) The role of the root apoplast in aluminium induced inhibition of root elongation and in aluminium resistance of plants: a review. Ann Bot 106: 185-197.
- Jouve L, Hoffmann L, Hausman JF (2004) Polyamine, carbohydrate, and proline content changes during salt stress exposure of aspen (*Populus tremula L.*): involvement of oxidation and osmoregulation metabolism. Plant Biol 6: 74-80.
- Justino GC, Cambraia J, Oliva MA, Oliveira JÁ (2006) Absorção e redução de nitrato em duas cultivares de arroz na presença de alumínio. Pesq Agrop Bras 41: 1285-1290.
- Kaiser BN, Gridley KL, Brady JE, Phillips T, Tyerman SD (2005) The role of molybdenum in agricultural plant production. Annals Bot 96: 745-754.
- Kingston-Smith AH, Walker RP, Pollock CJ (1999) Invertase in leaves: conundrum or control point. J Exp Bot 50:735-743.
- Kochian LV, Hoekenga OA, Piñeros MA (2004) How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. Annual Rev Plant Biol 55: 459-493.
- Kováčik J, Klejdus B, Hedbavny J (2010) Effect of aluminium uptake on physiology, phenols and amino acids in *Matricaria chamomilla* plants. J Hazard Mater 178: 949-955.

- Klimashevskii EL, Mrakiva YA, Bernatzkaya LM, MalySheva, AS (1972) Physiological response to aluminium toxicity in the root zone of pea varieties. *Agroch* 6: 487-496.
- Klimashevskii EL, Markova YA, Seregina ML, Grodzinskii DM, Kozarenko TD (1970) Specifics of the physiological activity of pea plants in connection with unequal resistance of different varieties to mobile aluminum. *Sov Plant Physiol* 17: 372-378, 1970.
- Krtková J, Havelková L, Ki Repelová AFR, Vosolsobe S, Novotná Z, Martinec J, Schwarzerová KR (2012) Loss of membrane fluidity and endocytosis inhibition are involved in rapid aluminum-induced root growth cessation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem* 60: 88-97.
- Lee BR, Jin YL, Jung WJ, Avice JC, Morvan-Bertrand A, Ourry A, Park CW, Kim TH (2008) Water-deficit accumulates sugars by starch degradation - not by de novo synthesis - in white clover leaves (*Trifolium repens*). *Physiol Plant* 134: 403-411.
- Leuschner C, Moser G, Bertsch C, Roderstein M, Hertel D (2007) Large altitudinal increase in tree root/shoot ratio in tropical mountain forests of Ecuador. *Basic Appl Ecol* 8: 219-230.
- Lemos Filho JP (1982) Efeito do alumínio sobre os teores de alguns elementos minerais, sobre a fotossíntese e sobre a atividade de certas oxidases em sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench). 46 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- Lichthenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: Colowick SP, Kaplan NO (Ed) *Methods in Enzymology*, v.148. Academic Press, San Diego. p.350-382.
- Li SX, Wang ZH, Stewar BA (2013) Responses of crop plants to ammonium and nitrate N. *Adv Agron* 118: 205-397.
- Ma JF, Ryan PR, Delhaize E (2001) Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends Plant Sci* 6: 1360-1385.

- Maués MM, Krug C, Wadt LHO, Drumond PM, Cavalcante MC, Santos ACS (2015) A castanheira-do-brasil: avanços no conhecimento das práticas amigáveis. *Funbio* 84 p.
- Mihailovic N, Drazic G, Vucinic Z (2008) Effects of aluminium on photosynthetic performance in Al-sensitive and Al-tolerant maize inbred lines. *Photosy* 46: 476-480.
- Milivojevic DB, Stojanovic DD (2003) Role of calcium in aluminum toxicity on content of pigments and pigment-protein complexes of soybean. *J Plant Nutrit* 26: 341-350.
- Nascimento HHC, Nogueira RJMC, Silva EC, Silva MA (2011) Análise do crescimento de mudas de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) em diferentes níveis de água no solo. *Rev árv* 35: 617-626.
- Panda SK, Baluska F, Matsumoto H (2009) Aluminum stress signaling in plants. *Plant Sign & Beha* 4: 592-597.
- Prochnow LI (2004) Avaliação e Manejo da acidez do solo. *Better Crops* 98: 1-5.
- Peres CA, Baider C, Zuidema PA, Wadt LHO, Kainer KA (2003) Demographic threats to the sustainability of Brazil nut exploitation. *Sci* 302: 2112-2114.
- Ramos AC, Façanha A, Palma LM, Okorokov LA, Cruz ZMA, Silva AG, Siqueira AF, Bertolazi AA, Canton GC, Melo J, Santos WO, Schimitberger VMB, Okorokova-Façanha AL (2011) An outlook on ion signaling and ionome of mycorrhizal symbiosis. *Braz J Plant Phys*, 23: 79-89.
- Rengel Z, Zhang WH (2003) Role of dynamics of intracellular calcium in aluminum toxicity syndrome. *New Phytologist* 159: 295-314.
- Salomão RP (2009) Densidade, estrutura e distribuição espacial da castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H & B) em uma floresta tropical de platô na Amazônia Setentrional. *Boletim do Museu Paraense Emilio Goeldi. Série bot* 4: 11-25

- Santos LA, Santos WA, Sperandio MVL, Bucher CA, Souza SRA, Fernandes MS (2011) Nitrate uptake kinetics and metabolic parameters in two rice varieties grown in high and low nitrate. *J Plant Nutri* 34: 988-1002.
- Silva MA, Jifon JL, Silva JAG, Sharma V (2007) Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. *Braz J Plant Phys* 19: 193-201.
- Silveira JAG, Rocha IMA, Viégas RA (2002) Metabolic responses of cowpea and cashew plants exposed to salt and water stress: new aspects on proline accumulation. Universidade Federal do Ceará, Departamento de Bioquímica e Biologia molecular. Disponível em <<http://sbbq.iq.usp.br/arquivos/regional/2002/cdresumo/Palestras/016.pdf>> Acesso em 04 Fev. 2018.
- Souza SR, Fernandes MS (2006) Nitrogênio. In: Fernandes MS. *Nutrição Mineral de Plantas*. Ed. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, 432p.
- Stitt M, Muller C, Matt P, Gibon Y, Carillo P, Morcuende R, Scheible WR, Krapp A (2002) Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *J Ex. Bot* 53: 959-970.
- Van Handel E (1968) Direct microdetermination of sucrose. *Anal Biochem* 22: 280-283.
- Vincentz M, Moureaux T, Leydecker MT (1993) Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves by nitrogen and carbon metabolites. *The Plant J* 3: 313-324.
- Weatherburn MW (1967) Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal Chem* 39: 971-974.
- Yang Q, Wang Y, Zhang J, Shi W, Qian C, Peng X (2007) Identification of aluminum responsive proteins in rice roots by a proteomic approach: cysteine synthase as a key player in Al response. *Prote* 7: 737-749.

Yang JL, Zhu XF, Peng YX, Zheng C, Li GX, Liu Y, Shi YZ, Zheng SJ (2011) Cell wall hemicellulose contributes significantly to aluminum adsorption and root growth in *Arabidopsis*. *Plant Physi* 155: 1880–1892.

Yemm EW, Cocking EC (1955) The determination of amino-acids with ninhydrin. *Analyst* 80: 209-213.

ANEXOS

Tabela 7. Comparação de médias pelo teste de tukey a 5% de significância dos teores de alumínio em cada variável bioquímica de mudas de *B. excelsa*.

Variáveis bioquímicas		Alumínio (mg L ⁻¹)				
		0	20	40	60	80
Vazamento de eletrólitos	Folha	3,74 a	4,24 a	4,27 a	3,92 a	4,69 a
	Raiz	3,26 c	3,76 ab	3,42 abc	3,19 bc	3,89 a
Redutase do nitrato	Folha	0,23 a	0,17 ab	0,109 b	0,101 b	0,104 b
	Raiz	0,23 a	0,229 a	0,21 a	0,228 a	0,228 a
Clorofila <i>a</i>	-	0,97 a	0,45 b	0,40 b	0,42 b	0,33 b
Clorofila <i>b</i>	-	2,05 a	2,06 a	1,55 ab	1,70 ab	1,47 b
Clorofila total	-	2,27 a	2,09 ab	1,58 bc	1,74 abc	1,50 c
Carotenóides	-	0,62 a	0,52 ab	0,59 a	0,58 a	0,44 b
Antocianinas	-	0,23 ab	0,24 a	0,186 b	0,188 ab	0,17 b
Nitrato	Folha	0,186 a	0,17 a	0,181 a	0,16 a	0,15 a
	Raiz	0,25 a	0,22 a	0,21 a	0,17 a	0,23 a
Amônio livre	Folha	1,90 a	1,36 b	1,38b	1,30 b	1,35 b
	Raiz	2,06 a	2,08 a	1,54 ab	1,75 ab	1,28 b
N-aminossolúveis	Folha	2,49 a	2,53 a	2,26 a	2,46 a	2,36 a
	Raiz	2,19 ab	2,14 ab	2,11 ab	2,42 a	2,07 b
Proteínas solúveis totais	Folha	1,08 ab	1,24 a	1,10 ab	1,02 b	1,14 ab
	Raiz	1,35 a	1,41 a	1,36 a	1,33 a	1,38 a
Açúcares solúveis totais	Folha	1,29 a	1,05 a	1,319 a	1,310 a	1,25 a
	Raiz	1,22 a	1,07 b	1,13 ab	1,02 b	1,05 b
Açúcares redutores	Folha	0,54 a	0,59 a	0,628 a	0,629 a	0,49 a
	Raiz	0,72 a	0,61 a	0,60 a	0,58 a	0,62 a
Açúcares não redutores	Folha	1,08 a	0,85 a	1,17 a	1,13 a	0,98 a
	Raiz	0,98 a	0,80 ab	0,88 ab	0,60 b	0,82 ab
Sacarose	Folha	0,73 a	0,54 b	0,41 b	0,46 b	0,43 b
	Raiz	0,60 a	0,54 ab	0,51 ab	0,44 b	0,55 ab
Prolina	Folha	0,85 c	0,77 c	1,02 bc	1,39 ab	1,64 a
	Raiz	1,04 a	1,15 a	1,14 a	1,03 a	1,05 a
Glicina betaína	Folha	1,66 d	1,67 cd	1,74 c	1,86 b	1,94 a
	Raiz	1,79 c	1,78 c	1,89 b	2,00 a	2,06 a

Letras distintas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.