



Universidade de Brasília – UnB

Instituto de Biologia

Departamento de Botânica

Aspectos fisiológicos, fitoquímicos e proteômicos de *Qualea grandiflora* Mart.
em resposta ao alumínio

Renata Cristina Costa e Silva

Dissertação apresentada ao programa de Pós-
Graduação em Botânica da Universidade de
Brasília como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre

Brasília-DF
setembro 2012



Universidade de Brasília – UnB

Instituto de Biologia

Departamento de Botânica

Aspectos fisiológicos, fitoquímicos e proteômicos de *Qualea grandiflora* Mart.
em resposta ao alumínio

Renata Cristina Costa e Silva

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alfredo Rodrigues Pereira

Dissertação apresentada ao programa de Pós-
Graduação em Botânica da Universidade de
Brasília como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre

Brasília-DF
setembro 2012

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida, pelas oportunidades lançadas e pelo dom do Espírito Santo.

Sou grata a todos que, indistintamente, através de sua vivência e compreensão, contribuíram para que eu chegasse até aqui. Agradeço em especial:

Ao professor Dr. Luiz Alfredo Rodrigues Pereira, pela orientação, confiança e compreensão recebida e acima de tudo pelo exemplo de profissional, que contribuiu incansavelmente para o meu crescimento pessoal e profissional. Obrigada pela paciência e apoio em todos os momentos que marcaram o curso.

Aos professores Dr. Lúcio Flávio de Alencar Figueiredo e Dra. Eliane Ferreira Noronha, pelo acompanhamento e participação constante na realização deste trabalho.

Aos professores Dra. Simoni campos e Dr. Octávio Luiz Franco por disponibilizarem o laboratório de proteômica da Universidade Católica de Brasília para as análises em 2-DE. Agradeço também ao mestrando Nelson Júnior por me acompanhar e dar dicas. Obrigada pela confiança de vocês.

À Dra. Jackeline Leite Pereira e ao Msc. Marcelo Ramada pelas valiosas contribuições nas análises proteômicas. Sem vocês não teria finalizado os experimentos nessa linha de pesquisa. Obrigada Jack, pelas palavras estimulantes e consoladoras, sobretudo pela sua paciência e dedicação.

Às amigas Juliane Laner Toledo, Raíssa Guimarães Leite que da mesma forma tiveram participação ativa e importante na realização deste trabalho: o auxílio de vocês foi valioso.

Aos demais colegas e funcionários do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, Anatomia e Fisiologia Vegetal e Taxonomia de Plantas, em especial, Fábio Nakamura, Thiago, Jéssika, Patrícia Monah, Anabele, Ludmila, Estevão, Bruno Edson, Fernanda, Mayco, André Hugo, Duda, Daiane e William pela amizade e carinho.

A todo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Botânica que proporcionaram minha formação.

A toda minha família, em especial meus pais João Teodoro e Maria Goretti e minha irmã Christiane pelo carinho, compreensão, ajuda, paciência e essencialmente pelo incentivo para que eu vencesse mais essa etapa.

Aos meus tios Ana Lúcia e Nídio pelo acolhimento, paciência e carinho. Muito obrigada por me receberem e tratarem tão bem em todos os dias que estive em Brasília. Tia, a senhora foi uma segunda mãe para mim.

Aos meus padrinhos Iolanda e Delinho pelas palavras amigas e orações, sobretudo pelo orgulho estimulante para que eu seguisse nessa caminhada.

À minha avó Afonsina a quem amo muito, pioneira dessa família maravilhosa da qual tanto me orgulho. À minha avó Nilza, tia Rosa, Dona Zilda e meus padrinhos Pedro e Elizabeth pelas orações.

Ao meu primo Leandro por me ajudar sempre que precisei.

Ao meu *honey* Leandro, pelo amor e pela ajuda, por sempre me estimular, acompanhar e entender os momentos de ausência.

À minha grande amiga Raíssa: “tudo o que sempre esperei de uma amiga encontrei em ti”. Obrigada por tudo!!!

A todas as pessoas que colaboraram de forma direta ou indireta, para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

1. PHYSIOLOGICAL ASPECTS, PHYTOCHEMICALS AND PROTEOMIC OF <i>QUALEA GRANDIFLORA</i> MART. IN RESPONSE TO THE ALUMINUM	2
1.1. Keywords.....	2
2. ASPECTOS FISIOLÓGICOS, FITOQUÍMICOS E PROTEÔMICOS DE <i>QUALEA GRANDIFLORA</i> MART. EM RESPOSTA AO ALUMÍNIO	3
2.1. Resumo.....	3
3. INTRODUÇÃO GERAL	4
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
4.1. Efeito da presença do alumínio (Al) nos solos.	6
4.2. Efeitos bioquímicos e fisiológicos do Al em plantas sensíveis	6
4.3. Plantas resistentes, tolerantes e acumuladoras de Al	8
4.4. Filogenia das plantas acumuladoras de Al	10
4.5. <i>Qualea grandiflora</i> (Vochysiaceae).....	10
5. OBJETIVO GERAL.....	12
5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13
CAPÍTULO I - Avaliação da resposta fisiológica ao alumínio de <i>Qualea grandiflora</i> Mart. .	20
7.1. ABSTRACT	21
7.2. RESUMO	22
7.3. INTRODUÇÃO	23
7.4. MATERIAL E MÉTODOS	27
7.4.1. Desinfestação, germinação e crescimento de <i>Q. grandiflora</i>	27
7.4.2. Coleta e análises de comprimento, biomassa e estado visual das plantas.....	28
7.4.3. Conteúdo dos pigmentos fotossintetizantes	29
7.5. RESULTADOS	30
7.5.1. Germinação e desenvolvimento das plântulas	30
7.5.2. Avaliação visual das plântulas crescidas em dois tratamentos (sem e com Al).....	30
7.5.3. Comprimento e biomassa aérea e radicular de plântulas crescidas na presença e ausência de Al.....	33
7.5.4. Análise de pigmentos fotossintetizantes	38
7.6. DISCUSSÃO	40
7.6.1. Desenvolvimento das plântulas de <i>Q. grandiflora</i>	40
7.6.2. Avaliação visual das plântulas crescidas em dois tratamentos (sem e com Al).....	40
7.6.3. Comprimento e biomassa aérea e radicular de plântulas crescidas na presença e ausência de Al.....	41
7.6.5. Análise de pigmentos fotossintetizantes	43
7.7. CONCLUSÕES.....	45

7.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
CAPÍTULO II - Histoquímica comparativa da presença de Alumínio em plântulas de <i>Qualea grandiflora</i> Mart.	53
8.1. ABSTRACT	54
8.2. RESUMO	55
8.3. INTRODUÇÃO	57
8.3.1. O alumínio (Al) em plantas	57
8.3.2. Localização do Al em tecidos vegetais	58
8.3.3. Histoquímica vegetal	58
8.4. MATERIAL E MÉTODOS	60
8.4.1. Material vegetal	60
8.4.2. Análise histoquímica na presença e ausência de Al	61
8.5. RESULTADOS	61
8.5.1. Análise anatômica-estrutural de <i>Q. grandiflora</i> nas diferentes condições de crescimento	61
8.5.2. Detecção de Al em raízes, caules e folhas de <i>Qualea grandiflora</i>	62
8.6. DISCUSSÃO	73
8.6.1. Comparação anatômica-estrutural de <i>Q. grandiflora</i> em dois tratamentos: sem Al e com Al	73
8.6.2. Sensibilidade dos testes para determinar o padrão de distribuição do Al em raiz, caule e folhas de <i>Q. grandiflora</i>	73
8.6.3. Movimentação e importância do Al para plântulas de <i>Q. grandiflora</i>	74
8.6.4. Locais onde o Al foi acumulado em plântulas de <i>Q. grandiflora</i>	75
8.7. CONCLUSÕES	78
8.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
CAPÍTULO III - Estudo comparativo do proteoma de raízes e folhas de <i>Qualea grandiflora</i> Mart. em resposta ao alumínio	84
9.1. ABSTRACT	85
9.2. RESUMO	86
9.3. INTRODUÇÃO	87
9.3.1. Cerrado	87
9.3.2. Plantas tolerantes e acumuladoras de Al	87
9.3.3. Proteômica	88
9.3.3.1. Espectrometria de massa	89
9.3.4. <i>Qualea grandiflora</i> Mart. (Vochysiaceae)	94
9.4. MATERIAL E MÉTODOS	95
9.4.1. Fluxograma das análises proteômicas	95
9.4.2. Material vegetal	96
9.4.3. Processamento e extração de proteínas	96
9.4.4. Quantificação de proteínas totais	97
9.4.5. Análises eletroforéticas	98
9.4.6. Análise das imagens	100
9.4.7. Espectrometria de massa	101
9.5. RESULTADOS	102

9.5.1. Estabelecimento do método de extração de proteínas para a análise em 2DE	102
9.5.2. Eletroforese Unidimensional.....	103
9.5.3. Dosagem de proteínas	104
9.5.4. Eletroforese Bidimensional	104
9.5.5. Análise das replicatas	104
9.5.6. Comparação dos Perfis Bidimensionais	105
9.5.7. Espectrometria de massa (MALDI-TOF/TOF)	107
9.5.8. Proteínas identificadas em folha de <i>Q. grandiflora</i>	113
9.6. DISCUSSÃO	116
9.6.1. Extração proteica de tecidos vegetais.....	116
9.6.2. Dosagem de proteínas	117
9.6.3. Eletroforese unidimensional	117
9.6.4. Eletroforese bidimensional	117
9.6.5. Proteínas identificadas e comparação entre os níveis de expressão.....	118
9.7. CONCLUSÕES.....	124
9.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Filogenia das angiospermas acumuladoras de Al (Jansen *et al.*, 2002)..... 1010

Figura 2. *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae). A- visão geral da árvore adulta; B- detalhes dos ramos; C- fruto fechado; D- fruto aberto; E- flor. 11

CAPÍTULO I

Figura 1. Plântulas de *Vochysia thyrsoidea* Pohl à esquerda crescendo em solos calcários com baixas concentrações de Al apresentando folhas cloróticas e à direita crescendo em solo ácido com altas concentrações de Al apresentando folhas saudáveis (Fonte: Haridasan *et al.*, 2008²)...25

Figura 2. Plântulas de *Miconia albicans* (Sw.) Triana, uma acumuladora de Al, à esquerda crescendo em solos calcários com baixos teores de Al. Note que nesse tratamento as plântulas apresentam folhas cloróticas. No centro crescendo em solo de Cerrado campo sujo e à direita crescendo em solo fértil de Mata Galeria de Cerrado ambos com altas concentrações de Al (Fonte: Haridasan *et al.*, 2008²)..... 25

Figura 3. Germinação e cultivo de *Q. grandiflora*. A- Emissão de raiz em sementes de *Qualea grandiflora* por volta do 20º dia de cultivo. B- Cotilédones de plântulas com aproximadamente 35 dias de cultivo. 30

Figura 4. Plântulas de *Q. grandiflora* após 120 dias de crescimento. A- Controle. Perceba que a plântula crescida na ausência de Al apresentou na parte aérea sinais de clorose. B- Crescidas na presença de Al. Note que a plântula crescida na presença de Al apresenta aspecto visual da parte aérea saudável. C- Aspecto visual da raiz principal de plântulas do tratamento controle (esquerda) e do tratamento com Al (direita). Observe que a raiz principal da plântula crescida sem Al (esquerda) cresceu menos que daquela crescida na presença de Al..... 31

Figura 5. Plantas de *Q. grandiflora* após 120 dias de crescimento. A-B Vista geral das plântulas crescidas na presença e ausência de Al. A- Crescidas na ausência de Al (controle).

B- Crescidas na presença de Al. Note que a presença do Al na solução nutritiva foi benéfica para o desenvolvimento dos indivíduos.....32

Figura 6. A- Média do comprimento da parte aérea de *Q.grandiflora* (CPA). 1- Solução controle (média: 30 dias: 17, 08 mm, 60 dias: 28,6845 mm, 120 dias: 98,876, SEM: 0,911, 1,4856 e 2,44231). 2- Solução com AlCl₃ (média 30 dias: 18,5 mm, 60 dias: 35,4886 mm, 120 dias: 132,081, SEM: 0,9896, 2,67 e 3,77468). O Teste T revelou diferenças significantes (P< 0,05). Figura B- Média do comprimento do sistema radicular de *Q.grandiflora* (CRP). 1- Solução controle (média 30 dias: 2,31 mm, 60 dias: 60,2782 mm, 120 dias: 121,47 mm, SEM: 0,561, 2,876 e 3,44716). 2- Solução com AlCl₃ (média 30 dias: 2,34 mm, 60 dias: 89,8807 mm, 120 dias: 159,756 mm, SEM: 0,87, 3,5189 e 4,85281). O Teste T mostrou que houve diferenças significantes entre os dois tratamentos (P<0,05).34

Figura 7. Taxa de crescimento da parte aérea (A) e radicular (B) (%) de plântulas de *Q. grandiflora* na presença e ausência de Al (P<0,05).....37

Figura 8. Massa fresca e seca da parte aérea de plantas de *Q. grandiflora* submetida a dois tratamentos: controle e com AlCl₃ aos 120 dias de tratamento. O Teste T mostrou diferenças significantes. M.F.A.: Massa fresca aérea. M.S.A.: Massa seca aérea. Figura B- Massa fresca e seca da parte radicular de plantas de *Q. grandiflora* submetida a dois tratamentos: controle e com AlCl₃. O Teste T indicou valores significantes. M.F.R.: Massa fresca radicular. M.S.A.: Massa seca radicular. (P<0,05).....38

Figura 9. Taxas de pigmentos fotossintetizantes (clorofila *a*, clorofila *b* e caroteno) de plantas de *Q. grandiflora* submetida a dois tratamentos: controle e com AlCl₃. A- Testes de ANOVA mostraram diferenças significantes em clorofila *a*, clorofila *b*, carotenos e clorofila *a+b* (P<0,05). B- Diferenças visuais observadas entre os diferentes tratamentos. À esquerda controle e à direita com Al.39

CAPÍTULO II

Figura 1. Detecção de Al em raízes de plântulas de *Q. grandiflora* com 120 dias de cultivo utilizando aluminon. A-I. Raízes de plântulas de *Qualea grandiflora* aos 120 dias de crescimento. A-C. Cortes de raízes de *Q. grandiflora* sem uso de corantes. D-F. Secções

transversais de raízes de *Q. grandiflora* crescidas em solução nutritiva sem AlCl_3 submetidas ao teste do aluminon. G-I. Secções transversais de raízes de *Q. grandiflora* crescidas em solução nutritiva com AlCl_3 submetidas ao teste do aluminon. A, D e G- Vista geral da raiz de *Q. grandiflora* em secção transversal. B, E e H- Detalhe do cilindro vascular da raiz de *Q. grandiflora*. C, F e I- Região do córtex e epiderme da raiz de *Q. grandiflora*. Ep: epiderme, Ct: córtex, En: Endodeme, Fl: floema, Me: medula, Pe: periciclo, Xi: xilema. Escalas: A, D, G- 100 μm , B, E e H – 50 μm e C, F e I- 30 μm66

Figura 2. Detecção de Al em raízes de plântulas de *Q. grandiflora* com 120 dias de cultivo utilizando hematoxilina. A-I. Raízes de plântulas de *Qualea grandiflora* aos 120 dias de crescimento. A-C. Cortes de raízes de *Q. grandiflora* sem uso de corantes. D-F. Secções transversais de raízes de *Q. grandiflora* crescidas em solução nutritiva sem AlCl_3 submetidas ao teste da hematoxilina. G-I. Secções transversais de raízes de *Q. grandiflora* crescidas em solução nutritiva com AlCl_3 submetidas ao teste do hematoxilina. A, D e G- Vista geral da raiz de *Q. grandiflora* em secção transversal. B, E e H- Detalhe do cilindro vascular da raiz de *Q. grandiflora*. C, F e I- Região do córtex e epiderme da raiz de *Q. grandiflora*. Ep: epiderme, Ct: córtex, En: Endodeme, Fl: floema, Me: medula, Pe: periciclo, Xi: xilema. Escalas: A, D, G- 100 μm , B, E e H – 50 μm e C, F e I- 30 μm67

Figura 3. Detecção de Al em caules de plântulas de *Q. grandiflora* com 120 dias de cultivo utilizando aluminon. A-F. Caules de plântulas de *Qualea grandiflora* aos 120 dias de crescimento. A-B. Cortes de caules de *Q. grandiflora* sem uso de corantes. C-D. Secções transversais de caules de *Q. grandiflora* crescida em solução nutritiva sem AlCl_3 submetidos ao teste do aluminon. E-F. Secções transversais de caules de *Q. grandiflora* crescidas em solução nutritiva com AlCl_3 submetidos ao teste do aluminon. A, C e E- Vista geral do caule de *Q. grandiflora* em secção transversal. B, D e F- Detalhe da medula do caule de *Q. grandiflora*. Ep: epiderme, Ct: cortex, Fbf: fibras do floema, Flb: fibras libriformes, Fl: floema, Me: medula, Pe: periciclo, Xi: xilema. Escalas: A, C, E- 100 μm e B, D e F – 50 μm68

Figura 4. Detecção de Al em caules de plântulas de *Q. grandiflora* com 120 dias de cultivo utilizando hematoxilina. A-F. Caules de plântulas de *Qualea grandiflora* aos 120 dias de crescimento. A-B. Cortes de caules de *Q. grandiflora* sem uso de corantes. C-D. Secções transversais de caules de *Q. grandiflora* crescida em solução nutritiva sem AlCl_3 submetidos

ao teste da hematoxilina. E-F. Secções transversais de caules de *Q. grandiflora* crescidas em solução nutritiva com $AlCl_3$ submetidos ao teste da hematoxilina. A, C e E- Vista geral do caule de *Q. grandiflora* em secção transversal. B, D e F- Detalhe da medula do caule de *Q. grandiflora*. Ep: epiderme, Ct: cortex, Fbf: fibras do floema, Flb: fibras libriformes, Fl: floema, Me: medula, Pe: periciclo, Xi: xilema. Escalas: A, C, E- 100 μm e B, D e F – 50 μm .
.....69

Figura 5. Detecção de Al na nervura central de folhas de plântulas de *Q. grandiflora* com 120 dias de cultivo utilizando aluminon. A-G. Folhas de plântulas de *Qualea grandiflora* aos 120 dias de crescimento. B-C. Cortes de folhas de *Q. grandiflora* sem uso de corantes. D-E. Secções transversais de folhas de *Q. grandiflora* crescidas em solução nutritiva sem $AlCl_3$ submetidas ao teste aluminon. F-G. Secções transversais de folhas de *Q. grandiflora* crescidas em solução nutritiva com $AlCl_3$ submetidas ao teste do aluminon. B, D e F- Vista geral da folha de *Q. grandiflora* em secção transversal. C, E e G- Detalhe da nervura central da folha de *Q. grandiflora*. cv: câmbio vascular, Eab: epiderme abaxial, Ead: Epiderme adaxial, Pae: parênquima aerífero, Fl: floema, Xi: xilema. Escalas: B-G- 100 μm 70

Figura 6. Detecção de Al na nervura central de folhas de plântulas de *Q. grandiflora* com 120 dias de cultivo utilizando hematoxilina. A-F. Folhas de plântulas de *Qualea grandiflora* aos 120 dias de crescimento. A-B. Cortes de folhas de *Q. grandiflora* sem uso de corantes. C-D. Secções transversais de folhas de *Q. grandiflora* crescidas em solução nutritiva sem $AlCl_3$ submetidas ao teste da hematoxilina. E-F. Secções transversais de folhas de *Q. grandiflora* crescidas em solução nutritiva com $AlCl_3$ submetidas ao teste da hematoxilina. A, C e E- Vista geral da folha de *Q. grandiflora* em secção transversal. B, D e F- Detalhe da nervura central da folha de *Q. grandiflora*. cv: câmbio vascular, Eab: epiderme abaxial, Ead: Epiderme adaxial, Pae: parênquima aerífero, Fl: floema, Xi: xilema. Escalas: A-F- 100 μm ..71

Figura 7. Detecção de Al no limbo de folhas de plântulas de *Q. grandiflora* com 120 dias de cultivo utilizando aluminon e hematoxilina. A-E. Folhas de plântulas de *Qualea grandiflora* aos 120 dias de crescimento. A. Corte da folha de *Q. grandiflora* sem uso de corantes. B e D. Secções transversais de folhas de *Q. grandiflora* crescidas em solução nutritiva sem $AlCl_3$ submetidas aos testes do aluminon e hematoxilina respectivamente. C e E. Secções transversais de folhas de *Q. grandiflora* crescidas em solução nutritiva com $AlCl_3$ submetidas aos testes aluminon e hematoxilina respectivamente. A-E- Vista geral do limbo da folha de *Q.*

grandiflora em secção transversal. Eab: epiderme abaxial, Ead: Epiderme adaxial, Pl: parênquima lacunoso, Pp: parênquima paliádico. Escalas: A-E- 100 μ m. 72

CAPÍTULO III

Figura 1. Esquema mostrando o funcionamento de um espectrômetro de massa para análise de proteínas (Fonte: Pereira, 2007). 90

Figura 2. Fluxograma das etapas de análise proteômica utilizadas nesse trabalho (Adaptado de Rose *et al.*, 2004). 95

Figura 3. Perfil proteico unidimensional (SDS PAGE) - Amostras proteicas de raiz, caule e folha de plântulas de *Q. grandiflora* crescidas com ou sem Al no meio nutritivo. Controle (RC, CC, FC1, FC2) e Al (RAL, CAL, FAL1, FAL2). Coloração com nitrato de prata. MC: Marcador molecular, RC: Raiz controle, CC: Caule controle, FC1: Folha controle 1, FC2: Folha controle 2, RAL: Raiz Al, CAL: Caule Al, FAL1: Folha Al 1, FAL2: Folha Al 2. 103

Figura 4. Perfil bidimensional de proteínas de raízes de plântulas de *Q. grandiflora* aos 120 dias de crescimento sem Al (controle) à esquerda e com Al à direita. Os números são referentes aos *spots* retirados para análise de espectrometria de massas. As amostras de plântulas crescidas com Al apresentaram a intensidade dos *spots* mais evidentes, bem como um número maior destes comparado ao tratamento controle. 108

Figura 5. Perfil bidimensional de proteínas de folhas de plântulas de *Q. grandiflora* aos 120 dias de crescimento sem Al (controle) à esquerda e com Al à direita. Os números são referentes aos *spots* retirados para análise de espectrometria de massas, sendo que aqueles marcados pela seta representam as proteínas identificadas. As amostras de plântulas crescidas com Al apresentaram a intensidade dos *spots* mais evidentes, bem como um número maior destes comparado ao tratamento controle. 109

Figura 6. Expressão diferencial dos *spots* de raiz de *Q. grandiflora* que compreende os spots 1, 2, 24, 30, 32, 37, 38 e 58. Em cada gráfico no canto inferior à esquerda a letra a representa a porção do gel com o *spot* do tratamento controle e b, o mesmo *spot* do gel do tratamento com Al. No gráfico o eixo vertical representa a diferença de porcentagem de volume de

proteína entre as amostras. O eixo horizontal mostra os tratamentos sem (controle) e com Al.
..... 110

Figura 7. Expressão diferencial dos *spots* de folha de *Q. grandiflora* que compreende os spots 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 e 11. Em cada gráfico no canto inferior à esquerda a letra a representa a porção do gel com o *spot* do tratamento controle e b, o mesmo *spot* do gel do tratamento com Al. No gráfico o eixo vertical representa a diferença de porcentagem de volume de proteína entre as amostras. O eixo horizontal mostra os tratamentos sem (controle) e com Al..... 111

Figura 8. Expressão diferencial dos *spots* de folha de *Q. grandiflora* que compreende os spots 12, 15, 16, 17 e 29. Em cada gráfico no canto inferior à esquerda a letra a representa a porção do gel com o *spot* do tratamento controle e b, o mesmo *spot* do gel do tratamento com Al. No gráfico o eixo vertical representa a diferença de porcentagem de volume de proteína entre as amostras. O eixo horizontal mostra os tratamentos sem (controle) e com Al. 112

Figura 9. Estrutura tridimensional da ATPsintase (Fonte: www.ufv.br)..... 121

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Taxa de crescimento da parte aérea (%) de plântulas de *Q. grandiflora*. Perceba que os valores para as plântulas do tratamento com Al foram significativamente maiores que o tratamento controle ($P < 0,05$).....35

Tabela 2. Taxa de crescimento da parte radicular (%) de plântulas de *Q. grandiflora*. Os valores foram significativamente maiores em plântulas do tratamento com Al ($P < 0,05$).36

CAPÍTULO II

Tabela 1. Presença de Al na raiz, caule e folhas de plântulas de *Q. grandiflora* aos 120 dias de crescimento submetidos a dois tratamentos: sem alumínio (controle) e com alumínio (Al). Note que em alguns tecidos, as reações mais intensas de coloração para os dois corantes ocorreram no tratamento com Al. O Al foi detectado pelos testes Aluminon (A) e Hematoxilina (H)..... 65

CAPÍTULO III

Tabela 1. Dosagem de proteínas de amostras de raiz, caule e folha de plantas de *Q. grandiflora* submetida a dois tratamentos. Note que as amostras de plântulas crescidas em Al apresentaram um conteúdo significativamente maior de proteínas ($P < 0,05$)..... 104

Tabela 2. Comparação entre as réplicas dos géis bidimensionais de cada condição de crescimento..... 105

Tabela 3. Relação de *spots* encontrados de folhas de plântulas de *Q. grandiflora* em perfil 2DE. Note que o número de *spots* detectados no tratamento com Al para as duas amostras (raiz e folha) foi maior que no controle..... 107

Tabela 4. Proteínas de folhas identificadas em *Q. grandiflora* aos 120 dias de tratamento (sem e com Al)..... 115

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

- 2-DE – Eletroforese bidimensional
- Ab – Absorbância
- ALMT – Aluminum malate transporter
- Al – Alumínio
- Al³⁺ - Alumínio trivalente
- Al₁₃ – Polímero de alumínio
- AlCl₃ – Cloreto de alumínio
- Al₂SiO₅ - Silicato de alumínio
- Al(OH), AlOH²⁺, Al(OH)⁺₂, Al(OH)₃, Al(OH)⁻₄– Hidróxido de alumínio
- AlPO₄ – Fosfato de alumínio
- AlSO⁺₄ – Sulfato de alumínio
- ATP – Adenosina tri fosfato
- C - Controle
- CO₂ – Gás carbônico
- CPA - Comprimento da parte aérea
- CRP - Comprimento da raiz principal
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- DMF - N, N-dimetilformamida
- DTT – Ditioneitol
- EDX - detector de dispersão de energia de raio-X
- EST - *Expressed sequence tags*
- FAL – Fazenda água limpa
- Q. grandiflora* – *Qualea grandiflora*
- HCl – Ácido clorídrico
- IEF – isoeletrofocalização
- KDa - Quilodalton
- KOH – Hidróxido de potássio
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- MALDI-ToF - *Matrix Assisted Laser Desorption /Ionization- Time Of Flight*
- MATE - *Aluminum-activated citrate and malate transporters*
- M.E.T.- Microscópio Eletrônico de Transmissão
- M.F.A - Massa fresca aérea

M. F. R. – Massa fresca radicular
M.M. – Massa molecular
MS - *Mass spectrometry*
MS - Murashige e Skoog (1962)
M.S.A. - Massa seca da parte aérea
M. S. R. – Massa seca da parte radicular
Nº - Número
N - Normal
NaClO – Hipoclorito de sódio
NaIO₃ – Iodato de sódio
NCBI - *National Center for Biotechnology Information*
NO – Óxido nítrico
P.I. – Ponto isoelétrico
PMF - *Peptide Mass Fingerprint*
ppm – Parte por milhão
PRX - Peroxirredoxina
PSD - *post source decay*
PVPP – polivinilpolipirrolidona
ROS – Espécie reativa do Oxigênio
RSA - resistência sistêmica adquirida
SDS PAGE - *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*
SEM – Erro padrão
T.C.A. - Taxa de crescimento da parte aérea.
TCA – Ácido tricloroacético
T.C.R. - Taxa de crescimento radicular.
TFA – Ácido trifluoroacético
TRX - Tiorredoxina

Aspectos fisiológicos, fitoquímicos e proteômicos de *Qualea grandiflora* Mart. em resposta ao alumínio

1. PHYSIOLOGICAL, PROTEOMIC AND PHYTOCHEMICALS OF *QUALEA GRANDIFLORA* MART. IN RESPONSE TO ALUMINUM

1.1. Abstract: The aluminum (Al) is the most abundant metal on the earth's crust, affecting the growth and development of plants. The effects of this metal on sensitive species as well as tolerance to Al have been studied for decades; however, the biochemical and physiological mechanisms remain unclear. Many Cerrado species, besides tolerating the presence of Al, accumulate this metal. The objective of this study was to investigate and compare physiological and molecular responses of *Qualea grandiflora* to Al and also analyze Al mobilization in order to better understand the mechanisms of tolerance and accumulation of this plant species. Seedlings of *Q. grandiflora* were grown with or without Al for 120 days and Al, which was provided in form of AlCl₃ (150 mM). The following growth parameters were evaluated: shoot and root length, root and shoot biomass and photosynthetic pigments. Moreover, to detect Al in roots, stems and leaves, two histochemical tests were used: hematoxylin and aluminon. Additionally, protein was extracted from roots and leaves to analyse the protein profile of plants from both treatments (with or without Al) using two-dimensional gels. It has been noticed that plants grown in the presence of Al showed a higher rate of root growth (23.9%), shoot (25.73%) as well as higher biomass accumulation in these regions (37% to 40% for root and shoot) respectively in comparison with the treatment without Al (control). Moreover, the chlorophyll (*a / b*) rates and carotenes were higher in plants treated with Al (11.472, 5.551 and 5.002). The histochemical tests revealed that *Q. grandiflora* mobilized Al and also accumulated it in all organs regardless of the treatment - root (cortex, endodermis, pericycle and phloem), stem (cortex, endodermis, pericycle, phloem and marrow) and leaf (epidermis, palisade and spongy parenchyma and phloem) - However, the reactions were more intense in samples from Al grown plant. Furthermore, the histochemical tests results indicated a possible accumulation of Al in chloroplasts. The proteomic analyzes corroborate the physiological and immunohistochemical analyses. In the presence of Al, it has been observed that *Q. grandiflora* differentially expressed proteins involved in energy metabolism, photosynthesis, and antioxidant metabolism. The results of this study revealed that Al may play an important role in the metabolism of this Al accumulating species.

Keywords: Aluminium, physiological response, histochemistry, proteome, *Q. grandiflora*.

2. ASPECTOS FISIOLÓGICOS, FITOQUÍMICOS E PROTEÔMICOS DE *QUALEA GRANDIFLORA* MART. EM RESPOSTA AO ALUMÍNIO

2.1. Resumo: O alumínio (Al) é o metal mais abundante na crosta terrestre, afetando o crescimento e o desenvolvimento das plantas. Os efeitos desse metal sobre as espécies sensíveis e tolerantes ao Al têm sido estudados por décadas, contudo, os mecanismos bioquímicos e fisiológicos continuam obscuros. Muitas espécies do Cerrado, além de não sofrer com a presença de Al, são acumuladoras deste metal. O objetivo deste trabalho foi investigar e comparar respostas fisiológicas e moleculares de *Qualea grandiflora* na presença de Al bem como analisar a mobilização desse metal das raízes às folhas, de forma a entender os mecanismos de tolerância e acumulação de Al nessa espécie. Plântulas de *Q. grandiflora* foram cultivadas na presença e ausência de Al por 120 dias de forma que o Al foi fornecido sob forma de $AlCl_3$ (150 μ M). Foram avaliados parâmetros fisiológicos de comprimento, biomassa e teores de pigmentos fotossintetizantes de 40 indivíduos (20 de cada tratamento). Outros cinco indivíduos foram separados e avaliou-se a mobilização do Al em raízes, caules e folhas através de testes histoquímicos utilizando aluminon e hematoxilina. No total, 40 indivíduos foram separados para a extração proteica e comparação do perfil bidimensional nos dois tratamentos. Plantas cultivadas na presença de Al apresentaram maior taxa de crescimento radicular (23,9%) e da parte aérea (25,73%), bem como maior biomassa nessas regiões (37% para raiz e 40% para parte aérea) quando comparadas ao tratamento sem Al (controle). Além disso, as taxas de clorofila (a/b) e carotenos foram maiores no tratamento com Al (11,472, 5,551 e 5,002). Nos testes histoquímicos observou-se que *Q. grandiflora* mobiliza e acumula o Al em todos os órgãos independente do tratamento – raiz (córtex, endoderme, periciclo e floema), caule (córtex, endoderme, periciclo, floema e medula) e folha (epiderme, parênquima paliçádico e lacunoso e floema) -, porém, as reações foram mais intensas para plantas crescidas na presença de Al. Além disso, os resultados histoquímicos indicam uma possível imobilização do Al em cloroplastos. O perfil de proteínas corrobora com as análises fisiológicas e histoquímicas. Na presença de Al, observou-se nos mapas proteicos de folhas de *Q. grandiflora* alterações no padrão de expressão de cinco proteínas envolvidas no metabolismo energético, na fotossíntese, além de mecanismos de defesa antioxidante, notando uma possível modulação do Al nesses mecanismos. Os resultados do presente estudo revelaram que o Al tem um papel importante no metabolismo dessa espécie.

Palavras chave: Alumínio, resposta fisiológica, histoquímica, proteoma, *Q. grandiflora*.

3. INTRODUÇÃO GERAL

O Cerrado é um bioma de grande importância para o Brasil, não somente pelo seu tamanho, mas por suas peculiaridades. Entre essas peculiaridades, a acidez do solo é um fator marcante desse bioma (Oliveira *et al.*, 2005). É fato que esta característica não está presente somente em solos do Cerrado, mas em muitas regiões do mundo, e podem afetar negativamente o crescimento das plantas devido a uma combinação de fatores, que incluem a toxidez devido a altas concentrações de metais pesados como alumínio (Al), bem como a deficiência de elementos essenciais, particularmente cálcio, magnésio, fósforo e molibdênio (Silva & Souza 2008). Portanto, os problemas impostos às plantas sensíveis às condições de solos ácidos como os do Cerrado não dependem de um só fator ou agente, mas de um somatório de fatores que afetam diferentes mecanismos bioquímicos e fisiológicos (Tabaldi, 2008).

As relações entre a acidez do solo e a solubilidade do Al, assim como os efeitos desse metal sobre as plantas, começaram a ser estudados nas últimas décadas (Kochian, 1995). Apesar dos vários estudos, o entendimento das vias metabólicas associadas à sensibilidade, resistência e tolerância ao Al em plantas ainda é limitado.

Apesar dos termos “resistência” e “tolerância” ao Al serem frequentemente usados na literatura como sinônimos, quando se referem a estresses abióticos, é importante estabelecer que o termo “resistência” se refere a mecanismos que impedem a entrada de Al na planta, enquanto o termo “tolerância” se refere a mecanismos que desintoxicam ou sequestram o Al internamente (Delhaize *et al.*, 2007). Além disso, alguns autores relatam que algumas espécies de plantas podem acumular Al, sendo denominadas acumuladoras, e são capazes de imobilizar esse metal em compartimentos celulares e também de transportar o Al das raízes até as folhas (Haridasan *et al.*, 2008¹).

Sabe-se que o Al é o metal mais abundante e o terceiro elemento mais comum na crosta terrestre, uma vez que a maioria dos minerais primários das rochas e os minerais secundários que se formam durante o intemperismo são aluminossilicatos e óxidos de Al insolúveis. Dessa forma, as raízes das plantas estão quase sempre expostas ao Al de alguma forma (Haridasan *et al.*, 2008¹). O alumínio trivalente (Al³⁺) é o tipo de Al mais rizotóxico, pois é capaz de se ligar a moléculas biológicas em diferentes constituintes celulares como parede celular, membrana plasmática e protoplasma (Kochian *et al.*, 2004). Além disso, o Al

pode causar estresse oxidativo, levando a oxidação de biomoléculas como lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e pigmentos fotossintetizantes (Kochian, 1995; Minocha *et al.* 1992).

Os efeitos do Al em plantas têm sido objetos de muitos estudos. Estes estudos têm mostrado que o Al prejudica o crescimento e o desenvolvimento de plantas sensíveis, como também mostrado a existência de plantas resistentes e/ou tolerantes (Delhaize *et al.*, 2012). Entretanto, não há relatos de estudos sobre mecanismos de acúmulo desse metal a nível molecular em plantas acumuladoras de Al, e são relativamente recentes as tentativas de pesquisar se esse metal desempenha alguma alteração no metabolismo dessas plantas (Haridasan *et al.*, 2008²).

Já há algum tempo se conhece o fato de que diferentes espécies de plantas absorvem quantidades significativas de Al (Jansen *et al.*, 2002) e aquelas que cuja concentração foliar de Al é acima de 1g.kg^{-1} são designadas de acumuladoras (Chenery, 1948). Assim, dentro das espécies vegetais acumuladoras pode haver uma ampla resposta metabólica a esse metal sugerindo que essas espécies possuem mecanismos para superar os efeitos negativos do Al observados em outras plantas (Jansen *et al.*, 2002).

Apesar de o Cerrado conter muitas espécies capazes de acumular Al, estudos dos mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares nesse grupo de plantas ainda são raros ou mesmo inexistentes. Nesse bioma, três famílias se destacam por possuírem espécies de plantas acumuladoras: Melastomataceae, Rubiaceae e Vochysiaceae. Essas famílias têm espécies que acumulam de 4 a $14\text{ g de Al.Kg}^{-1}$ em matéria seca de folhas (Haridasan, 1982).

Nesse trabalho, uma espécie característica do Cerrado foi selecionada: *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae). Essa espécie se caracteriza pela sua abundância e distribuição em diferentes classes de solo do Cerrado. *Q. grandiflora* é capaz de armazenar grandes quantidades de Al em partes aéreas, inclusive em solos de pH acima de 6,0 (Araújo, 1984). Este trabalho se propõe a realizar análises de resposta fisiológica, histoquímica e proteômica dessa espécie na presença e ausência do Al para estudar os efeitos fisiológicos, moleculares e a mobilização desse metal em seu organismo.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Efeito da presença do alumínio (Al) nos solos.

O Al é o terceiro elemento mais abundante na litosfera, logo após o oxigênio e o silício, compondo aproximadamente 8% da crosta terrestre (Jansen *et al.*, 2002). Em solos de pH alcalino ou neutro esse elemento se encontra na forma de sais insolúveis, como por exemplo, Al_2SiO_5 , $\text{Al}(\text{OH})_3$, AlPO_4 , e formas organicamente complexas de Al (Jansen *et al.*, 2002). Entretanto, sob certas condições, o Al pode se tornar solúvel, como por exemplo, quando o ambiente torna-se ácido ou quando os níveis de matéria orgânica no solo são altos (Jansen *et al.*, 2002).

Quando o pH do solo se torna ácido, formas solúveis de Al podem acumular-se em concentrações que inibem o crescimento e o funcionamento da raiz de plantas sensíveis. Portanto, à medida que os solos se acidificam, íons Al^{+3} passam a ocupar as posições de troca catiônica, em superfícies eletronegativas dos coloides, em substituição aos cátions removidos pela lixiviação, onde concentrações de espécies de Al podem alcançar níveis tóxicos para esses organismos (Rengel & Zhang, 2003).

Evidências mais recentes sugerem que em solos ácidos, o Al monomérico tais como Al^{3+} , hidróxidos de Al (AlOH^{2+} ; $\text{Al}(\text{OH})^{+}_2$; $\text{Al}(\text{OH})^{-}_4$) e espécies de AlSO^{+}_4 são as formas mais tóxicas para as plantas, juntamente com os polímeros Al_{13} (Kinraide, 1991; Jansen *et al.*, 2002). No entanto, em pHs menores que 5,0; a forma Al^{3+} predomina sobre as outras (Rossiello & Netto, 2006).

A maior parte dos solos do Cerrado é ácida, com valores de pH que permitem a ocorrência do íon trivalente Al^{+3} tanto na solução do solo como em sítios de troca. Nessas condições, o Al é solubilizado e se torna tóxico para plantas sensíveis (Kochian, 1995; Haridasan, 2008¹). Em geral, essas plantas têm seu desenvolvimento comprometido, primariamente por lesar o funcionamento normal das raízes, inibindo o seu crescimento e bloqueando os mecanismos de aquisição e transporte de água e nutrientes (Tabaldi, 2008).

4.2. Efeitos bioquímicos e fisiológicos do Al em plantas sensíveis

É importante compreender como se manifesta a toxicidade do Al^{+3} nas plantas sensíveis, para o melhor entendimento dos mecanismos de tolerância a este elemento. Assim, vários efeitos são descritos na literatura, sendo que os principais envolvem diretamente o

cátion Al^{3+} (Hartwig *et al.*, 2007). Quanto aos sintomas observados relacionados à toxicidade do Al, Beckmann (1954) observou em trigo (*Triticum aestivum* L.) e outros cereais o amarelecimento das folhas e a redução de crescimento da planta, o que denominou de “crestamento”. Os efeitos da toxicidade do Al^{3+} se manifestam rapidamente, e às vezes, em questão de minutos o Al é capaz de inibir o crescimento da raiz, o que resulta em danos ao sistema radicular (Kochian, 1995, 2004; Barceló & Poschenrieder, 2002). A literatura registra numerosos exemplos da rápida ação tóxica do Al que foi observada em trigo (Ma *et al.*, 2004), milho (*Zea mays*) (Li *et al.*, 2000), feijão (*Phaseolus vulgaris*) (Massot *et al.*, 1999, 2002), sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) (Andrade Júnior *et al.*, 2005). Nessas espécies se verificou uma rápida e exacerbada diminuição e/ou inibição do crescimento radicular diretamente associado a vários fenômenos intra e extracelulares (Cakmak & Horst, 1991; Yamamoto *et al.*, 2002).

A diminuição do crescimento das raízes na presença de Al^{3+} muitas vezes se deve à inibição da expansão e alongamento das células das raízes, e também, concomitantemente, da própria divisão celular (Kochian, 1995; Matsumoto, 2000). Um dos sítios da ação tóxica do Al^{3+} está localizado no ápice da raiz, assim muitas pesquisas sobre a tolerância ao Al são focadas nesta região (Kochian, 1995; Sivaguru *et al.*, 1999). Indivíduos sensíveis que crescem em solos contendo altos teores desse metal têm o crescimento do sistema radicular prejudicado, às vezes paralisado, e as raízes se tornam curtas e grossas (Kochian, 1995). Essas anomalias observadas no sistema radicular de plantas sensíveis expostas ao Al^{3+} resultam em menor capacidade de exploração do solo pelas plantas, ocasionando prejuízos no aproveitamento da água e nutrientes minerais (Braccini *et al.*, 1998; Kochian, 2004).

Em decorrência disso, é observada uma diminuição da produtividade das plantas que também resulta numa baixa resposta à fertilização do solo (Bonato 1999). Isso ocorre por três principais motivos: 1) Grande parte dos nutrientes (K, Ca, Mg, N, S, B e P) ficam menos disponíveis em valores de pH mais ácido e outros, como Fe, Cu, Mn e Zn mostram comportamento inverso (Silva & Souza 2008); 2) A translocação de elementos essenciais para dentro da célula da planta é afetada, uma vez que esse metal interfere na absorção e movimentação de importantes elementos como P, Ca e Mg na planta; 3). Além disso, o pH mais baixo contribui para a adsorção do P no solo, pois os hidróxidos de Al ($\text{Al}(\text{OH})_3$) formam ligações químicas muito fortes com ânions fosfatos, diminuindo suas disponibilidades para as plantas (Echart & Cavalli-Molina, 2001).

Em nível celular, em função da rápida reatividade do Al^{3+} , as reações adversas a este elemento podem ocorrer na parede celular, na membrana plasmática, no citoesqueleto e

até no núcleo. Dentro da célula, o Al^{3+} interage com as vias de transdução de sinais, em especial as relacionadas com a homeostase e transporte do cálcio (Ca), alterando os níveis de Ca^{2+} (Zhang & Rengel, 1999), podendo interagir e inibir a enzima fosfolipase C associada às vias de transporte do Ca (Jones & Kochian, 1995). Além disso, o Al trocável pode formar complexos de baixo peso molecular com vários ligantes, tais como grupos carboxilato, sulfato e fosfato. Essa espécie de Al também pode se ligar a grupos mais complexos como ácidos orgânicos (Rossiello & Netto, 2006), assim como a macromoléculas e interferir no metabolismo de açúcares, proteínas fosforiladas, nucleotídeos e ácidos nucléicos (Kochian, 1995; Minocha *et al.* 1992). O metabolismo energético também pode ser afetado uma vez que o Al^{3+} é capaz de formar complexos com ATP e inibir as ATPases e outras fosfatases da membrana plasmática, dificultando ou impedindo a utilização da energia contida nas ligações do ATP pelas células (Calbo & Cambraia, 1980; Cambraia, 1989).

4.3. Plantas resistentes, tolerantes e acumuladoras de Al

Mesmo o Al sendo desfavorável ao desenvolvimento de muitas espécies de plantas, estudos mostram que algumas apresentam resistência a esse metal. Isso foi observado em vários cultivares com genótipos resistentes como em soja (*Glycine max* (L.) Merr.) (Duressa *et al.*, 2010), trigo (*T. aestivum*, L.) (Ryan *et al.*, 1995 in Ryan *et al.*, 2001¹) e arroz (*Oriza sativa* L.) (Jones & Darrah, 1995 in Ryan *et al.*, 2001²). Outras espécies, além de não apresentar sensibilidade ao Al, acumulam esse metal nas partes vegetativas como verificado em *Miconia fallax* DC. (Melastomataceae), *Vochysia thyrsoidea* Pohl (Vochysiaceae) e *Palicourea rigida* Kunth. (Rubiaceae), três espécies lenhosas do Cerrado (Haridasan, 1982; Haridasan, 2008²).

As pesquisas indicam a existência de dois mecanismos: 1) a exclusão do Al das células radiculares, e; 2) tolerância intrínseca a este metal. O primeiro tem sido observado com frequência em espécies de interesse agrônômico, em geral de ciclo anual, cujos teores internos de Al são menores que 0,1g de Al.Kg^{-1} de matéria seca. O segundo mecanismo é mais comum em espécies arbóreas e apresentam em seus tecidos teores de Al de pelo menos 1g de Al.Kg^{-1} de matéria seca e são denominadas de acumuladoras (Chenery, 1948).

Em plantas que excluem o Al, ácidos orgânicos tais como malato, oxalato ou citrato são exsudados na rizosfera o que confere a essas plantas maior resistência ao Al, pois esses compostos realizam a quelatação e imobilização deste metal no solo próximo à raiz impedindo sua entrada (Ma *et al.*, 2001). Esse mecanismo é encontrado em muitas plantas de

interesse agronômico como em *Cassia tora* L. (Ma & Matsumoto 1997), feijão (*P. vulgaris* L.) (Rangel *et al.*, 2010, Eticha *et al.*, 2010; Miyasaka *et al.*, 1991), trigo (*T. aestivum* L.) (Delhaise *et al.*, 1993; revisão de Ma *et al.*, 2001; Sazaki *et al.*, 2004; Ryan *et al.*, 2009) e cevada (*Hordeum vulgare* L.) (Furukawa, *et al.*, 2007).

Nos últimos anos, tem se procurado entender como muitas espécies consentem com elevados níveis de Al solúvel no solo (Haridasan, 1988). Conjectura-se que essas espécies possuem mecanismos internos de desintoxicação do Al ainda não totalmente esclarecidos (MA *et al.*, 2001; Ryan *et al.*, 2011). No entanto, mais recentemente alguns autores têm proposto que para algumas espécies este elemento, além de não ter nenhum efeito tóxico, favorece o crescimento e desenvolvimento dessas plantas (Haridasan *et al.*, 2008^{1,2}), portanto, falar de mecanismos de desintoxicação talvez não seja apropriado nesses casos.

Nas plantas acumuladoras a capacidade de absorção de nutrientes essenciais para o crescimento e reprodução não é prejudicada por altas concentrações de Al no solo (Haridasan *et al.*, 2008²). Muitas espécies comuns do Cerrado absorvem grandes quantidades deste elemento e transportam para folhas ou acumulam em outros órgãos como sementes como observado em *Palicourea rigida* Kunth (Rubiaceae), *Miconia albicans* (Sw.) Triana (Melastomataceae) e *Vochysia thyrsoidea* Mart. (Vochysiaceae) (Haridasan, 2008¹). Medeiros (1983) sugere que o Al é importante no metabolismo dessas espécies. Araújo (1984) sugere que *Qualea grandiflora* Mart., *Callisthene fasciculata* Mart., e outras Vochysiaceae, acumulam Al nas folhas mesmo quando presentes em condições de cerradão mesotrófico, que se caracteriza por apresentar solos com pH acima de 6 e possuírem altos níveis de Ca e Mg e baixa saturação de Al.

Em relação às respostas metabólicas das plantas ao Al, várias pesquisas também indicam o envolvimento de compostos orgânicos nos mecanismos de acúmulo de Al. Assim, em plantas acumuladoras o Al se encontra complexado com compostos orgânicos e/ou sequestrado em compartimentos celulares como parede celular e vacúolo (Ma *et al.*, 2001). Em *Melastoma malabathricum* L. (Melastomataceae) e *Fagopyrum esculentum* Moench. (Polygonaceae), o transporte de Al³⁺ dentro do xilema provavelmente ocorre em forma de citratos (Al:citrato ± 1:1) (Watanabe & Osaki, 2002; Ma *et al.*, 2001). A forma de acúmulo de Al nas folhas de *M. malabathricum* se dá pela formação de oxalatos de Al nos vacúolos (Ma *et al.*, 2001). Além disso, se verificou que nas folhas dessa planta, o Al não induz somente o aumento da concentração de oxalato, mas também de citrato e malato (Watanabe & Osaki, 2002).

4.4. Filogenia das plantas acumuladoras de Al

A maioria das espécies acumuladoras pertence ao grupo das Rosídeas e Asterídeas (Fig. 1) (Jansen *et al.*, 2002). Ao todo são conhecidas 45 famílias com espécies que acumulam Al; das quais 32% pertencem à família Rubiaceae (Jansen *et al.*, 2002). Além de Rubiaceae, as famílias Anisophyllaceae, Celastraceae, Cornaceae, Diapensaceae, Geissolomataceae, Grossulariaceae, Melastomataceae, Pentaphragaceae, Polygonaceae, Proteaceae, Symplocaceae, Theaceae e Vochysiaceae também possuem um considerável número de espécies acumuladoras de Al. Evolutivamente, a característica de acumulação de Al se originou em diferentes épocas durante o processo de evolução vegetal (Jansen *et al.*, 2002).

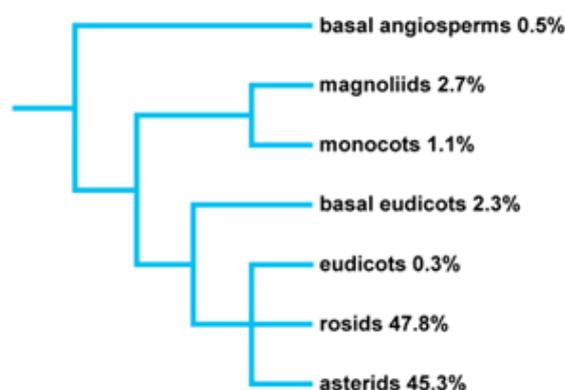


Figura 1. Filogenia das angiospermas acumuladoras de Al (Jansen *et al.*, 2002)

4.5. *Qualea grandiflora* (Vochysiaceae)

Devido às condições intrínsecas do Cerrado, principalmente relacionadas ao solo, é notória a participação de espécies acumuladoras de Al na composição florística deste bioma. A família Vochysiaceae é uma das mais importantes desse grupo (Haridasan & Araújo, 1987). Goodland (1971) aponta *Q. grandiflora* Mart. como uma das espécies acumuladoras mais abundantes do Cerrado.

Ao estudar aspectos nutricionais de um Cerrado e cerradão no Distrito Federal, Ribeiro (1983) concluiu que *Q. grandiflora* está entre as oito espécies mais importantes na composição florística do Cerrado dessa região. Araújo (1984) confirmou os resultados de Ribeiro (1983) e destaca esta espécie entre as oito mais importantes de um cerradão distrófico no Distrito Federal.

A espécie *Q. grandiflora* (Fig. 2) foi selecionada para estudos sobre as respostas fisiológicas, análise histoquímica e proteoma comparativos envolvendo os processos de acúmulo e de tolerância ao Al em plantas nativas. Essa espécie, também conhecida como pau-terra, pau-terra-do-campo e pau-terra-do-Cerrado se destaca por sua abundância nas diferentes classes de Cerrado. Estudos indicam que *Q. grandiflora* pode acumular de 3,91 g a 5,16 g de Al.Kg⁻¹ de matéria seca, principalmente nas partes aéreas (Andrade *et al.*, 2007; Haridasan, 1982).

Q. grandiflora ocorre nos cerrados da Amazônia, São Paulo, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul, tanto em solos distróficos como mesotróficos (Araújo e Haridasan, 1988). O pau-terra é uma árvore de até 15 m, com tronco tortuoso de casca escura e rugosa, pouco espessa (Silva Júnior *et al.*, 2005). Adicionalmente, *Q. grandiflora* é uma espécie heliófita, pioneira, decídua, ocorrendo tanto em formações primárias como secundárias (Lorenzi, 1992), sendo também de ocorrência comum no Cerrado do Distrito Federal.



Figura 2. *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae). A- visão geral da árvore adulta; B- detalhes dos ramos; C- fruto fechado; D- fruto aberto; E- flor (Adaptado de Haridasan *et al.*, 2008¹)

5. OBJETIVO GERAL

O objetivo principal deste trabalho foi estudar a resposta fisiológica e mobilização do Al em *Qualea grandiflora*, visando identificar proteínas envolvidas na tolerância ao Al por meio de estudos proteômicos.

5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar e comparar respostas fisiológicas de crescimento de plantas de *Q. grandiflora* expostas ao Al em solução nutritiva;
- Determinar o padrão histoquímico de distribuição do Al em plântulas de *Q. grandiflora* crescidas na presença e ausência deste metal;
- Obter perfis proteicos bidimensionais de folhas e raízes de plântulas cultivadas nas duas soluções nutritivas controle (sem Al) e com Al e fazer o mapeamento e a identificação de proteínas associadas à tolerância ao Al por espectrometria de massa.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE JUNIOR, V. C.; MOTA, J. H.; CASTRO, N. E. A. DE. Avaliação da tolerância a alumínio de dois genótipos de sorgo. Rev. científica eletrônica de agronomia. n. 07, 2005.

ANDRADE, L. R. M. DE; BECQUER, T.; FRANCO, A. C.; HARIDASAN, M.; MARTINS É. DE S.; Efeito das condições edáficas na disponibilidade e acumulação de alumínio e de nutrientes em plantas nativas do Cerrado. In XI Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, Gramado – Rio Grande do Sul, Brasil, 2007.

ARAÚJO, G.M. Comparação do estado nutricional de dois cerradões em solo distrófico e mesotrófico no Planalto Central do Brasil. Dissertação de Mestrado, Brasília, DF, Universidade de Brasília, 1984.

BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. Environmental and Experimental Botany, Oxford, v.48, n.1, p.75-92, 2002.

BECKMANN, I. Sobre o cultivo e melhoramento do trigo (*Triticum vulgare* Vill) no sul do Brasil. Rev. Agronomia Sulriograndense, v.1, n.1, p.64-72, 1954.

BONATO, C. M. Efeito do alumínio e do sulfato sobre a atividade da sulfúrilase do ATP e sobre o teor de tióis solúveis em dois cultivares de sorgo. Rev. Acta Scientiarum v. 21. p.549-553, 1999.

BRACCINI, M. C. L.; MARTINEZ, H. E. P.; PEREIRA, P. R. G.; SAMPAIO, N. F.; SILVA, E. A. M. Tolerância de genótipos de cafeeiro ao alumínio em solução nutritiva. i. crescimento e desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular. Rev. Bras. Ci. Solo, v.22. p.435-442, 1998.

CAKMAK, I., HORST, W.J. Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tip of soybean (*Glycine max* L.). Journal Physiological Plant. v.834, p. 463-468, 1991.

CALBO, A.G.; CAMBRAIA, J. Efeito do alumínio sobre a composição mineral de dois cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench.) Rev. Ceres, v.27. p.368-378, 1980.

CAMBRAIA, J. Mecanismos de tolerância à toxicidez de alumínio em plantas. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FISILOGIA VEGETAL. 2,1989, Piracicaba. Anais Piracicaba: SBFV/ESALQ, 1989.

CHENERY, E.M. Aluminium in the plant world. Part.I. Kew bulletin, v.2, p.173-183, 1948.

DELHAIZE, E.; RYAN, P.R.; JAMES, R.A. Aluminium tolerance of root hairs underlies genotypic differences in rhizosheath size of wheat (*Triticum aestivum*) grown on acid soil. Journal New Phytol. v.195. n.3. p. 609-619, 2012.

DELHAIZE, E., B.D. GRUBER AND P.R. RYAN. The roles of organic anion permeases in aluminum resistance and mineral nutrition. FEBS Lett., v. 581. p. 2255-2262, 2007.

DELHAIZE, E.; RYAN, P.R.; RANDALL, P.J. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum*) L. II. Aluminumstimulated excretion of malic acid from root apices. Journal Plant Physiology. v.103. p. 695–702, 1993.

ECHART, C. L.; CAVALLI-MOLINA, S. Fitotoxicidade do alumínio: efeitos, mecanismo de tolerância e seu controle genético. Rev. Ciência Rural, Santa Maria, v.31, n.3, p.531-541, 2001.

ETICHA D, ZAHN M, BREMER M, YANG Z, RANGEL AF, RAO IM, HORST WJ. Transcriptomic analysis reveals differential gene expression in response to aluminium in common bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes. Ann Bot. v.105. n.7. p.1119-1128, 2010.

FURUKAWA, J.; YAMAJI, N.; WANG, H.; MITANI, N.; MURATA, Y.; SATO, K.; KATSUHARA, M.; TAKEDA, K.; MA, J.F.; An Aluminum-Activated Citrate Transporter in Barley. Journal Plant Cell Physiol. v. 8. n.48. p. 1081–1091, 2007.

GOODLAND, R. Oligotrofismo e alumínio no cerrado. P. 44-60 in III Simpósio sobre o cerrado. Ed. da Unversidade de São Paulo e Ed. Edgard Blücher. 239 p. 1971.

HARIDASAN, M. Alumínio é um elemento tóxico para as plantas nativas do cerrado? In: Prado, CHBA; Casali, CA. Fisiologia Vegetal: práticas em relações hídricas, fotossíntese e nutrição mineral. Barueri, Editora Manole. v.85, n.204. p.1553-1559, 2008.

HARIDASAN, M. Nutritional adaptations of native plants of the cerrado biome in acid soils. Review: Brazilian Journal of Plant Physiology. 2008.

HARIDASAN, M., ARAÚJO, G. M. Aluminium-accumulating species in two forest communities in the cerrado region of central Brazil. Journal Forest Ecology and Management, v. 24, p. 15-26, 1988.

HARIDASAN, M. & ARAÚJO, G. M. Aluminium accumulating species in two forest communities in the cerrado region of central Brazil. Journal Forest Ecology and Management v. 24 p.15-26, 1987.

HARIDASAN, M., Aluminium accumulation by some cerrado native species of central Brazil. Journal. Plant and soil. v. 65. p.265-273, 1982.

HARTWIG I.; OLIVEIRA A.C.; CARVALHO, F.I.F.; BERTAN I.; SILVA J.A.G.; SCHMIDT D.A.M; VALÉRIO, I.P.; MAIA, L.C.; FONSECA, D.A.R.; REIS, C.E.S. Mecanismos associados à tolerância ao alumínio em plantas. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 28, n. 2, p. 219-228, 2007.

JANSEN, S.; BROADLEY, M.; ROBBRECHT, E.; SMETS, E. Aluminium hyperaccumulation in angiosperms: a review of its phylogenetic significance. Botanical Review, v. 68, p. 235-269, 2002.

JONES, D. L.; DARRAH P. R. Influx and efflux of organic acids across the soil-root interface of *Zea mays* L. and its implications in rhizosphere C flow. Journal Plant and Soil. v.173, p.103– 109, 1995.

JONES, D. L.; KOCHIAN, L. V. Aluminum inhibition of the inositol 1,4,5-triphosphate signal transduction pathway in wheat roots: a role of aluminum toxicity. *Journal Plant Cell, Rockville*, v.7, n.11, p.1913-1922, 1995.

KINRAIDE, T. B. Identity of the rhizotoxic aluminium species. *Journal Plant and Soil, The Hague*, v. 134, n. 1, p. 167-178, 1991.

KOCHIAN, L.V., HOEKENGA, O. A.; PIÑEROS, M. A. How do crop plants tolerate acid soils? mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Journal Plant Biol.*v. 55. p.459–493, 2004.

KOCHIAN, L.V. Cellular mechanism of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annual Review Plant Physiology. Journal Plant Molecular Biology, Nova Iorque*, v.48, p.237-260, 1995.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 352p. 1992.

Li XF, MA JF, Hiradate S, Matsumoto H. Mucilage strongly binds aluminum but does not prevent roots from aluminum injury in *Zea mays*. *Journal Physiology Plant*, v. 108, p. 152–60, 2000.

MASSOT, N. NICANDER B, BARCELÓ J, POSCHENRIEDER C, TILLBERG E. A rapid increase in cytokinin levels and enhanced ethylene evolution precede Al³⁺-induced inhibition of root growth in bean seedlings (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal Plant Growth Regul*, v. 37. p.105–12, 2002.

MASSOT, N.; LLUGANY, M.; POSCHENRIEDER C, BARCELÓ J. Callose production as indicator of aluminum toxicity in bean cultivars. *Journal Plant Nutr.* v.22, p.1–10, 1999.

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

MA, J .F.; RYAN, P. R.; DELHAIZE, E. Aluminum tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *TRENDS in Plant Science*, Oxford, v. 6, n. 6, p. 273- 278, 2001.

MA J.F., ZHENG S.J. & MATSUMOTO H. Specific secretion of citric acid induced by Al stress in *Cassia tora* L. *Journal Plant and Cell Physiology* v.38, p. 1019–1025. 1997.

MATSUMOTO H. Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. *International Review of Cytology*. v.200. p. 1-47, 2000.

MEDEIROS, R.A. Comparação do estado nutricional de algumas espécies, acumuladoras e não acumuladoras de alumínio, nativas do cerrado. Dissertação de Mestrado, Brasília, DF, Universidade de Brasília, 1983.

MINOCHA, R.; MINOCHA, S.C.; STEPHANIE, L.L.; SHORTLE, W.C. Effects of aluminum on DNA synthesis, cellular polyamines, polyamine biosynthetic enzymes and inorganic ions in cell suspension cultures of a woody plant. *Catharauthus roseus*. *Journal Physiol. Plant.*, v. 85. p. 417-424, 1992.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Journal Physiologia Plantarum*, Kopenhagen. v.15, p.473-497, 1962.

MIYASAKA, S. C.; BUTA, J. G.; HOWELL, R. K.; FOY, C. D. Mechanism of aluminium tolerance in snapbeans: root exudates of citric acid. *Journal Plant Physiol*. v.96. p. 737–743, 1991.

RANGEL, F.A.; RAO, I.M. BRAUN, H.P.; HORST, W.J. aluminum resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris*) involves induction and maintenance of citrate exudation from root apices. *Journal Physiologia Plantarum* v.138, p. 176–190, 2010.

RENGEL, Z., ZHANG, W.H., Role of dynamics of intracellular calcium in aluminium toxicity syndrome. *Journal New Phytol*. v.159, p.295-314, 2003.

RIBEIRO, J.F. Comparação da concentração de nutrientes na vegetação arbórea e nos solos de um cerrado e de um cerradão no Distrito Federal, Brasil. Dissertação de Mestrado, Brasília,

DF, Universidade de Brasília, 1983.

ROSSIELLO, R. O. P.; NETTO, J. J. Toxidez de alumínio em plantas: novos enfoques para um velho problema. In: FERNANDES, M. S. (Ed.). *Nutrição Mineral de Plantas*. Vicosa: SBCS, 432 p. 2006.

RYAN, P. R.; TYERMAN, S. D.; SASAKI, T.; FURUICHI, T.; YAMAMOTO, Y.; ZHANG, W. H.; DELHAIZE, E. The identification of aluminium-resistance genes provides opportunities for enhancing crop production on acid soils. *Journal of Experimental Botany*, v. 62, n. 1, p. 9–20, 2011.

RYAN, P. R.; RAMAN H.; GUPTA S.; HORST W. J.; DELHAIZE E. A second mechanism for aluminum resistance in wheat relies on the constitutive efflux of citrate from roots. *Journal Plant Physiology* v.149, p.340–351, 2009.

RYAN, P.R.; DELHAIZE, E.; RANDALL, P.J. Characterisation of Al-stimulated efflux of malate from the apices of Al-tolerant wheat roots. *Planta*. v. 196 p. 103–110, 1995. In RYAN, P.R.; DELHAIZE, E.; JONES, D.L. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Journal Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* v. 52 p.527–560, 2001.

RYAN, P.R.; DELHAIZE, E.; JONES, D.L. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Journal Plant Physiology. Plant Mol. Biol.* v. 52 p.527–560, 2001.

SASAKI T, YAMAMOTO Y, EZAKI B, KATSUHARA M, AHN SJ, RYAN PR, DELHAIZE E, MATSUMOTO H. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. *The Plant Journal*. v. 37, p. 645–653, 2004.

SILVA, C. R.; SOUZA, Z. M. Rev. Eficiência do uso de nutrientes em solos ácidos: manejo de nutrientes e uso pelas plantas. p.38. 2008. In www.UNESP.br. Acesso às 01:35 do dia 24/05/2011.

SILVA, I. R.; SMYTH T. J.; MOXLEY, D. F.; CARTER, T. E.; ALLEN, N. S.; RUFTY, T. W. Aluminum accumulation at nuclei of cells in the root tip. Fluorescence detection using

lumogallion and confocal laser scanning microscopy. *Journal Plant Physiology*, Rockville, v.123, n.2, p.543-552, 2000.

SILVA JÚNIOR, M.C.; SANTOS, G.C.; NOGUEIRA, P.E.; MUNHOZ, C.B.R.; RAMOS, A.E. 100 Árvores do Cerrado. Guia de campo. Brasília: Rede de sementes do Cerrado. 278 p. 2005.

SIVAGURU, M.; BALUSKA, F.; VULKMANN, D.; FELLE, H. H.; HORST, W. J. Impacts of aluminum on the cytoskeleton of maize root apex: short-term effects on the distal part of the transition zone. *Journal Plant Physiology*, Rockville, v.119, n.3, p.1073-1082, 1999.

TABALDI, L. A. Avaliação bioquímica-fisiológica de clones de batata em relação ao alumínio. Tese de doutorado, Santa Maria, RS, Universidade Federal de Santa Maria, 2008.

TAYLOR, G. J.; MCDONALD-STEPHENS, J. L.; HUNTER, D. B.; BERTSCH, P. M.; ELMORE, D.; RENGEL, Z.; REID, R. J. Direct measurement of aluminum uptake and distribution in single cells of *Chara corallina*. *Journal Plant Physiology*, v.123. n.3. p.987-996, 2000.

WATANABE, T.; OSAKI, M. Mechanisms of adaptation to high aluminum condition in native plant species growing in acid soils: a review. *Communications in Soil Science and Journal Plant Analysis*, v. 33, p. 1247-1260, 2002.

YAMAMOTO Y, KOBAYASHI Y, DEVI SR, RIKIISHI S, MATSUMOTO H. Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells. *Journal Plant Physiology* v.128, p. 63–72, 2002.

ZHANG, W.H.; RENGEL Z. Aluminium induces an increase in cytoplasmic calcium in intact wheat root apical cells. *Australian Journal of Plant Physiology*, Collingwood, v.26, n.5, p.401-409, 1999.

**CAPÍTULO I - Avaliação da resposta fisiológica ao
alumínio de *Qualea grandiflora* Mart.**

7. EVALUATION OF THE PHYSIOLOGICAL RESPONSE OF ALUMINUM *QUALEA GRANDIFLORA* MART.

7.1. ABSTRACT: The element Aluminum (Al) is common in Cerrado soils and many plant species are very sensitive to the presence of this metal. There is a direct correlation between soil pH and the Al solubility, and the lower the pH the more soluble is the Al. The effects of Al on plant growth and development have been studied for decades, however, the biochemical and physiological mechanisms involved in Al toxicity are still unclear. Furthermore, it is known that Al affects negatively several cellular processes and structures, and the Al^{+3} has been considered the most toxic form for plants. On the other hand, many Cerrado plants are Al tolerant. Besides being tolerant to the presence of Al, these plants accumulate it. Therefore, the purpose of this work is to evaluate the influence of Al on the growth and development of *Qualea grandiflora* seedlings, a native Cerrado species that accumulate Al. *Q. grandiflora* seeds were germinated on germitest paper in Petri dishes, and then grown in $1/5$ MS salt solution, pH 4.5 – 4.8, with or without Al (Control). The Al was provided by adding $AlCl_3$ (150 μ M) to the MS solution. After 120 days of cultivation the following parameters were taken from both treatments: length of root and shoot, biomass (fresh weight/dry weight), as well as chlorophyll and carotene contents. Student Test T was performed to determine differences among the treatments with $P < 0.05$. Compared with the controls, seedlings grown with Al showed higher length (root and shoot) and accumulated more biomass. In general, the results showed significant differences between both treatments, indicating that Al was beneficial for *Qualea* growth. Root and shoot length of *Q. grandiflora* seedlings treated with Al was respectively 23.9% (± 3.4) and 25.73% (± 2.44) higher than the controls. Similarly, Al treated plants significantly accumulated more biomass. Root and shoot biomass was 37% ($\pm 3,19$) and 40% ($\pm 4,87$), respectively, higher than no Al treated plants. Moreover, chlorophyll (a and b) and carotene contents (11,472, 5,551 and 5,002) were higher in seedlings grown in the presence of Al as compared to control (8.203, 3.356 and 3.041). The results suggest that *Q. grandiflora* seedlings had a better development in the presence of Al.

Key words: Effects of Aluminum, physiological mechanisms, accumulating plant, Cerrado, *Q. grandiflora*.

7. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA FISIOLÓGICA AO ALUMÍNIO DE *QUALEA GRANDIFLORA* MART.

7.2. RESUMO: O alumínio (Al) é comum em solos do Cerrado e muitas plantas são sensíveis a determinadas espécies de Al no solo. Existe uma relação direta entre a acidez do solo e a solubilidade do Al. Os efeitos desse metal sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas têm sido estudados por décadas, contudo, os mecanismos bioquímicos e fisiológicos continuam essencialmente obscuros. Além disso, sabe-se que o Al atua sobre diversas moléculas, processos e estruturas celulares, e o Al^{+3} é considerado a forma mais tóxica deste metal. Muitas espécies do Cerrado, além de não sofrer com a presença de Al, são acumuladoras deste metal. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do Al em plântulas de *Qualea grandiflora*, uma espécie do Cerrado acumuladora de Al, crescidas na presença e ausência de Al. Sementes de *Q. grandiflora* foram germinadas em papel germitest sob placas de petri e as respectivas plântulas cultivadas em vermiculita em solução nutritiva $1/5$ MS em dois tratamentos (com e sem Al). O Al foi fornecido sob forma de $AlCl_3$ (150 μ M), com pH ajustado e mantido entre 4,5 e 4,8. Após 120 dias de cultivo os seguintes parâmetros foram analisados nos dois tratamentos: comprimento da raiz e parte aérea e biomassa (peso fresco/seco), bem como a quantificação de pigmentos fotossintetizantes. As médias foram comparadas pelo teste de T de Student com nível de significância de 5%. As análises de comprimento e biomassa mostraram diferença significativa entre os dois tratamentos. Comparadas com os respectivos controles, plantas crescidas em Al tiveram um comprimento médio de 23,9% ($\pm 3,4$) e 25,73% ($\pm 2,44$) maior para raiz e parte aérea, respectivamente. Similarmente, a biomassa de plântulas crescidas com Al se mostrou 37% ($\pm 3,19$) maior para raiz e 40% ($\pm 4,87$) maior para parte aérea que os controles. Além disso, a quantidade das clorofilas a, b e carotenos (11,472, 5,551 e 5,002) também foi maior naquelas plântulas crescidas na presença de Al (8,203, 3,356 e 3,041). Os resultados do presente estudo revelaram que o Al é um elemento químico importante para o crescimento e desenvolvimento de *Q. grandiflora*, e provavelmente para outras espécies acumuladoras da família Vochysiaceae.

Palavras chave: Efeitos do Alumínio, mecanismos fisiológicos, planta acumuladora, Cerrado, *Q. grandiflora*.

7.3. INTRODUÇÃO

Solos do Cerrado são caracterizados pela baixa produtividade e a baixa resposta desses solos à fertilização, o que tem sido frequentemente atribuído à sua acidez e a presença de Al. A espécie fitotóxica do alumínio Al^{+3} , predominante em solos ácidos, é considerada a mais danosa para espécies de plantas ditas sensíveis ao Al (Kochian, 1995). Em consequência, quando plantadas nesses solos, essas plantas apresentam um pobre desenvolvimento radicular o que resulta em deficiências nutricionais, maior susceptibilidade à seca, e ataque de patógenos (Kinraide & Parker, 1990).

A redução do crescimento do sistema radicular pode estar relacionada a interações desse cátion com sítios específicos localizados nas paredes celulares (Horst, 1995), assim como com o genoma nuclear induzindo uma redução da divisão celular (Liu & Jiang, 1991; Clarkson, 1995). Adicionalmente, o Al também provoca a diminuição da permeabilidade da membrana plasmática (Ahn *et al.*, 2001) por meio da interação com fosfolípidios de membrana (Jones & Kochian, 1997) e peroxidação de lipídios (Peixoto *et al.*, 2001; Yamoto *et al.*, 2001). Contudo, os efeitos do Al sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas ainda não estão totalmente esclarecidos (Matsumoto, 2000).

A maioria das espécies vegetais cultivadas apresenta elevada sensibilidade ao Al, o que pode ser uma barreira à produtividade agrícola, pois em razão de sua participação na composição dos minerais primários, este elemento é um importante componente da maioria dos solos (Kochian, 1995). Além disso, os efeitos do Al sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas são mais acentuados quando o pH da solução do solo encontra-se menor ou igual a 5,5 (Kochian, 1995, 2004). Os solos do Cerrado, na maioria *oxisols* e *entisols*, são ácidos e distróficos e apresentam baixa disponibilidade de nutrientes (Haridasan *et al.*, 2008²). Em geral, plantas cultivadas são mais susceptíveis a toxicidade de Al e manganês (Mn) presentes nos solos do Cerrado e, independente da deficiência de nutrientes, não crescem bem na ausência de calagem e adubação. Entretanto, os conceitos de deficiência de nutrientes e toxicidade, bem estabelecidos na agricultura tradicional, não devem ser estendidos às plantas nativas indiscriminadamente. As inúmeras espécies das plantas nativas que ocorrem no bioma são resistentes ou tolerantes às condições edáficas consideradas desfavoráveis para as plantas cultivadas. Assim, sua distribuição, frequência nas comunidades nativas, crescimento e produtividade são determinados pela disponibilidade de nutrientes, regime hídrico do solo e outros fatores edáficos (Haridasan *et al.*, 2008²).

As espécies crescendo em solos ácidos são tolerantes ou resistentes ao Al porque

sua capacidade de absorção de nutrientes essenciais, crescimento e reprodução não são prejudicados por altas concentrações de Al no solo (Haridasan *et al.*, 2008²). Muitas espécies comuns do Cerrado, em vez de excluir, absorvem grandes quantidades deste elemento e transportam para folhas ou acumulam em outros órgãos como sementes, e alguns nem mesmo sobrevivem na ausência do Al trocável (Al³⁺), apesar de até o momento nenhum papel deste elemento no metabolismo das plantas ter sido comprovado (Haridasan *et al.*, 2008²).

A capacidade de uma determinada espécie em adaptar-se a condições de solo pode ser evidenciada pela avaliação do crescimento inicial das plantas frente à disponibilidade de nutrientes (Haridasan *et al.*, 2008²). Desta forma, a eficiência do crescimento da planta pode ser relacionada à habilidade de adaptação das plântulas às condições do solo (Haridasan *et al.*, 2008²; Silva, 2009). O crescimento de algumas espécies em ambientes com diferentes concentrações de Al e baixos níveis de pH pode ser atribuído à capacidade de ajustar, de forma eficaz e rápida, seu aparelho fisiológico para maximizar a aquisição de recursos nesse ambiente (Haridasan, 2008^{1,2}; Silva, 2009).

Alguns estudos têm evidenciado a plasticidade fisiológica de espécies cultivadas frente ao teor de Al relacionando o crescimento inicial das plântulas em diferentes concentrações desse metal (Camargo, 1981; Silva, 2009; Santos *et al.*, 2010). Porém, são escassos os estudos a respeito do comportamento de espécies acumuladoras de Al, englobando parâmetros fisiológicos como crescimento, biomassa e fotossíntese em resposta a esse metal. Estudos envolvendo esses fatores fisiológicos podem contribuir para o melhor entendimento dos processos envolvidos no metabolismo do Al nessas plantas.

Com respeito às plantas acumuladoras, algumas parecem necessitar de Al para desenvolver, ou mesmo, serem incapazes de sobreviver na ausência de Al (Haridasan, 2008²; Watanabe *et al.*, 2001). Estes fatos indicam que esse metal tenha alguma função metabólica importante nessas plantas que ainda não foi elucidada. Isso parece ser o caso de *Miconia albicans* (Sw.) Triana (Melastomataceae) e *Vochysia thyrsoidea* Pohl (Vochysiaceae), duas espécies lenhosas do Cerrado (Harisadan *et al.*, 2008²). Estas espécies só ocorrem em solos ácidos na região dos Cerrados e sementes de *Miconia albicans* e *Vochysia thyrsoidea* germinadas em solos calcários produzem plântulas com folhas cloróticas e necróticas e não apresentam crescimento normal (Harisadan *et al.*, 2008²). Além disso, quando comparadas a folhas com desenvolvimento normal, as folhas cloróticas possuem baixas concentrações de Al e quando transplantadas para solos ácidos, as plantas retomam o crescimento normal, recuperando altas concentrações de Al nas folhas (Fig. 1 e 2) (Haridasan & Araújo, 1988; Machado, 1985). Assim, parece que algumas plantas nativas do Cerrado são alumíniofílicas,

mostrando que o conceito de toxicidade de Al não é um conceito universal que pode ser aplicado indiscriminadamente (Haridasan, 2008²).



Figura 1. Plântulas de *Vochysia thyrsoidea* Pohl à esquerda crescendo em solos calcários com baixas concentrações de Al apresentando folhas cloróticas e à direita crescendo em solo ácido com altas concentrações de Al apresentando folhas saudáveis (Fonte: Haridasan et al., 2008²).



Figura 2. Plântulas de *Miconia albicans* (Sw.) Triana, uma acumuladora de Al, à esquerda crescendo em solos calcários com baixos teores de Al. Note que nesse tratamento as plântulas apresentam folhas cloróticas. No centro crescendo em solo de Cerrado campo sujo e à direita crescendo em solo fértil de Mata Galeria de Cerrado ambos com altas concentrações de Al (Fonte: Haridasan et al., 2008²).

Adicionalmente, há vários outros relatos sobre os efeitos benéficos do Al em diferentes espécies, onde o Al induziu uma maior absorção de nutrientes como K e P

(Watanabe & Osaki, 2002). Num experimento em vasos com cultura de chá (*Camellia sinensis* L.), Chenery (1955) indicou a possibilidade de o Al atuar como estimulante do crescimento de raízes devido a maior absorção desses nutrientes. Segundo o mesmo autor, *Camellia sinensis* absorve Al ao longo de seu ciclo, e a concentração de Al nas folhas aumenta com a idade, onde as folhas mais velhas normalmente contêm cerca de 5g.Kg^{-1} de Al (Konishi, 1990). Além disso, é interessante observar, por exemplo, que *Callisthene fasciculata* (Vochysiaceae), uma planta nativa de ocorrência exclusiva de solos calcários com pH acima de 7 ainda acumule altas concentrações de Al. Este fato foi associado com uma possível acidificação da rizosfera para possibilitar a absorção de Al^{3+} (Haridasan & Araújo, 1988).

Exemplos de como os solos calcários reduzem o crescimento e desenvolvimento de plantas acumuladoras de Al do Cerrado devido a baixa disponibilidade do Al^{3+} têm sido documentados na literatura como, por exemplo, *Vochysia thyrsoidea* (Machado, 1985), *Vochysia pyramidalis* (Andrade *et al.*, 2005), e *Miconia albicans* (Jansen, 2002). Porém, até o momento os mecanismos fisiológicos e bioquímicos que requerem a presença de Al nas plantas acumuladoras ainda não estão esclarecidos.

Parâmetros morfológicos têm sido usados por diversos autores para observar a reação das plantas frente ao Al. Mas apenas um parâmetro isolado pode não ser determinante para se afirmar se uma planta é ou não tolerante ao Al (Costa de Macedo *et al.*, 1997). Dentre os parâmetros mais usados para avaliar o crescimento estão: a massa fresca e seca da parte radicular (Jan & Petersson, 1989), massa fresca e seca da parte aérea (Foy e Silva, 1991), comprimento radicular e da parte aérea e taxa de crescimento desses órgãos (Fageria *et al.*, 1988). Além disso, o conteúdo de pigmentos fotossintetizantes é de fundamental importância para a avaliação do potencial das espécies arbóreas em relação a sua adaptabilidade e eficiência metabólica, pois a disponibilidade desses pigmentos constitui um dos fatores críticos para o seu desenvolvimento (Almeida *et al.*, 2004).

Buscando entender os mecanismos fisiológicos de acumulação de Al, a espécie acumuladora *Qualea grandiflora* Mart. foi selecionada para a análise dessas variáveis. O pau-terra pertencente à família Vochysiaceae, é uma planta acumuladora de Al de grande relevância no bioma Cerrado, pois é capaz de acumular esse metal tanto em solos distróficos quanto mesotróficos (Haridasan *et al.*, 2008²).

Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da importância do Al para o crescimento inicial de *Q. grandiflora* e para isso foram analisados os seguintes parâmetros:

comprimento do sistema radicular e caulinar, biomassa (peso fresco/seco) e a taxa de pigmentos fotossintéticos de plântulas dessa espécie.

7.4. MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de árvores de *Q. grandiflora* foram coletadas no mês de setembro de 2001 em áreas de Cerrado sentido estrito na Estação Biológica da Universidade de Brasília (UnB), na Reserva ecológica da Fazenda Água Limpa - UnB (FAL) e na Reserva Ecológica do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Exsiccatas das plantas alvo das coletas foram preparadas e depositadas no Herbário da Universidade de Brasília (UB). As sementes foram germinadas e posteriormente cultivadas na presença e ausência de Al para a avaliação da resposta fisiológica. O experimento foi conduzido no período de setembro de 2011 a abril de 2012.

7.4.1. Desinfestação, germinação e crescimento de *Q. grandiflora*

7.4.1.1. Desinfecção das sementes e germinação

As sementes foram imersas em álcool 70% por 1 min. e em NaClO (hipoclorito de sódio) a 2% por 30 min. Em seguida as sementes foram lavadas três vezes em água bidestilada autoclavada, colocadas em placas de Petri esterilizadas sobre papel germitest embebido com água destilada autoclavada e incubadas em câmara de crescimento a 30°C, 70% de umidade relativa e fotoperíodo de 18 h.

7.4.1.2. Desenvolvimento de plântulas

Trinta dias após a germinação, 40 plântulas foram selecionadas e transferidas para os ensaios. A seleção das plântulas foi feita considerando as condições de saúde (cotilédones sem sinais de clorose), uniformidade de tamanho, e sistema radicular variando em torno de 2-3 cm de profundidade. Em seguida, as plântulas foram transferidas para copos de plástico (500 mL) contendo vermiculita esterilizada. A solução nutritiva MS (Murashige e Skoog, 1962) foi utilizada na proporção $1/5$ em dois tratamentos (com e sem Al) sem a adição de açúcares e vitaminas. O Al foi fornecido pela adição de 150 μM de AlCl_3 na solução nutritiva. Durante o período experimental de 120 dias, o pH da solução nutritiva foi ajustado e mantido

com HCl 0,1 M e KOH 0,1 M entre 4,5 e 4,8 com o intuito de manter o Al solubilizado.

As plântulas foram colocadas em sala de crescimento a 25°C, 70% de umidade relativa, e fotoperíodo de 18 h. As soluções nutritivas eram repostas a cada dois dias. Cada tratamento continha 20 plantas e foram feitas três repetições.

7.4.2. Coleta e análises de comprimento, biomassa e estado visual das plantas

Após 60 e 120 dias de crescimento, as plântulas foram retiradas dos copos plásticos e suas raízes lavadas com água corrente até a completa retirada do substrato. Fez-se a medição das raízes principais e parte aérea (haste principal acima do cotilédone). As medições foram realizadas utilizando-se régua milimetrada automática (paquímetro). O peso fresco e seco da parte aérea e radicular foi avaliado ao final dos 120 dias do experimento. As plantas separadas em raízes e parte aérea foram submetidas à secagem em estufa a 72°C, durante 72 h. As medições do peso da matéria fresca e seca dos diferentes órgãos foram obtidas em balança analítica (AND/HR200). Todos os parâmetros analisados tiveram um número total de 40 plântulas, sendo 20 de cada tratamento. A caracterização do estado visual da parte aérea foi realizada diariamente avaliando as características morfológicas surgidas nos cotilédones e folhas após o início do tratamento em solução nutritiva controle (sem Al) e com Al. A análise visual das raízes foi feita aos 60 e 120 dias de tratamento.

7.4.2.1. Parâmetros Avaliados:

- A) Caracterização do estado visual das folhas e raízes;
- B) Comprimento da parte aérea (CPA) da plântula: medição do caule da plântula com régua graduada em milímetro a partir do colo;
- C) Comprimento da raiz principal (CRP) da plântula: medição da raiz da plântula com régua graduada em milímetro abaixo do colo;
- D) Taxa de crescimento da parte aérea (TCA), realizada através da equação: $TCA = \frac{Cf - Ci}{100/10}$

Sendo:

$TCA =$ Avaliação da medição do dia da coleta (Cf) menos a avaliação da medição da semana anterior à coleta (Cf-1).

Cf – comprimento radicular final; Ci - comprimento radicular inicial.

E) Taxa de crescimento radicular (TCR), realizada através da equação: $TCR = (Cf - Ci) \times 100/10$

Sendo:

TCR = Avaliação da medição do dia da coleta (Cf) menos a avaliação da medição da semana anterior à coleta (Cf-1).

Cf – comprimento radicular final; Ci - comprimento radicular inicial.

7.4.3. Conteúdo dos pigmentos fotossintetizantes

Os teores das clorofilas *a* e *b* e de carotenos foram determinados através do método proposto por Wellburn (1994), onde cinco discos foliares de 0,25 cm de raio correspondentes a cinco plântulas de cada tratamento foram excisados e colocados em tubos de microcentrífuga âmbar (eppendorffs) contendo 2 mL de DMF (N, N-dimetilformamida- $HCON(CH_3)_2$). Em seguida, os tubos foram envolvidos em papel alumínio e armazenados a 4°C por 48 h até que toda a clorofila fosse retirada.

Ao término deste tempo, procedeu-se a leitura da absorbância (*ab*) das amostras nos comprimentos de onda de 663,8 nm, 646,8 nm e 480 nm com um espectrofotômetro para determinar as concentrações de clorofila *a*, *b* e carotenóides respectivamente. As amostras foram medidas no espectrofotômetro Genesys 2 (Termo Spectromic).

Os cálculos de absorbância das amostras foram realizados segundo as equações 1, 2 e 3, de acordo com Ronen & Galun (1984) e Barnes e colaboradores (1992):

$$1- \text{Clorofila A} = ((12 * Ab_{663,8} - 3,11 * Ab_{646,8}) * Vol) / A)$$

$$2- \text{Clorofila B} = ((20,78 * Ab_{646,8} - 4,88 * Ab_{663,8}) * Vol) / A)$$

$$3- \text{Carotenóides} = (((1000 * \text{Clorofila A} - 1,12 * \text{Clorofila B} - 34,07 * Ab_{480}) / 245) * 2) / A)$$

7.4.4. Análise estatística

Para todos os experimentos realizados, foi feita antes do teste T, a aplicação do teste Shapiro-wilk, apropriado para tamanhos amostrais pequenos a fim de se avaliarem a normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias respectivamente. Os testes de comparações de média dos diferentes tratamentos foram realizados com o auxílio do *software* MYNOVA com erro padrão analisado. A significância $P=0.05$ foi utilizada.

7.5. RESULTADOS

7.5.1. Germinação e desenvolvimento das plântulas

As sementes de *Q. grandiflora* germinaram em torno do oitavo dia após o rompimento dos tegumentos, cuja evidência foi a extrusão da raiz (Fig. 3-A). Em geral, a emissão dos cotilédones ocorreu por volta de 30 dias após a germinação (Fig. 3-B), e logo adquiriram a coloração verde/verde escura e mantiveram-se aderidos às plântulas por todo período de análise, que foi de 120 dias.

O sistema radicular dessa espécie é pivotante e se verificou a formação de raízes laterais, formando uma densa malha de raízes finas.

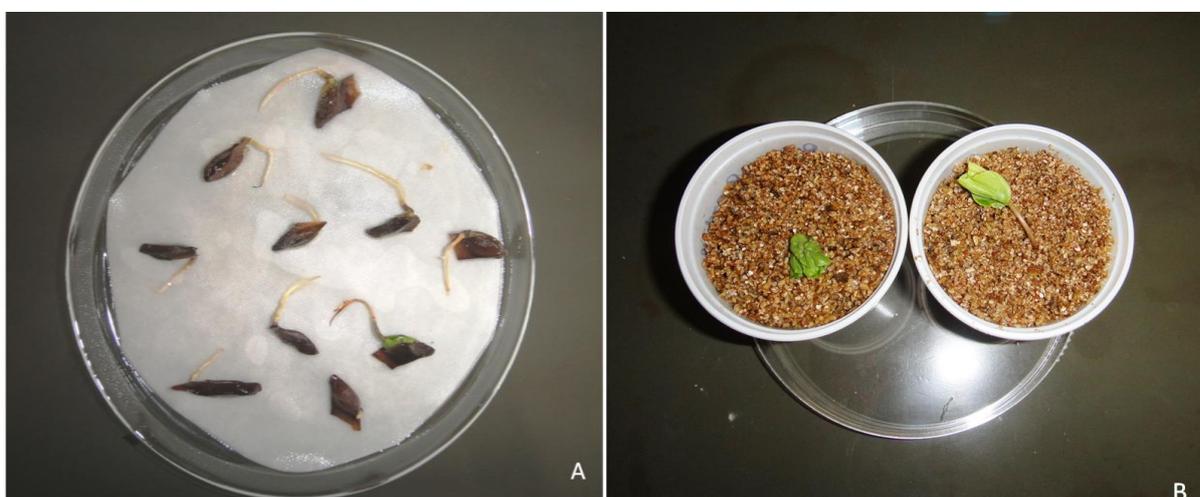


Figura 3. Germinação e cultivo de *Q. grandiflora*. A- Emissão das raízes em sementes de *Qualea grandiflora* no 20º dia de cultivo. B- Cotilédones de plântulas com 35 dias de cultivo.

7.5.2. Avaliação visual das plântulas crescidas em dois tratamentos (sem e com Al)

Visualmente as plântulas crescidas com Al e as controle já mostravam diferenças (Figura 4). Foi observado ao redor de 60 dias após a germinação, que mais de 70% das plântulas do tratamento controle quando comparadas com aquelas crescidas em Al apresentavam cotilédones menos desenvolvidos, e frequentemente com sinais de clorose e necrose no ápice e margens cotiledonares (Figura 4-A). Essas características permaneceram por todo o período do experimento.

Além disso, o tratamento controle se caracterizou por plântulas que tiveram um menor crescimento tanto da parte aérea quanto radicular em comparação com as tratadas com

Al (Figuras 4-A e 5-A). A diferença mais relevante foi encontrada em relação ao tamanho das raízes; menores quando comparadas às das plântulas tratadas com Al (Figura 4-C, 5-A).

As plantas crescidas em solução nutritiva contendo Al tiveram um melhor desenvolvimento e se mostraram mais saudias, pois não tinham sinais de clorose nem subdesenvolvimento do sistema radicular. Os cotilédones eram verdes, assim como as demais folhas das plântulas (Figura 4-B e 5-B). Além disso, as raízes cresceram mais uniformemente sem nenhum sinal de toxidez (Figura 4-C, 5-B).

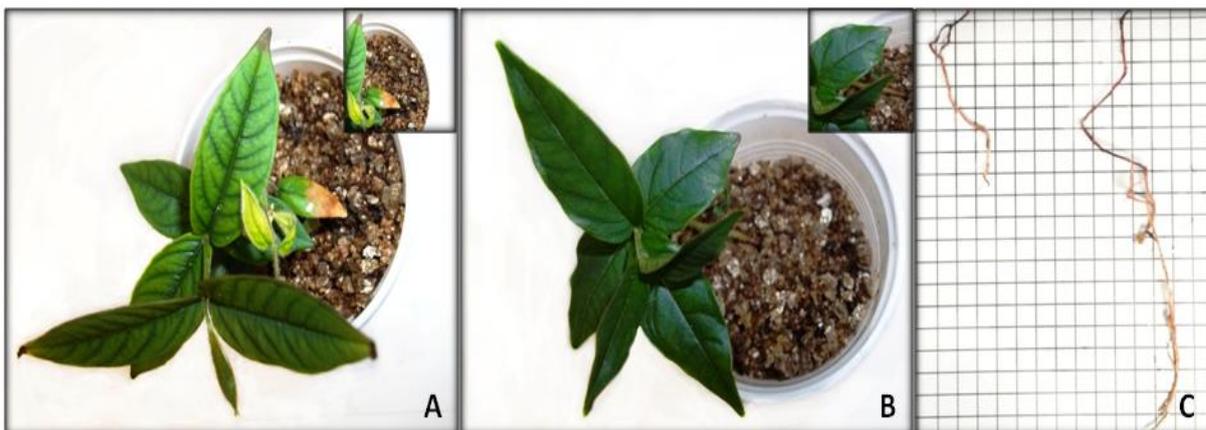


Figura 4. Plântulas de *Q. grandiflora* após 120 dias de crescimento. A- Controle. Perceba que a plântula crescida na ausência de Al apresentou na parte aérea sinais de clorose. B- Crescidas na presença de Al. Note que a plântula crescida na presença de Al apresenta aspecto visual da parte aérea sadia. C- Aspecto visual da raiz principal de plântulas do tratamento controle (esquerda) e do tratamento com Al (direita). Observe que a raiz principal da plântula crescida sem Al (esquerda) cresceu menos que daquela crescida na presença de Al.

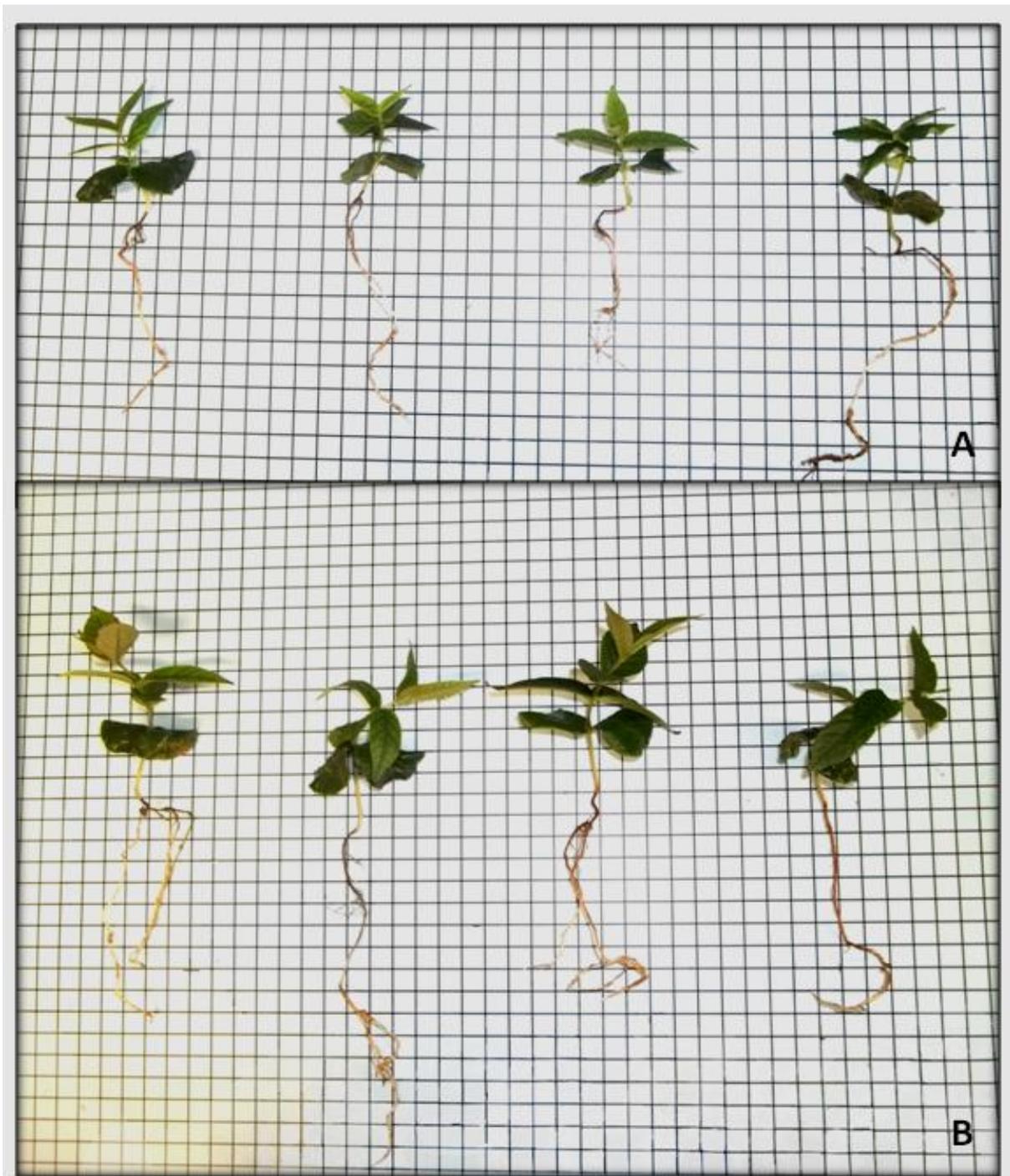


Figura 5. Plantas de *Q. grandiflora* após 120 dias de crescimento. A-B Vista geral das plântulas crescidas na presença e ausência de Al. A- Crescidas na ausência de Al (controle). B- Crescidas na presença de Al. Note que a presença do Al na solução nutritiva foi benéfica para o desenvolvimento dos indivíduos.

Os resultados sugerem que o Al tem uma função importante no crescimento e desenvolvimento de *Q. grandiflora*. Foi percebida uma clara tendência das plântulas de *Q. grandiflora* crescidas em Al de se desenvolverem melhor, e mesmo no período inicial do experimento foi possível perceber diferenças entre os tratamentos, que se tornaram mais

significantes após 90 dias de crescimento.

7.5.3. Comprimento e biomassa aérea e radicular de plântulas crescidas na presença e ausência de Al

As diferenças entre plantas crescidas com Al e aquelas sem Al não se resumem apenas em aspectos morfológicos como descrito no item anterior. Parâmetros como comprimento e biomassa também mostraram diferenças significativas entre os dois tratamentos tanto na parte aérea quanto no sistema radicular.

Foi verificado aos 120 dias que comprimento da parte aérea das plântulas crescidas na presença de Al foi em média 25,73% maior que o respectivo controle (Figura 6-A). Por volta dos 120 dias de cultivo, plântulas crescidas com Al alcançaram a média de 132,081 cm ($\pm 3,77468$) enquanto a média daquelas sem Al foi de 98,876 cm ($\pm 2,44231$). Essas diferenças foram estatisticamente significativas mostrando que o Al favoreceu o crescimento dos caules de *Q. grandiflora* (Figura 6-A). Adicionalmente, as plântulas crescidas com Al apresentaram taxa de crescimento da parte aérea (TCA) significativamente maior (3,182%) que o tratamento controle (2,382%) ($P < 0,05$) (Tabela 1 e Figura 7-A).

O crescimento da parte radicular de plântulas crescidas com Al também foi significativamente maior. Essas plântulas apresentaram uma média no comprimento das raízes de 23,9% superior àquelas crescidas em solução controle aos 120 dias de tratamento (Figura 6-B). As raízes de plântulas crescidas com Al alcançaram a média de 159,756 mm ($\pm 3,85281$) enquanto a média daquelas sem Al foi de 121,47 mm ($\pm 4,44716$). Adicionalmente, a taxa de crescimento radicular (TCR) das raízes de plântulas tratadas com Al foi de 4,982%, enquanto que o respectivo controle foi de 3,621%, e estes valores são significantes ($P < 0,05$) (Tabela 2 e Figura 7-B).

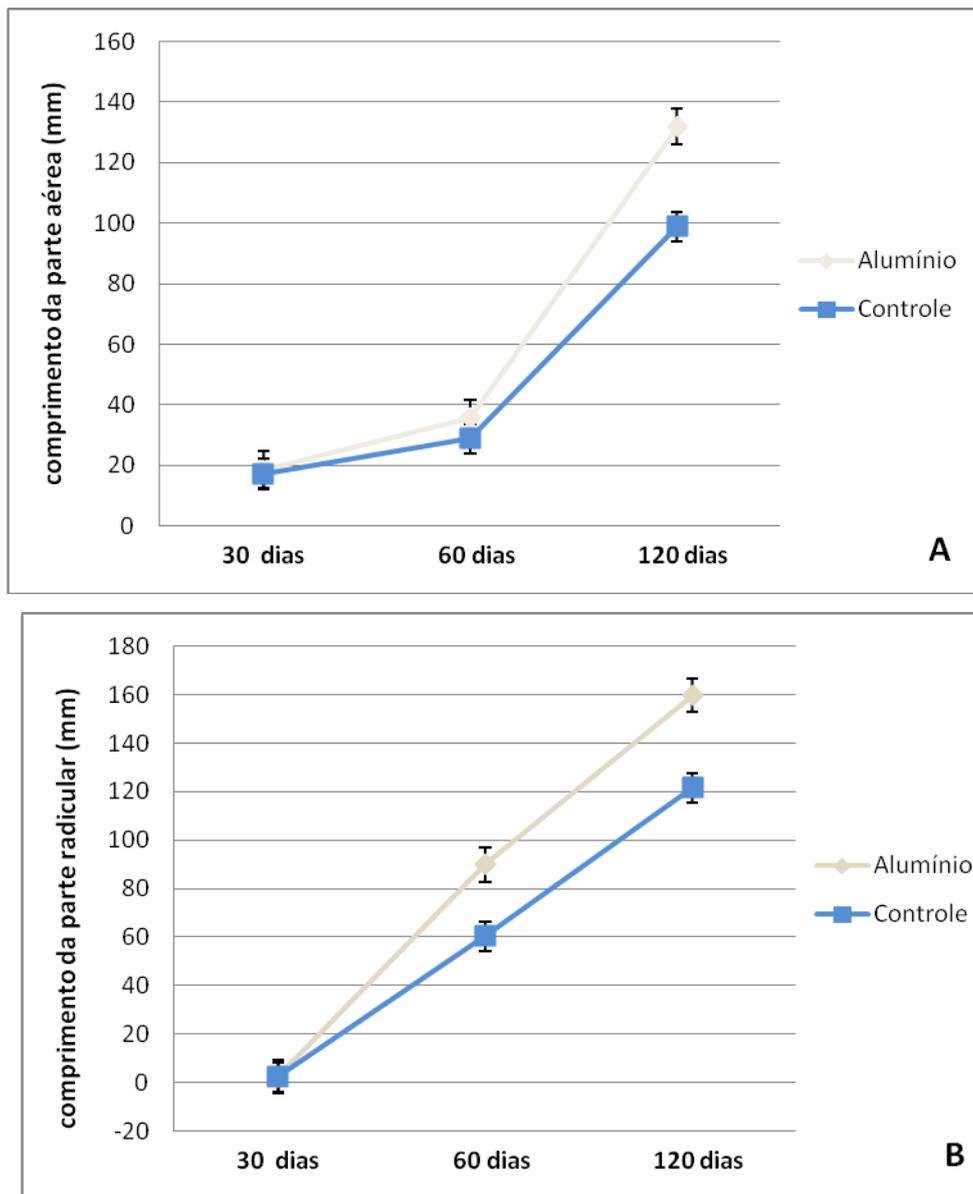


Figura 6. A- Média do comprimento da parte aérea de *Q. grandiflora* (CPA). 1- Solução controle (média: 30 dias: 17,08 mm, 60 dias: 28,6845 mm, 120 dias: 98,876, SEM: 0,911, 1,4856 e 2,44231). 2- Solução com $AlCl_3$ (média 30 dias: 18,5 mm, 60 dias: 35,4886 mm, 120 dias: 132,081, SEM: 0,9896, 2,67 e 3,77468). O Teste T revelou diferenças significantes ($P < 0,05$). **Figura B-** Média do comprimento do sistema radicular de *Q. grandiflora* (CRP). 1- Solução controle (média 30 dias: 2,31 mm, 60 dias: 60,2782 mm, 120 dias: 121,47 mm, SEM: 0,561, 2,876 e 3,44716). 2- Solução com $AlCl_3$ (média 30 dias: 2,34 mm, 60 dias: 89,8807 mm, 120 dias: 159,756 mm, SEM: 0,87, 3,5189 e 4,85281). O Teste T mostrou que houve diferenças significantes entre os dois tratamentos ($P < 0,05$).

Tabela 1. Taxa de crescimento da parte aérea (%) de plântulas de *Q. grandiflora* na presença e ausência de Al ($P < 0,05$).

Indivíduo	Tratamento Controle	Tratamento com Al
	Taxa de crescimento da parte aérea	Taxa de crescimento da parte aérea
1	2,73	3,2
2	2,01	3,65
3	3,14	4,01
4	1,48	1,17
5	1,64	3,66
6	2,31	3,64
7	2,27	4,03
8	1,39	3,66
9	2,44	2,98
10	2,38	2,24
11	3,52	4,25
12	3,14	1,06
13	1,01	3,26
14	2,3	3,97
15	5,1	3,04
16	1,9	3
17	2,79	3,38
18	2,03	2,87
19	1,02	1,97
20	3,04	4,6
Média	2,382	3,182

Tabela 2. Taxa de crescimento da parte radicular (%) de plântulas de *Q. grandiflora* na presença e ausência de Al (P<0,05).

Indivíduo	Tratamento Controle	Tratamento com Al
	Taxa de crescimento da parte radicular	Taxa crescimento parte radicular
1	4,33	5,6
2	5,01	7,25
3	4,09	6
4	3,46	2,27
5	4,54	4,66
6	5,81	6,35
7	3,97	5,03
8	3,31	5,06
9	4,84	6,09
10	3,38	4,24
11	2,23	4,29
12	3,14	3,66
13	2	4,28
14	2,4	5,09
15	6,1	6,04
16	1,9	5,48
17	1,79	3,78
18	3,06	4,87
19	4,05	3,97
20	3,01	5,63
Média	3,621	4,982

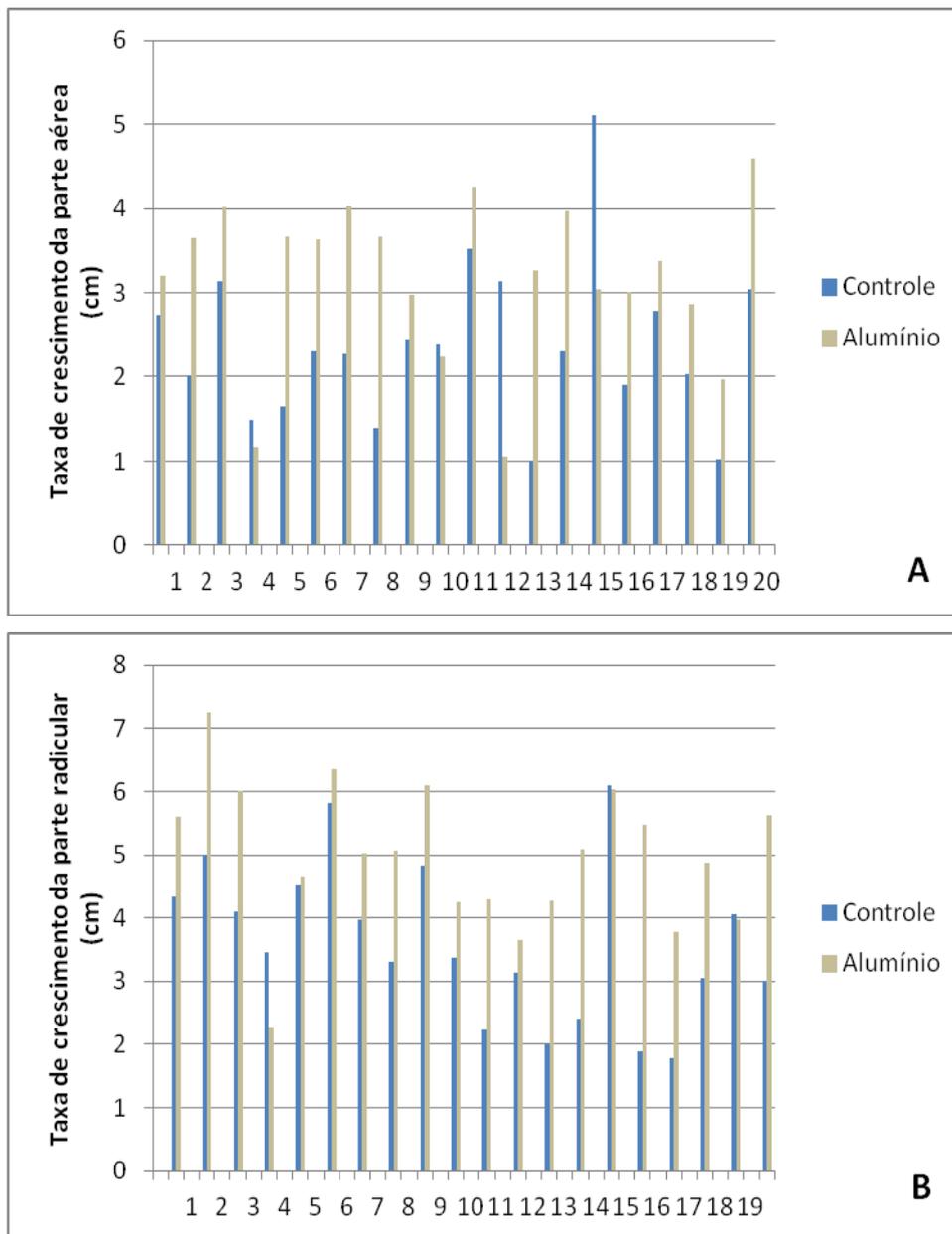


Figura 7. Taxa de crescimento da parte aérea (A) e radicular (B) (%) de plântulas de *Q. grandiflora* na presença e ausência de Al ($P < 0,05$).

Em relação ao acúmulo de biomassa, os dados também refletem os resultados observados pelas medidas de crescimento. A presença de Al resultou em significativo aumento no acúmulo de biomassa tanto na parte aérea ($0,2214 \pm 0,012$) quanto nas raízes ($0,0149 \pm 0,000765$) em comparação ao tratamento controle (caule $0,1348 \pm 0,00674$; raiz $0,00948 \pm 0,000452$) (Figuras 8-A e 8-B) ($P < 0,05$). Esses valores mostram que as plântulas tratadas com Al acumularam 40% mais biomassa na parte aérea e 37% na parte radicular.

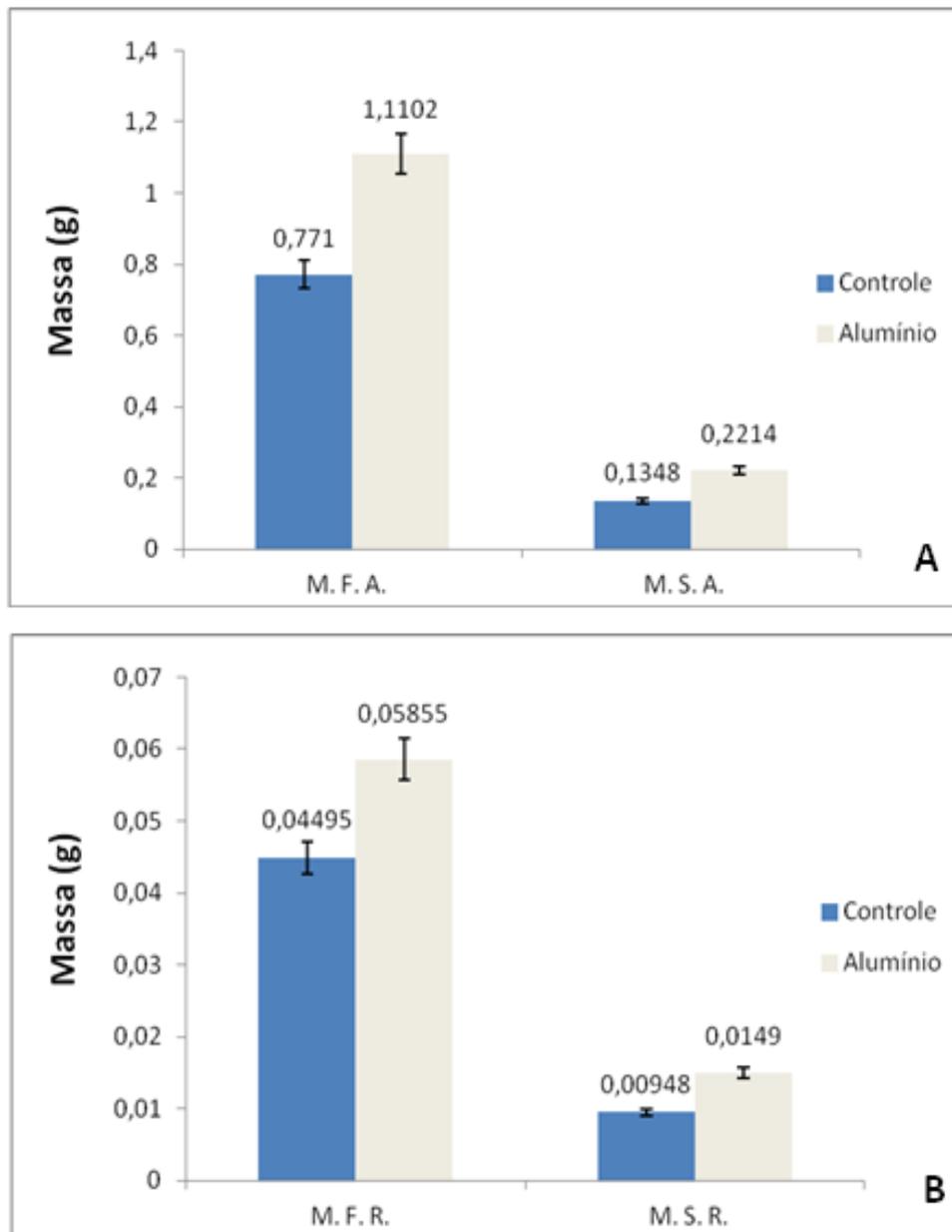


Figura 8. Massa fresca e seca da parte aérea de plantas de *Q. grandiflora* submetida a dois tratamentos: controle e com AlCl_3 aos 120 dias de tratamento. O Teste T mostrou diferenças significantes. M.F.A.: Massa fresca aérea. M.S.A.: Massa seca aérea. Figura B- Massa fresca e seca da parte radicular de plantas de *Q. grandiflora* submetida a dois tratamentos: controle e com AlCl_3 . O Teste T indicou valores significantes. M.F.R.: Massa fresca radicular. M.S.A.: Massa seca radicular. ($P < 0,05$).

7.5.4. Análise de pigmentos fotossintetizantes

A análise do conteúdo dos pigmentos fotossintéticos mostrou uma variação significativa entre os dois tratamentos (Figura 9). Teores mais altos de clorofila *a* ($11,472 \pm 2,06$) clorofila *b* ($5,551 \pm 0,98$) e de carotenos ($5,002 \pm 0,73$) foram encontrados em plântulas

crescidas na presença de Al quando comparados aos respectivos controles ($8,203 \pm 0,39$, $3,356 \pm 0,14$ e $3,041 \pm 0,152$). A razão entre clorofilas totais também foi maior no tratamento com Al ($17,023 \pm 1,11$) em comparação ao controle ($11,559 \pm 0,65$), indicando que houve uma maior taxa de produção desses pigmentos em resposta a esse metal. Com respeito à razão clorofilas *a-b* e carotenos, não foram registradas variações significantes entre os dois tratamentos, cujos valores ficaram entre $3,8 (\pm 0,19)$ e $3,403 (\pm 0,17)$ para os tratamentos controle e com alumínio respectivamente.

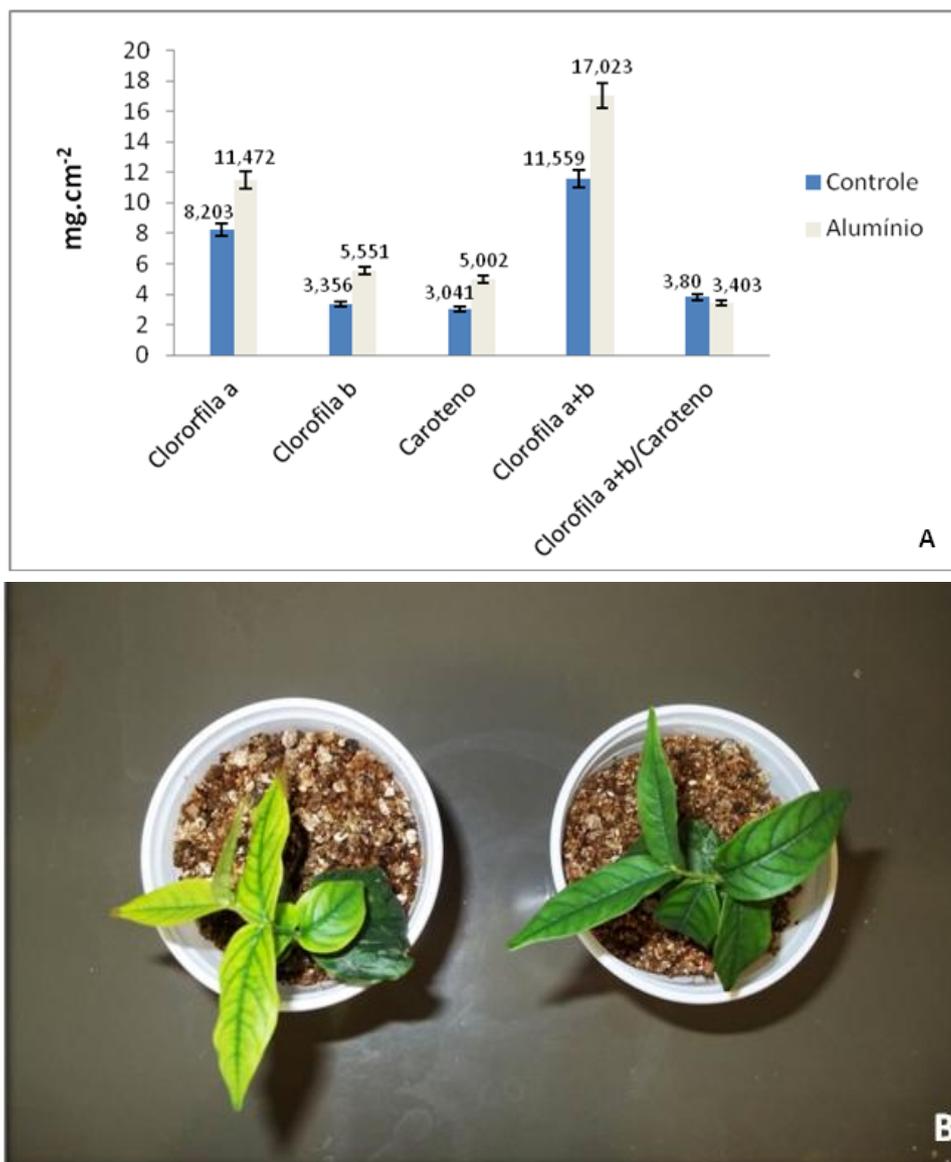


Figura 9. Taxas de pigmentos fotossintetizantes (clorofila *a*, clorofila *b* e caroteno) de plantas de *Q. grandiflora* submetida a dois tratamentos: controle e com AlCl_3 . A- Testes de ANOVA mostraram diferenças significantes em clorofila *a*, clorofila *b*, carotenos e clorofila *a+b* ($P < 0,05$). B- Diferenças visuais observadas entre os diferentes tratamentos. À esquerda controle e à direita com Al.

7.6. DISCUSSÃO

7.6.1. Desenvolvimento das plântulas de *Q. grandiflora*

O crescimento lento de *Q. grandiflora* é consistente com o que se verifica frequentemente em outras espécies do Cerrado (Haridasan, 2008²), e também em algumas acumuladoras como em *Vochysia thyrsoidea* Pohl. (Machado, 1985). Evolutivamente, essa característica tem sido associada à taxa de crescimento e metabolismo de absorção lentos dessas espécies arbóreas (Machado, 1985; Haridasan & Araújo, 1988), provavelmente devido à baixa disponibilidade de nutrientes em seu ambiente de adaptação.

O sistema radicular pivotante observado em *Q. grandiflora* é característico das plantas acumuladoras de Al (Machado, 1985). Consistentemente, outras espécies acumuladoras do cerrado como *Miconia albicans*, *Miconia ferruginata*, *Palicourea rígida*, *Vochysia thyrsoidea*, *Qualea parviflora* e *Qualea multiflora* Mart. apresentam raízes profundas (Machado, 1985; Klink *et al.*, 2003; Haridasan *et al.*, 2008²). Uma grande percentagem das espécies acumuladoras é composta de indivíduos pertencentes a comunidades arbóreas, o que é provavelmente devido a alguma vantagem competitiva em condições de solo ácido (Haridasan *et al.*, 2008¹). Furlani e Furlani (1991) destacaram que o menor teor de nutrientes na superfície dos solos ácidos está relacionado à precipitação do Al³⁺, assim nas plantas tolerantes e acumuladoras de Al o efeito indireto do maior aprofundamento e crescimento das raízes ocasiona maior exploração de volume de solo, e, portanto, não afeta agressivamente a absorção de nutrientes pela planta.

7.6.2. Avaliação visual das plântulas crescidas em dois tratamentos (sem e com Al)

Na literatura, as plântulas classificadas como sadias são aquelas que apresentam raiz principal longa, com ou sem raízes laterais e hipocótilo e folhas verdes e desenvolvidos (Hadas, 1976; Pereira & Andrade, 1994). Os resultados aqui descritos mostraram que os indivíduos que cresceram no tratamento com Al apresentaram essas características. Isto sugere que este metal favorece o melhor desenvolvimento de raízes, cotilédones e folhas nas plantas acumuladoras. O efeito benéfico do Al sobre o desenvolvimento de plantas do Cerrado já foi ressaltado por Machado (1985) e Haridasan (1988; 2008^{1,2}). Foi observado que plântulas de *Vochysia Thyrsoidea* apresentaram melhor desenvolvimento da parte aérea e radicular em solos ácidos quando comparadas a aquelas crescidas em solos calcários com

baixa concentração de Al (Machado 1985). Esse fenômeno também tem sido verificado em plantas não nativas do Cerrado. *Camellia sinensis* chega a acumular mais de 10.000 ppm de Al em suas folhas, e na presença deste metal suas plântulas têm uma aceleração considerável da formação de novas raízes e o desenvolvimento da parte aérea é também positivamente influenciado (Jansen *et al.*, 2002).

Também existem relatos do efeito benéfico do Al, em baixas concentrações, em várias plantas cultivadas como cevada (Reid *et al.*, 1971) arroz (Fageria, 1982; Vasconcelos, 1997), sorgo (Baligar *et al.*, 1995), trigo (Delhaize *et al.*, 1993) e maracujá (Silva, 2009). Segundo Tang Van Hai e colaboradores (1989), há um limite tolerável de concentração de Al solubilizado que pode até estimular o crescimento de muitas espécies cultivadas. Este efeito do crescimento da planta na presença de Al ainda não é bem entendido, podendo estar associado a efeitos secundários como, por exemplo, aos teores de ferro na solução através da hidrólise do Al (Foy, 1984), bloqueio da superfície negativa das raízes pelo Al permitindo a entrada de nutrientes aniônicos do solo para as raízes, entre outros (Freire, *et al.*, 1987).

Por outro lado, a ausência de Al não proporcionou um desenvolvimento adequado das plântulas de *Q. grandiflora*. Para algumas espécies do Cerrado, a ausência de Al se traduz em sinais de clorose nos cotilédones e folhas. Em espécies acumuladoras do Cerrado, como *Vochysia thyrsoidea* foram visto sinais de oxidação e clorose nos cotilédones e folhas após 80 dias de crescimento em solo calcariado com baixas concentrações de Al (Machado, 1985). Adicionalmente, Haridasan (2008²) também observou sinais de clorose e menor crescimento de plântulas de outra espécie acumuladora (*Miconia albicans*) em solos calcários com baixos teores de Al.

7.6.3. Comprimento e biomassa aérea e radicular de plântulas crescidas na presença e ausência de Al

O comprimento e a produção de matéria seca total permite avaliar o crescimento e fazer inferências sobre como ocorreu o desenvolvimento de determinada planta. A quantidade total de matéria seca acumulada pela planta é reflexo direto da produção fotossintética líquida, somada à quantidade de nutrientes minerais absorvidos (Engel, 1989). Assim, é possível comparar entre condições diferentes de crescimento e conhecer sobre as necessidades nutricionais requeridas por determinada espécie (Engel, 1989).

Quanto ao comprimento e biomassa da parte aérea se verificou que, após 120 dias

de tratamento, as plântulas de *Q. grandiflora* crescidas em solução com Al responderam melhor quando comparadas com as crescidas na ausência de Al. Essas diferenças, que variaram de 23,9 a 40% em raízes e parte aérea respectivamente em favor das plântulas tratadas com AL, se mostraram estatisticamente significativas ($P < 0,05$). Quanto ao papel que o Al porventura exerce no metabolismo e fisiologia das plantas, Matsumoto *et al.* (1976) entendem que a acumulação de Al nas folhas é um processo lento e pode não ter um papel fisiológico crítico no crescimento inicial da parte aérea, mas que um longo período de exposição poderá refletir um melhor desenvolvimento da parte aérea de plantas acumuladoras. É possível que essa diferença na função fisiológica do Al nas fases iniciais e mais avançadas no desenvolvimento das plantas seja em decorrência da presença deste metal nas reservas das sementes, o que pode diminuir a necessidade deste metal no início do desenvolvimento vegetal.

Quanto ao crescimento da parte radicular também foi observado que o Al estimulou o crescimento das raízes de *Q. grandiflora*. Semelhantemente, *Miconia albicans* em solos ácidos e alta concentração de Al também apresenta maior crescimento radicular (Haridasan 2008²). Adicionalmente, trabalhando com arroz (*Oriza sativa* L.) Tang Van Hai *et al.* (1989) ressaltam que o Al em solução nutritiva pode até incitar o crescimento radicular em plantas não sensíveis. Nessas plantas, o Al parece ter uma função fisiológica nessas plantas que reflete positivamente no processo de formação de novas raízes e só então é transferido para as folhas e então é acumulado nas células (Matsumoto *et al.* 1976). Os resultados observados em *Q. grandiflora* comprovam que o Al não estimula efeitos de estresse em raízes; ao contrário, estimula ao crescimento nessa planta acumuladora.

Os resultados sobre o acúmulo de biomassa mostra que ocorreu uma maior alocação de matéria seca no sistema radicular em plântulas de *Q. grandiflora* cultivadas na presença de Al. De forma similar, em *Vochysia thyrsoidea* a massa seca radicular foi maior nas plantas crescidas em solos com alta concentração de Al quando comparadas com aquelas crescendo em solos calcários (Machado, 1985). É sabido que raízes tem um grande consumo de fotoassimilados, que pode chegar até 44% do que a planta produz, sendo que $\frac{1}{4}$ desse valor é utilizado em crescimento e o restante é consumido na respiração de manutenção (Pimentel, 1998). As raízes que mais recebem fotoassimilados são as recém-formadas, próximas à superfície do solo, e quanto mais escassos os recursos no meio, maior o investimento em sistema radicular. Para a maioria das plantas, está bem estabelecido que o Al é um competidor direto do Ca, Mg e P, pois se liga a canais desses íons na membrana celular da célula radicular (Horst, 1995; Kohian, 1995, 2004). Provavelmente, o Al^{3+} diminuiu a absorção de alguns

desses nutrientes, estimulando o crescimento da raiz para explorar melhor o solo e superar as deficiências nutricionais decorrentes da presença do Al^{3+} . Em função deste crescimento ocorre um maior acúmulo de biomassa nessa parte da planta.

Outra possibilidade pode estar relacionada com uma possível função fisiológica do Al, além daquelas associadas aos conhecidos efeitos tóxicos do Al. O Al parece estar envolvido em mecanismos fisiológicos de crescimento e desenvolvimento de *Q. grandiflora* resultando em respostas positivas na presença desse metal. Isso parece ser resultado de suas condições adaptativas de sobrevivência.

7.6.5. Análise de pigmentos fotossintetizantes

O crescimento e a adaptação da planta a diferentes ambientes podem estar relacionados à sua eficiência de crescimento, que está associada, entre outros fatores, aos teores de clorofila foliar (Almeida *et al.*, 2004). Os teores de clorofila e carotenoides nas folhas são utilizados para estimar o potencial fotossintético das plantas, pela sua ligação direta com a absorção e transferência de energia luminosa e ao crescimento e à adaptação a diversos ambientes (Porra *et al.*, 1989). Uma planta com alto teor de clorofila é capaz de atingir taxas fotossintéticas mais altas, o que está relacionado com o seu valor potencial de captação de “quanta” por unidade de tempo (Porra *et al.*, 1989; Chappelle & Kim, 1992). Quaisquer modificações nos níveis de pigmentação fotossintetizante de uma espécie podem estar relacionadas às diferentes respostas fisiológicas em suas características bioquímicas e anatômicas devido às diferentes condições de crescimento (Atroch *et al.*, 2001).

As plântulas submetidas ao Al apresentaram maior conteúdo de clorofilas (*a/b*). As maiores taxas de clorofilas *a* e *b* nessas plântulas podem ser decorrentes da maior eficiência adaptativa dessa espécie à presença desse metal. Concomitantemente, o Al pode ter estimulado o melhor desenvolvimento foliar, o que sem apresentar os sinais de clorose e oxidação visualizados em plântulas crescidas sem Al, pode ter favorecido a abertura dos estômatos e a fixação de carbono pelas plantas (Walters *et al.*, 1993). Além disso, o aumento da clorofila *b* em plântulas que receberam Al pode ser devido a um aumento da proporção do complexo coletor clorofila *a/b*-proteína, em relação ao complexo P-700-clorofila *a*-proteína (Mebrahtu, 1991).

Outro fator importante pode ser o maior desenvolvimento de “grana” em cloroplastos de folhas crescidas sob Al, que é onde se encontra o complexo *a/b*-proteína (Mebrahtu, 1991). É provável que sob condições de alta saturação de Al tenha havido um

eficiente controle de produção de pigmentos fotossintetizantes, conseqüentemente, do status adaptativo da planta na presença desse metal, de modo a permitir uma otimização da atividade fotossintética e da turgescência, necessárias ao crescimento (Reis, 1991).

A capacidade de crescer rapidamente na presença de Al é um mecanismo importante de adaptação da espécie (Haridasan, 2008²). A adaptação aos altos teores de Al é uma característica genética, a qual faz com que as folhas apresentem estrutura anatômica e propriedades fisiológicas que as capacitem ao uso efetivo da radiação solar disponível.

A redução da taxa dos pigmentos clorofila *a*, *b* e carotenos na ausência de Al pode estar associada aos sinais de clorose em toda a extensão do limbo (característica observada em mais de 70% das plantas desse tratamento), conseqüentemente, à diminuição da taxa fotossintética, o que induziria ao fechamento dos estômatos, reduzindo a fixação de carbono e causando uma diminuição na quantidade de fotoassimilados (Grime, 1965; Kozłowski *et al.*, 1991). Outros estudos mostram que respostas de mal desenvolvimento foliar podem causar decréscimos nos teores de clorofilas *a* e *b* e de carotenos e diminuir a razão entre clorofilas e carotenos (Carvalho *et al.*, 2007; Pompelli *et al.*, 2010; Lui *et al.*, 2011).

7.7. CONCLUSÕES

- As diferentes condições de crescimento em meio nutritivo às quais as plântulas de *Q. grandiflora* foram submetidas influenciaram nos parâmetros de crescimento, biomassa e teores de clorofila avaliados;
- *Q. grandiflora* apresentou um melhor desenvolvimento da parte aérea e radicular crescendo em solução nutritiva com Al;
- O crescimento e biomassa, bem como as taxas de crescimento da parte aérea e radicular de plântulas dessa espécie foram maiores na presença do Al;
- Os teores de clorofila foram influenciados positivamente pela adição do Al em solução nutritiva;
- Nota-se que o Al é um elemento químico importante para o crescimento e desenvolvimento de *Q. grandiflora*.

7.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, S.J.; SIVAGURU, M.; OSAWA, H.; CHUNG, G.P.; MATSUMOTO, H. Aluminum inhibits the H⁺-ATPase activity by permanently altering the plasma membrane surface potentials in squash roots. *Journal Plant Physiology*, v. 126, p. 1381-1390, 2001.

ALMEIDA, L. P. de, ALVARENGA, A. A. de; CASTRO, E. M. de; ZANELA, S. M.; VIEIRA, C. V. Crescimento inicial de plantas de *Cryptocaria aschersoniana* Mez. submetidas a níveis de radiação solar. *Rev. Ciência Rural, Santa Maria*, v. 34, n. 1, p. 83- 88, 2004.

ANDRADE, J. V. C.; MOTA, J. H.; CASTRO, N. E. A. DE. Avaliação da tolerância a alumínio de dois genótipos de sorgo. *Rev. científica eletrônica de agronomia*. n. 07, 2005.

ATROCH, E. M. A. C; SOARES, A. M.; ALVARENGA, A. A. de; CASTRO, E. M, de Crescimento, teor de clorofilas, distribuição de biomassa e características anatômicas de plantas jovens de *Bauhinia forticata* LINK submetidas à diferentes condições de sombreamento. *Rev. Ciência e Agrotecnologia, Lavras*, v. 25, n. 4, p. 853–862, 2001.

BALIGAR, V.C.; ANGHINONI, I.; PITTA, G.V.E.; SANTOS, H.L. dos; CUNHA FILHO, E.; SCHAFFERT, R.E. Aluminum effects on plant and nutrient uptake parameters of soil and solution grown sorghum genotypes. *Journal of Plant Nutrition, New York*, v.18, n.11, p.2325-2328, 1995.

CAMARGO, C. E. O. Melhoramento do trigo VI hereditariedade da tolerância a três concentrações de alumínio em solução nutritiva. Seção de Arroz e Cereais de Inverno, Instituto Agrônômico. *Rev. Bragantia*. v.43. n.2. p. 279-291, 1984.

CARVALHO, A. P. F.; BUSTAMANTE, M. M. C.; KOZOVITS, A. R.; ASNER, G. P. Variações sazonais nas concentrações de pigmentos e nutrientes em folhas de espécies de Cerrado com diferentes estratégias fenológicas. *Rev. Brasileira de Botânica*. v.30. n.1. p. 19-27, 2007.

CHAPPELLE, E. W.; KIM, M. S. Ratio analysis of reflectance spectra (RARS): an algorithm

for a remote estimation of the concentrations of chlorophyll A, chlorophyll B, and carotenoids in soybean leaves. *Journal Remote Sensing of Environment*, New York, v. 39, p. 239-247, 1992.

CHENERY, E.M. A preliminary study of aluminium and the tea bush. *Journal Plant and Soil*, Dordrecht, v.6, p.174-200, 1955.

CLARKSON, D.T. The effect of aluminum and some other trivalent metal cations on cell division in the root apices of *Allium cepa*. *Journal Analytical Botany*, v. 29, p. 309-315, 1995.

COSTA DE MACEDO, C.; KINET, J. M. & VAN SINT JAN, V. Effects of duration and intensity of aluminium stress on growth parameters in four rice genotypes differing in aluminium sensitivity. *Journal of Plant Nutrition*, v. 20, n. 1 p. 181-193, 1997.

DELHAIZE, E.; RYAN, P.R.; RANDALL, P.J. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum*) L. II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. *Journal Plant Physiology*. v.103. p. 695–702, 1993.

ENGEL, V. L. Influência do sombreamento sobre o crescimento de mudas de espécies nativas, concentração de clorofila nas folhas e aspectos de anatomia. 202 f. Dissertação (Mestrado) – ESALQ, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1989.

FAGERIA, N. K.; WRIGHT, R. J. & BALIGAR, V. C. Rice cultivar response to aluminium in nutrient solution. *Journal Communications in Soil Science and Plant Analysis*, v. 19, n. 7/12, p. 1133-1142, 1988.

FAGERIA, N. K.; CARVALHO, J. R. P. Influence of aluminum in nutrient solutions on chemical composition in upland rice cultivars. *Journal Plant and Soil*, Dordrecht, v. 69, p. 31-44, 1982.

FOY, C. D. & SILVA, A. R. D. A. Tolerances of wheat germplasm to acid subsoil. *Journal of Plant Nutrition*, v. 14, p. 1277-1295, 1991.

FOY, C. D. Physiological effects of hydrogen, aluminum, and manganese toxicities in acid soil. In: ADAMS, F. , ed. Soil acidity and liming. Madison, American Society of Agronomy, 2.ed. p.57-97, 1984.

FREIRE, L.R.; AMARAL SOBRINHO, N.M.B.; FERNANDES, M.S.; RIBEIRO, M.E.S.; SANTOS, J.C.P. dos. Efeito de alumínio nas raízes de arroz cultivado em solução nutritiva. Rev. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.22, n.5, p.459-464, maio 1987.

FURLANI, P.R.; FURLANI, A.M.C. Tolerância a alumínio e eficiência a fósforo em milho e arroz: características independentes. Bragantia, Campinas, v.50, n.2, p.331-340, 1991.

GRIME, J. P. Shade tolerance in flowering plants. Journal Nature, v. 208, n. 5006, p. 161-163, 1965.

HADAS. A. Water uptake and germination of leguminous seeds under changing external water potential in osmotic solution. Journal Experimental Botany, Oxford, v. 52, p. 480 – 489, 1976.

HARIDASAN, M., ARAÚJO, G. M. Aluminium-accumulating species in two forest communities in the cerrado region of central Brazil. Journal Forest Ecology and Management, v. 24, p. 15-26, 1988.

HORST, W. J. The role of the apoplast in aluminum toxicity and resistance of higher plants: a review. Z Pflanzenernaehr Bodenkd. v. 158. p. 419–428, 1995

JAN, F. & PETERSSON, S. Varietal diversity of upland rice in sensitivity to aluminium. Journal of Plant Nutrition, v. 12, n. 9, p. 973- 993, 1989.

JANSEN, S.; BROADLEY, M.; ROBBRECHT, E.; SMETS, E. Aluminium hyperaccumulation in angiosperms: a review of its phylogenetic significance. Botanical Review, v. 68, p. 235-269, 2002.

JONES, D.L.; KOCHIAN, L.V. Aluminum interaction with plasma membrane lipids and

enzyme metal binding sites and its potential role in Al citotoxicity. *FEBS Letters*, v. 400, p. 54-57, 1997.

KINRAIDE, T.B. Identity of the rhizotoxic aluminum species. *Journal Plant and Soil*, v. 134, p. 167-178, 1991.

KINRAIDE T.B.; PARKER D.R. Apparent phytotoxicity of mononuclear hydroxy aluminium to four dicotyledenous species. *Journal Physiologia Plantarum*, v. 79, p. 283–288, 1990.

KLINK, A.C.; MIRANDA, H. S.; GONZALOES, M.I.; VICENTINI, R.F. O Bioma Cerrado. Brasília, DF, 2003 *in* www.fonatura.org.br/conteudo. Acesso dia 13 de julho de 2012 às 09:15 hrs.

KOCHIAN, L.V., Hoekenga, O. A.; Piñeros, M. A. How do crop plants tolerate acid soils? mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Journal Plant Biol.*v. 55. p.459–493, 2004.

KOCHIAN, L.V. Cellular mechanism of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annual Review Plant Physiology. Journal Plant Molecular Biology*, Nova Iorque, v.48, p.237-260, 1995.

KONISHI, S. Stimulatory effects of aluminium on tea plant growth. In: XIV International congress of soil science, 1990, Kyoto. Transactions. Kyoto: ISSS. v.4, p.164-169, 1990. Trabalho apresentado na seção “New Aspects of Essential and Beneficial Elements in Plant Nutrition”.

KOZLOWSKI, T. T.; KRAMER, P. J.; PALLARDY, S. G. The physiological ecology of woody plants. San Diego: Academic Press. 657 p. 1991.

LIU, C.; LIU, Y.; GUO, K.; FAN, D.; LI, G.; ZHENG, Y.; YU, L.; YANG, R. Effect of dorghht on pigments, osmotic adjustment and antioxidant enzymes in six Woody plant species in karst habitats of southwestern China. *Journal Enviornmental and Experimental Botany*. v.71. p. 174-183, 2011.

LIU, D.; JIANG, W. Effects of Al^{3+} on the nucleolus in root tip cells of *Allium cepa*. Rev. Hereditas, v. 115, p. 213-219, 1991.

MACHADO, J. W. B. Acumulação de alumínio em *Vochysia thyrsoidea* Pohl. Dissertação de Mestrado, Brasília, DF, Universidade de Brasília, 1985.

MATSUMOTO, H. Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. International Review of Cytology, v. 200, p. 1-46, 2000.

MATSUMOTO, H. et al. Localization of aluminium in tea leaves. Journal Plant and Cell Physiology. v. 17, nº 3, p. 627-631, 1976.

MEBRAHTU, T.; HAVOVER, J. W. Leaf age effects on photosynthesis and stomatal conductance of black locust seedlings. Journal Photosynthetica, Prague, v. 25, n. 4, p. 537-544, 1991.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Journal Plant Physiol. v.15. p.473-497, 1962.

PEIXOTO, P.H.P.; CAMBRAIA, J.; MOSQUIM, P.R.; MOREIRA, M.A. Aluminum effects on fatty acid composition and lipid peroxidation of a purified plasma membrane fraction of root apices of two sorghum cultivars. Journal of Plant Nutrition, v. 24, p. 1061-1070, 2001.

PIMENTEL, C. Metabolismo de carbono na agricultura tropical. Seropédica : Edur, 150 p. 1998.

PEREIRA, T.S.; ANDRADE, A.C.S. Germinação de *Psidium guajava* L. e *Passiflora edulis* S. - Efeito da temperatura, do substrato e morfologia do desenvolvimento pós-seminal. Rev. Brasileira de Sementes, Brasília, v.16, p.58-62, 1994.

POMPELLI, M. F.; MARTINS, S. C. V.; ANTUNES, W. C.; CHAVES, A. R. M.; DaMATTA, F. M. Photosynthesis and photoprotection in coffee leaves is affected by nitrogen and light availabilities in winter conditions. Journal of Plant Physiology. v.167. p. 1052-1060.

PORRA, R. J.; THOMPSON, W. A.; KRIDEMANN, P. E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophylls standards by atomic absorption spectroscopy. *Journal Biochimic et Biophysica Acta*, Amsterdam, v. 975, p. 384-394, 1989.

REID, D. A.; FLEMING, A. L.; FOY, C. D. A. Method of determining aluminum response of barley in nutrient solution in comparison to response in Al-toxic soil. *Journal Agron. J. Madison*. v.63. p.600-603, 1971.

REIS, G. G. dos. Crescimento e ponto de compensação lumínico em mudas de espécie florestais nativas submetidas a diferentes níveis de sombreamento. *Rev. Árvore*, Viçosa, v. 18, n. 2, p. 103-111, 1991.

SANTOS, C. A. C.; ALMEIDA, J.; SANTOS, A. R.; VIEIRA, E. L.; CLOVIS PEREIRA PEIXOTO, C. P. *Rúcula* em cultivo hidropônico submetida em diferentes concentrações de alumínio - *eruca* in hydroponics posted in different concentrations of aluminum. *journal bioscience* v.26. n.6, 2010

SILVA, A. C. Avaliação da tolerância ao alumínio em plântulas de maracujazeiro e mamoeiro. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRJ. 2009.

TANG VAN HAI; TRUONG THI N. G. A.; LAUDELOUT, H. Effect of aluminium on the mineral nutrition of rice. *journal. Plant and Soil*.v. 114. p. 173–185, 1989.

VASCONCELOS, S. S. Métodos de avaliação da tolerância à toxicidade de alumínio em cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.). Dissertação de Mestrado. Seropédica: Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRRJ, 1997. 137 p.

WALTERS, M. B.; KRUGER, E. L.; REICH, P. B. Growth, biomass distribution and CO₂ exchange of northern hardwood seedlings in high and low light: relationships with successional status and shade tolerance. *Rev. Oecologia*, Berlin, v. 94, p. 7-16, 1993.

WATANABE, T.; OSAKI, M. Mechanisms of adaptation to high aluminum condition in

native plant species growing in acid soils: a review. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, v. 33, p. 1247-60, 2002.

WELLBURN, A. R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. journal. Plant Physiol.* v. 144, p. 307-313, 1994.

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

**CAPÍTULO II - Histoquímica comparativa da presença de
Alumínio em plântulas de *Qualea grandiflora* Mart.**

8. HISTOCHEMISTRY COMPARATIVE THE PRESENCE OF ALUMINUM IN THE SEEDLING *QUALEA GRANDIFLORA* MART.

8.1. ABSTRACT: Approximately 20% of Brazilian soils are acid and have high levels of aluminum (Al). These characteristics are common to Cerrado soils and many plant of this biome not only tolerate high levels of Al, but also accumulate considerable amounts of this metal. The location of Al in tissues/organs of Cerrado plants is extremely important to elucidate the physiological mechanisms that involve Al metabolism in plants. The objective of this study was to evaluate the presence of Al in various organs of *Qualea grandiflora* (pau-terra) seedlings, a native Al accumulating species. Seeds of *Q. grandiflora* were germinated and grown with and without Al. After 120 days, root samples (mature regions), as well as stem and leaves (at the node 2) from seedlings of both treatments were hand-sectioned and stained with either hematoxylin (0.2%) + NaIO₃ (0.02%) or aluminon (0.1%) + 3M ammonium acetate, which are capable of detecting Al in plant tissues. The microscopy analysis showed that in roots, Al was present in the cortex, endodermis and pericycle, independently of the kind of dye used. Furthermore, Al was also present in the root phloem. In the stem, both dyes detected the presence of Al in the cortex, endodermis, phloem and pith. In leaves, hematoxylin only detected Al in samples from seedlings treated with Al, which was present in the epidermis, mesophyll (both palisade and spongy parenchyma), as well as in the phloem of the midrib. Otherwise, tests with aluminon detected Al in the same regions, of both treatments. Moreover, the samples taken from plants grown with Al showed higher stain intensity than those grown without Al. In general, aluminon test detected Al regardless the treatment, nonetheless the reactions were more intense in seedlings grown with Al. Similarly, this pattern was also verified when hematoxylin was used, therefore, in comparison with the control plants, Al-grown plants always had high reaction intensity. Thus, the results shown here support the idea that Al may be absorbed by the roots and transported to leaves, where it can be accumulated. Additionally, the fact that Al was also detected in control plants indicates that this metal may be present in seed reserve, and also may play a role during seed germination and plant establishment. Al accumulation in *Q. grandiflora* suggests that the accumulation of this metal may be of physiological relevance for this species, and not mere mechanism of detoxification.

Key words: Hematoxilin, Aluminon, tissue, accumulate aluminum.

8. HISTOQUÍMICA COMPARATIVA DA PRESENÇA DE ALUMÍNIO EM PLÂNTULAS DE *QUALEA GRANDIFLORA* MART.

8.2. RESUMO: Aproximadamente 20% do território brasileiro apresenta solos com forte acidez, e níveis elevados de alumínio (Al). Essas características são comuns aos solos do Cerrado e neste bioma há numerosos exemplos de plantas que não apenas toleram a presença de Al, mas também acumulam consideráveis quantidades desse metal. A localização do Al em tecidos/órgãos vegetais é de extrema importância para elucidar os mecanismos fisiológicos que envolvem o metabolismo desse metal nas plantas acumuladoras. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de Al em diversos órgãos de plântulas de *Qualea grandiflora* (pau terra), uma espécie nativa acumuladora de Al. Sementes de *Q. grandiflora* foram germinadas e crescidas em dois tratamentos (com e sem Al). Após 120 dias, amostras de regiões maduras da raiz, como também de caule e folhas (2º nó) de plântulas dos dois tratamentos foram seccionadas em micrótomo de mão e coradas com aluminon (0,1%) + 3M acetato de amônio e hematoxilina (0,2%) + NaIO₃ (0,02%), corantes capazes de detectar Al em tecidos vegetais. As lâminas foram montadas em glicerina e analisadas e fotografadas em microscópio. Em raízes, verificou-se presença de Al no córtex, endoderme e periciclo nos dois tratamentos independente do corante utilizado. Quanto aos tecidos vasculares, o Al foi detectado apenas no floema da raiz. No caule, observaram-se reações positivas no córtex, endoderme, floema e na região medular; os resultados foram positivos para os dois corantes nos dois tratamentos. Nas folhas, quando coradas com hematoxilina, apenas plântulas tratadas com Al revelaram a presença de Al na epiderme, no parênquima clorofiliano e floema na nervura central e parênquima paliçádico e lacunoso no limbo. Adicionalmente, testes com aluminon detectaram Al nessas estruturas nos dois tratamentos, com maior intensidade no tratamento com Al. É importante dizer que em raízes e caules, o Al foi detectado independentemente do tratamento; porém, as reações foram mais intensas nas plântulas crescidas com Al. Muito embora, em grande parte dos tecidos a hematoxilina mostrou resultados positivos para a presença de Al com a respectiva conformação com o aluminon. Estes dois corantes mostraram ser capazes de detectar Al de forma bastante consistente nos diversos órgãos examinados. Assim, ficou claro que o Al é absorvido pelas raízes e transportado pela planta, e o local de maior acumulação deste metal pareceu ser a folha. Ainda, como o Al foi detectado em plantas controle pode-se concluir que este elemento já está presente nas reservas da semente e que a sua mobilização deve ocorrer durante a germinação. A presença do Al em *Q. grandiflora* reforça a ideia de que o acúmulo desse metal possa ter

um papel de alta relevância fisiológica nessas plantas, não sendo apenas um mero mecanismo de desintoxicação.

Palavras chave: Hematoxilina, Aluminon, tecidos, acumuladora do Cerrado.

8.3. INTRODUÇÃO

8.3.1. O alumínio (Al) em plantas

O Cerrado brasileiro, que compõe em torno de 20% do território nacional, caracteriza-se por apresentar solos com forte acidez, deficiência extrema de fósforo, cálcio, magnésio e níveis elevados de Al e manganês (Embrapa, 1978). Nessas condições, o Al dissolvido na solução do solo, pode ser absorvido pelas plantas o que causa, em espécies sensíveis, inibição do crescimento radicular e, conseqüentemente, sintomas de desnutrição generalizada (Vitorello *et al.*, 2005).

A solubilização do Al é um fenômeno complexo, e foi demonstrado que o Al^{3+} é a espécie de Al mais rizotóxica (Kinraide & Parker, 1990). Essa toxicidade se deve ao fato que o Al^{3+} , assim como outras formas monoméricas do Al, são potencialmente reativos com ligantes biológicos (Ahn *et al.*, 2001). Pesquisadores têm especulado que a toxicidade do Al^{3+} em plantas sensíveis pode ser resultado de interações desse metal com vários sítios celulares diferentes como com a parede celular, membrana plasmática e protoplasma. Além disso, o Al pode se ligar a enzimas, proteínas, canais de Ca e moléculas sinalizadoras (Ahn *et al.*, 2001).

Embora o Al^{3+} possa produzir alguns efeitos tóxicos comuns à maioria das plantas, como por exemplo, inibição do crescimento radicular e conseqüente diminuição da absorção de macronutrientes e micronutrientes, há efeitos específicos sobre diferentes grupos de plantas (Tabaldi, 2008). Assim, tanto dentro de uma mesma espécie quanto entre espécies diferentes pode haver uma ampla variação genética com respeito à tolerância ao Al, indicando que muitas espécies nativas de solos ácidos ou cultivares tolerantes desenvolveram vários mecanismos de desintoxicação ao Al, o que pode incluir a imobilização e acumulação em seus tecidos (Tabaldi, 2008).

Embora muitos estudos buscassem explicar mecanismos de tolerância e acúmulo de Al em plantas, a mobilização do Al nos tecidos de plantas tolerantes e acumuladoras ainda não está bem elucidada (Haridasan, 1986; Silva, 2009). Além disso, em função do Cerrado possuir características peculiares, principalmente ligadas à acidez dos solos, há numerosos exemplos de espécies nativas que acumulam esse metal em partes aéreas, sugerindo o transporte desse metal pela raiz via xilema (Haridasan, 2008²). Assim, estudos da localização do Al nessas espécies podem ajudar na elucidação dos mecanismos de mobilização desse metal nos diferentes órgãos, bem como sua função metabólica que fazem com que essas

plantas sejam classificadas de “aluminiofílicas” (Haridasan *et al.*, 2008²).

8.3.2. Localização do Al em tecidos vegetais

A detecção de Al em tecidos vegetais é um passo importante para o estudo dos mecanismos utilizados pelas plantas para sua desintoxicação e/ou tolerância (Haridasan *et al.*, 1986, 2008²). Alguns artigos mostram que várias espécies do bioma Cerrado tais como *Miconia albicans* (Sw.) Triana e *Miconia ferruginata* (D.C.) (Melastomataceae) (Jansen *et al.*, 2003; Haridasan *et al.*, 1986), *Qualea multiflora* Mart., *Qualea parviflora* Mart. e *Vochysia Thyrsoides* (Vochysiaceae) (Haridasan, 1982; Haridasan *et al.*, 1986, 2008¹) e *Palicourea rígida* (Rubiaceae) (Haridasan, 1982; Haridasan *et al.*, 1986) acumulam Al em grandes quantidades nas folhas, e que esse acúmulo não interfere na absorção de outros cátions, tais como K, Ca e Mg (Haridasan *et al.*, 2008¹). No entanto, informações sobre papel do Al no metabolismo dessas plantas ou de sítios de acumulação desse metal em tecidos de diferentes órgãos, como raiz e caule não estão disponíveis.

Haridasan e colaboradores (1986) relatam que o Al ocorre em grandes quantidades na parede celular e epiderme das folhas de *Q. grandiflora*, *Q. parviflora* e *Q. multiflora*. Alguns estudos mostram a presença de Al nos elementos de floema e outros tecidos metabolicamente ativos de folhas e sementes também em outras plantas acumuladoras do Cerrado como *Miconia pohliana* Gogn. e *Vochysia rufa* (Spr.) Mart. Estes dados fortemente sugerem que este metal pode ser translocado e redistribuído entre os diversos órgãos vegetais (Haridasan *et al.*, 1986, 1987). Contudo, pouco se sabe sobre como ocorre a translocação do Al da raiz para as partes aéreas. No entanto, altas concentrações de Al nas sementes é uma evidência indireta de que o transporte deste pode ocorrer via xilema e floema, e também que o Al possa ter alguma função metabólica nessas plantas (Barros *et al.*, 2007; Haridasan 2008²).

8.3.3. Histoquímica vegetal

O uso de técnicas químico-histológicas para a identificação de substâncias em botânica está baseada no uso de reagentes cito ou químico-histológicos previamente estabelecidos em protocolos. Essa metodologia auxilia na identificação da composição química de substâncias presentes em estruturas vegetais, quer seja de compostos do metabolismo primário e/ou secundário, e ainda, pode auxiliar na localização de metais e íons

acumulados provenientes do solo (Costa & Proença da Cunha 2000).

Costa e Proença da Cunha (2000) afirmam que além do valor intrínseco da identificação de compostos nos diferentes tecidos, as técnicas de histoquímica ainda contribuem para explicar mecanismos adaptativos das espécies em seu ambiente natural de sobrevivência.

Os métodos histoquímicos baseiam-se em reações cromáticas utilizadas no reconhecimento da natureza química das membranas e do conteúdo celular (Costa & Proença da Cunha, 2000). São métodos de análise qualitativa e, às vezes, quantitativa de componentes celulares, incluindo proteínas, carboidratos, lipídios e elementos iônicos (Gersbach *et al.*, 2001). Esses métodos combinam várias técnicas de microscopia e fotomicroscopia apoiados em metodologia especial que valoriza a presença, bem como o sítio ativo das substâncias químicas ou grupos de compostos do metabolismo nas plantas (Gersbach *et al.*, 2001).

8.3.3.1. Testes histoquímicos para detecção de Al em plantas

O uso de corantes químicos é um método rápido e barato para avaliar a presença de Al nas plantas, que para ter eficiência deve ser considerada a razão H^+/OH^- no meio intra e extracelular, estágio de crescimento do órgão (se o indivíduo é plântula ou adulto) e sua coloração natural (pigmentos provenientes do metabolismo vegetal) (Rossiello & Jacob Neto, 2006). Deve também ser considerado o provável local de exclusão ou acumulação do Al, e se o mecanismo de tolerância da espécie é baseado na exclusão externa ou interna na raiz ou se ocorre na parte aérea (Jacob- Neto *et al.*, 1991; Jacob- Neto, 1993; Barceló & Poschenraider, 2002).

Vários corantes têm sido utilizados para a detecção de Al em plantas, alguns apresentaram grande eficiência, como a hematoxilina (Kinraide, 1988; Massot *et al.*, 1991; Vasconcelos, 1997), quinalizarina (Kalovoulos & Misopolinos, 1993), azul de metileno (Wagatsuma *et al.*, 1988), violeta de pirocatecol (Jacob-Neto, 1993, Vasconcelos, 1997) e aluminon (Haridasan *et al.*, 1986; Cotta *et al.*, 2007).

8.3.3.2. Hematoxilina e Aluminon na detecção do Al em plantas

A hematoxilina e o aluminon são corantes indicadores da presença de Al e frequentemente utilizados em análises de tecidos vegetais. A hematoxilina é um corante orgânico, de caráter básico que desenvolve uma cor azul-turquesa quando complexado com o

Al (Backer, 1962). O princípio desse método de avaliação se baseia na oxidação da hematoxilina para hemateína (por NaIO_3 ou outros agentes oxidantes), que em presença de íons metálicos (Cr, Fe ou Al), tem a propriedade de se corar (Gill *et al.*, 1974).

Já o aluminon é um sal do ácido aurintricarboxílico, sendo usado para detecção de Al^{3+} em meio ácido; ou na forma de um complexo quelado com o Al, e produz uma coloração vermelha. (Clark e Krueger, 1985).

O aluminon foi testado por Haridasan (1986) em plantas acumuladoras de Al do Cerrado em espécies das famílias Melastomataceae, Rubiaceae e Vochysiaceae que apresentaram reações positivas para presença deste metal em tecidos foliares. Consistentemente, Cotta *et al.* (2008) detectaram o Al em três espécies do Cerrado também em tecidos foliares utilizando tanto a hematoxilina quanto o aluminon. Barros (2007) e Haridasan (1986) utilizaram respectivamente a hematoxilina e o aluminon para a detecção de Al em tecidos vegetais de várias espécies nativas do Cerrado, entre as quais, *Q. grandiflora*. A comparação desses dois trabalhos mostrou que hematoxilina e aluminon apresentaram diferenças no padrão de coloração dos tecidos foliares dessa espécie. Esses trabalhos mostram que os dois corantes possuem diferentes capacidades de detecção, sugerindo que a presença de outros íons trivalentes como Be^{3+} e Fe^{3+} e a presença de agentes redutores como H_2S e SO_2 podem interferir na formação do complexo corante-Al.

Neste trabalho, tanto a hematoxilina quanto o aluminon foram usados para estudar a distribuição do Al nos diversos tecidos de raiz, caule e folha de *Q. grandiflora* para entender melhor os mecanismos de transporte e mobilização do Al nos diferentes tecidos e órgãos analisados.

8.4. MATERIAL E MÉTODOS

8.4.1. Material vegetal

Sementes de *Q. grandiflora* foram separadas, germinadas em papel germitest por 30 dias em água destilada autoclavada. Em seguida, as plântulas com 2-3 cm de radícula foram transferidas para recipientes de 500 mL de vermiculita contendo meio líquido de $1/5$ MS (1962) em dois tratamentos (com e sem Al). O Al foi fornecido pela adição de $150 \mu\text{M}$, de AlCl_3 na solução nutritiva. O pH da solução nutritiva foi mantido entre 4,5 e 4,8 para evitar a precipitação com Al, sendo feito sempre que necessário o ajuste com HCl 0,1 M ou KOH 0,1

M, durante o período experimental de 120 dias. As plântulas foram colocadas em sala de germinação a 25°C, 70% de umidade, e fotoperíodo de 18 h. Raízes, caules e folhas de cinco plantas de cada tratamento foram separados para a análise histoquímica.

8.4.2. Análise histoquímica na presença e ausência de Al

Amostras de raízes (regiões medianas), caules e folhas do segundo nó das plântulas foram retiradas, armazenadas e estocadas em água destilada autoclavada até que a análise histoquímica fosse realizada. Os cortes foram feitos em micrótomo de bancada e imersos em solução de aluminon (Vetec) (0,1% aluminon + 3N acetato de amônio) durante uma hora e em seguida imersos em água Milli-Q por 5 min. Em seguida estes cortes foram imersos em 3,2N de carbonato de amônia (Vetec) durante 5 min. (Haridasan, 1986). Além do aluminon, secções transversais dos mesmos órgãos foram coradas com solução de hematoxilina (Vetec) (0,2% hematoxilina + 0,02% Na IO₃) por 35 min e em seguida lavadas por 5 min em água Mili-Q (Barros *et al.*, 2007). Após a coloração, as lâminas provisórias foram montadas em água destilada e analisadas em microscópio Olympus CX31 e fotografadas com câmera digital acoplada Olympus Camedia C- 7070; 20 megapixels.

8.5. RESULTADOS

8.5.1. Análise anatômica-estrutural de *Q. grandiflora* nas diferentes condições de crescimento

A análise anatômica não mostrou diferenças estruturais entre plântulas de *Q. grandiflora* provenientes dos dois tratamentos.

Raízes: anatomicamente as raízes de *Q. grandiflora* possuem uma epiderme simples, uma hipoderme distinta, um córtex parenquimático e medula. O sistema vascular presente é do tipo sifonostélico, pouco comum em dicotiledôneas, onde a medula fica envolvida por um cilindro de xilema e um de floema (Fig. 1 e 2).

Caules: Em *Q. grandiflora* o caule possui uma epiderme simples e abaixo desta existe um tecido parenquimático de aproximadamente duas camadas de células (Fig. 3 e 4). Mais internamente, há uma camada distinta de tecido esclerenquimático. No estágio de desenvolvimento em que o caule se encontrava por ocasião deste estudo, o restante do córtex

e a medula estavam separados por tecido vascular secundário - xilema internamente e floema externamente (Fig. 3- A e 4- A).

Folhas: As folhas possuem uma epiderme simples. Na nervura central há um parênquima aerífero distinto (Fig. 5 e 6). No feixe vascular da nervura principal o xilema se encontrava circundado pelo floema. O feixe vascular estava envolvido por um tecido fibroso. O mesofilo da folha tinha simetria dorsiventral (fig. 7).

8.5.2. Detecção de Al em raízes, caules e folhas de *Qualea grandiflora*

Esse metal foi encontrado na raiz, caule e folha de *Q. grandiflora* independentemente do tratamento e corante utilizado. Contudo, algumas pequenas diferenças foram observadas em alguns tecidos da folha com respeito à intensidade da reação, tipo de corante usado, e tecidos corados. Além dessas diferenças nas folhas, perceberam-se variações quanto à intensidade da reação nos três órgãos analisados, que geralmente mostraram os tecidos nas amostras do tratamento com Al com coloração mais intensa.

A presença de Al foi constatada nos diferentes órgãos de *Q. grandiflora* pela formação de uma coloração que variou de azul ao roxo nas amostras para testes feitos com hematoxilina e um vermelho púrpuro quando o corante usado foi o aluminon. A Tabela 1 mostra um quadro geral da presença de Al nos diversos órgãos/tecidos de *Q. grandiflora*.

Além de relatar a presença de Al em diferentes tipos de células e tecidos, a Tabela 1 também mostra que determinados tecidos tiveram maior intensidade de reação que outros. Em geral, os tecidos de amostras de plântulas do tratamento com Al se apresentaram mais corados comparados ao tratamento controle para ambos corantes usados.

Raízes: A análise foi feita em regiões medianas da raiz principal. Nos dois tratamentos, os corantes usados deram reação positiva para presença de Al na região do córtex da raiz das plântulas, sendo que a coloração mais intensa foi do tratamento com Al (Tabela 1, Fig. 1 e 2). Adicionalmente, o aluminon detectou Al somente na epiderme das raízes de plântulas crescidas com Al (Fig. 1-I). Por outro lado, a hematoxilina detectou esse metal nos dois tratamentos (com e sem Al) nesse tecido (2-F e I). Para as demais regiões da raiz, os dois corantes utilizados mostraram resultados similares, onde se observa reação positiva para Al nas células do córtex, tanto nas paredes quanto no conteúdo interno destas células, em ambos os tratamentos, mas consistentemente mais intensa nas raízes de plântulas crescidas com Al (Fig.1- A, D e G, 2- A, D e G). As células da endoderme e periciclo também se coraram levemente nas amostras dos dois tratamentos (Fig. 1-D e G, 2-D e G). No sistema vascular

das raízes, as paredes e conteúdos de algumas células do parênquima radial do xilema se apresentaram levemente coradas nas amostras de ambos os tratamentos independente do corante usado (Fig.1-E, H, 2-E e H). Em geral, os elementos de vaso e as fibras libriformes não apresentaram coloração. Entretanto, as regiões próximas do câmbio vascular e o floema secundário mostraram uma reação mais intensa que foi observada tanto nas paredes celulares quanto nos conteúdos celulares. O Al também foi detectado no parênquima medular da raiz nas paredes e conteúdo das células, sendo que não houve diferença de intensidade de coloração entre os dois tratamentos (Fig. 1-E, H, 2-E e H).

Caules: Ambos os testes histoquímicos revelaram coloração mais intensa em amostras de caule de plântulas do tratamento com Al (Fig. 3 e 4). Contudo, nem todos os tecidos caulinares deram reação positiva para a presença de Al, como é o caso da epiderme. No córtex, os resultados mostraram que as células do colênquima também não contém Al. Diferentemente, o parênquima cortical do caule mostrou a presença de Al nos dois tratamentos, contudo, o teste aluminon revelou maior intensidade para o tratamento com Al (Fig. 3- E). Quanto ao sistema vascular, os elementos do floema estavam corados nas paredes e conteúdos das células nos dois tratamentos, entretanto, nas amostras de plântulas crescidas com suplemento de Al as reações foram mais intensas, para ambos os testes histoquímicos (Fig. 3- C, E, 4-C e E). Na medula, a coloração foi mais intensa nas células parenquimáticas próximas ao xilema (3-D, F, 4-D e F). Ainda com respeito à medula, é importante destacar que as células onde se observou reação positiva para Al são aquelas que possuem grandes quantidades de plastídios (Fig. 3 e 4). Esta constatação pode ser vista nos cortes não submetidos aos testes para detecção de Al nas amostras de caule, independentemente do teste usado (Fig. 3-B e 4 –B). Este resultado pode indicar uma correlação positiva entre plastídios e acúmulo de Al nas células. Porém, análises mais acuradas (tais como técnicas em M.E.T.- Microscópio Eletrônico de Transmissão) serão necessárias para essa confirmação. No caule também não se observou coloração dos elementos de vaso e fibras libriformes.

Folhas: Na nervura central, somente o corante aluminon detectou a presença de Al nas paredes da epiderme nos dois tratamentos, com coloração mais intensa nas amostras do tratamento com Al (5- D e F). Já a hematoxilina apresentou resultados positivos na epiderme da nervura central somente nas amostras de plantas do tratamento com Al (6- C e E). No restante dos tecidos da nervura principal, paredes e conteúdo do parênquima clorofiliano adjacente à epiderme adaxial se apresentaram coradas nas amostras dos dois tratamentos apenas pela reação do aluminon, e consistentemente com outras amostras, as reações foram mais intensas no tratamento com Al (Fig. 5-D e F). Seguindo o padrão já observado em outros

tecidos, na nervura central a hematoxilina detectou Al apenas no parênquima clorofiliano de plântulas do tratamento com Al (6- E). Quanto aos feixes vasculares da nervura central, com aluminon, foi vista reação positiva para presença de Al nas paredes e conteúdos celulares dos elementos condutores do floema nos dois tratamentos, também com maior intensidade para amostras de plântulas do tratamento com Al (Fig. 5- E e G). A hematoxilina só apresentou reações positivas nos elementos de floema de amostras do tratamento com Al (Fig. 6- F). Independentemente do tratamento e corantes, os elementos de vaso e as fibras que acompanham os feixes não apresentaram reação positiva para presença de Al. Nas regiões do limbo, submetidas à reação com aluminon, a epiderme apresentou padrões de coloração semelhantes aos encontrados na nervura central, onde foi detectada a presença do Al nas células epidérmicas adaxiais e abaxiais em amostras de folhas dos dois tratamentos, entretanto, se percebeu maior intensidade de coloração nas plântulas do tratamento com Al (Fig. 7- B e C). Neste tecido, a hematoxilina não mostrou reação positiva na epiderme das plântulas crescidas sem suplemento de Al (Fig. 7- D). Nenhum dos testes para Al revelou a presença deste metal na cutícula. Com respeito ao mesofilo, o teste com aluminon deu positivo para presença de Al nos parênquimas paliçádico e lacunoso da folha de *Q. grandiflora*, cujas células estavam totalmente coradas nos dois tratamentos, contudo com mais intensidade nas amostras de folha daquelas crescidas com Al (Fig. 7- B e C). Diferentemente, a hematoxilina foi capaz de detectar a presença de Al apenas nas amostras de folhas tiradas de plântulas suplementadas com Al (Fig. 7- E), sendo que amostras do controle, testadas com este corante não houve reação positiva para Al (Fig. 7- D).

Tabela 1. Presença de Al na raiz, caule e folhas de plântulas de *Q. grandiflora* aos 120 dias de crescimento submetidos a dois tratamentos: sem alumínio (controle) e com alumínio (Al). Note que em alguns tecidos, as reações mais intensas de coloração para os dois corantes ocorreram no tratamento com Al. O Al foi detectado pelos testes Aluminon (A) e Hematoxilina (H).

Órgão	Tecido	Controle A/H	Alumínio A/H	
Raiz	Epiderme	- / -	- / +	
	Córtex	+ / +	++ / ++	
	Endoderme	+ / +	+ / +	
	Periciclo	+ / +	+ / +	
	Xilema			
		Elementos de vaso	- / -	- / -
		Parênquima radial	+ / +	+ / +
	Floema			
		Fibras do Floema	- / -	- / -
		Elemento de tubo crivado	+ / +	+ / +
		Parênquima	+ / +	+ / +
			+ / +	+ / +
		Medula		
	Caule	Epiderme	- / -	- / -
Colênquima		- / -	- / -	
Córtex		+ / +	++ / ++	
Endoderme		+ / +	+ / ++	
Xilema				
		Fibras do xilema	- / -	- / -
		Elementos de vaso	- / -	- / -
		Parênquima	- / -	- / -
Floema				
		Fibras do Floema	- / -	- / -
		Elemento de tubo crivado	+ / +	++ / ++
		Parênquima	+ / +	++ / ++
		Medula	+ / +	++ / +
Folha		Epiderme Adaxial	+ / -	++ / +
	Epiderme Abaxial	+ / -	++ / +	
	Mesofilo	Parênquima paliçádico	+ / -	++ / +
		Parênquima lacunoso	+ / -	++ / +
	Nervura Central			
		Parênquima Clorofiliano	+ / -	++ / +
			+ / -	++ / +
		+ / -	++ / +	
	Xilema			
		Fibras do xilema	- / -	- / -
		Elementos de vaso	- / -	- / -
	Floema			
		Fibras do Floema	- / -	- / -
		Elemento de tubo crivado	+ / -	++ / +

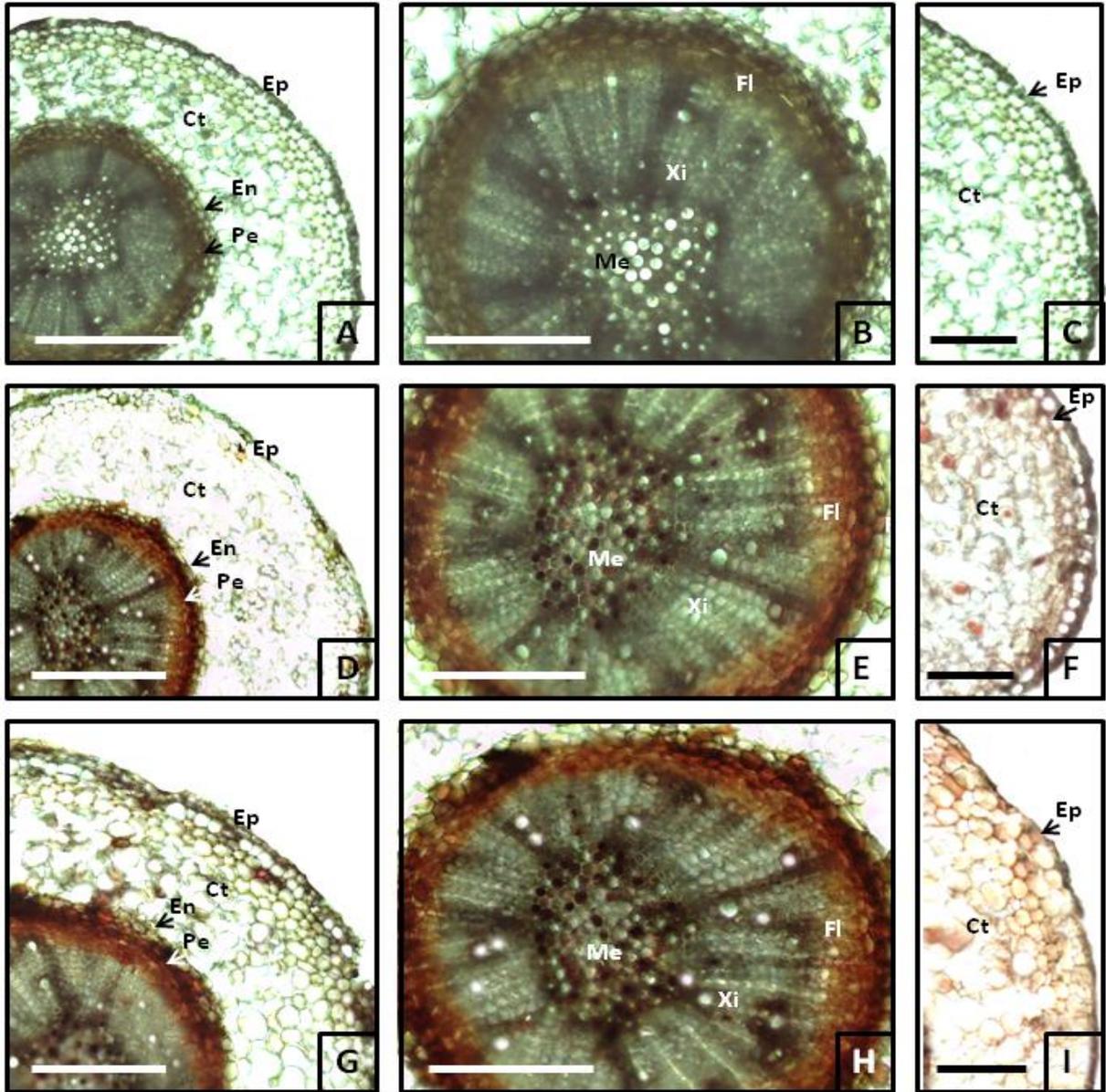


Figura 1. Detecção de Al em raízes de plântulas de *Q. grandiflora* com 120 dias de cultivo utilizando aluminon. A-I. Raízes de plântulas de *Qualea grandiflora* aos 120 dias de crescimento. A-C. Cortes de raízes de *Q. grandiflora* sem uso de corantes. D-F. Secções transversais de raízes de *Q. grandiflora* crescidas em solução nutritiva sem AlCl_3 submetidas ao teste do aluminon. G-I. Secções transversais de raízes de *Q. grandiflora* crescidas em solução nutritiva com AlCl_3 submetidas ao teste do aluminon. A, D e G- Vista geral da raiz de *Q. grandiflora* em secção transversal. B, E e H- Detalhe do cilindro vascular da raiz de *Q. grandiflora*. C, F e I- Região do córtex e epiderme da raiz de *Q. grandiflora*. Ep: epiderme, Ct: córtex, En: Endodeme, Fl: floema, Me: medula, Pe: periciclo, Xi: xilema. Escalas: A, D, G- 100 μm , B, E e H – 50 μm e C, F e I- 30 μm .

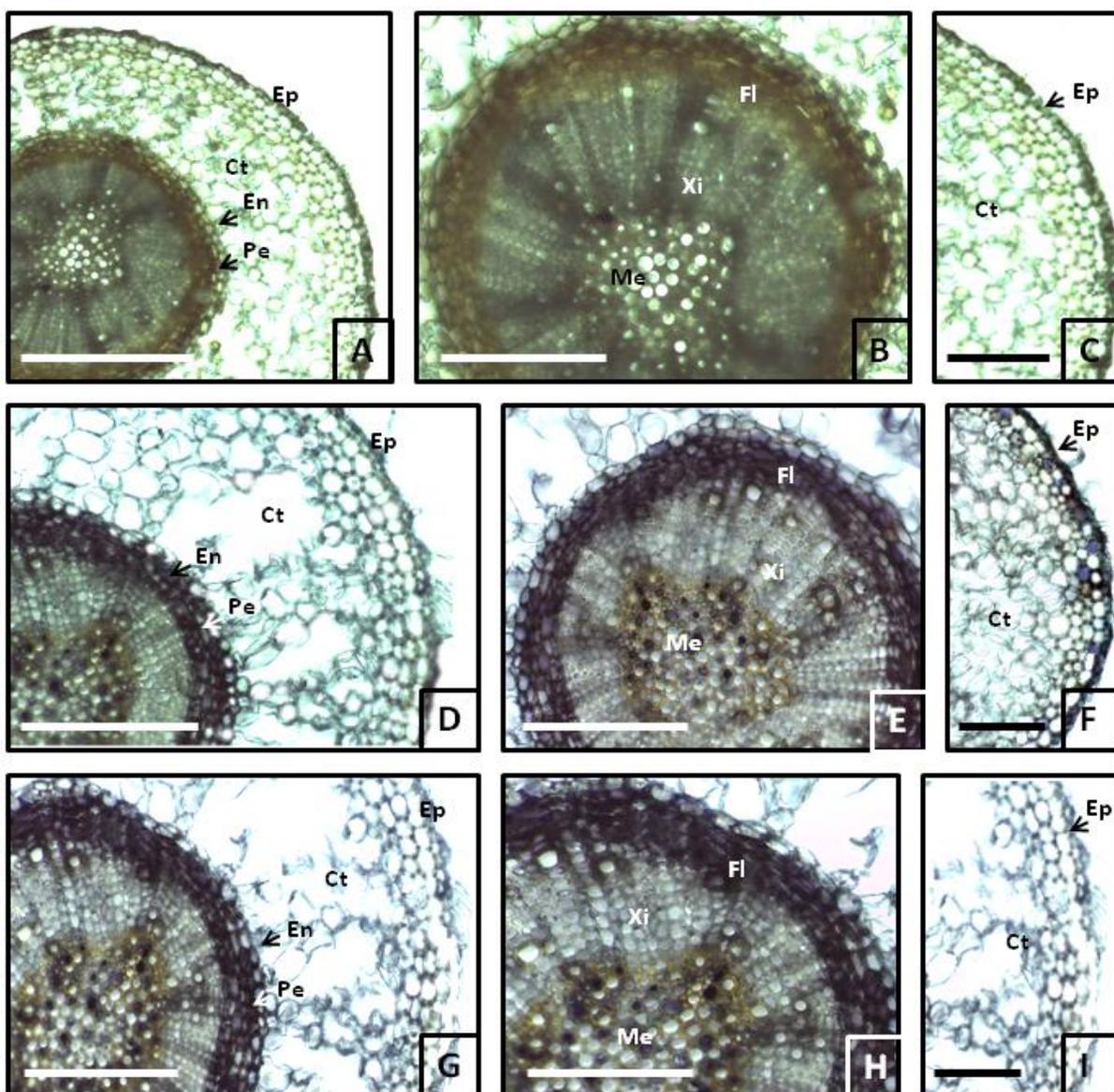


Figura 2. Detecção de Al em raízes de plântulas de *Q. grandiflora* com 120 dias de cultivo utilizando hematoxilina. A-I. Raízes de plântulas de *Qualea grandiflora* aos 120 dias de crescimento. A-C. Cortes de raízes de *Q. grandiflora* sem uso de corantes. D-F. Secções transversais de raízes de *Q. grandiflora* crescidas em solução nutritiva sem $AlCl_3$ submetidas ao teste da hematoxilina. G-I. Secções transversais de raízes de *Q. grandiflora* crescidas em solução nutritiva com $AlCl_3$ submetidas ao teste do hematoxilina. A, D e G- Vista geral da raiz de *Q. grandiflora* em secção transversal. B, E e H- Detalhe do cilindro vascular da raiz de *Q. grandiflora*. C, F e I- Região do córtex e epiderme da raiz de *Q. grandiflora*. Ep: epiderme, Ct: córtex, En: Endodeme, Fl: floema, Me: medula, Pe: periciclo, Xi: xilema. Escalas: A, D, G- 100 μm , B, E e H – 50 μm e C, F e I- 30 μm .

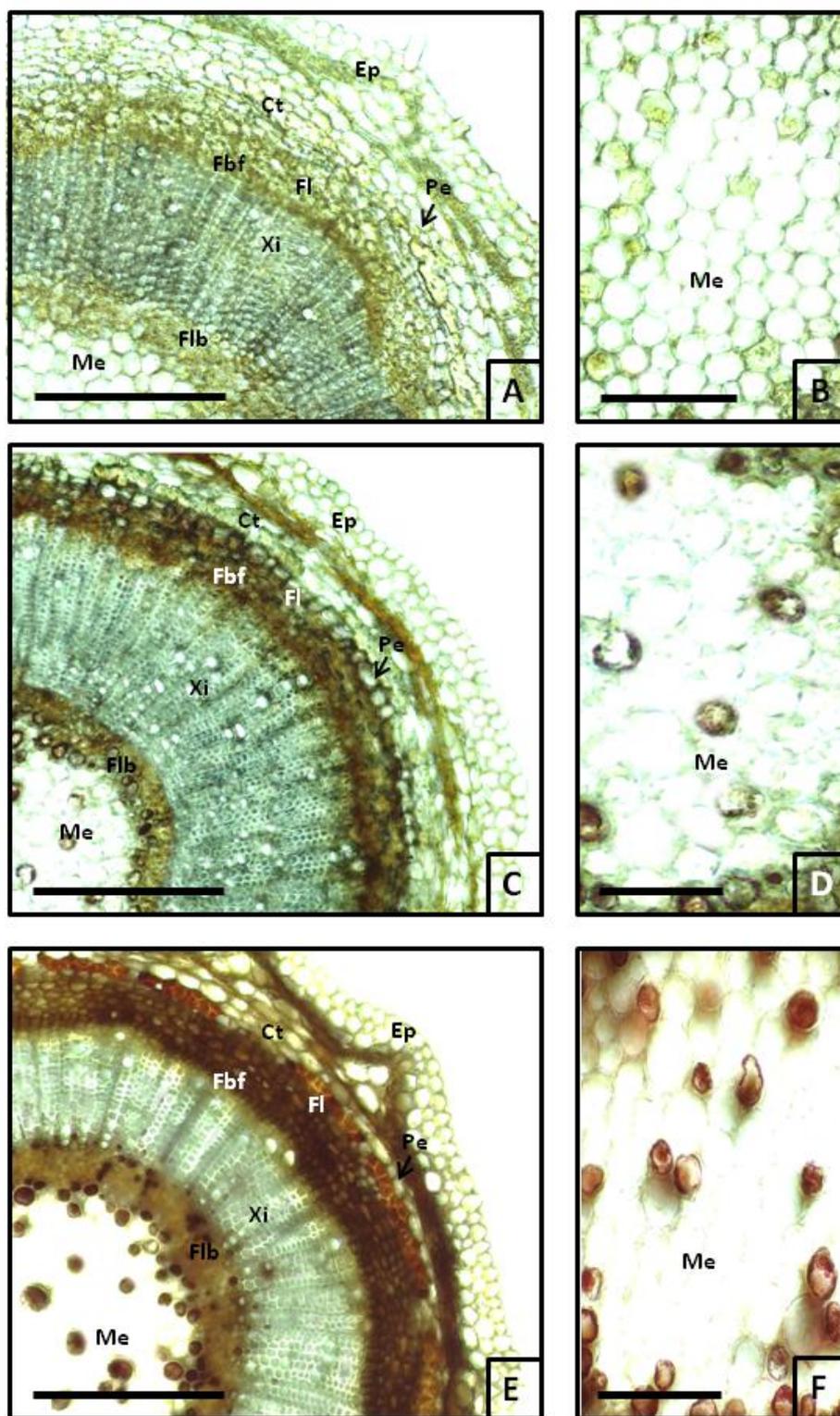


Figura 3. Detecção de Al em caules de plântulas de *Q. grandiflora* com 120 dias de cultivo utilizando aluminon. A-F. Caules de plântulas de *Qualea grandiflora* aos 120 dias de crescimento. A-B. Cortes de caules de *Q. grandiflora* sem uso de corantes. C-D. Secções transversais de caules de *Q. grandiflora* crescida em solução nutritiva sem AlCl_3 submetidos ao teste do aluminon. E-F. Secções transversais de caules de *Q. grandiflora* crescidas em solução nutritiva com AlCl_3 submetidos ao teste do aluminon. A, C e E- Vista geral do caule de *Q. grandiflora* em secção transversal. B, D e F- Detalhe da medula do caule de *Q. grandiflora*. Ep: epiderme, Ct: cortex, Fbf: fibras do floema, Flb: fibras libriformes, Fl: floema, Me: medula, Pe: periciclo, Xi: xilema. Escalas: A, C, E- 100 μm e B, D e F – 50 μm .

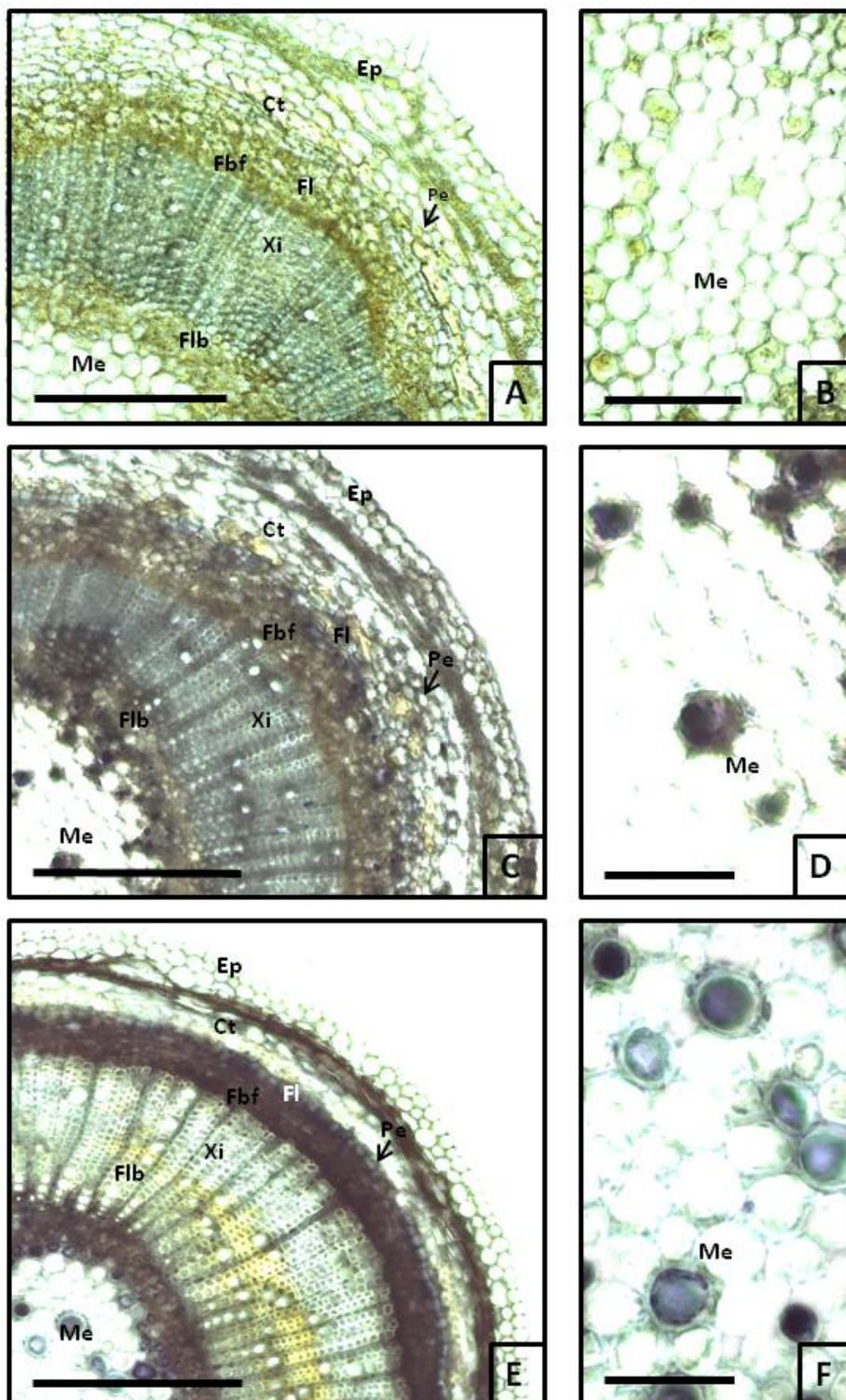


Figura 4. Detecção de Al em caules de plântulas de *Q. grandiflora* com 120 dias de cultivo utilizando hematoxilina. A-F. Caules de plântulas de *Qualea grandiflora* aos 120 dias de crescimento. A-B. Cortes de caules de *Q. grandiflora* sem uso de corantes. C-D. Secções transversais de caules de *Q. grandiflora* crescida em solução nutritiva sem $AlCl_3$ submetidos ao teste da hematoxilina. E-F. Secções transversais de caules de *Q. grandiflora* crescidas em solução nutritiva com $AlCl_3$ submetidos ao teste da hematoxilina. A, C e E- Vista geral do caule de *Q. grandiflora* em secção transversal. B, D e F- Detalhe da medula do caule de *Q. grandiflora*. Ep: epiderme, Ct: cortex, Fbf: fibras do floema, Flb: fibras libriformes, Fl: floema, Me: medula, Pe: periciclo, Xi: xilema. Escalas: A, C, E- 100 μm e B, D e F – 50 μm .

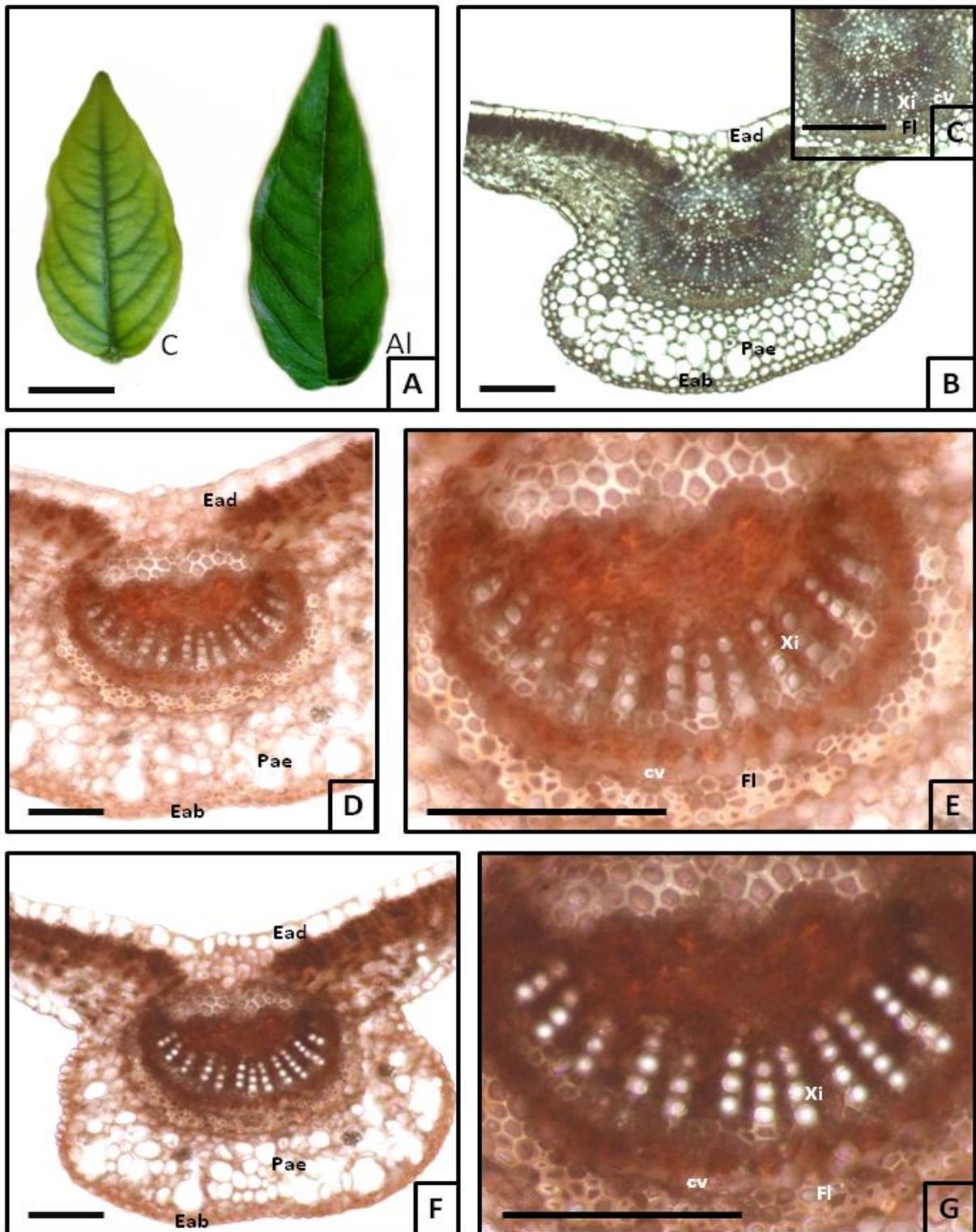


Figura 5. Detecção de Al na nervura central de folhas de plântulas de *Q. grandiflora* com 120 dias de cultivo utilizando aluminon. A-G. Folhas de plântulas de *Qualea grandiflora* aos 120 dias de crescimento. B-C. Cortes de folhas de *Q. grandiflora* sem uso de corantes. D-E. Secções transversais de folhas de *Q. grandiflora* crescidas em solução nutritiva sem AlCl_3 submetidas ao teste aluminon. F-G. Secções transversais de folhas de *Q. grandiflora* crescidas em solução nutritiva com AlCl_3 submetidas ao teste do aluminon. B, D e F- Vista geral da folha de *Q. grandiflora* em secção transversal. C, E e G- Detalhe da nervura central da folha de *Q. grandiflora*. cv: câmbio vascular, Eab: epiderme abaxial, Ead: Epiderme adaxial, Pae: parênquima aerífero, Fl: floema, Xi: xilema. Escalas: B-G- 100 µm.

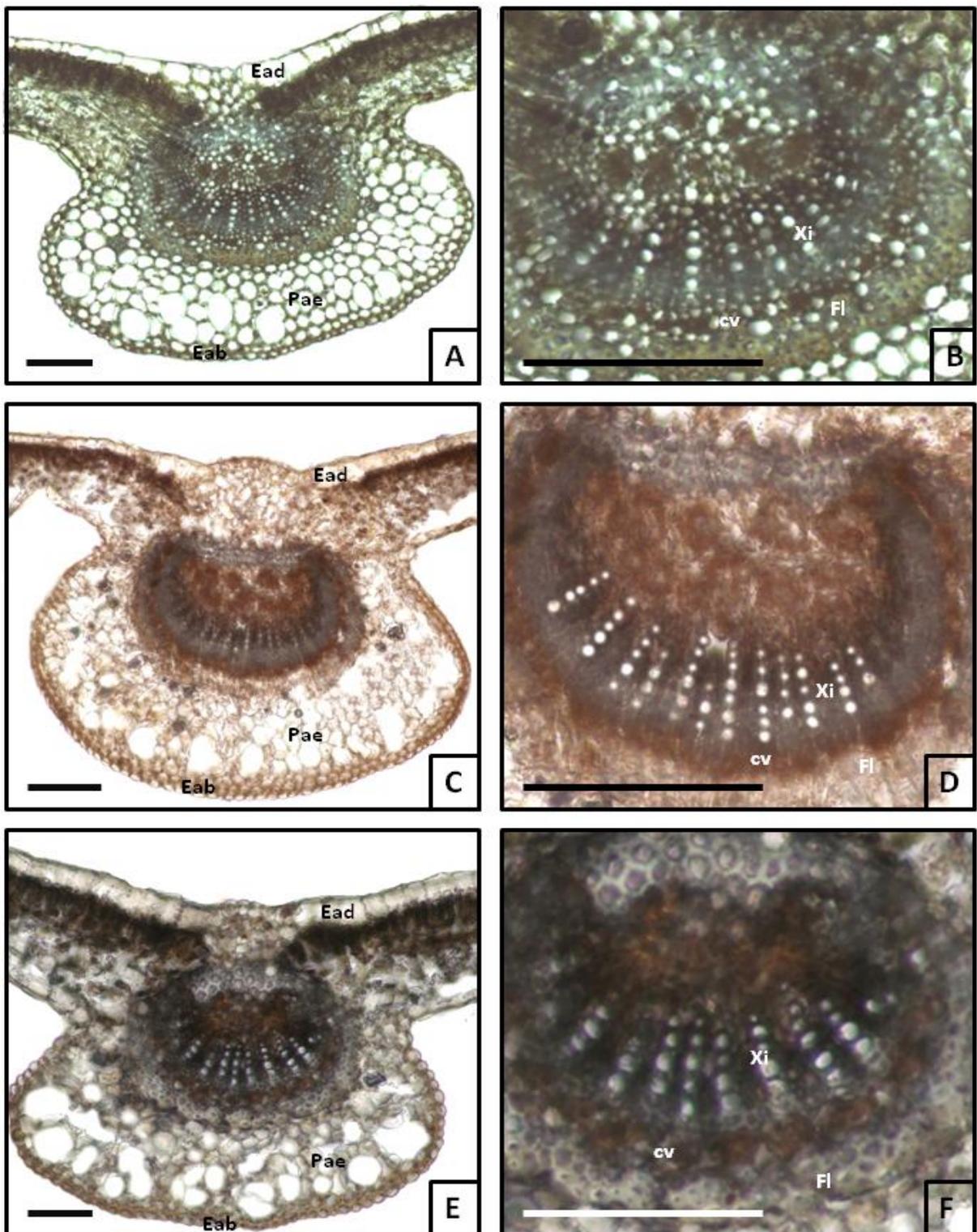


Figura 6. Detecção de Al na nervura central de folhas de plântulas de *Q. grandiflora* com 120 dias de cultivo utilizando hematoxilina. A-F. Folhas de plântulas de *Qualea grandiflora* aos 120 dias de crescimento. A-B. Cortes de folhas de *Q. grandiflora* sem uso de corantes. C-D. Secções transversais de folhas de *Q. grandiflora* crescidas em solução nutritiva sem AlCl_3 submetidas ao teste da hematoxilina. E-F. Secções transversais de folhas de *Q. grandiflora* crescidas em solução nutritiva com AlCl_3 submetidas ao teste da hematoxilina. A, C e E- Vista geral da folha de *Q. grandiflora* em secção transversal. B, D e F- Detalhe da nervura central da folha de *Q. grandiflora*. cv: câmbio vascular, Eab: epiderme abaxial, Ead: Epiderme adaxial, Pae: parênquima aerífero, Fl: floema, Xi: xilema. Escalas: A-F- 100 μm .

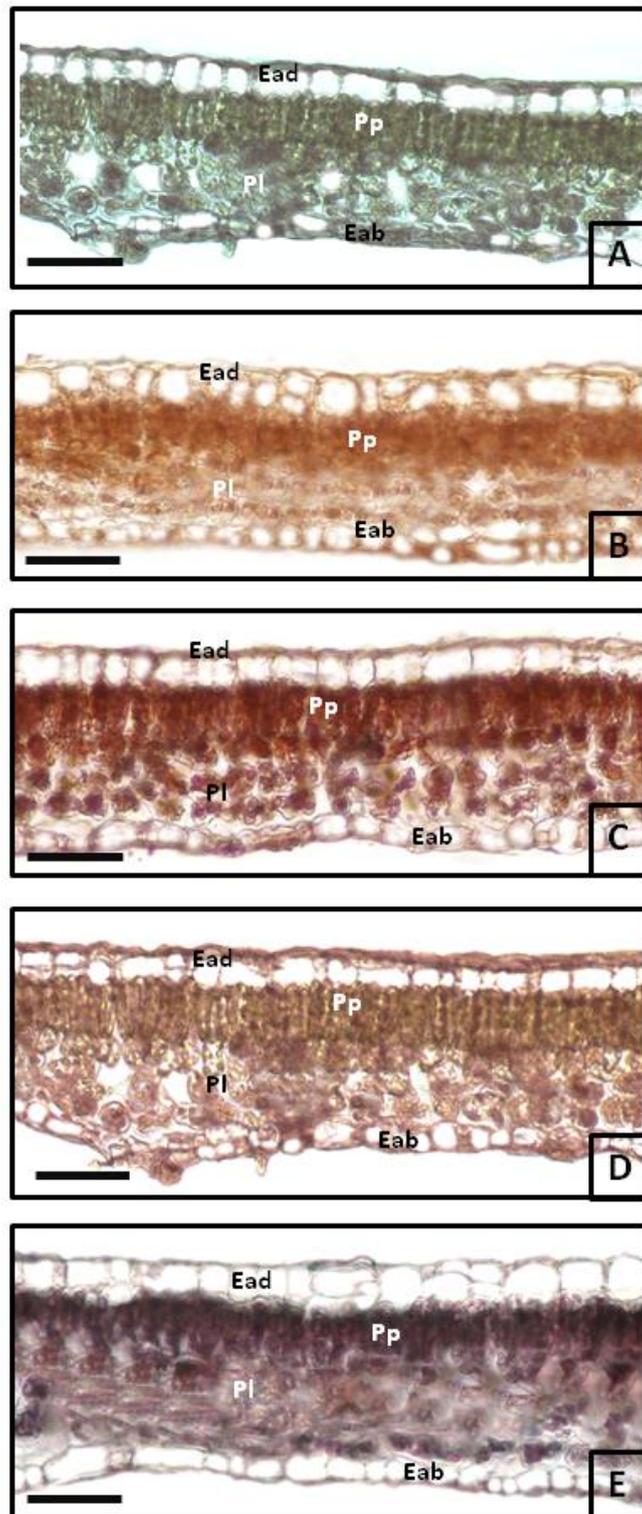


Figura 7. Detecção de $AlCl_3$ no limbo de folhas de plântulas de *Q. grandiflora* com 120 dias de cultivo utilizando aluminon e hematoxilina. A-E. Folhas de plântulas de *Qualea grandiflora* aos 120 dias de crescimento. A. Corte da folha de *Q. grandiflora* sem uso de corantes. B e D. Secções transversais de folhas de *Q. grandiflora* crescidas em solução nutritiva sem $AlCl_3$ submetidas aos testes do aluminon e hematoxilina respectivamente. C e E. Secções transversais de folhas de *Q. grandiflora* crescidas em solução nutritiva com $AlCl_3$ submetidas aos testes aluminon e hematoxilina respectivamente. A-E- Vista geral do limbo da folha de *Q. grandiflora* em secção transversal. Eab: epiderme abaxial, Ead: Epiderme adaxial, Pl: parênquima lacunoso, Pp: parênquima paliádico. Escalas: A-E- 100 μm .

8.6. DISCUSSÃO

8.6.1. Comparação anatômica-estrutural de *Q. grandiflora* em dois tratamentos: sem Al e com Al.

O fato de que não foram observadas diferenças anatômicas entre as plântulas de *Q. grandiflora* dos dois tratamentos sugere que a presença ou ausência de Al não afete o drasticamente padrão anatômico-estrutural dessa espécie. Além disso, é possível que na fase de desenvolvimento inicial as diferenças anatômicas não sejam perceptíveis, pois grande parte dos recursos usados pelas plântulas provém das reservas da semente, cujo acumulam grandes quantidades de Al. Para se determinar se ao longo do desenvolvimento a presença ou ausência deste metal induz algum tipo de modificação anatômica serão necessários estudos com um intervalo de tempo maior.

8.6.2. Sensibilidade dos testes para determinar o padrão de distribuição do Al em raiz, caule e folhas de *Q. grandiflora*.

A detecção da presença de Al em tecidos vegetais pode ser realizada por métodos químicos ou histoquímicos. Andrade e colaboradores (2007) quantificaram quimicamente o teor de Al em partes aéreas das espécies *Vochysia pyramidalis*, *Q. grandiflora* e *Callistene major*, três espécies do Cerrado, encontrando os valores 5,39, 3,91 e 6,49 g.Kg⁻¹ de matéria seca em folhas, respectivamente. Embora sejam valores altos comparados com outras espécies de plantas não acumuladoras (< 1 g.Kg⁻¹) esses resultados pouco informam quanto a natureza dos mecanismos envolvidos na absorção e distribuição deste elemento dentro da planta. Nesse contexto, os testes histoquímicos são importantes ferramentas para a detecção desse metal nos diferentes tecidos e compartimentos celulares (Haridasan, 1986). Essas análises podem subsidiar um melhor entendimento dos mecanismos adaptativos de acumulação, desintoxicação e/ou tolerância ao Al nas espécies analisadas.

Neste trabalho, foi comparada a capacidade dos corantes aluminon e hematoxilina para detectar o Al em cortes anatômicos de raiz, caule e folha em duas condições de crescimento: sem Al (controle) e com Al. Os resultados obtidos indicam que os dois corantes foram capazes de detectar a presença de Al nos órgãos estudados. No entanto, observou-se que o aluminon e a hematoxilina não apresentam a mesma sensibilidade ao Al, o que, dependendo do corante usado, resultou em diferenças na detecção de Al em determinados

órgãos (Tabela 1). Em geral, o teste com aluminon pareceu ser mais sensível, pois foi capaz de detectar a presença de Al onde a hematoxilina deu resultado negativo. Nesse sentido, a hematoxilina não detectou Al em determinados tecidos de amostras do tratamento controle, onde o aluminon deu positivo para a presença deste metal. Para uma análise mais detalhada, estes resultados reforçam a necessidade de utilização de pelo menos dois testes histoquímicos para a mesma reação para a confirmação e veracidade nas análises.

8.6.3. Movimentação e importância do Al para plântulas de *Q. grandiflora*

Era de se esperar que as plântulas de *Q. grandiflora* crescidas sem Al não apresentassem resultados negativos, entretanto, mesmo aos 120 dias, indivíduos do tratamento controle apresentaram reação positiva para a presença do Al nos três órgãos analisados, sobretudo na raiz e no caule. A detecção de Al em *Q. grandiflora*, independente do tratamento, está, muito provavelmente associada ao fato de que as sementes dessa espécie acumulam altos teores deste metal nos seus tecidos de reserva que se localizam nos cotilédones (Haridasan 1982, 2008²).

Estudos *in vivo* e *in vitro* sobre o papel dos cotilédones em várias espécies têm demonstrado que esses órgãos exercem grande influência no desenvolvimento das plantas (Oliveira & Morais 1999), assim como para espécies do Cerrado como *Byrsonima basiloba* Juss. e *Eugenia dysenterica* DC. (Silveira *et al.*, 2012). No caso de *Qualea grandiflora*, os dados aqui apresentados mostram que durante o desenvolvimento inicial, os cotilédones certamente contribuíram para o crescimento do eixo embrionário através da translocação de carboidratos, lipídios e outros nutrientes, tendo o fornecimento dessas substâncias das sementes até as partes aéreas um papel fundamental em seu crescimento. Isto pode ser inferido em função da mobilização do Al presente nas reservas da semente até as folhas, como demonstrado pelos testes histoquímicos. Adicionalmente, não se pode excluir que o Al possa ter algum papel fisiológico durante o processo de germinação.

Os fatos acima descritos suportam a ideia de que, em *Q. grandiflora*, o acúmulo de Al não é um mero mecanismo de tolerância à elevada quantidade deste metal nos solos do Cerrado. Ainda pouco se sabe sobre qual a função fisiológica do Al nessas plantas, mas que este pode ser relevante para o crescimento e desenvolvimento em plantas acumuladoras, pois este metal não é apenas mobilizado das sementes até as folhas, mas também é absorvido quando há disponibilidade deste elemento no substrato. Além disso, é interessante observar que outras plantas do Cerrado como *Vochysia thyrsoidea* e *Callisthene fasciculata* Mart.,

também espécies da família Vochysiaceae, são capazes de acumular Al em folhas tanto em solos ácidos quanto calcários (Machado 1985; Medeiros, 1983). Esses resultados são consistentes com o que foi observado em *Vochysia thyrsoidea* e *Q. grandiflora* onde foi confirmada, por métodos histoquímicos, a presença de Al nas folhas (Cotta *et al.* (2007).

Embora neste estudo o Al não tenha sido quantificado nos diferentes órgãos de *Q. grandiflora* analisados, foi claramente possível perceber diferenças de intensidade de coloração. Isto pode ser um indicativo da quantidade de Al presente nas diferentes condições de crescimento (com e sem Al). Essa inferência sobre a quantidade de Al nas amostras é mais clara quando foram comparadas, dentro do mesmo teste, as intensidades das reações entre amostras de plantas crescidas com Al, com aquelas que não tiveram esse metal suplementado na solução nutritiva. Observando os tecidos dos caules e folhas e com menor grau das raízes, as secções de plântulas tratadas com Al apresentaram uma reação claramente mais intensa (Figs 1-7), portanto é possível concluir que quanto maior a disponibilidade de Al, maior será a absorção deste metal pela planta. Similarmente, em *Vochysia rufa* Mart., outra acumuladora do Cerrado, este metal é detectado de acordo com as diferentes quantidades disponíveis em solução nutritiva de crescimento, onde maiores intensidades de reação corresponderam com as maiores quantidades de Al disponível na solução nutritiva (Andrade *et al.*, 2006).

8.6.4. Locais onde o Al foi acumulado em plântulas de *Q. grandiflora*

Em raízes, houve coloração do córtex, endoderme, periderme, floema e medula independente do tratamento. No entanto, os testes com aluminon e hematoxilina revelaram a presença desse metal somente na epiderme plântulas do tratamento com Al. Resultados semelhantes foram observados em raízes de *Vochysia pyramidalis*, uma planta acumuladora comum no Cerrado quando exposta a 0, 25, 50 e 150 μM de Al e pH 4,5 por 47 dias (Andrade *et al.* 2005). Nessa espécie, as reações foram positivas para: córtex, endoderme, cilindro vascular e medula em todos os tratamentos e na epiderme apenas nas maiores concentrações de Al (150 μM).

Quanto ao caule, os resultados detectaram a presença de Al no córtex, endoderme, floema e medula de *Q. grandiflora* independente do tratamento. Consistente com outros órgãos analisados se observou um maior acúmulo de Al em plântulas crescidas na presença desse metal. A presença de Al também já foi detectada em caules de outras plantas nos mesmos tecidos onde este foi detectado em *Q. grandiflora*. Assim, o Al também está presente no parênquima cortical e células do floema do caule de *Vochysia elliptica* (Spr.) Mart., uma

planta acumuladora do Cerrado, tanto em solos ácidos quanto calcários (Haridasan *et al.*, 1986).

Na análise das folhas, observaram-se resultados positivos para a presença de Al na epiderme, parênquima clorofiliano, paliçádico e lacunoso, floema e câmbio vascular utilizando o aluminon. Em geral, os testes com hematoxilina apresentaram resultados semelhantes aos do aluminon para os mesmos tecidos/estruturas. Entretanto, a hematoxilina não foi capaz de detectar Al no parênquima incolor da medula, paliçádico e lacunoso nas amostras do tratamento controle. Os dois corantes apresentaram resultados negativos para fibras libriformes na nervura central. Em outras plantas, os testes com aluminon e hematoxilina mostraram resultados semelhantes aos aqui descritos, observando diferenças de coloração entre o aluminon e hematoxilina em tecidos foliares adultos (Cotta *et al.* 2008). Consistentemente, Haridasan *et al.* (1987) e Haridasan (2008²) detectaram padrões semelhantes de distribuição de Al em *Qualea multiflora* Mart., *Palicourea ridida* H.B.K., e *Vochysia thyrsoidea* Pohl.

A não detecção de Al por hematoxilina em tecidos foliares como parênquimas paliçádico e lacunoso no limbo e epiderme e parênquima clorofiliano na nervura central do tratamento controle sugere uma menor capacidade de detecção de Al por hematoxilina quando em pouca quantidade em folhas de *Q. grandiflora*. Estes resultados são consistentes com os obtidos por Andrade, *et al.* (2009), onde esse corante apresentou baixa intensidade de cor em tecidos com baixos teores de Al em *Q. grandiflora* e *V. pyramidalis*. Clark e Kruegen (1985) reportam que a reação de coloração formada pelo complexo Al-hematoxilina está sujeita à interferência de outros íons como Be^{3+} e Fe^{3+} , resultando na ausência de coloração. Além disso, a presença de ácido cítrico e sílica, comuns em tecidos foliares, também podem exercer interferência na formação desse complexo.

Em escala subcelular, é importante destacar a presença de Al nas células da medula do caule *Q. grandiflora*, mais especificamente nas paredes celulares e um provável acúmulo desse metal nos plastídios, possivelmente cloroplastos, como observado nas Figuras 3 e 4. Pode-se perceber também em folhas uma intensa reação nas células do parênquima clorofiliano (paliçádico e lacunoso), talvez em associação com os cloroplastos. Análises em um microscópio eletrônico de transmissão acoplado a um detector de dispersão de energia de raio-X (EDX) revelaram ampla distribuição de Al nos tecidos foliares das espécies acumuladoras *Vochysia pyramidalis*, *Sclerobium paniculatum* Vog. e *Qualea grandiflora*. Nessas espécies houve sensibilização dos cloroplastos nas células do mesófilo, indicando presença de Al nessa organela (Andrade *et al.* 2009). Os dados observados neste estudo

corroboram os resultados fisiológicos que asseguram que o Al tem um papel importante no metabolismo fotossintético. No entanto, devem-se realizar análises mais aprofundadas para saber o mecanismo bioquímico desse metal em células de *Q. grandiflora*.

8.7. CONCLUSÕES

- Os testes histoquímicos revelam a mobilização de Al dos cotilédones das sementes de *Q. grandiflora* para o restante da plântula;
- Os dois corantes revelaram divergência quanto à coloração de tecidos foliares no tratamento controle, sendo o aluminon o mais sensível para a detecção de Al nesse órgão;
- No geral as plântulas crescidas na presença de Al tiveram maior intensidade de reação, sugerindo uma maior acumulação de Al devido a sua disponibilidade na condição de crescimento;
- Visto que o Al foi detectado em plantas controle (sem Al), pode-se concluir que este elemento já está presente nas reservas da semente e que a sua mobilização deve ocorrer durante a germinação;

8.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, L. R. M.; wateau, F.; BARROS, L. M.G.; ECHEVARRIA, G.; COTTA, M. G.; Localização de Alumínio em folhas de plantas do cerrado através de hematoxilina e micro-análises de raio X. *In XII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal*. “Desafios para a produção de alimentos e bioenergia. Fortaleza, CE. 2009.

ANDRADE, L. R. M.; FRANCO, A. C.; HARIDASAN, M.; BARROS, L. M.G.; GEEST, J. J. V. D.; COTTA, M. G.; RIBEIRO, D. G. R. Alumínio nos ápices radiculares de espécies nativas do Cerrado. EMBRAPA Cerrados, 2007.

ANDRADE, L. R. M. DE; BECQUER, T.; FRANCO, A. C.; HARIDASAN, M.; MARTINS É. DE S.; Efeito das condições edáficas na disponibilidade e acumulação de alumínio e de nutrientes em plantas nativas do Cerrado. *In XI Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal*, Gramado – RS, 2007.

ANDRADE, L. R. M.; CAVALCANTE, D. P.; KARLA, C. T.; RAMOS, A. K. B.; CARVALHO, M. A. Uso do método de coloração de raízes com hematoxilina para classificação de genótipos de leucena quanto à tolerância ao alumínio. EMRAPA Cerrados. 2003.

AHN SJ, SIVAGURU M, CHUNG GC, RENGEL Z, MATSUMOTO H. Aluminum-induced growth inhibition is associated with impaired efflux and influx of H⁺ across the plasma membrane in root apices of squash (*Cucurbita pepo*). *Journal Exp. Bot.* v. 53. p. 1959–66, 2001.

BACKER, J. R. Experiments on the action of mordants. Aluminium-haematein. *Quarterly Journal of Micro-scopical Science.* v. 103. p. 493-517, 1962.

BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. *journal Environmental and Experimental Botany*, v.48, n.1, p.75-92, 2002.

BARROS, L.M.G.; ANDRADE, L.R.M.; GEEST, J.J.V.D.; COTTA, M.G.; RIBEIRO, D.G.;

BRACCINI, M. C. L.; MARTINEZ, H. E. P.; SILVA, E. A. M.; BRACCINI, A. L.; SCAPIM, C. A. Crescimento da planta e coloração das raízes com hematoxilina como critérios de avaliação de genótipos de café quanto à tolerância à toxidez por alumínio. *Rev. Bras. de ciência e solo*. v. 24. p. 59-68, 2000.

CLARK, R. A.; KRUEGER, G. L. Aluminon: Its limited application as a reagent for detection of aluminon species. *Journal Histochemistry*. v. 33. n. 7. p. 729-732.

COTTA, M. G.; ANDRADE, L. R. M.; DER GEEST, J. J. V.; GOMES, A. C. M. M.; DE SOUZA, C. M. D.; DE ALMEIDA, J. D.; BARROS, L. M. G. Diferenças entre hematoxilina e aluminon na detecção de alumínio em tecidos foliares de plantas nativas do cerrado. *In IX Simpósio Nacional Cerrado*. Brasília – DF, 2008.

COSTA, A. F.; PROENÇA DA CUNHA, A. *Farmacognosia*. Calouste Gulbenkian. Lisboa. 3° ed. v. 3, 2000.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Relatório técnico anual, 1976/77. Brasília, DF, 183p. 1978.

FRANCO, A.C.; BECQUER, T. Acumulação de alumínio em tecidos foliares de espécies nativas do Cerrado. *In Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal*, Gramado-RS. Braz. *Journal Plant Physiology*., vol. 19, suplem. CD-ROM. 2007.

GERSBACH, P.V., WILLIE, S.G. & SARAFIS, V. A new histochemical method for localization of the site of monoterpene phenol accumulation in plant secretory structures. *Annals of Botany*. v. 88. p. 521-525, 2001.

GILL, G. W.; FROST, J. K. MILLER, K. A. A new formula for half-oxidized hematoxylin solution that neither overstain nor requires differentiation. *journal Acta cytological*. v. 18. p. 300-311, 1974.

HARIDASAN, M. Alumínio é um elemento tóxico para as plantas nativas do cerrado? In: Prado, CHBA; Casali, CA. Fisiologia Vegetal: práticas em relações hídricas, fotossíntese e nutrição mineral. Barueri, Editora Manole. v.85, n.204.1553-1559, 2008.

HARIDASAN, M. Nutritional adaptations of native plants of the cerrado biome in acid soils. Review: Brazilian. Journal of Plant Physiology. 2008.

HARIDASAN, M. Distribution and mineral nutrition of aluminium-accumulating species in different plant communities of the cerrado region of central Brazil. p. 309-348, *In* San Jos, J.J. Montes, R. (eds.) La Capacidad Bioproductiva de Sabanas. I.V.I.C., Caracas, Venezuela. 545p. 1987.

HARIDASAN, M.; PAVIANI, T. I.; SCHIAVINI, I. Localization of aluminium in the leaves of some aluminium-accumulating species. *Journal of Plant and Soil* v.95. p.435-437, 1986.

HARIDASAN, M. Aluminium accumulation by some Cerrado native species of central Brazil. *Journal of Plant and Soil*, v.65, p.163-175, 1982.

JACOB NETO, J. The interactions of H⁺/ OH⁻ exchanges between roots and rhizosphere with plant nutrition and aluminium effects. Tese de Doutorado. Dundee, University of Dundee, 281p. 1993.

JACOB NETO, J.; RAVEN, J. A. & WOLLENWEBER, B. Aluminium in the rhizosphere of *Phaseolus vulgaris* L. *In* International conference on heavy metals in the environment, Edinburg. Proceedings. Edinburg, CEP Consultants, p. 103-106, 1991.

JANSEN, S.; HARIDASAN, M.; SMETS, E. "Aluminum-accumulating plants," in AccessScience, ©McGraw-Hill Companies, 2003 *in* <http://www.accessscience.com>. Acesso às 11:55 do dia 29/11/2011.

KALOVOULOS, J. M. & MISOPOLINOS, N. D. Aluminium detection on corn roots by the quinizarin method. *Journal of Plant and Soil*, v. 74. p. 131-132, 1983.

KINRAIDE T, PARKER D. Apparent phytotoxicity of mononuclear hydroxyaluminum

to four dicotyledonous species. journal *Physiol. Plant.* v. 79. p. 283–88, 1990.

KINRAIDE, T. B. Proton extrusion by wheat roots exhibiting severe aluminum toxicity symptoms. journal *Plant Physiol.* v. 88. p. 418–423, 1988.

MASSOT, N.; POSCHENRIEDER, C. & BARCELÓ, J. Aluminum tolerance assessment in bush bean cultivars by root growth analysis and hematoxylin staining. *Rev. Suelo Planta*, v. 1. p.25-32, 1991.

MACHADO, J.W.B. Acumulação de alumínio em *Vochysia thyrsoidea* Pohl. Dissertação de Mestrado, Brasília, DF, Universidade de Brasília, 1985.

MATSUMOTO, H.; HIRASAWA, E.; MORIMURA, S.; TAKAHASHI, E. Localization of aluminum in tea leaves. journal *Plant and Cell Physiology.* v. 17, p. 627-631, 1976.

MEDEIROS, R.A. Comparação do estado nutricional de algumas espécies, acumuladoras e não acumuladoras de alumínio, nativas do cerrado. Dissertação de Mestrado, Brasília, DF, Universidade de Brasília, 1983.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Rev. Physiologia Plantarum*, Kopenhagen. v.15, p.473-497, 1962.

OLIVEIRA, F. O.; MORAIS, P. L. D. Influência da remoção de cotilédones no desenvolvimento de ramificações nas axilas cotiledonares de plântulas de leguminosas. *Rev. Acta bot. bras.* v. 13. n. 3. p. 243-249, 1999.

PAULILO, M. T. S. & FELIPPE, G. M. 1994. Contribuição dos cotilédones e partição de matéria durante o crescimento inicial de *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae). *Rev. Brasileira de Botânica* v.17. p. 87-91.

POLLE, E.; KONZAK, C. F.; KITTRICK, J. A. Visual detection of aluminum tolerance levels in wheat by hematoxylin staining of seedling roots. journal *Crop Science.* v. 18. p. 823-827, 1978.

ROSSIELLO, R. O. P. & JACOB-NETO, J. Toxidez de alumínio em plantas: Novos enfoques para um velho problema. *In* FERNANDES, M. S. Nutrição mineral de plantas. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência de Solos, 2006. 432 p.

SILVA, A. C. Avaliação da tolerância ao alumínio em plântulas de maracujazeiro E MAMOEIRO. Dissertação de Mestrado. Seropédica, RJ. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2009.

TABALDI, L. A. Avaliação bioquímica-fisiológica de clones de batata em relação ao alumínio. Tese de doutorado, Santa Maria, RS, Universidade Federal de Santa Maria, 2008.

VASCONCELOS, S. S. Metodos de avaliação da tolerância à toxidade de alumínio em cultivares da arroz (*Oryza sativa L.*). Dissertação de Mestrado. Seropédica – RJ. Universidade Federal do Rio de Janeiro RJ, 137p. 1997,

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

WAGATSUMA, T.; KAWASHIMA, T. & TAWARYA, K. Comparative stainability of plant root cells with basic dye (methylene blue) in association with aluminium tolerance. *Comm. Soil Sci. Rev. Plant Anal.* v.19. p. 1207-1215, 1998.

CAPÍTULO III - Estudo comparativo do proteoma de raízes e folhas de *Qualea grandiflora* Mart. em resposta ao alumínio

9. COMPARATIVE STUDY OF PROTEOME ROOT AND LEAVES *QUALEA GRANDIFLORA* MART. IN RESPONSE TO ALUMINUM

9.1. ABSTRACT: The Cerrado savannah is considered the richest in biodiversity worldwide. Studying mechanisms of aluminum tolerance in plants endemic to this biome can provide valuable information for genetic engineering of plants of agronomic interest to increase the tolerance of these plants to the stress caused by this metal. *Qualea grandiflora* is an Al accumulating species widely distributed in the Cerrado. The objective of this study is to investigate the presence of proteins associated with Al tolerance in *Q. grandiflora*. Roots and leaves of 40 seedlings of *Q. grandiflora* with 120 days of cultivation, grown in nutrient solution fifth MS with and without acid pH and Al were used for the two-dimensional profile analysis. The proteomic maps revealed 32 proteins differentially expressed in roots and 36 proteins in leaves and additionally compared with their respective controls, there were eight unique proteins in root and thirteen sheets on treatment with Al these unique proteins treatment with Al and differentially expressed in both conditions sheets, identified two proteins involved in metabolic pathways of photosynthesis, one related to synthesis of ATP and a mechanism for antioxidants. This study provides important information to help in understanding the modulation of processes in Al tolerance accumulator plants.

Key words: Proteomic, aluminum accumulating,, metabolism.

9. ESTUDO COMPARATIVO DO PROTEOMA DE RAÍZES E FOLHAS DE *QUALEA GRANDIFLORA* MART. EM RESPOSTA AO ALUMÍNIO

9.2. RESUMO: O bioma Cerrado é considerado a savana mais rica em biodiversidade de todo o mundo. Estudar mecanismos de tolerância ao alumínio em plantas endêmicas desse bioma poderá fornecer informações valiosas para a engenharia genética de plantas de interesse agrônomo visando aumentar a tolerância destas plantas ao estresse causado por esse metal. *Qualea grandiflora* é uma espécie acumuladora de alumínio amplamente distribuída no Cerrado. O objetivo deste trabalho é analisar o processo que envolve a mudança no padrão de expressão de proteínas associadas à tolerância ao Al em *Q. grandiflora*. Raízes e folhas de plântulas de 40 plântulas de *Q. grandiflora* com 120 dias de cultivo, crescidas em solução nutritiva $1/5$ MS com e sem Al e pH ácido foram utilizadas para a análise do perfil bidimensional. Os mapas proteômicos revelaram 32 proteínas diferencialmente expressas em raízes e 36 proteínas em folhas e adicionalmente, comparadas com os respectivos controles, foram observadas oito proteínas exclusivas em raiz e treze em folhas no tratamento com Al. Destas proteínas exclusivas do tratamento com Al e diferencialmente expressas nas duas condições em folhas, se identificou duas proteínas envolvidas em rotas metabólicas da fotossíntese, uma relacionada a síntese de ATP e uma em mecanismos antioxidantes. Este estudo fornece informações importantes para contribuir no entendimento da modulação do Al nos processos de tolerância de plantas acumuladoras.

Palavras chave: Proteômica, acumuladora de Al, metabolismo.

9.3. INTRODUÇÃO

9.3.1. Cerrado

O cerrado brasileiro cobre uma área de aproximadamente dois milhões de km² abrangendo dez estados do Brasil. É caracterizado por apresentar solos com pH reduzido, baixos teores de matéria orgânica, assim como de Ca e Mg trocáveis, e também de saturação de bases (Oliveira *et al.*, 2005). Além disso, os solos do Cerrado têm relativamente elevados teores de alumínio trocáveis (Al³⁺), tóxico para a maioria das plantas cultivadas e não adaptadas a esse tipo de solo (Oliveira *et al.*, 2005).

O foco dos estudos sobre os solos no bioma Cerrado antes da década de 80 foi dado à pobre disponibilidade de nutrientes e sua acidez, sem dar ênfase às adaptações de espécies nativas que permitem a sobrevivência dessas plantas nestas condições, proporcionando-as a resiliência necessária que é a base da grande diversidade mosaica de fisionomias vegetais da região (Goodland, 1971^{1,2}; Goodland e Pollard, 1973; Lopes e Cox, 1977).

Sabe-se que esse bioma abriga plantas que podem acumular grandes quantidades de Al em seus tecidos tais como *Miconia pohliana* Cogn.(Melastomataceae), *Palicourea rigida* H.B.K. (Rubiaceae) e *Vochysia elliptica* (Spr.) Mart. (Vochysiaceae) (Haridasan, 1988, 2008²). Estudar mecanismos de tolerância e acúmulo de Al em plantas acumuladoras irá fornecer informações valiosas sobre o papel desse metal no metabolismo dessas plantas. É importante salientar que até o momento não há estudos moleculares envolvendo esse mecanismo em plantas desse bioma.

9.3.2. Plantas tolerantes e acumuladoras de Al

A resposta das plantas ao Al se constitui um tópico de pesquisa importante, pois importantes culturas são suscetíveis aos solos ácidos. Como resultado, a produtividade dessas culturas é seriamente afetada principalmente pelos altos níveis de Al³⁺ nestes solos (Mariano *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2002; Vitorello *et al.*, 2005). No entanto, plantas nativas que toleram solos ácidos ainda não têm recebido a devida atenção.

A questão da toxicidade do Al em ecossistemas de Cerrado foi levantada pela primeira vez por Goodland (1971²), que sugeriu que escleromorfismo exibido por muitas das espécies nativas poderia estar associado com a toxicidade do Al nos solos ácidos. Hutchinson (1943), Chenery (1948^{1, 2}) e Webb (1954) identificaram espécies de plantas do bioma savana

(Austrália e outras partes do mundo) que acumulam Al. Com base na frequência dos taxa envolvidos, os autores supracitados formularam a hipótese de que plantas pertencentes às famílias Vochysiaceae e Melastomataceae poderiam ser acumuladoras de Al. Isso foi comprovado em estudos posteriores de Haridasan (1982, 1987, 2008¹) onde reportou-se que as espécies acumuladoras do bioma Cerrado pertenciam às famílias Melastomataceae, Vochysiaceae e Rubiaceae. Além disso, tem sido relatado que estas espécies acumuladoras do Cerrado não apresentam baixas concentrações de nutrientes essenciais, em comparação com não acumuladoras, e que o Al não inibe o seu crescimento (Haridasan *et al.*, 2008²).

Recentemente, alguns pesquisadores tem voltado sua atenção para espécies de plantas capazes de acumular altos níveis de Al na parte aérea como, por exemplo, *Qualea parviflora* Mart., *Qualea multiflora* Mart. e *Vochysia thyrsoidea* Pohl. (Vochysiaceae). Essas espécies possuem mecanismos de adaptação à presença desse metal nos solos do Cerrado. Dentre os mecanismos adaptativos para tolerar o Al internamente está a expressão diferencial de genes e proteínas envolvidos na produção de complexos de ácidos orgânicos, principalmente malato, citrato e oxalato, sendo que essa quelação reduz efetivamente a atividade do Al no citosol, prevenindo a formação de complexos entre esse metal e os componentes celulares como APTases, etc. (MA *et al.*, 2001; Delhaize *et al.*, 2006; Ryan *et al.*, 2011).

Além disso, existem mecanismos externos que incluem a formação de quelados não tóxicos de Al com ânions de ácidos orgânicos secretados pelos ápices radiculares, ou alcalinização do apoplasto radicular e rizosfera, os quais substituem as espécies tóxicas de Al por formas menos tóxicas (Wenzl *et al.*, 2001; Delhaize *et al.*, 2006). Há fortes correlações entre tolerância ao Al e liberação de ácidos orgânicos ativada pela presença de Al em numerosas espécies de plantas, como a aveia (*Avena sativa*) (Zheng *et al.*, 1998), tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Delhaize *et al.*, 2001) e trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*) (Ma *et al.*, 1997), mas o entendimento molecular desse mecanismo não está bem esclarecido.

9.3.3. Proteômica

Proteoma é o conjunto de todas as proteínas presentes em um material biológico e que, ao contrário do genoma, está em contínua mudança em resposta aos estímulos internos e externos sofridos pelo organismo (Wilkins *et al.*, 1994). Atualmente, consiste na análise simultânea de misturas complexas de proteínas provenientes de lisados celulares e extratos de tecidos com o intuito de detectar diferenças quantitativas e qualitativas na expressão proteica.

Seu objetivo se diversifica para a análise de vários aspectos funcionais das proteínas como modificações pós-traducionais, interações proteínas-proteína, atividades e estruturas (Westermeyer & Naven, 2001).

Existem dois tipos de análises proteômicas, a estrutural e a comparativa. A primeira se dá pela caracterização do proteoma total de um determinado organismo, tecido, organela ou estrutura celular com a identificação do maior número possível de proteínas. A proteômica comparativa visa a identificação de proteínas diferencialmente expressas diante de condições ou estímulos específicos (Wilkins *et al.*, 2001).

No contexto da proteômica comparativa, onde o objetivo é identificar diferenças quantitativas e qualitativas entre amostras de proteínas extraídas de determinado organismo/órgão/tecido submetido a condições bióticas ou abióticas diferentes, a técnica de 2-DE (Significado da sigla) é geralmente o método de escolha (Rabilloud, 2002). Essa técnica permite a geração de dados que possibilita uma boa avaliação visual (para amostras pouco complexas) tornando possíveis comparações entre amostras (Rabilloud, 2002). Pela técnica de 2-DE as proteínas são separadas com base em dois princípios: pontos isoelétricos (P.I.) e massas moleculares (M.M.). A separação de proteínas por eletroforese bidimensional possibilita a construção de mapas estruturais utilizados no estudo de proteínas expressas em diferentes tecidos e organismos crescidos em diferentes condições e estágios de desenvolvimento, fornecendo informações acerca do crescimento e desenvolvimento permitindo a sua caracterização pós-traducional (Rose, 2004).

Em uma segunda etapa, o produto peptídico imobilizado nesses géis deve ser identificado, e esta identificação é realizada através de análises de espectrometria de massa (Natera *et al.*, 2000; Westermeyer, 2001).

9.3.3.1. Espectrometria de massa

A espectrometria de massa é uma técnica analítica utilizada desde o início do século XX para obter a massa molecular e informações quanto às características estruturais de uma determinada amostra proteica, fornecendo informações sobre a composição elementar, a estrutura e análises quantitativas e qualitativas do material analisado (Vega-Bustillos, 2003).

A proteômica se beneficiou muito com desenvolvimento da espectrometria de massa voltada aos processos biológicos. Em decorrência disso, houve um aumento do número de sequências armazenadas em bancos de dados (Vega-Bustillos, 2003). Um fator importante para isso foi o desenvolvimento de técnicas para a ionização de proteínas e peptídeos em

MALDI (*matrix assisted laser desorption/ionization* – ionização por eletrovaporização), que combinadas com analisadores de massa TOF (*time of flight* – tempo de voo) aumentaram a sensibilidade e a acurácia na determinação da massa do peptídeo (Aebersold & Mann, 2003). A escolha do analisador de massa poderá fornecer maior ou menor acurácia, resolução, sensibilidade e custo dependendo do objetivo a ser alcançado (Cunha *et al.*, 2006).

O princípio da espectrometria de massa (MS- *mass spectrometry*) é a avaliação da razão massa/carga (m/z) dos íons na fase gasosa resultantes da ionização da amostra e constitui sempre um método analítico destrutivo, significando que a amostra é consumida pela ionização, e é transferida para a fase gasosa em dissociação (Jonsson, 2002). Nesse processo, uma forma de energia é transferida para a amostra para causar sua ionização (formação de íons livres na fase gasosa). A Figura 1 apresenta um esquema de como um espectrômetro de massa comum funciona. O esquema mostra onde uma proteína fragmentada é ionizada e lançada para uma fonte de íons. O analisador de massas irá detectar a massa pela carga e um processador irá gerar os mapas peptídicos ou PMF (*Peptide Mass Fingerprint*), ou, dependendo do aparelho, pode-se gerar a sequências destes peptídeos analisados.

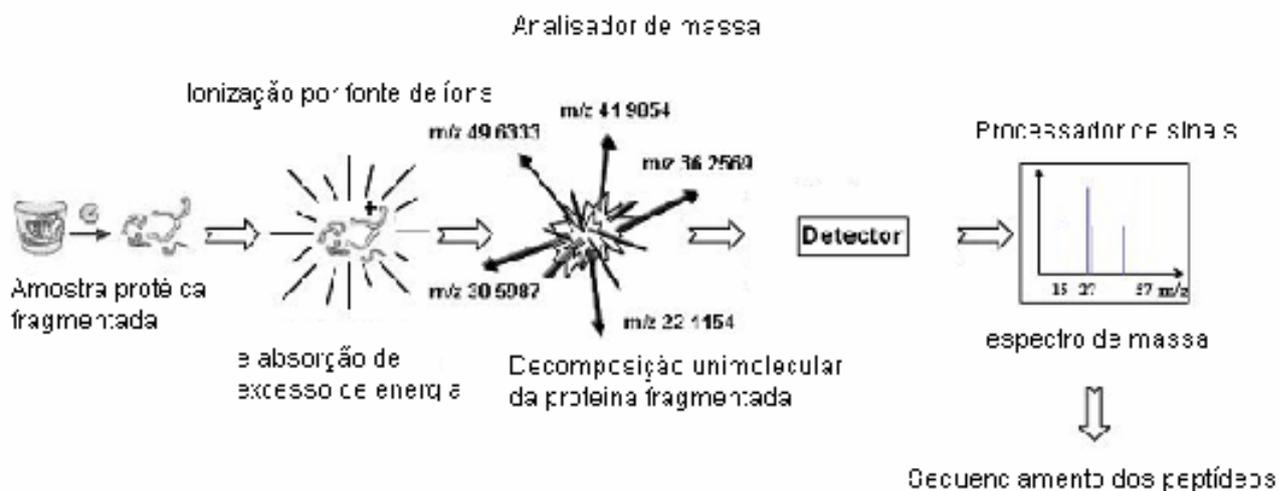


Figura 1. Ilustrativo do procedimento de preparação da amostra para a espectrometria de massa (Fonte: Pereira, 2007).

9.3.3.2. Identificação de proteínas

Na análise de um proteoma comparativo, a identificação de proteínas é de suma importância para caracterizar e mapear diferenças de expressão proteica do organismo em estudo (Cunha *et al.*, 2006).

Um equipamento muito utilizado é o MALDI-TOF. Nessa análise, o método de impressão digital do mapa peptídico (PMF) é praticamente infalível e particularmente útil na identificação de proteínas de espécies com genomas pequenos e completamente sequenciados. Para proteínas de espécies cujo genoma não está sequenciado – como no caso desse trabalho – é necessário usar bancos de dados ampliados (sem restrição taxonômica). Nesse caso, é imprescindível utilizar fragmentos de sequência peptídica (MS/MS- *sequence tags*) para uma identificação mais confiável; geralmente obtido em equipamentos do tipo MALDI-TOF-TOF (Cunha *et al.*, 2006).

9.3.3.3. Proteômica Vegetal

Segundo Park (2004), a proteômica vegetal encontra-se menos avançada em relação à pesquisa proteômica para os organismos unicelulares e leveduras. O maior avanço no caso destes organismos pode ser explicado pela rápida disponibilidade das sequências genômicas completas desses organismos e a menor complexidade do seu proteoma.

Com o sequenciamento completo do genoma de *Arabidopsis thaliana* (*The Arabidopsis genome initiative*, 2000) e de outras plantas e abundância de dados de EST (*Expressed sequence tags* - sequências parciais de genes expressos), acredita-se que em pouco tempo a proteômica vegetal tornar-se-á um campo de pesquisa bastante explorado (Agrawal, *et al.*, 2005).

A análise proteômica em plantas foi iniciada com milho (*Zea mays*) (Touzet *et al.*, 1996) e *A. thaliana* (Sahnoun *et al.*, 2000), mas a primeira revisão em proteômica vegetal foi publicada somente no fim do século passado (Thiellemente *et al.* 1999). A maioria destes estudos se baseia na comparação dos níveis de expressão sem a real identificação das proteínas e tinham como objetivo a identificação de marcadores para diferentes situações (Agrawal *et al.*, 2005). Além dessas plantas, estudos têm sido realizados em outras espécies de dicotiledôneas tais como feijão, uva, ervilha, batata, tabaco, tomate, soja, etc. Estes estudos tem fornecido um grande número de aplicações de novos métodos de preparação da amostra em diferentes condições de crescimento (Agrawal *et al.*, 2005, Duressa *et al.*, 2010).

Uma boa preparação da amostra que se traduz na extração do máximo número de proteínas de uma dada célula, tecido, órgão ou organismo é crucial para a subsequente separação, resolução e identificação de proteínas (Wikins *et al.*, 1996). A prevalência de compostos provenientes do metabolismo secundário representa um dos problemas mais significativo que diretamente afeta à análise de proteomas vegetais (Rose *et al.*, 2004). A baixa concentração de proteínas em alguns tipos de material vegetal, como raízes, também representa outro obstáculo. Um protocolo de extração ideal resultaria na solubilização do total de proteínas em uma dada amostra, minimizando artefatos pós-extração e contaminantes não proteicos (Rose *et al.*, 2004). Vários métodos de preparação estão disponíveis para diferentes materiais vegetais (Rabolloud, 1996). Um dos métodos mais utilizados é o que utiliza ácido tricloroacético e acetona (TCA/acetona) para a precipitação direta das proteínas de um dado material (Granier, 1988). Uma vantagem é a precipitação imediata de proteínas e a inativação simultânea de componentes envolvidos na degradação proteica, como as proteases. Entretanto, este método também envolve a precipitação de outras substâncias (sais, pigmentos e polifenóis) que interferem na focalização isoeletrica (IEF) das proteínas (Granier, 1988). Para a extração proteica no presente trabalho, esse método foi utilizado com maior eficiência.

Uma das maiores dificuldades da proteômica vegetal é a identificação de proteínas de organismos com genomas não sequenciados. A identificação e caracterização de proteínas são possíveis pela disponibilidade de sequências genômicas e de “fragmentos de sequência expressa” ESTs (*Expressed sequence tag*) (Van Wijk, 2001). Para contornar os problemas de falta de sequências genômicas, duas alternativas são possíveis: se sequências ESTs estão disponíveis, proteínas podem ser identificadas por sequências *tags* obtidas por ESI-MS/MS ou usando-se MALDI-TOF PSD (*post source decay* – decaimento após a fonte), mas esse método é fortemente dependente do tamanho e qualidade dos bancos de dados EST. Outro caminho seria realizar buscas baseadas em homologia, preferencialmente usando-se sequências obtidas de MS/MS, MALDI-TOF/TOF, ou sequenciamento de Edman. Essas alternativas são possíveis devido ao compartilhamento de proteínas homólogas entre organismos vegetais de diferentes taxa (Van Wijk, 2001). Neste trabalho as buscas foram feitas por homologia usando-se sequências obtidas por MS/MS visto que a espécie analisada não possui genoma sequenciado.

9.3.3.4. Proteoma comparativo de plantas em resposta ao Al

Os estudos de proteomas totais ou comparativos podem ser importantes ferramentas na identificação de proteínas envolvidas em mecanismos de adaptação de diferentes espécies de plantas em resposta ao Al. Além disto, esta abordagem pode ser utilizada para a inserção de sequências no banco de dados em genomas não sequenciados.

Apesar do grande número de espécies acumuladoras de Al, estudos proteômicos para explicar a absorção e acúmulo de Al nessas plantas é um assunto pouco estudado. São relativamente recentes as tentativas de pesquisar se o esse metal desempenha algum papel importante no metabolismo dessas plantas (Matsumoto, 2000, Watanabe & Osaka, 2002; Ryan *et al.*, 2011).

As pesquisas sobre o proteoma de resposta das plantas ao Al começaram a surgir nos últimos dez anos, mas a maior parte desses estudos tem sido biologicamente descritiva ou focada no melhoramento das metodologias agronômicas. Alguns poucos estudos foram realizados em plantas Al-resistentes/sensíveis, como o arroz (*Oryza sativa* L.) (Yang *et al.*, 2007, a soja (*Glicine Max* L.- PI 416937) (Duressa *et al.*, 2010, 2011) e o tomate (*Solanum esculentum* L.) (Zhou *et al.*, 2009). Nesses trabalhos as proteínas identificadas como diferencialmente expressas participam de mecanismos de regulação de antioxidantes e desintoxicação; como por exemplo as oxirredutases, onde plantas expostas ao Al tiveram um aumento na sua expressão (Yang *et al.*, 2007), como também as glutatonas e o sistema ABC que se conjugam com as toxinas e as exportam para fora da célula, ou são armazenadas no vacúolo pelo sistema transportador de proteínas ABC (Zhen *et al.*, 2007). O aumento da produção dessas proteínas sugere que essas espécies realizam a extrusão do Al para fora da célula ou compartimentaliza este metal no vacúolo (Duressa *et al.*, 2010, 2011, Zhou *et al.*, 2009).

Adicionalmente, genes que codificam proteínas transportadoras de lipídeos e açúcares também podem ter um aumento do nível de expressão, como observado em soja (PI 416937) após 48h de exposição ao Al (Duressa *et al.*, 2010). Essas proteínas transportam lipídios para a parede celular da epiderme para a biossíntese de cutina, sendo este um mecanismo de defesa contra patógenos e estresses abióticos incluindo o Al (J.-C. Kader, 1997 citado por Duressa *et al.*, 2010). Proteínas transportadoras de açúcares estão relacionadas a ataques patógenos e também são encontradas na presença de Al (Duressa *et al.*, 2010), pois os polissacarídeos, glicoproteínas, e glicolipídios atuam no reconhecimento da superfície celular desencadeando respostas de resistência e/ ou tolerância a esse metal (Handford *et al.*, 2006).

Outros grupos de proteínas envolvidas nos mecanismos de resistência e/ou tolerância ao Al em plantas são codificados por genes membros das famílias ALMT e MATE (Delhaize *et al.*, 2007). Estudos genômicos indicam a ativação de genes que codificam proteínas que são enzimas e transportadores relacionadas às rotas metabólicas do malato, oxalato e citrato – ácidos orgânicos capazes de imobilizar o Al dentro e fora da célula – e parecem estar envolvidas em mecanismos de tolerância ao Al em muitas espécies (Ma *et al.*, 2001); dentre as quais temos a canola (*Brassica napus* L.), a alfafa (*Medicago sativa* L.) e o trigo (*Triticum aestivum* L.) (Anoop *et al.*, 2003; Tesfaye *et al.*, 2001; Ryan *et al.*, 2009).

A hipótese da participação de proteínas que protegem os sistemas celulares dos efeitos maléficos do Al³⁺ é uma ideia bem estabelecida e possui extenso corpo de evidências. Entretanto, é necessário investigar os mecanismos envolvidos nesse processo, principalmente em nível molecular, para que a toxicidade do Al³⁺ e tolerância das plantas sejam esclarecidas (Gonçalves *et al.*, 2000). Um dos primeiros e principais sítios da interferência do Al³⁺ parece ser a membrana plasmática e, portanto, a sua proteção torna-se essencial para a atividade celular. Plantas acumuladoras devem possuir enzimas e transportadores menos sensíveis ou produzirem ácidos orgânicos ou outras moléculas capazes de complexar o Al³⁺, mantendo-o numa forma inócua (Kochian, 1995, 2004). Além disso, o sistema oxidante da planta parece responder à presença desse metal (Duressa *et al.*, 2011).

Na sua quase totalidade, os estudos de proteômica vegetal de resposta ao Al envolvem plantas cultivadas, por isso, o entendimento de proteínas envolvidas nestes mecanismos em plantas acumuladoras nativas do Cerrado continua inexplorado. Conhecendo os mecanismos de resposta envolvidos na expressão proteica de modulação do Al em plantas acumuladoras se abre a possibilidade de se obter, por meio da engenharia genética, plantas de interesse econômico que sejam ao mesmo tempo mais tolerantes e mais produtivas.

9.3.4. *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae)

O objeto de estudo deste trabalho é uma espécie de grande importância do Cerrado, a saber, *Qualea grandiflora* Mart. Esta espécie se caracteriza por sua abundância e distribuição em diferentes classes de solo desse bioma (Haridasan, *et al.*, 2008¹). Além disso, é uma planta capaz de armazenar grandes quantidades de Al em partes aéreas.

Analisando-se o proteoma comparativo de *Q. grandiflora* na presença e ausência de Al poder-se-á avaliar as proteínas diferencialmente expressas em resposta a esse metal.

9.4. MATERIAL E MÉTODOS

9.4.1. Fluxograma das análises proteômicas

O fluxograma para uma análise proteômica (Fig. 2) consiste primeiramente da extração de proteínas de um organismo de interesse utilizando-se o método adequado, seguida pela separação das proteínas com o uso da eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2-DE), sua digitalização e análise. Posteriormente, selecionam-se *spots* de interesse dos géis que serão digeridos e identificados por espectrometria de massa e cruzamento em bancos de dados disponíveis (Park, 2004).

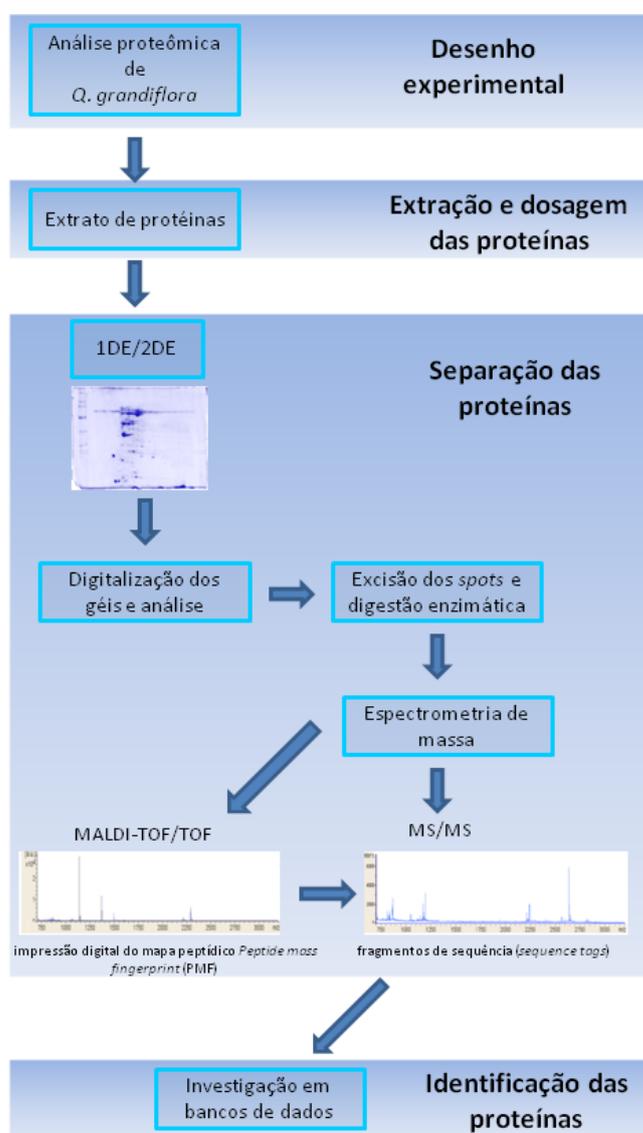


Figura 2. Fluxograma das etapas de análise proteômica utilizadas nesse trabalho (Adaptado de Rose *et al.*, 2004).

9.4.2. Material vegetal

Sementes da espécie *Q. grandiflora* presentes em áreas de Cerrado Sentido Restrito na Estação Biológica da Universidade de Brasília (UnB), na Reserva ecológica da Fazenda Água Limpa - UnB (FAL) e na Reserva Ecológica do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) em seu ambiente natural de ocorrência foram coletadas, germinadas e cultivadas na presença e ausência de Al por 120 dias. O Al foi fornecido pela adição de 150 μM de AlCl_3 na solução nutritiva e o pH da solução nutritiva foi ajustado e mantido com HCl 0,1 M e KOH 0,1 M entre 4,5 e 4,8 com o intuito de manter o Al solubilizado. As plântulas cresceram em copos de plástico (500 mL) contendo vermiculita esterilizada. A solução nutritiva MS (Murashige e Skoog, 1962) foi utilizada na proporção $1/5$ em dois tratamentos (com e sem Al) sem a adição de açúcares e vitaminas

Raízes e folhas de 20 plantas relativas a cada tratamento foram lavadas com água destilada autoclavada e separadas para as análises proteômicas (estocadas a -80°C até o processamento das amostras).

9.4.3. Processamento e extração de proteínas

As raízes e folhas (de tamanho uniforme) das plantas relativos aos dois tratamentos foram maceradas em nitrogênio líquido, em cadinho resfriado até a obtenção de um fino pó e transferidas para tubos eppendorfs de 2 mL.

9.4.3.1. Extração Ácida (TCA/acetona)

A extração de proteínas de folhas e raízes foi realizada como descrito por Natarajan *et al.* (2005). Amostras contendo 0,1 g de tecido pulverizado foram ressuspensas em 2 mL de 10% TCA/acetona (p/v) contendo 0,007% (v/v) de β -mercaptoetanol. As amostras foram incubadas a 4°C por 3 h e posteriormente foram centrifugadas a $10.000\times$ g por 20 min, e o sobrenadante descartado. Foram feitas cinco lavagens com 2 mL de 10% TCA/acetona (p/v) até que a amostra estivesse livre de pigmentos. Em seguida fez-se três lavagens com 2 mL de 10% TCA/água destilada (m/v) e duas lavagens com acetona 100% gelada contendo 1mM do inibidor de proteases PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride). Os Eppendorfs contendo as amostras foram incubados sob vácuo por 1 h para a total retirada da acetona. As condições de centrifugação para as lavagens foram: $10.000\times$ g por 20 min em

cada procedimento. Após o procedimento de precipitação e lavagem das amostras, estas foram ressuspensas em 1,5 mL de tampão de reidratação sem azul de bromofenol (p/v: 8M de uréia, 2M de tiouréia, 0,5% (p/v) de CHAPS e 0,002% (v/v) de anfólitos).

9.4.3.2. Extração fenólica

Esse método foi realizado de acordo com a descrição de Wang e colaboradores (2003) com algumas modificações. Amostras contendo 0,1g de tecido pulverizado foram distribuídas em tubos de 2 mL, ressuspensas em 1,5 mL de acetona gelada, homogeneizadas por 30 s utilizando vortex e centrifugadas a 11.700 g a 4°C por 5 min. Este procedimento foi repetido e os precipitados resultantes foram lavados com solução TCA/acetona a 10% (m/v) de 3 a 4 vezes para a remoção de compostos secundários. Para a remoção do TCA, os precipitados foram lavados com acetona 80% (v/v) gelada 2 vezes. A cada lavagem, as amostras foram homogeneizadas utilizando o vortex e centrifugadas como descrito acima. Após a lavagem, o precipitado de cada tubo foi ressuspensado com 0,5 mL de tampão Tris-HCl pH 8.0 100 mM contendo 30% de sacarose (m/v), 2% (m/v) de SDS, 5% (v/v) de 2-mercaptoetanol e 1% (m/v) de polivinilpolipirrolidona (PVPP), homogeneizado por 30 s e sonificado por 20 min. Em seguida, 0.8 mL de fenol (pH 8.0) foi adicionado à mistura, homogeneizado no vortex e centrifugado nas condições descritas acima. A fase fenólica de cada uma das extrações foi coletada e transferida para outro tubo. Às fases fenólicas coletadas foram adicionados 1 mL de solução de acetato de amônio a 0,3 M em metanol. Estas misturas foram incubadas a -80°C para a precipitação de proteínas, após 2 horas as misturas foram centrifugadas a 11.700 g por 10 min a 4°C, o sobrenadante obtido foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com acetona a 80% (v/v). A fração solúvel foi ressuspensa em 1,5 mL de tampão de reidratação sem azul de bromofenol como descrito no protocolo de extração ácida.

9.4.4. Quantificação de proteínas totais

A determinação da concentração de proteínas por amostra foi realizada a partir de 0,1 g do macerado de raízes e folhas homogeneizadas em tampão de reidratação. As amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 5 min a 4°C, e o sobrenadante dialisado e posteriormente utilizado como fonte de proteínas. A concentração de proteínas foi

determinada utilizando-se Plus One 2D Quant-Kit (GE Healthcare), tendo albumina de soro bovino (BSA) como padrão. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm.

9.4.5. Análises eletroforéticas

9.4.5.1. Eletroforese Unidimensional

Foram realizadas eletroforeses desnaturantes em gel de poliacrilamida (SDS PAGE) de acordo com Laemmli (1970), para a análise inicial dos perfis proteicos. O gel possuía espessura de 0,75 mm e gradiente de poliacrilamida de 12,5%. Utilizou-se o sistema Hoeffer SE-600 (Pharmacia Biothec) conectado ao resfriador Multitemp II (Amersham). A separação eletroforética foi realizada a 15°C e corrente constante de 40 mA.

9.4.5.1.2. Coloração com nitrato de prata

Após a corrida das amostras, o gel foi corado para visualização das proteínas, utilizando o método descrito por Blum *et al.* (1987). O gel foi transferido para uma solução fixadora [metanol 50% (v/v), ácido acético glacial 12% (v/v) e formaldeído 0,1% (v/v)] em agitação lenta e constante por 60 min. Em seguida, o gel foi lavado três vezes com solução de etanol 50% (v/v) por 20 min cada. Após as lavagens, o gel foi tratado, por 1 min, com solução de tiosulfato de sódio 0,2 g.L⁻¹ com leve agitação manual, lavando-se logo após com água destilada 3 vezes por 20 s cada. Em seguida o gel foi incubado por 20 min em solução de nitrato de prata (2 g.L⁻¹) contendo formaldeído (0,75 mL.L⁻¹). Posteriormente, foi lavado novamente em água destilada por duas vezes (2 min cada lavagem) e a revelação foi realizada com solução de carbonato de sódio 6,0% (p/v) contendo 2 mL de tiosulfato de sódio 0,2 g.L⁻¹ e 50 µL de formaldeído. Após a visualização das bandas, a solução reveladora foi descartada e a solução de parada [metanol 50% (v/v) e ácido acético 12% (v/v)] foi adicionada. O gel foi mantido em temperatura ambiente até o momento de fotografar.

9.4.5.2. Eletroforese Bidimensional

9.4.5.2.1. Isoeletrofocalização (IEF)

Esse método foi realizado de acordo com a descrição de Sanchez e colaboradores

(1997). Amostras de raízes e folhas contendo 500 µg de proteínas provenientes da solubilização com tampão de reidratação foram transferidas para novos eppendorfs, cujos volumes foram completados para 500 µL com o reagente —De-streak e anfólitos pH 3-10 (GE healthcare). Essas amostras foram e aplicados em tiras com gradiente de pH de 3 a 10 de 18 cm de comprimento (*Immobiline Drystrip*, Amersham Biosciences). As tiras contendo as amostras foram hidratadas por 16 h em temperatura ambiente. Para a focalização isoeétrica, utilizou-se o aparelho IPGphor III (GE healthcare) de acordo com o seguinte protocolo: 500 V por 1 h, 1000 V por 1h, 2000 V por 3 h e 5000 V até 55.000V, num total de 14 h de focalização para amostras de raiz e 200 V por 1 h, 1000 V por 1 h, 3000 V por 3 h e 5000 V até 57.400 V num total de 17 h de focalização para amostras de folha. As tiras de gradiente de pH provenientes da focalização foram acondicionadas em tubos de plástico e estocadas a -20°C até a realização da segunda dimensão.

9.4.5.2.2. Eletroforese de segunda dimensão em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As tiras de pH focalizadas foram submetidas à redução e alquilação por incubação consecutiva em 2,5 mL de tampão de equilíbrio [Tampão Tris- HCl 50 mM pH 8,8, Uréia 6 M, glicerol 30% (v/v), SDS 30% (m/v) e traços de azul de bromofenol] contendo 0,1 g de ditioneitol (DTT), e estas imersas sob agitação por 15 min. Após esse período, a solução foi descartada e foram adicionados 2,5 mL de tampão de equilíbrio contendo 0,25 g de iodoacetamida. As tiras foram incubadas nesta solução sob agitação por 15 min.

A segunda dimensão foi realizada de acordo com Laemmli (1970). Os géis de separação na concentração de 12,5% de poliacrilamida (p/v) foram preparados um dia antes da corrida. A eletroforese foi realizada em géis de 25,5 cm x 20,5 cm x 0,15 cm em uma cuba ETTAN DALT SIX (GE Healthcare). As tiras foram dispostas horizontalmente sobre os géis e cobertas com uma solução selante (agarose 0,5% (m/v), tampão de corrida 1X [Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1 % (m/v)] e traços de azul de bromofenol). A segunda dimensão foi feita utilizando dois passos: corrente de 10 mA/gel por 1 h e corrente de 40 mA/gel por aproximadamente 7 h. A temperatura do sistema foi mantida em 15 °C por meio do sistema de circulação termostática MultiTemp III (GE Healthcare). Foi utilizado o marcador de massa molecular —*Unstained protein Molecular weight marker* (Promega) para a determinação da massa molecular das proteínas.

9.4.5.2.3. Coloração dos géis

Os géis retirados foram corados com azul de Comassie G-250 (Candiano *et al.*, 2004) por 3 dias e em seguida foram descorados, sob agitação, em solução de ácido acético 10% (v/v). Ao todo, foram feitos três géis para cada condição, totalizando 12 géis bidimensionais, provenientes de amostras de raízes e folhas de 40 plantas (20 para cada condição).

9.4.6. Análise das imagens

Das réplicas de cada condição, o gel com menos imperfeições foi selecionado como mapa de referência. Para comparar as réplicas, foi utilizada a ferramenta *landmark* para o ajuste das diferenças de migração dos *spots* de proteínas. Foi gerado um fator de correlação entre as réplicas evidenciando a reprodutibilidade do experimento.

Os géis foram digitalizados utilizando-se o scanner —ImageScanner III calibrado de acordo com manual do fabricante (GE Healthcare) em modo transparente e as imagens geradas em formato Tiff foram analisadas utilizando o programa computacional —ImageMaster™ 2D Platinum v7.0 (GE Healthcare).

Os pontos proteicos foram escaneados com suavidade de 10 (*smooth*), saliência 40 e área mínima de 70. A leitura dos pontos foi feita de modo automático seguida de manual para que pontos proteicos lidos por engano pelo programa, como bolhas no gel, fossem excluídos da análise. A detecção de cada *spot* proteico foi validada por inspeção manual e editada quando necessário. O programa também forneceu o número de *spots* e a estimativa dos seus PIs e massas moleculares.

Os pontos proteicos comuns entre os dois tratamentos, com valor de diferença de expressão maior que 1,5 e os pontos proteicos exclusivos para cada condição foram escolhidos para a etapa de identificação. Os *spots* em comum selecionados apresentando a diferença de volume foram assinalados como diferencialmente expressos (Teste T de Student - $p < 0,05$).

Os *spots* comuns e diferenciais para as duas condições foram excisados dos géis e armazenados em Eppendorfs de 0,5 mL para serem digeridos com tripsina e os peptídeos analisados por espectrometria de massas.

9.4.7. Espectrometria de massa

9.4.7.1. Digestão trípica dos pontos proteicos (*spots*)

Para análise por espectrometria de massas, 45 *spots* foram retirados dos géis bidimensionais, sendo 21 de raiz e 24 de folhas. Estes *spots* foram digeridos segundo Shevchenko *et al.* (1996; 2007) com modificações. As bandas retiradas dos géis foram colocadas em tubos de 0,5 ml. Em seguida, adicionou-se 200 µL de uma solução de bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0 em acetonitrila 50% (v/v), agitou-se em vórtex por 20 min e o sobrenadante foi descartado. Esta etapa foi repetida até os pedaços de géis ficarem totalmente transparentes. Após o descarte, adicionou-se 100 µL de acetonitrila às amostras e agitou-se em vórtex por 5 min. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram completamente secas em uma Speed-Vaccum.

Foram adicionadas as amostras, 15 µL de uma solução de tripsina Gold-Mass V582A (Promega) 10ng.µL⁻¹ em tampão bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0 e as mesmas foram armazenadas no gelo. Após 15 min, adicionou-se 40 µL de tampão bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0 e as amostras foram incubadas à 37 °C por 16 h. O sobrenadante da reação foi transferido para tubos novos de 0,5 ml. Adicionou-se aos pedaços de géis 50 µL de ácido trifluoroacético (TFA) 5% (v/v) em acetonitrila e agitou-se em vórtex por 10 min. O sobrenadante foi transferido para os tubos novos contendo o sobrenadante da etapa anterior. Esta etapa foi repetida novamente. O produto da digestão por tripsina foi secado totalmente em uma Speed-vaccum.

As amostras foram ressuspendidas em 6 µL de água miliQ e 1 µL foi transferido para tubos novos de 0,5 ml contendo 1 µL de matriz [5 mg de ácido α-4-ciano-hidroxicinamico em 500 µL de TFA 0,3% (v/v)/ acetonitrila 50% (v/v)]. Dessa mistura, 0,7 µL de cada amostra foram aplicadas em poços diferentes, em triplicata, de uma placa de MALDI MTP 384 *ground steel* (Bruker Daltonics). Para a calibração do equipamento, foi utilizada a mistura de calibrantes 4700 *Proteomics Analyzer Calibration Mixture* (Applied Biosystems).

9.4.7.2. Espectrometria de massa em MALDI/TOF-TOF, análise dos espectros e identificação das proteínas.

As amostras foram analisadas em um espectrômetro de massas Ultraflex III MALDI TOF/TOF (Bruker Daltonics) no Laboratório de Espectrometria de Massas do CENARGEN/EMBRAPA. O aparelho estava configurado em modo positivo, refletor em V e extração retardada. Os espectros de MS e MS/MS foram obtidos automaticamente, após configuração de parâmetros no programa FlexControl (Bruker Daltonics). Os peptídeos foram sequenciados manualmente através dos programas FlexAnalysis (Bruker Daltonics) e PepSeq (MicroMass Co.). As sequências obtidas foram submetidas à comparação com o banco de dados de proteínas do NCBI, através do algoritmo blastp. Avaliou-se todos os táxons de plantas disponíveis em bancos de dados, priorizando os da divisão Magnoliopsida, e quando possível da ordem Myrtales.

9.5. RESULTADOS

9.5.1. Estabelecimento do método de extração de proteínas para a análise em 2DE

Grande parte dos protocolos de extração de proteínas, como a extração fenólica, não deram os mesmos resultados vistos em outras plantas (resultado não mostrado). Os géis bidimensionais para as amostras extraídas de raiz e folha de *Q. grandiflora* utilizando o método fenólico apresentaram uma série de obstáculos como baixa definição, maior percentual de degradação dos *spots*, menor taxa de degradação proteolítica, além de alta concentração de compostos interferentes o que dificultou as análises de dosagem de proteínas. Em virtude disso, concluiu-se que este método não era adequado para a amostra analisada, pois excluía uma parte significativa das proteínas presentes no material vegetal.

Para as amostras de *Q. grandiflora* o método de extração ácida (TCA/acetona) foi o mais eficiente. Esse protocolo de extração utilizado para proteínas de raízes e folhas foi usado com o intuito de se obter um único método para ambos os tecidos, com mínima perda proteica possível e menor percentual de degradação e interferentes provenientes do metabolismo secundário vegetal. Os géis apresentaram boa definição dos *spots*, bem como um maior número destes, principalmente os de alta massa, não observados nos géis obtidos por extração fenólica.

9.5.2. Eletroforese Unidimensional

É importante mencionar que em raízes, a amostra foi aplicada diretamente do tampão de reidratação para a eletroforese unidimensional. Diferentemente, em folhas, primeiramente se realizou um procedimento de precipitação das amostras com TCA/acetona para auxiliar ainda mais na retirada de possíveis interferentes presentes. Esse procedimento resultou em uma considerável diminuição da quantidade de proteínas e também na perda de alguns *spots* em folha, principalmente aqueles de massa baixa. No entanto, optou-se por utilizar esse procedimento, visto que os interferentes afetavam a focalização e as posteriores análises em eletroforese bidimensional.

A Figura 3 mostra o perfil unidimensional das amostras de raiz e folha provenientes de dois tratamentos: sem Al (controle) e com Al. O mesmo foi corado com nitrato de prata. Os resultados mostraram o perfil proteico completo das amostras de raiz e folhas de *Q. grandiflora* dos dois tratamentos.

Nessa análise, observa-se que quantidade de proteínas em amostras de raiz e folha variou de 10 a 40 µg em função da sensibilidade do corante utilizado no gel. Não foi possível evidenciar diferenças qualitativas nos perfis proteicos das amostras de um mesmo órgão entre os dois tratamentos. No caso das amostras do tratamento com Al (raiz e folha) se percebe algumas diferenças sutis entre as amostras, com respeito à quantidade. Porém, foi necessário um aprofundamento da análise por meio da 2-DE, a qual tem o poder de resolução muito mais eficiente para cada proteína.



Figura 3. Perfil proteico unidimensional (SDS PAGE) - Amostras proteicas de raiz e folha de plântulas de *Q. grandiflora* crescidas com ou sem Al no meio nutritivo em gel de poliacrilamida em condição desnaturante SDS-PAGE. Controle (RC, FC1, FC2) e Al (RAL, FAL1, FAL2). Coloração com nitrato de prata. MC: Marcador molecular de massa (KDa), RC: Raiz controle, FC1: Folha controle 1, FC2: Folha controle 2, RAL: Raiz Al, FAL1: Folha Al 1, FAL2: Folha Al 2.

9.5.3. Dosagem de proteínas

A Tabela 1 mostra a quantidade de proteínas detectada em raízes e folhas nas duas condições de crescimento (controle e Al). Em geral, raízes e folhas do controle mostraram uma quantidade menor de proteínas comparada ao tratamento com Al. As médias das quantidades de proteína para raiz foram 511,69 ($\pm 23,4$) $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 640,94 ($\pm 32,6$) $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e para folhas foram 1898,89 ($\pm 105,2$) $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 2752,6 ($\pm 137,5$) $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para os respectivos controles e crescidas com Al. Esses valores foram significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Tabela 1. Dosagem de proteínas de amostras equivalentes de raiz e folha de plantas de *Q. grandiflora* submetida a dois tratamentos (presença e ausência de Al) ($P < 0,05$).

Amostras/tratamentos	Concentração de proteínas $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Raiz Controle	511,69
Raiz Alumínio	640,94
Folha Controle 1	1868,81
Folha Controle 2	1928,98
Folha Alumínio 1	2629,23
Folha Alumínio 2	2875,98

9.5.4. Eletroforese Bidimensional

Para melhor visualizar o perfil de proteínas dos tecidos radicular e foliar de *Q. grandiflora* nas diferentes condições de crescimento foram construídos mapas proteômicos (Fig. 4 e 5). Nessa etapa, foi utilizado na isoeletrofocalização um gradiente de pH de 3-10 visando a obtenção de um perfil mais amplo de resposta dessa espécie às diferentes condições de crescimento. O perfil dos *spots* no gel bidimensional para as amostras de folha se mostrou satisfatório para as posteriores análises em espectrometria de massa e identificação dos peptídeos (Fig. 5), mas o perfil das amostras de raiz mostrou *spots* de tamanho muito pequeno e com baixa resolução (Fig. 4), impossibilitando a geração de bons espectros para a identificação. Portanto, para as amostras de raiz será necessário repetir a extração e concentrar a amostra através de liofilização.

9.5.5. Análise das replicatas

Os mapas proteômicos de raízes e folhas dos diferentes tratamentos (controle e

com Al) foram realizados em triplicata e analisados no *software “Image master 2D Platinum 7”*. As réplicas dos perfis bidimensionais apresentaram boa reprodutibilidade, uma vez que o coeficiente de correlação médio da regressão linear entre o volume dos *spots* foi de 0,96 para os dois tratamentos.

Os géis de raiz e folha que tiveram melhor resolução quando comparados com as respectivas réplicas e geraram um maior coeficiente de correlação (0,98 para as duas amostras) foram considerados mapas de referência para análises de expressão diferencial (Figuras 4 e 5). A Tabela 2 contém os dados referentes às comparações entre as réplicas: número de *spots* do mapa de referência e número de *spots* presentes em cada condição de crescimento. Assim, foi observado um alto coeficiente de correlação ($r^{2\ a}$). Os valores obtidos para os tratamentos controle e com Al foram de 0,98/ 0,92 e 0,98 /0,88 para raiz e 0,96 /0,96 e 0,97 /0,95 para folha respectivamente. Corroborando com os valores de correlação, detectaram-se os números de *spots* igualmente presentes nas réplicas de cada tratamento. Esses valores foram de 51 / 48 e 73 / 63 para raiz e 48 / 52 e 70 / 69 para folha nos tratamentos controle e com Al, respectivamente. Esses resultados indicam uma boa reprodutibilidade no experimento.

Tabela 2. Comparação entre as réplicas dos géis bidimensionais de cada condição de crescimento.

Condição de crescimento	Número de <i>spots</i> detectados no mapa de referência	Número de <i>spots</i> presentes nas réplicas	$r^{2\ a}$
Raiz Controle	52	51 / 48	0,98 / 0,92
Raiz Alumínio	71	73 / 63	0,98 / 0,88
Folha Controle	50	48 / 52	0,96 / 0,96
Folha Alumínio	72	70 / 69	0,97 / 0,95

^a Valor de correlação entre o mapa de referência com suas réplicas.

9.5.6. Comparação dos Perfis Bidimensionais

No perfil 2-DE as diferenças entre amostras de raiz e folha dos dois tratamentos foram razoavelmente distinguidas visualmente, e através do *software Image master 2D Platinum 7*, usado na análise dos géis, foi possível calcular o ponto isoelétrico (PI), a massa molecular (MM) aproximados, o volume e o número de *spots* das proteínas de interesse.

Para raízes de *Q. grandiflora*, os mapas dos géis apresentaram *spots* proteicos distribuídos em PIs na faixa de pH entre 4 a 8 e com massas moleculares variando entre 10 e 100 KDa (Fig. 4). Quanto as amostras de folhas dos géis, os mapas apresentaram *spots* distribuídos, principalmente, em PIs variando entre pH de 4 a 7. A contagem do maior número de *spots* mostrou que a maioria das proteínas tinha massa molecular entre 10 e 75 kDa definidos e com boa separação de proteínas, principalmente as abundantes neste tecido, como a ribulose-bisfosfato carboxilase oxigenase (Rubisco) (Fig. 5). A Tabela 3 contém o número de *spots* encontrados em raízes e folhas dos dois tratamentos. O número total de *spots* detectados nos géis nos tratamentos controle e com Al foi de 52 e 71 em raiz (controle e Al) e 50 e 72 em folha (controle e Al). Já os números de *spots* diferenciais foram de 13 e 32 em raiz e 14 e 36 em folha para os tratamentos controle e com Al, respectivamente.

O teste T utilizado para as médias dos volumes dos *spots* de cada um dos mapas de referência mostrou diferenças significativas entre as imagens do tratamento controle e as do tratamento com Al (8 *spots* em raiz e 12 em folha) (Fig. 6, 7 e 8), assim como para a quantificação de proteínas realizada para cada uma das condições (Tabela 1). O maior número de *spots* foi detectado no tratamento com Al, bem como também o maior número de *spots* exclusivos e superexpressos (Tabela 3).

Os *spots* que apresentaram uma diferença de volume de pelo menos 1,5 vezes entre os tratamentos foram assinalados como diferencialmente expressos. As diferenças mais significativas foram observadas para os *spots* de número 1, 2, 24, 30, 32, 37, 38 e 58 em raiz e os de número 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 11, 12, 15, 16, 17 e 29 em folha. Adicionalmente, as variações de volume encontradas entre os tratamentos controle e com Al foram de 1,6 a 2,5 para raiz e 1,2 a 3,1 para folha respectivamente (Fig. 6, 7 e 8). O coeficiente de correlação obtido para a regressão entre os valores de volume e número de *spots* das diferentes condições de tratamento das amostras foi de 0.66 para raiz e 0,54 para folha.

Tabela 3. Números de *spots* encontrados nos mapas proteômicos de plântulas de *Q. grandiflora*.

Amostras	Tratamento	Nºtotal de spots	Spots exclusivos	Spots comuns
Raiz	Controle	52	13	39
Raiz	Alumínio	71	32	39
Folha	Controle	50	14	36
Folha	Alumínio	72	36	36

9.5.7. Espectrometria de massa (MALDI-TOF/TOF)

Os *spots* apresentando expressões diferenciais nas duas condições de crescimento foram selecionados e preparados para a identificação utilizando a técnica de MS/MS. Foram tripsinizadas 45 amostras, sendo 21 de raiz e 24 de folha. Foram analisados 11 *spots* de raiz e 5 de folha, mas apenas os *spots* de folha geraram espectros de boa resolução, e destes, foram identificadas cinco proteínas, sendo uma do tratamento controle (*spot* 29) e 4 do tratamento com Al (*spots* 1, 3, 8 e 9) (Fig. 5). As Figuras 7 e 8 apresentam os valores de PI e MM bem como o volume dos *spots* nas diferentes condições.

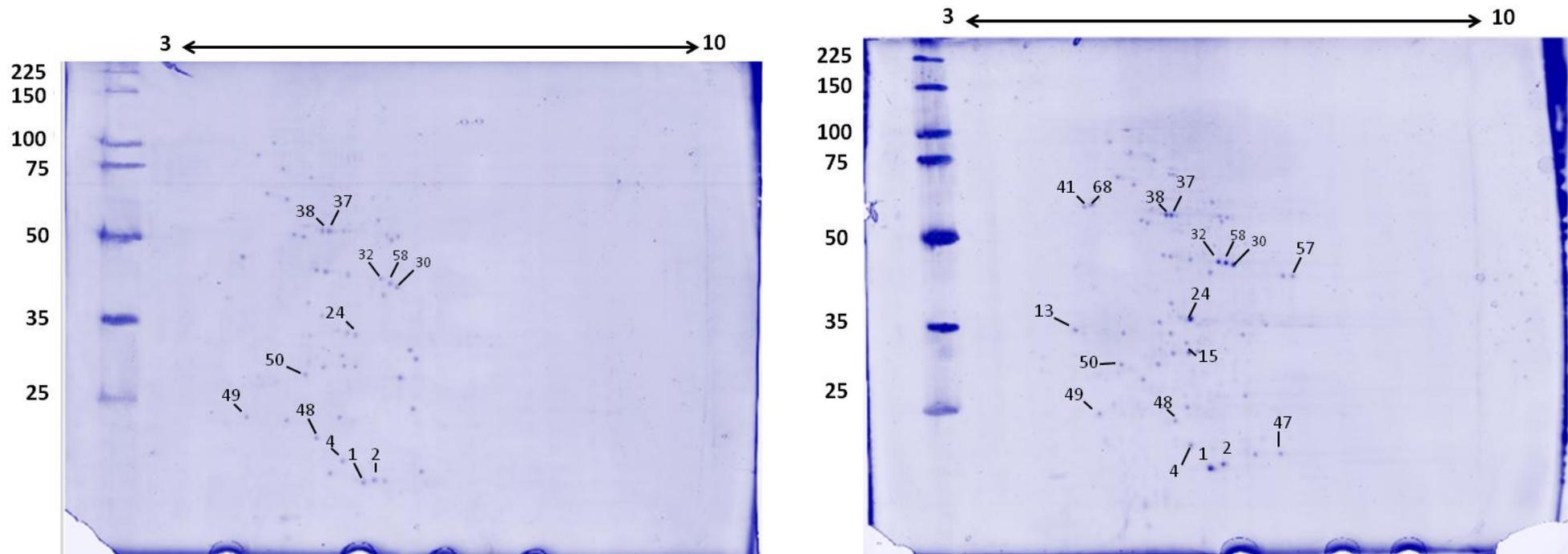


Figura 4. Mapas proteômicos dos géis de referência de raízes de plântulas de *Q. grandiflora* aos 120 dias de crescimento sem Al (controle) à esquerda e com Al à direita. Os números são referentes aos *spots* retirados para análise de espectrometria de massas.

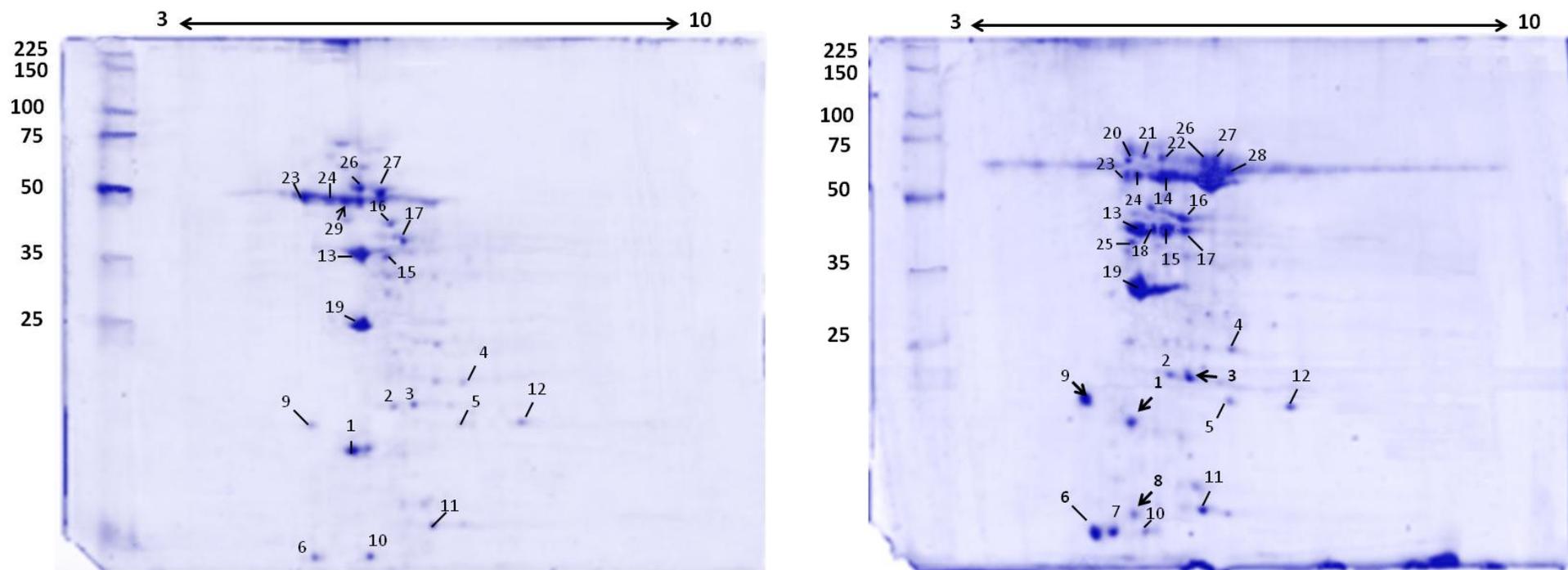


Figura 5. Mapas proteômicos dos géis de referência de folhas de plântulas de *Q. grandiflora* aos 120 dias de crescimento sem Al (controle) à esquerda e com Al à direita. Os números são referentes aos *spots* retirados para análise de espectrometria de massas, sendo que aqueles marcados pela seta representam as proteínas identificadas.

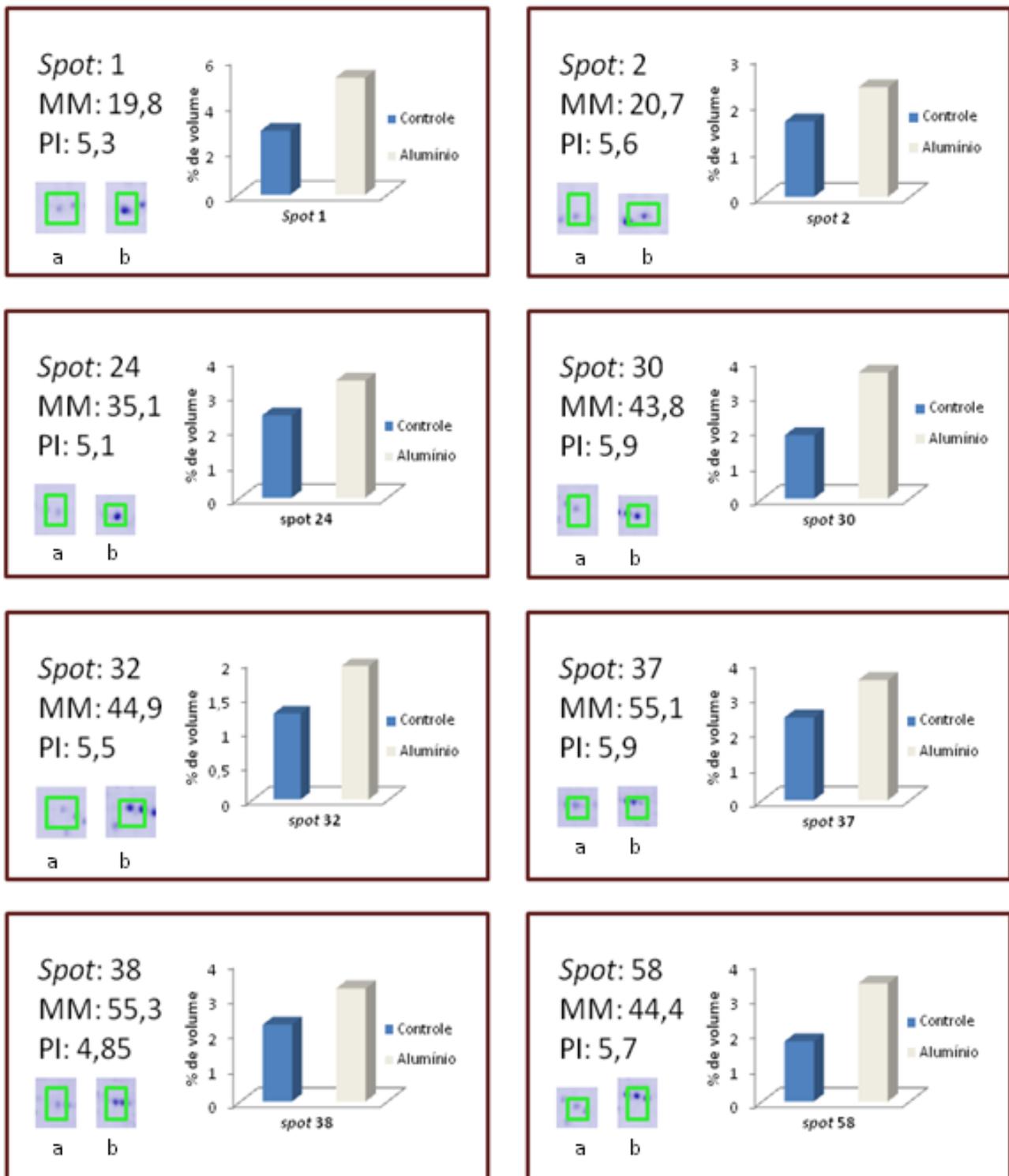


Figura 6. Expressão diferencial dos *spots* de raiz de *Q. grandiflora* que compreende os spots 1, 2, 24, 30, 32, 37, 38 e 58. Em cada gráfico no canto inferior à esquerda a letra a representa a porção do gel com o *spot* do tratamento controle e b, o mesmo *spot* do gel do tratamento com Al. No gráfico o eixo vertical representa a diferença de porcentagem de volume de proteína entre as amostras. O eixo horizontal mostra os tratamentos sem (controle) e com Al.

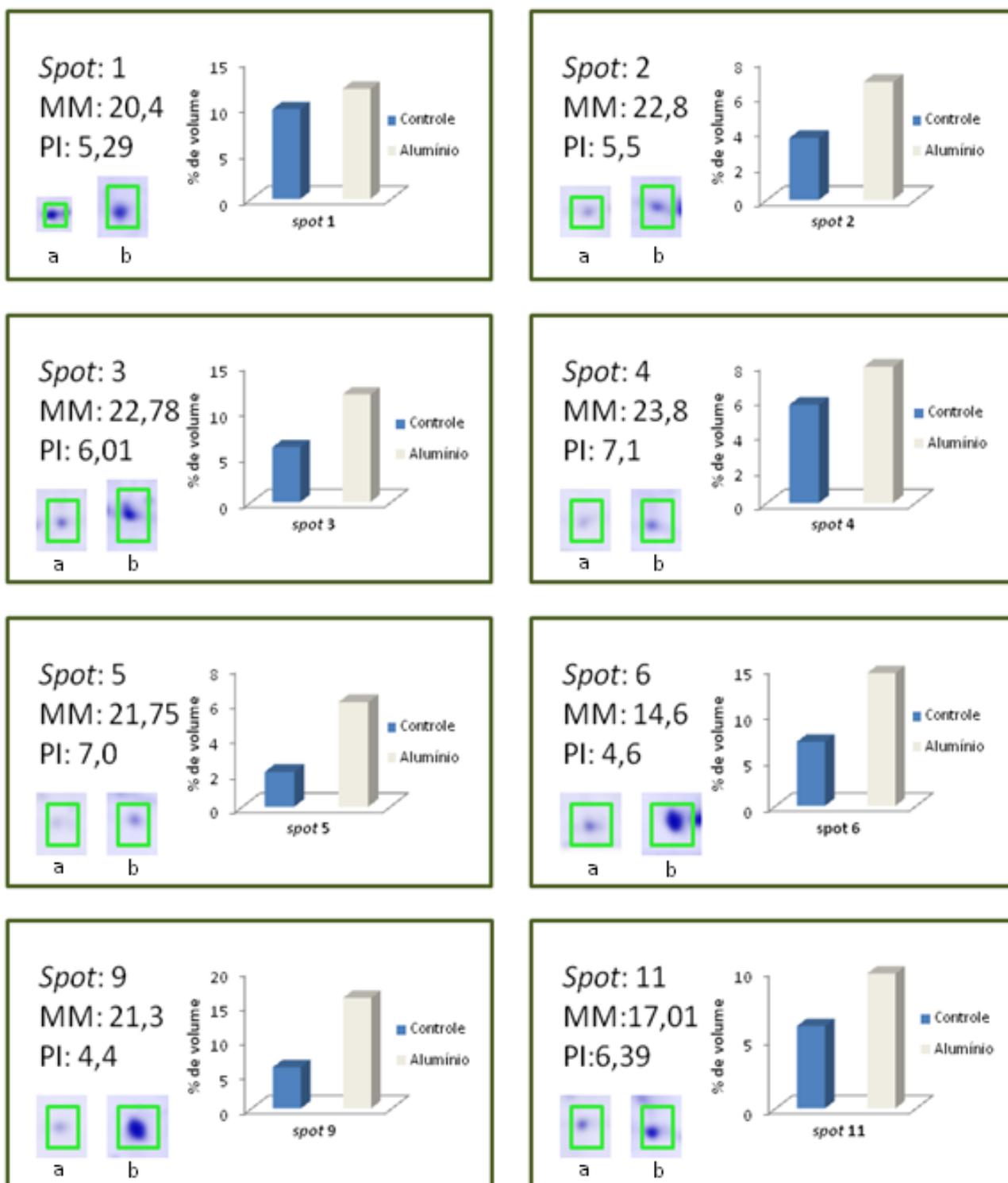


Figura 7. Expressão diferencial dos *spots* de folha de *Q. grandiflora* que compreende os spots 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 e 11. Em cada gráfico no canto inferior à esquerda a letra a representa a porção do gel com o *spot* do tratamento controle e b, o mesmo *spot* do gel do tratamento com Al. No gráfico o eixo vertical representa a diferença de porcentagem de volume de proteína entre as amostras. O eixo horizontal mostra os tratamentos sem (controle) e com Al.

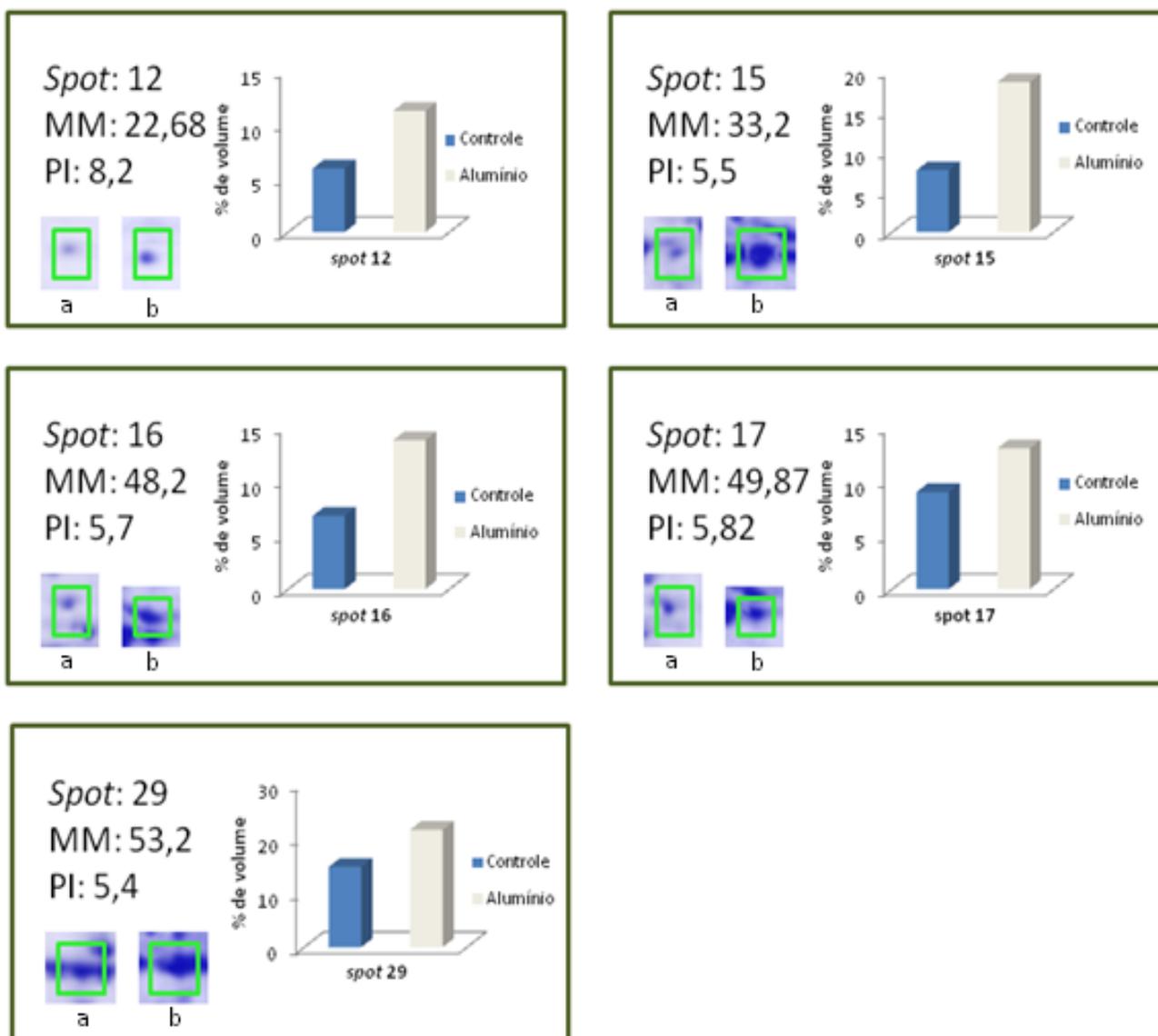


Figura 8. Expressão diferencial dos *spots* de folha de *Q. grandiflora* que compreende os spots 12, 15, 16, 17 e 29. Em cada gráfico no canto inferior à esquerda a letra a representa a porção do gel com o *spot* do tratamento controle e b, o mesmo *spot* do gel do tratamento com Al. No gráfico o eixo vertical representa a diferença de porcentagem de volume de proteína entre as amostras. O eixo horizontal mostra os tratamentos sem (controle) e com Al.

9.5.8. Proteínas identificadas em folha de *Q. grandiflora*

Os *spots* selecionados a partir dos perfis bidimensionais de amostras de folhas de *Q. grandiflora* foram submetidos à técnica de PMF, usando espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF, sem resultados positivos. Devido à falta de sequências de proteínas de *Q. grandiflora* disponíveis em bancos de dados foi necessário usar outra estratégia para a identificação das proteínas correspondentes aos *spots* selecionados.

Assim, os peptídeos provenientes dos digestos trípticos dos *spots* foram sequenciados manualmente através dos programas FlexAnalysis (Bruker Daltonics) e PepSeq (MicroMass Co.). As sequências obtidas em MALDI-TOF/TOF foram submetidas à comparação por homologia com dados de proteínas do banco de dados do NCBI, através do algoritmo Blastp, com o objetivo de identificar as proteínas presentes nas amostras de folha de *Q. grandiflora* nas duas condições de crescimento. Adicionalmente, os espectros de MS foram obtidos automaticamente (FlexControl, Bruker Daltonics).

No total, cinco amostras de folha apresentaram sinais de MS e foram analisadas novamente para obtenção de espectros de MS/MS. As cinco proteínas são apresentadas na Tabela 4. A Figura 7 indica os valores de PI e MM das proteínas de folha de *Q. grandiflora* identificadas até o momento. A maioria das proteínas identificadas é de origem cloroplastídica e participam do metabolismo de energia da planta. As proteínas são: “proteína hipotética”, subunidade beta da ATP sintase, proteína do complexo proteico do tipo III captador de luz do fotossistema II no cloroplasto, Rubisco e peroxirredoxina (Tabela 4).

O *spot* 1 excisado do gel do tratamento com Al foi identificado como uma proteína hipotética (*hypothetical protein*) encontrada nas duas condições descritas e sem diferença de volume significativa entre os dois tratamentos ($P > 0,05$).

O *spot* 29 do tratamento controle foi identificado como uma subunidade beta da ATP sintase (*ATP synthase beta subunit*). Esta proteína foi significativamente mais expressa na presença de Al (Fig. 7).

A proteína correspondente ao *spot* 3 também foi mais expressa na presença de Al (Fig. 7). Esse *spot* foi identificado como uma proteína do complexo proteico do tipo III captador de luz do fotossistema II no cloroplasto (*chloroplast photosystem II light harvesting complex protein type III*). Seguindo o mesmo padrão dos *spots* 1 e 3 o *spot* 9 também foi expresso nos dois tratamentos, contudo, foi significativamente mais expresso nas folhas de plântulas crescidas com Al, e foi identificado como a proteína Rubisco (*ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase*). Essa enzima, chave no processo de assimilação de

CO₂, é abundantemente encontrada em folhas de plantas vasculares.

Outra proteína identificada cuja expressão foi diferenciada nos dois tratamentos foi a correspondente ao *spot* 8 (Fig.7). Essa proteína também foi mais expressa na presença de Al e foi identificada como sendo uma peroxirredoxina (*Peroxiredoxin-2E, chloroplastic type II peroxiredoxin E*).

Tabela 4. Lista de *spots* identificados nos mapas proteômicos de *Q. grandiflora* aos 120 dias de tratamento (sem e com Al).

Proteínas identificadas	Spot (s)	Nº de acesso NCBI	pI e MM (KDa)	Sequência de aminoácidos obtidos	Organismo	Tratamento
Hypothetical protein	1	<u>XP_002442024.1</u>	7,9/91,12	LSLEYEQYK	<i>Sorghum bicolor</i> L. Moench	Alumínio
ATP synthase beta subunit	29	<u>ACV71484.1</u>	5,22/52,7636	AHGGVSVFGGVGER IVGEEHYETAQR FVQAGSEVSALLGR IFNVLGEPVDDLGLVVTR	<i>Cratogeomys</i> <i>formosum</i> (Jack) Dyer	Controle
chloroplast photosystem II light harvesting complex protein type III	3	<u>AEV59647.1</u>	5,02/14,918	GSLPGDYGFDPLGLSDPEGTGGFIEPR	<i>Oxytropis arctobia</i> Bunge.	Alumínio
Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxigenase	9	<u>AAK31173.1</u>	4,78/21,694	IVDSFPGQSIDFFGALR VQLADQYLSNAALGDANQD	<i>Oryza sativa</i> Indica Group. L.	Alumínio
Peroxiredoxin-2E, chloroplastic type II peroxiredoxin E	8	<u>XP_002283652.1</u>	7,67/22,511	HLPGFVEK AIGCELDLSDKPVGLGVR GDEVLLLSDGNGEFTR	<i>Vitis vinifera</i> L.	Alumínio

9.6. DISCUSSÃO

9.6.1. Extração proteica de tecidos vegetais

Como mencionado, ocorreram dificuldades durante o processo de extração de proteínas das amostras de *Q. grandiflora*. A preparação de amostras de material vegetal é reconhecidamente mais difícil devido à rigidez das paredes celulares e ao acúmulo de uma ampla gama de metabólitos secundários tanto no vacúolo central quanto no citoplasma (Rose *et al.*, 2004). Um dos grandes problemas na extração de proteínas vegetais é a interferência de compostos secundários, tais como fenóis, carboidratos e lipídeos bem como a pigmentação da amostra, uma vez que estes podem se ligar às proteínas dificultando a sua remoção no processo de extração e a análise em gel 2DE (Rose *et al.*, 2004). As técnicas de preparo da amostra mais utilizadas são: extração ácida com TCA/acetona e a extração fenólica, mas há variações quanto à metodologia mais adequada para cada um dos tecidos vegetais (Rose *et al.*, 2004). Para as amostras de *Q. grandiflora* utilizadas neste trabalho, o método mais adequado foi a extração ácida.

A extração ácida remove compostos interferentes de uma mistura proteica, que podem afetar negativamente a obtenção de géis reprodutíveis e de alta resolução, cujo efeito aparece após a coloração com nitrato de prata ou Comassie blue sob forma de borrões nos géis (Rose *et al.*, 2004).

É possível que o grande acúmulo de metabólitos secundários como fenóis e mesmo a presença de elevadas quantidades de Al em *Q. grandiflora* podem ter afetado a eficiência dos outros protocolos usados. Além disso, é de se esperar que plantas acumuladoras de Al tenham elevadas concentrações desses compostos visto que fenóis podem se complexar com metais, tais como o Al, por isso, estes compostos começaram a ser relacionados com a tolerância ao Al (Matsumoto *et al.*, 1976; Ofeimanu *et al.*, 2001).

Dificuldades na extração de proteínas são frequentemente discutidas em plantas, como, por exemplo, soja BX10 (*Glicine Max*), arroz (*Oryza sativa* L.), tomate (*Solanum lipocarpum*) e *Ocotea catharinensis* Mez. em função da quantidade de amostra, concentração de proteínas recuperadas e presença de substâncias interferentes como pigmentos e compostos fenólicos (Zhen *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007; Zhou, *et al.*, 2009¹). Nesses trabalhos, também se optou pela extração ácida.

9.6.2. Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas de raízes e folhas de plantas dos dois tratamentos também foi um parâmetro analisado (Tabela 1). As amostras apresentando a mesma quantidade de tecido dos dois órgãos analisados dos diferentes tratamentos apresentaram diferenças significantes na quantidade de proteína. Uma vez que foi utilizada a mesma relação tecido/volume na extração, a maior quantidade de proteínas detectadas em raízes e folhas do tratamento com Al pode ser explicada pela alteração pós-traducional de *Q. grandiflora* nessa condição de crescimento.

Respostas diferenciais têm sido observadas entre cultivares analisados em termos de indução e repressão da expressão proteica na presença de Al, entre eles soja, arroz e tomate (Zhen *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007; Zhou, *et al.*, 2009¹). Esses resultados mostram, em geral, um aumento na quantidade de proteínas após a exposição a esse metal.

9.6.3. Eletroforese unidimensional

Em SDS PAGE 12,5% foram aplicadas amostras de raiz e folha provenientes dos dois tratamentos (controle e com Al). Nesta análise, não foi possível notar claras diferenças visuais entre as diferentes condições analisadas. Isso se deve à complexidade do perfil proteico das amostras e à relativa baixa resolução da eletroforese unidimensional, sendo necessária a análise em perfil bidimensional para se detectar as diferenças qualitativas e quantitativas da amostra (Rose *et al.*, 2004).

9.6.4. Eletroforese bidimensional

A técnica de 2-DE tem demonstrado ser poderosa para identificação de proteínas em misturas complexas, pois através dessa análise as proteínas de interesse poderão ser selecionadas (Medina *et al.*, 2004). Neste trabalho, realizou-se a eletroforese bidimensional de raízes e folhas de *Q. grandiflora* para a análise da resposta destes órgãos ao Al.

As análises das réplicas apresentaram boa reprodutibilidade. Devido aos altos níveis de erros indeterminados associados às análises em 2-DE, é necessária a determinação de coeficientes de variância ou índices de correlação entre as réplicas de amostras vegetais, principalmente entre tecidos como folha, por conterem grande quantidade de pigmentos e outros compostos, que tornam as análises em 2-DE mais passíveis a resultados menos

confiáveis (Asirvatham *et al.*,2002). A correlação entre as réplicas depende de vários fatores experimentais como: a perda de amostra durante a re-hidratação da *strip*, que pode ser causada pela variação do tempo de incubação, pela eficiência de transferência da primeira para a segunda dimensão na 2-DE; pela coloração dos géis, concentração de proteínas nas amostras, assim como pela curva padrão de coloração feita durante a análise da imagem pelo *software* (Berth *et al.*,2007).

Como as réplicas de *Q. grandiflora* apresentaram coeficiente de correlação médio de 0,96, para as amostras de raiz e folha nas diferentes condições de crescimento, houve uma maior garantia de que as diferenças nas análises entre as condições não fossem atribuídas às limitações da técnica de extração, ou de mau procedimento nas etapas de primeira e segunda dimensão, e sim a variações intrínsecas ao próprio mapa proteico entre os tratamentos descritos. Sendo assim, a simplicidade do protocolo de extração utilizada em *Q. grandiflora*, bem como a utilização dos mesmos procedimentos na focalização isoeétrica e segunda dimensão para as repetições favoreceu a reprodutibilidade da separação de proteínas.

9.6.5. Proteínas identificadas e comparação entre os níveis de expressão

A técnica de identificação por PMF usando espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF foi utilizada para os *spots* de *Q. grandiflora*, sem resultados positivos. Como o PMF é baseado nos valores exatos das massas de peptídeos, é indispensável que a sequência da proteína ou de seu gene esteja disponibilizada em bancos de dados. Essa técnica não foi bem sucedida devido à inexistência de sequências proteicas ou gênicas de *Q. grandiflora*, ou mesmo de algum espécimen da mesma família (Vochysiaceae) nos bancos de dados disponíveis. Isso inviabilizou as análises por PMF. Embora esse resultado fosse esperado, existem relatos de casos de identificação por PMF de proteínas cuja sequência não estava depositada em bancos de dados, como visto em *Trypanosoma cruzi*. Isto ocorreu devido à presença de sequências altamente homólogas de outros organismos (Paba *et al.*,2004).

Em *Q. grandiflora* o Al induz um aumento da expressão de proteínas do metabolismo energético

Estas proteínas são as mais abundantes em amostras de tecido vegetal, com padrão de expressão variável (Plomion *et al.*, 2000). Como esperado, nas análises proteômicas de folha de *Q. grandiflora* as proteínas envolvidas no metabolismo energético, aparecem com

grande evidência, em especial a Ribulose- 1,5-bifosfatase carboxilase/oxygenase (*spot 9*), que teve seu nível de expressão sensivelmente aumentado no tratamento com Al. Como esta é uma enzima de alta massa molecular, em análises proteômicas encontram-se normalmente, apenas subunidades (Agrawai, 2009). Sua função é catalisar a síntese de fosfoglicerato a partir do dióxido de carbono atmosférico, a primeira reação do ciclo de Calvin realizado pelas plantas (Pascual, *et al.*, 2008).

Kandasamy e colaboradores (2009) observaram em análises proteômicas o aumento da expressão desta enzima e de outras proteínas relacionadas à fotossíntese em arroz (*Oriza sativa*) na presença de uma rizobactéria promotora de crescimento (*Pseudomonas fluorescens*). Este fato foi interpretado como um aumento do potencial fotossintético dessa espécie induzido pela presença das rizobactérias (Kandasamy *et al.*, 2009).

A maior expressão da Rubisco parece ocorrer em função da maior atividade fotossintética de folhas de *Q. grandiflora* na presença de Al e, conseqüentemente, maior produção de energia pelas plântulas nesse meio de crescimento, pois nessa condição as plantas apresentaram um melhor desenvolvimento das folhas comparadas ao tratamento controle. Como esta enzima faz parte da via metabólica da fotossíntese (Boutry & Chua, 1985; Ellis, 2010), parece que o Al influenciou positivamente nesse mecanismo. Esse estímulo foi percebido também visualmente, uma vez que as folhas submetidas a essa condição de crescimento apresentaram maiores teores de clorofila mostrando-se sadias e verde-escuras, já no tratamento controle, as folhas apresentavam-se em sua grande maioria cloróticas.

Outras proteínas envolvidas na fotossíntese provenientes do cloroplasto foram encontradas em folha de *Q. grandiflora*, como uma proteína do complexo protéico do tipo III captador de luz do fotossistema II (*spot 3*). Esse complexo pertence a uma das mais diversificadas superfamílias de proteínas encontradas em quase todas as plantas. Estas proteínas regulam a síntese e o metabolismo de compostos primários e secundários na via fotossintética (Cheng, 2010). São pigmentos protéicos envolvidos na captação de luz e constituem mais de 40% das proteínas fotossintéticas de membrana e cerca de metade dos pigmentos totais dos tilacóides (Mohanty *et al.*, 2002). Na fotossíntese, além das funções de captação de energia solar, participa da fotoproteção, mantendo um empilhamento em “grana”, realizando a segregação lateral dos complexos na membrana tilacóide e ajuste da distribuição de energia de excitação (Horton *et al.*, 1996). Esse complexo também está envolvido na resposta das plantas a mudanças de condições ambientais, particularmente sob temperaturas elevadas e iluminação forte (Horton *et al.*, 1996) e em processos regulatórios, pois mantêm o

equilíbrio entre a dissipação e a utilização da energia luminosa para minimizar a geração de moléculas oxidantes, protegendo assim a planta contra dano oxidativo e aumentando a atividade de crescimento em plantas tolerantes a essas condições (Li *et al.*, 2000).

Esse complexo apresentou superexpressão em folhas do tratamento com Al comparado ao controle (Fig. 7). Provavelmente *Q. grandiflora* na presença de Al é estimulada a aumentar a atividade desse complexo buscando a proteção contra o dano oxidativo e a tolerância a esse metal. Além disso, a presença do Al estimulou o crescimento dessa espécie e, concomitantemente a formação de folhas mais expandidas e verde escuras, possibilitando a maior captação de luz nessa condição de crescimento. Ali e Komatsu (2006) relatam que esse complexo está envolvido em mecanismos de tolerância e que a superexpressão do mesmo poderia potencialmente aumentar a atividade de crescimento determinada pela tolerância ao estresse ambiental provocado pela seca em arroz-tolerante (*Oryza sativa* L.- Zhonghua 8), salientando que essa excitação pode ser regulada para evitar a inibição da fotossíntese como mecanismo de “*backup*”.

Além da enzima rubisco, também foi identificada uma subunidade beta da enzima ATP Sintase (*spot 29*) que faz parte do complexo da ATP Sintase. Esse complexo é encontrado na membrana de mitocôndrias e cloroplastos e se constitui uma proteína periférica que produz ATP a partir de ADP, na presença de um gradiente de prótons através da membrana. A ATP Sintase realiza a síntese e hidrólise de ATP acoplada a um transportador de prótons durante a fosforilação oxidativa em mitocôndrias (Zhang *et al.*, 2004). Além disso, essa enzima contém cerca de 5 subunidades distribuídas em dois grupos. “F0 e F1”. F0 é formada de subunidades “a, b e c”. A subunidade “c” possui um anel com 10 a 14 peptídeos. Esses polipeptídeos se encontram inseridos na membrana tilacoidal e formam no seu interior um canal protônico, através do qual ocorre o fluxo de prótons do lúmen até o estroma. F1 é constituída de 5 cadeias polipeptídicas, onde a principal para catálise de ATP é a subunidade beta (Zhang *et al.*, 2004). As subunidades beta possuem três tipos de conformações (L, T e O) que dependem da rotação da subunidade γ . A conformação “L” permite a ligação do ADP ao Pi, e portanto, a síntese do ATP, e a “O” participa da liberação do ATP (Fig. 9) (Zhang *et al.*, 2004). Além de atuar na produção de energia, a ATP sintase subunidade beta é uma molécula sinalizadora necessária para o crescimento de plantas podendo ter sua expressão aumentada em resposta a estímulos externos (bióticos/abióticos) (Chivasa *et al.*, 2011).

A liberação moléculas de ATP nas células vegetais (via simplasto/apoplasto) promovem a ativação da expressão de vários genes em plantas (Jeter *et al.*, 2004), assim como mudanças na própria abundância da proteína ATP sintase beta subunidade (Chivasa *et al.*,

2005 , Chivasa *et al.*, 2010, 2012), o que pode causar alterações de sinalização do ATP na fisiologia das plantas. As moléculas de ATP liberadas em plantas podem regular o crescimento da planta (Reichler *et al.*, 2009 , Clark *et al.*, 2010), e atuam em vários outros processos como as respostas de gravitropismo (Tang *et al.*, 2003), resistência xenobiótica (Thomas *et al.*, 1999), interações planta-simbióticos (McAlvin & Stacey 2005), bem como interações planta-patógeno (Chivasa *et al.*, 2009). No entanto, o mecanismo pelo qual a ATP sintase subunidade beta regula estes processos permanece obscuro, principalmente porque os sensores de sinal de ATP extracelulares e genes de regulação e proteínas associados a este processo ainda não foram totalmente identificados (Chivasa *et al.*, 2011).

A superexpressão dessa enzima em plântulas de *Q. grandiflora* em resposta ao Al pode ser decorrente da maior produção de energia para o crescimento dessa espécie, visto que foi observada a maior produção de biomassa, bem como o melhor desenvolvimento tanto da parte aérea quanto da parte radicular dessa espécie na presença desse metal. Além disso, é possível que essa enzima atue no mecanismo adaptativo de *Q. grandiflora* que possibilita um aumento na taxa de crescimento nessa condição. Esse resultado é consistente com a superexpressão de outras proteínas envolvidas no metabolismo da fotossíntese em *Q. grandiflora* na presença de Al citadas anteriormente.

Adicionalmente, essa enzima também pode ter sido superexpressa em *Q. grandiflora* na presença de Al como uma resposta de tolerância. Alguns estudos trazem que a maior expressão dessa enzima também está associada ao mecanismo de tolerância, como observado em arroz (*Oriza sativa* L.) sob exposição ao cobre (Rakwal, 1999) e em *Suaeda salsa* L., em resposta à tolerância ao estresse salino (Li et al., 2011).

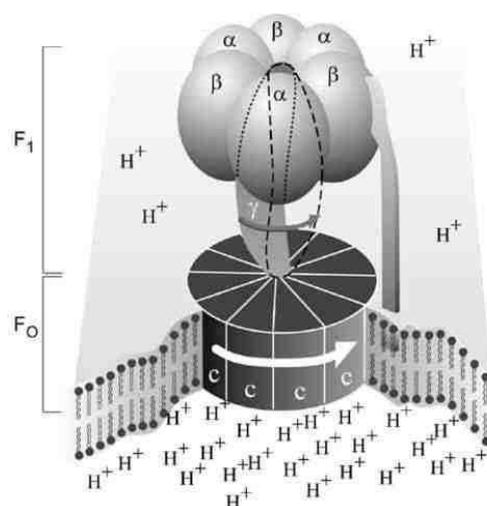


Figura 9. Estrutura tridimensional da ATPsintase (Fonte: www.ufv.br).

Proteína do metabolismo antioxidante

Uma peroxiredoxina (*Peroxiredoxin-2E, chloroplastic type II peroxiredoxin E*) também foi encontrada em folha do tratamento com Al (*spot 8*). Constituem elementos centrais da rede reguladora de tiol-dissulfureto de células vegetais. Esta classe de proteínas já foi descrita em humanos, a PRX5 (peroxirredoxina 5), uma peroxidase homodimérica TRX (tioredoxina), amplamente expressa em tecidos e encontrada em mitocôndrias, peroxissomos e citosol de células desempenhando um papel importante na antioxidação (Dietz *et al.*, 2006).

Em geral, as peroxiredoxinas são peroxidases que catalisam a redução do peróxido de hidrogênio, assim como de hidroperóxidos orgânicos e peroxinitrito. Estão divididas em três classes: peroxirredoxinas 2-cisteína típicas; peroxirredoxinas 2-cisteína atípicas; e peroxirredoxinas 1-cisteína. Todas elas têm o mesmo mecanismo catalítico básico de antioxidação, no qual existe um resíduo de cisteína com atividade de oxirredução - o resíduo de cistina peroxidático no centro ativo da enzima - que é oxidado pelo substrato peróxido, resultando num ácido sulfênico. A oxidação excessiva deste resíduo de cisteína em peroxirredoxinas desativa estas enzimas; no entanto, isto pode ser revertido através da ação de sulfirredoxinas (Chae *et al.*, 1993; Lim *et al.*, 1998).

Em plantas, as espécies reativas do oxigênio (ROS), tais como o peróxido de hidrogênio são formadas principalmente nos cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomos e apoplasto durante a fotossíntese e respiração (Río *et al.*, 2002; Mittler, 2002; Foyer e Noctor, 2005). As células vegetais também produzem espécies de nitrogênio reativo, tais como óxido nítrico (NO), S-nitrosoglutathione (GSNO), e peroxinitrito, sob determinadas condições fisiológicas (Lamattina *et al.*, 2003; Valderrama *et al.*, 2007; Neill. *et al.*, 2008). A superprodução de todos os tipos de espécies reativas do oxigênio é potencialmente prejudicial, mas, concentrações controladas, cumprem funções essenciais ao desenvolvimento das plantas, como a resposta de defesa e a sinalização (Foyer e Noctor, 2005; Besson-Bard *et al.*, 2008.). Assim, defesas antioxidantes estão ligadas a regulação celular através de uma rede complexa envolvendo elementos de entrada, transmissores e proteínas sensoriais, tais como essas enzimas (Besson-Bard *et al.*, 2008).

A localização celular exclusiva da peroxiredoxina em *Q. grandiflora* no tratamento com Al sugere que esta pode ter um papel antioxidante em organelas na presença desse metal, pois essas estruturas subcelulares são importantes fontes de espécies reativas do oxigênio, além dessas proteínas possuem um papel no controle da transdução de sinal. A produção de peroxiredoxinas está ligada à resposta de defesa de plantas em um mecanismo

induzido denominado de resistência sistêmica adquirida (RSA) (Horta, 2009). Provavelmente a superexpressão dessas proteínas esteja relacionada à tolerância ao Al, visto que o mesmo quando não imobilizado dentro do citosol pode provocar a oxidação de biomoléculas (Kochian, 2004). Além disso, como se relatou um possível aumento da taxa de fotossíntese de *Q. grandiflora* na presença de Al, supõe-se que a produção de espécies reativas ao oxigênio seja maior, estimulando a superexpressão dessas proteínas.

Shoresh e Harman (2008) demonstraram que alterações no padrão de crescimento, muitas vezes ocasionadas por estresse abiótico são acompanhadas pelo aumento na expressão de proteínas envolvidas em rotas de defesa antioxidante. Em soja Al-tolerante, foi demonstrado o Al promove o aumento da expressão de genes envolvidos no metabolismo da fotossíntese, assim como de proteínas de rotas de defesa (Zhen *et al.*, 2007), indicando que provavelmente esse metal pode induzir este mesmo tipo de resposta em *Q. grandiflora*.

Outros estudos trazem que essas proteínas podem estar envolvidas em rotas metabólicas de defesa antioxidante em resposta a fenômenos abióticos causados por uma infinidade de fatores, tais como diferentes níveis de temperatura, luz e gases (CO² e O², O³) (Agrawal, 2009; Zhou *et al.*, 2009¹, 2009²; Zhen *et al.*, 2007). Um aumento na expressão dessas proteínas desencadeia o mecanismo de “estabilização por homeostase” (Lee *et al.*, 2007). Foi observado, por exemplo, em folhas de arroz (*Oryza sativa* L.) que altos níveis de cobre e cádmio desencadeiam modificações pós traducionais aumentando a síntese de peroxiredoxinas em folhas dessa espécie (Agrawal, 2009).

Além disso, a maior atividade e produção da ATPsintase subunidade beta em *Q. grandiflora* no tratamento com Al como um mecanismo de aumento da atividade metabólica na presença desse metal bem como a tolerância ao Al também pôde provavelmente desencadear a maior expressão de peroxiredoxinas. Concomitantemente, Chivasa e colaboradores (2011) assim como Canção e colaboradores (2006) demonstraram que, o aumento da atividade da ATP sintase em *A. thaliana* e *Nicotiana tabacum* desencadeou uma onda citosólica de íons Ca²⁺, aumentando consequentemente os níveis de óxido nítrico e espécies reativas ao oxigênio; e que alterando esses níveis, houve o desencadeamento de ativação de genes que sintetizam proteínas antioxidantes, como por exemplo, as peroxiredoxinas.

9.7. CONCLUSÕES

- Mapas proteômicos das diferentes condições de crescimento de *Q. grandiflora* foram construídos com sucesso e permitiram a visualização de algumas diferenças de expressão;
- Um total de cinco proteínas foram identificadas e, por se tratar de um trabalho pioneiro em uma planta acumuladora do Cerrado, nenhuma havia sido encontrada em outros estudos;
- Uma maior concentração de proteínas foi detectada no tratamento com Al, sugerindo uma possível modulação desse metal na expressão de proteínas em *Q. grandiflora*;
- A resposta proteica de *Q. grandiflora* variou de acordo com a sua condição de crescimento, evidenciando o arsenal genético que esta espécie acumuladora tem para poder obter energia de diversas fontes, inclusive na presença do Al;
- Em resumo, os resultados obtidos neste trabalho e suas próximas etapas abrem perspectivas para a continuidade e criação de novas linhas de pesquisa em plantas acumuladoras de Al a nível molecular. Estas linhas se basearão principalmente no emprego de ferramentas proteômicas e análise da expressão gênica, visando a identificação de marcadores moleculares relacionados à tolerância ao Al.

9.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass-spectrometry-based proteomics. *Rev. Nature.* v.422. p. 198-207, 2003.

AGRAWAL, G. K.; YONEKURA, M; IWAHASHI, H.; RAKWAL, R. System, trends and perspectives of proteomics in dicot plants. Part I: Technologies in proteome establishment. *Journal of chromatography.* p. 109-123, 2005.

AGRAWAL, G. K.; JWA, N. S.; RAKWAL, R. Rice proteomics: Ending phase I and the beginning of phase II. *journal Proteomics.* v. 9. p. 935–963, 2009.

ALI, G. M. KOMATSU, S. Proteomic analysis of Rice leaf sheath during drought stress. *Journal Proteomics.* v. 5. p. 396-403, 2006.

ANOOP, V.M.; BASU, U.; MCCAMMON, M.T.; MCALISTER-HENN, L. TAYLOR, G. J. Modulation of Citrate Metabolism Alters Aluminum Tolerance in Yeast and Transgenic Canola Overexpressing a Mitochondrial Citrate Synthase. *journal Plant Physiology.* v. 132, p. 2205–2217, 2003.

ASIRVATHAM, V. S.; WATSON. B. S.; SUMNER, L.W. Analytical and biological variances associated with proteomic studies of *Medicago truncatula* by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal Proteomics.* v. 8. p. 960-968, 2002.

BERTH, M.; MOSER, F. M.; KOLBE, M.; BERNHARDT, J. The state of the art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images. *Journal Applied Microbiology and Biotechnology.* v. 76. p.1223-1243, 2007.

BESSON-BARD A, PUGIN A, WENDEHENNE D. New insights into nitric oxide signaling in plants. *journal Plant Biology.* v. 59. p. 21–39, 2008.

BOUTRY M., CHUA N.-H. A nuclear gene encoding the beta subunit of the mitochondrial ATP synthase in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Journal EMBO,* v. 12. p. 2159–2165, 1985.

CANDIANO G, BRUSCHI M, MUSANTE L, SANTUCCI L, GHIGGERI GM, CARNEMOLLA B, ORECCHIA P, ZARDI L, RIGHETTI PG. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Journal Electrophoresis*. v. 25. n.9. p.1327-1333, 2004.

CHAE, H. Z. KIM, I. H. RHEE, S. G. Cloning, sequencing and mutation of thiol-specific antioxidant gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. v. 268. p. 16815- 16821, 1993.

CHENERY, E.M. Aluminium in the plant world. Part.I. *Kew bulletin*, v.2, p.173-183, 1948.

CHENG, Y.C. Theoretical Study of Coherence Assisted Excitation Energy Transfer in Photosynthetic Light Harvesting. *Ann. journal Phys. Chem*. 2010, v. 60. p. 241, 2010.

CHIVASA, S.; NDIMBA, B. K.; SIMON, W.J.; LINDSEY, K.; SLABAS, A. R. Extracellular ATP functions as an endogenous external metabolite regulating plant cell viability. *Journal Plant Cell*. v. 17. n.11. p. 3019-3034, 2005.

CHIVASA S., SIMON W. J., MURPHY A. M., LINDSEY K., CARR J. P., SLABAS A. R. The effects of extracellular adenosine 5'-triphosphate on the tobacco proteome. *Journal Proteomics*. v. 10. p. 235–244, 2010.

CHIVASA, S.; TOMÉ, D. F. A.; HAMILTON, J. M.; SLABAS, A.R. Proteomic Analysis of Extracellular ATP-Regulated Proteins Identifies ATP Synthase β -Subunit as a Novel Plant Cell Death Regulator. *Journal Mol Cell Proteomics*. v. 10. n.3, 2011.

CHIVASA. S; ANTONI R. SLABAS, A. R. Plant extracellular ATP signalling: new insight from proteomics. *Journal Mol. Bio Syst.*, v.8. p. 445-452, 2012.

CLARK G., TORRES J., FINLAYSON S., GUAN X., HANDLEY C., LEE J., KAYS J. E., CHEN Z. J., Roux S. J. Apyrase (nucleoside triphosphate-diphosphohydrolase) and extracellular nucleotides regulate cotton fibre elongation in cultured ovules. *Plant Physiol*. v. 152. p. 1073–1083, 2010.

CUNHA, R. B.; CASTRO, M. S.; FONTES, W. Espectrometria de massa de proteínas- O papel da espectrometria de massa na era pós genômica. Rev. Biotecnologia, ciência e desenvolvimento. n. 36, 2006.

DELHAIZE E, HEBB DM, RYAN PR. 2001. Expression of a *Pseudomonas aeruginosa* citrate synthase gene in tobacco is not associated with either enhanced citrate accumulation or efflux. Journal Plant Physiol. v. 67. p. 125-2059, 2001.

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, p. 2255–2262, 2007.

DIETZ K-J, JACOBS S, OELZE M-L, LAXA M, TOGNETTI V, DE MIRANDA SMN, BAIER M, FINKEMEIER I The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. Journal Exp. Bot. v. 57. p. 1697-1709, 2006.

DURESSA, D.; SOLIMAN, K.; CHEN, D. Identification of Aluminum Responsive Genes in Al-Tolerant Soybean Line PI 416937. International Journal of Plant Genomics. 13 p., 2010.

DURESSA, D.; SOLIMAN, K.; TAYLOR, R.; ZACHARY SENWO, Z. Proteomic Analysis of Soybean Roots under Aluminum Stress. Journal of Plant Genomics. v. 12, 2011.

ELLIS J.R. The chemical reactions catalyzed by RuBisCO are described in the online Biochemistry textbook by Stryer et al. "Tackling unintelligent design". journal Nature. v. 463. n. 7278. p.164–165, 2010.

FOYER, C .H.; NOCTOR,G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. journal Plant Cell Environ v. 28. p.1056–1071, 2005.

GOODLAND, R. A physiognomic analysis of the Cerrado vegetation of central Brazil. Journal Ecol. v. 59. p.411-419, 1971.

GOODLAND, R. Oligotrófismo e alumínio no Cerrado. In FERRI, M.G (ed), III Simpósio sobre o cerrado. p. 44- 60. EDUSP, São Paulo,1971.

GOODLAND, R. POLLARD, R. The Brazilian Cerrado vegetation, a fertility gradient. *Journal Ecol.* v.61. p.219-224, 1973.

GONÇALVES, J. F. C.; PEIXOTO, P. H. P.; CAMBRAIA, J. TOXICIDADE DO ALUMÍNIO EM PLANTAS. *Rev.Universa.* v. 8, n. 1, p. 243-258, 2000.

GRANIER, F. Extraction of plant proteins for two-dimensional electrophoresis. *journal Eletrophoresis.* v. 9. n. 11. p. 712-718, 1988.

HANDFORD, P. A. "Fibrillin-1, a calcium binding protein of extracellular matrix". *Rev. Biochim. Biophys. Acta* v. 2. n. 3. p. 84-90, 2001.

HARIDASAN, M. Aluminium accumulation by some Cerrado native species of central Brazil. *Journal Plant and soil,* v.65, p.265-273, 1982.

HARIDASAN, M. Distribution and mineral nutrition of aluminium-accumulating species in different plant communities of the cerrado region of central Brazil. *In* San Jos, J.J. Montes, R. (eds.) *La Capacidad Bioproductiva de Sabanas.* I.V.I.C., Caracas,Venezuela. 545p. p. 309-348, 1987.

HARIDASAN, M. Performance of *Miconia albicans* (Sw.) Triana, an aluminium accumulating species in acidic and calcareous soils. *Commun. Soil Sci. Journal Plant Anal.* v. 19. p. 1091-1103, 1988.

HARIDASAN, M. Alumínio é um elemento tóxico para as plantas nativas do cerrado? *In:* Prado, CHBA; Casali, CA. *Fisiologia Vegetal: práticas em relações hídricas, fotossíntese e nutrição mineral.* Barueri, Editora Manole. v. 85, n. 204. p. 1553-1559, 2008.

HARIDASAN, M. Nutritional adaptations of native plants of the cerrado biome in acid soils. *Review: Brazilian Journal of Plant Physiology.* 2008.

HORTON, P., RUBAN, A.V., AND WALTERS, R.G. Regulation of light harvesting in green plants. *Annu. Journal Plant Mol. Biol.* v.47. p. 655-684, 1996.

HUTCHINSON, D. E. The biochemistry of aluminium and certain related elements. Quarterly Reviews of Biology. v.18. p.1-29, 123-153, 242-262, 331-363, 1943.

JETER C. R., TANG W., HENAFF E., BUTTERFIELD T., ROUX S. J. Evidence of a novel cell signaling role for extracellular adenosine triphosphates and diphosphates in Arabidopsis. Journal Plant Cell 16, 2652–2664, 2004.

JONSSON, A. P.. Mass spectrometry for protein and peptide characterization. Journal of Cellular and Molecular Life Sciences . v. 58. p. 868-884, 2002.

KANDASAMY, S.; LOGANATHAN, K.; MUTHURAJ. R.; DURAISAMY, S.; SEETHARAMAN, S.; THIRUVENGADAM, R.; PONNUSAMY, B.; RAMASAMY, S. Understanding the molecular basis of plant growth promotional effect of *Pseudomonas fluorescens* on rice through protein profiling. Journal Proteome Science. v. 7. n. 7, 2009.

KOCHIAN, L.V. Cellular mechanism of aluminum toxicity and resistance in plants. Annual Review Plant Physiology. Journal Plant Molecular Biology. v.48, 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. Journal Plant Biol. v. 55. p.459–493, 2004.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Journal Nature. v. 227. p.680, 1970.

LAMATTINA, L.; GARCÍA-MATA, C.; GRAZIANO, M.; PAGNUSSAT, G. Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. Annu Journal Plant Biol. vol. 54. p. 109–136, 2003.

LEE W, CHOI, K.S.; RIDDELL, J.; Ip, C., GHOSH, D.; PARK, J. H.; PARK, Y. M. Human peroxiredoxin 1 and 2 are not duplicate proteins: the unique presence of CYS83 in Prx1 underscores the structural and functional differences between Prx1 and Prx2. Journal Biol. Chem. v. 282. p. 22011-22022, 2007.

- LI X-P, BJÖRKMAN O, SHIH C, GROSSMAN AR, ROSENQUIST M, JANSSON S, NIYOGI KK. A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Journal Nature*. v. 403. p. 391–395, 2000
- LI, W.; ZHANG, C.; LU, Q.; WEN, X.; LU, C. The combined effect of salt stress and heat shock on proteome profiling in *Suaeda salsa*. *Journal Plant Physiology*. v. 168. p. 1743–1752, 2011.
- LIM, M. J.; CHAE, H. Z. RHEE, S. G. YU, D. Y.; LEE, K-K, YEOM, Y. I. The type II peroxiredoxin gene family of the mouse: molecular structure, expression and evolution. *Rev. Gene*. v. 216. p. 197-205, 1998.
- LOPES, A. J.; COX, F. R. A survey of the fertility status of surface soils under Cerrado vegetation of Brazil. *Soil Sci. American Journal*. v. 41. p. 752-757, 1977.
- MA J.F.; ZHENG, S. J.; MATSUMOTO, H.; HIRADATE, S. Detoxifying aluminum with buckwheat. *Journal Nature*. v. 70. p. 390-569, 1997.
- MA, J .F.; RYAN, P. R.; DELHAIZE, E. Aluminum tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *TRENDS in Plant Science*, Oxford, v. 6, n. 6, p. 273- 278, 2001.
- MARIANO, E. D.; JORGE, R. A.; KELTJENS, W. G.; MENOSSI, M. Metabolism and root exudation of organic acid anions under aluminium stress. *Braz. Journal Plant Physiol*. v.17. p.157-172, 2005.
- MCALVIN C. B. M., STACEY, G. Transgenic expression of the soybean apyrase in *Lotus japonicas* enhances nodulation. *Journal Plant Physiology*. 137, 1456–1462, 2005.
- MATSUMOTO H. Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. *International Review of Cytology*. v. 200. p. 1-47, 2000.
- MEDINA, M.L., KIERNAN U.A., FRANCISCO W.A. Proteomic analysis of rutin-induced secreted proteins from *Aspergillus flavus*. *Journal Fungal Genetics and Biology*. v. 41. p. 327-335, 2004.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Journal Trends Plant Sci* v. 7. p. 405–410, 2002.

MONHANTY, P. VANI, B.; PRAKASH, S. Elevated temperature treatment induced alteration in thylakoid membrane organization and energy distribution between the two photosystems in *Pisum sativum*. *Z. Naturforsch.* p.836-842, 2002

MORAES, F. M. S. Análise proteômica da embriogênese somática e da aquisição de competência embriogênica de *Ocotea Catharinensis* Mez (Lauraceae). Dissertação de Mestrado, Brasília, DF, Universidade de Brasília, 2006.

NATERA, S. H. A., GUERREIRO, N. AND DJORDJEVIC, N. A. Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for the investigation of symbiosis. *Journal Mol. Plant-Microbe Interact.* v.13, p.995–1009, 2000.

NEILL, S.; BARROS, R.; BRIGHT, J.; DESIKAN, R.; HANCOCK J.; HARRISON, J.; MORRIS, P.; RIBEIRO, D.; WILSON, I. Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *Journal Exp. Bot.* v. 59. p.165–176, 2008.

OLIVEIRA, I. P.; COSTA, K. A. P.; SANTOS, K. J. G.; MOREIRA, F. P. CONSIDERAÇÕES sobre a acidez dos solos de Cerrado. *Rev. Eletrônica Faculdade Montes Belos, Goiás*, v.1, n.1, p. 01-12, 2005.

OFEI-MANU, P.; WAGATSUMA, T.; ISHIKAWA, S.; TAWARAYA, K. The plasma membrane strength of the root-tip cells and root phenolic compounds are correlated with Al tolerance in several common woody plants. *Journal Soil Science Plant Nutrition, Tokyo*, v.47, n.2, p.359-375, 2001.

PABA, J.; SANTANA, J. M.; TEIXEIRA, A. R. L.; FONTES, W.; SOUZA, M.V.; RICART, C. A. O. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi*. *Journal Proteomics.* v. 4, p. 1052-1059, 2004.

PARK, K. O. Proteomic studies in plants. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology.*

v.37. p. 133-138, 2004.

PASCUAL, M. B.; JING, Z. P.; KIRBY, E. G.; CANOVAS, F. M.; GALLARDO, F. Response of transgenic poplar overexpressing cytosolic glutamine synthetase to phosphinothricin. *Journal Phytochemistry*. v. 69. n. 2. p.382-389, 2008.

PEREIRA, J. L. Proteoma comparativo de xilema de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus globulus*. Dissertação de Mestrado, Brasília, DF, Universidade Católica de Brasília, 2007.

PLOMION, C.; PIONNEAU, C.; BRACH, J.; COSTA, P.; BAILLERES, H. Compression Wood- Responsive Proteins in Developing Xylem of Maritime Pine (*Pinus pinaster* Ait.). *Journal Plant Physiology*. v.123. p. 959-969, 2000.

RABILLOUD, T. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old fashioned, but still climbs up the mountains. *Journal Proteomics*. v. 2. p. 3-10, 2002.

RAKWAL, R.; AGRAWAL, G. K.; YONEKURA, M. Separation of proteins from stressed rice (*Oryza sativa* L.) leaf tissues by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: induction of pathogenesis-related and cellular protectant proteins by jasmonic acid, UV irradiation and copper chloride. *Journal Electrophoresis*. v. 20. p. 3472–3478, 1999.

REICHLER, S. A.; TORRES, J.; RIVERA, A. L.; CINTOLESI, V. A.; CLARK, G.; ROUX, S. J. Intersection of two signalling pathways: extracellular nucleotides regulate pollen germination and pollen tube growth via nitric oxide. *Journal Exp. Bot.* v. 60. p. 2129–2138, 2009.

del RÍO LA, CORPAS, F. J.; SANDALIO, L. M.; PALMA, J. M.; GÓMEZ, M.; BARROSO, J. B. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *Journal Exp Bot.* v. 53. p. 1255–1272, 2002.

ROSE, J. K. C.; BASHIR, S; GIOVANNONIL, J. J.; JAHN, M. M.; SARANAVAN, R. S. Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. *The Plant Journal*. v.39. p. 715-733, 2004.

RYAN, P.R.; DELHAIZE, E.; JONES, D.L. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Journal Plant Physiology. Plant Mol. Biol.* v. 52. p. 527–560, 2001.

RYAN P. R.; RAMAN H.; GUPTA S.; HORST W. J.; DELHAIZE E. A second mechanism for aluminum resistance in wheat relies on the constitutive efflux of citrate from roots. *Journal Plant Physiology.* v.149, p.340–351, 2009.

RYAN PR, S. D. TYERMAN², SASAKI, T.; FURUICHI, T.; YAMAMOTO, Y.; ZHANG, W. H.; DELHAIZE, E. The identification of aluminium-resistance genes provides opportunities for enhancing crop production on acid soils. *Journal of Experimental Botany*, v. 62, n. 1, p. 9–20, 2011.

SAHNOUN, I.; DÉHAIS, P.; MONTAGU, M. V.; ROSSIGNOL, M.; ROUZÉ, P. A plant plasma membrane database. *Journal Biotech.* v. 78. p. 235-246, 2000.

SANCHEZ, J. C.; ROUGE, V.; PISTEURS, M.; RAVIER, F.; TONELLA, L.; MOOSMAYER, M.; WILKINS, M. R.; HOCHSTRASSER, D. F.. Improved and simplified in-gel sample application using reswelling of dry immobilized pH gradients. *Journal Eletrophoresis.* v. 18.p. 324-327, 1997.

SHEVCHENKO, A., WILM, M., VORM, O., MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Journal Analytical Chemistry.* v. 68. p. 850-858, 1996.

SHEVCHENKO, A., THOMAS, H., HAVLIS, J., OLSEN, J.V., MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Journal Nature Protocols.* v. 1. p. 2856-2860, 2007.

SHORESH. M.; HARMAN G. E.; Genome-wide identification, expression and chromosomal location of the genes encoding chitinolytic enzymes in *Zea mays*. *Journal Mol Genet Genomics.* v. 147. p. 2147-2163, 2008.

SILVA IR, SMYTH TJ, BARROS NF, NOVAIS RF. Physiological aspects of aluminum toxicity and tolerance in plants. *Rev. Tópicos em Ciência Solo.* v. 2. p.277-335, 2002.

TANG W., BRADY S. R., SUN Y., MUDAY G. K., ROUX S. J. Extracellular ATP inhibits root gravitropism at concentrations that inhibit polar auxin transport. *Journal Plant Physiology*. v. 131. p. 147–154, 2003.

TESFAYE, M.; TEMPLE, S. T.; ALLAN, D. L.; VANCE, C. P.; SAMAC, D. A. Overexpression of Malate Dehydrogenase in Transgenic Alfalfa Enhances Organic Acid Synthesis and Confers Tolerance to Aluminum. *Journal Plant Physiology*, v. 127, p. 1836–1844, 2001.

THIELLEMENT, H.; BAHRMAN, N.; DAMERVAL, C.; PLOMION, C.; ROSSIGNOL, M.; SANTONI, V.; DE VIENNE, D.; ZIVY, M. Proteomics for genetics and physiological studies in plants. *Journal Electrophoresis*. v. 20. p.2013-2026, 1999.

THOMAS, C.; SUN, Y.; NAUS, K.; LLOYD, A.; ROUX, S. Apyrase functions in plant phosphate nutrition and mobilizes phosphate from extracellular ATP. *Journal Plant Physiol*. v. 119. p. 543–552, 1999.

TOUZET, P.; RICCARDI, F.; MORIN, C.; DAMERVAL, C.; HUET, J-C.; PERNOLLET, J-C.; ZIVY, M. DE VIENNE, D. The mayze two-dimensional gel protein database: towards an integrated genome analysis program. *Rev. Theor. Appl. Genet*. v. 93. p. 997-1005, 1996.

VALDERRAMA, R.; CORPAS, F.J.; CARRERAS, A.; FERNÁNDEZOCAÑA, A.; CHAKI, M.; LUQUE, F.; GÓMEZ, RODRÍGUEZ M.V.; COLMENERO, VAREA, P.; DELRÍO, L.A.; BARROSO, J. B. Nitrosative stress in plants. *Journal FEBS Lett* v. 581. p. 453–461, 2007.

VAN WIJK, K. Challenges and prospects of plants proteomics. *Journal Plant Physiology*. v. 126, p. 501-508, 2001.

VEGA-BUSTILLOS, O.; SASSINE, A.; MARCH, R. A espectrometria de massa quadrupolar. São Paulo, SP: Scortecci, 2003.

VITORELLO, V. A.; CAPALDI, F.R.; STEFANUTO, V. A. Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. *Braz. Journal Plant Physiol*. v. 17. p. 129-143, 2005.

WATANABE, T.; OSAKI, M. Mechanisms of adaptation to high aluminum condition in native plant species growing in acid soils: a review. *Journal Communications in Soil Science and Plant Analysis*, v. 33, p. 1247-60, 2002.

WEBB, L. J. Aluminium accumulation in the Australian-new Guinea flora. *Aust. Journal Bot.* v. 2. p. 176-196, 1954.

WENZL, P.; PATIÑO, G. M.; CHAVES, A. L.; MAYER, J. E.; RAO, I. M. The high level of aluminum resistance in signalgrass is not associated with known mechanisms of external aluminum detoxification in root apices. *Journal Plant Physiology*, Rockville, v.125, n.3, p.1473-1484, 2001.

WESTERMEIER, *Journal Electrophoresis in practice*. Weinheim: Wiley-VCH, 2001

WILKINS, M. R.; PASQUALI, C.; APPEL, R. D.; OU, K.; GOLAZ, O.; SANCHEZ, J. C.; YAN, J. X.; GOOLEY, A. A.; HUGHES, G.; HUMPHERY-SMITH, I.; WILLIAMS, K. L.; HOCHSTRASSER, D. F. From proteins to proteomes: Large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and aminoacid analysis. *Journal Nature Biotechnology*. v. 14. p. 61-65, 1996.

WILKINS, M. R.; SANCHEZ, J. C.; WILLIAMS, K. L.; HOCHSTRASSER, D. F. Current challenges and future applications for protein maps and post-translational vestor maps in proteome projects. *Journal Eletrophoresis*. v. 17. n. 5. p. 830-838, 2001.

YANG, Q.; WANG, Y.; ZHANG, J.; SHI, W. QIAN, C. PENG, X. Identification of aluminum-responsive proteins in rice roots by a proteomic approach: Cysteine synthase as a key player in Al response. *Journal Proteomics*. v. 7. p. 737-749, 2007.

ZHANG X, NIWA H, RAPPAS M. "Mechanisms of ATPases--a multi-disciplinary approach". *Journal Curr Protein Pept Sci* v. 5. n. 2. p. 89-105, 2004.

ZHEN, Y.; QI, J. L.; WANG, SI.; SU, J.; XUA, G. H.; ZHANGA, M. S.; MIAOA, L. V.; PENG, X.; TIANA, D.; YANG, Y. Comparative proteome analysis of differentially expressed proteins induced by Al toxicity in soybean. *Rev. Physiologia Plantarum*. v. 131,

p.542–554, 2007.

ZHENG SJ, MA JF, MATSUMOTO H. Continuous secretion of organic acids is related to aluminum resistance during relatively long-term exposure to aluminum stress. *Journal Physiol. Plant.* v. 14. p. 103-209, 1998.

ZHOU, S.; SAUVE, R.; THANNHAUSER, T. W. 1. Aluminum induced proteome changes in tomato cotyledons. *Journal Plant Signaling & Behavior.* v. 8, n. 4, p. 769-772, 2009.

ZHOU, S.; SAUVE, R.; THANNHAUSER, T. W. 2. Proteome changes induced by aluminium stress in tomato roots. *Journal of Experimental Botany,* v. 60, n. 6, p. 1849–1857, 2009.