

Efeito do alumínio no conteúdo de poliaminas livres e atividade da fosfatase ácida durante o crescimento de brotações de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivadas *in vitro*

Effect of aluminium on the free polyamines content and acid phosphatase activity during the growth of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* shoots cultivated *in vitro*

Lúcia Helena Menegon Basso¹, Giuseppina Pace Pereira Lima², Antônio Natal Gonçalves³, Stela Maria Carvalho Vilhena¹ e Cilene do Carmo Federice Padilha⁴

Resumo

Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de diferentes doses de alumínio em brotações do híbrido *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, cultivadas *in vitro*. Foram avaliados no meio de cultura os valores de pH e modificações químicas, através do programa Geochem. Os teores de poliaminas livres (putrescina, espermidina e espermina) e a atividade da enzima fosfatase ácida foram avaliados nas brotações. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos, sendo 0; 6,75; 13,50 e 27 mg.L⁻¹ de Alumínio e quatro repetições por tratamento. Os dados foram coletados aos 4, 8, 12, 16, 20, 24 e 28 dias de cultivo. A adição de doses crescentes de AlCl₃.6H₂ alterou o equilíbrio iônico do meio de cultura em todas as concentrações, resultando em alterações morfológicas nas brotações, diminuição do pH, intensificação na síntese de putrescina, espermidina e espermina e aumento na atividade da enzima fosfatase ácida.

Palavras-chave: Híbrido, Micropropagação, Estresse, Alumínio, Putrescina, Espermidina, Espermina

Abstract

This paper is aiming to evaluate the effects of different levels of the aluminum on the growth of the *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* shoots cultivated *in vitro*. Evaluations were carried out on pH and chemicals modifications of the culture medium by Geochem program, polyamines contents (putrescine, spermidine e spermine) and acid phosphatase activity on the shoots. The trial had a totally randomized design with four treatments and four replicates. The treatments were: 0.0, 6.75, 13.50 and 27 mg.L⁻¹ of AlCl₃.6H₂. Evaluations were carried out on the 4th, 8th, 12th, 16th, 20th, 24th and 28th day of culture. The addition of the aluminium, in all concentrations, affected the culture medium ionic equilibrium, the morphology of the shoots, reduced the pH on the medium, induced an increase in polyamines content and higher acid phosphatase activity.

Keywords: Hybridization, Micropropagation, Stress, Aluminium, Putrescine, Spermidine, Spermine

INTRODUÇÃO

A crescente demanda pela madeira de *Eucalyptus* spp. na produção de papel, celulose e energia, têm merecido especial atenção de Instituições de Pesquisas, Universidades e Empresas em todo o Brasil. A espécie pode ser propagada vegetativamente por estaquia e enxertia, entre-

tanto, apresentam normalmente baixo índice de enraizamento (XAVIER e COMÉRIO, 1996).

A cultura de tecidos mostra-se boa alternativa de propagação, necessitando de menor espaço físico, apresentando elevada taxa de multiplicação, menor incidência de pragas e doenças durante o cultivo, e possibilitando maior controle dos fatores envolvidos (HIGASHI *et al.*, 2002).

¹Pesquisadora Doutora do Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – Caixa Postal 510 - Botucatu, SP - 18618-000 – E-mail: lhmbasso@ig.com.br; ma-aguiar@uol.com.br

²Professora Doutora do Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – Caixa Postal 510 - Botucatu, SP - 18618-000 – E-mail: gpplima@ibb.unesp.br

³Professor Doutor do Departamento de Departamento de Ciências Florestais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo – Caixa Postal 9 - Piracicaba, SP – 13418-900 - E-mail: natalgon@esalq.usp.br

⁴Pesquisadora do Departamento de Física e Biofísica do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – Caixa Postal 510 - Botucatu, SP - 18618-000 – E-mail: padilha@ibb.unesp.br

Em geral, a atividade florestal é destinada a solos arenosos e de baixa fertilidade, possuindo muitos deles, níveis de elementos considerados tóxicos para as plantas. Dentre estes elementos, o alumínio se destaca, colaborando com a diminuição do pH do solo e prejudicando a disponibilidade de alguns elementos fundamentais na nutrição mineral das plantas (MALAVOLTA *et al.*, 1997). O alumínio é o terceiro metal mais abundante da crosta terrestre, após o oxigênio e o silício, sendo encontrado em diferentes formas, como aluminossilicatos insolúveis ou óxidos (FOY *et al.*, 1978; DeLHAIZE e RYAN, 1995; LARSEN *et al.*, 1996; MA *et al.*, 2001). Mesmo em pequenas quantidades o Al^{3+} pode inibir o crescimento das raízes, em poucos minutos ou horas, em diversas espécies vegetais.

A toxidez por alumínio pode causar inibição da divisão celular, lesões nas membranas, alterações na síntese do DNA e mitose, além de interferir na fixação do fósforo, em formas menos disponíveis no solo e na planta. Diminui também a respiração radicular, a absorção, transporte e uso de elementos como o Ca, Mg, P, K e água (ROY *et al.*, 1988; KOCHIAN, 1995).

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

Foi sugerido (SHORTLE e SMITH, 1988) que o alumínio causa redução na absorção de Ca e Mg nas raízes, causando deficiência de cálcio em árvores. Esta deficiência pode promover a indução da biossíntese e/ou acúmulo (pela interconversão) de putrescina e espermidina em tecidos foliares. Outros trabalhos também relatam o acúmulo de putrescina e alterações em outras poliaminas (espermina e espermidina) em plantas tratadas com alumínio (MINOCHA *et al.*, 1996).

Elevados teores de alumínio e conseqüentemente, baixos níveis de pH no meio afe-

tam o metabolismo da enzima fosfatase ácida (E.C.3.1.3.2), (BIELESKI, 1973; HELAL, 1990). A fosfatase ácida está geralmente relacionada como transportadora do fósforo inorgânico, desempenhando papel importante na hidrólise de fósforos ésteres no meio, transformando o fósforo não disponível em fósforo inorgânico, disponível (BIELESKI, 1973; DUFF *et al.*, 1991).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes doses de alumínio em brotações do híbrido de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* *in vitro*, através da determinação dos níveis de pH do meio, teores de poliaminas (putrescina, espermidina e espermina) e da atividade da enzima fosfatase ácida nas brotações, durante o período de cultivo.

MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal usado (sementes) foi obtido a partir de um clone do híbrido de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivado *in vitro*, fornecido pela Lafisa. Após a germinação das sementes em meio Gonçalves (1980), o hipocótilo foi multiplicado durante 30 dias para obtenção de quantidade suficiente de brotações para o início do experimento em meio Gonçalves (1980), acrescido de IAA (ácido indol acético) ($0,01 \text{ mg L}^{-1}$) 6 BAP (6-benzil aminopurina) ($0,2 \text{ mg L}^{-1}$) com pH ajustado a 5,8 antes da inclusão do alumínio. O alumínio foi adicionado ao meio de cultura, sob a forma de $AlCl_3 \cdot 6H_2O$, nas seguintes concentrações: $6,75 \text{ mg Al L}^{-1}$ ou $0,25 \text{ mM } AlCl_3 \cdot 6H_2O$ (T1); $13,5 \text{ mg Al L}^{-1}$ ou $0,50 \text{ mM } AlCl_3 \cdot 6H_2O$ (T2); $27,0 \text{ mg Al L}^{-1}$ ou $1,0 \text{ mM } AlCl_3 \cdot 6H_2O$ (T3) e omissão em $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ (controle).

Utilizou-se manta acrílica, para sustentação das brotações em meio líquido, pois com a adição de $AlCl_3 \cdot 6H_2O$, o valor de pH diminuía (Tabela 1), não permitindo a gelificação do agar. Em cada recipiente foi adicionado 50 mL do meio de cultura, incluindo o alumínio, a manta acrílica e quatro brotações.

Tabela 1. Valores de pH durante o período de cultivo de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, *in vitro*, em meio de cultura Gonçalves (1980) modificado.

Table 1. pH value during the period of culture of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* shoots in Gonçalves (1980) modified.

Doses Al	Dias de coleta durante o cultivo							
	0	4	8	12	16	20	24	28
0	5,2	4,7	4,8	4,8	4,6	4,6	4,7	4,7
6,75	3,5	4,5	4,6	4,7	4,5	4,6	4,5	4,6
13,5	3,3	4,1	4,5	5,1	5,7	4,7	4,8	4,5
27,0	3,1	4,0	4,3	5,2	5,3	5,2	4,9	5,3

O cultivo ocorreu em sala de crescimento com temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas claro e 8 horas escuro e intensidade luminosa de $50 \pm 2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As brotações constituíram-se de parte aérea pouco desenvolvida e ausência de sistema radicular. A padronização ocorreu pelo tamanho das gemas.

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos (Controle – ausência de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; T1 - $6,75 \text{ mg Al L}^{-1}$ ou $0,25 \text{ mM AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; T2 - $13,5 \text{ mg Al L}^{-1}$ ou $0,50 \text{ mM AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; T3 - $27,0 \text{ mg Al L}^{-1}$ ou $1,0 \text{ mM AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e quatro repetições, para todos os parâmetros medidos. As coletas foram realizadas aos 4, 8, 12, 16, 20, 24 e 28 dias de cultivo para avaliar os valores do pH no meio de cultura, os teores de poliaminas (putrescina, espermidina e espermina) e a atividade da enzima fosfatase ácida por eletroforese de isoenzimas, em brotações cultivadas sob efeito das crescentes doses de alumínio.

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

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

Onde:

$i = 1, \dots, 7$; $j = 1, \dots, 4$; $k = 1, \dots, 4$;

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

t_i = efeito da i -ésima coleta

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

t'_k = efeito de k -ésima dose de alumínio

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

e_{ijk} = erro experimental associado a Y_{ijk} , usado como resíduo em nível de subparcela (dose), $e_{ijk} \cap N(0, \theta^2_{ij})$.

As médias obtidas foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Análise do equilíbrio químico do meio de cultura

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

Teores de poliaminas

O teor das poliaminas livres foi realizado de acordo com o método de Flores e Gals-ton (1985), modificado por Lima (1994). Amostras do material fresco foram coletadas, pesadas, homogeneizadas em 1 ml de ácido perclórico a 5% e centrifugadas a 10.000 rpm por 20 minutos, a 4°C . Alíquotas da parte orgânica foram retiradas e submetidas à cromatografia de camada delgada. As placas de sílica gel (60 G) foram ativadas a 100°C por duas horas. Os solventes cromatográficos empregados foram clorofórmio:triethylamina (20:1). As poliaminas foram qualificadas e quantificadas em espectroscopia de fluorescência VDS (Pharmacia Biotech).

Atividade da enzima fosfatase ácida

Amostras de brotações de cada tratamento foram pesadas para a obtenção da massa fresca. Em seguida, 1 grama do material foi macerado em almofariz gelado com 2 ml de solução extratora n.1 de Alfenas *et al.* (1991). O macerado foi centrifugado a 10.000 rpm / 20 minutos a 4°C . O sobrenadante foi armazenado a -8°C para posterior análise.

Condições da corrida eletroforética

Após descongelamento, foram retiradas alíquotas de $40 \mu\text{l}$ e pipetadas em "Wicks" (papel filtro de $15 \times 6 \text{ mm}$ embebido com as amostras). Géis contendo 2/3 de penetrose de milho e 1/3 de amido (Sigma) na concentração final de 12%, foram resfriados e posteriormente cortados ao meio e colocados os "Wicks" com as diferentes amostras. Em uma das extremidades foi aplicado um "Wicks", com bromofenol, para marcação da distância de migração. A corrida foi realizada em geladeira e os "Wicks" retirados após trinta minutos. Retirados os "Wicks", seguiu-se à corrida por um período de quatro horas, aproximadamente 8 cm de migração do marcador.

Coloração das enzimas

Foram utilizadas secções de 5 mm, conforme protocolo de Alfenas *et al.* (1991). Os géis foram incubados no escuro a $30-37^\circ\text{C}$, até aparecerem as bandas, descartando-se a solução de coloração e fixando o gel em solução de glicerol a 10%. Foi padronizado em 1 hora o tempo coloração para a fosfatase ácida (ACP).

Análise dos géis

Os géis foram fotografados em VDS (Amersham Pharmacia Biotec), as imagens analisadas com suas formas alélicas, as atividades expressas como mobilidade relativa (Rf) e índice de densidade óptica através da densitometria de gel (Programa Software Image Master VDS, versão 2,0, da Amersham Pharmacia Biotec (1995, 1996).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Modificações químicas do meio de cultura

Houve alterações no pH (Tabela 1) do meio de cultura durante o cultivo, provavelmente causadas pela adição de doses crescentes de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Inicialmente houve redução acentuada de pH no meio de cultura dos tratamentos (T1- pH 3,5; T2 – pH 3,3; T3 – pH 3,1), devido provavelmente à adição de alumínio, sendo que, a partir do quarto dia houve tendência de aumento desses valores. (apresentaram valores mais básicos.) O tratamento controle mostrou diminuição de pH até o quarto dia, permanecendo então, estável até o final do experimento. A absorção de nutrientes pelas plantas, devido ao seu metabolismo normal, geralmente, altera a composição do meio, permitindo uma faixa acima da qual o pH tende a subir sem que ocorra a precipitação do alumínio (CONNER e MEREDITH, 1984), o que pode explicar os valores do pH medidos após o quarto dia de coleta.

A simulação do balanço químico dos elementos no meio de cultura, realizado pelo programa Geochem, em função das alterações do pH (Tabela 2), sugere que o fósforo (PO_4^{3-}) poderá tornar-se menos disponível para as plantas, em função de sua ligação com o alumínio. As porcentagens encontradas de PO_4^{3-} ligados ao Al^{3+} foram de 0% no controle, 10,8%; 24,8% e

46,1% nos tratamentos T1, T2 e T3, respectivamente. O PO_4^{3-} está presente, em sua maioria, ligado ao H^+ nas porcentagens de 80,9 no controle, e 71,3; 60,4 e 42,9, nos tratamentos T1, T2 e T3, respectivamente.

A função do fósforo é alterada na presença de alumínio, pois este se liga rapidamente ao fósforo, alterando sua disponibilidade para as plantas. Desta forma, o metabolismo celular é afetado, resultando em danos irreversíveis, sendo que, as ligações do alumínio com o fósforo ocorrem na forma de inibição não competitiva (MALAVOLTA *et al.*, 1997). Os sintomas de deficiência de fósforo, freqüentemente, assemelham-se aos sintomas de fitotoxidade ao alumínio (FOY *et al.*, 1978).

Os elementos enxofre (SO_4^{2-}), cloro (Cl^-) e boro ($\text{B}(\text{OH})_4^-$) mostraram aumento na porcentagem de ligações com o Al em função das crescentes doses de Al ao meio. Em relação aos demais nutrientes, a simulação não indicou grandes modificações em suas disponibilidades.

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

Ocorreu também diminuição do crescimento das brotações e a formação de massa calosa, enrijecida, com elevada oxidação, o que promoveu o escurecimento do material vegetal (Figura 1). Esse escurecimento é geralmente provocado pela oxidação de fenóis, estimulada pela diminuição do pH do meio (HIRANO e HIJII, 1998). Muitas das desordens ocorridas nas brotações podem ter sido causadas não somente pela adição do alumínio ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ao meio, mas também pela diminuição ou aumento do pH (Tabela 1).

Tabela 2. Distribuição primária em porcentagem de alguns ligantes livres e ligados ao Alumínio no meio de cultura Gonçalves (1980) com os diferentes tratamentos, através do programa Geochem.

Table 2. Primary distribution (%) of some free and combined ligands with aluminum in Gonçalves (1980) medium under different aluminium treatments, by the Geochem program.

Ligantes livres ou com Al	Controle	Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3
PO_4^{3-} ligado	0	10,8	24,8	46,1
PO_4^{3-} livre	0	0	0	0
SO_4^{2-} ligado	0	0,5	2,1	6,3
SO_4^{2-} livre	65,9	64,7	63,3	60,3
Cl^- ligado	0	0	0,2	0,8
Cl^- livre	95,8	95,7	95,5	95,0
$\text{B}(\text{OH})_4^-$ ligado	0	0,5	1,0	2,1
$\text{B}(\text{OH})_4^-$ livre	0	0	0	0

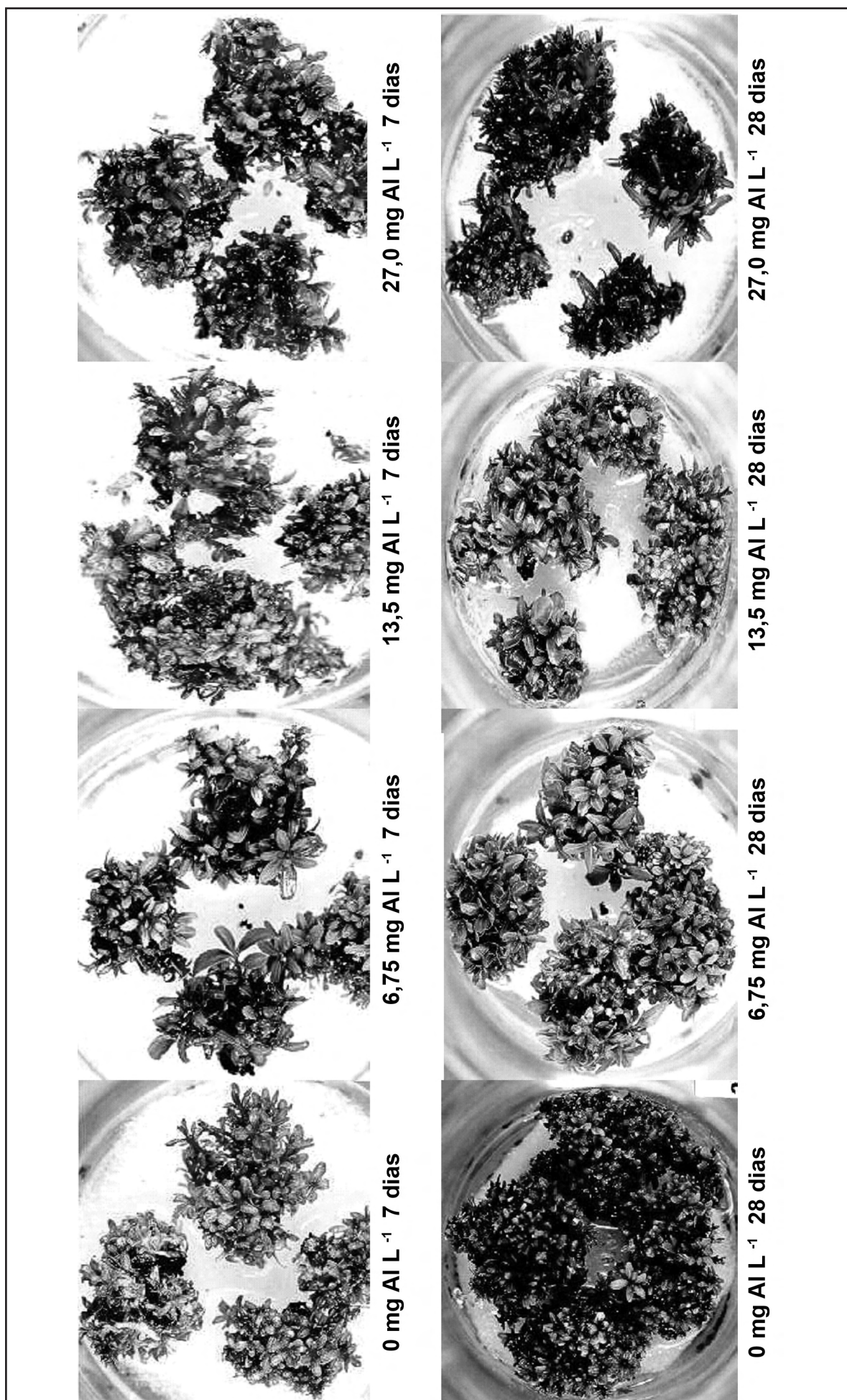


Figura 1. Brotações de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, em meio de cultura Gonçalves (1980), com adição de diferentes doses de alumínio aos 7 e 28 dias de cultivo.
Figure 1. *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* shoots cultivated in Gonçalves (1980) medium under different aluminium concentrations at the 7th and 28th days of culture.

Pode ser notado que ocorreram alterações morfológicas nas brotações como o enrijecimento das folhas e amarelecimento, promovido provavelmente, pela degradação da clorofila. As mudanças morfológicas poderiam ser atribuídas a uma desorganização do citoplasma, como descrito por Alessa e Oliveira (2001), em brotações de *Vaucheria longicaulis* submetidas a doses crescentes de alumínio. O excesso de alumínio tem efeito marcante na morfologia de espécies florestais, promovendo a peroxidação dos lipídeos das membranas celulares, alterando o transporte de íons e modificando o crescimento das plantas (YAMAMOTO *et al.*, 1997).

Poliaminas

Observa-se aumento no teor da diamina putrescina, durante o período de cultivo, sob efeito dos diferentes tratamentos (Tabela 3). Na fase inicial, isto é, do quarto ao décimo segundo dia de cultivo, ocorreram maiores níveis de putrescina para as brotações mantidas no tratamento com a dose mais alta de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Brotações cultivadas na dose mais baixa de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e pertencentes ao tratamento controle, apresentaram baixas concentrações de putrescina nestas épocas de coleta. Após esse período, começou a ocorrer diminuição dos teores de putrescina nos tratamentos contendo maiores doses de alumínio.

Flores (1991) verificou que o papel específico do acúmulo de putrescina seria a manutenção do balanço cátion-ânion no tecido vegetal e o acúmulo dessa diamina foi atribuído à carência de potássio, tanto em mono e dicotiledôneas, o que parece ser uma resposta universal. Resultados semelhantes foram encontrados por diversos autores em trabalhos clássicos (BASSO, 1974; BASSO *et al.*, 2003; SMITH, 1985; FLORES, 1990). Malavolta *et al.* (1997) relataram que o alumínio interfere na absorção de K, na forma de inibição competitiva, alterando a disponibilidade do potássio no processo de absorção. Provavelmente, como o potássio é cofator de enzimas de síntese de poliaminas, a diminuição dessas substâncias

poderia ser atribuída a alterações na atividade das enzimas, na carência de potássio e a possível deficiência do cátion estaria sendo balanceada pela putrescina. Conforme relatado por Smith (1985) e Tiburcio *et al.* (1997), a diamina putrescina é convertida a triamina espermidina e a tetramina espermina por sucessivas transferências de grupos aminopropil, que necessitam de cofatores como o potássio. Parece que, devido à adição de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e a conseqüente indisponibilidade de alguns nutrientes, como o cálcio e o potássio, pode ter sido favorecido o acúmulo de putrescina no início da fase de crescimento das brotações.

A partir do décimo segundo dia, as concentrações de putrescina apresentaram tendência de aumento até o final do período de cultivo em todos os tratamentos testados, com algumas variações relacionadas, provavelmente, ao período de desenvolvimento das brotações, confirmando a participação das poliaminas na regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas (ADIGA e PRASSAD, 1985; WATSON e MALMBERG, 1996). Alterações nos níveis de putrescina podem ser uma das mudanças induzidas pela deficiência da nutrição mineral. Estas mudanças na composição e conteúdo de poliaminas, induzidas pela deficiência de potássio, diferem de acordo com o tecido e estágio de desenvolvimento do estresse nutricional (BOUCHEREAU *et al.*, 1999).

Alterações nos teores de putrescina sob ação de alumínio também foram relatadas por outros autores. MINOCHA *et al.* (1996) avaliaram o efeito de diferentes doses de alumínio em cultura de *Picea rubens* cultivadas *in vitro* e verificaram que ocorreu inibição do crescimento e aumento nos níveis de putrescina. Na mesma espécie, Minocha e Long (2004) relataram que alumínio causou significativo aumento na concentração celular de putrescina. Essas alterações nos teores de putrescina, bem como de outras poliaminas, podem ser atribuídas a uma resposta primária do estresse causado por Al ou ser causado indiretamente através do efeito de estresse em outros processos metabólicos.

Tabela 3. Teor putrescina ($\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ m.fresca) em explantes de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em diferentes épocas de coleta em função das doses de Al no meio de cultura.

Table 3. Putrescine content ($\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ fresh matter) of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* shoots cultivated in medium under different aluminium concentrations during the culture period.

Dose de Al	Período de Coleta (dias)						
	4	8	12	16	20	24	28
0	-	0,00131 ^{bc}	0,00029 ^{ac}	0,00146 ^{abc}	0,00123 ^{abc}	0,00396 ^{aA}	0,00262 ^{bB}
6,75	-	0,00110 ^{bc}	0,00008 ^{ac}	0,00148 ^{abc}	0,00170 ^{abc}	0,00476 ^{aA}	0,00342 ^{abAB}
13,5	0,00090 ^{ab}	0,01524 ^{bb}	0,00122 ^{ab}	0,00066 ^{ab}	0,00083 ^{bb}	0,00206 ^{ab}	0,00464 ^{aA}
27,0	0,00195 ^{aAB}	0,002537 ^{aAB}	0,00081 ^{ab}	0,00114 ^{ab}	0,00059 ^{bb}	0,00258 ^{aAB}	0,00401 ^{abA}

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

Por outro lado, o aumento nos níveis de putrescina notado em todos os tratamentos, pode ser atribuído ao crescimento normal das plantas. O acúmulo de putrescina durante a fase de crescimento linear, também foi relatado por Aribaud *et al.* (1994), que observaram a biossíntese de poliaminas ocorrendo nos primeiros dias de cultivo *in vitro*, quando as células de *Chrysanthemum morifolium* se multiplicavam rapidamente. Isto indica que a biossíntese de poliaminas ocorreu simultaneamente à condição fisiológica de intenso metabolismo, no qual a divisão celular ou a formação de órgãos estaria diretamente correlacionada.

Com relação aos teores de espermidina, nota-se que os valores foram maiores do que os encontrados para a putrescina, em brotações mantidas nas doses 13,5 e 27,0 mg Al L⁻¹, na fase inicial do crescimento da cultura (Tabela 4).

As poliaminas exercem sua função na membrana pela formação de complexos com os fosfolipídeos, os quais seriam responsáveis pela

redução da fluidez (ROBERTS *et al.*, 1983). Existem opiniões divergentes com relação às poliaminas em muitas áreas da fisiologia vegetal, no que se refere ao seu efetivo papel e, conseqüentemente, sua categoria não está ainda definida (se atuam ou não como reguladores vegetais). O papel das poliaminas e seus efeitos indicam que há necessidade de mais estudos, entretanto, com a utilização das técnicas de cultivo *in vitro* é possível estudar os mecanismos de adaptação das plantas a solos com problemas de toxidez pelas altas concentrações de alumínio.

Atividade da fosfatase ácida (EC 3.1.3.2)

A análise eletroforética mostrou que o material vegetal utilizado apresentou cinco bandas em todos os tratamentos (ACP₁, ACP₂, ACP₃, ACP₄, ACP₅). Embora tenham ocorrido algumas diferenças de intensidade de cada banda ao longo do período de cultivo, nenhum padrão de resposta foi encontrado em relação aos diferentes tratamentos (Figura 2).

Tabela 4. Teor de espermidina (nmol.g⁻¹ m.fresca) em explantes de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em diferentes épocas de coleta em função das doses de Al no meio de cultura.

Table 4. Spermidine content (nmol.g⁻¹ fresh matter) of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* shoots cultivated in medium under different aluminium concentrations during the culture period.

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

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



Figura 2. Eletroforese de isoenzimas (Fosfatase Ácida E.C.3.1.3.2) presentes em brotações de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivadas em meio Gonçalves (1980) submetidas a estresse por Alumínio. A escala à esquerda da figura corresponde à razão de mobilidade da corrida eletroforética. Os números 1, 2, 3 e 4 são as repetições do tratamento controle. Os de 5 a 8, as repetições do tratamento T1. Os números de 9 e 10 são amostras teste, os de 11 a 14 repetições do tratamento T2, e os de 15 a 18 as repetições do tratamento T3.

Figure 2. Analytical isoenzymatic eletroforese of acid phosphatase (E.C.3.1.3.2) of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* shoots cultivated in Gonçalves (1980) under aluminum stress. The left scale of the figure shows the mobility of eletroforese. The numbers 1, 2, 3 and 4 are the repetition of the control treatment, 5, 6, 7 and 8 represent treatment 1, 9 and 10 are the sample test. The number 11 to 14 represent the repetition of the treatment 2 and 15 to 18, repetition of the treatment 3.

Tabela 5. Teor espermina (nmol.g⁻¹ m.fresca) em explantes de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em diferentes épocas de coleta em função das doses de Al no meio de cultura.

Table 5. Spermidine content (nmol.g⁻¹ fresh matter) of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* shoots cultivated in medium under different aluminium concentrations during the culture period.

Dose de Al	Período de Coleta (dias)						
	4	8	12	16	20	24	28
0	0,00148 ^{bAB}	0,00348 ^{aAB}	0,00622 ^{abA}	0,00187 ^{aAB}	0,00101 ^{bB}	0,00077 ^{bB}	0,00472 ^{aAB}
6,75	0,00288 ^{bB}	0,00322 ^{aB}	0,02489 ^{aA}	0,00110 ^{aB}	0,00093 ^{bB}	0,00057 ^{bB}	0,00512 ^{aB}
13,5	0,00389 ^{bB}	0,00197 ^{aB}	0,00915 ^{abA}	0,00257 ^{aB}	0,00337 ^{aB}	0,00479 ^{aB}	0,0362 ^{aB}
27,0	0,00739 ^{aA}	0,00178 ^{aB}	0,00334 ^{bB}	0,00420 ^{aAB}	0,0044 ^{aAB}	0,00265 ^{abB}	0,00420 ^{aAB}

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

Tabela 6. Atividade da fosfatase ácida (ACP total) presente nos explantes de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em diferentes épocas de coleta em função das doses de Al no meio de cultura.

Table 6. Acid phosphatase activity (ACP total) in *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* shoots cultivated in medium under different aluminium concentrations during the culture period.

Dose de Al	Período de Coleta (dias)						
	4	8	12	16	20	24	28
0	5,28 ^{aC}	4,29 ^{bC}	5,08 ^{aC}	17,00 ^{bB}	29,82 ^{aA}	36,32 ^{ba}	18,63 ^{aB}
6.75	6,96 ^{aD}	7,05 ^{abCD}	4,84 ^{aD}	15,38 ^{bC}	29,42 ^{aAB}	35,90 ^{ba}	27,32 ^{aB}
13.5	8,24 ^{aCD}	9,10 ^{abCD}	4,21 ^{aD}	41,80 ^{aA}	20,99 ^{aBC}	36,49 ^{baB}	25,20 ^{aB}
27.0	5,71 ^{aC}	11,45 ^{aBC}	5,28 ^{aC}	58,60 ^{aA}	31,99 ^{aB}	71,97 ^{aA}	24,14 ^{aBC}

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

Não houve diferenças genéticas na expressão das bandas para a fosfatase ácida. O comportamento do total de bandas (ACP total) foi analisado através da somatória das intensidades ópticas de todas elas, em cada período de coleta. Os géis mostraram que a intensidade da enzima fosfatase ácida foi proporcional às crescentes doses de AlCl₃.6H₂O, caracterizadas pelo escurecimento do gel. (Tabela 5)

O aumento da atividade da enzima fosfatase ácida (Tabela 6) em função de doses crescentes de alumínio na solução nutritiva concordam com os resultados de Zaini e Mercado (1985), trabalhando com plantas de arroz, observaram aumento da atividade da enzima quando a concentração de alumínio na solução foi elevada de 3 para 30 mg L⁻¹, sugerindo que a atividade da enzima é alta quando o estado nutricional em fósforo é baixo. Esse aumento da atividade enzimática poderia ter favorecido a absorção do fósforo em situações de baixa disponibilidade, o que permite às plantas sobreviverem em situações de baixo teor de fósforo. De acordo com KOYAMA *et al.* (1988), o maior fator tóxico causado pela adição de AlCl₃.6H₂O é a formação de alumínio-fosfato-insolúvel e consequente diminuição na disponibilidade de fósforo para a planta, alterando dessa forma, a atividade da fosfatase ácida. Mudanças na atividade da enzima são características de cada variedade e podem estar também asso-

ciadas à desigualdade na permeabilidade das células expostas ao alumínio (KLIMASHEVSKII e BERNARTSKAYA, 1973). Talvez isso explique na variação da atividade da enzima ocorrente neste trabalho.

Estes resultados obtidos a partir de análises bioquímicas poderão colaborar com estudos mais aplicados, já que geralmente, a cultura de tecidos é usada por empresas para a formação de mudas. Podem servir como modelo para as plantas no campo e solos com problemas de alumínio, que são freqüentes em diversas regiões do Brasil.

CONCLUSÕES

A adição de doses crescentes de AlCl₃.6H₂O altera o equilíbrio iônico do meio de cultura em todas as concentrações testadas, resultando em alterações morfológicas nas brotações, diminuição do pH, intensificação na síntese de putreína, espermidina e espermina e aumento na atividade da enzima fosfatase ácida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIGA, P.R.; PRASAD, G.L. Biosynthesis and regulation of polyamines in higher plants. In: GALSTON, A.W.; SMITH, T.A. **Polyamines in plants**. Dordrecht: Martinus Nijhoff/ Dr. W. Junk Publishers, 1985. p.3-24.

- ALESSA, L.; OLIVEIRA, L. Aluminum toxicity studies in *Vaucheria longicaulis* var. *macounii* (Xanthophyta, tribophyceae): 1- effects on cytoplasm organization. **Environmental and experimental botany**, Oxford, v.45, p.205-232, 2001.
- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: UFV, 1991. 242p.
- ARIBAUD, M.; CARRÉ, M.; MARTIN-TANGUY, J. Polyamine metabolism and *in vitro* cell multiplication and differentiation in leaf explant *Chrysanthemum morifolium* Ramat. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.15, p.143-155, 1994.
- BASSO, L.H.M. **Formação de di e poliaminas em plantas deficientes em potássio e magnésio**. 1974. 40p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1974.
- BASSO, L.H.M.; GONÇALVES, A.N.; SILVEIRA, L.V.A.; LIMA, G.P.P. Efeito do alumínio no crescimento de brotações de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, cultivadas *in vitro*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.63, p.167-177, 2003.
- BIELESKI, R.L. Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.24, p.225-252, 1973.
- BOUCHEREAU, A.; AZIZ, A.; LARHER, F.; MARTIN-TANGUY, J. Polyamines and environmental challenges: recent development. **Plant Science**, Amsterdam, v.140, p.103-125, 1999.
- CONNER, A.J.; MEREDITH, C.P. An improved polyurethane support system for monitoring growth in plant cell culture. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.3/4, n.1, p.59-68, 1984.
- DELHAIZE, E.; RYAN, P.R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v.107, p.315-321, 1995.
- DUFF, S.M.G.; PLANXTON, D.D. Phosphate starvation response in plant cells: synthesis and degradation of acid phosphatases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, Washington, v.88, p.9538-9542, 1991.
- FLORES, H.E. Changes in polyamine metabolism in response to abiotic stress. In: SLOCUM, R.D.; FLORES, H.E. **Biochemistry and physiology of polyamines in plants**. Boca Raton: CRC, 1991. cap.15, p.213-228.
- FLORES, H.E. Polyamines and plant stress. In: ALSCHER, R.G.; CUMMING, J.R. **Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms**. New York: Wiley-Liss, 1990. cap.10, p.217-239.
- FOY, C.D.; CHANEY, R.L.; WHITE, M.C. The physiology of metal toxicity in plants. **Annual Review Plant Physiology**, Palo Alto, v.29, p.511-566, 1978.
- GONÇALVES, A.N. Reversion to juvenility and cloning of *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake in cell and tissue culture systems. In: SIMPÓSIO IUFRO EM MELHORAMENTO GENÉTICO E PRODUTIVIDADE DE ESPÉCIES FLORESTAIS DE RÁPIDO CRESCIMENTO, 1980, Águas de São Pedro. **Silvicultura**, São Paulo, v.8, n.32, p.786-787, 1983.
- HELAL, H.M. Varietal differences in root phosphatase activity as related to the utilization of organic phosphates. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.123, p.161-163, 1990.
- HIGASHI, E.N.; SILVEIRA, R.L.A.; GONÇALVES, A.N. Nutrição e adubação em minijardim clonal hidropônico de *Eucalyptus*. **Circular Técnica IPEF**, Piracicaba, n.194, p.1-21, 2002.
- HIRANO, Y.; HIJII, N. Effects of low pH and aluminum on root morphology of Japanese red cedar saplings. **Environmental Pollution**, London, v.101, p.339-347, 1998.
- KLIMASHEVSKII, E.L.; BERNATSKAYA, M.L. Activity of ATPase and acid phosphatase in growth zones of the roots of pea having different sensitivity to Al-ion toxicity. **Soviet Plant Physiology**, Washington, v.20, p.201-204, 1973.
- KOCHIAN, L.V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.46, p.237-260, 1995.
- KOYAMA, H.; OKAWARA, R.; OJIMA, K.; YAMAYA, T. Reevaluation of characteristics of a carrot cell line previously selected as aluminium-tolerant cell line. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.74, p.683-687, 1988.

- LARSEN, P.B.; TAI, C.; KOCHIAN, L.V.; HOWELL, S.H. *Arabidopsis* mutants with increased sensitivity to aluminum. **Plant Physiology**, Rockville, v.110, p.743-751, 1996.
- LIMA, G.P.P. Efeito do cálcio sobre o teor de poliaminas, peroxidase e nitrato redutase em calos de arroz (*Oryza sativa* L. cv IAC 4440). 1994. 84p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 1994.
- MA, J.F.; RYAN, P.R.; DELHAIZE, E. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. **Trends in Plant Science**, London, v.6, p.273–278, 2001.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2.ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319p.
- MATTIGOD, S.V.; SPOSITO, G. Chemical modeling of trace metal equilibria in contaminated soil solutions using the program Geochem. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v.93, p.837-856, 1979.
- MINOCHA, R.; LONG, S. Effects of aluminum on organic acid metabolism and secretion by red spruce cell suspension cultures and the reversal of Al effects on growth and polyamine metabolism by exogenous organic acids. **Tree Physiology**, Victoria, v.24, p.55-64, 2004.
- MINOCHA, R.; MINOCHA, S.; LONG, S.L.; SHORTLE, W.C. Effects of aluminum on DNA synthesis, cellular polyamine, polyamine biosynthetic enzymes and inorganic ions in cell suspension cultures of wood plant, *Catharanthus roseus*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.85, p.417-424, 1992.
- MINOCHA, R.; SHORTLE, W. C.; COUGHLIN JR., D.J.; MINOCHA, S.C. Effects of aluminium on growth, polyamine metabolism, and inorganic ions in suspension cultures of red spruce (*Picea rubens*). **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v.26, n.4, p.550-559, 1996.
- ROBERTS, D.R.; WALKER, M.A.; THOMPSON, J.E.; DUMBROFF, E.B. The effects on inhibition of polyamine and ethylene biosynthesis on senescence, thylene production and polyamine levels in cut carnations. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v.25, p.315-322, 1983.
- ROY, A.K.; SHARMA, A.; TALUKDER, G. Some aspects of aluminum toxicity in plants. **Botanical Review**, Lancaster, v.54, p.145-178, 1998.
- SHORTLE, W.C.; SMITH, K.T. Aluminum-induced calcium deficiency syndrome in declining red spruce. **Science**, Washington, v.240, p.1017-1018, 1988.
- SMITH, T.A. Polyamines in plants. In: GALSTON, A.W.; SMITH, T.A. **Polyamines in plants**. Dordrecht: Martinus Nijhoff/ Dr. W. Junk Publishers, 1985.
- TIBURCIO, A.F.; ALTABELLA, T.; BORRELL, A.; MASGRAU, C. Polyamine metabolism and its regulation. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.100, p.664-674, 1997.
- WATSON, M.B.; MALMBERG, R.L. Regulation of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh arginine decarboxylase by potassium deficiency stress. **Plant Physiology**, Rockville, v.111, p.1077-1083, 1996.
- XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Microestadia: uma maximização da micropropagação de *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, Viçosa, v.20, n.1, p.9-16, 1996.
- YAMAMOTO, Y.; HASHIYA, A.; MATSUMOTO, H. Oxidative damage to membranes by combination of aluminum and iron in suspension-cultured tobacco cells. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v.38, p.1333-1339, 1997.
- ZAINI, Z.; MERCADO, T.T. Phosphorus and phosphatase activity of rice seedling: 1- levels of phosphorus and phosphatase activity of the roots. **The Philippine Agriculturist**, Manila, v.68, p.211-216, 1985.

Recebido em 16/05/2006

Aceito para publicação em 19/07/2007