

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal



Dissertação

**MICROPROPAGAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO DE  
PEREIRA E MARMELEIRO CULTIVADOS EM MEIO  
CONTENDO ALUMÍNIO**

**Mirian de Farias Ribeiro**

Pelotas  
Rio Grande do Sul  
2010

**Mirian de Farias Ribeiro**

**MICROPROPAGAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO DE PEREIRA E  
MARMELEIRO CULTIVADOS EM MEIO CONTENDO ALUMÍNIO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Márcia Wulff Schuch

Pelotas  
Rio Grande do Sul - Brasil  
Março, 2010

Dados de catalogação na fonte:  
Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901  
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

R484m      Ribeiro, Mirian de Farias  
                Micropropagação e estresse oxidativo de pereira e marmeleiro cultivados em meio contendo alumínio / Mirian de Farias Ribeiro ; orientador Márcia Wulff Schuch. – Pelotas, 2010. – 70f. ; il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Instituto de Biologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2010.

1.Fisiologia vegetal. 2.Multiplicação *in vitro*.  
3.Enraizamento *in vitro*. 4.Solos ácidos. 5.Toxicidade.  
I.Schuch, Márcia Wulff. II.Título.

CDD: 634.1

**Banca examinadora:**

---

Dr<sup>a</sup>. Márcia Wulff Schuch (Orientadora)

---

Dr. Leonardo Ferreira Dutra

---

Dr. José Antônio Peters

---

Dr. Sidnei Deuner

*Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite nele.*

Dedico a meus pais, Jurema e Mairi, que sempre acreditaram.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, por terem me proporcionado tudo que tenho até hoje, por sempre apoiarem e respeitarem minhas decisões e, por muitas vezes, abrirem mãos de seus sonhos para que os meus fossem realizados;

Ao meu irmão Marcos, por ter estado sempre presente a meu lado me ajudando e me incentivando. Apesar de todas as nossas brigas sempre seremos irmãos e bons amigos;

De maneira especial ao meu namorado Marcus, pela compreensão, carinho e amor a mim dedicados;

Aos colegas de Pós Graduação em Fisiologia Vegetal, com quem tive o prazer de conviver, alguns em especial;

Ao amigo Sidnei Deuner, pela ajuda no desenvolvimento de parte desse trabalho, pelos ensinamentos e pelo apoio em momentos decisivos;

Aos meus colegas de laboratório, acima de tudo amigos, André Luiz Kulkamp de Souza, Bruno Carra, Daniele Camargo Nascimento, Geniane Lopes Carvalho, Luana Borges Affonso, Samila Silva Camargo, Tânia Regina Pelizza e Zeni Fonseca Pinto Tomaz. *Ninguém consegue algo sem ajuda, sempre que houver uma obra ela é o resultado da somatória de todo um conjunto. Obrigado por fazerem parte dessa soma;*

Aos colegas do programa de Pós Graduação em Agronomia, em especial as amigas Cláudia Simone Madruga Lima e Cari Rejane Fiss Timm;

A professora Dr<sup>a</sup>. Márcia Wulff Schuch, pela confiança, respeito e por seguir me orientando em mais essa etapa importante da minha vida. Meu agradecimento mais que especial;

Ao Programa de Pós Graduação em Fisiologia Vegetal pela oportunidade de realizar o curso de mestrado;

Aos docentes do Programa de Pós Graduação em Fisiologia Vegetal pelos conhecimentos e amizade;

Aos funcionários do Departamento de Botânica, em especial à Suzi Braga.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão de bolsa de estudos;

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho.

Agradeço

## RESUMO

RIBEIRO, Mirian de Farias. **Micropropagação e estresse oxidativo de pereira e marmeleiro cultivados em meio contendo alumínio**, 2010. 70f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do alumínio (Al) na multiplicação e enraizamento *in vitro* de pereira e marmeleiro. Os explantes constituíram-se de segmentos nodais de pereira e marmeleiro cultivados *in vitro*. O meio de cultura para pereira foi o QL modificado por Leblay e para marmeleiro foi o MS, ambos adicionados de Al a 0 (pH 5,7 controle), 0, 15, 30, 45 e 60 mg L<sup>-1</sup> (pH 4,0), colocado em frascos contendo 1 g de algodão hidrófilo para multiplicação e 3 g de vermiculita para enraizamento e 30 mL de meio. O experimento constou de quatro repetições com cinco explantes cada. A multiplicação foi avaliada aos 60 dias quanto a percentagem de explantes brotados, número e comprimento das brotações, massa fresca e massa seca total e a atividade das enzimas catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) em pereira. O enraizamento foi avaliado aos 45 dias quanto a percentagem de explantes enraizados, número e comprimento das raízes, massa fresca e seca da parte aérea e radicular, a atividade das enzimas CAT, APX e superóxido dismutase (SOD) em pereira e teor de nutrientes. Na multiplicação, o marmeleiro teve 100% de explantes brotados, mas houve diminuição no número de brotos. O 'MC' apresentou diminuição no comprimento dos brotos, na massa fresca e seca, já o 'BA 29' apresentou aumento desses parâmetros. A pereira teve alta percentagem de explantes brotados. A 'Conference' apresentou maior número de brotos. Com relação ao comprimento dos brotos, massa fresca e seca houve aumento na presença de Al. A atividade da CAT na 'Conference' foi aumentada em 30 mg L<sup>-1</sup> de Al e na 'Abate Fetel' foi aumentada em 30 e 45 mg L<sup>-1</sup> de Al. A atividade da APX na 'Conference' foi aumentada em 30 e 60 mg L<sup>-1</sup> de Al e na 'Abate Fetel' foi aumentada em 30 mg L<sup>-1</sup> de Al. No enraizamento, o marmeleiro apresentou maior percentagem de enraizamento, maior número e comprimento das raízes. A maior massa fresca da parte aérea foi obtida pela 'Conference' e por 30 mg L<sup>-1</sup> de Al. A massa fresca da raiz foi maior no 'BA 29' em 15 mg L<sup>-1</sup> de Al. A maior massa seca da parte aérea foi obtida pela 'Conference' e por 15 e 30 mg L<sup>-1</sup> de Al. A maior massa seca da raiz foi obtida pelo 'BA 29' e por 15 mg L<sup>-1</sup> de Al. O teor de nutrientes aumentou na presença de Al. A atividade da CAT e APX aumentou e da SOD diminuiu em 'Abate Fetel' na presença de Al, enquanto que na 'Conference' a atividade da CAT diminuiu, da APX diminuiu somente em 45 mg L<sup>-1</sup> de Al e da SOD aumentou. De modo geral, os cultivares responderam de

forma diferente a presença de Al e, em alguns parâmetros, a presença desse metal foi benéfica.

**Palavras Chave:** Multiplicação *in vitro*. Enraizamento *in vitro*. Solos ácidos. Toxicidade.

## ABSTRACT

RIBEIRO, Mirian de Farias. **Micropropagation and oxidative stress of pear and quince cultivated on medium with aluminum**, 2009. 70f. Dissertation (Master) – Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The objective of this work was to evaluate the effect of aluminum (Al) on *in vitro* multiplication and rooting of pear and quince. The explants were nodal segments of pear and quince *in vitro* cultivated. The culture medium to pear was QL modified by Leblay and to quince was MS, both added of Al to 0 (pH 5,7, control), 0, 15, 30, 45 e 60 mg L<sup>-1</sup> (pH 4,0) put in jars with 1 g of cotton for multiplication and 3 g of vermiculite for rooting and 30 mL of medium. The trial had four replicates and five explants each. At 60 days the percentage of shoots, length and number of shoots, fresh and dry mass and catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) activity in pear were assessed. At 45 days the percentage of rooting, length and number of root, fresh and dry mass of shoots and roots, CAT, APX and superoxide dismutase (SOD) activity in pear and nutrients content were assessed. In the multiplication, the quince had 100% of shoot, but decreased the number of shoots. The length of shoots, fresh and dry mass decreased in 'MC' but increased in 'BA 29'. The pear had high percentage of shoots. The number of shoot was higher for 'Conference'. The length of shoots, fresh and dry mass was increased at Al. CAT activity in 'Conference' was increased at 30 mg L<sup>-1</sup> of Al and in 'Abate Fetel' was increased at 30 and 45 mg L<sup>-1</sup> of Al. APX activity in 'Conference' was increased at 30 and 60 mg L<sup>-1</sup> of Al and in 'Abate Fetel' was increased at 30 mg L<sup>-1</sup> of Al. In the rooting, the percentage of rooting, length and number of roots was higher for quince. The fresh mass of shoot was higher for 'Conference' and for 30 mg L<sup>-1</sup> of Al. The fresh mass of root was higher for 'BA 29' at 15 mg L<sup>-1</sup> of Al. The dry mass of shoot was higher for 'Conference' and for 15 and 30 mg L<sup>-1</sup> of Al. The dry mass of root was higher for 'BA 29' and for 15 mg L<sup>-1</sup> of Al. The nutrient content increased at aluminum. In the 'Abate Fetel' the CAT and APX activity was increased and the SOD activity was decreased at aluminum. On the other hand, in the 'Conference' the CAT activity was decreased at aluminum, the APX was decreased only at 45 mg L<sup>-1</sup> of Al and the SOD activity was increased. As conclusion, the cultivars answered of different form at Al and, in some parameters, the presence of this metal was beneficial.

**Key words:** *In vitro* multiplication. *In vitro* rooting. Acidic soils. Toxicity.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - Percentagem

°C – Graus Celsius

$\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  – Micro mol por metro ao quadro por segundo

$\mu\text{M}$  – Micromolar

AIB – Ácido Indolbutírico

$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$  – Sulfato de alumínio

Al – Alumínio

ASA – Ácido ascórbico

APX – Ascorbato Peroxidase

$\text{Al}^{+3}$  – Alumínio trivalente

BAP – Benzilaminopurina

Ca – Cálcio

Cam – Calmodulina

CAT – Catalase

cm – Centímetro

Cu – Cobre

Dr<sup>a</sup>. – Doutora

Dr. – Doutor

Fe – Ferro

g – Grama

$\text{H}_2\text{O}_2$  – Peróxido de hidrogênio

K – Potássio

$\text{mg L}^{-1}$  – Miligrama por litro

mL – Mililitro

Mg - Magnésio

mM – Milimolar

Mn – Manganês  
MS – Murashige e Skoog  
N – Nitrogênio  
Nm – Nanômetro  
P – Fósforo  
pH – Potencial hidrogeniônico  
PVPP – Polivinilpolipirrolidona  
QL – Quorin e Lepoivre  
RPM – Rotações por minuto  
RS – Rio Grande do Sul  
UFPeI – Universidade Federal de Pelotas  
W – Watts  
Zn – Zinco

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	iv
RESUMO.....	vi
ABSTRACT .....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
SUMÁRIO.....	xvi
LISTA DE TABELAS .....	xiii
LISTA DE FIGURAS .....	xiv
INTRODUÇÃO .....	1
OBJETIVOS .....	9
CAPITULO I - EFEITO DO ALUMÍNIO E ATIVIDADE DE ENZIMAS DO METABOLISMO OXIDATIVO EM BROTAÇÕES DE PEREIRA E MARMELEIRO CULTIVADAS <i>IN VITRO</i> .....	10
INTRODUÇÃO .....	10
MATERIAL E MÉTODOS .....	12
Avaliação da multiplicação da cultura em condições de estresse por alumínio.....	14
Extração das enzimas antioxidantes em pereira .....	14
Determinação da atividade da enzima catalase em pereira.....	15
Determinação da atividade da enzima ascorbato peroxidase em pereira .....	15
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
Avaliação da multiplicação da cultura em condições de estresse por alumínio .....	16
Determinação da atividade das enzimas catalase e ascorbato peroxidase em pereira .....	23
CONCLUSÕES .....	26
CAPITULO II - EFEITO DO ALUMÍNIO NO CRESCIMENTO DAS RAÍZES DE BROTAÇÕES DE PEREIRA E MARMELEIRO CULTIVADAS <i>IN VITRO</i> .....	27
INTRODUÇÃO .....	27

MATERIAL E MÉTODOS.....	29
Avaliação do enraizamento da cultura em condições de estresse por alumínio .....	31
Teor de nutrientes no material vegetal .....	31
Extração das enzimas antioxidantes em pereira .....	32
Determinação da atividade da enzima catalase em pereira.....	32
Determinação da atividade da enzima ascorbato peroxidase em pereira .....	32
Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase em pereira .....	32
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
Avaliação do enraizamento da cultura em condições de estresse por alumínio .....	33
Teor de macronutrientes no material vegetal .....	39
Teor de micronutrientes no material vegetal .....	45
Determinação da atividade das enzimas catalase, ascorbato peroxidase e superóxido dismutase em pereira .....	48
CONCLUSÕES .....	53
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	54
REFERÊNCIAS.....	55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962).....	13
Tabela 2	Composição do meio de cultura QL (QUOIRIN; LEPOIVRE, 1977) modificado por Leblay, Chevreau e Raboin (1991).....	14
Tabela 3	Composição do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962).....	30
Tabela 4	Composição do meio de cultura QL (QUOIRIN; LEPOIVRE, 1977) modificado por Leblay, Chevreau e Raboin (1991).....	31
Tabela 5	Porcentagem de explantes enraizados, número médio de raízes e comprimento médio das raízes em cultivares de pereira e marmeleiro tratados com diferentes concentrações de alumínio durante o enraizamento <i>in vitro</i> . UFPEL, Pelotas, 2009.....	33
Tabela 6	Massa fresca da parte aérea em cultivares de pereira e marmeleiro tratados com diferentes concentrações de alumínio durante o enraizamento <i>in vitro</i> . UFPEL, Pelotas, 2009.....	35
Tabela 7	Massa seca da parte aérea de cultivares de pereira e marmeleiro tratados com diferentes concentrações de alumínio durante o enraizamento <i>in vitro</i> . UFPEL, Pelotas, 2009.....	37
Tabela 8	Massa seca das raízes de cultivares de pereira e marmeleiro tratados com diferentes concentrações de alumínio durante o enraizamento <i>in vitro</i> . UFPEL, Pelotas, 2009.....	38

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Percentagem de explantes brotados de cultivares de pereira e marmeleiro tratados com diferentes concentrações de alumínio durante a multiplicação *in vitro*. UFPEL, Pelotas, 2009..... 16
- Figura 2 Número médio de brotos de cultivares de pereira e marmeleiro tratados com diferentes concentrações de alumínio durante a multiplicação *in vitro*. UFPEL, Pelotas, 2009..... 17
- Figura 3 Comprimento dos brotos de cultivares de pereira e marmeleiro tratados com diferentes concentrações de alumínio durante a multiplicação *in vitro*. UFPEL, Pelotas, 2009..... 18
- Figura 4 Massa fresca de cultivares de pereira e marmeleiro tratados com diferentes concentrações de alumínio durante a multiplicação *in vitro*. UFPEL, Pelotas, 2009.. .....20
- Figura 5 Massa seca de cultivares de pereira e marmeleiro tratados com diferentes concentrações de alumínio durante a multiplicação *in vitro*. UFPEL, Pelotas, 2009. ....21
- Figura 6 Atividade específica da CAT ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  Proteína) na parte aérea de cultivares de pereira tratados com diferentes concentrações de alumínio na multiplicação *in vitro*. UFPEL, Pelotas, 2009. ....23
- Figura 7 Atividade específica da APX ( $\mu\text{mol Ascorbato min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  Proteína) na parte aérea de cultivares de pereira tratados com diferentes concentrações de alumínio na multiplicação *in vitro*. UFPEL, Pelotas, 2009. ....24

Figura 8	Massa fresca da parte aérea de cultivares de pereira e marmeleiro tratados com diferentes concentrações de alumínio durante o enraizamento <i>in vitro</i> . UFPEL, Pelotas, 2009. ....	35
Figura 9	Massa fresca radicular de cultivares de pereira e marmeleiro tratados com diferentes concentrações de alumínio durante o enraizamento <i>in vitro</i> . UFPEL, Pelotas, 2009. ....	36
Figura 10	Massa seca da parte aérea de cultivares de pereira e marmeleiro tratados com diferentes concentrações de alumínio durante o enraizamento <i>in vitro</i> . UFPEL, Pelotas, 2009. ....	37
Figura 11	Massa seca radicular de cultivares de pereira e marmeleiro tratados com diferentes concentrações de alumínio durante o enraizamento <i>in vitro</i> . UFPEL, Pelotas, 2009. ....	38
Figura 12	Teor de macronutrientes na parte aérea de cultivares de pereira e marmeleiro tratados com diferentes concentrações de alumínio no enraizamento <i>in vitro</i> . UFPEL, Pelotas, 2009. ....	40
Figura 13	Teor de micronutrientes na parte aérea de cultivares de pereira e marmeleiro tratados com diferentes concentrações de alumínio no enraizamento <i>in vitro</i> . UFPEL, Pelotas, 2009. ....	45
Figura 14	Atividade específica da CAT ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ Proteína}$ ) na parte aérea de cultivares de pereira tratados com diferentes concentrações de alumínio no enraizamento <i>in vitro</i> . UFPEL, Pelotas, 2009. ....	49
Figura 15	Atividade específica da APX ( $\mu\text{mol Ascorbato min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ Proteína}$ ) na parte aérea de cultivares de pereira tratados com diferentes concentrações de alumínio no enraizamento <i>in vitro</i> . UFPEL, Pelotas, 2009. ....	50
Figura 16	Atividade específica da SOD ( $\text{U mgMF}^{-1}$ ) na parte aérea de cultivares de pereira tratados com diferentes concentrações de alumínio no enraizamento <i>in vitro</i> . UFPEL, Pelotas, 2009. ....	51

## INTRODUÇÃO

### **A fruticultura**

Um dos segmentos mais importantes da agricultura brasileira é a fruticultura. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas, o agronegócio representa, aproximadamente, 21% do total do produto interno bruto (PIB) e é o setor que pode responder mais rapidamente para a geração de emprego no país. (LACERDA, LACERDA, ASSIS, 2004).

O consumo interno de frutas frescas e industrializadas apresentou grande expansão nos últimos anos. Esse mercado tem se caracterizado, ainda, por uma diversificação das espécies e de variedades consumidas, onde as frutas de clima temperado, em geral, apresentam crescimento em volumes e valores comercializados anualmente (JUNQUEIRA; PEETZ, 2003).

A pêra, como as demais frutas de clima temperado, vem apresentando, uma notável expansão de consumo ao longo dos últimos anos. A importação de pêra fresca pelo Brasil passou de 137 mil toneladas em 2007, para 143 mil toneladas em 2008 e até julho de 2009 já estava em 97 mil toneladas, onde a maioria é importada da Argentina, Estados Unidos, Uruguai e Chile, o que corresponde cerca de 90% da sua disponibilidade interna, ou seja, fundamentalmente dependente da importação para atender o mercado interno. Tal situação tem posicionado o Brasil como o segundo maior importador de pêra no mercado mundial (JUNQUEIRA; PEETZ, 2003; NAKASU, 2003; PETRI, 2008; GUTIERREZ, 2009).

A variedade Abate Fetel é uma das mais apreciadas na Europa, sendo a variedade com a maior cotação neste mercado. Possui uma polpa branca relativamente fina (amanteigada), consistente, suculenta e agradável para o consumo, ainda que não propriamente madura. Essa variedade é bem apta para a alta densidade e a fruta, sendo adequadamente conservada, pode ser mantida por

ate 7 meses em frigoconservacao. É uma variedade com um grande potencial para a regioao sul do Brasil (AYUB; GIOPPO, 2009).

A Conference é a pêra mais produzida na Europa e possui uma grande aceitação em praticamente todo continente. Possui uma polpa muito doce, de consistência amanteigada e muito suculenta. É uma variedade muito produtiva e com uma adaptabilidade muito grande, sendo produzida tanto nos climas mais quentes até os locais mais frios. No Brasil, essa variedade está sendo testada já há alguns anos, mas possui problemas de superação de dormência e de frutificação (PERAZZOLO, 2008).

O cultivo da pêra pode significar uma alternativa de diversificação econômica importante (JUNQUEIRA; PEETZ, 2003). Porém, o Brasil possui uma pequena área de plantio de pereira e por isso, o consumo está baseado na importação. A estagnação da área plantada deve-se à baixa qualidade e à baixa produtividade obtida até o momento (NAKASU; FAORO, 2003).

Para Marangoni e Malaguti (2002), a utilização de marmeleiro como porta-enxerto tem representado um fator de grande expansão na cultura da pereira, principalmente em função da notável redução de vigor que proporciona a cultivar copa. (SANSVINI, 1994). O porta-enxerto é a porção da planta que forma o sistema radicular e é comumente utilizado quando as condições de solo são adversas ao desenvolvimento radicular da variedade copa. Essas adversidades podem ser de ordem física, tais como solos de baixa fertilidade, muito úmidos, ou biológica, tais como fungos e pragas (nematóides, filoxera, pérola-da-terra) (QUEZADA; NAKAZU; HERTER, 2003), caracterizando os solos predominantes nas regiões de cultivo da pereira no Sul do Brasil (BASSO; FREIRE; SUZUKI, 2003).

Os marmelos que atualmente vem se mostrando mais adaptados são o BA 29, Marmelo Cydo, Marmelo Adams e Marmelo C, em ordem decrescente de vigor (AYUB; GIOPPO, 2009).

O marmeleiro 'BA29' é de fácil propagação e apresenta um aparato radicular bem desenvolvido, proporcionando um bom suporte às plantas, por isso adaptável a solos pesados e argilosos, e solos com elevado teor de calcário, sendo menos suscetível a clorose. (LORETI; GIL 1994; COLOMBO; NÉRI, 2003).

O marmeleiro 'MC' é o porta-enxerto marmeleiro mais ananizante, sendo possível plantios em altas densidades (CAMPBELL, 2003). É bastante sensível a

clorose, exigente em nutrição e irrigação. Não suporta frio excessivo. Sistema radicular é bastante superficial (LORETI; GIL, 1994).

No entanto, essa cultura apresenta problemas, pois mesmo que o uso de plantas enxertadas seja uma prática comum na fruticultura, ressalta-se a dificuldade de pouca afinidade entre enxerto e porta-enxerto (FACHINELLO et al., 1999). Além dessa incompatibilidade de enxertia, existe a morte de plantas. Os marmeleiros provocam, ainda, maior debilidade quanto ao crescimento e vigor, o que coloca em dúvida a sua utilização como porta-enxerto de pereira (CAMELLATO, 2003).

Diante de tais dificuldades, o cultivo da pereira pode ser realizado através de mudas autoenraizadas; adequadas para pomares de média-baixa densidade e em solos com baixa fertilidade. Estes sistemas de propagação podem resolver o problema de incompatibilidade com a cultivar copa. As principais vantagens no uso de mudas autoenraizadas são a ausência de incompatibilidade de enxertia, grande robustez e alta produtividade. Em contrapartida, no entanto, há um elevado vigor, que não é interessante para a fruticultura que visa plantios adensados, e um longo período de juvenilidade nestas plantas (COLOMBO; NÉRI, 2003).

## **O alumínio**

O Al é o metal mais abundante e o terceiro elemento mais comum na crosta terrestre, após o oxigênio e o silício, compreendendo aproximadamente 7% da sua massa total (MA; RYAN; DELHAIZE, 2001; YAMAMOTO et al., 2002; BURKHARDT et al., 2008).

O conteúdo total de Al no solo varia de 1 até 25%, e isto é determinado por fatores naturais e antropogênicos, tais como a fertilização com nitrogênio, fósforo e potássio, bem como, a emissão de substâncias ácidas e formadoras de ácidos emitidas para atmosfera principalmente por indústrias e veículos mecânicos. Estas substâncias encontram seu caminho para o solo na forma de chuvas ácidas e causam forte acidificação da solução do solo e liberam íons de Al, em uma forma facilmente absorvida pelo sistema radicular das plantas (KONARSKA, 2010).

Assim, as raízes das plantas estão sempre expostas a alguma forma de Al. No entanto, a maioria do Al ocorre na forma de óxidos e aluminossilicatos, que não são tóxicos para as plantas. Em solos não-ácidos, o Al está complexado em compostos insolúveis, mas, quando os solos tornam-se ácidos, o Al é solubilizado

para um cátion trivalente tóxico, o  $\text{Al}^{3+}$ . Sabe-se que o teor de  $\text{Al}^{3+}$  na solução do solo é baixo (em geral,  $< 0,1 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ). Mesmo assim seu efeito tóxico é manifestado, pois o  $\text{Al}^{3+}$  passa para a solução em substituição ao absorvido pelas raízes. A toxicidade tem sido reconhecida como o maior fator limitante da produtividade de plantas em solos ácidos, os quais representam de 30 a 40% das terras cultiváveis do planeta (DEGENHARDT et al., 1998; MA; RYAN; DELHAIZE, 2001; TEDESCO; BISSANI, 2004; RAVEN, 2007). O Al é capaz de hidrolisar a água e liberar íons hidrogênio que reduz e mantêm o pH da solução do solo ácido (BOHNEN, 2000).

Nas raízes das plantas, o Al se acumula predominantemente nas células localizadas na zona de alongamento e, mesmo em concentrações micromolares, o  $\text{Al}^{3+}$  pode inibir o crescimento das raízes, em poucos minutos ou horas, em muitas espécies de importância agrícola (MA; RYAN; DELHAIZE, 2001; YAMAMOTO et al., 2002; BASSO et al., 2007).

Os efeitos da toxidez de Al nas plantas podem ser observados através da redução do desenvolvimento das raízes, devido à inibição da divisão celular; engrossamento e pouca ramificação das raízes, devido à desorganização dos meristemas; escurecimento das raízes, devido à necrose dos tecidos; acumulação de Al no protoplasma e núcleo das células do córtex das raízes; além de inibir a absorção e translocação de fósforo e cálcio para a parte aérea (KAMINSKI; RHEINHEIMER, 2000; ANGHINONI; MEURER, 2004). Como consequência, a absorção de nutrientes e água é prejudicada (KAMINSKI; RHEINHEIMER, 2000).

Estes distúrbios prejudicam o desenvolvimento da parte aérea da planta, que pode apresentar sintomas de deficiência de fósforo, devido à falha na sua translocação (ANGHINONI; MEURER, 2004) e causar graves anomalias ao sistema radicular, com modificações nos padrões de absorção e o metabolismo de nutrientes (SALVADOR et al., 2000).

A absorção de um nutriente depende de sua concentração em torno da raiz. Em condições reais podem existir fatores que limitam a capacidade das plantas de absorverem os nutrientes do solo, mesmo que estes se encontrem disponíveis em quantidades apreciáveis. Tais fatores são a aeração e temperatura do solo, o antagonismo entre nutrientes e as substâncias tóxicas (ANGHINONI; MEURER, 2004).

O papel do Al e sua interação com elementos nutrientes foram, por muitos anos, uma parte dos estudos da nutrição das plantas, e desta forma tem se tornado uma importante área da pesquisa agrônômica (BASSO; FREIRE; SUZUKI, 2003).

A fertilidade do solo está centrada na eficiência com que as plantas adquirem e utilizam os nutrientes essenciais, e depende do sincronismo entre a capacidade do solo em fornecê-los em quantidades e taxas suficientes, e da capacidade que as plantas possuem em absorvê-los. Os solos ácidos, então, são considerados de baixa fertilidade, pois as quantidades de alguns nutrientes, como cálcio, magnésio, fósforo e nitrogênio, são insuficientes, e a presença do Al interfere no processo de absorção das plantas, já que ele inibe diretamente o crescimento radicular (KAMINSKI; RHEINHEIMER, 2000).

Sempre que há referência à baixa fertilidade de solos ácidos, o Al tem sido apontado como o maior limitador de sua produtividade, porém a presença do Al na solução do solo não interfere considerável e diretamente na disponibilidade dos nutrientes, mas na capacidade de absorção das plantas (KAMINSKI; RHEINHEIMER, 2000).

Embora a toxidez do Al tenha sido identificada como um problema associado à acidez dos solos há mais de 70 anos, o conhecimento sobre os principais locais, os mecanismos pelos quais esse metal afeta o metabolismo vegetal e o mecanismo responsável pela tolerância ao Al permanecem em grande parte ainda no campo das especulações, não tendo sido bem elucidados (MA; ZHENG; MATSUMOTO, 1997; YAMAMOTO et al., 2002; MALDANER, 2008). Os resultados de trabalhos sobre os efeitos prejudiciais do Al em solos ácidos ainda são incipientes (BURKHARDT et al., 2008).

O estresse oxidativo é um importante componente da reação das plantas a níveis tóxicos de Al (RICHARDS et al., 1998), causando a ativação de enzimas antioxidantes (SCHUCH et al., 2008).

Durante a evolução das plantas, muitas desenvolveram mecanismos complexos de resistência à toxidez de Al até hoje não bem explicados e o grau de tolerância varia extensivamente com a espécie. Até o momento, sabe-se que as plantas podem ser tolerantes por serem capazes de tolerar altos níveis de Al no simplasto ou por se desintoxicarem do mesmo após sua entrada na célula. Como exemplo de plantas tolerantes pode-se citar a samambaia e o capim-barba-de-bode,

que conseguem sobreviver em solos com alto teor deste elemento. (ECHART; CAVALLI-MOLINA, 2001; ANGHINONI; MEURER, 2004).

### **A cultura *in vitro***

Devido às limitações da seleção a campo e em solo sob condições controladas, a maioria dos trabalhos de seleção de cultivares tolerantes ao Al tem sido conduzidas com metodologias que utilizam solução de nutrientes. Nessa abordagem, diferentes técnicas têm sido empregadas para avaliar a tolerância e a sensibilidade ao Al. O critério mais utilizado para medir a toxicidade ao Al é a comparação do crescimento e/ou peso das raízes de plantas crescidas em solução nutriente com pH ácido e uma concentração adequada de Al com plantas controle crescidas na ausência de Al (ECHART; CAVALLI-MOLINA, 2001).

Uma técnica eficaz em estudos que objetivam avaliar a influência de fatores bióticos e abióticos nos aspectos fisiológicos, morfológicos, bioquímicos e anatômicos das espécies vegetais, bem como a tolerância ao Al, é a cultura *in vitro*, que compreende várias técnicas que utilizam o cultivo asséptico em laboratório, sendo a micropropagação uma delas (HARTMANN et al., 1997). A cultura de tecidos difere dos métodos tradicionais, principalmente nas condições sob as quais a propagação é efetuada, mas não difere destes quanto a seus princípios. As diferenças referem-se ao fato da micropropagação empregar propágulos pequenos, controle asséptico, controle do meio ambiente e rápida multiplicação (FACHINELL; HOFFMANN; NACHTIGAL, 2005; TREVISAN; ANTUNES; GONÇALVES, 2004).

O material vegetal utilizado para a propagação *in vitro* fica submetido a condições controladas de luz, fotoperíodo e temperatura, interagindo com substâncias orgânicas (SCHUCH; ERIG, 2005), nesse contexto é possível que as plantas também sejam submetidas a condições de estresse, permitindo o acompanhamento do seu crescimento e desenvolvimento em laboratório.

Poucos trabalhos relatam o efeito do Al em plantas cultivadas *in vitro* e sua ação na parte aérea, já que a maioria descreve os efeitos do metal nas raízes (BASSO et al., 2003; MALDANER, 2008), entre eles podem-se citar Basso et al. (2003) que analisaram o efeito do Al no crescimento de brotações de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivadas *in vitro* e concluíram que a indisponibilização de nutrientes como cálcio, fósforo e potássio, causada pela adição de concentrações

crecentes de Al ao meio de cultura, alterou o metabolismo celular e isso ocasionou alterações morfológicas na parte aérea, acúmulo de massa seca e redução de proteínas solúveis totais, Schuch et al. (2009) que observaram o efeito do Al em marmeleiro 'BA-29' cultivado *in vitro* e que concluíram que esse cultivar é negativamente afetado pelo Al e pH baixo, mas é capaz de ativar os sistemas de defesa e Maldaner (2008) que estudou a toxidez de Al em plântulas de *Pfaffia* cultivadas *in vitro* e concluiu que a presença de baixas concentrações de Al (50 mg L<sup>-1</sup>) no meio de cultura estimula o crescimento dessas plântulas. Sabe-se que a adição de concentrações crescentes de Al altera o equilíbrio iônico do meio de cultura, o que resulta em alterações morfológicas nas brotações e diminuição do pH (BASSO et al., 2007).

### **Os genótipos tolerantes ao alumínio**

São conhecidas diversas técnicas de correção do solo, sendo algumas voltadas para a correção de solos ácidos (WADT, 2002). Na maioria das vezes, o problema é contornado com a aplicação de calcário no solo, juntamente com a utilização de espécies ou variedades tolerantes à toxicidade de Al (BRACCINI; MARTINEZ; BRACCINI, 2000; CUSTÓDIO et al., 2002). Entretanto, a aplicação de calcário na superfície do solo, ou seja, na camada arável, não soluciona os problemas de acidez nas camadas inferiores, não sendo efetivo na correção da acidez do subsolo devido à baixa mobilidade dos componentes solúveis do calcário. Tal condição se torna uma opção economicamente inviável para os produtores menos capitalizados e apresenta problemas técnicos (ECHART; CAVALLI-MOLINA, 2001; HARTWIG, 2007; OLIVEIRA, 2002; BISSANI; GIASSON; CAMARGO, 2004). Outro fator limitante é de que em áreas distantes das fontes de calcário o custo de aplicação se torna alto, tornando-a inviável economicamente (SILVA et al., 2006).

Portanto, pelo fato da utilização de corretivos da acidez do solo não ser a estratégia mais viável em muitas situações de solos ácidos (por razões técnicas e econômicas), o desenvolvimento de genótipos tolerantes ao Al tem sido o caminho mais focado (OLIVEIRA, 2002; PEREIRA et al., 2003; HARTWIG, 2007).

Os efeitos do Al no crescimento do sistema radicular das plantas vêm sendo estudados em várias espécies e constitui uma das principais características na classificação de genótipos quanto à tolerância a esse metal (MALDANER, 2008).

A obtenção de cultivares tolerantes à toxicidade do Al tem despertado o interesse de muitas áreas da pesquisa agrícola, particularmente quando se pretende explorar eficientemente solos com acidez subsuperficial, com elevada concentração de Al e de difícil correção com manejo químico (PATERNIANI; FURLANI, 2002).

Os cultivares podem apresentar diferenças quando submetidos a condições de baixo pH. Cultivares com maior absorção de nutrientes tendem a ser mais tolerantes a condições ácidas (CUSTÓDIO et al., 2002).

Assim, o emprego de genótipos adaptados às condições de solo ácido conjuntamente com a adição de calcário e adubações racionais são as estratégias de maior potencial para a utilização racional dos solos com elevados teores de Al trocável (KOCHIAN, 1995).

## **OBJETIVOS**

Estudar o efeito do Al na multiplicação e enraizamento *in vitro* de cultivares de pereira Conference e Abate Fetel e cultivares de marmeleiro MC e BA 29.

Analisar a atividade de enzimas envolvidas no estresse oxidativo, como Catalase, Ascorbato peroxidase e Superóxido dismutase, de plantas de pereira e marmeleiro submetidas a concentrações crescentes de Al.

Avaliar o teor de nutrientes da massa seca da parte aérea de plantas cultivadas em meio de cultivo contendo Al.

## **CAPITULO 1**

### **EFEITO DO ALUMÍNIO E ATIVIDADE DE ENZIMAS DO METABOLISMO OXIDATIVO EM BROTAÇÕES DE PEREIRA E MARMELEIRO CULTIVADAS *IN VITRO***

#### **INTRODUÇÃO**

A produção de pêras no Brasil ainda é incipiente, principalmente pela pouca pesquisa existente sobre a cultura. O cultivo comercial de pereiras ainda é insignificante, já que a produção não atinge 10% do total consumido (NAKASU, 2003). Com a falta de produção, a importação do produto colocou a pêra como a fruta importada mais consumida pelos brasileiros no ano de 2005. Para Marangoni e Malaguti (2002), a utilização de marmeleiro como porta-enxerto tem representado um fator de grande expansão na cultura da pereira, principalmente em função da notável redução de vigor que proporciona a cultivar copa. Porém um dos problemas apresentados por esta cultura é a incompatibilidade entre porta-enxertos e cultivares-copa. Isto então pode ser minimizado pela utilização de cultivares auto-enraizados, como é realizado em alguns países que apresentam solos menos férteis. As regiões de cultivo de pereira no sul do Brasil apresentam geralmente solos muito ácidos e de baixa fertilidade natural.

Um elemento presente no solo que afeta negativamente a maioria dos vegetais e diminui o pH do solo para números baixos entre 4,5 a 5,0 é o alumínio (Al), sendo o principal fator de toxidez na maioria dos solos. O estresse oxidativo é um importante componente das respostas das plantas a níveis tóxicos de Al (RICHARDS et al., 1998), pois causa a ativação de enzimas antioxidantes. No Brasil cerca de 205 milhões de hectares apresentam altas concentrações de Al (DE LA FUENTE e ESTRELLA, 1999) e onde a correção da acidez do solo é de difícil

execução, o uso de cultivares tolerantes a este mineral pode ser a solução para este problema.

Poucos trabalhos relatam o efeito do Al na parte aérea em plantas cultivadas *in vitro*. Segundo Massot, Poschenrieder e Barceló (1992), apenas o índice de tolerância baseado na alongação radicular não deve ser um indicador seguro da sensibilidade ao Al. O crescimento da parte aérea deve ser também considerado, uma vez que danos no sistema radicular podem causar menor crescimento da parte aérea. Sabe-se também que existe uma relação bastante forte entre a toxidez ao Al e o estresse oxidativo.

Desta forma, o presente trabalho visou avaliar *in vitro* os efeitos do Al e pH ácido na multiplicação de brotações de pereira e marmeleiro, com particular atenção a ativação das enzimas catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) em pereira, envolvidas no estresse oxidativo.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Micropropagação de Plantas Frutíferas do Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel/UFPel e no Laboratório de Metabolismo Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia/UFPel em Pelotas - RS.

O material vegetal utilizado foram explantes constituídos de segmentos nodais ( $\pm 1,5$  cm) provenientes de brotações de pereira, cultivares Conference e Abate Fetel, e de marmeleiro, cultivares MC e BA-29, cultivadas *in vitro*, oriundas da Itália e subcultivadas 10 vezes.

O meio de cultura utilizado para pereira foi o QL (QUOIRIN; LEPOIVRE, 1977) modificado por Leblay, Chevreau e Raboin (1991) (Tabela 1) e para marmeleiro foi o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) (Tabela 2) acrescido de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de Benzilaminopurina (BAP). Diferentes concentrações de Al foram adicionadas ao meio de cultura, sob a forma de  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ , nas seguintes concentrações: 0 com pH 5,7 que corresponde ao pH utilizado para essas culturas (controle) e 0, 15, 30, 45 e  $60 \text{ mg L}^{-1}$  Al (pH 4,0). O cálculo das concentrações do metal utilizado foi baseado apenas no teor de Al presente no sal ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ ).

Houve necessidade de se trabalhar com meio de cultura líquido, pois ao se adicionar o Al e manter o pH ácido (4,0) não ocorria a geleificação do meio; assim utilizou-se 1 g de algodão hidrófilo como sustentação das brotações. Em cada frasco foram colocados 30 mL do meio de cultura e 5 explantes. As culturas permaneceram em sala de crescimento com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de  $27 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com fatorial 4 cultivares x 6 concentrações e constou de quatro repetições com cinco explantes por repetição.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro ou analisados por regressão polinomial, utilizando o programa estatístico WINSTAT 1.0 (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2003) desenvolvido na UFPel, onde os dados expressos em porcentagem foram transformados em arco seno da raiz quadrada de  $x/100$  e os dados numéricos foram transformados em raiz quadrada de  $x+0,5$ .

Tabela 1: Composição do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962).

<b>Componentes</b>	<b>Concentração (mg L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Macronutrientes</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KNO <sub>3</sub>	1900
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	441
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
Na <sub>2</sub> EDTA	37,25
KI	0,83
<b>Micronutrientes</b>	
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,85
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16,9
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
<b>Vitaminas</b>	
Ácido Nicotínico	0,5
Cloridrato de piridoxina	0,5
Cloridrato de tiamina	0,5
Glicina	2,0

Tabela 2: Composição do meio de cultura QL (QUOIRIN; LEPOIVRE, 1977) modificado por Leblay, Chevreau e Raboin (1991).

<b>Componentes</b>	<b>Concentração (mg L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Macronutrientes</b>	
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1133,77
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	405
KNO <sub>3</sub>	1800
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	355,79
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	600
<b>Micronutrientes</b>	
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,76
KI	0,08
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25
CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
FeNa <sub>2</sub> EDTA. 2H <sub>2</sub> O	36,70
<b>Vitaminas</b>	
Tiamina	1
Ácido Nicotínico	1
Piridoxina	1
Glicina	4

## Ensaio realizados

### Avaliação da multiplicação da cultura em condições de estresse por alumínio

Aos 60 dias, foi feita a contagem dos explantes brotados, do número de brotações por explante e foi medido o comprimento, em centímetros (cm), de cada brotação. Após, o material vegetal foi pesado para obtenção da massa fresca e posteriormente seco em estufa de circulação forçada a 80°C durante 3 dias, para obtenção da massa seca, ambas expressas em miligramas (mg).

### Extração das enzimas antioxidantes em pereira

Para a extração das enzimas antioxidantes dos cultivares de pereira, visto que os protocolos não se ajustaram aos cultivares de marmeleiro, foram macerados 200 mg de tecido foliar com pistilo e mortar e homogeneizadas em polivinilpolipirrolidona (PVPP) 20% acrescido do seguinte tampão de extração: fosfato de potássio 100 mM , pH 7,8, EDTA 0,1 mM e ácido ascórbico (ASA) 1 mM . Os homogeneizados foram centrifugados a 13.000 rpm, por 20 minutos a 4°C. O

sobrenadante foi coletado para as análises enzimáticas da CAT e APX (BIEMELT; KEETMAN; ALBRECHT, 1998).

#### **Determinação da atividade da enzima CAT em pereira**

A atividade da CAT foi avaliada pelo decréscimo na absorvância a 240 nm, durante 2 minutos, em um tampão de incubação contendo fosfato de potássio 100 mM , pH 7,0 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 12,5 mM , incubado a 28°C, em que foi monitorado o consumo do peróxido de hidrogênio (HAVIR; MCHALE, 1987).

#### **Determinação da atividade da enzima APX em pereira**

A atividade da APX foi realizada segundo Nakano e Asada (1981), monitorando-se a taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm. O tampão de incubação foi composto por fosfato de potássio 100 mM , pH 7,0, ácido ascórbico 0,5 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,1 mM .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Avaliação da multiplicação da cultura em condições de estresse por alumínio

Houve interação significativa entre cultivar e concentração para porcentagem de explantes brotados. Como pode-se observar na Figura 1, os cultivares de marmeleiro não foram influenciados pela presença de Al, mantendo 100% de explantes brotados em todos os tratamentos. Os cultivares não diferiram significativamente em todos os tratamentos. Com relação a concentração de Al, a ausência de Al e pH ácido e as concentrações de 30, 45 e 60 mg L<sup>-1</sup> de Al não diferiram significativamente entre os cultivares e na concentração de 15 mg L<sup>-1</sup> de Al o cultivar Conference apresentou menos porcentagem de explantes brotados.

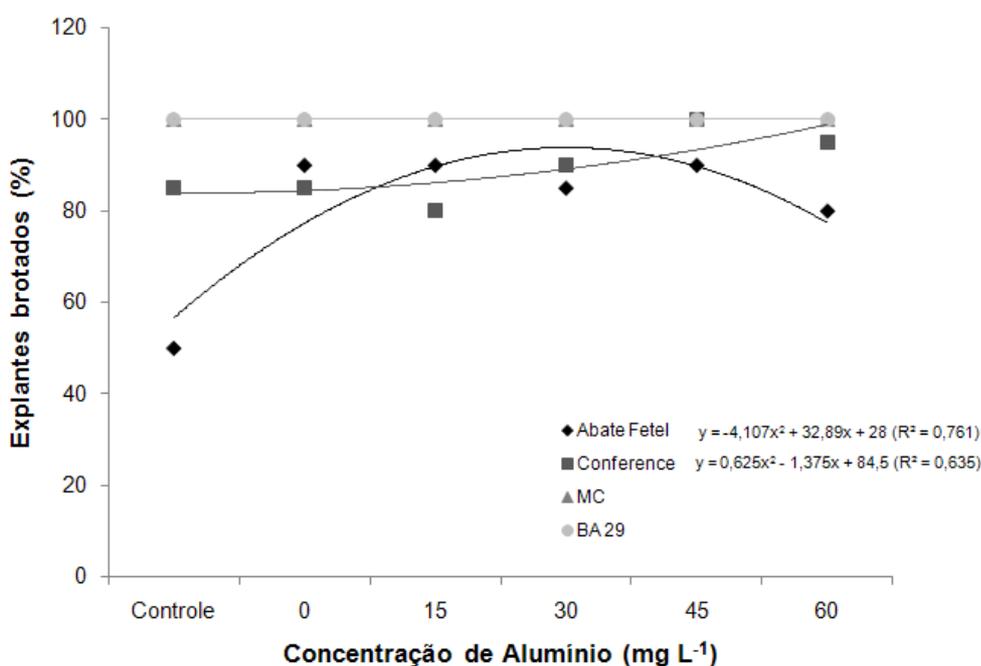


Figura 1: Porcentagem de explantes brotados de cultivares de pereira e marmeleiro tratados com diferentes concentrações de alumínio durante a multiplicação *in vitro*. UFPEL, Pelotas, 2009.

Para o número médio de brotos a interação foi significativa para os efeitos entre cultivar e concentração. Observa-se na Figura 2 que o Al diminuiu significativamente o número de brotos dos cultivares MC e Abate Fetel somente na concentração de 60 mg L<sup>-1</sup> de Al, ou seja, passou a ter efeito negativo somente na concentração mais alta testada. Schuch et al. (2008) trabalhando com marmeleiro cultivar BA 29 *in vitro* notaram que o Al reduziu a proliferação a partir de 30 mg L<sup>-1</sup>, diferente do que se observou nesse trabalho onde este cultivar, e também o cultivar de pereira Conference, não foi afetado pela presença de Al. Na concentração de 45 mg L<sup>-1</sup> de Al os cultivares não diferiram significativamente. Já na ausência de Al e pH ácido e na concentração de 30 mg L<sup>-1</sup> de Al o cultivar BA-29 foi o que apresentou menor número de brotos diferindo significativamente dos demais. Nas concentrações de 15 mg L<sup>-1</sup> e 60 mg L<sup>-1</sup> de Al, os cultivares BA- 29 e Abate Fetel e MC e Abate Fetel, respectivamente, apresentaram menor número de brotos diferindo significativamente.

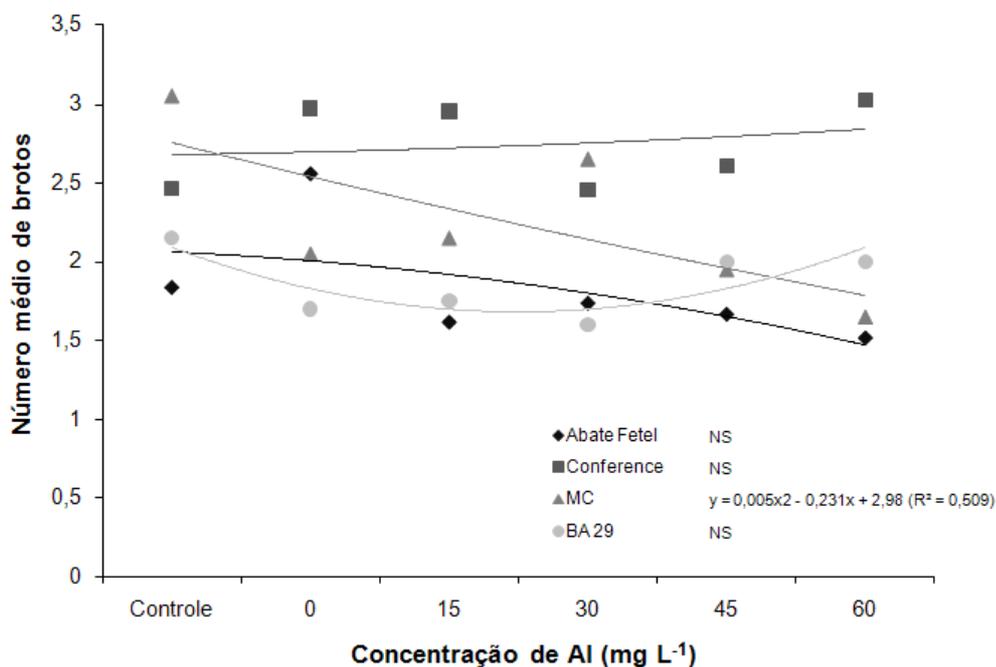


Figura 2: Número médio de brotos de cultivares de pereira e marmeleiro tratados com diferentes concentrações de alumínio durante a multiplicação *in vitro*. UFPEL, Pelotas, 2009.

Com relação ao comprimento médio das brotações, também houve interação entre cultivar e concentração (Figura 3). Os cultivares de marmeleiro apresentaram

uma diminuição significativa a partir da concentração de 45 mg L<sup>-1</sup> de Al, mantendo o comprimento médio dos brotos nas concentrações mais baixas de Al. Os cultivares de pereira não diferiram significativamente, concluindo-se que o Al não teve efeito nesses cultivares. Nas concentrações de 45 e 60 mg L<sup>-1</sup> de Al os cultivares não diferiram significativamente. Na ausência de Al e pH ácido e nas concentrações de 15 e 30 mg L<sup>-1</sup> de Al o cultivar BA-29 apresentou maior comprimento dos brotos diferindo significativamente dos demais, exceto na concentração de 30 mg L<sup>-1</sup> de Al onde não diferiu do cultivar Abate Fetel.

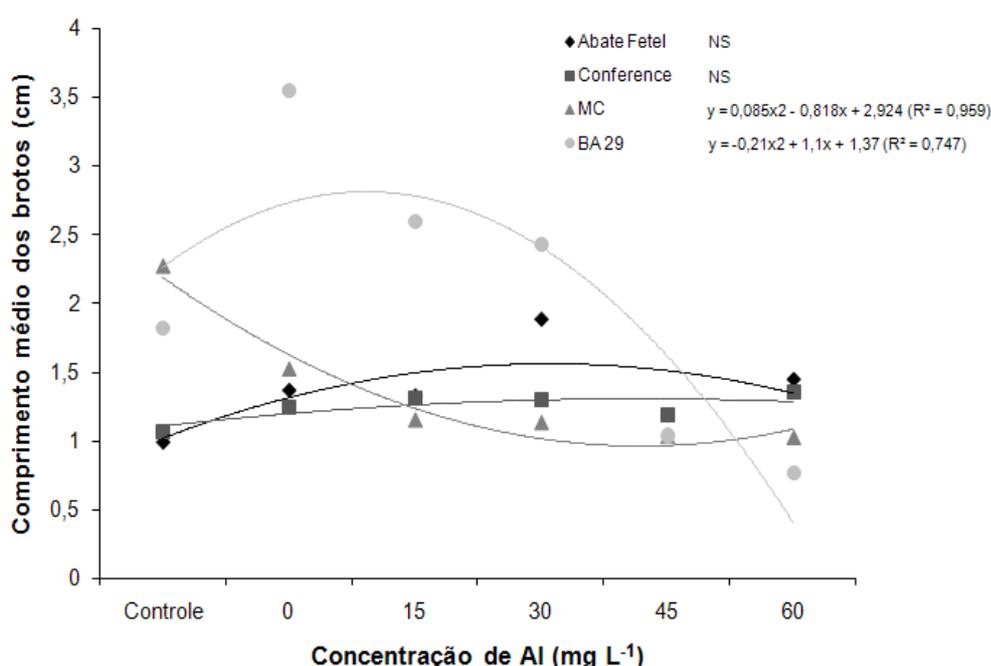


Figura 3: Comprimento médio dos brotos de cultivares de pereira e marmeleiro tratados com diferentes concentrações de alumínio durante a multiplicação *in vitro*. UFPEL, Pelotas, 2009.

O efeito inibitório do Al em concentrações elevadas era esperado e também foi observado por outros autores, como exemplo, em trabalho sobre toxidez de Al em genótipos de *Pfaffia in vitro*, Maldaner (2008) observou que a altura média das brotações nos dois acesso de *P. glomerata* foi inibida por concentrações de Al superiores a 50 mg L<sup>-1</sup> de Al. Resultados semelhantes também foram observados por Kidd e Proctor (2000) no comprimento da parte aérea em cultivares de *Betula pendula*, onde concentrações maiores que 35 mg L<sup>-1</sup> reduziram o crescimento. Para Dantas et al. (2001) um dos principais efeitos do Al na parte aérea de porta-enxertos

somaclonais de macieira foi o encurtamento dos internódios, resultando em altura média menor, o que pode também ter ocorrido com os cultivares de marmeleiro.

Salvador et al. (2000) trabalhando com goiabeira observou que as concentrações de Al acima de  $15 \text{ mg L}^{-1}$  ocasionaram menor altura das plantas e os efeitos das concentrações de Al para altura da planta obtidos no tratamento sem adição de Al (controle), foram significativamente menores dos que os das plantas presentes em solução de 5 e  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de Al, porém superiores àqueles encontrados nas plantas submetidas às concentrações de 20 e  $25 \text{ mg L}^{-1}$ .

Segundo Helyar (1978), as concentrações crescentes de Al causam um declínio exponencial na produção da parte aérea. Muitos pesquisadores acreditam que os efeitos da fitotoxicidade de Al podem ser atribuídos diretamente a uma deficiência de fósforo induzida pelo Al (FOY, 1992). Porém, quando se usam espécies mais tolerantes ao Al, nota-se um estímulo na produção em baixas concentrações de Al, mas o declínio volta a aparecer em altas concentrações.

Veloso et al. (1995) observaram que houve a tendência de maior altura das plantas de pimenteira do reino nas concentrações de até  $20 \text{ mg L}^{-1}$  de Al na solução, a altura das plantas nas concentrações de 20 a  $40 \text{ mg L}^{-1}$  de Al foram maiores que a testemunha. Kotzé (1974), estudando seis porta-enxertos de macieira, em solução nutritiva, observou que em cinco deles o crescimento das brotações foi inibido pela presença do Al, enquanto que a outra cultivar apresentou nessa condição o seu melhor crescimento com Al.

A massa fresca e massa seca total apresentaram interação significativa entre cultivar e concentração. Observa-se na Figura 4, que para massa fresca total os cultivares Conference, BA 29 e Abate Fetel não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos. Resultados semelhantes foram obtidos por Maldaner (2008), onde as biomassas fresca e seca dos órgãos e do total das plântulas do acesso BRA de *Pfaffia glomerata in vitro* foram maiores na presença de  $50 \text{ mg L}^{-1}$  de Al, enquanto as concentrações maiores não apresentaram efeito quando comparado ao controle. A cultivar MC teve sua massa fresca total diminuída significativamente em todos os tratamentos com Al. Na ausência de Al e pH ácido e na concentração de  $30 \text{ mg L}^{-1}$  de Al, os cultivares não diferiram estatisticamente entre si. Nas concentrações de 45 e  $60 \text{ mg L}^{-1}$  de Al o cultivar MC obteve menor massa fresca diferindo significativamente dos outros cultivares. Já na concentração

de 15 mg L<sup>-1</sup> de Al os cultivares Abate Fetel e MC apresentaram menos massa fresca diferindo significativamente.

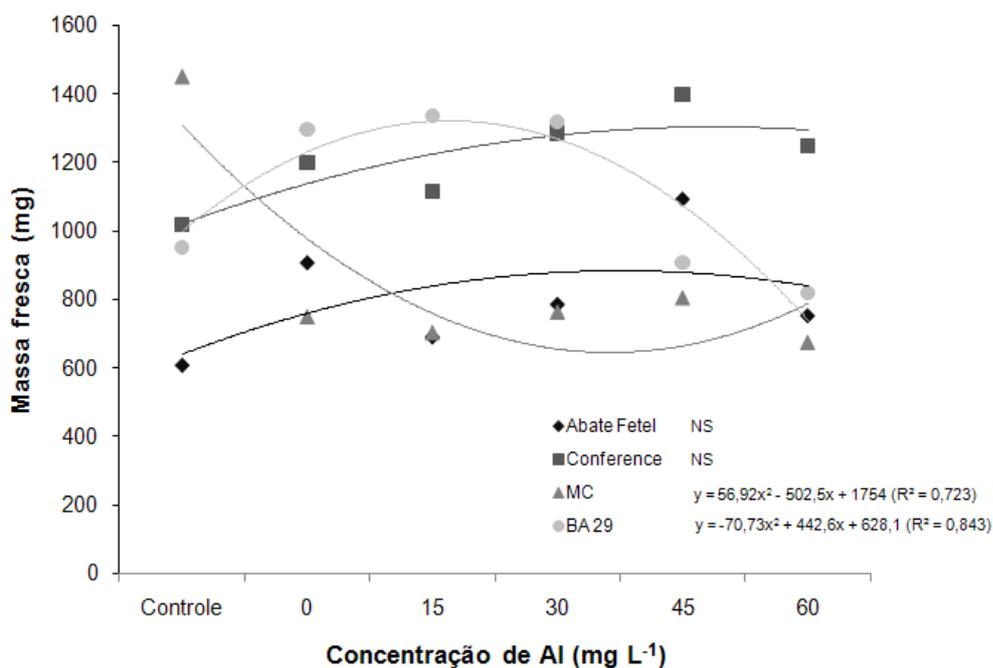


Figura 4: Massa fresca de cultivares de pereira e marmeleiro tratados com diferentes concentrações de alumínio durante a multiplicação *in vitro*. UFPEL, Pelotas, 2009.

Já para massa seca, os cultivares de pereira continuaram não apresentando diferença significativa. O cultivar MC na presença de 60 mg L<sup>-1</sup> de Al apresentou uma diminuição significativa da massa seca total e a presença de Al até a concentração de 45 mg L<sup>-1</sup> proporcionou um aumento significativo da massa seca total do cultivar BA 29 (Figura 5). Na ausência de Al e nas concentrações de 15 e 30 mg L<sup>-1</sup> de Al os cultivares Conference e BA-29 obtiveram maior massa seca, diferindo significativamente dos demais cultivares, já nas concentrações de 45 e 60 mg L<sup>-1</sup> de Al somente o cultivar MC apresentou menor massa fresca.

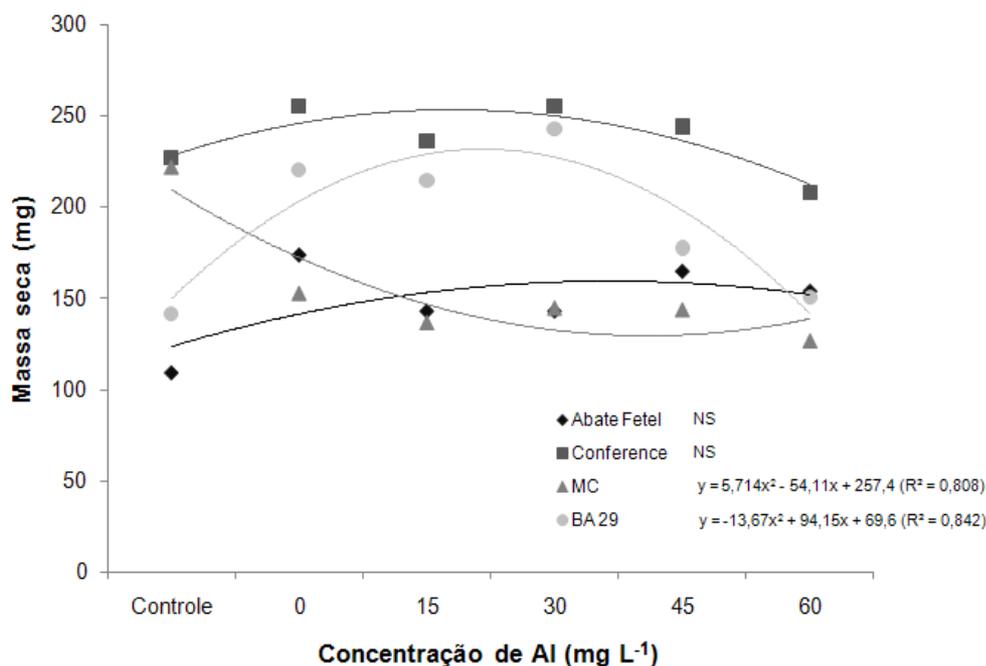


Figura 5: Massa seca de cultivares de pereira e marmeleiro tratados com diferentes concentrações de alumínio durante a multiplicação *in vitro*. UFPEL, Pelotas, 2009.

Alves et al. (2001) notaram que a presença do Al no meio de cultivo provocou uma redução na produção de massa seca total para cássia-verrugosa, embora para o ipê-mirim a produção de massa seca foi afetada apenas na concentração de 20 mg L<sup>-1</sup>.

Sousa (1991) não verificou efeito negativo do Al em plantas de seringueira com relação à produção de massa seca total, exatamente como se observou nos cultivares de pereira. Em trabalho realizado por Basso et al. (2003) o resultado da curva de crescimento baseado na massa seca das brotações de eucalipto submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações de Al *in vitro* mostrou que houve aumento de massa para todos os tratamentos, durante o período de cultivo. Diante desses e outros resultados, Villa et al. (2008) supõe que o Al no meio induz mecanismos bioquímicos e fisiológicos na planta que neutralizam a toxicidez por H<sup>+</sup> e Al<sup>+3</sup>.

Dantas et al. (2001) observaram que o Al reduziu significativamente a massa seca total dos porta-enxertos de macieira, exceto para o somaclone M.939, que apresentou aumento da massa seca em presença do Al. Embora a presença do Al no tecido vegetal cause danos fisiológicos e bioquímicos por vezes irreversíveis e intrinsecamente relacionados ao crescimento de plantas (PEGTEL, 1986), de acordo

com os resultados obtidos o efeito do Al sobre a massa seca pode estar relacionado à própria absorção dos nutrientes.

Embora o Al seja normalmente considerado como um elemento tóxico para as plantas cultivadas existem vários trabalhos que demonstram sua essencialidade para algumas espécies (MACHADO, 1997). Segundo Marschner (1990), sob certas condições e para espécies de plantas com alta tolerância ao Al, baixos níveis deste metal podem causar efeitos benéficos ao crescimento de plantas superiores. Em arroz, Fageria e Zimmermann (1979) e Fageria, Baligar e Wright (1989) mostraram que alguns cultivares produziram maior quantidade de massa seca sob  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de Al. De acordo com estes autores, uma possível explicação é o aumento da disponibilidade de ferro (Fe) no meio de crescimento, resultando na hidrólise de Al e pH mais baixo. Fageria (1982) mostrou em três cultivares de arroz a maior produção de peso seco com  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de Al quando comparado com a ausência de Al. Howeler e Cadavid (1976), Thawornwong e Diest (1974) também mostraram que o desenvolvimento do arroz foi estimulado na presença de baixas concentrações de Al em solução nutritiva. Isto sugere que em arroz, uma pequena quantidade de Al seja necessária para o desenvolvimento normal da planta. Grime e Hodgson (1969) apresentaram a evidência de que a resposta positiva da presença do Al a *Scabiosa columbaria* é devido ao deslocamento de Fe (pelo Al) de certos locais da planta, e com isso aprimorando a distribuição e utilização do Fe pela planta.

Keltjens e Van Loenen (1989) verificaram que na presença de  $30 \text{ mg L}^{-1}$  de Al não houve redução de crescimento e de produção de massa seca em *Pinus silvestris*, e nas espécies *Larix decidua* e *Quercus robur* houve até um estímulo na produção de massa seca na presença de Al em solução nutritiva. Também, Schier (1985) observou efeitos negativos no crescimento de *Picea rubens* e *Abies balsamae*, somente em concentrações de Al superiores a  $50 \text{ mg L}^{-1}$ .

A pesquisa tem distinguido os mecanismos de tolerância ao Al em duas classes principais: aqueles que atuam no sentido de impedir a entrada do Al pela raiz e aqueles que permitem a planta acumular o Al em locais específicos na planta. Estes processos têm sido alvo de inúmeros trabalhos científicos (KOCHIAN, 1995; MATSUMOTO, 2000; MA; RYAN; DELHAIZE, 2001; BARCELÓ; POSCHENRIEDER, 2002; MA; FURUKAWA, 2003). A maior parte das pesquisas está focada na exclusão do Al pela exsudação de ácidos orgânicos ativados pela presença do Al no

ápice da raiz. Porém, evidências vêm sendo acumuladas num mecanismo de tolerância baseado na desintoxicação interna, onde o Al seria complexado pelos ácidos orgânicos. As especulações também se estendem a um maior número de mecanismos de tolerância ao Al e as diferenças entre espécies vegetais quanto a estes mecanismos.

### Determinação da atividade das enzimas catalase e ascorbato peroxidase em pereira

Como observado na Figura 6, a atividade da CAT no cultivar Conference foi aumentada somente na concentração de 30 mg L<sup>-1</sup> de Al. Já o cultivar Abate Fetel teve a atividade da CAT aumentada nas concentrações de 30 e 45 mg L<sup>-1</sup> de Al.

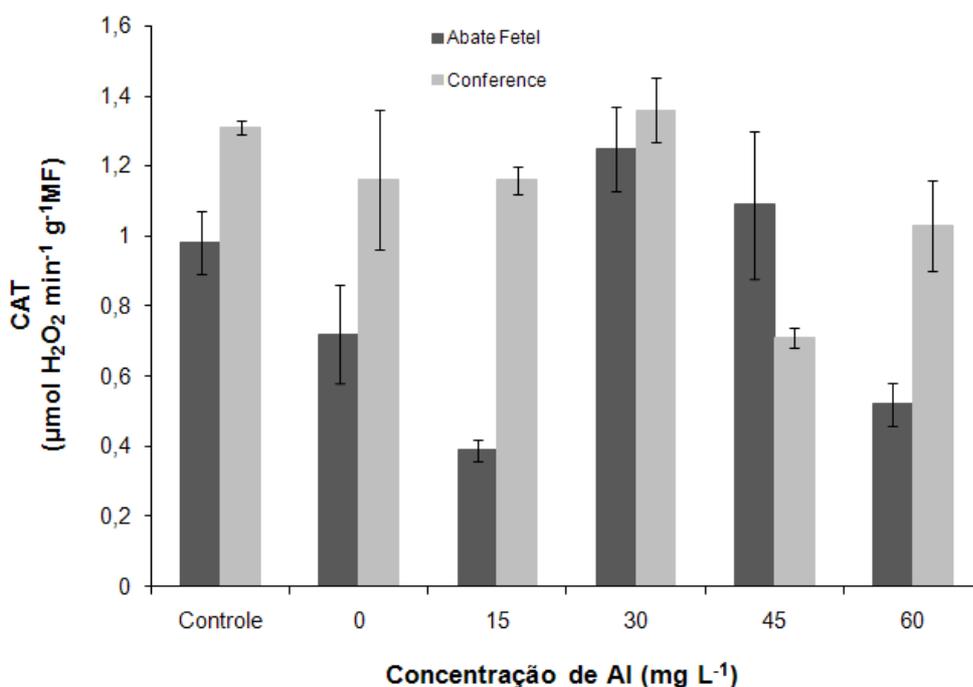


Figura 6: Atividade específica da CAT ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ MF}$ ) na parte aérea de cultivares de pereira tratados com diferentes concentrações de alumínio na multiplicação *in vitro*. As barras representam o erro-padrão da média de três repetições. UFPEL, Pelotas, 2009.

A atividade da APX no cultivar Conference foi aumentada na concentração de 60 mg L<sup>-1</sup> de Al e no cultivar Abate Fetel foi aumentada na concentração de 30 mg L<sup>-1</sup> de Al (Figura 7).

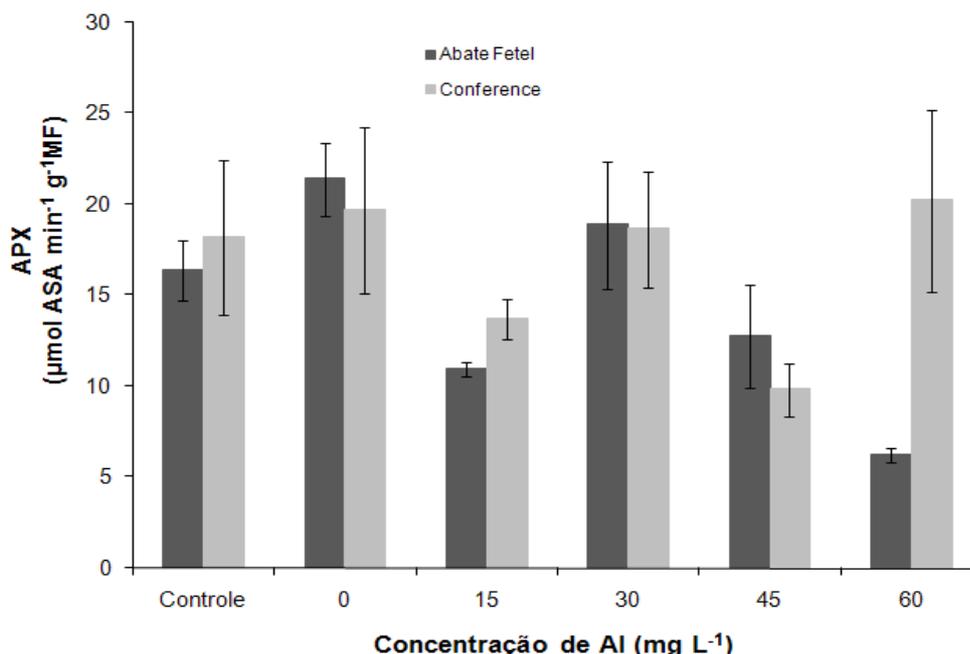


Figura 7: Atividade específica da APX ( $\mu\text{mol Ascorbato min}^{-1} \text{mg}^{-1}\text{MF}$ ) na parte aérea de cultivares de pereira tratados com diferentes concentrações de alumínio na multiplicação *in vitro*. As barras representam o erro-padrão da média de três repetições. UFPEL, Pelotas, 2009.

Schuch et al. (2008) trabalhando com Al e estresse oxidativo em marmeleiro BA-29 *in vitro* observaram que a CAT não mostrou variação nas diferentes concentrações de Al testadas, ou seja, apresentou uma atividade diferente da que foi observada nos cultivares de pereira analisados no presente trabalho. Já Darkó et al. (2004) trabalhando com estresse por Al em trigo verificaram o aumento da atividade das enzimas CAT e APX.

Segundo Maldaner (2008) a atividade da CAT nos brotos de *Pfaffia* diminuiu em todas as concentrações de Al no acesso BRA, enquanto no acesso JB/UFSM diminuiu apenas na concentração de 150 mg L<sup>-1</sup>. De modo geral, o acesso BRA mostrou maior atividade da CAT do que o acesso JB/UFSM. A atividade da APX nos brotos de *Pfaffia* aumentou nas concentrações de 50, 100 e 200 mg L<sup>-1</sup> ou diminuiu na concentração de 150 mg L<sup>-1</sup> no acesso BRA, enquanto que no acesso JB/UFSM aumentou na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> ou diminuiu na concentração de 150 mg L<sup>-1</sup>. De modo geral, o acesso BRA mostrou maior atividade da APX do que o acesso JB/UFSM.

No presente trabalho foram testadas concentrações mais baixas de Al, mas foi possível perceber que diferente do que foi observado por Maldaner (2008), a

atividade da CAT não diminuiu em todas as concentrações testadas, mas os cultivares também se comportaram de maneira diferente, sendo que a Abate Fetel mostrou maior atividade da CAT do que a Conference quando comparadas com seus respectivos controles. Para APX, o cultivar que apresentou maior atividade foi a Conference, quando comparada com seu controle.

Evidências sugerem que o aumento no conteúdo normal de espécies de oxigênio reativo (EROs) pode induzir enzimas antioxidantes. Entre essas enzimas, a catalase (CAT) é uma das enzimas envolvidas na remoção do peróxido tóxico (APEL; HIRT, 2004). Nesse trabalho, a atividade da CAT foi maior em algumas concentrações, indicando um alto estresse oxidativo das plantas naquelas condições. Segundo Schützendübel e Polle (2002), a diminuição na atividade da CAT pode ser devido a um bloqueio de grupos funcionais essenciais na enzima ou um deslocamento de íons metais essenciais da enzima.

Junto com a CAT, APX pode transformar peróxidos em espécies não reativas, mas a APX tem uma afinidade maior por  $H_2O_2$  quando comparada com a CAT (GRAHAM; PATTERSON, 1982). A ascorbato peroxidase é a segunda barreira de defesa contra o  $H_2O_2$  produzido nos cloroplastos. Assim, a atividade da APX no cultivar Conference foi a que demonstrou ter uma maior defesa contra o estresse por Al.

## CONCLUSÕES

As concentrações de Al utilizadas não foram suficientes para diferenciar os quatro genótipos quanto a tolerância ao Al na multiplicação *in vitro*. Em alguns parâmetros analisados os cultivares de marmeleiro se mostraram mais suscetíveis a presença de altas concentrações desse metal, mas sem ser possível de diferenciá-los entre tolerantes ou não. As enzimas envolvidas no metabolismo oxidativo tiveram um aumento de suas atividades em algumas concentrações de Al, porém não foi possível distinguir os cultivares quanto aos níveis de estresse causado pela presença de concentrações crescentes de Al.

## **CAPITULO 2**

### **EFEITO DO ALUMÍNIO NO CRESCIMENTO DAS RAÍZES DE BROTAÇÕES DE PEREIRA E MARMELEIRO CULTIVADAS *IN VITRO***

#### **INTRODUÇÃO**

Solos ácidos associados a metais tóxicos são uma das maiores restrições à produção agrícola e, entre os metais, o Al destaca-se como um dos maiores problemas em solos com  $\text{pH} \leq 5,0$  (ECHART; CAVALLI-MOLINA, 2001).

As regiões de cultivo de pereira no sul do Brasil apresentam geralmente solos muito ácidos e de baixa fertilidade natural, possuindo teores de alumínio (Al) que freqüentemente atingem níveis tóxicos para as plantas (SILVA et al., 2006). (BOHNEN; MEURER; BISSANI, 2000).

As plantas submetidas ao estresse por Al têm o crescimento radicular diminuído, ramificação deficiente, raízes curtas e grossas, o que diminui o volume de solo explorado. Como consequência, a absorção de nutrientes é prejudicada, (KAMINSKI, 2000). Além do mais, podem apresentar alterações nas atividades de enzimas antioxidantes.

Embora os campos agrícolas ácidos sejam corrigidos com calcário, esta correção se dá numa estreita faixa superficial, o que deixa uma camada subsuperficial ácida e com Al tóxico (CUSTÓDIO et al., 2002). Assim, uma alternativa que oferece maiores possibilidades de sucesso é a utilização de espécies ou variedades tolerantes à toxicidade de Al (BRACCINI; MARTINEZ; BRACCINI, 2000).

Nos países mais desenvolvidos os cultivares-copa autoenraizados são cultivados em solos menos férteis, sendo uma solução para a cultura da pereira, visto que os porta-enxertos de marmeleiro apresentam alta incompatibilidade com algumas variedades de pêra (PERAZZOLO, 2008).

As principais vantagens de mudas autoenraizadas são: a ausência de incompatibilidade de enxertia, grande robustez e alta produtividade (COLOMBO; NÉRI, 2003).

Como poucos trabalhos relatam o efeito do Al em plantas cultivadas *in vitro*, o presente trabalho visou avaliar os efeitos do Al no enraizamento *in vitro* de pereira e marmeleiro, na ativação das enzimas catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e superóxido dismutase (SOD) em pereira, envolvidas no estresse oxidativo, e no teor de nutrientes.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Micropropagação de Plantas Frutíferas do Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel/UFPel e no Laboratório de Metabolismo Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia/UFPel em Pelotas - RS.

O material vegetal utilizado foram explantes constituídos de segmentos nodais ( $\pm 5$  cm) provenientes de brotações de pereira, cultivares Conference e Abate Fetel, e de marmeleiro, cultivares MC e BA-29, cultivadas *in vitro*, oriundas da Itália e subcultivadas 13 vezes.

As brotações foram subcultivadas em meio para indução do enraizamento. O meio de cultura utilizado para pereira foi o QL (QUOIRIN; LEPOIVRE, 1977) modificado por Leblay, Chevreau e Raboin (1991) (Tabela 3) e para marmeleiro foi o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) (Tabela 4) com a metade dos sais (MS/2), ambos acrescido de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido indolbutírico (AIB). Após 7 dias, as brotações foram transferidas para meio de cultura QL modificado por Leblay, Chevreau e Raboin (1991) para pereira e MS para marmeleiro. Diferentes concentrações de Al foram adicionadas ao meio de cultura, sob a forma de  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ , nas seguintes concentrações: 0 com pH 5,7 que corresponde ao pH utilizado para essas culturas (controle) e 0, 15, 30, 45 e  $60 \text{ mg L}^{-1}$  Al (pH 4,0). O cálculo das concentrações do metal utilizado foi baseado apenas no teor de Al presente no sal ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ ).

Houve necessidade de se trabalhar com meio de cultura líquido, pois ao se adicionar o  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$  e manter o pH ácido (4,0) não ocorria a geleificação do meio; assim utilizou-se 3 g do substrato vermiculita como sustentação das brotações. Em cada frasco foram colocados 30 mL do meio de cultura e 5 explantes.

As culturas permaneceram em sala de crescimento com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de  $27 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com fatorial 4 cultivares x 6 concentrações e constou de quatro repetições com cinco explantes por repetição.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro ou analisados por regressão polinomial, utilizando o programa estatístico WINSTAT 1.0 (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2003) desenvolvido na UFPel, onde os dados expressos em porcentagem foram transformados em arcoseno da raiz quadrada de  $x/100$  e os dados numéricos foram transformados em raiz quadrada de  $x+0,5$ .

Tabela 3: Composição do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962).

<b>Componentes</b>	<b>Concentração (mg L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Macronutrientes</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KNO <sub>3</sub>	1900
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	441
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
Na <sub>2</sub> EDTA	37,25
KI	0,83
<b>Micronutrientes</b>	
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,85
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16,9
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
<b>Vitaminas</b>	
Ácido Nicotínico	0,5
Cloridrato de piridoxina	0,5
Cloridrato de tiamina	0,5
Glicina	2,0

Tabela 4: Composição do meio de cultura QL (QUOIRIN; LEPOIVRE, 1977) modificado por Leblay, Chevreau e Raboin (1991).

<b>Componentes</b>	<b>Concentração (mg L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Macronutrientes</b>	
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1133,77
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	405
KNO <sub>3</sub>	1800
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	355,79
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	600
<b>Micronutrientes</b>	
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,76
KI	0,08
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25
CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
FeNa <sub>2</sub> EDTA. 2H <sub>2</sub> O	36,70
<b>Vitaminas</b>	
Tiamina	1
Ácido Nicotínico	1
Piridoxina	1
Glicina	4

## Ensaio realizados

### Avaliação do enraizamento da cultura em condições de estresse por alumínio

Aos 45 dias, foi feita a contagem dos explantes enraizados, do número de raízes por explante e foi medido o comprimento de cada raiz, em centímetros (cm). Após, o material vegetal foi separado em parte aérea e raiz, pesado para obtenção da massa fresca e posteriormente seco em estufa de circulação forçada a 80°C durante 3 dias, para obtenção da massa seca, ambas expressas em miligramas (mg).

### Teor de nutrientes no material vegetal

As mesmas amostras utilizadas para a obtenção da massa seca foram submetidas à análise da concentração dos nutrientes no material vegetal. As amostras foram moídas e submetidas a digestões nítrico-perclórica e sulfúrica, onde foram determinadas as concentrações dos elementos nos extratos obtidos, segundo a metodologia descrita por Tedesco et al. (1995).

### **Extração das enzimas antioxidantes em pereira**

Para a extração das enzimas antioxidantes em pereira, visto que os protocolos não se ajustaram aos cultivares de marmeleiro, foram macerados 200 mg de tecido foliar com pistilo e mortar e homogeneizadas em polivinilpirrolidona (PVPP) 20% acrescido do seguinte tampão de extração: fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8, EDTA 0,1 mM e ácido ascórbico 1 mM. Os homogeneizados foram centrifugados a 13.000 rpm, por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado para as análises enzimáticas da CAT e APX (BIEMELT; KEETMAN; ALBRECHT, 1998).

### **Determinação da atividade da enzima catalase em pereira**

A atividade da CAT foi avaliada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, durante 2 minutos, em um tampão de incubação contendo fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 12,5 mM, incubado a 28°C, em que foi monitorado o consumo do peróxido de hidrogênio (HAVIR; MCHALE, 1987).

### **Determinação da atividade da enzima ascorbato peroxidase em pereira**

A atividade da APX foi realizada segundo Nakano e Asada (1981), monitorando-se a taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm. O tampão de incubação foi composto por fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, ácido ascórbico 0,5 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,1 mM.

### **Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase em pereira**

A atividade do superóxido dismutase (SOD) foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977) em um meio de reação composto por fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8, metionina 14 mM, EDTA 0,1µM, NBT 75 µM e riboflavina 2 µM. Os tubos com o meio de reação e a amostra foram iluminados por sete minutos em uma caixa com uma lâmpada fluorescente de 20 W. Para o controle, o mesmo meio de reação, porém sem a amostra foi iluminado e como branco foi utilizado um tubo de ensaio coberto por papel alumínio e mantido no escuro, este foi utilizado para zerar o espectro fotômetro. As leituras foram realizadas a 560 nm. Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições de ensaio.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Avaliação do enraizamento da cultura em condições de estresse por alumínio

Para a percentagem de enraizamento, número de raízes e comprimento das raízes observou-se somente efeito simples de cultivar (Tabela 5). Os cultivares de marmeleiro apresentaram maior percentagem de enraizamento, sendo que a pereira 'Abate Fetel' não diferiu do 'MC', maior número médio de raízes e maior comprimento das raízes.

Tabela 5: Percentagem de explantes enraizados, no número médio de raízes e comprimento médio das raízes em cultivares de pereira e marmeleiro tratados com diferentes concentrações de alumínio durante o enraizamento *in vitro*. UFPEL, Pelotas, 2009.

Cultivar	Enraizamento(%)	Nº raízes	Comprimento das raízes (cm)
MC	51,04 bc	5,46 a	6,41 a
BA 29	89,58 a	4,51 a	6,41 a
Conference	38,54 c	2,68 b	4,19 b
Abate Fetel	62,50 b	2,46 b	4,10 b

\*Médias seguidas por letras distintas (minúsculas nas colunas) diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Semelhante a esse trabalho, Maldaner (2008) observou que *Pfaffia tuberosa in vitro* não apresentou variação significativa no enraizamento quando submetida a diferentes concentrações de Al, tendo um acesso apresentado maior número de raízes do que os demais acesso. Com relação ao comprimento do sistema radicular, este autor não verificou efeito das concentrações de Al. Contudo, constatou diferença entre as espécies de *Pfaffia* estudadas, assim como ocorreu nesse trabalho entre as espécies de marmeleiro e pereira, tendo o marmeleiro apresentado maior comprimento das raízes do que a pereira.

Alguns trabalhos relatam que plantas tratadas com Al podem apresentar sinais visíveis de oxidação nas raízes, detectada pelo escurecimento, especialmente dos ápices radiculares devido à oxidação de fenóis, o que pode ser causado pela diminuição do pH (HIRANO E HIJII, 1998). Esse sintoma não foi observado nos cultivares estudados.

Em cafeeiro (BRACCINI; MARTINEZ; BRACCINI, 2000), o Al afetou o comprimento da raiz principal e o desenvolvimento das raízes laterais, que apresentaram engrossamento e amarelecimento das pontas. Foi constatado, em quatro linhagens de café, pequeno aumento no crescimento do sistema radicular com a adição de Al.

As raízes de soja, em condições de acidez e em presença do Al, mostraram descoloração e redução nas ramificações secundárias. Posteriormente, as extremidades das raízes tornaram-se necróticas. O efeito de maior impacto, devido ao excesso de Al, consistiu na redução do tamanho e engrossamento do sistema radicular (MASCARENHAS; CAMARGO; FALIVENE, 1984), o que caracteriza o efeito tóxico do Al nessa planta, o que não ocorreu com os cultivares testados no presente trabalho. Essa característica, por sinal, serve como o melhor indicador para se avaliar a tolerância ao Al, em solução nutritiva, entre cultivares de diversas espécies (DANTAS et al., 2001).

Segundo Machado (1997) as diminuições no alongamento radicular são os primeiros sintomas de toxicidade observáveis nas plantas e esses sintomas não foram observados nos cultivares estudados. O mesmo foi observado por Fortunato e Nicoloso (2004) em trabalho sobre toxidez de Al em plântulas de grábia onde visualmente todas as plântulas tiveram raízes normais, apresentando-se claras e sem alterações morfológicas, desse modo, indicando a ausência de toxidez de Al<sup>3+</sup>.

A massa fresca da parte aérea apresentou somente efeito simples de cultivar e concentração. Com relação aos cultivares, o cultivar Conference diferiu significativamente dos demais apresentando maior massa fresca da parte aérea, sendo seguido pelo 'Abate Fetel', 'BA-29' e 'MC' (Tabela 6). Com relação as concentrações de Al, a menor massa fresca foi obtida somente na concentração de 60 mg L<sup>-1</sup> (Figura 8) diferindo significativamente das demais. Mendonça et al. (1999) observou que a redução no peso da massa fresca da parte aérea de maracujazeiro foi altamente significativa quando as plantas foram submetidas a concentrações

crecentes de Al e que nas concentrações de 15, 30 e 45 mg L<sup>-1</sup> foram apresentados os menores valores, o oposto do que foi encontrado nessas mesmas concentrações no presente trabalho.

Tabela 6: Massa fresca da parte aérea em cultivares de pereira e marmeleiro tratados com diferentes concentrações de alumínio durante o enraizamento *in vitro*. UFPel, Pelotas, 2009.

Cultivar	Massa fresca da parte aérea (mg)
MC	364 d
BA 29	653 c
Conference	2200 a
Abate Fetel	1449 b

\*Médias seguidas por letras distintas (minúsculas nas colunas) diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

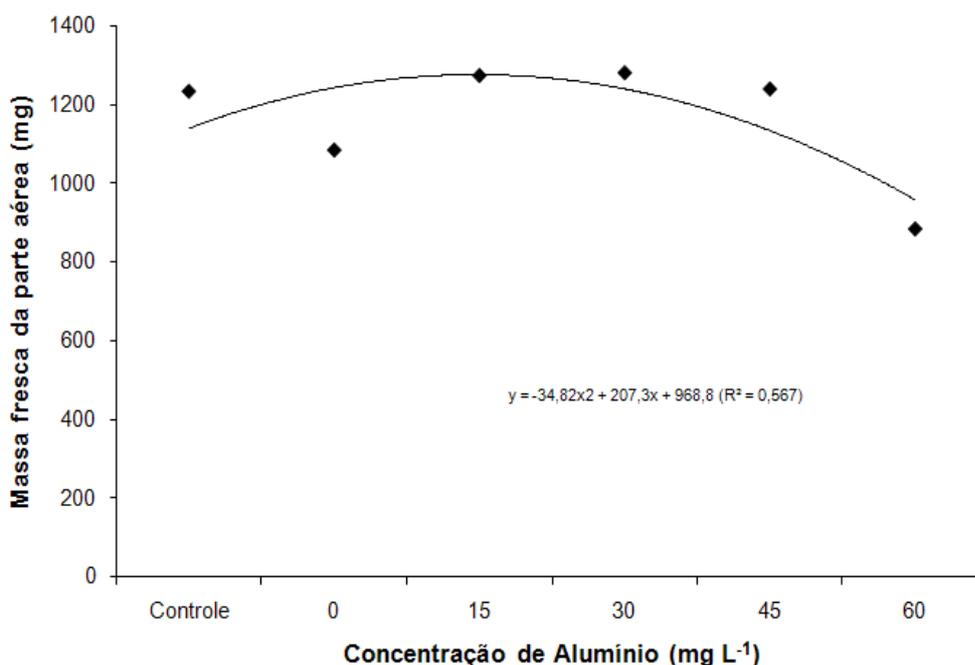


Figura 8: Massa fresca da parte aérea de cultivares de pereira e marmeleiro tratados com diferentes concentrações de alumínio durante o enraizamento *in vitro*. UFPel, Pelotas, 2009.

Com relação a massa fresca radicular houve interação significativa entre cultivar e concentração. Na Figura 9 se observa que a massa fresca radicular do cultivar BA 29 aumentou significativamente na concentração de 15 mg L<sup>-1</sup> Al, não diferindo da concentração de 60 mg L<sup>-1</sup> Al. Já os demais cultivares não diferiram

significativamente entre os tratamentos. Com relação as concentrações, os tratamentos com 0 de Al e pH ácido, juntamente com a concentração de 45 mg L<sup>-1</sup> de Al não apresentaram diferença significativa entre os cultivares. Nas concentrações de 15 e 60 mg L<sup>-1</sup> de Al o cultivar BA-29 diferiu significativamente dos demais apresentando maior massa fresca radicular. Na concentração de 30 mg L<sup>-1</sup> de Al o cultivar MC diferiu significativamente dos demais desenvolvendo menos massa fresca adicular.

Mendonça et al. (1999) trabalhando com mudas de maracujazeiro cultivadas em solução nutritiva com Al obteve redução significativa da massa fresca da raiz, apresentando já na concentração de 5 mg L<sup>-1</sup> reduções de mais de 50% da massa da raiz .

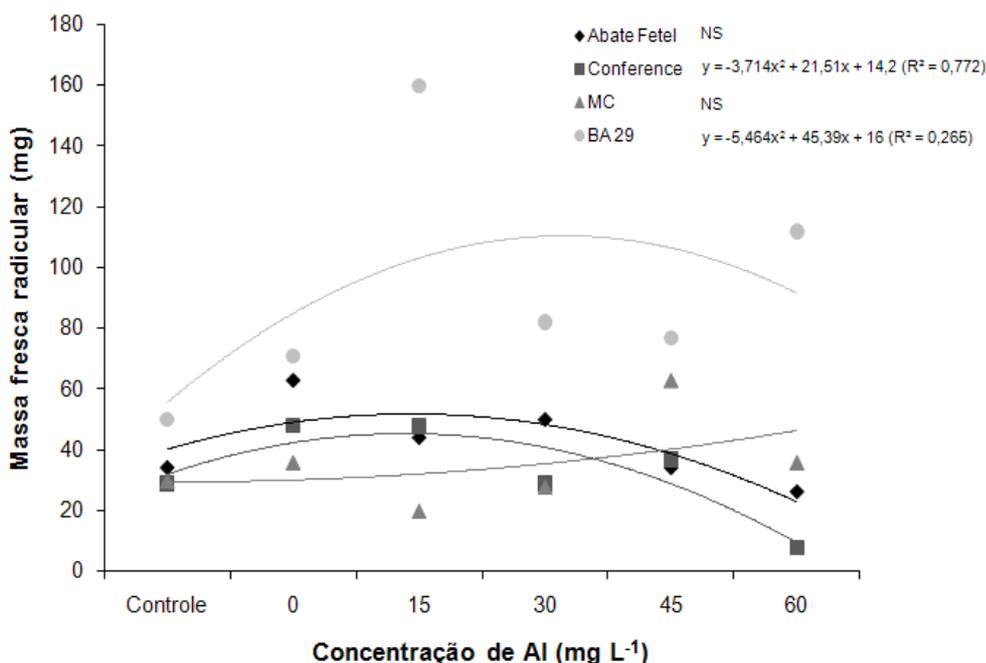


Figura 9: Massa fresca radicular de cultivares de pereira e marmeleiro tratados com diferentes concentrações de alumínio durante o enraizamento *in vitro*. UFPel, Pelotas, 2009.

Para massa seca da parte aérea e massa seca radicular observou-se somente efeitos simples de cultivar e concentração. A maior massa seca da parte aérea foi obtida pelo cultivar Conference, havendo diferença significativa entre os cultivares (Tabela 7). Já com relação as concentrações, a menor massa seca da parte aérea foi obtida na concentração de 60 mg L<sup>-1</sup> de Al, diferindo significativamente das demais. (Figura 10).

Tabela 7: Massa seca da parte aérea de cultivares de pereira e marmeleiro tratados com diferentes concentrações de alumínio durante o enraizamento *in vitro*. UFPel, Pelotas, 2009.

Cultivar	Massa seca da parte aérea (mg)
MC	108 d
BA 29	148 c
Conference	341 a
Abate Fetel	273 b

\*Médias seguidas por letras distintas (minúsculas nas colunas) diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

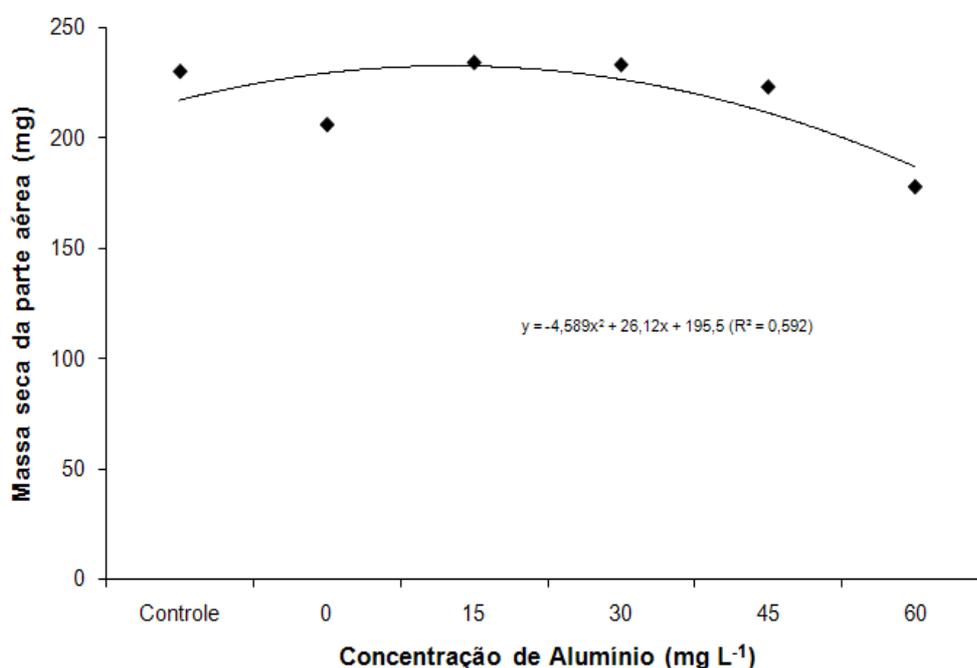


Figura 10: Massa seca da parte aérea de cultivares de pereira e marmeleiro tratados com diferentes concentrações de alumínio durante o enraizamento *in vitro*. UFPel, Pelotas, 2009.

Villa et al. (2008) trabalhando com porta-enxertos de videira notou que para 'Gravesac', as baixas concentrações de Al não exercem nenhum efeito sobre o peso seco para a parte aérea. Enquanto que nesse trabalho as baixas concentrações proporcionaram uma maior massa seca.

Dantas et al. (2001) observaram que o Al reduziu significativamente a massa seca da parte aérea do porta-enxerto M.9 e dos somaclones M.939 e M.922, não estando de acordo com esse trabalho, onde as concentrações de 15 e 30 mg L<sup>-1</sup> de Al aumentaram o massa seca da parte aérea, porém não diferiram estatisticamente dos demais tratamentos.

Já a maior massa seca radicular foi obtida pelo cultivar BA 29, diferindo significativamente das demais (Tabela 8), e, como visto na massa fresca, a menor massa seca também foi obtida somente na concentração de 60 mg L<sup>-1</sup> (Figura 11). O mesmo foi observado por Veloso et al. (1995) para a massa seca do caule e das raízes de pimenteira, embora, nas raízes, a concentração de 15 mg L<sup>-1</sup> de Al tenha tido efeito semelhante à concentração de 5 mg L<sup>-1</sup>, diferindo dos demais tratamentos.

Tabela 8: Massa seca radicular de cultivares de pereira e marmeleiro tratados com diferentes concentrações de alumínio durante o enraizamento *in vitro*. UFPel, Pelotas, 2009.

Cultivar	Massa seca radicular (mg)
MC	12 b
BA 29	18 a
Conference	5 c
Abate Fetel	7 c

\*Médias seguidas por letras distintas (minúsculas nas colunas) diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

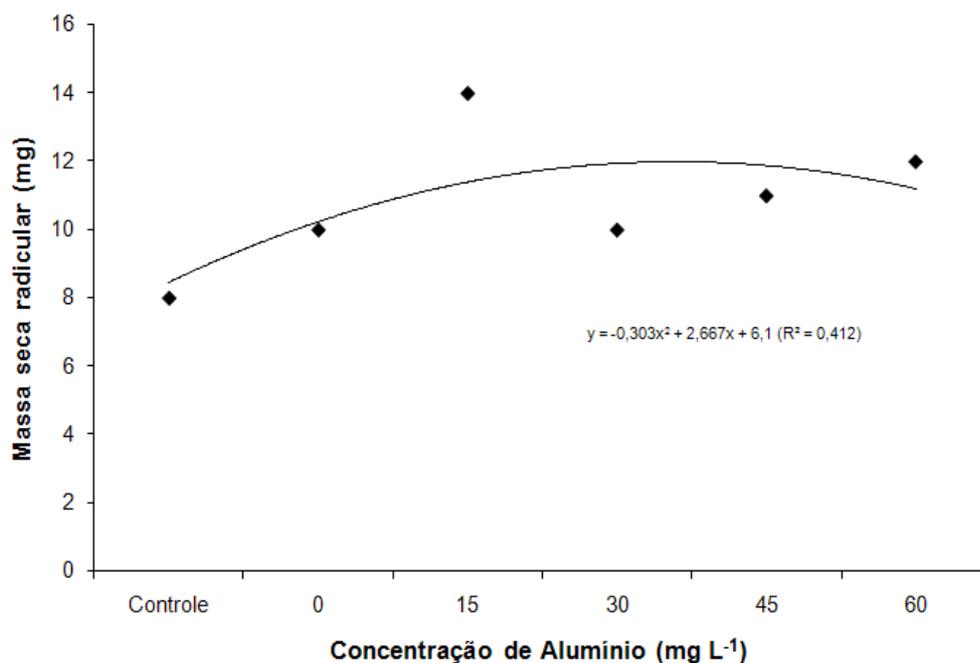


Figura 11: Massa seca radicular de cultivares de pereira e marmeleiro tratados com diferentes concentrações de alumínio durante o enraizamento *in vitro*. UFPel, Pelotas, 2009.

Considerando que o efeito primário do Al é a inibição do crescimento das raízes, que se tornam curtas e grossas, Camargo, Camargo e Souza (1984) constataram que o peso seco das raízes de arroz cultivares Pérola, IAC-25, IAC-165 e IAC-435, mesmo apresentando raízes mais curtas em soluções com  $50\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{Al}^{3+}$ , mostraram um peso seco das raízes nessas condições maior do que quando comparados com o peso seco em soluções sem Al. Estando de acordo com o comportamento da massa seca dos cultivares analisados.

Custódio et al. (2002) estudando o estresse por Al e acidez em cultivares de soja notaram que para o peso seco de raiz, não houve diferenças entre os cultivares, podendo-se observar o mesmo em relação aos tratamentos, onde os cultivares se apresentaram de forma homogênea o que não foi observado nesse trabalho, já que os cultivares apresentaram diferença estatística significativa entre elas, estando de acordo com Dantas et al. (2001) que notaram diferenças de comportamento entre os genótipos de porta-enxertos somaclonais de macieira submetidos a tratamentos com Al.

Quando o pH do solo é  $\leq 5,5$ , e na presença do  $\text{Al}^{3+}$ , o mesmo solubiliza-se na solução do solo, tornando-se potencialmente tóxico para as plantas (KOCHIAN, 1995), inibindo o crescimento e o desenvolvimento das raízes, alterando a absorção de água e nutrientes, e por conseqüência o desenvolvimento das plantas é reduzido. (HARTWIG et al., 2007).

A inibição do alongamento celular pode ser devido ao resultado de, pelo menos em parte, alterações nas células da coifa, que agem como sensores do estresse ambiental (MARSCHNER, 1991). Estas alterações são conseqüências do alto acúmulo de Al no núcleo das células (NAIDOO; STEWART; LEWIS, 1978). Há casos em que a redução no comprimento das raízes parece ser acompanhado por um aumento no diâmetro. Este fenômeno, entretanto, não compensa a diminuição da área superficial das raízes, que é funcionalmente mais importante que a massa radicular.

### **Teor de macronutrientes no material vegetal**

Os efeitos do Al nos teores de macronutrientes das cultivares de marmeleiro e pereira podem ser observados na Figura 12. Para discussão, os resultados foram comparados com os resultados da análise foliar de pereira encontrada no Manual de

adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Não foram encontrados resultados da análise foliar de marmeleiro, portanto foi feita a comparação desta cultura com a pereira.

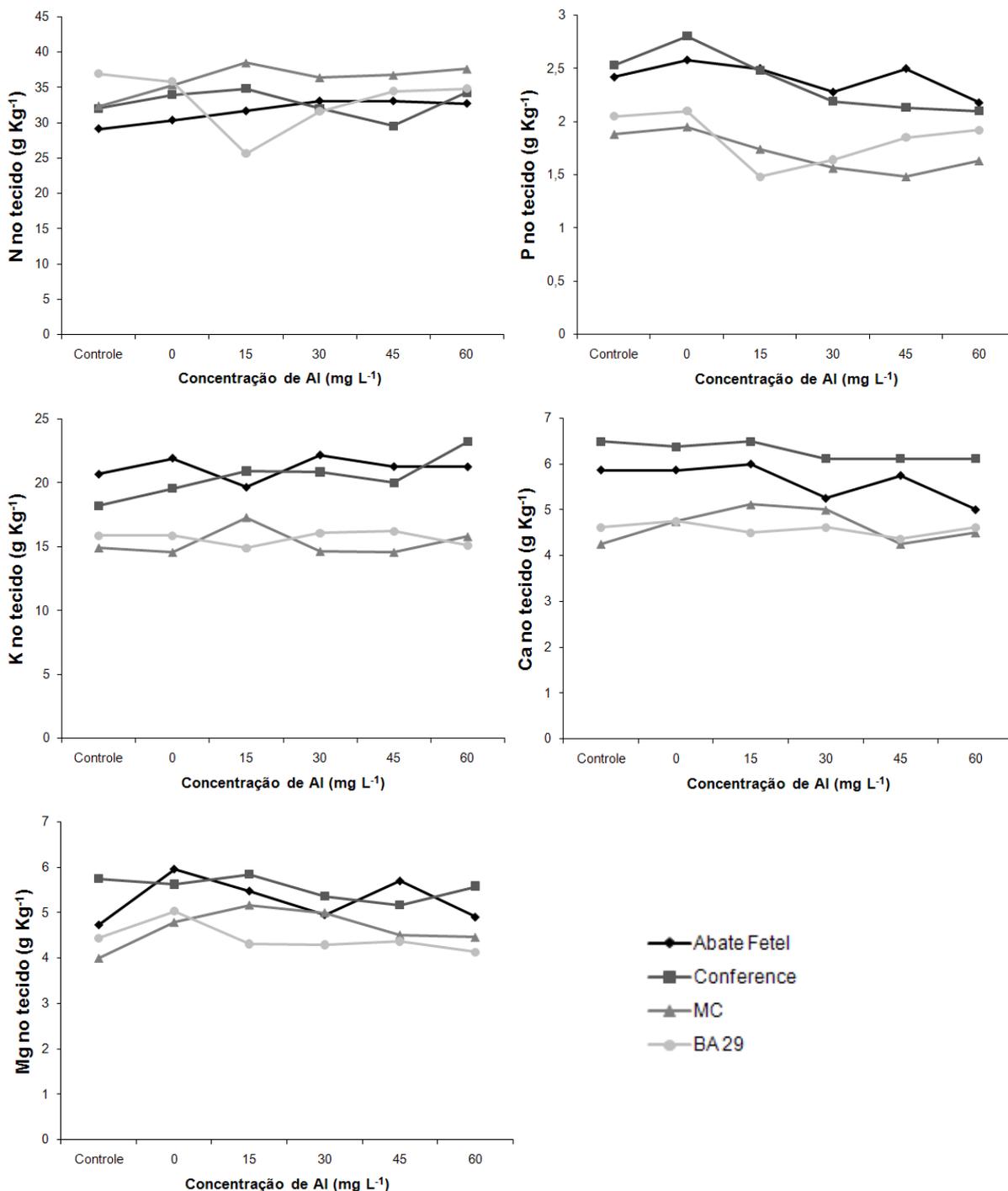


Figura 12: Teor de macronutrientes na parte aérea de cultivares de pereira e marmeleiro tratados com diferentes concentrações de alumínio no enraizamento *in vitro*. UFPel, Pelotas, 2009.

A concentração de N aumentou nos cultivares Abate Fetel e MC na presença de Al. No cultivar Conference houve um aumento da concentração seguido de uma diminuição nas concentrações de 30 mg L<sup>-1</sup> e 45 mg L<sup>-1</sup>. Já no cultivar BA 29 o Al causou uma diminuição da concentração de N em todos os tratamentos. Conforme observado na cultivar BA 29, Salvador et al (2000) analisando a influência do Al em mudas de goiabeira também notaram uma diminuição no teor de N na presença desse metal. A quantidade normal de N na pereira segundo o Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina varia de 2,0 a 2,5 %, sendo considerado excessivo concentrações maiores que 3,0%. Como podemos-se observar na Figura 12, os cultivares de pereira e marmeleiro apresentam teores excessivos de N. Segundo Camargo e Sá (2004), em algumas culturas, como exemplo os cereais, o N em excesso favorece o crescimento vegetativo, porém para outras culturas esse excesso pode não ser benéfico. Isso pode ter ocorrido com as culturas aqui analisadas, os cultivares de pereira apresentaram maior massa fresca e massa seca da parte aérea que os cultivares de marmeleiro, portanto, na pereira, o N em excesso pode ter favorecido o crescimento da parte aérea, enquanto que no marmeleiro esse excesso pode ter sido prejudicial.

Com relação a concentração de P todos os cultivares apresentaram um aumento desse nutriente no meio sem Al com pH ácido seguido então de uma diminuição na presença de Al. Resultado semelhante foi obtido por Basso et al. (2003), que estudando o efeito do Al no crescimento de brotações de eucalipto cultivadas *in vitro* observaram que a adição de Al na solução resultou numa menor concentração de P no tecido. O P é absorvido predominantemente na forma iônica de H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e na presença de Al pode ocorrer uma insolubilização deste, formando fosfato de Al, fazendo com que a função do fósforo seja alterada, uma vez que ocorre rápida ligação do Al com o P, alterando sua disponibilidade para as plantas. Assim, o metabolismo celular é afetado, normalmente resultando em danos irreversíveis já que a ligação do Al com o fósforo ocorre na forma de inibição não competitiva (BASSO et al., 2003; MALAVOLTA, VITTI; OLIVEIRA, 1997). Já Veloso et al. (1995), em pimenteirias do reino, observaram que o aumento da concentração de Al na solução aumentou a quantidade de fósforo até a concentração de 15 mg L<sup>-1</sup>, decrescendo nas concentrações 20 e 40 mg L<sup>-1</sup>, diferente do que foi observado no presente trabalho, visto que a presença de Al diminuiu a concentração de P. Em

mudas de maracujá-amarelo houve decréscimo das concentrações de fósforo com o aumento das concentrações de Al, podendo este resultado estar relacionado com os efeitos deletérios do Al sobre a disponibilidade, absorção e utilização de vários nutrientes, dentre estes o fósforo (MENDONÇA et al, 1999). Quando comparados com os teores normais de P descrito no Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, os teores desse nutriente nos cultivares analisados se encontram dentro da faixa de normalidade, que varia de 0,15 a 0,30%.

A concentração de K na cultivar Conference aumentou em todos os tratamentos. Na cultivar MC houve um aumento somente na concentração  $15 \text{ mg L}^{-1}$ , enquanto que na cultivar Abate Fetel houve uma diminuição apenas nessa concentração. A concentração de K na cultivar BA 29 se manteve estável. Em trabalho sobre o efeito do Al em diferentes cultivares de soja, Mascarenhas, Camargo e Falivene (1984) notaram que, com a aplicação de níveis crescentes de Al, havia um aumento no teor de K, como aconteceu com as cultivares de pereira. Também Zysset et al. (1996) encontraram que a absorção de K por plântulas de nogueiras foi independente do aumento da concentração de Al na solução nutriente. Para Andrew, Johnson e Sandland (1973) o aumento na absorção de potássio pode ter ocorrido devido à capacidade das plantas em preservar um balanço catiônico. Segundo Basso et al. (2003) o potássio atua em processos osmóticos, na síntese e manutenção de proteínas, na abertura e fechamento dos estômatos, na permeabilidade da membrana, no controle do pH. O potássio pela adição de Al pode resultar em complexas alterações celulares, uma vez que é um ativador enzimático por excelência. Exatamente como foi observado na cultivar MC, Veloso et al. (1995) verificou que também houve um aumento no acúmulo de potássio com a adição de até  $15 \text{ mg L}^{-1}$  na solução nutritiva em pimenteiras do reino, com tendência decrescente a partir de  $20 \text{ mg L}^{-1}$ . O estímulo no crescimento e na absorção de nutrientes, pelo Al, em baixas concentrações, também já foram observados por Mullette (1975) para *Eucalyptus* e para outras espécies vegetais por vários autores. Os teores de K nos cultivares de marmeleiro são considerados normais ou acima do normal quando comparados com os resultados da análise foliar de pereira do Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa

Catarina, onde a concentração normal varia de 1,2 a 1,5%. Já os cultivares de pereira apresentaram um elevado teor de K, considerado excessivo.

Na Figura 12, observa-se que a concentração de Ca aumentou no cultivar Abate Fetel, diminuindo a partir da concentração de 30 mg L<sup>-1</sup>, enquanto que no cultivar MC também aumentou, diminuindo a partir da concentração de 45 mg L<sup>-1</sup>. No cultivar Conference houve uma pequena diminuição e no cultivar BA 29 a concentração se manteve estável. Em pimenteiras do reino, Veloso et al. (1995) também observaram um aumento na quantidade de cálcio, porém com a adição de até 15 mg L<sup>-1</sup> de Al na concentração em que eles obtiveram os maiores valores, com diminuição nas quantidades, a partir das concentrações 20 e 40 mg L<sup>-1</sup>. Uma hipótese segundo Basso et al. (2003) é que a presença de Al pode ter reduzido a concentração de Ca no tecido devido ambos os íons competirem pelo mesmo sítio do carregador ativo no processo de absorção, ocorrendo uma inibição competitiva do Al com o Ca. Do mesmo modo, Foy (1984), verificou que a toxidez de Al pode se manifestar como uma deficiência de Ca induzida, em consequência de uma redução do transporte do nutriente na planta, provocando um colapso nos pontos de crescimento em valores de pH < 5,5. O antagonismo Al x Ca talvez seja o fator mais limitante na absorção de Ca.

Outra hipótese sustenta-se nas afirmações de Siegel e Haug (1983), que relataram a interferência do Al na atividade da enzima ATPase estimulada pela calmodulina (Cam), uma proteína que exerce papel importante na manutenção de membranas e que constitui o principal alvo do Al. Segundo Cambraia (1989), o cálcio, ao se ligar à Cam, provoca mudanças de conformação nesta proteína, alterando sua interação com certas enzimas e proteínas. Desta maneira, é possível que um dos efeitos fitotóxicos do Al esteja relacionado com a menor absorção de Ca, devido ao efeito de inibição da proteína (SIEGEL; HAUG, 1983).

Apesar do teor de Ca estar bem abaixo do considerado normal pelo Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina para pereira (1,1 a 1,7%) os cultivares não apresentavam sintomas visual de deficiência desse nutriente, como por exemplo, necrose nos ápices radiculares ou nas folhas jovens.

A concentração de Mg nas cultivares Abate Fetel e BA 29 diminuiu na presença de Al. Na cultivar MC houve um aumento até a concentração de 15 mg L<sup>-1</sup>

passando a diminuir nos demais tratamentos. Na cultivar Conference houve uma diminuição em todos os tratamentos. Veloso et al. (1995) observaram em pimenteiras do reino que a presença de Al na solução nutritiva promoveu um pequeno estímulo na absorção de magnésio, pois a maior quantidade ocorreu na concentração de  $15 \text{ mg L}^{-1}$  e as plantas submetidas às concentrações mais elevadas, 20 e  $40 \text{ mg L}^{-1}$ , mostraram uma tendência de redução, estando de acordo com o que foi observado na cultivar MC. Basso et al. (2003) notaram que a presença de Al também reduziu a concentração de Mg no tecido vegetal. Quando comparados com o teor de Mg descrito para pereira no Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, os cultivares de marmeleiro apresentaram concentrações de Mg dentro da faixa normal, já os cultivares de pereira apresentaram teores excessivos desse nutriente, ou seja, acima de 0,45%.

Camargo, Camargo e Souza (1984) trabalhando com cultivares de arroz em diferentes concentrações de Al observaram que os teores de Ca, K e Mg diminuíram nas partes aéreas em todos os cultivares de arroz estudados à medida que foram aumentados os teores de  $\text{Al}^{+3}$  de 0 a  $50 \text{ mg L}^{-1}$  nas soluções. No presente trabalho, as concentrações de Ca e Mg tiveram uma resposta semelhante a encontrada por estes autores, embora em algumas cultivares a diminuição tenha se dado somente em altas concentrações de Al. Diminuição de Ca e Mg também foram observadas por Kohno, Matsumura e Kobayashi (1995) e Izuta et al. (1996) quando usaram Al como tratamento. Para Salvador et al. (2000), P, Ca e Mg foram os nutrientes mais afetados pela presença de Al.

Conforme Foy (1974) e Furlani (1989), a redução nos teores de nutrientes, em relação ao controle, pode estar relacionada com a interferência do excesso do Al nas reações enzimáticas e na disposição de polissacarídeos nas paredes celulares, prejudicando, com isso, a absorção, o transporte e o uso de vários nutrientes, entre eles P, Ca e Mg. De acordo com Faquin e Vale (1991) e Malavolta, Vitti e Oliveira (1997), o Al, quando na forma solúvel, além de causar fitotoxidez nas plantas, compete com outros cátions, principalmente Ca e Mg, pelos mesmos sítios de absorção no complexo de troca.

### Teor de micronutrientes no material vegetal

Os efeitos do Al nos teores de micronutrientes das cultivares de marmeleiro e pereira podem ser observados na Figura 13. Para discussão, os resultados também foram comparados com os resultados da análise foliar de pereira encontrada no Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Não foram encontrados resultados da análise foliar de marmeleiro, portanto foi feita a comparação desta cultura com a pereira.

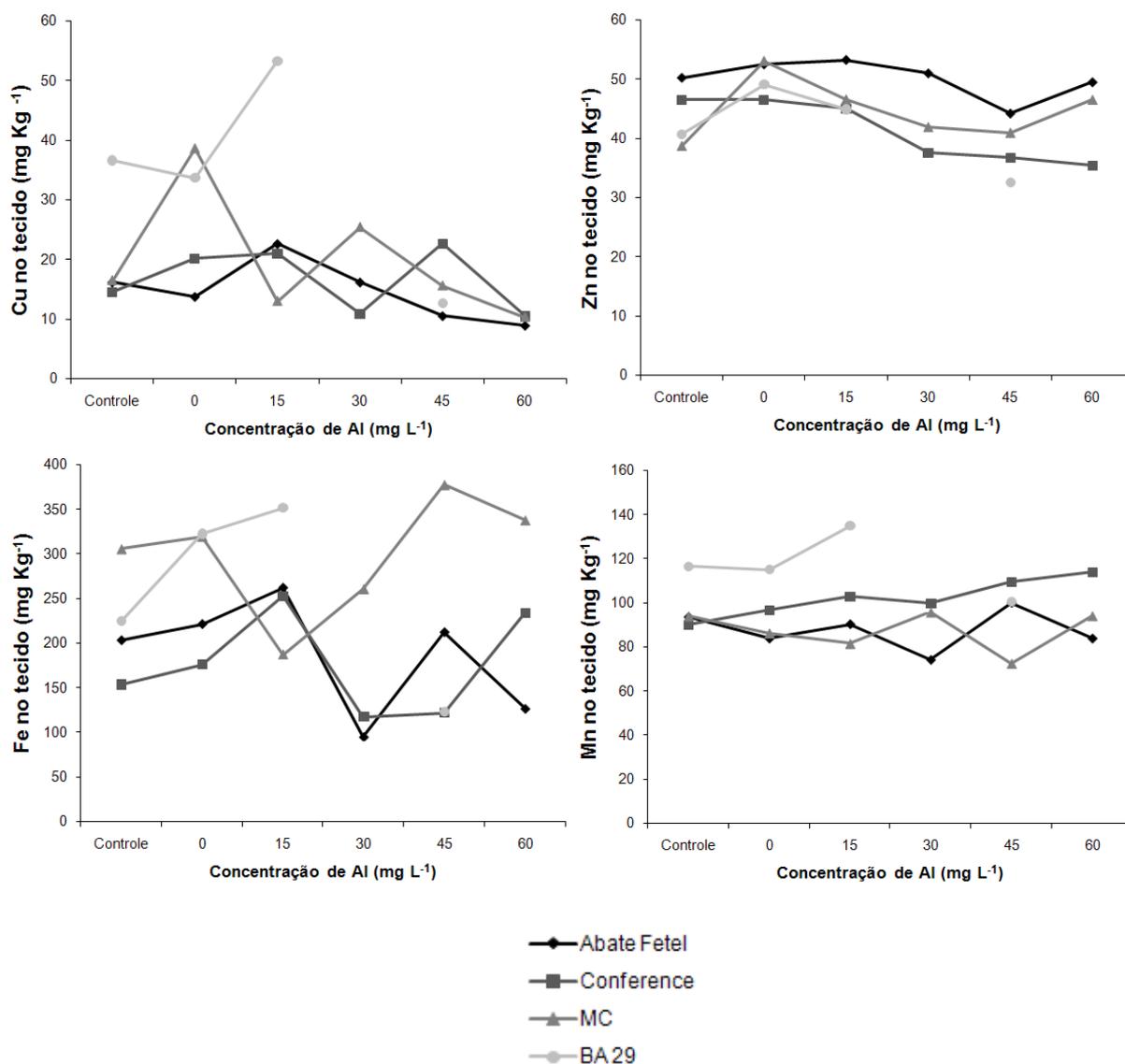


Figura 13: Teor de micronutrientes na parte aérea de cultivares de pereira e marmeleiro tratados com diferentes concentrações de alumínio no enraizamento *in vitro*. UFPel, Pelotas, 2009.

No cultivar MC houve um aumento na concentração de Cu no meio com 30 mg L<sup>-1</sup> de Al em relação ao controle. No cultivar Conference houve um aumento

exceto nas concentrações de 30 mg L<sup>-1</sup> e 60 mg L<sup>-1</sup>. No cultivar Abate Fetel houve um aumento na concentração de 15 mg L<sup>-1</sup> seguido de uma diminuição nos demais tratamentos. No cultivar BA 29 houve um aumento na concentração de 15 mg L<sup>-1</sup> e uma diminuição na concentração de 45 mg L<sup>-1</sup>, nas concentrações de 30 mg L<sup>-1</sup> e 60 mg L<sup>-1</sup> não foi possível fazer a análise devido a falta de material. O teor de cobre dos cultivares de pereira se encontram dentro da normalidade apresentada no Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina para pereira. Já comparando essa cultura com o marmeleiro, este apresentou teores acima do normal e excessivo, principalmente o cultivar BA 29. Carvalho (1980) cita que altos níveis de cobre no solo provocam redução no crescimento radicular, reduzindo a superfície de absorção das raízes e, conseqüentemente, a produção, porém, o cultivar BA 29 apresentou maior comprimento das raízes do que os cultivares de pereira, demonstrando que talvez esse excesso não seja tóxico para esses cultivares.

A concentração de Zn no cultivar MC aumentou em relação ao controle com pH 5,7. No cultivar Conference houve uma diminuição em todos os tratamentos. No cultivar Abate Fetel houve um aumento até a concentração de 15 mg L<sup>-1</sup> seguido de uma diminuição nos demais tratamentos. No cultivar BA 29 houve uma diminuição na concentração de 15 mg L<sup>-1</sup> e 45 mg L<sup>-1</sup>, nas concentrações de 30 mg L<sup>-1</sup> e 60 mg L<sup>-1</sup> não foi possível fazer a análise devido a falta de material. A concentração de Zn dos cultivares analisados está dentro da faixa normal de acordo com o Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina para pereira, ou seja, de 20 a 100 mg Kg<sup>-1</sup>.

Com relação a concentração de Fe no cultivar MC houve uma diminuição apenas nas concentrações de 15 mg L<sup>-1</sup> e 30 mg L<sup>-1</sup>. No cultivar Conference houve um aumento nas concentrações de 15 mg L<sup>-1</sup> e 60 mg L<sup>-1</sup>. No cultivar Abate Fetel houve um aumento até a concentração de 15 mg L<sup>-1</sup> seguido de uma diminuição nos demais tratamentos. No cultivar BA 29 houve um aumento até a concentração de 15 mg L<sup>-1</sup> e uma diminuição na concentração de 45 mg L<sup>-1</sup>, nas concentrações de 30 e 60 não foi possível fazer a análise devido a falta de material.

Segundo Basso et al. (2003) as concentrações de Fe foram maiores nas brotações de eucalipto cultivadas no tratamento controle, para as brotações mantidas na presença de Al, ocorreu redução na concentração de Fe durante todo o

período de cultivo, diferindo deste trabalho, já que houve um aumento na concentração de ferro em todas as cultivares. A absorção do ferro é influenciada por outros cátions como K, Ca e Mg. Para Malavolta, Vitti e Oliveira (1997) a diminuição em alguns tratamentos pode ser devida a presença de Al, que alterou a disponibilidade de alguns nutrientes resultando, indiretamente, na diminuição da concentração de ferro na planta.

Em mudas de pimenteira (VELOSO et al., 1995) a medida que se aumentou a concentração de Al na solução, a quantidade de ferro se elevou. Esses resultados estão de acordo com as observações de Mengel e Kirkby (1987), que relataram que a toxidez de Al está sempre acompanhada por altos níveis de ferro. Em arroz, Alam (1983) observou um maior acúmulo de ferro com aumento da concentração de Al.

O teor de ferro dos cultivares de pereira se encontram dentro da normalidade apresentada no Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina para pereira (50 a 250 mg Kg<sup>-1</sup>). Já comparando essa cultura com o marmeleiro, este apresentou teores bem acima do normal, chegando a 351,41 mg Kg<sup>-1</sup> no cultivar BA 29. Segundo Ponnampertuma, Bradfield e Peech (1955), um dos sintomas visíveis da toxidez do ferro é o bronzeamento das folhas, que não foi observado nesse experimento.

No cultivar MC houve um aumento na concentração de Mn apenas nas concentrações de 30 mg L<sup>-1</sup> e 60 mg L<sup>-1</sup>. No cultivar Conference houve um aumento em todos os tratamentos. No cultivar Abate Fetel houve um aumento apenas na concentração de 45 mg L<sup>-1</sup>. No cultivar BA 29 houve um aumento na concentração de 15 mg L<sup>-1</sup> e uma diminuição na concentração de 45 mg L<sup>-1</sup>, nas concentrações de 30 mg L<sup>-1</sup> e 60 mg L<sup>-1</sup> não foi possível fazer a análise devido a falta de material.

Em mudas de eucalipto cultivadas *in vitro* (BASSO et al., 2003) a concentração de Mn foi pouco afetada pela presença de Al no meio de cultura, embora as brotações submetidas aos tratamentos com Al tenham apresentado variações nos teores de Mn durante o período de cultivo. Na pimenteira do reino (VELOSO et al., 1995) notou-se que houve aumento na quantidade de manganês com a adição de Al na solução até a concentração de 15 mg L<sup>-1</sup>, decrescendo nas concentrações superiores. Entretanto, os teores obtidos não se mostraram tóxicos para as plantas, de acordo com as observações destes autores. Por outro lado, Mengel e Kirkby (1987) observaram que, freqüentemente, altos níveis de manganês

nos tecidos das plantas estão associados à toxidez de Al. Entretanto Alam (1983) verificou que, no arroz, o aumento de Al na solução promoveu uma diminuição do teor de Mn.

A concentração de Mn dos cultivares de pereira e marmeleiro analisados está dentro da normalidade de acordo com o Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina para pereira, ou seja, de 30 a 130 mg Kg<sup>-1</sup>. Somente no cultivar Conference na concentração de 15 mg L<sup>-1</sup> o teor de Mn foi considerado acima do normal (135,01 mg Kg<sup>-1</sup>).

Com referência aos micronutrientes nas mudas de goiabeira (SALVADOR et al., 2000), exceto o Cu, os teores foliares de Fe, Mn e Zn apresentaram alterações relacionadas com as concentrações de Al. Para o Fe e Mn, a maior concentração de Al diminuiu significativamente os seus teores, enquanto a de Zn aumentou nas três primeiras adições. Resultados semelhantes também foram relatados por Foy (1984) e Asher (1991). As acumulações de Cu, Fe, Mn, Zn e Al nas folhas, caule e raízes mostraram reduções significativas nos tratamentos de maior adição de Al.

### **Determinação da atividade das enzimas catalase, ascorbato peroxidase e superóxido dismutase em pereira**

Como observado na Figura 14, a atividade da CAT no cultivar Abate Fetel aumentou na presença de Al, enquanto que no cultivar Conference diminuiu na concentração de 30 mg L<sup>-1</sup> de Al.

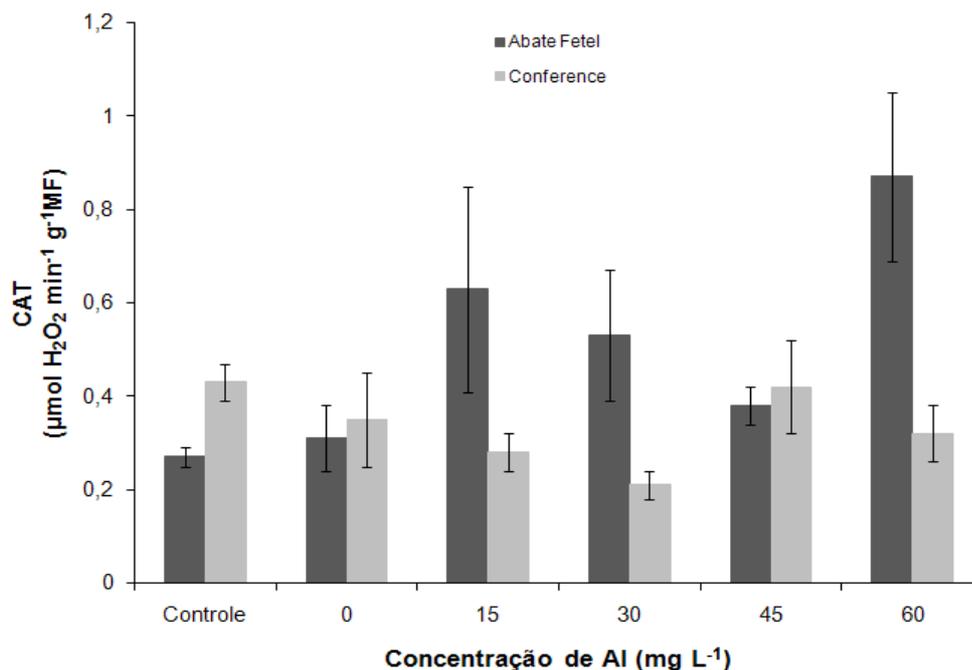


Figura 14: Atividade específica da CAT ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ MF}$ ) na parte aérea de cultivares de pereira tratados com diferentes concentrações de alumínio no enraizamento *in vitro*. As barras representam o erro-padrão da média de três repetições. UFPel, Pelotas, 2009.

A atividade da APX no cultivar Abate Fétel aumentou na presença de Al, enquanto que no cultivar Conference diminuiu, com exceção da concentração de  $45 \text{ mg L}^{-1}$  onde houve um aumento da atividade dessa enzima (Figura 15).

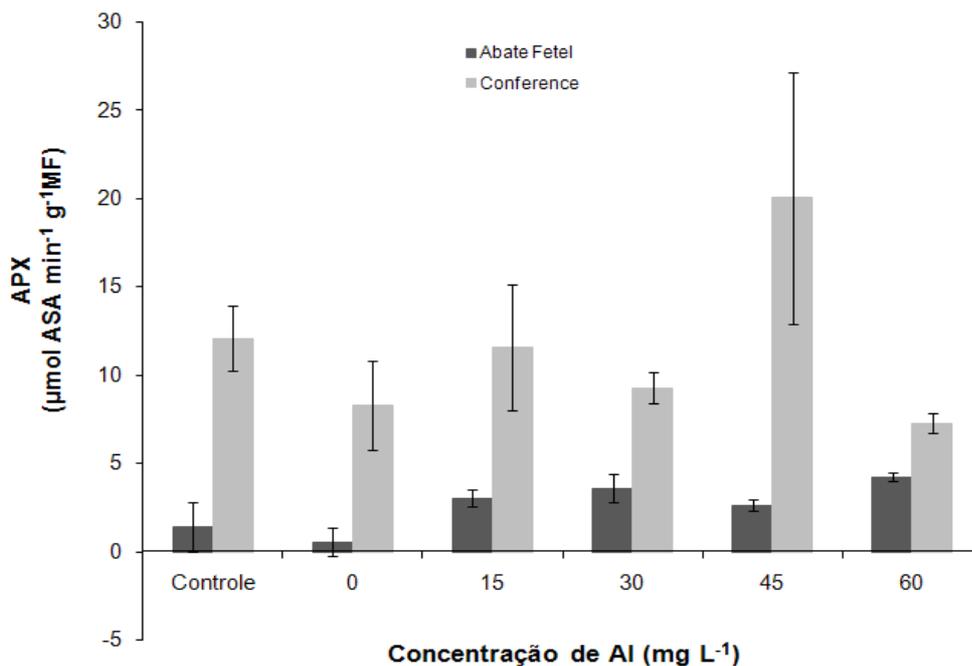


Figura 15: Atividade específica da APX ( $\mu\text{mol Ascorbato min}^{-1} \text{mg}^{-1}\text{MF}$ ) na parte aérea de cultivares de pereira tratados com diferentes concentrações de alumínio no enraizamento *in vitro*. As barras representam o erro-padrão da média de três repetições. UFPel, Pelotas, 2009.

Na Figura 16 podemos observar que a atividade da SOD no cultivar Abate Fetel aumentou somente nas concentrações de 15 e 60  $\text{mg L}^{-1}$  de Al e no cultivar Conference aumentou em todos os tratamentos com esse metal presente.

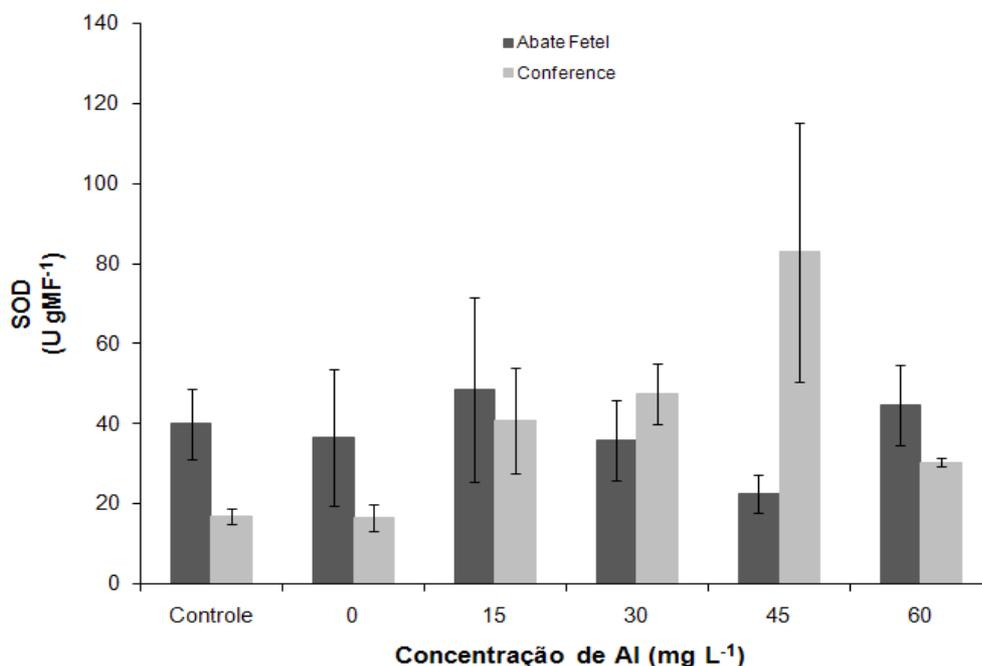


Figura 16: Atividade específica da SOD ( $\text{U mgMF}^{-1}$ ) na parte aérea de cultivares de pereira tratados com diferentes concentrações de alumínio no enraizamento *in vitro*. As barras representam o erro-padrão da média de três repetições. UFPel, Pelotas, 2009.

Segundo Apel e Hirt (2004) a produção de espécies de oxigênio reativo (EROs) parece ser um evento dinâmico durante o desenvolvimento vegetal, bem como uma resposta da planta a estresses bióticos e abióticos. As plantas possuem sistemas enzimáticos de defesa para a desintoxicação de vários tipos de espécies de oxigênio reativo (por exemplo peróxidos, superóxidos), envolvendo as enzimas superóxido dismutase, várias peroxidases, catalase, etc (DARKÓ et al., 2004). Em trabalho com trigo, Darkó et al. (2004) indicaram que algumas enzimas antioxidantes, especialmente SOD, CAT e APX, foram ativadas durante o estresse por Al, já que apresentaram um aumento nas atividades. Nesse presente trabalho os cultivares de pereira também tiveram as enzimas CAT, APX e SOD ativadas, já que em algumas concentrações de Al houve um aumento na atividade.

O aumento na atividade da enzima SOD, que é um modo de sinalização do processo de estresse oxidativo, indica que a exposição ao íon  $\text{Al}^{+3}$  está gerando uma quantidade de radicais superóxido nessas concentrações que a quantidade de enzima SOD existente não consegue degradar, obrigando a célula a ativar a síntese da SOD (BOSCOLO, 2001; SIMONOVICOVÁ et al, 2004).

A degradação do radical superóxido pela SOD produz  $H_2O_2$  na célula. O balanço entre as atividades das enzimas SOD e CAT/APX é muito importante para o sistema de defesa antioxidantes, pois CAT e APX possuem a função de degradar a molécula de  $H_2O_2$ , como modo de proteger as células dos produtos do estresse oxidativo (CAPALDI, 2006).

A baixa atividade da SOD na presença de metais pesados, como observado no cultivar Abate Fetel com  $45 \text{ mg L}^{-1}$  de Al, pode favorecer o acúmulo de radicais superóxido, que contribui para a ocorrência de danos nas membranas celulares (BHATTACHARJEE, 1998).

Capaldi (2006) considerou que em células de tabaco houve maior atividade da SOD no tratamento com Al, porém sem ter muita diferença do controle, a atividade da catalase foi próxima no tratamento com pH 4,2 com ou sem Al, mas foi maior do que no controle e a atividade da APX no tratamento com baixo pH e Al foi maior do que em relação ao controle. Ainda segundo Capaldi (2006) o incremento na atividade da SOD sugere um aumento no conteúdo de radicais superóxido, pois a SOD transforma estes radicais em  $H_2O_2$ . Esse aumento foi mais significativo nos tratamentos com baixo pH e presença de Al. O aumento das concentrações de  $H_2O_2$  fez com que as enzimas antioxidantes aumentassem sua atividade, sendo que a CAT e a APX atuam diretamente na quebra do peróxido de hidrogênio, como modo de defesa celular aos agentes oxidantes.

Já Schuch et al. (2009) estudando o efeito do Al em marmeleiro observaram que a atividade das enzimas CAT e SOD não foram alteradas pela presença desse metal, diferente do que foi observado por Boscolo (2001) em milho, onde houve um aumento da atividade da SOD quando as plantas foram submetidas a concentrações altas de Al.

## **CONCLUSÕES**

De maneira geral, os cultivares de marmeleiro tiveram melhor enraizamento do que os cultivares de pereira, sendo possível concluir que esses cultivares foram mais tolerantes ao Al do que os cultivares de pereira. Já com relação a parte aérea, se conclui que os cultivares de pereira é que foram mais tolerantes ao Al do que os cultivares de marmeleiro. A presença de Al e o aumento das suas concentrações não interferiram na absorção de nutrientes. E por fim, o cultivar Abate Fetel apresentou um melhor sistema antioxidante do que o cultivar Conference, em relação as enzimas analisadas.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tendo em vista que o objetivo do trabalho era diferenciar os genótipos em relação a tolerância ao Al, pode-se dizer que pelas concentrações utilizadas não foi possível fazer essa distinção. Um dos problemas começa com a falta de trabalhos relacionados a esse assunto.

Pelo fato de se trabalhar com plantas *in vitro*, não foi possível obter quantidade de massa seca suficiente para fazer repetições dos resultados da análise de nutrientes, não permitindo assim uma análise estatística .

Na análise das enzimas, apesar de algumas tentativas, não foi possível realizar a análise dos cultivares de marmeleiro, devido a falta de ajuste dos protocolos para esses cultivares e a falta de material, já que o que se obteve foi utilizado nessas poucas tentativas.

Visualmente os quatro genótipos apresentavam parte aérea e raízes normais, ou seja, sem alterações morfológicas visíveis em relação ao controle.

No final do trabalho se esperava poder concluir que os cultivares de pereira eram tolerantes ao alumínio e os de marmeleiro não, justificando a utilização de mudas autoenraizadas em solos com alta concentração desse metal.

Uma sugestão interessante seria a utilização de concentrações maiores com intervalos maiores para que se possa tentar distinguir os genótipos quanto a tolerância ao Al.

## REFERÊNCIAS

ALAM, S. M. Effect of aluminum on the dry matter and mineral content of rice. **Journal of Science Technology**, Peshawar, v.7, n.1/2, p.1-3, 1983.

ALVES, R. M. M.; OLIVEIRA, L. E. M.; NETO, A. E. F.; FILHO, N. D. Comportamento diferencial das espécies florestais cássia-verrugosa (*Senna multijuga* (L.C. RICH.) I. & B.) e ipê-mirim (*Tecoma stans* H.B.K.) na presença de alumínio. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v.25, n.5, p.1161-1168, 2001.

ANDREW, C. S.; JOHNSON, A. D.; SANDLAND, R. L. Effect of aluminum on the growth and chemical composition of some tropical and temperate pasture legumes. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v.24, p.325-339, 1973.

ANGHINONI, I; MEURER, E. J. Suprimento de nutrientes pelo solo e sua absorção pelas plantas. In: Bissani, C. A.; Gianello, C.; Tedesco, M. J.; Camargo, F. A. O. **Fertilidade dos solos e manejo da adubação de culturas**. Porto Alegre: Genesis, 2004. p.33-42.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annu. Rev. Plant Biol.** v.55, p.373-399, 2004.

ASHER, C. J. Beneficial elements, functional nutrients, and possible new essential elements. In: MORTVEDT, J. J.; COX, F. R.; SHUMAN, L. M.; WELCH, R. M., eds.

**Micronutrients in Agriculture.** Madison, American Society of America, 1991. p.703-723.

AYUB, R. A.; GIOPPO, M. A cultura da Pereira. 2009. Disponível em: [www.uepg.br/uepg\\_departamentos/defito/htm/.../anais/Pera.pdf](http://www.uepg.br/uepg_departamentos/defito/htm/.../anais/Pera.pdf). Acesso em: 17 mar. 2010.

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.

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

BASSO, C.; FREIRE, C. J. S.; SUZUKI, A. Solos, adubação e nutrição. In: NAKASU, B. H.; CENTELLAS-QUEZADA, A.; HERTER, F. G. **Pêra. Produção**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p.55-71.

BASSO, L. H. M.; LIMA, G. P. P.; GONÇALVES, A. N.; VILHENA, S. M. C.; PADILHA, C. C. F. 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*. **Scientia Forestalis**. Piracicaba, n.75, p.9-18, 2007.

BHATTACHARJEE, S. Membrane lipid peroxidation, free radical scavengers and ethylene evolution in *Amaranthus* as affected by lead and cadmium. **Biologia Plantarum**, 40: 131-135, 1998.

BIEMELT, S., KEETMAN, U., ALBRECHT, G. Re-aeratio following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense in roots of wheat seedlings. **Plant Physiol**, 1998, vol.116, p.651-658.

BISSANI, C. A.; GIASSON, C.; CAMARGO, F. A. O. Solos afetados por sais. In: Bissani, C. A.; Gianello, C.; Tedesco, M. J.; Camargo, F. A. O. **Fertilidade dos solos e manejo da adubação de culturas**. Porto Alegre: Genesis, 2004. p.265-275.

BOHNEN, H. Acidez do solo: origem e correção. In: KAMINSKI, J. coord. **Uso de corretivos da acidez do solo no plantio direto**. Pelotas: SBCS – Núcleo Regional Sul, 2000. p.9-19.

BOHNEN, H; MEURER, E. J.; BISSANI, C. A. Solos ácidos e solos afetados por sais. In: Meurer, E. J. **Fundamentos de Química do Solo**. Porto Alegre: Genesis, 2000. p.109-125.

BOSCOLO, P. R. S. **Relação entre estresse oxidativo e a tolerância ao alumínio ( $Al^{+3}$ ) em milho**. 2001.104 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

BRACCINI, M. C. L.; MARTINEZ, H. E. P.; BRACCINI, A. L. Avaliação de linhagens de cafeeiros quanto à tolerância ao alumínio pelo método do papel-solução. **Bragantia**. Campinas, n.59, v.2, p.221-226, 2000.

BURKHARDT, S. L.; VILLA, F.; SILVA, A. L.; COMIM, J. J.; PASQUAL, M. Avaliação de porta-enxertos de videira *in vitro* em condições de estresse por alumínio. **Ciência Téc. Vitiv.** , v.23, n.1, p.21-27, 2008.

CAMARGO, C. E. O.; CAMARGO, O. B. A.; SOUZA, D. M. Diferentes concentrações de alumínio em solução nutritiva na tolerância de cultivares de arroz. **Bragantia**. Campinas, v.43, n.2, p.357-368, 1984.

CAMBRAIA, J. Mecanismos de tolerância a toxidez de alumínio em plantas. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FISIOLÓGIA VEGETAL, 2., Piracicaba, 1989. **Anais...** Piracicaba: SBFV; ESALQ, 1989. p.85-92.

CAMELLATO, D. Propagação. In: **Frutas do Brasil-46**, Pêra: Produção. Brasília – DF: Embrapa Informação Tecnológica, p.37-45, 2003.

CAMPBELL, J. Pear Rootstocks. The State of New South Wales, **NSW Agriculture**. Agfact H4.1.15, 1.ed. 2003.

CAPALDI, F. R. **Estresse oxidativo e diferenças na sensibilidade de células de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) cv. BY-2 ao alumínio e à acidez**. 2006. 150f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, São Paulo.

CARVALHO, J.G. de. **Efeito de aplicações foliares de oxiclóreto de cobre em cafeeiros (*Coffea arábica* L.)**. Lavras: ESAL, 1980. 43p. Dissertação ( Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas).

COLOMBO, R.; NÉRI, C. M. Portinnesti del Pero, un modello vincente. **La Tecnica / L'Impianto del Frutteto**, Imola (BO), n.9, p.72-74. Disponível em: <http://www.ermesagricoltura.it/rivista/2003/settembre/RA030972s.pdf>

CUSTÓDIO, C. C.; BOMFIM, D. C.; SATURNINO, S. M.; NETO, N. B. M. Estresse por alumínio e por acidez em cultivares de soja. **Scientia Agrícola**. Piracicaba, v.59, n.1, p.145-153, 2002.

DANTAS, A. C. M., FORTES, G. R. de L.; SILVA, J. B.; NEZI, A. N.; RODRIGUES, A. C. R. Tolerância ao alumínio em porta-enxertos somaclonais de macieira cultivados em solução nutritiva. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.4, p.615-623, 2001.

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

DE LA FUENTE, J.M.; ESTRELLA, L.H. Advances in the Understanding of aluminum Toxicity and the Development of Aluminum – Tolerant Transgenic Plants. **Advances in Agronomy**. 1999, v.66, p.103-120.

DEGENHARDT, J.; LARSEN, P. B.; HOWELL, S. H.; KOCHIAN, L. V. Aluminum resistance in the Arabidopsis Mutant alr-104 Is Caused by an Aluminum-Induced Increase in Rhizosphere pH. **Plant Physiology**. , v.117, p.19-27, 1998.

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

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C.; **Propagação de plantas frutíferas**. 1.ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 221p.

FACHINELLO, J. C.; MUSACCHI, S.; ZUCCHERELLI, S.; SANSAVINI, S. Efeito da interação porta-enxerto copa no padrão isoenzimático de plantas de pereira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 21, n. 3, p. 288-296, 1999.

FAGERIA, N. K. Tolerância diferencial de cultivares de arroz ao alumínio em solução nutritiva. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.17, n.1, p.1-9, 1982.

FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V. C.; WRIGHT, R. J. The effects of aluminum on growth and uptake of Al and P by rice. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.24, n.6, p.677-682, 1989.

FAGERIA, N. K.; ZIMMERMANN, F. J. P. Seleção de cultivares de arroz para tolerância a toxidez de alumínio em solução nutritiva. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.14, n.2, p.141-147, 1979.

FAQUIN, V.; VALE, F. R. Toxidez de alumínio e manganês. **Inf. Agropec.**, 15:28-38, 1991.

FORTUNATO, R. P.; NICOLOSO, F. T. Toxidez de alumínio em plântulas de grápia (*Apuleia leiocarpa* Vog. Macbride). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.1, p.89-95, 2004.

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

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

FOY, C. D. Soil chemical factors limiting plant root growth. In: HATFIELD, J.L., ed. **Limitations to plant root growth**. New York, Springer-Verlag, 1992. p.97-149.

FURLANI, P.R. Efeitos fisiológicos do alumínio em plantas. In: SIMPÓSIO AVANÇADO DE SOLOS E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 2., Piracicaba, 1989. **Anais**. Campinas, Fundação Cargill, 1989. p.73-90.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, 59:309-314, 1977.

GRAHAM, D.; PATTERSON, B. D. Responses of plants to low non-freezing temperatures: proteins, metabolism and acclimation. **Annu. Rev. Plant Physiol.** v.33, p.347-372, 1982.

GRIME, J. P.; HODGSON, J. G. An investigation of the ecological significance of lime chlorosis by means of large scale comparative experiments. In: RORISON, I. H. **Ecological aspects of the mineral nutrition of plants**. Sheffield: British Ecological Society, 1969. p.67-69.

GUTIERREZ, A. Guia de variedades da pêra européia. 2009. Disponível em: <http://www.jornalentreposto.com.br/qualidade/cqh/269-guia-de-variedades-da-pera-europeia>. Acesso em: 24 dez. 2009.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T. et al. **Plant propagation: principles and practices**. 6.ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1997. 770p.

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. M.; REIS, C. E.

S. Mecanismos associados à tolerância ao alumínio em plantas. **Ciências Agrárias**. Londrina, v. 28, n.2, p.219-228, 2007.

HAVIR, E. A., MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Physiologia Plantarum**, 1987, vol. 84, p.450-455.

HELYAR, K. R. Effects of aluminum and manganese toxicity on legume growth. In: ANDREW, C. S.; KAMPRATH, E. J. (Ed.). **Mineral nutrition of legumes in tropical and subtropical soils**. Melbourne: CSIRO, 1978, p.207-231.

HIRANO, Y.; HIJII, N. Effects of low pH and aluminum on root morphology of Japanese red cedar saplings. **Environmental Pollution**. New York, v.101, p.339-347, 1998.

HOWELER, R. H.; CADAVID, L. F. Screening of rice cultivars for tolerance to Al toxicity in nutrient solutions and compared with a field screening method. **Agronomy Journal**, Madison, v.68, n.5, p.551-555, 1976.

IZUTA, T.; MIWA, M.; MIYAKE, H.; TOTSUKA, T. Effects of low pH and excess Al on growth, water content and nutrient status of Japanese cedar seedlings. **Environmental sciences**, v.4, p.113-125, 1996.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. Mercados interno e externo. In: NAKASU, B. H.; CENTELLAS-QUEZADA, A.; HERTER, F. G. **Pêra. Produção**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p.10-19.

KAMINSKI, J.; RHEINHEIMER, D. dos S. A acidez do solo e a nutrição mineral de plantas. In: KAMINSKI, J. coord. **Uso de corretivos da acidez do solo no plantio**

**direto.** Pelotas: SBCS – Núcleo Regional Sul, 2000. p.21-39.

KELTJENS, W. G.; VAN LOENEN, E. Effects of aluminum on growth and chemical composition of hydroponically grown seedlings of five different forest tree species. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.119, n.1, p.39-50, 1989.

KIDD, P. S.; PROCTOR, J. Effect of aluminium on the growth and mineral composition of *Betula pendula* Roth. **Journal of Experimental Botany**. Oxford, v. 51, p.1057-1066, 2000.

KOCHIAN, L. V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**. v.46, p.237–260, 1995.

KOHNO, Y.; MATSUMURA, H.; KOBAYASHI, T. Effects of solution pH on the growth of *Cryptomeria japonica* and *Chamaecyparis obtuse* in growth in nutrient solution culture. **Journal of Japan Society for Atmospheric Environment**, v.32, p.29-37, 1997.

KONARSKA, A. Effects of aluminum on growth and structure of red pepper (*Capsicum annum* L.) leaves. **Acta Physiol Plant**. v.32, p.145-151, 2010.

KOTZÉ, W. A. G. **The effect of aluminium on plant growth and its amelioration in acid subsoils of the Western Cape**. Stellenbosch: University of Stellenbosch, 1974. 100 p. Ph.D. Thesis.

LACERDA, M. A. D. de; LACERDA, R. D. de; ASSIS, P. C. De O. A participação da fruticultura no agronegócio brasileiro. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, ISSN 1519-5228, v. 4 – n. 1 - 1º semestre 2004.

LEBLAY C., CHEVREAU E., RABOIN L. M. Adventitious shoot regeneration from in vitro leaves of several pear cultivars (*Pyrus communis* L.). **Plant Cell, tissue and organ culture**, 1991, vol.25, p.99-105.

LORETI, F.; GIL, G. Portainjertos para el peral: situacion actual y perspectivas. **Fruticola**, Italia, v.15, n.2, p.45-50, may-ago, 1994.

MA, J. F.; FURUKAWA, J. Recent progress in the research of external Al detoxification in higher plants: a minireview. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v.97, n.1, p.46-51, 2003.

MA, J. F.; RYAN, P. R.; DELHAIZE, A. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. **Trends Plant Science**, London, v.6, n.6, p.273-278, 2001.

MA, J. F.; ZHENG, S. J.; MATSUMOTO, H. Detoxifying aluminium with buckwheat. **Nature**, v.390, p.569-570, 1997.

MACHADO, P. L. O. de A. **Considerações gerais sobre a toxicidade do alumínio nas plantas**. Rio de Janeiro: EMBRAPA – CNPS, 1997. 22p.

MACHADO, A. A.; CONCEIÇÃO, A. R. **Sistema de análise estatística para Windows**. Winstat. Versão 1.0. UFPel, 2003.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2.ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319p.

MALDANER, J. **Toxidez de alumínio em genótipos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken**. Santa Maria, 2008. 94p.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria.

MARANGONI, B., MALAGUTI, D. I portinnesti Del pero. **L'Informatori Agrario** – Suplemento n. 1. Verona, p. 26-29, 2002.

MARSCHNER, H. Mechanisms of adaptation of plants to acid soils. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.134, n.1, p.1-20, 1991.

MASCARENHAS, H. A. A.; CAMARGO, E. O.; FALIVENE, S. M. P. Efeito do alumínio sobre o crescimento de raízes, peso seco da parte aérea e raízes de diferentes cultivares de soja. **Bragantia**. Campinas, v.43, n.1, p.191-200, 1984.

MASSOT, N.; POSCHENRIEDER, C.; BARCELÓ, J. Differential response of three bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars to aluminum. **Acta Botanica Neerlandica**, Stuttgart, v. 41, p. 293-298, 1992.

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

MENDONÇA, R. M. N.; COELHO, A. F. S.; MARTINEZ, H. E. P.; FONTES, P. C. R.; PEREIRA, P. R. G. Resposta de mudas de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.) cultivadas em solução nutritiva, a diferentes níveis de alumínio. **Revista Ceres**. Lavras, v.46, n. 266, p.357-370, 1999.

MENGEL, K.; KIRKBY, E. A. **Principles of plant nutrition**. 4.ed. Worblaufen-Bern: International Potash Institute, 1987. 687p.

MULLETTE, K. J. Stimulation of growth in *Eucalyptus* due to aluminum. **Plant and Soil**, The Hague, v.42, p.495- 499, 1975.

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

NAIDOO, G.; STEWART, J. McD.; LEWIS, R. J. Accumulation sites of Al in snapbean and cotton roots. **Agronomy Journal**, Madison, v.70, n.3, p.489-492, 1978.

NAKANO, Y., ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, 1981, vol.22, p.867-880.

NAKASU, B. H. Introdução. In: NAKASU, B. H.; CENTELLAS-QUEZADA, A.; HERTER, F. G. **Pêra. Produção**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p.9.

NAKASU, B. H.; FAORO, I. D. Cultivares. In: NAKASU, B. H.; CENTELLAS-QUEZADA, A.; HERTER, F. G. **Pêra. Produção**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p.29-36.

OLIVEIRA, P. H. de. **Herança genética e mapeamento molecular da tolerância à toxicidade do alumínio em aveia (*Avena sativa* L.)**. 2002. 102 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

PATERNIANI, M. E. A. G. Z.; FURLANI, P. R. Tolerância à toxicidade de alumínio de linhagens e híbridos de milho em solução nutritiva. **Bragantia**. Campinas, v.61, n.1, p.11-16, 2002.

PEGTEL, D. M. Responses of plants to Al, Mn and Fe, with particular reference to *Succisa pratenses* Moench. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 43, p. 43-55, 1986.

PERAZZOLO, G. Problemática da cultura da pereira no Rio Grande do Sul. In: II Reunião Técnica da Cultura da Pereira, 2, 2008, Lages. **Anais...** Lages, SC. p.20-24.

PEREIRA, W. E.; SIQUEIRA, D. L.; PUIATTI, M.; MARTÍNEZ, C. A.; SALOMÃO, L. C. C.; CECON, P. R. Growth of citrus rootstocks under aluminium stress in hydroponics. **Scientia Agrícola**. Piracicaba, v.60, n.1, p.31-41, 2003.

PETRI, J. L. Problemática da cultura da pereira no Brasil. In: II Reunião Técnica da Cultura da Pereira, 2, 2008, Lages. **Anais...** Lages, SC. p.17-19.

PONNAMPERUMA, F. N.; BRADFIELD, R.; PEECH, M. Physiological disease of rice attributable to iron toxicity. **Nature**, 175, 265.

QUEZADA, A. C.; NAKAZU, B. H.; HERTER, F. G. **Pêra: produção**. Embrapa clima Temperado, (Pelotas, RS). Embrapa Informação Tecnológica, 105p, 2003.

QUOIRIN, M., LEPOIVRE, P. Étude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus*. **Acta Horticulturae**, The Hague, v.78, p.437-442, 1977.

RAVEN, P. H; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 830p.

RICHARDS, D. K., SCHOTT, E. J., SHARMA, Y. K., DAVIS, K., GARDNER, R. C. Aluminum induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, 1998, vol.116, p.409-418.

SANSAVINI, S. 1994. Performance of micropropagated pear trees. Disponível em: [http://www.actahort.org/books/367/367\\_34.htm](http://www.actahort.org/books/367/367_34.htm). Acesso em: 27 dez. 2009.

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

SCHIER, G. A. Response of red spruce and balsam fir seedlings to aluminium toxicity in nutrient solutions. **Canadian Journal of Forest Research**. Ottawa, v.15, n.1, p.29-33, 1985.

SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C. Micropropagação de plantas frutíferas. In: **Propagação de plantas frutíferas**. 1ª ed.. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 2005. p. 155-173.

SCHUCH, M. W.; CELLINI, A.; MASIA, A.; MARINO, G. Alumínio e estresse oxidativo em porta-enxerto de pereira, marmeleiro BA 29, *in vitro*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 20, 2008, Vitória – ES. **Anais...** Vitória – ES: SBF, 2008. CD-ROM.

SCHUCH, M. W.; CELLINI, A.; MASIA, A.; MARINO, G. Aluminium-induced effects on growth, morphogenesis and oxidative stress reactions in *in vitro* cultures of quince. **Scientia Horticulturae**. (No prelo). 2009.

SCHÜTZENDÜBEL, A.; POLLE, A. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. **J. Exp. Bot.** v. 53, p.1351-1365, 2002.

SIEGEL, N.; HAUG, A. Calmodulin - dependent formation of membrane potential in barley root plasma membrane vesicles: A biochemical model of aluminum toxicity in plants. **Physiol. Plant.**, 59:285-291, 1983.

SILVA, J. A. G.; CARVALHO, F. I. F.; COIMBRA, J. L. M.; BENIN, G.; OLIVEIRA, A. C.; VIEIRA, E. A.; FINATTO, T.; BERTAN, I.; SILVA, G. O.; GARCIA, S. M. Tolerância à toxicidade por alumínio em cultivares de aveia (*Avena sativa* L.) sob cultivo hidropônico. **Revista Brasileira de Agrociência**. Pelotas, v.12, n.3, p.265-271, 2006.

SIMONOVICOVÁ, M.; HUTTOVÁ, J.; SIROKÁ, B.; TAMÁS, L. Root growth inhibition by aluminum is probably caused by cell death due to peroxidase-mediated hydrogen peroxide production. **Protoplasma** 224:91-98, 2004.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO – NÚCLEO REGIONAL SUL. **Manual de adubação e de calagem para os Estado do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 10<sup>a</sup> Ed. Porto Alegre. 2004.

SOUSA, C. A. F. de. **Influência do alumínio na mobilização de reservas, nutrição mineral e crescimento de plântulas de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)**. Lavras: ESAL, 1991. 120 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras.

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. 2. Ed rev. e ampl. Porto Alegre: Departamento de Solos, UFRGS, 1995. 174p.

TEDESCO, M. J.; BISSANI, C. A. Acidez no solo e seus efeitos nas plantas. In: Bissani, C. A.; Gianello, C.; Tedesco, M. J.; Camargo, F. A. O. **Fertilidade dos solos e manejo da adubação de culturas**. Porto Alegre: Genesis, 2004. p.75-92.

THAWORNWONG, N.; DIEST, A. V. Influence of high acidity and aluminum on the growth of lowland rice. **Plant and Soil**, Netherlands, v.41, n.1, p.141-159, 1974.

TREVISAN, R.; ANTUNES, L.E.C.; GONÇALVES, E.D. Propagação de plantas frutíferas nativas. In: **Espécies Frutíferas Nativas do Sul do Brasil**. 1 ed. Pelotas, RS: Embrapa Clima Temperado, 2004, v.1, p.47-69.

VELOSO, C. A. C.; MURAOKA, T.; MALAVOLTA, E.; CARVALHO, J. G. de. Efeitos do alumínio em pimenteiras do reino (*Piper nigrum* L.) cultivadas em solução nutritiva. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.52, n.2, p.368-375, 1995.

VILLA, F.; BURKHARDT, S. L.; SILVA, A. L.; PASQUAL, M. Avaliação *in vitro* de dois porta-enxertos de videira introduzidos em meio de cultivo contendo alumínio. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 20, 2008, Vitória – ES. **Anais...** Vitória – ES: SBF, 2008. CD-ROM.

WADT, P. G. F. Manejo de solos ácidos do estado do Acre. Rio Branco: Embrapa Acre, 2002. 28p.

YAMAMOTO, Y., KOBAYASHI, Y.; DEVI, S. R.; RIKIISHI, S.; MATSUMOTO, H. Aluminum Toxicity Is Associated with Mitochondrial Dysfunction and the Production of Reactive Oxygen Species in Plant Cells. **Plant Physiology**, v.128, p.63-72, 2002.

ZYSSET, M.; BRUNNER, I. FREY, B.; BLASER, P. Response of European chestnut to varying calcium/aluminum ratios. **Journal of environmental quality**, v.25, p.702-708, 1996.