

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

TOXIDEZ DE ALUMÍNIO EM GENÓTIPOS DE
Pfaffia glomerata (Spreng.) Pedersen e *Pfaffia tuberosa*
(Spreng.) Hicken

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Joseila Maldaner

Santa Maria, RS, Brasil

2008

TOXIDEZ DE ALUMÍNIO EM GENÓTIPOS DE
Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Pfaffia tuberosa
(Spreng.) Hicken

por

Joseila Maldaner

Dissertação apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Agronomia.

Orientadores: Prof. Danton Camacho Garcia
Prof. Fernando Teixeira Nicoloso
Prof^a Maria Rosa Chitolina Schetinger

Santa Maria, RS, Brasil

2008

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Agronomia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**TOXIDEZ DE ALUMÍNIO EM GENÓTIPOS DE *Pfaffia
glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Pfaffia tuberosa* (Spreng.)
Hicken**

elaborada por
Joseila Maldaner

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Agronomia

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Danton Camacho Garcia - UFSM
(Presidente/Orientador)

Prof. Fernando Teixeira Nicoloso - UFSM
(Orientador)

Prof. Arthur Germano Fett Neto – UFRGS

Prof. Maria Rosa Chitolina Schetinger - UFSM
(Co-Orientadora)

Santa Maria, 22 de fevereiro de 2008.

DEDICATÓRIA

À meus pais, Lotário Maldaner e Lori Maldaner

pela vida, pelo amor e confiança que sempre em mim depositaram

Às minhas irmãs, Viviane Maldaner e Claudia Regina Maldaner

pelo companheirismo, apoio e participação em todos os momentos

Ao meu namorado, Ricardo

pelo amor, pelo carinho com que me acompanhou e me incentivou,

especialmente na conclusão deste trabalho

Dedico e ofereço!

AGRADECIMENTOS

Ao professor Fernando por, desde o início da graduação, despertar em mim a vontade de trabalhar com pesquisa científica, pela orientação e ensinamentos.

Ao professor Danton pela receptividade em abraçar conjuntamente essa causa.

À professora Maria Rosa, pelo apoio e colaboração, especialmente nas análises bioquímicas.

Aos colegas de Laboratório: Renata, Jamile, Luciane T., Liana, Denise, Etiane, Rejane, Luciane B., Gabriel, por toda a colaboração e apoio prestados durante o desenvolvimento do trabalho.

À todos que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse possível.

À UFSM, ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, aos professores, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES, e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, obrigada.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| SUMÁRIO..... | 6 |
| LISTA DE FIGURAS..... | 8 |
| LISTA DE TABELAS..... | 10 |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | 11 |
| RESUMO..... | 12 |
| ABSTRACT..... | 14 |
| | |
| 1. INTRODUÇÃO GERAL | 16 |
| 1.1. Objetivos..... | 18 |
| 1.1.1. Objetivo Geral..... | 18 |
| 1.1.2. Objetivos Específicos..... | 18 |
| | |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 19 |
| 2.1. Gênero <i>Pfaffia</i> | 19 |
| 2.2. Solos ácidos e a toxicidade por alumínio..... | 23 |
| 2.3. Estresse oxidativo - Espécies Reativas de Oxigênio..... | 28 |
| 2.4. Sistema Antioxidante..... | 29 |
| | |
| 3. RESULTADOS..... | 35 |
| 3.1. ARTIGO 1: Toxidez de alumínio em plântulas de <i>Pfaffia glomerata</i> e <i>Pfaffia tuberosa</i> cultivadas <i>in vitro</i> . Joseila Maldaner; Fernando Teixeira Nicoloso; Renata Rauber; Jamile Fabbrin Gonçalves; Liana Verônica Rossato; Etiane Caldeira Skrebsky; Rejane Flores; Danton Camacho Garcia (submetido, Revista Ciência Rural)..... | 36 |
| | |
| 3.2. ARTIGO 2: Aluminum induced oxidative stress in two accessions of <i>Pfaffia glomerata</i> . Joseila Maldaner; Fernando Teixeira Nicoloso; Denise Cargnelutti; Jamile Fabbrin Gonçalves; Renata Rauber; Luciane Almeri Tabaldi; Luciane Belmonte Pereira; Liana Verônica Rossato; Etiane Caldeira Skrebsky; Maria Rosa Chitolina Shetinger; Danton Camacho Garcia..... | 52 |

| | |
|---|-----------|
| 4. DISCUSSÃO..... | 81 |
| 5. CONCLUSÕES..... | 84 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 85 |

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

| | |
|---|----|
| FIGURA 01 - Estrutura do ecdisteróide β -ecdisona | 21 |
| FIGURA 02 – Distribuição relativa das espécies de Al em solução do solo | 24 |
| FIGURA 03 – Via Asada-Halliwel de detoxificação do peróxido de hidrogênio e regeneração do ácido ascórbico envolvendo várias enzimas antioxidantes..... | 31 |
| FIGURA 04 - Caminho das espécies reativas de oxigênio e sua remoção nas plantas | 32 |
| FIGURA 05 - Estrutura do ácido ascórbico atuando na estabilização dos radicais livres. | 33 |

ARTIGO 2

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 - Aluminum content in roots (A) and shoot (B) of two accessions (BRA and JB/UFSM) of <i>P. glomerata</i> exposed to five Al concentrations. Values are expressed as means of three replicates \pm S.D. Identical capital letters indicate no significant differences among the <i>Pfaffia glomerata</i> accessions in the same Al concentration ($p < 0.05$) according to Tukey's multiple range test. Identical lowercase letters indicate no significant differences between Al concentrations in the same <i>P. glomerata</i> accession ($p < 0.05$) according to Tukey's multiple range test..... | 61 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| FIGURA 2 - Changes in root (A), shoot (B) and total (C) dry weight, and root length (D) of two accessions (BRA and JB/UFSM) of <i>P. glomerata</i> exposed to five Al concentrations. Identical capital letters indicate no significant differences among the <i>Pfaffia glomerata</i> accessions in the same Al concentration ($p < 0.05$) according to Tukey's multiple range test. Identical lowercase letters indicate no significant differences between Al concentrations in the same <i>P. glomerata</i> accession ($p < 0.05$) according to Tukey's multiple range test..... | 62 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| FIGURA 3 - Changes in hydrogen peroxide in roots (A) and shoot (B), and malondialdehyde (MDA) levels in roots (C) and shoot (D) of two accessions (BRA and JB/UFSM) of <i>P. glomerata</i> exposed to five Al concentrations. Values are expressed as means of three replicates \pm S.D. Identical capital letters indicate no significant differences among the <i>Pfaffia glomerata</i> accessions in the same Al concentration ($p < 0.05$) according to Tukey's multiple range test..... | 63 |
|--|----|

range test. Identical lowercase letters indicate no significant differences between Al concentrations in the same *P. glomerata* accession ($p < 0.05$) according to Tukey's multiple range test..... 63

FIGURA 4 - Changes in CAT activity in roots (A) and shoot (B), APX activity in roots (C) and shoot (D) and SOD activity in roots (E) and shoot (F) of two accessions (BRA and JB/UFSM) of *P. glomerata* exposed to five Al concentrations. Values are expressed as means of three replicates \pm S.D. Identical capital letters indicate no significant differences among the *Pfaffia glomerata* accessions in the same Al concentration ($p < 0.05$) according to Tukey's multiple range test. Identical lowercase letters indicate no significant differences between Al concentrations in the same *P. glomerata* accession ($p < 0.05$) according to Tukey's multiple range test..... 65

FIGURA 5 - NPSH concentration in roots (A) and shoot (B), ASA concentration in roots (C) and shoot (D) and carotenoids concentration in shoot (E) of two accessions (BRA and JB/UFSM) of *Pfaffia glomerata* exposed to five Al concentrations. Values are expressed as means of three replicates \pm S.D. Identical capital letters indicate no significant differences among the *Pfaffia glomerata* accessions in the same Al concentration ($p < 0.05$) according to Tukey's multiple range test. Identical lowercase letters indicate no significant differences between Al concentrations in the same *P. glomerata* accession ($p < 0.05$) according to Tukey's multiple range test..... 67

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

TABELA 1 - Número de raízes por plântula (nr) aos 15 dias após a inoculação (DAI), altura da maior brotação (altma), média das alturas (Xalt); número de segmentos nodais da maior brotação (N° segma), número total de segmentos nodais por plântula (N°tseg) e número de folhas por plântula (N° folhas) de três genótipos de *Pfaffia* submetidos a cinco concentrações de Al no meio de cultura, aos 24 DAI.....44

TABELA 2 - Matéria fresca da parte aérea (mfpa), matéria fresca da raiz (mfr), matéria fresca total por plântula (mft), matéria seca da parte aérea (mspa), matéria seca da raiz (msr), matéria seca total por plântula (mst) e relação entre matéria seca de raiz e da parte aérea (msr/mspa) de três genótipos de *Pfaffia* submetidos a cinco concentrações de Al no meio de cultura, aos 24 dias após a inoculação.....45

LISTA DE ABREVIATURAS

Al – alumínio

ALA-D – enzima ácido 5-aminolevulínico / δ -aminolevulinato desidratase

Al^{3+} - alumínio trivalente (Al livre), a forma mais tóxica

$Al(H_2O)_6^{3+}$ – forma octaedral hexahidratado do alumínio – Al^{3+}

$AlOH^{2+}$; $Al(OH)_2^+$; $Al(OH)_3^0$ e $Al(OH)_4^-$ - hidróxidos de alumínio

AlF^{2+} - fluoreto de alumínio

$AlSO_4^+$ - sulfato de alumínio

$AlH_2PO_4^{2+}$ - fosfato de alumínio

APX – enzima ascorbato peroxidase / ascorbate peroxidase

ASA – ácido ascórbico /ascorbic acid

ATP – adenina trifosfato

CAT – enzima catalase/ catalase enzyme

CuZnSOD – superóxido dismutase dependente de cobre e zinco

DNA – ácido desoxiribonucléico

ERO – espécies reativas de oxigênio/ ROS – reactive oxygen species

Fe-SOD – superóxido dismutase dependente de ferro

GSH – glutathiona reduzida

GSSG - glutathiona oxidada

$HO\cdot$ - hidroxila

H^+ - próton de hidrogênio

H_2O_2 – peróxido de hidrogênio

MDA – malondialdeído

Mn SOD - Superóxido dimutase dependente de manganês

NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

$OH\cdot$ – radical hidroxila

O_2 - dioxigênio; oxigênio molecular

O_2^- - superóxido

1O_2 - oxigênio singlete

pH – potencial de hidrogênio

SOD - Superóxido dismutase/ superoxide dismutase

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Agronomia
Universidade Federal de Santa Maria

TOXIDEZ DE ALUMÍNIO EM GENÓTIPOS DE *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken

Autora: Joseila Maldaner

Orientadores: Danton Camacho Garcia

Fernando Teixeira Nicoloso

Co-orientador: Maria Rosa Chitolina Schetinger

A toxidez do alumínio (Al), especialmente em solos ácidos, é um fator determinante da baixa produtividade para muitas culturas e, embora um considerável número de trabalhos seja desenvolvido com a finalidade de elucidar esse problema, praticamente inexistem estudos em plantas medicinais. O objetivo do presente trabalho foi identificar e caracterizar aspectos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos da toxidez do Al em dois acessos de *Pfaffia glomerata* (BRA e JB/UFSM) e em um acesso de *Pfaffia tuberosa*. Em condição de cultivo *in vitro*, as plântulas dos três acessos foram submetidas a cinco concentrações de Al (0, 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹) e após 24 dias foram avaliados vários parâmetros de crescimento. Já em sistema de cultivo hidropônico, os dois acessos de *P. glomerata* foram submetidos às mesmas concentrações de Al por 7 dias e após avaliaram-se o crescimento e vários parâmetros bioquímicos ligados ao estresse oxidativo. Em ambas as condições de cultivo, as concentrações de Al acima de 100 mg L⁻¹ afetaram negativamente a maioria dos parâmetros de crescimento nos dois acessos de *P. glomerata*, enquanto a *P. tuberosa* não foi afetada. Entretanto, no cultivo *in vitro* verificou-se aumento do crescimento de ambos acessos de *P. glomerata* na presença de 50 e 100 mg L⁻¹ de Al. No sistema de cultivo hidropônico, embora os padrões de produção de biomassa e alongamento das raízes sejam diferentes entre os dois acessos de *P. glomerata*, verificou-se que o acesso BRA foi mais sensível à toxidez de Al do que o acesso JB/UFSM. A concentração de Al nos tecidos das raízes e parte aérea aumentou com o incremento de Al no substrato de cultivo, porém nas raízes foi maior. O Al provocou aumento mais pronunciado na peroxidação lipídica do acesso BRA. A concentração de H₂O₂ nas raízes do acesso JB/UFSM diminuiu em 150 mg L⁻¹ de Al; por outro lado, houve aumento de H₂O₂ na parte aérea dos dois acessos. A toxidez de Al provocou maior alteração na atividade da catalase (CAT) nas raízes do que na parte aérea. A atividade da CAT de raízes do acesso JB/UFSM aumentou na presença de 50 e 200 mg L⁻¹ de Al, enquanto no acesso BRA ela decresceu em todos níveis de Al. Em geral, tanto em raízes como na parte aérea, a atividade da ascorbato peroxidase (APX) foi mais alta no acesso BRA do que no JB/UFSM. Por outro lado, o decréscimo na atividade da superóxido dismutase (SOD) pela presença de Al foi maior no acesso BRA do que no JB/UFSM. Já com relação ao sistema antioxidante não enzimático, houve um aumento na concentração de ácido ascórbico (AsA) nas raízes do acesso BRA e na parte aérea dos dois acessos, por outro lado houve redução da concentração

de AsA nas raízes do acesso JB/UFSM. Já a concentração de grupos tióis não protéicos (NPSH) foi reduzida nas raízes de ambos os acessos pela presença de Al. A concentração de NPSH na parte aérea do acesso JB/UFSM aumentou na presença de Al. Já no acesso BRA houve aumento da concentração de NPSH na presença de 100 mg L⁻¹ de Al, enquanto houve redução de NPSH nas concentrações de 50, 150 e 200 mg L⁻¹. Concluiu-se que a redução do crescimento dos acessos de *P. glomerata* induzida pela toxidez de Al deveu-se ao aumento do estresse oxidativo, sendo que o acesso JB/UFSM possui um sistema antioxidante mais eficiente do que o acesso BRA na remoção das espécies reativas de oxigênio.

Palavras-chave: Ginseng Brasileiro, estresse oxidativo, alumínio, crescimento, sistema antioxidante.

ABSTRACT

Master Dissertation

Graduate Program in Agronomy

Universidade Federal de Santa Maria

Aluminum toxicity on *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen and *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken genotypes

Author: Joseila Maldaner

Advisers: Danton Camacho Garcia

Fernando Teixeira Nicoloso

Co-adviser: Maria Rosa Chitolina Schetinger

Al toxicity, especially in acid soils, is a determinant factor of lower productivity for several cultures and, although some studies have been developed to elucidate this problem, studies on medicinal plants are extremely rare. The aim of this study was to identify and characterize morphologic, physiologic and biochemical aspects of Al toxicity on two *Pfaffia glomerata* (BRA and JB/UFSM) accessions and one *Pfaffia tuberosa* access. Plantlets of three accessions were submitted to five Al concentrations (0, 50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹) *in vitro* and after 24 days several growth parameters were evaluated. Two accessions of *P. glomerata* were submitted to the same Al concentrations in a hydroponic system during 7 days, after which the growth and some biochemical parameters related to oxidative stress were evaluated. Under both conditions, Al concentrations higher than 100 mg L⁻¹ affected most of the growth parameters of both *P. glomerata* accessions, whereas *P. tuberosa* was not affected. However, *in vitro* we verified an increase in growth for both *P. glomerata* accessions at 50 and 100 mg L⁻¹ Al. In the hydroponic system, although the patterns of biomass production and roots elongation differ for the two accessions of *P. glomerata*, it was observed that the BRA access was more sensitive to Al toxicity than the JB/UFSM access. The Al concentration in root and shoot tissues increased with increasing Al in the substrate, however the increase was greater in the roots. Al triggered a more pronounced increase of lipid peroxidation in the BRA access. The H₂O₂ concentration in JB/UFSM roots decreased at 150 mg L⁻¹ Al, however there was an increase of H₂O₂ in the shoot of both accessions. Al toxicity caused a greater change in catalase activity (CAT) in the roots than in the shoot. CAT activity in the roots of JB/UFSM increased at 50 and 200 mg L⁻¹ of Al, while in the BRA access it decreased at all Al levels. As far as, both in the roots and shoots, the activity of ascorbate peroxidase (APX) was higher in the BRA access than in the JB/UFSM access. On the other hand, the decrease in superoxide dismutase (SOD) activity by Al exposure was greater in BRA than in JB/UFSM. In relation to the non enzymatic antioxidant system, there was an increase in ascorbic acid (AsA) in the roots of the BRA access and in the shoot of both accessions in the presence of Al. On the other hand, there was reduction in AsA concentration in the JB/UFSM roots. The concentration of non-protein thiol groups (NPSH) was reduced by Al in the roots of both accessions. NPSH concentration increased in the shoot of JB/UFSM in the presence of Al. On the other hand, in the BRA access there was an increase of NPSH at 100 mg L⁻¹ Al, while there was a reduction at 50, 150 and 200 mg L⁻¹. We conclude that the reduction in growth of both *P. glomerata* accessions, induced by Al, can be attributed to the increase of oxidative stress, and the JB/UFSM access has a more efficient antioxidant system than that of the BRA access for removing reactive oxygen species.

Key words: Brazilian Ginseng, oxidative stress, aluminum, growth, antioxidant system

1. INTRODUÇÃO:

A toxidez provocada pelo alumínio (Al) é um dos principais fatores limitantes do crescimento das plantas, principalmente em solos com pH abaixo de 5,0. Sua intensidade depende da concentração em que se encontra na solução do solo e da relação com outros elementos, principalmente Ca, P, K e Mg (CANAL & MILELNICZUK, 1983). A acidificação dos solos pode ocorrer naturalmente quando cátions são lixiviados, mas também pode ser acelerada pelas práticas agrícolas ou mesmo pelas chuvas ácidas (KENNEDY, 1986). A elevada acidez pode tornar-se tóxica e causar danos ao desenvolvimento vegetal, sendo fator determinante da baixa produtividade agrícola em solos ácidos, os quais correspondem a 40% das terras aráveis do mundo (FOY et al, 1978). Uma parcela considerável do território brasileiro caracteriza-se por apresentar solos ácidos, boa parte dos quais está concentrada na Região Sul, onde a baixa disponibilidade de fósforo, cálcio, magnésio, associada a elevadas concentrações de Al, é a causa da baixa produtividade para muitas culturas (MACHADO, 1997). 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 e mecanismos pelos quais esse metal afeta o metabolismo vegetal permanecem em grande parte ainda no campo das especulações.

É reconhecido que o primeiro e, talvez, o principal efeito do Al seja a inibição do crescimento radicular através da sua interferência na divisão celular (CLARKSON, 1966, KOCHIAN, 1995). Na célula, o Al altera as propriedades da parede e da plasmalema, inibindo a elongação celular do eixo principal, tornando as raízes mais grossas e pouco funcionais, bem como afeta o sistema de carregadores de nutrientes (AHN et al., 2001). O Al também provoca a diminuição da permeabilidade da membrana plasmática por interagir com os fosfolípidios e por induzir a peroxidação lipídica (YAMAMOTO et al., 2001). Como o maior efeito do Al está na redução do crescimento do sistema radicular, sua influência sobre a absorção de nutrientes nas condições naturais poderá manifestar-se principalmente para aqueles íons cujo suprimento à raiz é na maior parte representado pelo processo de difusão, como é o caso do P e do K (CANAL & MIELNICZUK, 1983).

A entrada de Al no simplasto é rápida (LAZOF et al., 1994), e, uma vez dentro da célula, o Al também interfere em processos relacionados ao núcleo, já que trabalhos indicam que o Al inibe o processo de divisão celular e pode ser encontrado associado ao DNA

(MORIMURA & MATSUMOTO, 1978), além de interagir com outros componentes do protoplasma, tais como enzimas, calmodulina, tubulina e nucleotídeos (MATSUMOTO et al., 1976; TAYLOR, 1989; EMMANUEL e PETER, 1995). Além disso, o Al também diminui a taxa de respiração, interfere em reações enzimáticas que interagem na deposição de polissacarídeos nas paredes celulares (FURLANI, 1983).

Yamamoto et al. (2002) relatam que o Al acumulado em células de tabaco causou redução da atividade mitocondrial, inibindo a respiração e reduzindo a produção de ATP, afetando o crescimento das células. Esses danos em nível mitocondrial foram relacionados com o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).

A exposição das plantas a uma condição de estresse pode intensificar a produção de EROs a ponto de o sistema antioxidante não ser mais capaz de destoxificar essa quantidade excessiva, o que pode causar oxidações a componentes celulares (FOYER et al., 1994). As EROs, através de reações em cadeia, levam à peroxidação lipídica, à inativação de enzimas e à degradação de ácidos nucleicos (LAMB & DIXON, 1997). Para manter em equilíbrio o metabolismo oxidativo e proteger as células dos danos causados pelo excesso de produção das ERO, os organismos vivos possuem um sistema de defesa antioxidante, formado por componentes enzimáticos e não enzimáticos que normalmente mantêm um balanço das ERO dentro das células. Dentre os antioxidantes enzimáticos estão a superóxido dismutase (SOD, E.C. 1.15.1.1), a catalase (CAT, E.C. 1.11.1.6) e a ascorbato peroxidase (APX, E.C. 1.11.1.11). Entre os antioxidantes não-enzimáticos estão o ácido ascórbico, a glutathione reduzida (GSH), os carotenóides e outros grupos tiólicos não protéicos (FOYER et al., 1994; HALL, 2002).

Os efeitos fitotóxicos causados pelo Al são altamente dependentes de pH, concentrações de sais, compostos orgânicos, temperatura e espécie vegetal, fatores que podem ser alterados de acordo com a natureza da composição química do substrato ou da espécie estudada. A tolerância ao Al, como consequência da variabilidade genética, consiste no principal fator individual que confere adaptação das espécies cultivadas em solos ácidos, que tem sido explorada em programas de melhoramento vegetal. A avaliação a campo para reação ao Al tóxico é a mais utilizada pelos melhoristas, principalmente por possibilitar adaptação gradativa dos genótipos ao ambiente e permitir de maneira direta a seleção múltipla em vários caracteres de interesse agrônomo. Entretanto, pode apresentar o inconveniente de reunir grande número de variáveis não controláveis, principalmente pela grande heterogeneidade do solo (FURLANI & CLARK, 1981). Uma técnica eficaz para avaliar a tolerância à toxicidade ao Al³⁺ é o emprego do cultivo hidropônico utilizando soluções nutritivas em laboratório e

identificação da sensibilidade do genótipo por meio da medida da retomada do crescimento (CAMARGO & OLIVEIRA, 1981; DORNELLES, 1994).

Pfaffia glomerata (Spreng.) Pedersen é uma espécie da família Amaranthaceae conhecida como Ginseng Brasileiro, sendo empregada como fitoterápico devido às suas propriedades antitumorais, antidiabéticas, tônico estimulante, atenuante de distúrbios gástricos e estimulante das funções sexuais. Vários metabólitos secundários foram identificados em extratos de raízes dessa espécie, tais como: ácido glomérico e ácido famérico, ecdisterona, rubrosterona, ácido oleanólico e oleanotato β -glicopiranosil. Este amplo emprego tem afetado as reservas naturais dessas espécies devido à exploração predatória, o que justifica o desenvolvimento de projetos e planos de cultivo para as mesmas (FIGUEIREDO et al., 2004).

Pesquisas com plantas medicinais crescem num ritmo pouco intenso. Portanto, pouco se sabe sobre os efeitos do Al no crescimento e desenvolvimento de espécies medicinais. Devido à grande dimensão do problema da baixa produtividade atribuída à acidez dos solos associada ao Al, torna-se necessária a realização de estudos que visam a elaboração de protocolos de seleção de genótipos resistentes ao Al, bem como a elucidação dos mecanismos que conferem a resistência a esse íon.

1.1 Objetivos:

1.1.1 Objetivo geral:

Caracterizar os efeitos do alumínio em aspectos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos de plantas de *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia tuberosa*.

1.1.2 Objetivos específicos:

- avaliar o crescimento de três genótipos de *Pfaffia* cultivados *in vitro* e *ex vitro* na presença de diferentes concentrações de alumínio;
- analisar o comportamento enzimático (catalase, superóxido dismutase, ascorbato peroxidase) e não enzimático (ácido ascórbico, grupos tióis não protéicos e carotenóides), relacionados ao estresse oxidativo de dois acessos de *P. glomerata*, em resposta à exposição ao alumínio.

2. REVISÃO DE LITERATURA:

2.1 *Pfaffia*

O gênero *Pfaffia*, pertencente à família Amaranthaceae, subfamília Gomphrenoideae, tribo Gomphreneae e sub-tribo Frolichinae, abrange cerca de 90 espécies, distribuídas na América do Sul desde a Guiana até a Bolívia e Argentina. No Brasil foram descritas 27 espécies (VIDAL et al., 1967), as quais foram encontradas em todas as regiões, preferencialmente à beira de rios e orlas de matas. Compreende espécies conhecidas popularmente como para-tudo, corango-açu, corango-de-batata ou ainda corango-sempré-viva e principalmente como Ginseng Brasileiro, onde se enquadram a *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (VASCONCELOS, 1982).

É reconhecido nessas espécies um grande potencial medicinal, o qual é atribuído ao fato de suas raízes apresentarem componentes que atuam na regeneração das células, na purificação do sangue, na inibição do crescimento de células cancerígenas, na regularização das funções hormonais e sexuais e como bioenergético (GAHAN, 1984), além de atuar como antidiabético (OLIVEIRA et al., 1980).

Vários compostos já foram identificados em extratos das raízes destas plantas. Nishimoto et al. (1987) isolaram 3 ecdisteróides e 1 saponina triterpênica de *P. iresinoides*, depois de terem verificado, em experimento anterior com esta espécie e com a *P. paniculata*, que ambas apresentavam fofosídeos nas raízes (saponinas e seus glicosídeos), os quais eram responsáveis por uma ação inibitória no crescimento de cultura de células tumorais de melanoma (NISHIMOTO et al., 1984, NAKAI et al., 1984). Posteriormente, Shiobara et al. (1993) isolaram ácidos fáficos até então desconhecidos de *Pfaffia glomerata*: o ácido glomérico (triterpenóide) e o ácido famérico (nortriterpenóide), mas ainda sem função testada biologicamente; no entanto, suas características químicas sugerem uma possível ação antitumoral. A partir da *P. paniculata* Kuntze, foram isolados sitosterol, estigmasterol, alantoína e ácido pfáfico e seus glicosídeos, havendo em alguns desses compostos verificação de atividade antitumoral *in vitro* (NISHIMOTO et al., 1984; NAKAI et al., 1984).

Michihiro et al. (1998) verificaram que o extrato de *P. glomerata*, quando administrado na dose de 1g kg⁻¹ induzia a uma elevação da taxa de natalidade, acompanhada de espermatogênese vigorosa, histologicamente comprovada, em hamsters dourados. Efeito

semelhante foi observado em ratos, que apresentaram aumento na síntese de DNA nas espermatogônias, sugerindo uma possível atividade estênica à essa espécie.

Outros estudos demonstraram que extratos de raízes de *P. glomerata* favoreceram a aprendizagem e a memória de cobaias (MARQUES et al., 2004) e apresentaram efeitos antiinflamatórios, analgésicos (NETO et al., 2005) e antioxidantes (DANIEL et al., 2005). Neto et al. (2004) verificaram que extratos hidroalcoólicos de *Pfaffia glomerata* mostraram-se ativos contra alguns protozoários, como a *Leishmania braziliensis*.

Marques (1998) apresentou dados sobre o efeito benéfico de extratos de *Pfaffia* na memória de curto prazo e memória declarativa em humanos, no desempenho de idosos em testes psicométricos, embora tenha registrado também prejuízo na praxia e orientação geral dos voluntários. Ackel et al. (1999) constataram que o tratamento com a planta aumentou a capacidade aeróbica de homens com idade entre 50 e 75 anos.

Além disso, na medicina popular, as raízes do Ginseng Brasileiro são utilizadas para tratar distúrbios gástricos e como antidiabético (MAGALHÃES, 2000). Pesquisas conduzidas com extratos fracionados de raízes de *Pfaffia glomerata* confirmaram a atividade antihiperlicemiante de extratos butanólicos; em adição, os pesquisadores constataram que a β -ecdisona não está relacionada com o efeito antidiabético (SANCHES et al., 2001). Freitas et al. (2003) constataram que extratos hidroalcoólicos das raízes de *Pfaffia* protegeram a mucosa gástrica de cobaias, confirmando o uso popular da planta.

Além destas propriedades, todas as espécies de *Pfaffia* já estudadas forneceram quantidades relativas de ecdisterona e seus análogos (ecdisteróides). A ecdisterona é um hormônio esteroide precursor da β -ecdisona (Figura 1), hormônio indutor das mudas nos insetos (ecdises). Rações compostas a base de *P. glomerata* foram administradas em criações de bichos-da-seda, no Japão, prolongando seu estágio larval, a fim de obterem maior rendimento na sericultura (NINAGI & MARUYAMA, 1996). Também é atribuído à ecdisona (20-hidroiecdisterona) e outros ginsenosídeos um efeito antioxidante (DANIEL et al., 2005).

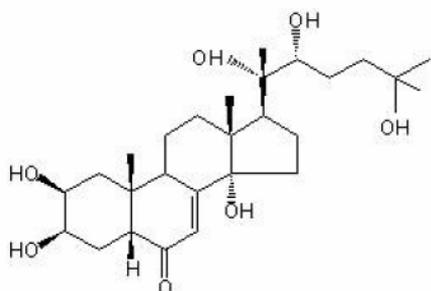


Figura 1 - Estrutura do ecdisteróide β -ecdisona (Adaptado de Daniel et al., 2005)

As saponinas e fitoecdisteróides do gênero não estão ainda totalmente caracterizadas sob o ponto de vista da atividade biológica. Em relação ao efeito dos ecdisteróides, foi constatado que a β -ecdisona não é o composto responsável pelo efeito anti-hiperglicemiante (SANCHES et al., 2001) e antiinflamatório (TANIGUCHI et al., 1998), descrito para a *Pfaffia iresinoides* e *Pfaffia glomerata*, respectivamente.

Em estudo recente, Carneiro et al. (2002) verificaram que uma espécie não identificada do gênero *Pfaffia* apresentava alta tolerância a solos contaminados, desenvolvendo-se abundantemente em solo contaminado com 90 e 1450 mg kg⁻¹ de Cd e Zn, respectivamente. Devido à acumulação de mais de 100 mg kg⁻¹ de Cd, a espécie pode ser considerada hiperacumuladora, o que estimula estudos na exploração de mais esse potencial das faffias em projetos de fitorremediação. O comportamento apresentado pela *Pffafia* sp. pode ser decorrente do fato de a espécie ocorrer naturalmente em áreas de mineração, pois segundo Watanabe (2000), a vegetação encontrada em áreas contaminadas representa importante fonte potencial de ecótipos tolerantes à poluição e apresenta-se adaptada ao ambiente estressante. As plantas tolerantes são endêmicas de solos poluídos, o que sugere significativa adaptação ecofisiológica, manifestando resistência à contaminação do solo com metais pesados (RASKIN et al., 1994).

A *Pfaffia glomerata* é a espécie de Ginseng Brasileiro de maior importância medicinal e comercial (VIGO et al., 2003; FIGUEIREDO et al., 2004; ZIMMER et al., 2006). Ocorre na América do Sul desde a Guiana até a Bolívia e Argentina. No Brasil, ocorre em todas as regiões, é típica de vegetação ciliar e de campos de inundação de rios, com ocorrência em todo o Brasil e países limítrofes; é freqüente no cerrado e matas do Estado de Mato Grosso do Sul (POTT & POTT, 1994). Caracteriza-se por apresentar plantas perenes, que ocorrem em orlas de matas, beiras de rios, capoeiras úmidas e campos rupestres. São subarbustivas ou arbustivas, com caules eretos ou semieretos, geralmente ocós, glabros ou levemente pilosos,

com 0,5 a 2,5 m de altura. Possui raiz tuberosa e geralmente bifurcada, como do ginseng do Oriente, daí o nome Ginseng Brasileiro. É uma espécie perene que floresce de novembro a junho, suas inflorescência são do tipo espiga subglobosa. As flores são hermafroditas ou polígamo-monóicas, bracteadas, com 5 sépalas livres iguais, 5 estames, anteras monotecas e ovário com apenas um óvulo; estilete muito curto ou ausente; estigma capitado ou levemente bilobado. Apresenta folhas de pecíolo curto, ovado-lanceoladas, com 5-12 cm de comprimento e 1-2cm de largura (SMITH & DOWNS, 1972).

Taschetto & Pagliarini (2001) verificaram uma variação entre $2n=32$ e $2n=36$ para o número cromossômico do pólen de populações naturais e cultivadas de *P. glomerata* (10 populações coletadas em diferentes regiões da Argentina e do Brasil). Os mesmos autores relataram algumas anormalidades, em baixa frequência, no comportamento meiótico de todas as populações, tais como ascensões precoces de cromossomos para os pólos e cromossomos retardatários em ambas as divisões; aderências cromossômicas; fusos tripolares e fusos paralelos.

Pfaffia tuberosa (Amaranthaceae) é uma espécie medicinal conhecida popularmente como corango-de-batata, com distribuição relativamente uniforme desde Goiás até o Rio Grande do Sul (SMITH & DOWNS, 1972). Tem porte herbáceo, com um sistema radicular que alterna regiões tuberosas e não-tuberosas. A *P. tuberosa*, semelhantemente a *P. glomerata*, é conhecida como Ginseng Brasileiro sendo usada na medicina popular no tratamento de sintomas de reumatismo, doenças vasculares e como tônico afrodisíaco (SIQUEIRA et al., 1988; TANIGUCHI et al., 1998). Arenas & Azorero (1977) reportaram o uso desta espécie no tratamento da esterilidade feminina.

De acordo com Nishimoto et al. (1986), o conteúdo de ecdisterona em *P. tuberosa* é menor do que em *P. iresinoides*. Estes mesmos autores relataram a presença de compostos medicinais com efeitos no aumento da resistência frente ao estresse em raízes de *P. tuberosa*, indicando o grande potencial desta planta para a indústria farmacêutica.

P. tuberosa também vem sendo coletada por processos extrativistas, sendo o material vegetal colhido heterogêneo e de baixa qualidade. Apesar disso, atualmente, não há dados disponíveis quanto às técnicas de cultivo utilizadas para a produção de mudas nesta espécie. Em outras espécies de *Pfaffia*, a propagação através de estacas é viável (NICOLOSO et al., 1999). Contudo, a *P. tuberosa* apresenta caules frágeis com entrenós muito longos, o que

No Brasil, o uso de fitoterápicos, tem sido largamente empregado em função do seu custo compensatório em relação aos tratamentos alopáticos, além de ser favorecido e estimulado pela diversidade biológica de espécies medicinais oferecidas pelos biomas

brasileiros. Sendo assim, nas últimas décadas, espécies medicinais genuinamente brasileiras têm sido exploradas de forma exclusivamente extrativista e, portanto, irracional tanto por parte da população, como por parte do setor industrial (RAVEN, 1992).

O amplo emprego dos metabólitos secundários dessas espécies na medicina popular e como matéria prima na indústria de fitoterápicos e fitocosméticos tem afetado suas reservas naturais devido à exploração predatória, a ponto de colocar várias espécies do gênero *Pfaffia* na lista das espécies em risco de extinção. De acordo com Ferreira (2005) e Montanari Jr (2001), há uma exportação em grande escala de *Pfaffia* principalmente, para o Japão e os Estados Unidos, o que acaba pondo em risco a variabilidade genética das populações naturais, uma vez que existem poucas áreas de cultivo comercial. Conforme Figueiredo et al. (2004), as ameaças às populações de *P. glomerata* são decorrentes, principalmente, do uso das raízes da planta e do extrativismo, sendo necessário estudos urgentes visando o cultivo comercial da espécie. Neste sentido, várias pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de desenvolver protocolos eficientes de micropropagação de *P. glomerata* e *P. tuberosa* (NICOLOSO et al., 2001; RUSSOWSKI & NICOLOSO, 2003; NICOLOSO et al., 2003; SKREBSKY et al., 2004; MARTINS & NICOLOSO, 2004; FLORES et al., 2006a; FLORES et al. 2006b; SKREBSKY et al., 2006; MALDANER et al., 2006; FLORES et al, 2007; MALDANER et al, 2007).

As informações científico-agronômicas sobre plantas medicinais crescem num ritmo pouco intenso, havendo carência de resultados de pesquisa sobre os métodos de propagação e as técnicas de cultivo *in vitro* que possam resultar em maior produção de biomassa e garantir a perpetuação da espécie (PAVARINO, 1995). Apesar das espécies medicinais terem sido caracterizadas quanto aos aspectos botânicos, químicos, farmacológicos, toxicológicos e tecnológicos, sua disponibilidade como matéria-prima para fitoterapia é baixa, em razão da forma totalmente extrativista como vem sendo exploradas, contrariando as iniciativas de cultivo racional (RAVEN, 1992).

2.2. Solos ácidos e a toxicidade por alumínio

O alumínio (Al) é o metal mais abundante e o terceiro elemento em quantidade na crosta terrestre. Embora não seja considerado um elemento essencial, o Al está presente nas plantas em níveis de 0,1 a 500 ppm, e a adição de baixas concentrações deste elemento a uma solução nutritiva pode estimular o crescimento vegetal (MRSCHNER, 1995). No entanto, em solos com elevada acidez pode tornar-se tóxico e causar danos ao desenvolvimento vegetal,

sendo um fator determinante da baixa produtividade agrícola em solos ácidos, os quais correspondem a 40% das terras aráveis do mundo (FOY et al, 1978).

Em solos tropicais e subtropicais úmidos, com altas precipitações pluviométricas, nutrientes solúveis como cálcio, magnésio, potássio e outros elementos básicos são lixiviados. Quando a remoção de cátions básicos é maior que sua taxa de liberação pelas intempéries, o pH do solo diminui. Além disso, a mineralização da matéria orgânica por microorganismos do solo, que resulta na liberação de nitrato e hidrogênio, e também as práticas agrícolas (resíduos vegetais e fertilizantes) e a mineração podem intensificar a acidificação dos solos (FOY et al., 1978; RAO et al., 1993; ECHART & CAVALI-MOLINA, 2001).

O Al, no solo, pode se apresentar na forma livre, complexado com hidróxidos (AlOH^{2+} ; $\text{Al}(\text{OH})_2^+$; $\text{Al}(\text{OH})_3^0$ e $\text{Al}(\text{OH})_4^-$), com sulfato (AlSO_4^+), com fluoreto (AlF^{2+}), com fosfato ($\text{AlH}_2\text{PO}_4^{2+}$), com ligantes orgânicos (Al-orgânico) e também pode estar na forma de polímeros (polinúcleos de Al). O somatório do Al nessas formas químicas representa a concentração total do Al na solução do solo (BLOOM e ERICH, 1996).

O Al livre é coordenado por seis moléculas de água em uma configuração octaedral ($\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$), o Al^{3+} , que é a forma que predomina em pH baixo (<5.0) (WRIGHT, 1989). Com o aumento do pH as moléculas de água perdem H^+ pela hidrólise do Al (BERSCH & PARKER, 1996). Pela Figura 2, pode-se ver a distribuição das formas de Al em função do pH e a predominância da forma Al^{3+} em pH inferior a 4.7.

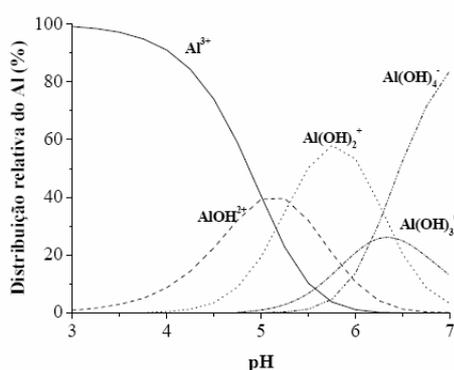


Figura 2 – Distribuição relativa das espécies de Al em solução do solo (Bertsch & Parker, 1995)

Em pH 4,1, acima de 90% do Al está na forma Al^{3+} , a forma mais tóxica ao crescimento vegetal, sendo um dos principais fatores limitantes à produção na maioria das espécies vegetais em solos ácidos. A toxidez do Al é reduzida quando o Al é complexado com sulfato (PAVAN et al., 1983) e fosfato (BLAMEY et al., 1983), em diversas espécies

testadas. Kinraide (1991) estimou que a espécie Al livre (Al^{3+}) é vinte vezes mais tóxica que $AlSO_4^+$ e trinta vezes mais que AlF^{2+} . Os complexos com ligantes orgânicos também são considerados não tóxicos ou pouco tóxicos (HUE & AMIEN, 1989; MIYASAWA, 1992; HUE & LICUDINE, 1999).

A maioria das plantas apresenta um teor de alumínio inferior a 0.2 mg Al g^{-1} massa seca, no entanto, algumas espécies, conhecidas como acumuladoras de Al, podem conter mais de 10 vezes esse valor sem apresentar sintomas de injúrias. Aproximadamente 400 espécies de plantas terrestres, de 45 famílias, são identificadas como hiperacumuladoras de vários metais tóxicos (BAKER et al., 2000).

Já é bem conhecido o fato de que o Al inibe o crescimento radicular, sendo o ápice radicular o alvo principal (KOCHIAN, 1995). Apesar dos numerosos trabalhos, os mecanismos fisiológicos dos efeitos tóxicos do Al no crescimento da raiz não estão ainda totalmente elucidados. Alguns autores apontam que a redução do alongamento do sistema radicular pode ser uma consequência da interação do Al com sítios específicos das paredes celulares (HORST, 1995) e com o DNA nuclear, inibindo a divisão celular (LIU & JIANG, 1991). Outros citam a inibição da mitose nas células do meristema apical da raiz, como causa primária da inibição do crescimento da raiz pelo Al (CLARKSON, 1966; MORIMURA & MATSUMOTO, 1978). As suposições contrárias à hipótese de a inibição da divisão mitótica ser o efeito primário da toxicidade do Al reside no fato desse íon ligar-se a muitos componentes celulares antes de entrar no núcleo, e este é, provavelmente, tóxico antes mesmo de penetrar nas células da raiz (HORST et al., 1991), especialmente no que diz respeito a interações com outros íons, tais como o Ca e o Mg, interferindo em vários processos metabólicos antes de afetar a divisão celular. Alguns sintomas apresentados pelas raízes afetadas por Al são o engrossamento e o encurtamento. Além disso, as raízes podem se tornar quebradiças e pouco ramificadas, desse modo são raízes pouco eficientes na absorção de água e de nutrientes do subsolo (FOY, 1976; KOCHIAN, 1995).

A entrada de Al no simplasto é rápida (LAZOF et al., 1994), e, uma vez dentro da célula, o Al também interfere em processos relacionados ao núcleo, já que trabalhos indicam que o Al inibe o processo de divisão celular e pode ser encontrado associado ao DNA (MORIMURA & MATSUMOTO, 1978), além de interagir com outros componentes do protoplasto, tais como enzimas, calmodulina, tubulina, ATP e GTP (MATSUMOTO et al., 1976; TAYLOR, 1989; EEMMANUEL e PETER, 1995). Além disso, o Al também diminui a taxa de respiração e interfere em reações enzimáticas que atuam na deposição de polissacarídeos nas paredes celulares (FURLANI, 1983).

Os mecanismos moleculares fundamentais da toxicidade do Al não são bem conhecidos, mas como o Al forma fortes ligações com compostos de oxigênio, este pode interagir com múltiplos sítios no apoplasto e simplasto nas raízes das células. Assim, a ligação do Al com estas substâncias são, provavelmente, um importante fator de toxicidade (MA et al., 2001). Devido à forte interação com os fosfolipídios de membrana e a peroxidação de lipídios, o Al também pode provocar alterações na permeabilidade da membrana plasmática (AHN et al., 2001; KOCHIAN, 1995; YAMAMOTO et al. 2001).

O efeito do Al no crescimento da parte aérea é apresentado como uma conseqüência dos danos causados por esse metal no sistema radicular, especialmente com relação às deficiências na absorção de água e nutrientes provocadas (MATSUMOTO et al., 1976). Alguns autores verificaram que os sintomas, especialmente foliares da toxidez do Al assemelham-se à deficiência de fósforo (folhas de crescimento anormal; coloração púrpura nos colmos, nas folhas e nas nervuras) ou à deficiência de cálcio (enrolamento das folhas jovens, colapso do ápice da planta e dos pecíolos), havendo variações dessas respostas nas diferentes espécies (FURLANI, 1989).

Problemas de acidificação do solo podem ser corrigidos por calagem, num processo que neutraliza os íons H^+ e Al^{3+} . Entretanto, a aplicação de calcário na superfície do solo não soluciona os problemas de acidez nas camadas sub-superficiais e a calagem a grandes profundidades geralmente é pouco prática e economicamente inviável. Por estas razões, a seleção de cultivares tolerantes ao Al torna-se a estratégia mais efetiva para a produção de culturas economicamente importantes em solos ácidos (FOY, 1984).

Os efeitos fitotóxicos causados pelo Al são altamente dependentes de pH, de concentrações de sais, de compostos orgânicos, de temperatura e da espécie vegetal, fatores que podem ser alterados de acordo com a natureza da composição química do substrato ou da espécie estudada. Algumas espécies de plantas são mais sensíveis ao Al^{3+} e variações podem ocorrer entre os genótipos da mesma espécie. A tolerância ao Al^{3+} , como conseqüência da variabilidade genética, consiste no principal fator individual que confere adaptação das espécies cultivadas em solos ácidos.

Por outro lado, em baixas concentrações o Al pode estimular o crescimento de algumas plantas. Salvador et al. (2000), por exemplo, relataram que, em solução nutritiva, o Al em pequenas concentrações aumentou o crescimento da goiabeira. Foy (1974) também menciona que em solução nutritiva baixa concentração de Al ($0,25$ a $0,30$ $mg\ L^{-1}$) estimulou o crescimento de milho. Os mecanismos pelos quais pequenas quantidades de alumínio beneficiam o crescimento das plantas ainda não são bem claros, e podem ser diferentes para

cada cultivar e para cada meio de crescimento. Foy (1974) e Marschner (1995) lançaram algumas possibilidades para justificar o fato, por exemplo, pelo aumento na disponibilidade do ferro em solos calcáreos (através da hidrólise do Al e da diminuição do pH); ou prevenção de deficiência de ferro, pela liberação do ferro adsorvido em sítios metabolicamente inativos dentro da planta (GRIME & HODGSON, 1969); o Al também pode bloquear sítios na parede celular carregados negativamente, promovendo a absorção de fósforo (MULLETE, 1975); ou pode agir no retardamento da deterioração das raízes em baixas concentrações de cálcio pelo crescimento mais lento; ainda, sugerem sua ação na correção ou prevenção do efeito de concentrações excessivas de fósforo, de cobre e manganês. A possibilidade de proporcionar maior equilíbrio de nutrientes no meio de crescimento é uma hipótese defendida por Fageria & Zimmermann (1979).

Uma ampla variação genética é reconhecida, tanto dentro como entre genótipos da mesma espécie, na tolerância ao Al (MA e FURUKAWA, 2003). Algumas plantas são capazes de tolerar até mesmo concentrações fitotóxicas deste elemento (POLAK et al., 2001), sugerindo que espécies ou cultivares tolerantes ao Al possuem vários mecanismos de detoxificação, incluindo mecanismos de tolerância internos e externos (TAYLOR, 1989).

A seleção de plantas tolerantes ao Al tem sido considerada a alternativa mais adequada para aumentar a produção em solos ácidos com altas concentrações de Al. Diferentes métodos de seleção têm sido empregados: cultivo a campo ou em solo sob condições controladas, bem como o cultivo em soluções nutritivas. Técnicas de seleção a campo selecionam germoplasmas sob condições climáticas e de solo naturais, e os dados finais refletem uma integração dos efeitos do estresse na toxicidade do Al e todas as condições do solo com o ciclo de crescimento completo. As desvantagens dos testes a campo são o tempo requerido (usualmente um período de crescimento completo), os problemas da variabilidade das características do solo, os efeitos de resistência diferencial à doenças e pestes, a vulnerabilidade do material às intempéries ambientais como seca ou inundação, e à inabilidade em interpretar o desempenho apresentado pelas plantas em função da complexidade das interações do meio ambiente. A seleção de solos que sejam adequados para uso em seleção de plantas tolerantes ao Al é dificultada pelo fato de que, em solos, a toxicidade ao Al não é o único fator limitante. Além disso, o efeito primário do Al nas plantas é a inibição do crescimento da raiz, e as raízes não são facilmente observáveis usando cultura em solo (ECHART e CAVALI-MOLINA, 2001).

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 conduzida usando

metodologias que utilizam sistemas hidropônicos. 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 do peso das raízes de plantas crescidas em solução nutritiva com pH ácido associado a uma concentração adequada de Al com plantas controles crescidas na ausência de Al. Eventualmente, outras características como número de raízes, coloração e ramificação das mesmas também têm sido utilizadas (PRIOLI et al., 1985; CAMBRAIA & CAMBRAIA, 1995).

2.4. Estresse oxidativo - Espécies Reativas de Oxigênio

No metabolismo celular aeróbico a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) é inevitável, pois são produzidas no processo de respiração celular que ocorre nas mitocôndrias das células, bem como nas vias relacionadas à fotossíntese. Nestes eventos celulares, as EROs são subprodutos inevitáveis do metabolismo aeróbico (MITTLER, 2002).

Situações de estresse podem intensificar a produção de EROs, aumentando a oxidação dos componentes celulares, o que pode causar danos ao organismo (SCANDALIOS, 2002). Nesses casos as EROs são citadas como sinalizadores de uma resposta a agentes estressores (MITTLER 2002; MITTLER et al. 2004).

As EROs, formadas por elétrons livres ou não pareados, têm uma instabilidade elétrica muito grande, e por esta razão, mesmo tendo meia vida muito curta, apresentam grande capacidade reativa, podendo afetar qualquer composto que esteja próximo, a fim de captar um elétron desse composto na intenção de obter sua estabilização. Desse modo, as EROs podem iniciar reações em cadeia com várias moléculas orgânicas, que nesse caso funcionam como substâncias oxidantes, levando à peroxidação lipídica, à inativação de enzimas e à degradação de ácidos nucleicos, dentre outras conseqüências (LAMB & DIXON, 1997).

A formação das EROs se dá primeiramente pelo o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que pode ser dismutado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou mesmo através de ação catalítica, pela atuação da enzima superóxido dismutase (SOD) (HALLIWELL & GUTTERIDE, 1989).

As EROs podem ser geradas pela desestabilização das camadas de elétrons do O_2 , formando 1O_2 (oxigênio singlete) ou de uma adição sequencial de elétrons ao O_2 , formando os radicais: $O_2^{\cdot-}$; H_2O_2 ; HO_2^{\cdot} e OH^{\cdot} (DAVIES, 1982).

As EROs possuem potencial para interagir de forma não específica com muitos componentes celulares, desencadeando reações peroxidativas e causando um dano

significante às membranas e a outras macromoléculas essenciais, tais como os pigmentos fotossintéticos, as proteínas, os ácidos nucleicos e os lipídios (SHALATA & TAL, 1998; Olmos et al., 1994; FOYER et al., 1994). A peroxidação lipídica é uma das principais conseqüências da cadeia de reação dos radicais livres. Os radicais mais reativos, como os superóxidos, atacam as moléculas biológicas pela abstração do hidrogênio e este mecanismo desencadeia a peroxidação lipídica (HALLIWELL & CHIRICO, 1993). A peroxidação lipídica em biomembranas causa danos na estrutura e funcionamento da mesma, alterando sua fluidez, inativando os receptores e as enzimas da membrana e aumentando a permeabilidade a íons como o Ca^{2+} (HALLIWELL & CHIRICO, 1993). A iniciação da peroxidação ocorre pelo ataque aos ácidos graxos, ou a um lado específico da cadeia de qualquer substância química que tenha reatividade suficiente para separar um H^+ da cadeia do ácido graxo. Os ácidos graxos poliinsaturados são particularmente sensíveis à peroxidação (HALLIWELL & CHIRICO, 1993).

Muitos estudos têm relacionado o Al ao estresse oxidativo, principalmente à peroxidação de lipídios e proteínas da membrana plasmática (CAKMAK & HORST, 1991; YAMAMOTO et al, 2001). A peroxidação dos lipídios seria resultado dos efeitos do Al na membrana (alteração de sua fluidez, permeabilidade, etc.), aumentando sua susceptibilidade à peroxidação (CAKMAK & HORST, 1991). No entanto, também há a hipótese de a geração da peroxidação lipídica, mediada por Al, ocorrer devido ao aumento na produção de ERO induzido por esse metal, aliada à redução na capacidade de destoxificação destas espécies (RYYPPO et al., 1998).

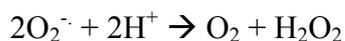
Para manter sob controle a produção de EROs, as plantas e todos os organismos possuem um sistema antioxidante representado por componentes enzimáticos e não enzimáticos. A toxicidade por Al e a ocorrência de estresse oxidativo afetam a atividade de enzimas do sistema antioxidante da célula e de compostos antioxidantes não enzimáticos, como uma resposta na intenção de manter a homeostase celular, evitando os efeitos tóxicos do Al.

2.5. Sistema Antioxidante

Todas as células possuem um sistema defensivo que as protege dos danos causados pelo excesso de EROs. Dentre os componentes enzimáticos desse sistema pode-se citar a superóxido dismutase (SOD, E.C. 1.15.1.1), a catalase (CAT, E.C. 1.11.1.6) e a ascorbato peroxidase (APX, E.C. 1.11.1.11). Aliados a essas enzimas as células também possuem

antioxidantes de baixo peso molecular, não enzimáticos, como o ácido ascórbico, a glutathiona reduzida (GSH) e outros grupos tiólicos não protéicos que removem tipos diferentes de EROs (FOYER et al., 1994) e protegem a célula contra a injúria e a disfunção dos tecidos (MIQUEL, 1989). Além disso, em plantas, os carotenóides também possuem efeito antioxidante importante no sistema fotossintético (HALLIWELL, 1987).

A superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) é a primeira linha de defesa celular contra danos causados pelas EROs e consiste num grupo de metaloenzimas que catalisam a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e O_2 a partir de radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Portanto, a SOD consome $O_2^{\cdot-}$, porém gera H_2O_2 (ALSCHER et al., 2002). Assim, a atividade das SODs determina as concentrações de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , os dois substratos da reação de Haber-Weiss, que origina os radicais OH^{\cdot} , e talvez por isso as SODs representem o mecanismo central de defesa celular (BOWLER et al., 1994; ALSCHER et al., 2002). Existem diferentes isoformas para diferentes compartimentos celulares, Mn-SOD (normalmente em mitocôndrias), Fe-SOD e Cu/Zn-SOD (nos cloroplastos). A reação geral da SOD pode ser descrita:



O H_2O_2 gerado na conversão de superóxidos pela SOD também é tóxico e deve ser detoxificado pela catalase e/ou peroxidases. As catalases, presentes nos peroxissomos, removem o H_2O_2 gerado durante a fotorrespiração e a β -oxidação dos ácidos graxos. A CAT, é uma enzima tetramérica que contém grupo heme e é encontrada em todos os organismos vivos e pertence à família das oxirredutases. As CATs agem na decomposição do H_2O_2 em água e oxigênio molecular (MORITA et al., 1994). É a única enzima que degrada H_2O_2 sem consumir equivalentes redutores da célula. É uma das enzimas chave envolvida na remoção de peróxidos tóxicos nas células quando estes estão em altas concentrações, pois apresenta baixa afinidade pelo H_2O_2 (MITTLER, 2002). Existem três isoenzimas de CAT identificadas: CAT1, CAT2, CAT3 (Scandalios, 1993). Sua reação está representada abaixo:



A ascorbato peroxidase (APX) é outra enzima que atua na remoção de H_2O_2 . É chave no ciclo da glutathiona-ascorbato que reduz o H_2O_2 (quando em baixas concentrações na célula) até água usando ascorbato como doador de elétrons, resultando na formação de dehidroascorbato, que é reciclado a ascorbato usando a glutathiona reduzida (GSH) como doadora de elétrons, e a glutathiona oxidada (GSSG) é convertida a glutathiona redizida pela enzima glutathiona redutase, reação dependente de NADPH (ASADA & TAKAHASHI, 1987). As Figuras 3 e 4 apresentam vias de destoxificação do H_2O_2 .

Quando os níveis de H_2O_2 não são eficientemente reduzidos pela CAT ou APX, podem reagir com outros ânions superóxidos, pela reação de Haber-Weiss, resultando em O_2 , íons OH^- e radical hidroxila (OH^\cdot), que também é uma forma de ROS e pode contribuir com danos oxidativos às células (RESENDE et al., 2003).

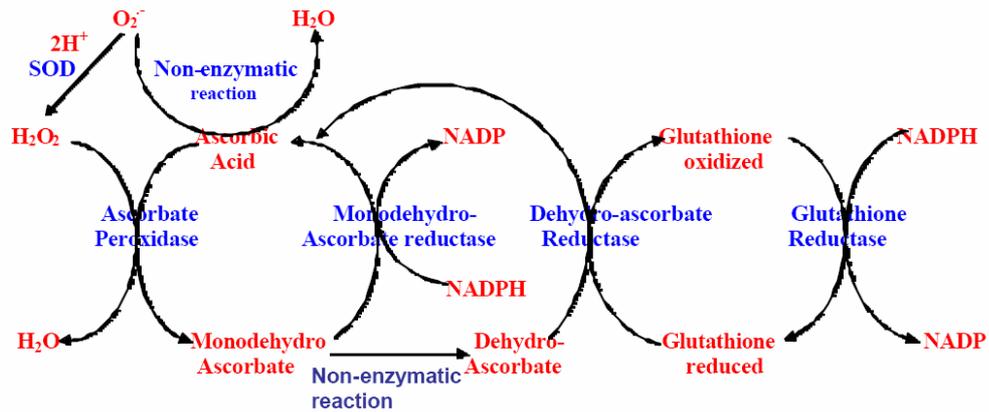


Figura 3 – Via Asada-Halliwell de detoxificação do peróxido de hidrogênio e regeneração do ácido ascórbico envolvendo várias enzimas antioxidantes. Adaptado de Arora et al.(2002).

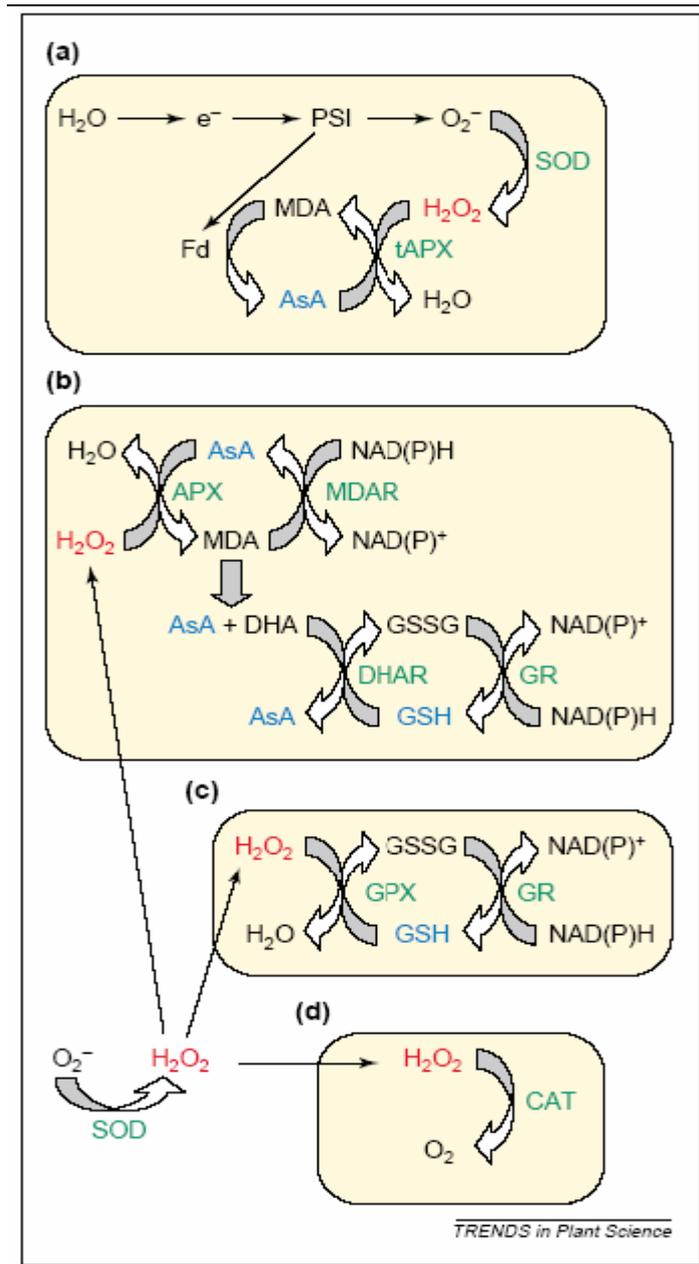


Figura 4 - Caminho das espécies reativas de oxigênio e sua remoção nas plantas (a) Ciclo água-água. (b) Ciclo ascorbato glutaciona (c). Ciclo glutaciona peroxidase (d). ROS estão indicadas em vermelho, antioxidantes em azul e enzimas removedoras de ROS em verde (Adaptado de Mittler, 2002).

Aliado ao sistema de defesa antioxidante enzimático, os organismos também dispõem das defesas antioxidantes não-enzimáticas que são de fundamental importância para as células. Compõem esse sistema não-enzimático, o ácido L-ascórbico (estrutura na figura 5), os grupos tióis não protéicos, entre estes a glutaciona, juntamente com os carotenóides.

Embora encontrado em baixas concentrações, o ácido L-ascórbico desempenha um importante papel na tolerância das plantas ao estresse como um componente do sistema antioxidante (NOCTOR & FOYER, 1998). Além de estar envolvido na regulação da fotossíntese, na expansão celular, na alongação das raízes e no transporte dos elétrons

transmembrana (NOCTOR & FOYER, 1998; SMIRNOFF, 2000), também é importante na remoção dos radicais livres de oxigênio (SINHA et al., 2005). Os radicais livres de oxigênio estão envolvidos na oxidação do ácido ascórbico para formar ácido dehidroascórbico, o qual é regenerado posteriormente até ácido ascórbico (Figura 5) (FRIDOVICH & HANDLER, 1961).

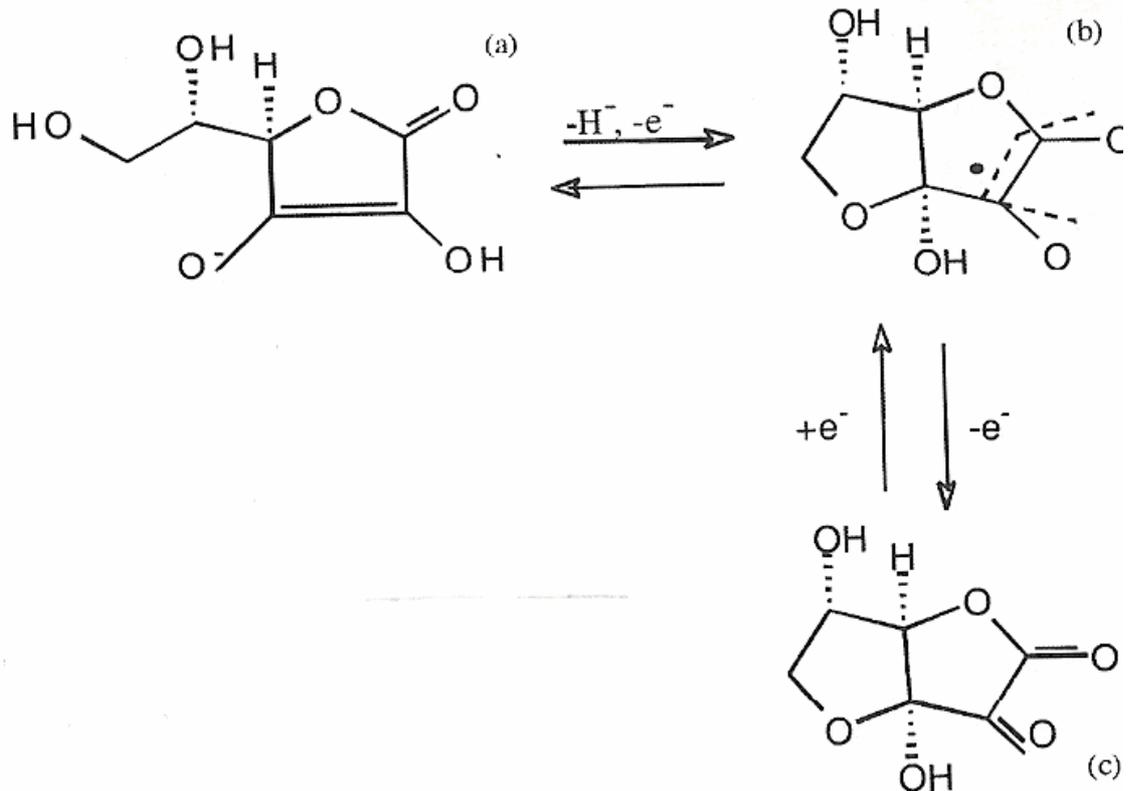


Figura 5 - Estrutura do ácido ascórbico atuando na estabilização dos radicais livres. a) ascorbato, b) radical ascorbil, c) ácido ascórbico. Adaptado de Machlin (1991).

Os grupos tióis não protéicos, entre estes a glutathiona, aparecem em uma proporção bem maior que a do ácido ascórbico (5 – 20 mM ácido ascórbico e 1–5 mM glutathiona) nos cloroplastos e outros compartimentos celulares. Essa maior proporção também pode ser relacionada com uma ação antioxidante mais importante (SCOTT et al., 1993). A GSH reduz diretamente a maioria das espécies reativas de oxigênio, enquanto que a enzima glutathiona redutase usa NADPH para reduzir GSSG a GSH (GRANT et al., 1997). Vários radicais livres e oxidantes são capazes de oxidar GSH a GSSG (NOCTOR & FOYER, 1998). Estudos mostram que níveis elevados de GSH celular estão associados à tolerância à metais pesados em plantas (CHEN & GOLDSBROUGH, 1994) e a exposição aos metais pesados leva a uma síntese acelerada de GSH em raízes e em culturas de células (SCHNEIDER & BERMAN, 1991).

1995). Além disso, a GSH pode reagir quimicamente com o oxigênio singlete, com o radical superóxido e hidroxila, funcionando como removedor de radicais livres. É também o precursor das fitoquelatinas que agem como peptídeos que complexam metais pesados em plantas (ROSEN, 2002). Embora seja conhecido o papel da GSH como um importante antioxidante celular, vários aspectos sobre a função de seus componentes precisam ser detalhados (BARTOSZ, 1996).

Os carotenóides também agem na proteção celular. Atuam na manutenção das reações fotodinâmicas, protegendo a clorofila da peroxidação lipídica e impedindo o colapso da membrana dos cloroplastos (KNOX & DODGE, 1985).

O fator que determina o estresse oxidativo é a velocidade com que as plantas ativam suas reservas antioxidantes (RANIERI et al., 1993), o que também vai determinar a tolerância ao estresse (SINHA et al., 1996), assim, o Al pode induzir estresse oxidativo às plantas quando seus níveis de acumulação e indução da produção de EROs excederem a capacidade de destoxificação pelo sistema antioxidante.

3. RESULTADOS:

3.1. ARTIGO 1:

**Toxidez de alumínio em plântulas de *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia tuberosa*
cultivadas *in vitro***

Aluminium toxicity in *Pfaffia glomerata* and *Pfaffia tuberosa* *in vitro* cultured plantlets

Joseila Maldaner, Fernando Teixeira Nicoloso, Renata Rauber, Jamile Fabbrin Gonçalves,
Liana Verônica Rossato, Etiane Caldeira Skrebsky, Rejane Flores, Danton Camacho Garcia

(Enviado para publicação na Revista Ciência Rural)

**Toxidez de alumínio em plântulas de *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia tuberosa*
cultivadas *in vitro***

Aluminium toxicity in *Pfaffia glomerata* and *Pfaffia tuberosa* *in vitro* cultured plantlets

Joseila Maldaner^I Fernando Teixeira Nicoloso^{II*} Renata Rauber^{III} Jamile Fabbrin
Gonçalves^I Liana Verônica Rossato^{IV} Etiane Caldeira Skrebsky^I Rejane Flores^I Danton
Camacho Garcia^V

RESUMO

Pfaffia é um gênero da família Amaranthaceae e possui várias espécies com amplo emprego na medicina popular. O presente trabalho objetivou caracterizar o efeito do alumínio (Al) no crescimento de plântulas de *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia tuberosa* cultivadas *in vitro*. Foram utilizados dois acessos de *P. glomerata* (JB e BRA) e um de *P. tuberosa* (JB/UFSM), os quais foram submetidos a cinco concentrações de Al (0, 50, 100, 150 e 200mg L⁻¹) adicionadas ao meio de cultura MS. Ao final do experimento (24 dias após inoculação dos explantes), observou-se que a menor concentração de Al (50mg L⁻¹) aumentou o crescimento das plântulas de *P. glomerata* do acesso BRA; esse efeito foi menos pronunciado no acesso JB. Por outro lado, concentrações maiores (acima de 50 e 100mg L⁻¹ de Al, respectivamente,

^I Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

^{II} Departamento de Biologia, UFSM, Campus Universitário, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: ftnicoloso@yahoo.com. *Autor para correspondência.

^{III} Curso de Engenharia Florestal, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

^{IV} Curso de Ciências Biológicas, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

^V Departamento de Fitotecnia, UFSM, NUPECH, Santa Maria, RS, Brasil.

para os acessos BRA e JB) provocaram decréscimo significativo na maioria dos parâmetros de crescimento avaliados. Portanto, em *P. glomerata*, o acesso JB é mais tolerante ao Al do que o BRA. As plântulas de *P. tuberosa* não apresentaram nenhuma alteração no crescimento pelos tratamentos de Al, fato que sugere a resistência dessa espécie ao Al. Os dados do presente trabalho sugerem que existe uma expressiva variabilidade genética em *Pfaffia* para a resistência ao Al, bem como o cultivo *in vitro* é um método adequado para checar as respostas das plantas à toxicidade do Al.

Palavras-chave: Ginseng Brasileiro, Amaranthaceae, genótipos, crescimento.

ABSTRACT

The genus *Pfaffia* belongs to the family Amaranthaceae and included several species with wide use in folk medicine. The present work aimed to characterize the effect of aluminum (Al) on the growth of *Pfaffia glomerata* and *Pfaffia tuberosa* *in vitro* cultured plantlets. Two accessions of *P. glomerata* (JB and BRA) and one of *P. tuberosa* (JB/UFSM) were submitted to five concentrations of Al (0, 50, 100, 150 and 200mg L⁻¹) added to MS medium. At the end of the assay (24 days after explant inoculation), plantlet growth in BRA increased at 50mg L⁻¹, and this effect was less pronounced in JB accession. On the other hand, higher concentrations of Al (above 50 and 100mg L⁻¹, respectively for BRA and JB accessions) induced significant reduction on most growth parameters evaluated. Therefore, compared with BRA accession, JB is more resistant to Al. *P. tuberosa* plantlets did not show any alteration in growth at all Al treatment, which suggests that this species is Al tolerant. The data in the present study suggest that there is a significant genetic variability to Al resistance in *Pfaffia*, and that *in vitro* assay is a suitable method to check plant responses to Al toxicity.

Key words: Brazilian Ginseng, Amaranthaceae, genotypes, growth.

INTRODUÇÃO

O gênero *Pfaffia* (Amaranthaceae) possui várias espécies amplamente empregadas na medicina popular por suas propriedades antitumorais, tônico estimulante, revitalizantes, antidiabéticas, as quais são atribuídas a compostos já identificados (ecdisteróides, saponinas, ácido glomérico, ácido famérico) em extratos de suas raízes (NAKAI et al., 1984; NISHIMOTO et al., 1987; SHIOBARA et al., 1993). A ecdisona (20-hidroxiecdisterona) é também arrogado um efeito antioxidante, o qual confere mais este uso medicinal para *Pfaffia* sp. (DANIEL et al., 2005). A exploração predatória das populações naturais de *Pfaffia*, para o emprego na medicina popular e como matéria prima na indústria de fitoterápicos e fitocosméticos, justifica o desenvolvimento de projetos e planos de cultivo para *Pfaffia* (MONTANARI Jr., 1999).

O alumínio (Al) é o terceiro metal mais abundante na crosta terrestre, após o oxigênio e o silício (MA et al., 2001), podendo tornar-se tóxico ao crescimento vegetal em função da sua alta concentração em solos ácidos. Em condições de solo ácido (pH<5,5), o alumínio apresenta-se na forma octaedral hexahidratado ($\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$), a mais tóxica ao crescimento vegetal, sendo um dos principais fatores limitantes à produção na maioria das espécies vegetais (ECHART & CAVALLI-MOLINA, 2001).

O primeiro e mais evidente sintoma da toxidez do alumínio é a inibição do crescimento da raiz, sendo que a parte compreendida entre a região meristemática e de alongação é que parece ser a mais sensível a ação desse íon (SIVAGURU & HORST, 1998). Na célula, o Al^{3+} altera as propriedades da parede e da plasmalema, pois afeta o sistema de carregadores de nutrientes, problemas que resultam na inibição da alongação celular do eixo principal, tornando as raízes mais grossas e pouco funcionais (RYAN et al., 2001). De modo interessante, concentrações baixas de Al no substrato podem apresentar efeitos estimulantes para o crescimento vegetal, o que foi observado em *Eucalyptus* (MULLETTE, 1975), em

arroz (FAGERIA & ZIMMERMANN, 1979), em feijão (OLIVEIRA & MALAVOLTA, 1982) e em macieira (PEREIRA et al., 1998). Esse fenômeno é conhecido como hormese, sendo considerado como uma supercompensação do crescimento em resposta ao estresse (CALABRESE & BLAIN, 2005).

Uma ampla variabilidade genética na tolerância ao Al é reconhecida, tanto dentro como entre genótipos de uma mesma espécie (MA e FURUKAWA, 2003). Algumas plantas são capazes de tolerar até mesmo concentrações fitotóxicas do elemento (POLAK et al., 2001), sugerindo que essas espécies ou cultivares tolerantes ao Al possuem vários mecanismos (internos e externos) de destoxificação (TAYLOR, 1988).

Poucos trabalhos relatam o efeito do Al em plantas cultivadas *in vitro*, embora essa técnica seja uma ferramenta eficaz em estudos que objetivam avaliar a influência de fatores bióticos e abióticos nos aspectos fisiológicos, morfológicos, bioquímicos e anatômicos das espécies vegetais. Ainda menor é número dos trabalhos que tratam do efeito do Al nas espécies medicinais. O objetivo deste trabalho foi caracterizar o efeito do Al no crescimento de plântulas de *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia tuberosa* cultivadas *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Como material vegetal, foram utilizados dois acessos de *Pfaffia glomerata*, identificados como BRA e JB e um de *Pfaffia tuberosa* (JB/UFSM). O acesso BRA foi coletado no município de Querência do Norte (PR) e faz parte do Banco de Germoplasma da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília, DF. O acesso JB faz parte do acervo do Jardim Botânico da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS. Uma exsicata desta espécie encontra-se depositada no Herbário do Departamento de Biologia da UFSM (SMDB 7606). As plantas de *P. tuberosa* utilizadas neste estudo, identificadas como acesso JB/UFSM, são oriundas de populações naturais existentes no

Jardim Botânico da UFSM, Santa Maria, RS. Uma exsicata da planta foi depositada no Herbário do Departamento de Biologia da UFSM (SMDB 9840).

Explantos caulinares de ambas as espécies foram cultivados previamente em meio de cultivo MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), suplementado com 30g L⁻¹ de sacarose, 0,1g L⁻¹ de mio inositol e 6g L⁻¹ de agar, segundo metodologia de micropropagação descrita por NICOLOSO et al. (2001) para *Pfaffia glomerata* e por FLORES et al. (2006) para *Pfaffia tuberosa*. Segmentos nodais (1 cm) sem folhas foram inoculados em meio de cultura contendo cinco concentrações de alumínio (0; 50; 100; 150 e 200mg L⁻¹) na forma de cloreto (AlCl₃). Em cada frasco de cultivo foi adicionado 50mL de meio MS e 10mL de solução de alumínio (ambos autoclavados separadamente). O pH, tanto da solução de Al quanto do meio MS, foi ajustado para 4,5±0,1 (esse procedimento foi estabelecido em ensaios preliminares que indicaram a necessidade da elevação do pH em 0,5 unidades antes da autoclavagem para se atingir o valor de pH 4,0 após a esterilização do meio de cultura). Os tratamentos consistiram de uma combinação fatorial entre os três acessos de *Pfaffia* e as cinco concentrações de Al adicionadas ao meio de cultura. A unidade experimental foi constituída de um frasco de cultivo (8,0 cm de diâmetro, 13,0 cm de altura e um volume de 653,12 cm³) contendo cinco explantes.

Os frascos de cultivo, contendo os explantes, foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25°C ± 1, fotoperíodo artificial (16 horas de luz) e intensidade luminosa de 35µmol m⁻² s⁻¹ obtido por lâmpadas brancas frias.

As plântulas foram avaliadas quanto ao número de raízes aos 15 dias após inoculação (DAI) e, ao final do experimento (24 DAI), o comprimento das raízes (TENNANT, 1975), a altura de brotações, o número de segmentos nodais, o número de brotações, a matéria seca e fresca das raízes e da parte aérea. Para a análise dos dados utilizou-se o software científico –

NTIA, desenvolvido pelo Centro Nacional de Pesquisa Tecnológica em Informática para Agricultura (EMBRAPA, 1997).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve interação significativa entre os três genótipos de *Pfaffia* e as concentrações de alumínio (Al) sobre o enraizamento dos explantes. No 15º dia após a inoculação (DAI), o número de raízes por plântula de *P. glomerata* no acesso JB sofreu redução em concentrações superiores a 100mg L⁻¹ de Al, enquanto para o acesso BRA, teores moderados de Al (50mg L⁻¹) estimularam o enraizamento (Tabela 1). Por outro lado, a *P. tuberosa* não apresentou variação significativa no enraizamento quando submetida a diferentes concentrações de Al (Tabela 1). O acesso JB apresentou maior número de raízes do que os demais acessos (Tabela 1).

Ao final do experimento (24 DAI) não se verificou efeito das concentrações de Al sobre o comprimento do sistema radicular. Contudo, constatou-se diferença entre as espécies de *Pfaffia* estudadas, sendo que ambos os acessos de *P. glomerata* apresentaram raízes mais alongadas ($\bar{X}=21,7$ cm plântula⁻¹) em relação à *P. tuberosa* ($\bar{X}=1,96$ cm plântula⁻¹).

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 & HIJII, 1998). Esse sintoma não foi observado nos três acessos de *Pfaffia* estudados.

Os efeitos do Al no crescimento do sistema radicular das plantas vêm sendo estudados em várias espécies, constituindo uma das principais características na classificação de genótipos quanto à tolerância a esse metal. Em milho, BLANCAFLOR et al. (1998) observaram uma significativa redução no alongamento de raízes, a qual atribuíram à interferência do Al na função dos microtúbulos e microfilamentos de actina. Semelhante

efeito foi observado em cultivares de soja exposta ao Al, embora, em alguns cultivares do grupo tolerante, essa redução no crescimento radicular não chegou a ser significativa (MENOSSO et al., 2001). Por outro lado, CUSTÓDIO et al. (2002) verificaram um aumento no comprimento de raiz em vários cultivares de soja quando submetidos a 27mg L^{-1} de Al. Um significativo acréscimo no número de raízes bem como na alongação radicular também foi registrado para *Betula pendula* quando submetidas a concentração de 35mg L^{-1} de Al (KIDD & PROCTOR, 2000). O aumento no enraizamento da *P. glomerata* acesso BRA pode ser devido ao efeito hormético. A hormese representa uma supercompensação do crescimento em resposta a um desequilíbrio na homeostase dos tecidos. Esse fenômeno tem sido descrito em relação a diferentes fatores, tais como substâncias orgânicas e inorgânicas, Al e deficiência nutricional (CALABRESE & BLAIN, 2005).

Os dois acessos de *P. glomerata* não diferiram significativamente quanto à altura da maior brotação, a qual foi estimulada pela menor concentração de Al testada (50mg L^{-1}), porém, em concentrações superiores a 100 e 50mg L^{-1} , respectivamente para os acessos JB e BRA, houve inibição (Tabela 1). A resposta da média de altura das brotações às concentrações de Al foi semelhante àquela verificada para a altura da maior brotação, a não ser pelo fato de o acesso BRA ter sido superior ao JB (Tabela 1). Resultados semelhantes aqueles do presente trabalho, foram observados no comprimento da parte aérea em cultivares de *Betula pendula* expostos a 2mg L^{-1} de Al; no entanto, concentrações mais elevadas (35mg L^{-1}) reduziram o crescimento (KIDD & PROCTOR, 2000). Alguns soma clones de macieira também apresentaram um aumento significativo na altura da parte aérea em baixas concentrações de Al (DANTAS et al., 2001). PASSO & RUIZ (1995) apresentaram resultados semelhantes para o crescimento da parte aérea do cafeeiro.

Para as variáveis número de segmentos nodais da maior brotação, número total de segmentos nodais e número de folhas por plântula, o acesso BRA de *P. glomerata* superou o

acesso JB e ambos foram superiores ao acesso JB/UFSM de *P. tuberosa* (Tabela 1). Semelhante ao observado para a altura das brotações, verificou-se interação significativa entre os três acessos de *Pfaffia* e as concentrações de Al sobre o número de segmentos nodais. No acesso JB de *P. glomerata*, verificou-se diminuição no número de segmentos nodais na presença de Al a partir da concentração de 150mg L⁻¹. Já o acesso BRA apresentou maior número de segmentos nodais por plântula na dose de 50mg L⁻¹ de Al, enquanto nas concentrações de 150 e 200mg L⁻¹ de Al houve redução nesse parâmetro (Tabela 1). O número de folhas em *P. glomerata* também foi inicialmente estimulado pelas menores concentrações de Al, sendo maior em 50mg L⁻¹ para o acesso BRA, enquanto o acesso JB apresentou uma tendência de aumento nesta variável até a concentração de 100mg L⁻¹. Já nas concentrações superiores (150 e 200mg L⁻¹) uma sensível redução no número de folhas foi observada para esses dois acessos (Tabela 1). KIDD & PROCTOR (2000) também relataram que a área foliar e o número de folhas em alguns cultivares de *Betula pendula* foram significativamente estimulados por algumas concentrações de Al.

Diferentemente do observado para os dois acessos de *P. glomerata*, não foram verificadas alterações significativas nos parâmetros de crescimento de *P. tuberosa* submetidas à variação na concentração de Al (Tabela 1).

Houve interação significativa entre os fatores acessos de *Pfaffia* e concentrações de Al para a matéria fresca da parte aérea, das raízes e do total da plântula, para a matéria seca de raízes e do total da plântula, bem como para a relação entre matéria seca de raízes e da parte aérea. O acesso JB de *P. glomerata* apresentou maior biomassa do que o acesso BRA (Tabela 2). Além disso, ambos os acessos de *P. glomerata* destacaram-se pela produtividade em biomassa com relação a *P. tuberosa* (Tabela 2).

Tabela 1- Número de raízes por plântula (nr) aos 15 dias após a inoculação (DAI), altura da maior brotação (altma), média das alturas (Xalt); número de segmentos nodais da maior brotação (N° segma), número total de segmentos nodais por plântula (N°tseg) e número de folhas por plântula (N° folhas) de três genótipos de *Pfaffia* submetidos a cinco concentrações de Al no meio de cultura, aos 24 DAI.

| Concentrações de Al (mg L ⁻¹) | nr | Altma (cm) | Xalt (cm) | N° segma | N° tseg | N°folhas |
|--|----------|---------------|--------------|----------|---------|----------|
| <i>Pfaffia glomerata</i>-JB | | | | | | |
| 0 | 8,20 a* | 3,25 a b | 1,86 a b c | 2,92 a | 3,80 a | 7,52 a b |
| 50 | 6,08 a b | 3,42 a | 2,23 a | 2,68 a b | 3,80 a | 7,52 a b |
| 100 | 6,92 a b | 2,88 a b | 1,95 a b | 2,84 a | 4,24 a | 8,48 a |
| 150 | 3,80 b c | 2,33 b c | 1,39 b c | 2,16 b | 2,76 b | 5,48 b c |
| 200 | 2,80 c | 1,64 c | 1,05 c | 1,60 c | 2,32 b | 4,64 c |
| <i>Pfaffia glomerata</i>-BRA | | | | | | |
| 0 | 3,92 b | 3,32 b | 2,55 b | 2,96 a | 4,92 b | 9,84 b |
| 50 | 7,36 a | 4,80 a | 3,80 a | 3,20 a | 5,68 a | 11,12 a |
| 100 | 2,75 b c | 2,96 b | 2,14 b | 2,55 b | 4,45 b | 8,90 b |
| 150 | 1,88 c | 2,09 c | 1,48 c | 2,21 c | 3,58 c | 7,17 c |
| 200 | 2,28 b c | 1,92 c | 1,40 c | 2,16 c | 3,52 c | 7,04 c |
| <i>Pfaffia tuberosa</i>-JB/UFSM | | | | | | |
| 0 | 1,21 a | 0,80 a | 0,52 a | 1,58 a | 2,21 a | 4,38 a |
| 50 | 0,72 a | 0,79 a | 0,50 a | 1,54 a | 2,21 a | 4,42 a |
| 100 | 0,80 a | 0,59 a | 0,42 a | 1,28 a | 2,00 a | 4,00 a |
| 150 | 0,00 a | 0,61 a | 0,44 a | 1,28 a | 1,96 a | 4,00 a |
| 200 | 0,60 a | 0,62 a | 0,42 a | 1,36 a | 1,96 a | 3,92 a |
| Acessos de <i>Pfaffia</i> | | | | | | |
| | nr | Altma (cm) | Xalt (cm) | N° segma | N°tseg | N°folhas |
| <i>P. glomerata</i>-JB | 5,56 a | 2,70 a | 1,70 b | 2,44 b | 3,38 b | 6,73 b |
| <i>P. glomerata</i>-BRA | 3,675 b | 3,029 a | 2,29 a | 2,62 a | 4,44 a | 8,82 a |
| <i>P. tuberosa</i>-JB/UFSM | 0,66 c | 0,68 b | 0,46 c | 1,41 c | 2,065 c | 4,14 c |

*médias seguidas de mesma letra, na vertical, não diferem significativamente pelo teste

Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.

As biomassas fresca e seca dos órgãos e do total das plântulas do acesso BRA de *P. glomerata* foram maiores na presença de 50mg L⁻¹ de Al, enquanto as doses maiores de Al não apresentaram efeito quando comparado ao controle. Já no acesso JB de *P. glomerata*, houve apenas uma tendência de aumento na produção de biomassa pela presença de Al na concentração de 100mg L⁻¹ em relação aos tratamentos controle e 50mg L⁻¹ de Al. A *P.*

tuberosa não apresentou alteração na biomassa pela presença do Al no meio de cultura (Tabela 2).

Tabela 2 - Matéria fresca da parte aérea (mfpa), matéria fresca da raiz (mfr), matéria fresca total por plântula (mft), matéria seca da parte aérea (mspa), matéria seca da raiz (msr), matéria seca total por plântula (mst) e relação entre matéria seca de raiz e da parte aérea (msr/mspa) de três genótipos de *Pfaffia* submetidos a cinco concentrações de Al no meio de cultura, aos 24 dias após a inoculação.

| Concentrações de Al (mg L ⁻¹) | Mfpa | mfr | Mft | msr | mst | Rmsr/mspa |
|--|-----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <i>Pfaffia glomerata</i>-JB | | | | | | |
| g planta ⁻¹ | | | | | | |
| 0 | 0,96 a b* | 1,70 a b | 2,62 a b | 0,127 a b | 0,203 a b | 1,43 a |
| 50 | 1,23 a b | 1,77 a b | 3,005 a b | 0,117 b | 0,196 a b | 1,32 a |
| 100 | 1,41 a | 2,99 a | 4,39 a | 0,369 a | 0,454 a | 3,01 a |
| 150 | 0,99 a b | 4,01 b | 1,94 b | 0,038 b | 0,115 b | 0,41 a |
| 200 | 0,77 b | 0,77 b | 1,56 b | 0,073 b | 0,142 b | 0,88 a |
| <i>Pfaffia glomerata</i>-BRA | | | | | | |
| g planta ⁻¹ | | | | | | |
| 0 | 0,62 b | 0,60 b | 1,22 b | 0,01 b | 0,073 b | 0,16 b |
| 50 | 1,23 a | 2,45 a | 3,68 a | 0,222 a | 0,311 a | 2,35 a |
| 100 | 0,69 b | 0,86 b | 1,64 b | 0,014 b | 0,075 b | 0,23 b |
| 150 | 0,55 b | 0,49 b | 1,03 b | 0,01 b | 0,069 b | 0,17 b |
| 200 | 0,65 b | 0,25 b | 0,908 b | 0,006 b | 0,066 b | 0,11 b |
| <i>Pfaffia tuberosa</i>-JB/UFSM | | | | | | |
| g planta ⁻¹ | | | | | | |
| 0 | 0,22 a | 0,086 a | 0,308 a | 0,003 a | 0,026 a | 0,15 a |
| 50 | 0,29 a | 0,034 a | 0,329 a | 0,002 a | 0,033 a | 0,07 a |
| 100 | 0,26 a | 0,02 a | 0,283 a | 0,004 a | 0,033 a | 0,12 a |
| 150 | 0,34 a | 0,0051 a | 0,344 a | 0,001 a | 0,036 a | 0,02 a |
| 200 | 0,37 a | 0,021 a | 0,395 a | 0,001 a | 0,038 a | 0,03 a |
| Acessos de <i>Pfaffia</i> | Mfpa | mfr | Mft | msr | mst | Rmsr/mspa |
| g planta ⁻¹ | | | | | | |
| <i>P. glomerata</i> -JB | 1,07 a | 1,65 a | 2,70 a | 0,145 a | 0,222 a | 1,41 a |
| <i>P. glomerata</i> -BRA | 0,75 b | 0,93 b | 1,70 b | 0,054 b | 0,121 b | 0,62 b |
| <i>P. tuberosa</i> -JB/UFSM | 0,30 c | 0,033 c | 0,33 c | 0,0022 c | 0,033 c | 0,08 c |

*médias seguidas de mesma letra, na vertical, não diferem significativamente pelo teste Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.

A razão da matéria seca de raiz e da parte aérea não diferiu significativamente em relação às concentrações de Al para o acesso JB de *P. glomerata* e em *P. tuberosa*. Já no acesso BRA de *P. glomerata*, esta razão foi significativamente maior em 50mg L^{-1} (Tabela 2). Alguns somaclones de macieira apresentaram redução significativa na matéria seca devido à adição de Al, enquanto outros somaclones tiveram resposta contrária (DANTAS et al., 2001). Efeito positivo de baixas concentrações de Al no incremento da biomassa de pimenteira do reino foi também reportado por VELOSO et al. (1995). Esses autores demonstraram que espécies tolerantes ao Al, quando expostas a baixas concentrações desse elemento, apresentam um estímulo na produção da biomassa, no entanto, constataram declínio em altas concentrações. Diferentes cultivares de soja também responderam de modo semelhante em baixas concentrações de Al (CUSTODIO et al., 2002). O incremento em biomassa nos tratamentos com doses moderadas de Al pode ser atribuído não necessariamente ao desenvolvimento das brotações, mas ao aumento da taxa de divisão celular, que diminui o alongamento e, em alguns casos, pode induzir a formação de massa calosa (VANGELISTI et al., 1995).

Os resultados do presente trabalho demonstram que as respostas de crescimento das plântulas em relação à toxidez de Al são genótipo dependente, principalmente em relação aos acessos de *P. glomerata*. Essa espécie é largamente distribuída em todo território brasileiro, no qual muitos genótipos adaptados a diferentes condições ambientais têm sido coletados. A *P. tuberosa* é uma espécie seletiva, xerófita e heliófita, bastante freqüente nos campos limpos, secos, enxutos e pedregosos (SMITH & DOWNS, 1972). Essas peculiaridades de ambiente, associada aos dados do presente estudo, sugerem que essa espécie apresenta características indicativas de tolerância ao Al. Portanto, a variabilidade encontrada em relação a vários parâmetros de crescimento das plântulas de diferentes acessos de *Pfaffia* pode ser explorada em programas de melhoramento genético.

CONCLUSÃO

Existem diferenças entre os acessos de *Pfaffia glomerata*, cultivados *in vitro*, em relação à toxicidade de Al. A presença de concentrações baixas de Al (50mg L^{-1}) no meio de cultura estimula o crescimento das plântulas de *P. glomerata*, sendo o acesso JB mais tolerante ao Al do que o acesso BRA. A *Pfaffia tuberosa* é tolerante ao Al até a concentração de 200mg L^{-1} .

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal e Ensino Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro concedido.

REFERÊNCIAS

- BLANCAFLOR, E.B. et al. Alterations in the cytoskeleton accompany aluminum-induced growth inhibition and morphological changes in primary roots of maize. **Plant Physiology**, Rockville, v.118, p.159-172, 1998.
- CALABRESE, E.J.; BLAIN, R. The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature, the hormesis database: an overview. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 202, p.289–301, 2005.
- CUSTÓDIO, C.C. et al. Estresse por alumínio e por acidez em cultivares de soja. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.59, n.1, p.145-153, 2002.

- DANIEL, J.F. de S. et al. Free radical scavenging activity of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pederson (Amaranthaceae). **Indian Journal Pharmacological**, Ahmedabad, v.37, n.3, p. 74-178, 2005.
- DANTAS, A.C. M. et al. 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.
- 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.
- EMBRAPA **Ambiente de software NTIA**, versão 4.2.2: manual do usuário. Campinas: Centro Nacional de Pesquisa Tecnológica em Informática para a Agricultura, 1997. 258p.
- 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.
- FLORES, R. et al. Otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.3, p.845-851, 2006.
- 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.
- 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.
- MA et al. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. **Trends in Plant Science**, London, v.6, p.273-278, 2001.
- MA. J.F.; FURUKAWA, J. Recent progress in the research of external Al detoxification in higher plants: a minireview. **Journal of Inorganic Biochemistry**, Oxford, v. 97, n.1, p. 46-51, 2003.

- MENOSSO, O.G. et al. Tolerância de genótipos de soja ao alumínio em solução nutritiva diluída. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, p.2157-2166, 2000.
- MONTANARI Jr. I. **Aspectos do cultivo comercial do ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen)**. São Paulo: CPQBA-UNICAMP. 1999. 3p. (Boletim Agroecológico. 12).
- MULLETTE, K.J. Stimulation of growth in *Eucalyptus* due to aluminium. **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.
- NAKAI, S. et al. Pfafosides, nortriterpenoid saponins from *Pfaffia paniculata*. **Phytochemistry**, Oxford, v.23, n.8, p.1703-1705, 1984.
- NICOLOSO, F.T. et al. Micropropagação do Ginseng Brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.3, n.2, p.11-18, 2001.
- NISHIMOTO, N. et al. Ecdysteroids from *Pfaffia iresinoides* and reassignment of some ¹³CNMR chemical shifts. **Phytochemistry**, Oxford, v.26, n.9, p.2505-2507, 1987.
- OLIVEIRA, I.P.; MALAVOLTA, E. Efeitos do alumínio e do manganês no feijoeiro. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v.17, n.4, p.549-557, 1982.
- PASSO, R.R.; RUIZ, H.A. Tolerância dos cafeeiros Conilon e Catuí à toxidez causada pelo alumínio e manganês. **Revista Ceres**, Viçosa, v.42, p.45-52, 1995.
- PEREIRA, J.S. et al. Efeito de diferentes concentrações de alumínio na multiplicação e enraizamento *in vitro* da macieira, cultivar "Marubakaido" (*Malus prunifolia* Willd, Borkh.). **Agropecuária de Clima Temperado**, Pelotas, v.1, n.1, p.21-27, 1998.
- POLAK, T.B. et al. The uptake and speciation of various Al species in the *Brassica rapa* pekinensis. **Phytochemistry**, Oxford, v.57, p.189-198, 2001.

RYAN, P.R. et al. Function and mechanism of organic anion exudations from plant roots. **Annual Reviews Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.52, 527-560, 2001.

SHIOBARA, Y. et al. Pfaffana-type nortriterpenoids from *Pfaffia pulverulenta*. **Phytochemistry**, Oxford, v.33, n.4, p.897-899, 1993.

SIVAGRURU, M.; HORST, W.J. The distal part of the transitional zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize. **Plant Physiology**, Rockville, v.163, p.155-163, 1998.

SMITH, L.B.; DOWNS, R.J. **Flora ilustrada catarinense: Amarantáceas**, Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1972, 110 p.

TAYLOR, G.J. The physiology of aluminum tolerance. In: Sigel. H.; Sigel. A. (Eds.). Metal Ions in Biological Systems. **Aluminum and its role in Biology**. New York: Marcel Dekker, v.24, p.165-198, 1988.

TENNANT, D. A test of a modified line intersect method of estimating root length. **The Journal of Ecology**, Oxford, v.63, p.995-1001, 1975.

VANGELISTI, R. et al. Responses of *Pinus pinea* and *Pinus pinaster* seedling roots to substrata at different pH values. **Annual Botany Fennici**, Helsinki, v.32, p.19-27, 1995.

VELOSO, C.A. et al. 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.

3.2. ARTIGO 2:**Antioxidant system of *Pfaffia glomerata* as a mechanism to scavenge Al stress side effects**

Joseila Maldaner, Fernando Teixeira Nicoloso, Denise Cargnelutti, Jamile Fabbrin Gonçalves,
Renata Rauber, Luciane Almeri Tabaldi, Luciane Belmonte Pereira, Liana Verônica Rossato,
Maria Rosa Chitolina Shetinger, Danton Camacho Garcia

Antioxidant system of *Pfaffia glomerata* as a mechanism to scavenge Al stress side effects

Joseila Maldaner^{1,4}, Fernando Teixeira Nicoloso^{1,4*}, Denise Cargnelutti^{2,5}, Jamile Fabbrin Gonçalves^{1,4}, Renata Rauber¹, Luciane Almeri Tabaldi^{1,4}, Luciane Belmonte Pereira^{2,5}, Liana Verônica Rossato¹, Maria Rosa Chitolina Shetinger^{2,5}, Danton Camacho Garcia^{3,4}

Departamento de Biologia¹, Química², Fitotecnia³, Programa de Pós-Graduação em Agronomia⁴ e em Bioquímica Toxicológica⁵, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

Abstract

Aluminum toxicity is a serious problem in Brazilian soils and selecting *Pfaffia glomerata* genotypes is an important strategy to produce this crop on such soils. *Pfaffia glomerata* accessions, BRA and JB/UFSM, were grown in a nutrient solution (pH 4.5±0.2) with 0, 50, 100, 150 and 200 mg l⁻¹ of Al. After 7 days, Al concentration in both root and shoot of both accessions increased with increasing Al levels. BRA showed greater Al concentration in roots and shoots compared with JB/UFSM. Root length in the BRA decreased linearly by Al treatments, whereas, in JB/UFSM it decreased, but no significant difference was found between 50 to 200 mg l⁻¹ Al levels. Lipid peroxidation in both BRA roots and shoot increased linearly when increasing Al levels, whereas in JB/UFSM roots it either decreased at 50 mg l⁻¹ or increased at 100, 150 and 200 mg l⁻¹. In the JB/UFSM reduced root H₂O₂ concentration was observed at all Al levels. Shoot H₂O₂ concentration increased similarly in both accessions. Root catalase (CAT) activity of JB/UFSM increased at 50 and 200 mg l⁻¹ of Al, while in the BRA it decreased at all Al levels. Shoot CAT activity in JB/UFSM decreased only at 150 mg l⁻¹ of Al, while in BRA it decreased at all Al levels. In

both roots and shoot ascorbate peroxidase activity was higher in the BRA than in the JB/UFSM. The decrease in root superoxide dismutase activity by Al treatments was greater in BRA than in JB/UFSM. There was a slight decrease in the root NPSH concentrations of both accessions, but at 150 mg l⁻¹ of Al it did not alter in JB/UFSM. Shoot NPSH concentration increased in the JB/UFSM regardless of Al levels, whereas it decreased in BRA at 50, 150 and 200 mg l⁻¹ of Al. Shoot AsA concentration of both accessions increased when increasing Al levels, but this increase was greater in JB/UFSM than in BRA. The results of this study showed that the cellular redox status of *P. glomerata* accessions seems to be affected by Al, and oxidative stress may be an important mechanism involved in Al toxicity. Moreover, JB/UFSM is more Al tolerant than BRA accession.

Keywords: Brazilian Ginseng; Aluminum; Malondialdehyde; Catalase; Ascorbate peroxidase; Superoxide dismutase; Ascorbic acid; Non-protein thiol groups; Growth

1. Introduction

Around 90 species of *Pfaffia* are known in Central and South America. In folk medicine, roots of *Pfaffia* are employed as aphrodisiac, stimulant and in the treatment of diabetes and inflammatory diseases (Oliveira et al., 1980). Extracts from roots of *P. glomerata* seem to have a central nervous system depressant activity (De Paris et al., 2000). Several compounds were isolated and identified from roots of *P. glomerata*, such as ecdysterone, saponins, glomeric acid, and pfameric acid, rubrosterone, oleanolic acid and beta-glucopyranosyl oleanolate (Nishimoto et al., 1987; Shiobara et al., 1993).

In the external environment, plants are under several abiotic and biotic stresses. The toxicity caused by aluminum in plants in acid soils is a well known example of such environmental stress (Kochian, 1995; Matsumoto, 2000; Ryan and Delhaize, 2001; Ma et al.,

2001). An important response to stress by aerobic cells is the production of reactive oxygen species (ROS), like superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyl radical ($\cdot OH$), alkoxy radical ($\cdot RO$), singlet oxygen (1O_2), and toxic hydrogen peroxide (H_2O_2) molecules (Luna et al., 1994, Asada, 1999, Breusegem et al., 2001).

The binding of Al to the membrane lipids causes the rigidification of the plasma membrane (Akeson et al., 1989; Deleers et al., 1986), which seems to affect its metabolism. Several data reported in the literature associate Al induced oxidative stress with lipid peroxidation in plants, suggesting that this process in biological membranes is the most prominent symptom of oxidative stress in plants and animals (Yamamoto et al., 2001).

It has been shown that Al enhances the production of ROS, although Al itself is not a transition metal and cannot catalyze redox reactions in both tobacco cells and pea roots (Yamamoto et al., 2001). Furthermore, in both systems, the Al-enhanced ROS production is strongly correlated with mitochondrial dysfunction and cell growth or root elongation inhibition. In non-chlorophyllated plant cells, mitochondria are a major organelle to produce ROS such as superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) and H_2O_2 as an unavoidable consequence of aerobic metabolism (Halliwell and Gutteridge, 1999).

All cells possess a defensive system which can reduce ROS easily, consisting of various enzymes such as catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX). In addition to these antioxidant enzymes, cells have low molecular mass agents represented by ascorbic acid (AsA), glutathione (GSH or Non-Protein Thiol (NPSH)), carotenoids and α -tocopherol, which are used as a hydrogen donor to convert H_2O_2 to H_2O . These antioxidant agents efficiently reduce ROS under normal circumstances, but if complete reduction does not occur, as under increased production triggered by adverse environmental conditions, the result may be a state of oxidative stress leading to the oxidation of biomolecules or even cell death (Richter and Schweitzer, 1997; Buckner et al., 2000).

During evolution, plants have developed numerous mechanisms that allow for survival in acid soils with higher availability of Al (Kochian, 1995). As a result of selection pressure, inter- and intra-species differences in response to Al are widely observed in the plant kingdom. Moreover, great differences in tolerance to Al have been reported among genotypes of the same species. Over the last several years, a great diversity of results obtained in physiologic and molecular mapping studies have shown that plant tolerance to Al toxicity is a complex multigenic characteristic that can involve several mechanisms of tolerance (Kochian, 1995; Barceló and Poschenrieder, 2002; Kochian et al., 2004). These include external (or exclusion) and internal detoxification mechanisms, such as the immobilization of Al by cell wall components (Zhang et al., 1994), the exudation of organic acids for the detoxification of Al in the apoplast (Ryan et al., 2001), Al compartmentation in the vacuole, etc. In this context, selection of varieties which are productive and tolerant to Al toxicity must be considered a very important component of strategies for dealing with acid soils.

This study was carried out in an attempt to better understand the oxidative stress triggered by Al on the enzymatic and non-enzymatic antioxidant system and its relation with lipid peroxidation and H₂O₂ production in two *Pfaffia glomerata* (JB/UFSM and BRA) accessions.

2. Materials and Methods

2.1 Plant material and experimental design

Pfaffia glomerata (Spreng.) Pedersen plantlets - accessions BRA and JB/UFSM- were obtained from *in vitro* culture in MS medium (Murashige & Skoog, 1962) supplemented with 0.6% agar, 30 g l⁻¹ of sucrose and 0.1 g l⁻¹ of mio-inositol, under climatized room conditions according to Nicoloso et al. (2001). Twenty five-day-old plantlets were transferred to plastic boxes (10 l) with polystyrene plates with holes that were used as a physical support for the

plants; roots were submerged in an aerated full nutrient solution of low ionic strength. The nutrient solution composition was the following (mg l⁻¹): 85.31 N; 7.54 P; 11.54 S; 97.64 Ca; 23.68 Mg; 104.75 K; 176.76 Cl; 0.27 B; 0.05 Mo; 0.01 Ni; 0.13 Zn; 0.03 Cu; 0.11 Mn and 2.68 Fe.

After two weeks of plantlet acclimatization, Al as AlCl₃ was added to the nutrient solution to final concentration of 0, 50, 100, 150 and 200 mg l⁻¹. During Al treatments phosphorus was omitted from the nutrient solution. The experiment was set in a completely randomized design, with three replicates for each treatment. The solution pH in each container was adjusted daily to 4.5 ± 0.2 by titration with HCl or NaOH solution of 0.1 M. Both *in vitro* and *ex vitro* cultured plants were grown in a growth chamber at 25±2°C in a 16/8-h light/dark cycle with 35 μmol m⁻² s⁻¹ of irradiance. The nutrient solution in the growth container was continuously aerated and renewed every seven days. Al-treated plantlets remained in each treatment for 7 days. At harvest time, the plants were divided into roots and shoot. Roots were rinsed twice with distilled water. Subsequently, growth and biochemical parameters were determined. To obtain dry weight, roots and shoots were dried at 65°C until constant weight. Root length was determined according to Tennant (1975).

2.2 Al determination

Dried plant tissues (0.2g) were ground and digested with 4 ml of concentrated HNO₃. Sample decomposition was carried out using a heating block *Velp Scientifica* (Milano, Italy). Heating was set at 130°C for two hours. Plastic caps were fitted to the vessels to prevent losses by volatilization. The content of Al was determined by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) PerkinElmer *Optima 4300 DV* (Shelton, USA) equipped with a cyclonic spray chamber and a concentric nebulizer.

2.3 Determination of hydrogen peroxide

The H₂O₂ content was determined according to Loreto and Velikova (2001). Approximately 0.1 g of both roots and shoot was homogenized at 4°C in 2 ml of 0.1% (w/v) trichloroacetic acid (TCA). The homogenate was centrifuged at 12000 x g for 15 min. Then, 0.5 ml of the supernatant was added to 0.5 ml of 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) and 1 ml of 1M KI. The H₂O₂ content of the supernatant was evaluated comparing its absorbance at 390 nm with a standard calibration curve. Hydrogen peroxide content was expressed as $\mu\text{M g}^{-1}$ fresh weight.

2.4 Estimation of lipid peroxidation

The degree of lipid peroxidation was estimated following the method of El-Moshaty et al. (1993). Fresh root and shoot samples were collected, weighed (0.1 g fresh weight) and ground in 10 ml of 0.2 M citrate-phosphate buffer (pH 6.5) containing 0.5% Triton X-100, using mortar and pestle. The homogenate was filtered with two paper layers and centrifuged for 15 min at 20000 x g. One milliliter of the supernatant fraction was added to an equal volume of 20% (w/v) TCA containing 0.5% (w/v) of thiobarbituric acid (TBA). The mixture was heated at 95°C for 40 min and then quickly cooled in an ice bath for 15 min, and centrifuged at 10000 x g for 15 min. The absorbance of the supernatant at 532 nm was read and corrected for unspecific turbidity by subtracting the value of the absorbance at 600 nm. The lipid peroxides were expressed as nmol MDA mg^{-1} protein, by using an extinction coefficient of 155 $\text{l mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

2.5 Superoxide dismutase (SOD; E.C. 1.15.1.1) activity

The activity of superoxide dismutase was assayed according to Mishra and Fridovich (1972). About 0.2 g of both root and shoot of *Pfaffia* plantlets were homogenized in 5 ml of

100 mM l⁻¹ K-phosphate buffer (pH 7.8) containing 0.1 mmol l⁻¹ ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.1% (v/v) Triton X-100 and 2% polyvinylpyrrolidone (PVP) (w/v). The extract was filtered and centrifuged at 22000 x g for 10 min at 4°C, and the supernatant was utilized for assay. The assay mixture consisted of a total volume of 1 ml, containing glycine buffer (pH 10.5), 1 mM l⁻¹ epinephrine and enzyme extract. Epinephrine was the last component to be added. The adenochrome formation in the next 4 min was recorded at 480 nm in UV- Vis spectrophotometer. One unit of SOD activity is expressed as the amount of enzyme required to cause 50% inhibition of epinephrine oxidation in the experimental conditions.

2.6. Catalase (CAT, E.C. 1.11.1.6) assay

Catalase (CAT) activity was assayed following the modified Aebi (1984) method. Fresh samples (1 g) were homogenized in 5 ml of 50 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ (pH 7.0), 10 g l⁻¹ PVP, 0.2 mM EDTA and 10 ml l⁻¹ Triton X-100. The homogenate was centrifuged at 12000 x g for 20 min at 4°C and the supernatant was used for the enzyme assay. CAT activity was determined by monitoring the disappearance of H₂O₂ measuring the decrease in absorbance at 240 nm from a reaction mixture containing 2 ml (15 mM H₂O₂ in KPO₄ buffer, pH 7.0) and 30 µl extract. Activity was expressed as ΔE min⁻¹ mg⁻¹ protein.

2.7. Ascorbate peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) assay

Ascorbate peroxidase was measured according to Zhu et al. (2004). The reaction mixture, in a total volume of 2 ml, contained 25 mM (pH 7.0) sodium phosphate buffer, 0.1 mM EDTA, 0.25 mM ascorbate, 1.0 mM H₂O₂ and 100 µl enzyme extract. H₂O₂-dependent oxidation of ascorbate was followed by a decrease in the absorbance at 290 nm (E = 2.8 l mM⁻¹ cm⁻¹) and activity was expressed as µmol oxidized ascorbate min⁻¹ mg⁻¹ protein.

2.8. Ascorbic acid (AsA) contents

Ascorbic acid determination was performed as described by Jacques-Silva et al. (2001). Both roots and shoot were homogenized in a solution containing 50 mM Γ^{-1} Tris-HCl and 10 ml Γ^{-1} Triton X-100 (pH 7.5), centrifuged at 6800 x g for 10 min. To the supernatant was added 10% TCA in the proportion of 1:1 (v/v) followed by centrifugation (6800 x g for 10 min) to remove protein.

An aliquot of the sample (300 μ l) was incubated at 37°C in a medium containing 100 μ l TCA 13.3%, 100 μ l deionized water and 75 μ l 2,4-Dinitrophenylhydrazine (DNPH). The DNPH solution contained 2% DNPH, 0.23% thiourea, 0.27% CuSO_4 diluted in 49% H_2SO_4 . After 3 h, 500 μ l of 65% H_2SO_4 was added and samples were read at 520 nm. A standard curve was constructed using *L*(+) ascorbic acid.

2.9. Non-protein thiol groups (NPSH) contents

Non-protein thiols content in the plant tissues was measured spectrophotometrically with Ellman's reagent (Ellman, 1959). Reaction was read at 412 nm after the addition of 10 mM 5-5-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (0.05 mL). *P. glomerata* plantlets were homogenized in a solution containing 50 mM Tris-HCl and 10 ml Γ^{-1} Triton X-100 (pH 7.5), centrifuged at 6800 x g for 10 min, and NPSH were determined in the fraction obtained after mixing 1 volume of supernatant with 1 volume of 10% TCA followed by centrifugation (6800 x g for 10 min) and neutralization (to pH 7.4) with 1 M Tris-HCl as described by Jacques-Silva et al. (2001). A standard curve using cysteine was used to calculate the content of thiol groups in samples, and was expressed as $\mu\text{mol -SH g}^{-1}$ fresh weight.

2.10. Carotenoid determination

Chopped fresh (0.1g) shoot sample was incubated at 65°C in dimethylsulfoxide (DMSO) until the tissues were completely bleached. Absorbance of the solution was then measured at 470 nm for carotenoids on Spectrophotometer (Celm E-205D). Carotenoids concentration was estimated using the equation of Lichtenthaler (1987).

2.11. Protein determination

In all the enzyme preparations, protein was determined by the Coomassie Blue method according to Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard.

2.12. Statistical analysis

The experiment was conducted in a completely randomized design with three replications. The one-way ANOVAs were calculated using the standard procedure, and the means were separated by Tukey's test. The term significant has been used to indicate differences for which $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Al concentration and plant growth

Al concentration in both roots and shoot increased with Al treatments. However most of Al taken up by plants was accumulated in the roots. BRA accession showed greater Al concentration in roots compared with JB/UFMSM (Fig. 1).

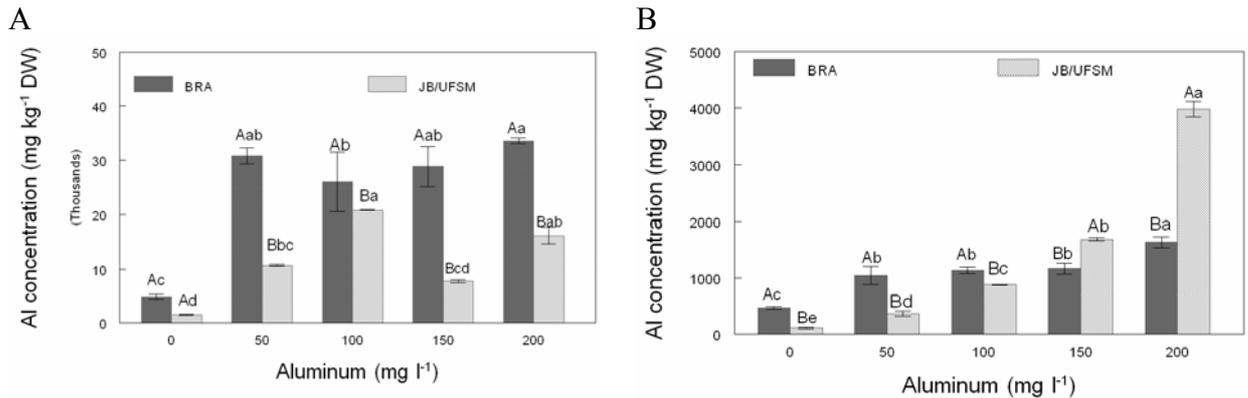


Figure 1: Aluminum content in roots (A) and shoot (B) of two accessions (BRA and JB/UFSM) of *P. glomerata* exposed to five Al concentrations. Values are expressed as mean of three replicates \pm S.D. Identical capital letters indicate no significant differences among the *Pfaffia glomerata* accessions in the same Al concentration ($p < 0.05$) according to Tukey's multiple range test. Identical lowercase letters indicate no significant differences between Al concentrations in the same *P. glomerata* accession ($p < 0.05$) according to Tukey's multiple range test.

The effects of Al on roots and shoot dry weight of both *Pfaffia glomerata* accessions are shown in Fig. 2 A and B, respectively. Shoot dry weight in BRA accession decreased significantly when increasing Al concentrations. In contrast, shoot dry weight in JB/UFSM was reduced only at 150 and 200 mg l⁻¹ of Al. On the other hand, root dry weight of BRA accession was not affected by Al, while in JB/UFSM it decreased at 100 and 150 mg l⁻¹, when compared to control group. Moreover, JB/UFSM presented greater root dry weight compared with BRA. The response of plant total dry weight in the BRA accession to Al levels was linear and negative, whereas in the JB/UFSM accession it only decreased at 50, 100 and 150 mg l⁻¹. In contrast, there was no significant difference between accessions (Fig. 2 C). The response of root length in the BRA accession to Al levels was linear and negative, whereas in the JB/UFSM accession it decreased when compared to the control, but no significant difference was found between 50 to 200 mg l⁻¹ Al treatments (Fig. 2D).

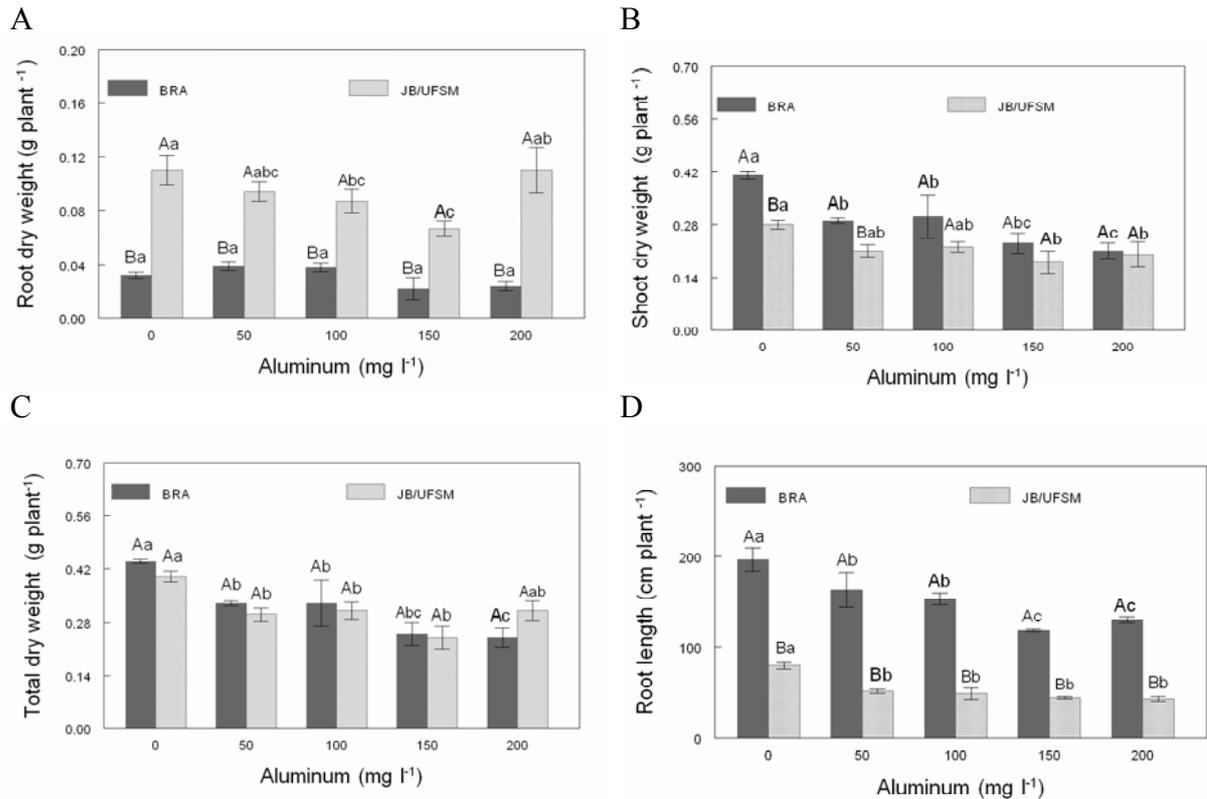


Figure 2: Changes in root (A), shoot (B) and total (C) dry weight, and root length (D) of two accessions (BRA and JB/UFSM) of *P. glomerata* exposed to five Al concentrations. Identical capital letters indicate no significant differences among the *Pfaffia glomerata* accessions in the same Al concentration ($p < 0.05$) according to Tukey's multiple range test. Identical lowercase letters indicate no significant differences between Al concentrations in the same *P. glomerata* accession ($p < 0.05$) according to Tukey's multiple range test.

3.2. H₂O₂ concentration and lipid peroxidation

The response of root H₂O₂ concentration in the JB/UFSM accession to Al levels was linear and negative, whereas in the BRA accession it either decreased at 100 mg l⁻¹ or increased at 150 mg l⁻¹ (Fig. 3 A). Shoot H₂O₂ concentration in both *P. glomerata* accessions increased significantly at 50 and 100 mg l⁻¹ of Al. Moreover, JB/UFSM accession showed increased shoot H₂O₂ concentration upon addition of Al exceeding 100 mg l⁻¹, when compared to the control. On the other hand, BRA presented no alteration in the same Al range (Fig. 3 B).

Root lipid peroxidation in the JB/UFSM accession decreased upon addition of 50 mg l⁻¹ Al, whereas it increased at 100, 150 and 200 mg l⁻¹ Al, when compared to the control. In

contrast, the response of root lipid peroxidation in the BRA accession to Al levels was linear and positive (Fig. 3 C). The response of shoot lipid peroxidation in the BRA accession to Al levels was also linear and positive, whereas in the JB/UFSM accession it showed a quadratic relationship with Al levels, but it peaked at 100 mg l⁻¹ of Al (Figure 3 D).

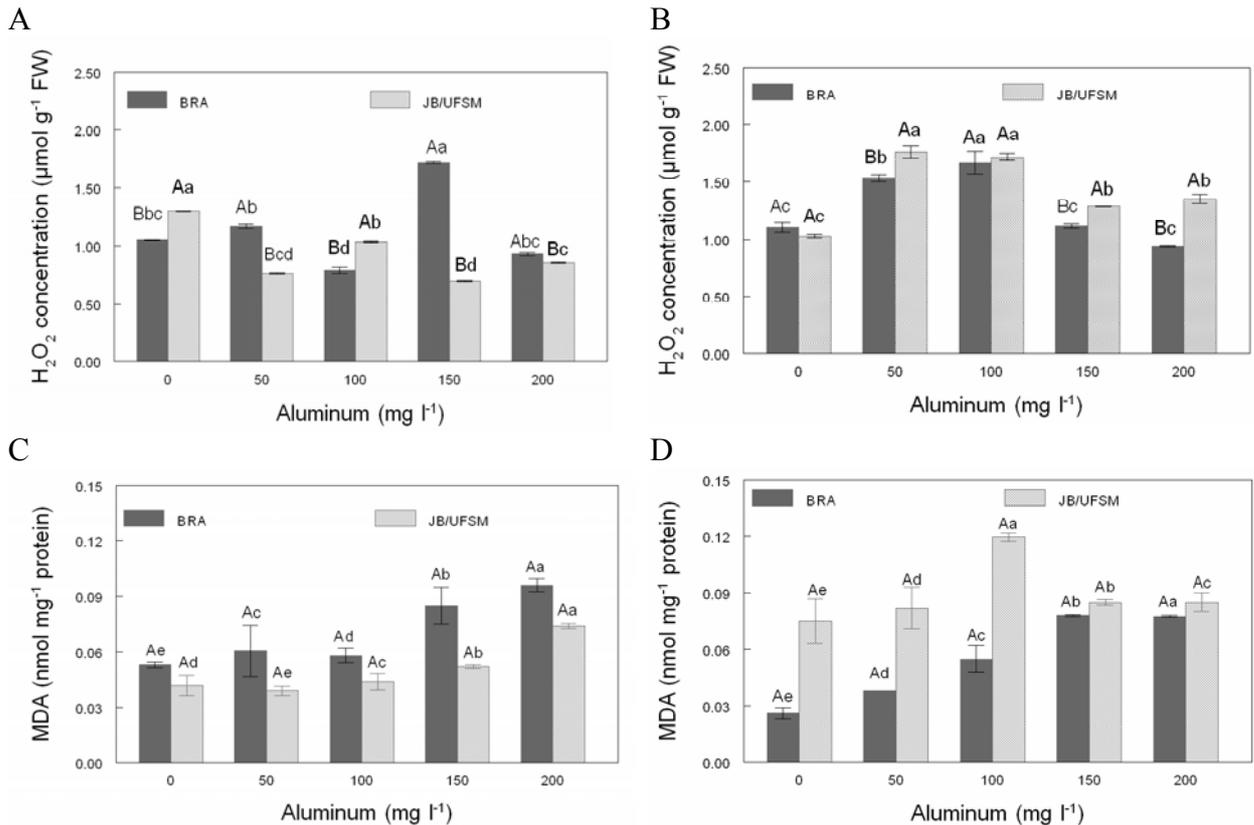


Figure 3: Changes in hydrogen peroxide in roots (A) and shoot (B), and malondialdehyde (MDA) levels in roots (C) and shoot (D) of two accession (BRA and JB/UFSM) of *P. glomerata* exposed to five Al concentrations. Values are expressed as mean of three replicates \pm S.D. Identical capital letters indicate no significant differences among the *Pfaffia glomerata* accessions in the same Al concentration ($p < 0.05$) according to Tukey's multiple range test. Identical lowercase letters indicate no significant differences between Al concentrations in the same *P. glomerata* accession ($p < 0.05$) according to Tukey's multiple range test.

3.3. Antioxidative systems

3.3.1. Catalase (CAT) activity

Root CAT activity in the BRA accession was reduced by Al levels, while in the JB/UFSM accession it either increased at 50 and 200 mg l⁻¹ or decreased at 100 and 150 mg l⁻¹

¹ (Fig. 4 A). On the other hand, shoot CAT activity decreased at all Al concentrations in the BRA accession, while it decreased in the JB/UFSM accession only at 150 mg l⁻¹ Al (Fig. 4 B). In general, BRA accession showed greater CAT activity than JB/UFSM accession.

3.3.2. Ascorbate peroxidase (APX) activity

Roots APX activity increased significantly when increasing Al levels in both *P. glomerata* accessions (Fig. 4 C). On the other hand, shoot APX activity either increased at 50, 100 and 200 mg l⁻¹ or decreased at 150 mg l⁻¹ in BRA accession, whereas it either increased at 100 mg l⁻¹ or tendency to decreased at 150 mg l⁻¹ in JB/UFSM accession (Fig. 4D). In general, BRA showed greater APX activity than JB/UFSM accession.

3.3.3. Superoxide dismutase (SOD) activity

Root SOD activity in the BRA accession either increased at 100 mg l⁻¹ of Al or decreased at 50, 150 and 200 mg l⁻¹, when compared to the control. In JB/UFSM accession, root SOD activity either increased at 150 mg l⁻¹ Al or decreased at 50, 100 and 200 mg l⁻¹, when compared to the control (Fig. 4 E). In shoot, SOD activity in BRA accession was either reduced at 50 mg l⁻¹ of Al or increased at 100, 150 and 200 mg l⁻¹, whereas in JB/UFSM accession it either decreased at 50 and 100 mg l⁻¹ of Al or increased at 150 and 200 mg l⁻¹, when compared to the control (Fig. 4 F). Moreover, BRA showed greater root and shoot SOD activity than JB/UFSM accession.

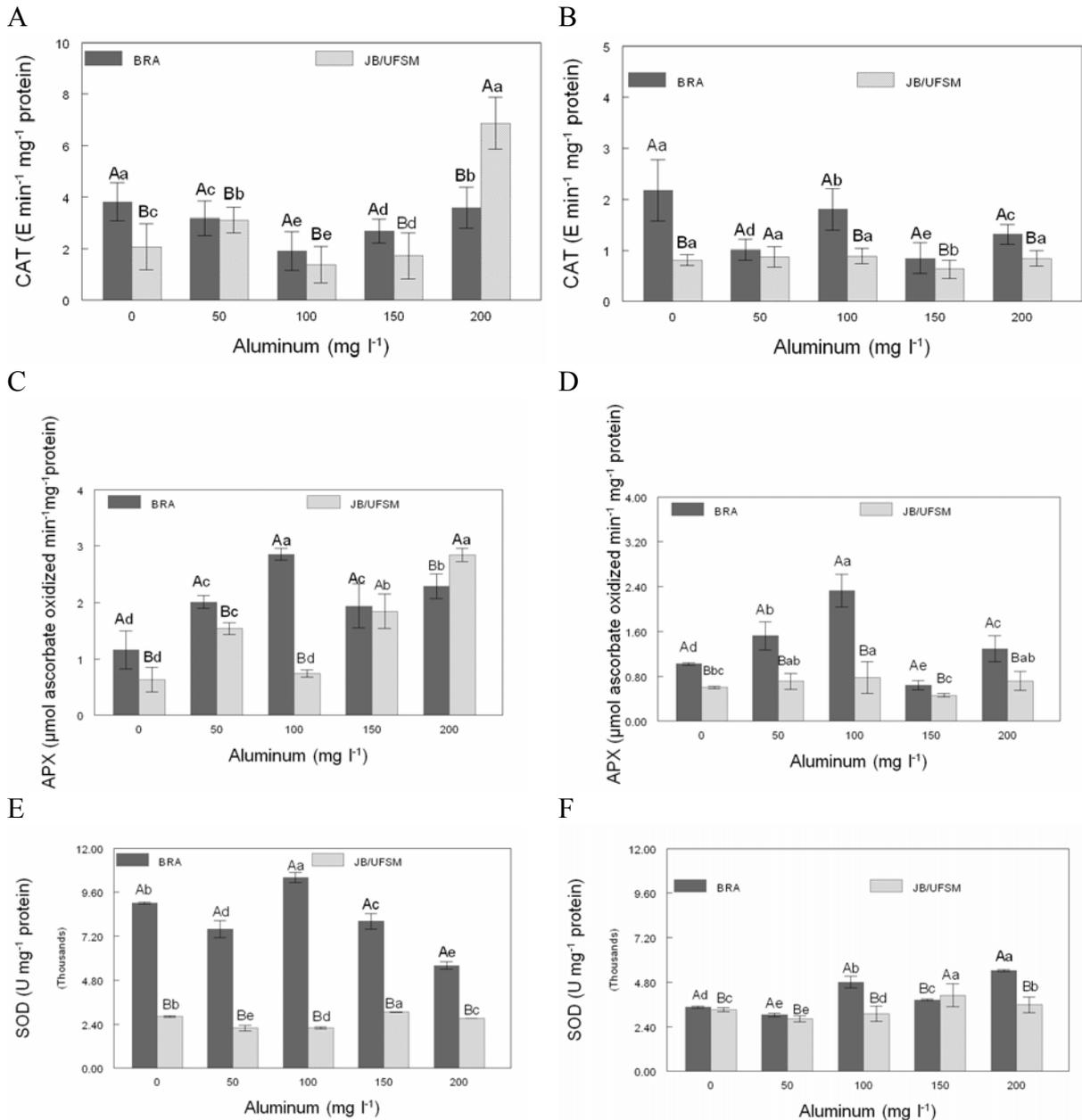


Figure 4: Changes in CAT activity in roots (A) and shoot (B), APX activity in roots (C) and shoot (D) and SOD activity in roots (E) and shoot (F) of two accessions (BRA and JB/UFSM) of *P. glomerata* exposed to five Al concentrations. Values are expressed as mean of three replicates \pm S.D. Identical capital letters indicate no significant differences among the *P. glomerata* accessions in the same Al concentration ($p < 0.05$) according to Tukey's multiple range test. Identical lowercase letters indicate no significant differences between Al concentrations in the same *P. glomerata* accession ($p < 0.05$) according to Tukey's multiple range test.

3.3.4. Non-protein thiol (NPSH) content

In general, roots NPSH contents were similarly reduced by Al in both accessions. Except for 150 mg l⁻¹ of Al, where root NPSH contents showed no alteration in JB/UFSM

accession when compared to the control (Fig. 5 A). Shoot NPSH contents increased with increasing Al levels in the JB/UFSM accession, whereas it either increased at 100 mg l⁻¹ of Al or decreased at 50, 150 and 200 mg l⁻¹ of Al in the BRA accession (Fig.5 B). In addition, there was a large difference in NPSH contents between plant parts, with approximately twice as much content in shoot than in roots.

3.3.5. Ascorbic acid (AsA) content

Root As A content in the two accessions had a different response to Al levels, it increased in the BRA accession regardless the Al level, and decreased in the JB/UFSM accession upon addition of Al exceeding 50 mg l⁻¹, when compared to the control (Fig. 5 C). Shoot AsA content in both *P. glomerata* accessions increased when increasing Al levels (Fig. 5 D). In addition, shoot AsA content was an order of magnitude greater than in the roots of both accessions.

3.3.6. Carotenoids content

Carotenoids content was not affected by Al concentrations in both *P. glomerata* accessions (Fig. 5 E).

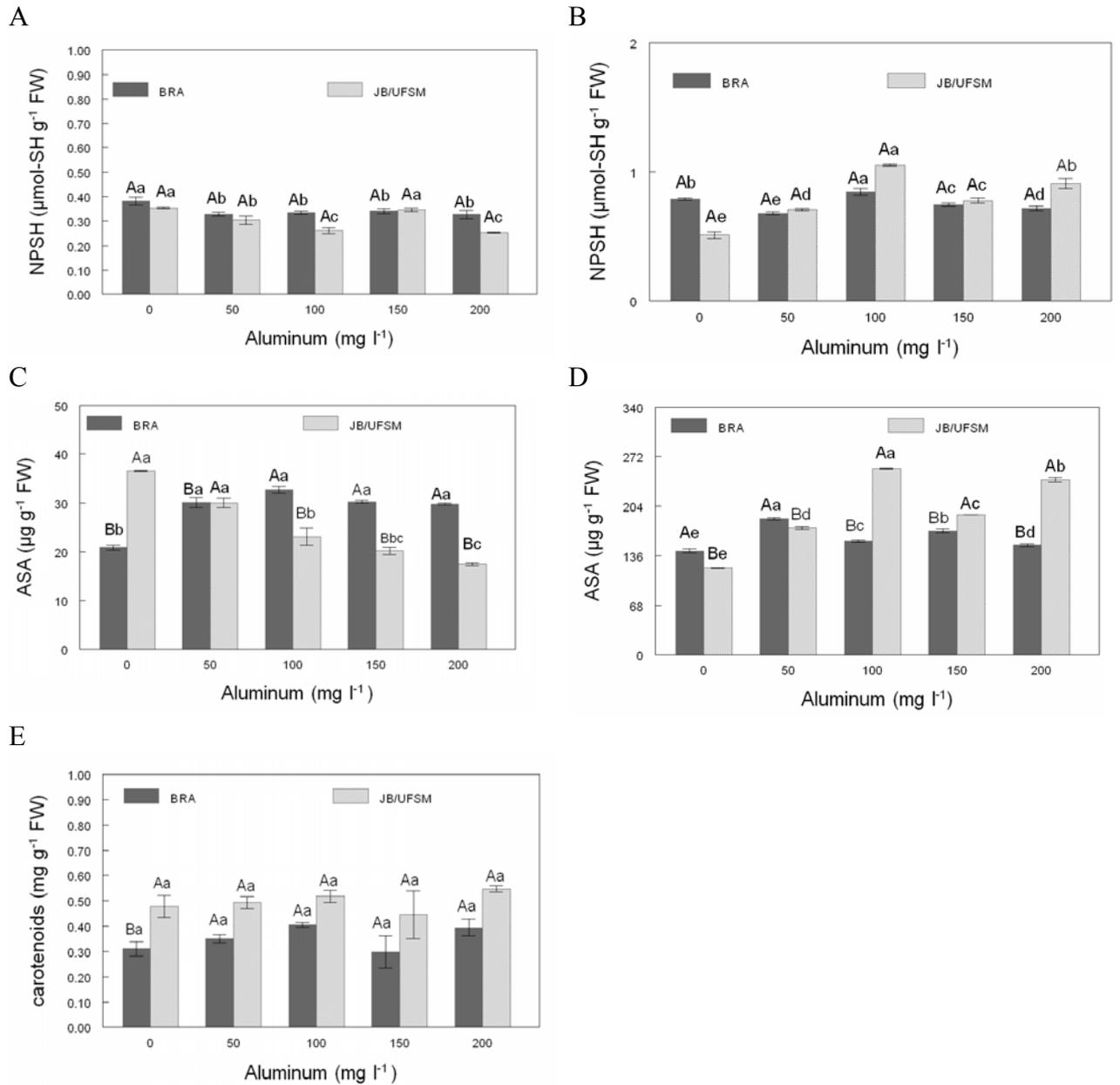


Figure 5: NPSH concentration in roots (A) and shoot (B), ASA concentration in roots (C) and shoot (D) and carotenoids concentration in shoot (E) of two accessions (BRA and JB/UFSM) of *Pfaffia glomerata* exposed to five Al concentrations. Values are expressed as mean of three replicates \pm S.D. Identical capital letters indicate no significant differences among the *Pfaffia glomerata* accessions in the same Al concentration ($p < 0.05$) according to Tukey's multiple range test. Identical lowercase letters indicate no significant differences between Al concentrations in the same *P. glomerata* accession ($p < 0.05$) according to Tukey's multiple range test.

4. Discussion

In acid soils, which occupy approximately 30% of the world's ice-free land (von Uexküll and Mutert, 1995) and around 40% of arable land (Wright, 1989), aluminum (Al) is one of the most important factors limiting crop production (Foy, 1988).

In roots and shoot (Fig. 1A and 1B, respectively) of both *P. glomerata* accessions (BRA and JB/UFSM) Al concentration increased when increasing Al levels. Aluminum concentration was lower in the shoot (Fig. 1 B), which indicates that the absorbed Al was mostly retained in the root tissues. Aluminum ions are taken up by plants mostly through the root system, and only small amounts reach the leaves. Most authors now agree that generally the active metal uptake processes involve ion-specific carriers with energy expenditure but a specific Al carrier has not yet been found (Mossor-Pietraszewska et al., 1997). It has been suggested that Al interact with many cellular sites: cell wall, plasma membrane, and DNA (Silva et al., 2000; Taylor et al., 2000); however, it seems that most of the Al accumulates in the cell wall.

In the present study, BRA accession showed greater root Al concentration compared with JB/UFSM (Fig. 1A). In spite of that, the root dry weight was not affected by Al treatments in the BRA accession, while in JB/UFSM it either decreased at 100 and 150 mg l⁻¹ or showed no alteration at 200 mg l⁻¹, when compared to the control (Fig. 2A). Shoot and plant total dry weight (Fig. 2B and 2C, respectively) in BRA accession decreased linearly with increasing Al levels, whereas in JB/UFSM the shoot dry weight was only reduced at 150 and 200 mg l⁻¹ and the plant total dry weight was reduced at 50, 100 and 150 mg l⁻¹. Similar results have been reported by other researches. Custódio et al (2002) reported, that Al had not effect on dry weight of soybean roots, while the shoot dry weight was reduced.

In the present study, root length in the BRA accession decreased linearly by Al treatments, whereas in JB/UFSM it decreased, but no significant difference was found between 50 to 200 mg l⁻¹ Al levels (Fig. 2D). Therefore, these results also indicate that the

root elongation was much more affected than the biomass, which is consistent with the idea that the inhibition of root elongation is the primary Al toxicity symptom (Dipierro et al., 2005) and has been used as a suitable parameter for assessing genotypic differences in Al resistance (Collet et al., 2002; Jemo et al., 2007). The results of the present study indicate that there is a significant genotypic difference between the two *P. glomerata* accessions studied in relation to Al stress, where JB/UFSM is more Al tolerant than BRA accession.

A common feature of several stresses, including Al-toxicity, is the perturbation of cell redox homeostasis, enhancing ROS production, which is generally considered harmful to plant cells (Richards et al., 1998). In the present study, lipid peroxidation in both roots and shoot (Fig. 3C and 3D, respectively) of BRA accession increased linearly when increasing Al levels, whereas in roots of JB/UFSM it either decreased at 50 mg l⁻¹ or increased at 100, 150 and 200 mg l⁻¹, but this increase was less pronounced than that observed for BRA accession. The response of roots and shoot lipid peroxidation due to increased stress suggests that Al induced formation of ROS. However, in the JB/UFSM accession reduced root H₂O₂ concentration was observed at all Al levels (Fig. 3A). On the other hand, shoot H₂O₂ concentration increased similarly in both accessions (Fig. 3B). Several investigations have shown that ROS induce lipid peroxidation, which has the potential to damage membranes (Ponquett et al., 1992; Yamamoto et al. 2001). On the other hand, Yamamoto et al. (2001) suggested that the peroxidation of lipids stimulated by Al in peas was a relatively early symptom, but not the direct cause of the growth inhibition of the root by this ion. Moreover, H₂O₂ serves as a signaling molecule to activate a rescue/defense system for restoring the redox homeostasis in plant cells (Gratão et al., 2005). Conversely, during oxidative stress, H₂O₂ is a strong toxic oxidant causing cell damage or even cell death and also can contribute to the carbonylation of proteins (Bienert et al., 2006).

Current evidence suggests that the increase in the normal steady state content of ROS can induce antioxidant enzymes. Among these enzymatic systems, catalase (CAT) is one of the enzymes involved in the removal of toxic peroxide (Apel and Hirt, 2004). Interestingly, CAT activity in roots was higher than in the shoot for both *P. glomerata* accessions (Fig. 4A and 4B, respectively), indicating higher oxidative stress in roots. However, root CAT activity of JB/UFSM increased at 50 and 200 mg l⁻¹ of Al, while in the BRA accession it decreased at all Al levels. In addition, shoot CAT activity in JB/UFSM decreased only at 150 mg l⁻¹ of Al, while in BRA it decreased at all Al levels. These results also indicate that the CAT activity in JB/UFSM was more efficient to protect the membrane lipids from Al stress. The decrease in CAT activity could be due to the blocking of essential functional groups like –SH in the enzyme or the displacement of essential metal ions from enzymes, as suggested for other metals (Schützendübel and Polle, 2002). Reduced CAT activity was also reported for coffee, maize and greengram (Queiroz et al., 1998; Panda et al., 2003).

Together with CAT, ascorbate peroxidase (APX) can transform peroxides into non-reactive species, but APX has a very high affinity for H₂O₂ as compared to CAT (Graham and Patterson, 1982). Ascorbate peroxidase is thought to form a second barrier of defense against H₂O₂ produced in the chloroplasts (Fryer et al., 2003; Chang et al., 2004). In the present study, in general, in both roots and shoot APX activity (Fig. 4C and 4D, respectively) was higher in BRA than in JB/UFSM accession. In addition, the increase in APX activity by Al treatments in BRA accession was greater than in JB/UFSM. In spite of that, the lipid peroxidation (Fig. 3C and 3D) was higher in BRA accession, indicating, therefore, that active stress was higher and growth inhibition (Fig. 2) was greater.

According to Aebi (1984) increased H₂O₂ levels may be related to low levels of superoxide dismutase (SOD) activity because H₂O₂ may inactivate enzymes by oxidizing their thiol groups. The first line of defense against ROS is represented by SOD. The SOD activity

is responsible for the degradation of superoxide radicals (O_2^-), to produce O_2 and H_2O_2 . Lee et al. (2002) suggested that enhanced activity of SOD may function in signaling oxidative stress, which leads to the induction of antioxidant enzymes associated with an H_2O_2 scavenging system, particularly an ascorbate-glutathione cycle. In the present study, the decrease in root SOD activity by Al treatments was greater in BRA than in the JB/UFSM accession (Fig. 4E). In spite of that, the shoot SOD activity was higher in BRA than in JB/UFSM accession (Fig. 4F). Moreover, the Al presence affected this enzyme similarly in both accessions, where it either decreased at 50 mg l^{-1} or increased at 150 and 200 mg l^{-1} . Interestingly, at 150 mg l^{-1} of Al, in which shoot APX activity of both accessions decreased (Fig. 4D) SOD activity was enhanced. Corroborating our results, other researches showed an increased SOD activity in the root of soybean (Cakmak and Horst, 1991), *Arabidopsis* (Richards et al., 1998), and sorghum (Peixoto et al., 1999) exposed to Al.

Besides enzymes scavenge ROS, plants have also some non-enzymatic antioxidants represented by non-protein thiol groups (NPSH), ascorbic acid (AsA), and carotenoids. The major pool of non-protein thiol sulphur in most plant species is represented by reduced glutathione. Non-protein thiol groups are known to be affected by the presence of several metals (Xiang and Oliver, 1998). In the present study, there was a slight decrease in root NPSH concentrations of both *P. glomerata* accessions, but at 150 mg l^{-1} of Al it did not alter in JB/UFSM, when compared to the control (Fig. 5A). On the other hand, shoot NPSH concentration increased in the JB/UFSM accession regardless of Al levels, whereas it decreased in BRA accession at 50 , 150 and 200 mg l^{-1} of Al (Fig. 5B).

Ascorbic acid (AsA) is a key antioxidant for elimination of ROS especially H_2O_2 (Noctor and Foyer, 1998). The reaction of AsA with H_2O_2 can occur directly or it can be catalyzed by APX (Chen and Gallie, 2004). Moreover, ROS are assumed to be involved in the oxidation of AsA to dehydroascorbic acid, leading to a reduction in the AsA content of the

plant (Singh et al., 2006). In the present study, root AsA content increased in BRA accession regardless of the Al level, and decreased in JB/UFSM upon addition of Al exceeding 50 mg l^{-1} (Fig. 5C). On the other hand, shoot AsA concentration of both accessions increased when increasing Al levels, but this increase was greater in JB/UFSM than in BRA (Fig. 5D). Therefore, the lower shoot lipid peroxidation in the JB/UFSM accession (Fig. 3D) could be explained by its greater induction of AsA biosynthesis. The decrease in the H_2O_2 concentration at the higher Al levels could be due to the scavenging action of the AsA-APX system. Similar result was also found in *Cucurbita pepo* by Dipierro et al. (2005). Both apoplastic and symplastic AsA are known to play a role in minimizing the stress effects and improving growth (Veljovic-Jovanovic et al., 2001). The elevated levels of AsA and glutathione were also showed to confer tolerance to oxidative stress induced by various environmental stresses (Kocsy et al, 2001; Shalata and Neumann, 2001). These observations demonstrate the importance of ASA and GSH in plant stress alleviation, they generally are consumed directly as scavengers of oxygen radicals.

Carotenoids, in some situations, might act as protectors of chlorophyll against the attack of free radicals. Carotenoids quench excess excitation energy from chlorophyll by direct transfer (Neubauer and Yamamoto, 1992; Demmig-Adams and Adams, 1992). Results of the present study showed no alteration of carotenoids concentration at all Al levels. Therefore, this suggests that a lesser effect of the Al treatments on carotenoids than on the other biochemical parameters analyzed may have occurred.

The results of this study show that the cellular redox status of *P. glomerata* accessions seems to be affected by Al, and oxidative stress may be an important mechanism involved in Al toxicity. Biochemical (lipid peroxidation) and physiological (root growth) alterations were observed in both accessions, but such changes were greater in BRA than in JB/UFSM accession. Therefore, these *P. glomerata* accessions differed in the expression of the amount

and type of antioxidants, suggesting a different capacity of these accessions to deal with oxidative stress, which resulted in varying sensitivity and tolerance to Al. Unlike redox-active metals (Cu and Fe), Al is not able to induce the production of ROS through a Fenton-like reaction. Al causes oxidative stress probably through indirect mechanisms such as interaction with antioxidative defense, disruption of the electron transport chain and induction of lipid peroxidation. Further research on the indirect mechanisms of Al-induced oxidative stress is required to reveal the underlying molecular and biochemical events involved.

Acknowledgements

The authors thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) for the research fellowships.

References

- Aebi, H., 1984. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* 105, 121-126.
- Akeson, M.A., Munns, D.N., Burau, R.G., 1989. Adsorption of Al³⁺ to phosphatidylcholine vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.* 986, 33-40.
- Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 373–399.
- Asada, K., 1999. The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 601–639.
- Barceló, J., Poschenrieder, C., 2002. Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. *Environ. Exp. Bot.*, 48, 75-92.

- Bienert, G.P., Schjoerring, J.K., Jahn, T.P., 2006. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 994-1003.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantity of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Breusegem, F.V., James, E.V., Dat, F., Inze, D., 2001. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Sci.* 161, 423–431.
- Buckner, B., Johal, G.S., Janick-Buckner, D., 2000. Cell death in maize. *Physiol. Plantarum* 108, 231-239.
- Cakmak, I., Horst, W.J., 1991. Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plantarum* 83, 463-468.
- Camargo, O.C.E. de, Oliveira, O.F., 1981. Tolerância de cultivares de trigo a diferentes níveis de alumínio em solução nutritiva e no solo. *Bragantia* 40, 21-23.
- Chang, T.S., Cho, C.S., Park, S., Yu, S., Kang, S.W., Rhee, S.G., 2004. Peroxiredoxin III, a mitochondrion-specific peroxidase, regulates apoptotic signaling by mitochondria. *J. Biol. Chem.* 279, 41975-41984.
- Chen, Z. Gallie, D.R., 2004. The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. *Plant Cell* 16, 1143-1162.
- Collet, L., Leon, C., Kollmeier, M., Schmohl, N., Horst, W.J., 2002. Assessment of aluminum sensitivity of maize cultivars using roots of intact plants and excised root tips. *J. Plant Nutr.* 165, 357-365.
- Custódio, C.C., Bomfim, D.C., Saturnino, S.M., Neto, N.B.M., 2002. Estresse por alumínio e por acidez em cultivares de soja. *Sci. Agricola* 59, 145-153.

- Deleers, M., Servais, J.P., Wülfert, E., 1986. Neurotoxic cations induce membrane rigidification and membrane fusion at micromolar concentrations. *Biochim. Biophys. Acta* 855, 271-276.
- Demmig-Adams, B., Adams III, W.W., 1992. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 599-626.
- De Paris, F., Neves, G., Salgueiro, J.B., Quevedo, J., Izquierdo, I., Rates, S.M., 2000. Psychopharmacological screening of *Pfaffia glomerata* Spreng. (Amaranthaceae) in rodents. *J Ethnopharmacol.* 73, 261-9.
- Dipierro, N., Mondelli, D., Paciolla C., Brunetti, G., Dipierro, S., 2005. Changes in the ascorbate system in the response of pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) roots to aluminium stress. *J. Plant Physiol.* 162, 529-536.
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70-77.
- El-Moshaty, F.I.B., Pike, S.M., Novacky, A.J., Sehgal, O.P., 1993. Lipid peroxidation and superoxide productions in cowpea (*Vigna unguiculata*) leaves infected with tobacco rings virus or southern bean mosaic virus. *Physiol. Mol. Plant Path.* 43, 109-119.
- Foy, C.D., 1976. Differential aluminum and manganese tolerances of plant species and varieties in acid soils. *Ciência & Cultura* 28, 150-155.
- Foy, C.D., 1988. Plant adaptation to acid, aluminium-toxic soils. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.*, 19, 959-987.
- Fryer, M.J., Ball, L., Oxborough, K., Karpinski, S., Mullineaux P.M., Baker, N.R., 2003. Control of ascorbate peroxidase 2 expression by hydrogen peroxide and leaf water status during excess light stress reveals a functional organization of *Arabidopsis* leaves. *Plant J.* 33, 691-705.
- Graham, D., Patterson, B.D., 1982. Responses of plants to low non-freezing temperatures: proteins, metabolism and acclimation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33, 347-372.

- Gratão, P.L., Prasad, M. N.V., Cardoso, P. F., Lead, P.J., Azevedo, R.A.A., 2005. Phytoremediation: green technology for the clean up of toxic metals in the environment. *Brazilian J. Plant Physiol.*, 17, 53-64.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd Edition, Oxford University Press, New York.
- Jacques-Silva, M.C., Nogueira, C.W., Broch, L.C., Flores, E.M.M., Rocha, J.B.T., 2001. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. *Pharmacol. Toxicol.* 88, 119–125.
- Jemo, M., Abaidoo, R.C., Nolte, C., Horst W.J., 2007. Aluminum resistance of cowpea as affected by phosphorus-deficiency stress. *J. Plant Physiol.* 164, 442-451.
- Kochian, L.V., 1995. Cellular mechanisms of aluminium toxicity and resistance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46, 237–60.
- Kochian, L.V., Hoekenga, O.A., Piñeros, M.A., 2004. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Ann. Rev. Plant Biol.* 55, 459-493.
- Kocsy, G., Galiba, G., Brunold, C., 2001. Role of glutathione in adaptation and signaling during chilling cold acclimation in plants. *Physiol. Plantarum* 113,158-164.
- Lee, J.H., Kim, S.R., Bae, C.S., Kim, D., Hong, H., Nah, S., 2002. Protective effect of ginsenosides, active ingredients of *Panax ginseng*, on kainic acid-induced neurotoxicity in rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* 325,129-33.
- Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.*148, 350–82.
- Loreto, F., Velikova, V., 2001. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Plant Physiol.* 127, 1781-1787.

- Luna, C.M., Gonzalez, C. A., Trippi, V.S., 1994. Oxidative damage caused by an excess of copper in oat leaves. *Plant Cell Physiol.* 35, 11–15.
- Ma, J.F., Ryan, P.R., Delhaize, E., 2001. Aluminum tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends in Plant Sci.*, 6, 273-278.
- Matsumoto, H., 2000. Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants, *Int. Rev. Cytol.* 200, 1-46.
- Misra, H.P., Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055.
- Mossor-Pietraszewska, T., Kwit, M., Legiewicz, M., 1997. The influence of aluminum ions on activity changes of some dehydrogenases and aminotransferases in yellow lupine. *Biol. Bull. Poznan* 34, 47-48.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum* 15, 473-497.
- Neubauer, C., Yamamoto, H.Y., 1992. Mehler-peroxidase reaction mediates zeaxanthin formation and zeaxanthin-related fluorescence quenching in intact chloroplasts. *Plant Physiol.* 99, 1354–1361.
- Nicoloso, F.T., Erig, A.C., Martins, C.F., Russowski, D., 2001. Micropropagação do Ginseng Brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. *Rev. Bras. Pl. Med.* 3, 11-18.
- Nishimoto, N., Shiobara, Y., Fujino, M., Inoue, S., Takemoto, T., Oliveira, F. de, Akisue, G., Hashimoto, G., Tanaka, O., Matsuura, H., 1987. Ecdysteroids from *Pfaffia iresinoides* and reassignment of some ¹³CNMR chemical shifts. *Phytochem.* 26, 2505-2507.
- Noctor, G., Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 249-279.

- Oliveira, F., Akisue, G., Akisue, M., 1980. Contribuição para o estudo para o estudo farmacognóstico do Ginseng brasileiro, *Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze. Ann. Farm. Quim. 20, 261-277.
- Panda, S.K., Singha, L.B., Khan, M.H., 2003. Does aluminium phytotoxicity induce oxidative stress in greengram (*Vigna radiata*) Bulg. J. Plant Physiol. 29, 77–86.
- Peixoto, P.H.P., Cambraia, J., Anna, R.S., Mosquim, P.R., Moreira, M.A., 1999. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. Brazilian J. Plant Physiol. 11, 137–145.
- Ponquett, R.T., Smith, M.T., Ross, G., 1992. Lipid autoxidation and seed ageing: putative relationships between seed longevity and lipid stability. Seed Sci. Res. 2, 51-54.
- Queiroz, C.G.S., Alonso, A., Mares-Guia, M.L., Magalhães, A.C., 1998. Chilling-induced changes in membrane fluidity and antioxidant enzyme activities in roots of (*Coffea arabica* L.) seedlings. Biol. Plantarum 41, 403-413.
- Richards, K.D., Schott, E.J., Sharma, Y.K., Davies, K.R., Gardner, R.C., 1998. Aluminum induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 116, 409-418.
- Richter, C., Schweizer, M., 1997. Oxidative stress in mitochondria. In: Scandalios, J.G. (Ed.), Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses, Monograph Series, v.34, 169-200.
- Ryan, P. R., Delhaize, E., 2001. Function and Mechanism of organic anion exudations from plant roots. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 52, 527-560.
- Shalata, A., Neumann, P.M., 2001. Exogenous ascorbic acid (vitamin C) increases resistance to salt stress and reduces lipid peroxidation. J. Exp. Bot. 52, 2207–2211.
- Shiobara, Y. Inoue, S.S., Kato, K., Nishiguchi, Y., Nishimoto, N., Oliveira, F. de., Akisue, G., Akisue, M.K., Hashimoto, G., 1993. Pfaffane-type nortriterpenoids from *Pfaffia pulverulenta*. Part.2. Phytochem., 33, 897-899.

- Silva, J.R., Smyth, T.J., Moxley, D.F., Carter, T.E., Allen, N.S., Rufty, T.W., 2000. Aluminum accumulation at nuclei of cells in the root tip. Fluorescence detection using lumogallion and confocal laser scanning microscopy. *Plant Physiol.* 123, 543-552.
- Singh, S., Eapen, S., D'Souza, S.F., 2006. Cadmium accumulation and its influence on lipid peroxidation and antioxidative system in an aquatic plant, *Bacopa monnieri* L. *Chemosphere* 62, 233-246.
- Schützendübel, A., Polle, A., 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J. Exp.Bot.* 53, 1351-1365.
- Taylor, G.J., McDonald-Stephens, J.L., Hunter, D.B., Bertsch, P.M., Elmore, D., Rengel, Z., Reid, R.J., 2000. Direct measurement of aluminum uptake and distribution in single cells of *Chara corallina*. *Plant Physiol.* 123, 987-996.
- Tennant, D., 1975. A test of a modified line intersect method of estimating root length. *J. Ecol.* 63, 995-1001.
- Veljovic-Jovanovic S.D., Pignocchi, C., Noctor, G., Foyer, C.H., 2001. Low ascorbic acid in the *vtc-1* mutant of *Arabidopsis* is associated with decreased growth and intracellular redistribution of the antioxidant system. *Plant Physiol.* 127, 426-435.
- Von Uexküll, R.A., Mutert, E. 1995. Global extent, development and economic impact of acid soils. In: Date, R.A., Grundon, N.J., Rayment, G.E., Probert, M.E., eds. *Plant-Soil interactions at low pH: principles and management*. Dordrecht, Kluwer Academic Publication, p.5-19.
- Wright, R.J., 1989. Soil aluminium toxicity and plant growth. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.*, 20, 1479-1497.
- Xiang, C., Oliver, D.J., 1998. Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10, 1539-1550.

- Yamamoto, Y., Kobayashi, Y., Matsumoto, H., 2001. Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. *Plant Physiol.* 125, 199–208.
- Zhang, G., Hoddinott, J., Taylor, G.J., 1994. Characterization of 1,3-beta-D-glucan (callose) synthesis in roots of *Triticum aestivum* in response to aluminum toxicity. *J. Plant Physiol.* 144, 229-234.
- Zhu, Z., Wei, G., Li, J., Qian, Q., Yu, J., 2004. Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Sci.* 167, 527–533.

4. DISCUSSÃO

Em ambas as condições de cultivo testadas, sistema *in vitro* e em hidroponia, verificou-se o efeito negativo de altas concentrações de Al no crescimento de plântulas dos dois acessos (JB/UFSM e BRA) de *Pfaffia glomerata*. De modo geral, a altura de brotações, o número de segmentos nodais, o número de folhas, o número e o comprimento de raízes, a biomassa fresca de raízes e parte aérea e a biomassa seca da parte aérea, foram reduzidas pelas altas concentrações de Al. Essa redução, em sistema de cultivo hidropônico, ocorreu já nas menores concentrações de Al, enquanto no cultivo *in vitro*, a concentração de 50 mg L⁻¹ aumentou o crescimento das plântulas; esse estímulo também ocorreu para algumas variáveis de crescimento na concentração de 100 mg L⁻¹ para o acesso JB/UFSM. A ocorrência de incremento no crescimento das plântulas pelo Al na condição de cultivo *in vitro* e não em sistema hidropônico pode ser atribuído ao fato de o Al estar menos disponível em meio geleificado, podendo seus efeitos ser compatíveis aos observados em concentrações menores desse íon (FAGERIA & ZIMMERMANN, 1979; FAGERIA et al., 1989).

Embora o Al não seja considerado um elemento essencial, e ainda se desconheçam os mecanismos pelos quais, em baixas concentrações, ele possa, algumas vezes, induzir aumento no crescimento ou produzir outros efeitos desejáveis, Foy (1974) e Marschner (1995) lançaram algumas possibilidades para justificar o fato, por exemplo, pelo aumento na disponibilidade do ferro em solos calcários (através da hidrólise do Al e da diminuição do pH); correção ou prevenção de deficiência de ferro, pela liberação do ferro adsorvido em sítios metabolicamente inativos dentro da planta; foi também proposto que o Al pode bloquear sítios, na parede celular, carregados negativamente, promovendo a absorção de fósforo; ou pode agir no retardamento da deterioração das raízes em baixas concentrações de cálcio pelo crescimento mais lento; ainda sugerem sua ação na correção ou prevenção do efeito de concentrações excessivas de fósforo, de cobre e manganês. A possibilidade de proporcionar maior equilíbrio de nutrientes no meio de crescimento é uma hipótese defendida por Fageria & Zimmermann (1979). Segundo Calabrese & Baldwin (2000) este evento é denominado hormese, a qual representa uma supercompensação do crescimento em resposta a um desequilíbrio na homeostase dos tecidos.

O fato de o acesso JB/UFSM de *P. glomerata* ter apresentado aumento em alguns parâmetros de crescimento, especialmente de biomassa, na concentração de 100 mg L⁻¹,

sugere que esse acesso pode apresentar mecanismos mais eficientes de tolerância à toxidez de Al do que o acesso BRA.

No experimento realizado em cultivo hidropônico os teores de Al tanto nas raízes como na parte aérea de ambos os acessos de *P. glomerata* aumentaram progressivamente de acordo com o incremento de sua concentração na solução nutritiva. Também foi verificado que grande parte do Al absorvido ficou retido nas raízes. O acesso BRA apresentou maior concentração de Al nas raízes do que o acesso JB/UFSM. Apesar disso, a biomassa seca das raízes foi reduzida na presença de 100 e 150 mg L⁻¹ de Al apenas no acesso JB/UFSM. No entanto, a redução no comprimento do sistema radicular de plantas cultivadas no sistema hidropônico bem como a redução no número de raízes de plântulas cultivada *in vitro* pode estar relacionada a maior acumulação do Al nas raízes. Desta forma, concluiu-se que a alongação do sistema radicular foi mais afetada pelo Al do que a biomassa. Muitos estudos têm mostrado que a inibição do crescimento da raiz é o principal sintoma visível inicial da toxidez do Al, o que resulta na redução e em danos do desenvolvimento radicular, podendo conduzir à deficiência mineral e estresse hídrico (DEGENHARDT et al., 1998).

A redução do crescimento da parte aérea pela toxidez de Al ocorre num momento posterior (RYAN et al., 1993; JONES & KOCHIAN, 1995) e parece ser uma consequência dos danos que ocorrem na raiz (MATSUMOTO et al., 1976). Semelhantemente à inibição de crescimento do sistema radicular, o Al também provocou redução no crescimento e biomassa da parte aérea nos dois acessos de *P. glomerata* em ambos os sistemas de cultivo.

Nas plantas de *P. glomerata* cultivadas em hidroponia também foi demonstrado que a toxidez do Al aumentou o estresse oxidativo. O Al aumentou a peroxidação lipídica (verificado pelo aumento dos níveis de MDA) na parte aérea e raízes de ambos os acessos, o que indica dano oxidativo aos lipídeos de membranas. A peroxidação lipídica pode indicar um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), como por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o qual aumentou na parte aérea de ambos os acessos, sendo que no acesso JB/UFSM houve aumento na presença de qualquer dose de Al, enquanto no acesso BRA houve aumento apenas na presença 50 e 100 mg L⁻¹ de Al. Já nas raízes do acesso JB/UFSM a concentração de H₂O₂ diminuiu pela presença de Al, enquanto nas raízes do acesso BRA ocorreu aumento significativo em 150 mg L⁻¹. O aumento na concentração de H₂O₂, normalmente induz a atividade de algumas enzimas antioxidantes, tais como catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e superóxido dismutase (SOD). Uma maior atividade da CAT foi observada nas raízes, indicando que o estresse oxidativo foi maior nesse órgão do que na parte aérea. O decréscimo na atividade da CAT, verificado principalmente no acesso

BRA, pode indicar que esse acesso possui um sistema antioxidante menos efetivo na destoxificação do Al. A atividade da APX foi estimulada em quase todas as concentrações de Al, e sua atividade foi maior no acesso BRA do que no JB/UFSM, o que acompanha as respostas da peroxidação lipídica. Além disso, a atividade da SOD nas raízes foi aumentada em 100 e 150 mg L⁻¹ nos acessos BRA e JB/UFSM, respectivamente, enquanto na parte aérea essa atividade aumentou nas maiores doses de Al em ambos os acessos. Uma constatação interessante foi que na concentração de 150 mg L⁻¹ a redução da atividade da APX na parte aérea em ambos os acessos, parece ter sido compensada pelo aumento na atividade da SOD. Por outro lado, a atividade da CAT parece ter sido inibida pelo excesso de H₂O₂, exceto nas concentrações de 50 e 200 mg L⁻¹ de Al nas raízes do JB/UFSM.

Em relação aos antioxidantes não enzimáticos, verificou-se que a concentração de tióis não protéicos (NPSH) foi reduzida pela presença de Al nas raízes de ambos os acessos de *P. glomerata*, exceto em 150 mg L⁻¹ de Al no acesso JB/UFSM. Por outro lado, na parte aérea a concentração de NPSH foi aumentada com a exposição ao Al no acesso JB/UFSM e nas concentrações de 50, 150 e 200 mg L⁻¹ de Al foi reduzida no acesso BRA. Quanto à concentração de ácido ascórbico (AsA), houve aumento na parte aérea de ambos os acessos na presença de Al, porém esse aumento foi maior em JB/UFSM do que em BRA, o que pode indicar a atuação do AsA na diminuição dos efeitos das ERO sobre a peroxidação lipídica, a qual foi menor nesse acesso. Nas raízes, a concentração de AsA aumentou no acesso BRA, mas foi reduzido em JB/UFSM. Já o conteúdo de carotenóides não foi influenciado pelas concentrações de Al.

De um modo geral, os dados do presente trabalho mostram que as altas concentrações de Al no substrato de cultivo provocam inibição do crescimento radicular e da parte aérea de ambos os acessos de *P. glomerata*, além de induzirem estresse oxidativo. Apesar disso, os dados sugerem que o acesso JB/UFSM possui um sistema antioxidante mais efetivo na remoção das espécies reativas de oxigênio do que o acesso BRA.

5. CONCLUSÕES

Concentrações elevadas de Al reduziram o crescimento radicular e da parte aérea de ambos os acessos de *P. glomerata* em sistema de cultivo *in vitro*, embora em baixas concentrações tenha havido um estímulo no crescimento. Esse estímulo, para o acesso JB/UFSM ocorreu em concentrações mais elevadas (100 mg L^{-1}) do que no BRA (50 mg L^{-1}), indicando uma suposta maior tolerância daquele em relação a este. Já as plântulas de *P. tuberosa* não tiveram seu crescimento influenciado pelas concentrações de Al nas condições de cultivo *in vitro*.

No cultivo em sistema hidropônico, o crescimento das plântulas de *P. glomerata* de ambos os acessos foi reduzido já nas concentrações mais baixas de Al. Além disso, o Al aumentou a peroxidação lipídica e o conteúdo de H_2O_2 . Isto sugere que o Al induziu danos às membranas celulares em plântulas de *Pfaffia glomerata*.

Também foram verificadas alterações nas respostas enzimáticas e não-enzimáticas do sistema antioxidante, sendo que a atividade da catalase foi inibida pela maioria das concentrações de Al e aumentada apenas em 50 e 200 mg L^{-1} nas raízes do acesso JB/UFSM. Já a atividade da ascorbate peroxidase foi estimulada em quase todas as concentrações de Al, e a superóxido dismutase teve uma maior atividade nas maiores concentrações de Al na parte aérea de ambos os acessos de *P. glomerata*, indicando o acionamento dessas enzimas para a remoção da produção excessiva das espécies reativas de oxigênio. Por outro lado, no sistema antioxidante não-enzimático, houve um aumento na concentração de ácido ascórbico nas raízes do acesso BRA e na parte aérea dos dois acessos, enquanto nas raízes do acesso JB/UFSM houve redução. Para a concentração de tióis não protéicos nas raízes de ambos os acessos houve redução pela presença de Al, enquanto na parte aérea, verificou-se aumento com a exposição ao Al no acesso JB/UFSM e na concentração de 150 mg L^{-1} no acesso BRA; porém, ocorreu redução nas demais concentrações de Al para o acesso BRA. Estas alterações sugerem que o acesso JB/UFSM é mais tolerante à toxidez de Al do que o acesso BRA.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS – Introdução e Discussão geral

ACKEL, C.R.; DANUCALOV, M.A.D.; NOUAILHETAS, V.L. Effect of *Pfaffia glomerata* on the ventilatory responses to exercise in humans aged between 50-75 years-old. **Medicine and Science in Sport and Exercise**, v.31, n.5, p.386-386, 1999.

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

ALSCHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.1331-1341, 2002.

ARENAS, P.; AZORERO, M. R. Plant used as means of abortion, contraception, sterilization and fecundation by Paraguayan indigenous people. **Economic Botany**, v.31, p.302-306, 1977.

ARORA, A; SAIRAM, R.K.; SRIVASTAVA, G.C. Oxidative stress and antioxidative system in plants. **Current Science**, vol.82, n.10, 2002.

ASADA, K.; TAKAHASHI, M. Production and scavenging of active oxygen species in photosynthesis. In D Kyle, C Osmond, C Arntzen, eds, *Photoinhibition*. **Elsevier Science Publishers**, p.227-287, 1987.

BAKER, A.J.M.; McGRATH, S.P.; REEVES, R.D; SMITH, J.A.C. Metal hyperaccumulator plants: A review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils; in **Phytoremediation of Contaminated Soil and Water** (Terry, N. & Banuelos, G., eds.) p.85-107, 2000.

BARTOSZ, G. Glutathione as antioxidant and electrophile scavenger. **Pollution Journal Environmental Study**, v.5, p.87-88, 1996.

BERSCH, P.M.; PARKER, D.R. Aqueous polynuclear aluminium species. I: Sposito, G. (ed.), *The environmental chemistry of aluminium* (2. utg.), **Lewis Publishers**, v.4, p.117-168, 1996.

BERTSCH, P.M.; PARKER, D.R. Aqueous polynuclear aluminum species. In: SPOSITO, G. (Ed.). **The environmental chemistry of aluminum**. Boca Raton: Lewis, p.117-168, 1995.

BLAMEY, F.P.C.; EDWARDS, D.G.; ASHER, C.J. Effects of aluminum, OH:Al and P:Al molar ratios, and ionic strength on soybean root elongation in solution culture. **Soil Science**, v.136, p.197-207, 1983.

BLOOM, P.R.; ERICH, M.S. The quantitation of aqueous aluminum. In: Sposito G., editor. **The Environmental Chemistry of Aluminum**. Ed 2. Boca Raton, FL: CRC Press; p.1-38, 1996.

BOWLER, C.; VAN CAMP, W.; VAN MONTAGU, M.; INZE, D. Superoxide dismutase in plants. **Critical Reviews in Plant Science**, v.13, p.199-218, 1994.

CAKMAK, I.; HORST, W.J. Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, v.83, p.463-468, 1991.

CALABRESE, E.J., BALDWIN, L.A. History of chemical hormesis. **Human and Experimental Toxicology**, v.19, p.2-31, 2000.

CAMBRAIA, J.; CAMBRAIA, M.C. Avaliação de híbridos de milho quanto à tolerância ao alumínio, em solução nutritiva. **Revista Ceres**, v.42, p.297-307, 1995.

CAMARGO, O.C.E. DE; OLIVEIRA, O.F. Tolerância de cultivares de trigo a diferentes níveis de alumínio em solução nutritiva e no solo. **Bragantia**, v.40, n.2, p.21-23, 1981.

CANAL, I.N.; MIELNICZUK, J. Parâmetros de absorção de potássio em milho (*Zea mays L.*), afetados pela interação alumínio – cálcio. **Ciência e Cultura**, v.35, n.3, p.336-340, 1983.

CARNEIRO, M.A.C.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M. Comportamento de espécies herbáceas em misturas de solo com diferentes graus de contaminação com metais pesados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, 1629-1638, 2002.

CHEN, J., GOLDSBROUGH, P.B. Increased activity of γ -glutamyl cysteine synthetase in tomato cells selected for cadmium tolerance. **Plant Physiology**, v.106, p.233-239, 1994.

CLARKSON, D.T. Effect of aluminum on the uptake and metabolism of phosphorus by barley seedlings. **Plant Physiology**, v.41, p.65-172, 1966.

DANIEL, J.F. DE S.; ALVES, K.Z.; SILVA JACQUES, D.; DA SILVA E SOUZA, P.V.; DE CARVALHO, M.G.; FREIRE, R.B.; FERREIRA, D.T.; FREIRE, M.F.I. Free radical scavenging activity of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). **Indian Journal of Pharmacology**, v.37, p.174-178, 2005.

DAVIES, K.J.A.; QUINTANILHA, A.T.; BROOKS, G.A.; PACKER, L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.107, p.1198-205, 1982.

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.

DORNELLES, C.A.L. O uso da cultura de tecidos na geração de variabilidade para tolerância à toxicidade do alumínio e sensibilidade ao ácido giberélico em trigo (*Triticum aestivum L.*). Porto Alegre, 1994. 102 p. Tese (Doutorado em Agronomia – Fitotecnia) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1994.

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

EMMANUEL, D.; PETER, R.R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiology**, v.107, p.315-321, 1995.

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

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**, v.24, n.6, p.677-682, 1989.

FERREIRA, S.H. Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil. São Paulo: Academia Brasileira de Ciências, 1998. 141 p. Disponível em: <<http://www.abc.org.br/arquivos/medicamentos.pdf>>. Acesso em: 25 jul. 2006.

FIGUEIREDO, L.S.; TEIXEIRA, S.L.; FREITAS, S.P.; VIEIRA, I.J.C.; MARTINS, E.R. Comportamento de 23 acessos de *Pfaffia glomerata* nas condições de campos de Goytacazes-RJ. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.7, n.1, p.67-72, 2004.

FLORES, R.; NICOLOSO, F.T.; MALDANER, J. Propagação clonal rápida de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken utilizando thidiazuron. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, v.9, n.1, p.1-7, 2007.

FLORES, R.; MALDANER, J.; NICOLOSO, F.T. Otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Ciência Rural**, v.36, n.3, p.845-851, 2006.

FLORES, R.; NICOLOSO, F.T.; VASCONCELOS, N.J.S. Indução de calos e aspectos morfogênicos de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.3, p.89-95, 2006.

FOY, C.D.; CHANEY, R.L.; WHITE, M.C. The physiology of metal toxicity in plants, **Annual Reviews in Plant Physiology**, v.29, p.511-556, 1978.

FOY, C.D., FLEMING, A.L. **Crop tolerance to sub-optimal land conditions**. Madison: ASA Meet., Houston, The physiology of plant tolerance to excess available aluminum and manganese in acid soils: p.301-328, 1976.

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

FOYER, C.H.; LELANDAIS, M.; KUNERT, K.J. Photooxidative stress in plants. **Physiologia Plantarum**, v.92, p.696-717, 1994.

FREITAS, C.S.; PAULA, M.F. R. de, RIECK, L., MARQUES, M. C. A. Actions of crude hydroalcoholic extract of *Pfaffia* sp. on gastrointestinal tract. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.46, n.3, 2003.

FRIDOVICH, I; HANDLER, P. Detection of free radicals generated during enzymic oxidations by the initiation of sulfite oxidation. **Journal of Biological Chemistry**, v.236, p.1836-1840, 1961.

FURLANI, A.M.C.; BATAGLIA, O.C. ; FURLANI, P.R. ; AZZINI, L.E. ; CAMARGO, O.B.A. Avaliação de genótipos de arroz quanto à eficiência na utilização de fósforo em solução nutritiva e em solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.7, p.291-303, 1983.

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, p.73-87, 1989.

FURLANI, P.R.; CLARK, R.B. Screening sorghum for aluminium tolerance in nutrient solution. **Agronomy Journal**, Madison, v.73, n.4, p.587-594, 1981.

GAHAN, P.B. **Plant histochemistry and cytochemistry: an introduction**. London: Academic, 301 p., 1984.

GRANT, C.M.; MACIVER, F.H.; DAWES, I.W. Glutathione synthetase is dispensable for growth under both normal and oxidative stress conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* due to an accumulation of the dipeptide gammaglutamylcysteine. **Molecular Biology of the Cell**, v.8, p.1699-1707, 1997.

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**, p.67-69, 1969.

HALL, J.L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.1-11, 2002.

HALLIWELL, B. **Oxidants and human disease: some new concepts**. FASEB J., 1 ed., p.358-364, 1987.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C **Free radicals in biology and medicine**. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press, 1989.

HALLIWELL, B; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **American Journal of Clinical Nutrition**, 57 (Suppl.): S715-S725S, 1993.

HORST, Z.J. et al. Short-term responses of soybean roots to aluminum. In: WRIGHT, R.J., BALIGAR, V.C., MURRAMANN, R.P. (eds.) **Plant-soil interactions at low pH**. Dordrecht: The Netherlands: Kluwer, p.733-739, 1991.

HORST, W.J. The role of the apoplast in aluminium toxicity and resistance of higher plants: a review. **Z Pflanzenernähr Bodenkd**, v.158, p.419-428, 1995.

HUE, N.V.; AMIEN, I. Aluminum detoxification with green manures. **Communication Soil Science Plant Analysis**, v.20, p.1499-1511, 1989.

HUE, N.V.; LICUDINE, D.L. Amelioration of subsoil acidity through surface application of organic manures. **Journal of Environmental Quality**, v.28, p.623-632, 1999.

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

KENNEDY, I.R. Acid soil and acid rain: The impact on the environment of nitrogen and sulphur cycling. **John Wiley & Sons**, p. 234, 1986.

KINRAIDE, T.B. Identify of the rhizotoxic aluminum species. In: WRIGTH, R.J. et al. (Ed.) **Plant-soil interactions at low pH**, p.717-728, 1991.

KNOX, J.P.; DODGE, A.D. The photodynamic action of eosin, a singlet oxygen generator. 2. The inhibition of photosynthetic electron transport. **Planta**, v.164, p.30-34, 1985.

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

KOVIDEVA, J.; ROY, S.; VRANJIC, J.A., HAUKIOJA, E.; HUGHES, P.R.; HANMINEN, O. Antioxidant responses to stimulated acid rain and heavy metal deposition in birch seedlings. **Environmental Pollution**, v.95, p.249-258, 1997.

LAMB, C.; DIXON, R.A. The oxidative burst in plant disease resistance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.48, p.251-275, 1997.

LAZOF, D.B.; GOLDSMITH, J.G.; RUFTY, T.W.; LINTON, R.W. Rapid uptake of aluminum into cells of intact soybean root tips. A microanalytical study using secondary ion mass spectroscopy. **Plant Physiology**, v.106, n.3, p.1107-1114, 1994.

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

MA, J.F.; RYAN, P.R.; DELHAIZE, E. Aluminum tolerance in plants and the complexing role of organic acids. **Trends in Plant Science**, v.6, p.273-279, 2001.

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

MACHADO, P.L.O.A. Considerações Gerais sobre a Toxicidade do Alumínio nas Plantas. **EMBRAPA**, Rio de Janeiro, 1-22, 1997.

MAGALHÃES, P.M. de. **Agrotecnologia para el cultivo de fáfia o ginseng brasileiro**. In: MARTINEZ, J.V. et al. Fundamentos de agrotecnología de cultivo de plantas medicinales iberoamericanas. Santafé de Bogotá: Convênio Andrés Bello/CYTED, p.323-332, 2000.

MALDANER, J.; NICOLOSO, F.T.; SANTOS, E.S.; FAGUNDES, C.K.; FLORES, R.; JUCOSKI, G.O. ; SKREBSKY, E.C. Crescimento de plântulas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen cultivadas *in vitro* sob dois níveis de nitrogênio e sacarose, durante seis subculturas sucessivas e aclimatização. **Ciência Rural**, v.37, p.133-140, 2007.

MALDANER, J.; NICOLOSO, F.T.; SANTOS, E.S.; FLORES, R.; SKREBSKY, E.C. Sacarose e nitrogênio na multiplicação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Ciência Rural**, v.36, n.4, p.1201-1206, 2006.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. Academic Press, San Diego, 1995.

MARQUES, L.C.; GALVÃO, S.M.P.; OLIVEIRA, M.G.M.; CARLINI, E.A. Estudo farmacológico pré-clínico de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen – In.: AMARANTHACEAE. XV SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PLANTAS MEDICINAIS. **Anais...** Águas de Lindóia-SP. 01, p.104, 1998.

MARQUES, L.C.; GALVÃO, S.M.P.; ESPÍNOLA, E.; DIAS, R.F.; MATTEI, R.; OLIVEIRA, M.G.M.; CARLINI, E.L. de A. Psychopharmacological assesment of *Pfaffia glomerata* roots (extract BNT-08) in rodents. **Phytotherapy Research**, v.18, n.7, p.566-572, 2004.

MARTINS, C.F; NICOLOSO, F.T. Micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.6, n.3, p.53-61, 2004

MATSUMOTO, H.; HIRASAWA, E.; MORIMURA, S.; TAKAHASHI, E. Localization of aluminum in tea leaves. **Plant Cell Physiology**, v.17, n.3, p.627-631, 1976.

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

MICHIHIRO, K.; YASUHIRO, T.; TOSHIHARU, H., SHIGEYUKI, A; MASAO, I.; MASASHI, K. Enhancing effect of brazilian *Pfaffia glomerata* on reproductive ability of male golden hamsters and of male mice. **Natural Medicines**, v.52, n.1, p.68-73, 1998.

MIQUEL, J. Historical introduction to free radical and antioxidant biomedical research. In: MIQUEL, J., QUINTANILHA, A.T., WEBER, H. (Eds.), **CRC Hand Book of Free Radicals and Oxidants in Biomedicine**. CRC Press, p.3-11, 1989.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v.7, 405-410, 2002.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; VAN BREUSEGEM, F. The reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science** v.9, p.490-498, 2004.

MIYASAWA, M.; CHIERICE, G.O.; PAVAN, M.A. Amenização da toxicidade de alumínio à raízes do trigo pela complexação com ácidos orgânicos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.16, p.209-215, 1992.

MONTANARI, J.I.; MAGALHÃES, P.M.; QUEIROGA, C.L. Influence of plantation density and cultivation cycle in root productivity and tenors of beta ecdisone in *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Acta Horticulturae**, v.3, n.502, p.125-129, 1999.

MORIMURA, S.; MATSUMOTO, H. Effect of aluminium on some properties and template activity of purified pea DNA, **Plant and Soil**, v.171, p.151-157, 1978.

MORITA, O.; GOTO, M.; EHARA, H. Growth and dry matter production of pasture plants grown under reduced light conditions of summer season. **Bulletin of the Faculty of Bioresources**, v.12, n.1, p.11-20, 1994.

NAKAI, S.; TAKAGI, N.; HAYASHI, S.; TAKEMOTO, T.H. Pfaffosides, nortriterpenoid saponins, from *Pfaffia paniculata*. **Phytochemistry**, v.23, n. 8, p.1703-1705, 1984.

NETO, A.G.; COSTA, J.M.L.C.; BELATI, C. Analgesic and anti-inflammatory activity of a crude root extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Journal of Ethnopharmacology**, v.96, p.87-91, 2005.

NETO, A.G.; da SILVA FILHO, A.A.; COSTA, J.M.L.C.; VINHOLIS, A.H.C.; SOUZA, G.H.B.; CUNHA, W.R.; SILVA, M.L.A.E.; ALBUQUERQUE, S.; BASTOS, J.K. Evaluation of the trypanocidal and leishmanicidal *in vitro* activity of the crude hydroalcoholic extract of *Pfaffia glomerata* (Amaranthaceae) roots. **Phytomedicine**, v.11, p.662-665, 2004.

NICOLOSO, F.T.; ERIG, A.C; RUSSOWSKI, D.; MARTINS, C.F. Efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, n.1, p.84-90, 2003.

NICOLOSO, F.T.; ERIG, A.C; MARTINS, C.F.; RUSSOWSKI, D. Micropropagação do Ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Petersen), **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.3, n.2, p.11-18, 2001.

NICOLOSO, F.T.; FORTUNATO, R.P.; FOGAÇA, M.A. Influência da posição da estaca no ramo sobre o enraizamento de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen em dois substratos. **Ciência Rural**, v.29, n.2, p.277-283, 1999.

NINAGI, O.; MARUYAMA, M. Utilization of 20-hydroxyecdysone extracted from a plant in sericulture. **Japan Agricultural Research Quarterly**, v.30, p.123-128, 1996.

NISHIMOTO, N.; SHIOBARA, Y.; FUJINO, M.; INOUE, S.; TAKEMOTO, T.; OLIVEIRA, F. DE; AKISUE, G.; HASHIMOTO, G.; TANAKA, O.; MATSUURA, H. Ecdysteroids from *Pfaffia iresinoides* and reassignment of some ¹³CNMR chemical shifts. **Phytochemistry**, v.26, n.9, p.2505-2507, 1987.

NISHIMOTO, N.; NAKAI, S.; TAKAGI, N.; HAYASHI, S.; TAKEMOTO, T. Pfaffosides and Nortriterpenoid Saponins from *Pfaffia paniculata*. **Phytochemistry**, v.23, p.139-142, 1984.

NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.49, p.249-79, 1998.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K. Contribuição para o estudo farmacognóstico do Ginseng brasileiro, *Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze. **Anais de Farmácia e Química**, v.20, p.261-277, 1980.

OLMOS, E. Induction of several antioxidant enzymes in the selection of a salt tolerant cell line of *Pisum sativum*. **Journal of Plant Physiology**, v.114, p. 594–598, 1994.

PAVAN, M.A. Alumínio em solos ácidos do Paraná: relação entre o alumínio não trocável, trocável e solúvel, com o pH, CTC, porcentagem de saturação de Al e matéria orgânica. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.7, n.1, p.39-46, 1983.

PAVARINO, M.A. **Viabilidade de mini-estaqueia de raízes em cinco espécies de uso medicinal**. Brasília: Universidade de Brasília, 12 p., 1995.

POLAK, T.B.; MILACIC, R.; PIHLAR, B.; MITROVIC, B. The uptake and speciation of various Al species in the *Brassica rapa pekinensis*. **Phytochemistry**, v.57, p.189-198, 2001.

POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do Pantanal**. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. 320p.

PRIOLI, S.M.A.P.; SILVA, J.C.; GALVÃO, J.D. Seleção da tolerância à toxidez de alumínio em milho (*Zea mays* L.). **Revista Ceres**, v.32, p.441-451, 1985.

RANIERI, A. Gluthatione-ascorbic acid cycle in pumpkin plants grown under polluted air in open-top chambers. **Journal of Plant Physiology**, v.142, p.286-290, 1993.

RAO, I. M.; ZEIGLER, R.S.; VERA, R.; SARKARUNG, S. Selection and breeding for acid-soil tolerance in crop. **BioScience**, v.43, n.7, p.454-465, 1993.

RASKIN, I.; RASKIN, I.; KUMAR, P.N.; DUSHENKOV, S.; SALT, D.E. Bioconcentration of heavy metals by plants. **Current Opinion Biotechnology**, v.5, p.285-290, 1994.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biology of Plants**, 5^a. ed. Worth Publishers, New York, 1992.

RESENDE, M.L.V.; SALGADO, S.M.L.; CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira** v.28, p.123-130, 2003.

ROSEN, B.P. Biochemistry of arsenic detoxification. FEBS: **Federation of European Biochemical Societies**, Letters, v.529, p.86-92, 2002.

RUSSOWSKI, D.; NICOLOSO, F.T. Nitrogênio e fósforo no crescimento de plantas de Ginseng Brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência Rural**, v.33, n.1, p.57-63, 2003.

RYAN, P.R.; DITOMASE, J.M.; KOCHIAN, L.V. Aluminium toxicity in roots: an investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. **Journal of Experimental Botany**, v.44, p.437-446, 1993.

RYYPPO, A.S.; IIVONEN, S.; RIKALA, R.; SUTINEN, M.L.; VAPAAVUORI, E. Responses of Scots pine seedlings to low root zone temperature in spring. **Physiologia Plantarum**, v.102, n.4, p.503-512, 1998.

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**, v.24, n.4, p.787-796, 2000.

SANCHES, N.R.; GALLETTO, R.; OLIVEIRA, C.E.; BAZOTTE, R.B.; CORTEZ, D.A.G. Avaliação da atividade anti-hiperglicemiante da *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). **Acta Scientiarum**, v.23, n.2, p.613-617, 2001.

SCANDALIOS, J.G. The rise of ROS. **Trends Biochem Science**, v.27, p.483-486, 2002.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, v.101, p.7-12, 1993.

SCOTT, M.D.; VAN DEN BERG J.J.M.; REPKA, T. Effect of excess α -hemoglobin chains on cellular and membrane oxidation in model β -thalassemic erythrocyte. **Clinical Investigation**, v.91, p.1706-1712. 1993.

SHALATA, A.; TAL, M. The effects of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the leaf of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*. **Physiologia Plantarum**, v.104, p.169-174, 1998.

SCHNEIDER, S.; BERGMANN, L. Regulation of glutathione synthesis in suspension cultures parsley and tobacco. **Botanica Acta**, v.108, p.34-40, 1995.

SHIOBARA, Y.; INOUE, S.; KATO, K. A nortriterpenoid, triterpenoid and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. **Phytochemistry**, v.32, n.6, p.1527-1530, 1993.

SINHA, S.; GUPTA, M.; CHANDRA, P. Biocummulation and biochemical effects on mercury in the plant *Bacopa monnieri* (L.). **Journal of Environmental Toxicology and Water Quality**, v.11, p.105-112, 1996.

SINHA, S.; SAXENA, R.; SINGH, S. Chromium induced lipid peroxidation the plants of *Pistia stratiotes* L.: role of antioxidants and antioxidant enzymes. **Chemosphere**, v.58, p.595-604, 2005.

SIQUEIRA, J.C. de. Considerações taxonômicas sobre as espécies brasileiras do gênero *Pfaffia* Mart. (Amaranthaceae). **Acta Biologica Leopoldensia**, v.10, p.269-278, 1988.

SIVAGRURU, M.; HORST, W.J. The distal part of the transitional zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize. **Plant Physiology**, v.163, p.155-163, 1998.

SKREBSKY, E.C.; NICOLOSO, F.T.; MALDANER, J. Substratos na aclimatização de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen produzida in vitro sob diferentes doses de sacarose. **Ciência Rural**, v.36, n.5, p.1416-1423, 2006.

SKREBSKY, E.C.; NICOLOSO, F.T.; FERRÃO, G.E. Sacarose e período de cultivo in vitro na aclimatização ex vitro de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen). **Ciência Rural**, v.34, n.5, p.1471-1477, 2004.

SMIRNOFF, N. Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection. **Philosophical Transactions: Biological Sciences**, v.355, p.1455-1464, 2000.

SMITH, L.B.; DOWNS, R.J. **Flora ilustrada catarinense - Amarantáceas**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, p.110, 1972.

- TANIGUCHI, S.; BERSANI-AMADO, C.A.; SUDO, L.S.; ASSEF, S.M.C. Effect of *Pfaffia irsinoides* on the experimental inflammatory process in rats. **Phytoterapy Research**, v.11, n.8, p.568-571, 1998.
- TASCHETTO, O.M.; PAGLIARINI, M.S. Caracterização citogenética de populações de *Pfaffia glomerata* (Amaranthaceae). In.: III SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA A AMERICA LATINA E CARIBE. **Anais...** p.442-443, 2001.
- TAYLOR, G. J. Aluminum toxicity and tolerance in plants. In: Adriano, D.C.; Johnson, A.H. (Eds.), **Acidic Precipitation**, Springer, v.2., p.327-361, 1989.
- VASCONCELOS, J.M.O. Estudo taxonômico sobre Amaranthaceae no RS, Brasil. Porto Alegre. Dissertação de Mestrado. (Curso de Pós-Graduação em Botânica), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1982.
- VIDAL, M.R.R. Flórula de Viçosa. I. Chenopodiaceae e Amaranthaceae. **Revista Ceres**, v. 4, p.46-79, 1967.
- VIGO, C.L.S; NARITA, E.; MARQUES, L.C. Validação da metodologia de quantificação espectrofotométrica das saponinas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen - Amaranthaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, n.2, p.46-49, 2003.
- WATANABE, T.; WATANABE, M.; WATANABE, Y.; HOTTA, C. Effects of oral administration of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) on incidence of spontaneous leukemia in AKR/J mice. **Cancer Detection and Prevention**, v.24, p.173-178, 2000.
- WRIGHT, R.J. Soil aluminum toxicity and plant growth. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.20, p.1479-1497, 1989.
- YAMAMOTO, Y.; HOBAYASHI, Y.; DEVI, S.R.; RIKIISHI, S. 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.
- YAMAMOTO, Y.; HOBAYASHI, Y.; MATSUMOTO, H. Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea poots. **Plant Physiology**, v.125, p.199-208, 2001.
- ZIMMER, A.R.; BRUXEL, F.; BASSANI, V.L.; GOSMANN, G. HPLC method for the determination of ecdysterone in extractive solution from *Pfaffia glomerata*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.40, p.450-453, 2006.