

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E MEIO
AMBIENTE

**Germinação e crescimento *in vitro* de baru (*Dipteryx alata* Vogel) em diferentes
concentrações de alumínio, ferro e manganês**

LUDMILA OSÓRIO CASTILHO NIEDACK

DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL
2020

Germinação e crescimento *in vitro* de baru (*Dipteryx alata* Vogel) em diferentes concentrações de alumínio, ferro e manganês

LUDMILA OSÓRIO CASTILHO NIEDACK

Orientadora: CLÁUDIA ROBERTA DAMIANI

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Meio Ambiente, Área de concentração: Bioprospecção, para obtenção do título de Mestre.

DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

N666g Niedack, Ludmila Osorio Castilho

Germinação e crescimento in vitro de baru (*Dipteryx alata* Vogel) em diferentes concentrações de alumínio, ferro e manganês [recurso eletrônico] / Ludmila Osorio Castilho Niedack, Lucas Garcia da Silva de Souza, Laura Eliza de Oliveira Alves. -- 2020.

Arquivo em formato pdf.

Orientadora: Cláudia Roberta Damiani.

Dissertação (Mestrado em Biologia Geral/Bioprospecção)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2020.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. cultivo in vitro. 2. metais potencialmente tóxicos. 3. contaminantes do solo. I. Souza, Lucas Garcia da Silva de . II. Alves, Laura Eliza de Oliveira. III. Damiani, Cláudia Roberta. IV. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

"GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO *in vitro* DE BARU (*Dipteryx alata* Vogel) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ALUMÍNIO, FERRO E MANGANÊS"

POR

LUDMILA OSÓRIO CASTILHO NIEDACK

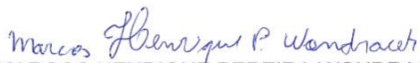
DISSERTAÇÃO APRESENTADA À UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS (UFGD), COMO PARTE DOS REQUISITOS EXIGIDOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM BIOLOGIA GERAL - ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: "BIOPROSPECÇÃO".



PROF.^a DR.^a CLÁUDIA ROBERTA DAMIANI
ORIENTADORA – UFGD



PROF.^a DR.^a JACKELINE SCHULTZ SOARES
MEMBRO TITULAR – UFGD



PROF. DR. MARCOS HENRIQUE PEREIRA WONDRAECK
MEMBRO TITULAR – UFGD

Aprovada em 22 de maio de 2020.

DEDICO

Ao meu marido:

Alexsander Niedack Alves

As minhas filhas:

Bethânia Castilho Niedack

&

Rebeca Castilho Niedack

OFEREÇO

Aos meus Pais:

Ademar Castilho Pereira & Mara Silvia Osório Castilho

A minha irmã e meu irmão:

Keysli Osório Castilho & Yuri Osório Castilho

As minhas sobrinhas e sobrinhos:

Manuela Cervo Niedack & Paolla Garcia Osório Castilho

&

Théo Henrique Osório Castilho Borges de Paula & Felipe Garcia Castilho

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me dar sabedoria e paz para conduzir todos os trabalhos do mestrado, e dividir comigo o fardo.

Agradeço de todo meu coração pelo apoio e compreensão do meu marido Alex, e nossas filhas Bethânia e Rebeca. Ao Alex por entender minhas ausências e me ajudar tanto no laboratório, como em casa. A Bethânia, que apesar de só ter 8 anos de idade, esteve presente no laboratório, me ajudando dentro das limitações da sua idade; e a Rebeca, que com seus 5 anos compreendeu que a mamãe precisa estudar.

Agradeço ao meu Pai Ademar, e minha Mãe Mara, por me apoiarem, e por pagarem pelas sementes utilizadas nos experimentos.

Agradeço a minha Orientadora Profa. Dra. Cláudia Roberta Damiani, por toda orientação, por me ensinar dos procedimentos mais simples aos mais complexos, por sua amizade e confiança. Sempre disse a todos que me perguntavam que só aceitei a missão de fazer mestrado, pois a Profa. Cláudia seria minha Orientadora.

Aos colegas do laboratório de Biotecnologia Vegetal. Agradeço ao Lucas, Aline e Laura, por todo o suporte, dedicação e colaboração. Lembrarei sempre de vocês.

Aos doutores membros da banca pela disponibilidade e contribuição no trabalho.

RESUMO

O baru (*Dipteryx alata* Vogel) é uma planta arbórea nativa, de ampla distribuição no Brasil e apresenta um crescimento e desenvolvimento em solos ácidos como o do Cerrado, indicando provável mecanismo de tolerância às condições adversas do solo, como a alta concentração de metais e o pH ácido. Devido à inexistência de informações sobre a tolerância desta espécie a metais e a possibilidade de ser utilizada na recuperação de áreas degradadas e/ou na fitorremediação, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a capacidade de germinação e crescimento *in vitro* de baru em meio suplementado com diferentes concentrações de alumínio, ferro e manganês, bem como, por meio da análise química, determinar a concentração dos metais acumulados nas plantas cultivadas nestas condições. Os tratamentos consistiram de: alumínio – Al^{3+} (0; 3,5; 7,0; 10,5; 21,0 ou 42,0 mg L^{-1}), ferro – Fe^{3+} (0; 2,5; 4,9; 7,4; 14,7 ou 29,4 mg L^{-1}) e manganês – Mn^{2+} (0; 0,4; 0,8; 1,2; 2,4 ou 4,8 mg L^{-1}) adicionados ao meio WPM. Os valores testados foram baseados na resolução CONAMA 420/2009 para águas subterrâneas, utilizando como menor concentração o valor limite, calculado com base em risco à saúde humana. Foi realizado um delineamento experimental inteiramente casualizado, sendo testadas seis concentrações de cada metal, cada tratamento foi constituído por três repetições, sendo cada repetição composta por um frasco de cultivo contendo cinco sementes cada. Aos 60 dias de inoculação foram avaliados o percentual de germinação, o número médio de folhas, o comprimento da raiz principal e da parte aérea, a massa fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular e a concentração dos cátions Al^{3+} , Fe^{3+} e Mn^{2+} na biomassa das plantas. Os resultados evidenciaram que nas condições em que o experimento foi conduzido, a germinação e o crescimento *in vitro* de baru não foram afetados pela presença em altas concentrações de nenhum dos metais avaliados, não sendo verificadas diferenças no percentual de germinação e no crescimento das plantas, assim como não foram observadas características típicas de toxicidade, como alterações na morfologia das raízes, clorose ou oxidação dos tecidos. A ausência de sintomas de toxicidade nas plantas de baru, na presença de Al^{3+} , Fe^{3+} e Mn^{2+} em concentrações acima dos valores limites encontrados na legislação, indicam que a espécie é tolerante a estes metais. O acúmulo de Al^{3+} e Fe^{3+} na biomassa das plantas, simultâneo ao aumento das concentrações destes elementos no meio de cultivo, indica que a espécie é uma provável acumuladora destes elementos ao longo do seu desenvolvimento, haja vista a presença em concentrações significativas destes elementos também nas sementes.

Palavras chave: Cultivo *in vitro*; metais potencialmente tóxicos; contaminantes do solo.

ABSTRACT

Baru (*Dipteryx alata* Vogel) is a native tree plant, widely distributed in Brazil and has a growth and development in acidic soils like the Cerrado, indicating a probable mechanism of tolerance to adverse soil conditions, such as the high concentration of metals and the acidic pH. Due to the lack of information on the tolerance of this species to metals and the possibility of being used in the recovery of degraded areas and / or in phytoremediation, this work was developed with the objective of evaluating the germination capacity and in vitro growth of baru in medium supplemented with different concentrations of aluminum, iron and manganese, as well as, through chemical analysis, determine the concentration of metals accumulated in seedlings grown under these conditions. The treatments consisted of: aluminum - Al^{3+} (0; 3.5; 7.0; 10.5; 21.0 or 42.0 mg L^{-1}), iron - Fe^{3+} (0; 2.5; 4.9; 7.4; 14.7 or 29.4 mg L^{-1}) and manganese - Mn^{2+} (0; 0.4; 0.8; 1.2; 2.4 or 4.8 mg L^{-1}) added to the medium WPM. The values tested were based on the CONAMA 420/2009 resolution for groundwater, using the limit value as the lowest concentration, calculated based on risk to human health. A completely randomized experimental design was carried out, with six concentrations of each metal being tested, each treatment consisting of three replications, each repetition consisting of a cultivation bottle containing five seeds each. At 60 days of inoculation, the percentage of germination, the average number of leaves, the length of the main root and the aerial part, the fresh and dry mass of the aerial part and the root system and the concentration of cations Al^{3+} , Fe^{3+} and Mn^{2+} were evaluated in seedling biomass. The results showed that under the conditions in which the experiment was conducted, germination and in vitro growth of baru were not affected by the presence in high concentrations of any of the metals evaluated, with no differences in the percentage of germination and seedling growth, as well as typical toxicity characteristics, such as changes in root morphology, chlorosis or tissue oxidation, were not observed. The absence of toxicity symptoms in baru seedlings, in the presence of Al^{3+} , Fe^{3+} and Mn^{2+} in concentrations above the limit values found in the legislation, indicate that the species is tolerant to these metals. The accumulation of Al^{3+} and Fe^{3+} in the seedling biomass, simultaneously with the increase in the concentrations of these elements in the culture medium, indicates that the species is a probable accumulator of these elements throughout its development, considering the presence in significant concentrations of these elements also in the seeds.

Keywords: *In vitro* cultivation; potentially toxic metals; soil contaminants.

LISTA DE ABREVIATURAS

Al³⁺: Alumínio

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente

Fe³⁺: Ferro

MS: Murashige e Skoog

Mn²⁺: Manganês

MPT: Metais potencialmente tóxicos

WPM: *Wood Plant Medium*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1. Revisão de literatura	11
1.1.1. Metais potencialmente tóxicos	11
1.1.2. Alumínio	11
1.1.3. Ferro	13
1.1.4. Manganês	14
1.1.5. Fitorremediação	15
1.1.6. Baru - <i>Dipteryx alata</i> Vogel	16
1.1.7. Cultivo <i>in vitro</i>	18
1.2. Objetivo geral	18
1.2.1. Objetivos específicos	19
2. MATERIAL E MÉTODOS	19
2.1. Material biológico	19
2.3. Análise dos dados	22
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
3.1. Germinação e crescimento <i>in vitro</i>	24
3.2. Análise química da biomassa vegetal	27
3.3. Aspecto visual das plantas	30
4. CONCLUSÃO	33
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

1. INTRODUÇÃO

Alguns dos metais encontrados no solo e considerados tóxicos são bioacumulativos, não se decompõem no ambiente e não são facilmente metabolizados, o que é a principal razão para a sua acumulação na cadeia alimentar dos produtores primários (através da absorção pelas plantas) e ao nível do consumidor (através do consumo) (ACKOVA, 2018).

Metais são definidos quimicamente como elementos que conduzem eletricidade, têm brilho metálico, são maleáveis e dúcteis, formam cátions e têm óxidos básicos (ATKINS & JONES, 1997). De modo geral, os metais *per se* não são acessíveis para os vegetais, somente após sofrerem reações químicas que alteram seu estado de oxidação se tornam disponíveis na solução do solo para as plantas como composto químico, como por exemplo, na forma de sal (APPENROTH, 2010). Alguns dos metais encontrados na natureza são essenciais para o crescimento das plantas, tais como o cobalto, cobre, ferro, manganês, molibdênio, níquel e zinco, denominados micronutrientes ou elementos traço, desempenham funções bioquímicas e fisiológicas essenciais, podendo citar a participação em reações redox e diretamente na estrutura de várias enzimas (APPENROTH, 2010; NAGAJYOTI et al., 2010). No entanto, quando a concentração interna destes elementos excede certo limiar, eles podem exercer efeitos tóxicos nas plantas. A toxicidade dos metais em plantas pode variar de espécie para espécie, e está relacionada com a concentração, a forma química, e o pH do solo (NAGAJYOTI et al., 2010; ACKOVA, 2018).

Grande parte dos solos do Cerrado (Latosolos, 44,1%) (BOLFE et al, 2020) apesar de apresentarem boas características físicas, classificados como Latossolo Vermelho-Escuro, Latossolo Vermelho-Amarelo e Latossolo Roxo são solos forte ou moderadamente ácidos (pH entre 4,5 e 5,5) (RIBEIRO & WALTER, 1998). A acidez do solo é medida através dos teores de Al^{3+} e hidrogênio trocável do solo, porém na prática, a acidez se deve a um complexo de fatores, podendo ser devido à baixa atividade dos microrganismos benéficos, a deficiência ou toxicidade dos nutrientes e a interação entre estes fatores (FAGERIA & STONE, 1999). De acordo com Haridasan (2008) os extremos do pH do solo afetam a disponibilidade dos nutrientes de suas formas, num extremo causando deficiência e no outro a toxicidade, independentemente das suas concentrações totais na matriz solo-mineral. Dentre as alterações químicas causadas pela acidez encontra-se a solubilização dos elementos na solução do solo, atingindo níveis tóxicos

como no caso do alumínio, manganês e ferro (KOCHIAN, 1995). O alumínio é solubilizado em pH inferior a 5,0 formando Al^{3+} e $AlOH^{2+}$, o manganês em pH inferior a 5,6 e o ferro apenas em pH inferior a 4,0 devido à sua forma oxidada (HARIDASAN, 2008).

Plantas cultivadas em solos do Cerrado, na ausência de calagem e adubação apresentam redução do crescimento, sendo susceptível a toxicidade do alumínio e manganês. Porém, o Cerrado apresenta inúmeras espécies de plantas nativas resistentes ou tolerantes às condições edáficas consideradas desfavoráveis às plantas cultivadas (HARIDASAN, 2008). De acordo com o mesmo autor, muitas espécies comuns desse Bioma, para o alumínio, por exemplo, em vez de excluir este elemento, absorvem grandes quantidades do mesmo e o transportam para folhas, acumulando-o em diferentes tecidos, incluindo folhas e sementes.

Espécies nativas resistentes ou tolerantes às condições edáficas consideradas desfavoráveis são importantes agentes fitorremediadores. Plantas fitorremediadoras, de acordo com Peuke & Rennenberg (2005) podem absorver os metais do solo e acumulá-los na biomassa vegetal; degradar os contaminantes orgânicos; volatilizar poluentes, bem como, por meio das raízes, imobilizar ou reduzir a biodisponibilidade dos poluentes.

Neste sentido, o estudo e a identificação de plantas fitorremediadoras são fundamentais para a recuperação de áreas degradadas. Dentre as espécies nativas, o baru (*Dipteryx alata* Vogel), Fabaceae, espécie de ampla distribuição no Brasil e de ocorrência no Cerrado, incluindo formações florestais Cerradão e Mata, áreas de transição entre Cerrado e Mata Estacional ou Galeria e no Cerrado Sentido Restrito destaca-se como uma espécie promissora para a recuperação de áreas degradadas em longo prazo (VIEIRA et al, 2010).

Considerando a ampla distribuição do baru, seu crescimento e desenvolvimento em solos ácidos, plantas desta espécie podem ter desenvolvido mecanismos de tolerância as condições adversas do solo, como alta concentração de metais e pH ácido. Devido à inexistência de informações sobre a tolerância desta espécie a metais na literatura até o momento, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a tolerância de plantas de baru (*Dipteryx alata* Vogel), germinadas e cultivadas *in vitro* em meio de cultivo suplementado com diferentes concentrações dos cátions alumínio, ferro e manganês.

1.1. Revisão de literatura

1.1.1. Metais potencialmente tóxicos

A ação do homem no ambiente é o fator principal quando se trata da contaminação do solo por metais potencialmente tóxicos (MPT) dentre as quais podemos destacar emissões causadas pelo crescimento desordenado de áreas industriais, mineração, uso inadequado de fertilizantes químicos e agentes fitossanitários, e a aplicação no solo de resíduos de esgoto (PANDEY et al, 2016; ZHANG et al, 2010).

Os MPT podem ser divididos em duas categorias conforme os benefícios e toxicidade que promovem. Há o tipo de elemento que é diretamente tóxico, mesmo em pequenas quantidades, como é o caso do cádmio, cromo, mercúrio e chumbo. Por outro lado, há os metais que são micronutrientes essenciais para animais e vegetais, que estão diretamente relacionados ao seu desenvolvimento, por estarem envolvidos em múltiplos processos metabólicos, e fazer parte da composição de enzimas e proteínas. Apesar disto, esses elementos até então essenciais podem se tornar tóxicos, quando sua concentração excede um teor crítico específico.

O ferro e o manganês fazem partes desses micronutrientes essenciais, porém potencialmente tóxicos, assim como o alumínio, que apesar de não ser um micronutriente essencial, está relacionado ao crescimento das plantas (HALL 2002; BASLAR et al., 2009; DOGAN et al., 2010; DURKAN et al., 2011; UGULU et al., 2012; TAIZ, et al., 2017).

Há uma relação entre a presença de MPT no solo, sua assimilação pelas plantas e os danos causados a saúde de animais e seres humanos (AHMAD et al., 2010). Khan et al. (2015) relata que as implicações dos MPT na saúde humana podem ser diretas e indiretas, e o impacto direto está relacionado à ingestão de alimentos contaminados por esses elementos, sendo os vegetais uma das principais fontes. Em seu estudo ficou constatado que as concentrações de cádmio, chumbo e cobre encontrados nas culturas alimentares foram muito superiores aos valores de referência.

1.1.2. Alumínio

O alumínio (Al) é o terceiro elemento mais abundante na crosta terrestre encontrado em estado sólido, e faz parte da composição de muitos minerais que compõem o solo (POGUE & LUKIW, 2014). Porém em solos ácidos, com pH menor que 4,5, o Al torna-se solúvel, alterando seu estado para as formas, $Al(OH)^{2+}$ e Al^{3+} (KINRAIDE, 1997) condições tóxicas para determinadas espécies vegetais, induzindo a inibição do

crescimento radicular, a capacidade da planta de absorver nutrientes e água e de interagir com os microrganismos presentes no solo, levando a deficiência nutricional (YANG et al, 2011; KOPITTKE et al, 2015; KOCHIAN et al, 2016).

Algumas espécies adaptadas aos solos ácidos desenvolveram mecanismos de exclusão ou de tolerância ao Al, ambas às estratégias demonstram ser igualmente bem sucedidas para lidar com a toxicidade do elemento (SCHMITT et al., 2016). O mecanismo de exclusão do Al tende a impedir ou limitar a entrada deste cátion pelo ápice da raiz (via apoplástica e simplástica), diminuindo os danos causados por sua interação com a parede e membrana celular. Plantas tolerantes metabolizam ou sequestram o Al, armazenando-os em vacúolos, oxidando o metal ou acumulando o mesmo nas folhas (KOCHIAN et al., 2016).

Algumas espécies vegetais podem acumular até 1000 mg kg⁻¹ de Al na massa seca (JANSEN et al., 2002; HARIDASAN, 2008). As plantas acumuladoras são encontradas principalmente nas regiões tropicais, pois são mais adaptadas aos solos ácidos (JONES & RYAN, 2016). De modo semelhante, algumas plantas nativas do Cerrado, devido ao solo ácido, com pH variando entre 4,5 e 5,5 (RIBEIRO & WALTER, 1998), desenvolveram mecanismos de resistência ou tolerância às condições edáficas consideradas desfavoráveis (HARIDASAN, 2008).

O Al compromete a divisão celular por meio da interrupção da mitose. Quanto à inibição do crescimento radicular, o processo acontece devido à ligação do Al³⁺ disponível no solo nas cargas negativas da membrana e parede celular, que se acumulam na hemicelulose presente nesta última estrutura, interrompendo a expansão das células entre o meristema e a zona de transição distal da raiz. Na parede celular, o Al³⁺ pode se ligar nas proteínas de parede, alterar o pH e substituir o cálcio no ácido galacturônico (maior componente da pectina), o que resulta no aumento da rigidez da parede celular, impedindo assim o afrouxamento necessário para a expansão celular. Na membrana celular, o alumínio pode substituir o Ca²⁺ presente nas pontes entre os principais grupos de fosfolipídios, afetando o movimento das proteínas na bicamada lipídica, afetando tanto o metabolismo simplástico como o apoplástico. A respiração e o metabolismo celular nas raízes, de um modo geral, não parecem ser afetados pela presença do Al, havendo duas hipóteses para explicar esta situação: na primeira, a concentração de Al³⁺ livre é baixa no citoplasma, e a segunda, os complexos formados através das ligações com o Al³⁺ não causam toxidez (JONES & RYAN, 2016; TABUCHI & MATSUMOTO, 2001; SIVAGURU et al, 2000).

1.1.3. Ferro

O ferro (Fe) é mais conhecido por sua deficiência, do que por seus efeitos tóxicos, seja em plantas ou nos seres humanos. Porém, o excesso de Fe pode promover o desenvolvimento de espécies reativas de oxigênio, a diminuição da fluorescência da clorofila, atuando como fotoinibidor (KAMPFENKEL et al, 1995; KUPPER & ANDRESEN, 2016; LI & WARD 2018).

Trata-se do quarto elemento mais abundante na litosfera, e na maioria das vezes está presente em grandes quantidades no solo, porém a disponibilidade do Fe é ditada pelo potencial redox do solo e pH. Em solos aeróbicos ou com pH mais altos, o Fe é prontamente oxidado e predominantemente encontrado na forma insolúvel de óxido férrico (Fe_2O_3). Em pH mais baixo (ácido), o Fe^{3+} é liberado do óxido e torna-se mais disponível para absorção pelas raízes (MARSCHNER et al., 2011; ROUT & SAHOO, 2015). Em condições de alagamento o Fe^{3+} é reduzido a Fe^{2+} , o que facilita sua absorção pela planta, passando a ser um metal potencialmente tóxico (SCHMIDT et al, 2020). O mesmo ocorre em relação ao pH do solo que, quanto mais ácido for, maior será a velocidade de redução do Fe^{3+} para Fe^{2+} (SOUZA et al, 2010; BRIAT & LOBREAUX, 1997). Áreas onde ocorre atividade de mineração podem acumular partículas de ferro no solo, este fato, associado ao pH ácido, também pode aumentar a disponibilidade de Fe no substrato (WONG et al. 1978). Portanto nas condições acima citadas, com a redução de ferro na forma férrica e a estabilização do ferro na forma ferrosa, o Fe^{2+} passa a ser prontamente absorvido pela planta (FITTER & HAY, 1989).

Cerca de 80% do Fe disponível na planta está presente no sistema fotossintético, necessário para a biossíntese de citocromos e outras moléculas do complexo heme e fixação de CO_2 , o que conseqüentemente está diretamente ligado a produção de biomassa, ou seja, no crescimento e produtividade da planta (BRIAT et al, 2007; BRIAT et al, 2010). Dentre as funções do ferro estão a de atuar como cofator de muitas enzimas na fotossíntese, respiração, síntese hormonal, síntese de DNA, desenvolvimento de cloroplastos e biossíntese de clorofila, graças a sua capacidade de ganhar e perder elétrons é uma peça essencial da cadeia de transporte de elétrons (SCHMIDT et al, 2020; KALAIIVANAN & GANESHAMURTHY, 2016; ROUT & SAHOO, 2015).

Em situações onde a presença do Fe no solo é suficiente para suprir as necessidades dos vegetais, as raízes das plantas reduzem o Fe^{3+} a Fe^{2+} , para que ocorra o transporte do metal através da membrana plasmática destas raízes (BIENFAIT, 1985).

A escassez de ferro no solo causa clorose das folhas, enquanto o excesso causa a redução da síntese e degradação das proteínas já existentes devido a formação de espécies reativas ao oxigênio. O ferro também é capaz de atuar como catalizador, por meio da reação de Fenton, produzindo radicais de hidroxila, os quais podem danificar estruturas lipídicas, proteínas e o DNA (SCHMIDT et al, 2020; ROUT & SAHOO, 2015).

1.1.4. Manganês

O manganês (Mn) é um elemento abundante na crosta terrestre, abrangendo cerca de 0,1%. Este metal faz parte da composição de mais de 100 minerais, dos quais se destacam o óxido de manganês (MnO_2), carbonato de manganês ($MnCO_3$) e piroxmagita ($MnSiO_3$) (GRAEDEL, 1978; EPA, 2003; WILLIAMS, 2020).

O Mn participa de vários processos no metabolismo vegetal, dentre os quais, a proteção e diminuição dos danos causados por espécies reativas de oxigênio (ROS); em processos de oxirredução, como cofator enzimático na reação de oxidação da água pelo fotossistema II; no metabolismo de ácidos graxos e de carboidratos (MARSCHNER, 1995; DUCIE & POLLE, 2005; SCHMIDT, 2016). No entanto, poucas são as informações com relação à absorção, acumulação e desintoxicação do manganês, suas interações e reações em plantas lenhosas (KUMARI et al, 2016).

O Mn em altos níveis é tóxico tanto para vegetais quanto para animais. Nos vegetais, o excesso de manganês diminui a produção agrícola (KOCHIAN, 1995), pois este metal compete com outros elementos pela absorção de Mg, Ca, K, Fe, e de N e P, no vegetal, o que leva a diminuição nutricional da planta. (CLAIR & LYNCH, 2005; SANTOS et al, 2017). Em seres humanos o excesso pode causar doenças neurodegenerativas, distúrbios do sistema reprodutivo e mau funcionamento do sistema imune (CAMPAGNA et al, 2013).

O manganês é transportado das raízes para o ápice caulinar com facilidade, onde são encontrados os primeiros indícios da toxicidade deste metal (ECKHARD et al, 2012). Os sintomas de toxicidade apresentados pelas plantas podem ser: manchas marrons em folhas velhas, clorose e necrose intervenal, deformação de folhas jovens e retardo de crescimento (FOY et al., 1978; FOY, 1988, WISSEMEIER & HORST, 1992; BALDISSEROTTO et al., 2007; FERNANDO & LYNCH, 2015).

Da mesma maneira que acontece com o alumínio, solos ácidos aumentam a biodisponibilidade de manganês, (KOGELMANN & SHARPE, 2006). Plantas tolerantes

ao Mn incluem mecanismos como, o sequestro do elemento acumulando-o nos vacúolos ou em alguns casos nos cloroplastos compartimentando-o nos tecidos foliares; na conversão do metal em um composto metabolicamente inativo, como um complexo de quelato de Mn^{2+} (McCAIN & MARKLEY, 1989; DOU et al., 2009; ECKHARD et al, 2012).

1.1.5. Fitorremediação

A fitorremediação é um método em que plantas são utilizadas para extrair ou sequestrar elementos ou moléculas consideradas tóxicas, presentes no solo, água, sedimentos e ar contaminados. Este processo é possível graças à capacidade de adaptação dos vegetais a condições adversas do ambiente, seja este pobre ou rico em nutrientes, ácido, salino, ou contaminado, por diversos tipos de metais, agentes orgânicos ou inorgânicos, através da absorção dos contaminantes, e desta forma se tornam uma alternativa biotecnológica economicamente viável e eficaz (MEMOM & SCHRODER, 2008; TAVARES et al, 2013; BERNARDINHO et al, 2016; TAIZ et al., 2017; SILVA et al, 2019).

A fitorremediação pode ocorrer de várias maneiras, entre elas a fitoextração, que desloca os metais do solo e acumula na biomassa vegetal; a fitodegradação ou fitotransformação, onde as plantas absorvem, armazenam e degradam os contaminantes orgânicos; a rizofiltração através da qual os agentes contaminantes são removidos de fontes aquosas por meio das raízes; a fitoestabilização, que imobiliza ou reduz a biodisponibilidade dos poluentes; e a fitovolatilização: uso de plantas para volatilizar poluentes (PEUKE & RENNENBERG, 2005).

Em condições naturais, os metais estão contidos nos solos em baixas concentrações, sem que haja risco ao ambiente. Nagajyoti et al. (2010), enumera seis fontes de metais potencialmente tóxicos que podem contaminar o meio ambiente: (1) fontes naturais: rochas e vulcões; (2) fontes agrícolas: fertilizantes, pesticidas, calagem do solo e irrigação; (3) fontes industriais: mineração, transporte do minério, fundição, reciclagem de metais; usinas que queimam carvão e usinas nucleares, indústria petrificadora; (4) efluentes domésticos: águas residuais da rede de esgoto, incineração de lixo e lixões; (5) fontes atmosféricas: deslocamento da fumaça e cinzas proveniente de erupções vulcânicas, queima de carvão e lixo; (6) outras fontes: veículos e aeronaves movidos a diesel.

Os procedimentos tradicionais de recuperação do solo, remoção, lavagem e estabilização física são caros e agressivos ao meio ambiente. Em contraponto, a fitorremediação tem uma ótima relação custo benefício, pode ser aplicada em grandes extensões contaminadas e, atuar na restauração da paisagem (BERNARDINHO, 2016).

A utilização de espécies lenhosas para fitorremediação também contribui para a diminuição da erosão e lixiviação, além do aumento da atividade microbiana do solo, isto se dá devido ao desenvolvimento do sistema radicular e caulinar da planta, e a sua disposição de acumular metais, e a maior produção de biomassa (CARNEIRO et al., 2002; BRUNNER et al., 2008)

A arborização de áreas degradadas é um modo sustentável de reconstruir o solo, além da regeneração do ambiente, contudo, a fitorremediação florestal demanda muito tempo para mostrar resultados efetivos, e tem um alto custo, variando de acordo com a árvore utilizada e o local a ser corrigido (PULFORD & WATSON, 2003; HAIGH, 2018).

O Conselho Nacional do Meio Ambiente do Brasil - CONAMA, no uso das atribuições, através da Resolução nº 420, de 28 de dezembro de 2009, alterada pela Resolução CONAMA nº 460/2013, do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA, dispôs sobre critérios e valores que irão orientar a respeito da qualidade do solo, quanto à presença de substâncias químicas, as concentrações máximas permitidas para metais em solos e águas subterrâneas. O artigo 3º desta resolução determina que: “Art. 3º - A proteção do solo deve ser realizada de maneira preventiva, a fim de garantir a manutenção da sua funcionalidade ou, de maneira corretiva, visando restaurar sua qualidade ou recuperá-la de forma compatível com os usos previstos”.

Estudos sobre a tolerância das plantas a metais potencialmente tóxicos e sua adaptação às áreas contaminadas são fundamentais para o desenvolvimento de estratégias e tecnologias para a fitorremediação. Os estudos sobre fitorremediação têm crescido no Brasil, mas ainda são necessárias pesquisas que utilizem plantas nativas (BERNARDINHO, 2016). Entender os mecanismos envolvidos na acumulação e desintoxicação de metais potencialmente tóxicos em plantas lenhosas é fundamental para gerar metodologias de fitorremediação (KUMARI et al, 2016).

1.1.6. Baru - *Dipteryx alata* Vogel

Dipteryx alata Vogel (Figura 1) é uma planta arbórea, conhecida popularmente como baru, cumbaru, barujó, feijão-coco, castanha-de-burro, pau-cumaru ou imburana-brava, pertence à classe Equisetopsida, ordem Fabales, família Fabaceae. O gênero

Dipteryx é constituído por 15 espécies que são exploradas na indústria madeireira e alimentícia, no paisagismo e na recuperação de áreas degradadas (SILVERIO, 2013).

Figura 1. Aspecto dos ramos, frutos e sementes de baru (*Dipteryx alata* Vogel).



Fonte: Liana John. Imagem capturada em 25/02/2020, disponível em: <https://conexoplaneta.com.br/blog/oba-o-baru-invadiu-os-doces-de-amendoim/>

Apesar de ser uma planta nativa, o baru não é endêmico, e distribui-se principalmente no Cerrado, nas regiões norte, nordeste, centro-oeste e sudeste do Brasil, além da Venezuela, Costa Rica e Panamá (CARVALHO, 2020; FERREIRA et al, 2018; SILVERIO et al, 2013; LORENZI, 2008).

O baruzeiro ou barueiro pode atingir até 25 metros de altura, apresenta folhas compostas pinadas e com filotaxia alterna. As flores são hermafroditas, e o fruto é do tipo drupa, ovoide, levemente achatado, de cor marrom (MELHEM, 1974, CNCFlora, 2012).

A castanha do baru é rica em lipídeos (40%) e proteínas (30%), sais minerais, aminoácidos, além de apresentar boa digestibilidade (SOUSA et al, 2011), polpa é composta principalmente por carboidratos (63%), dos quais prevalecem amido, fibras insolúveis e açúcares (ALVES et al., 2010), sendo utilizado na produção de barras de cereais, biscoitos, licores, e para a extração de óleo (SANTOS et al, 2012).

De acordo com CNCFlora (2012) o baru apresenta uma população de indivíduos estável, porém, em um futuro próximo, poderá ter uma redução em sua subpopulação. A espécie aparece no *The IUCN Red List of Threatened Species* como vulnerável (12/2019). A exploração da madeira nobre da árvore, das sementes por parte das comunidades

tradicionais, e a perda de habitat para a agricultura e pastagens, é o que nos traz a esta perspectiva (OLDFIELD et al., 1998; CORREA et al, 2000; SILVERIO et al, 2013; MAGALHÃES, 2014).

Hoje no Brasil a exploração do baru é proveniente de uma atividade extrativista, na qual agricultores familiares fazem a coleta dos frutos maduros que caem no chão, extraem suas castanhas para a produção artesanal de seus derivados alimentícios, ou as vendem para empresas e cooperativas e associações de agricultores familiares. Contudo ainda não há dados quanto ao impacto e a sustentabilidade desta atividade (MAGALHÃES, 2014). Por outro lado, o plantio de baru em áreas degradadas é indicado para a recuperação do local e preservação da espécie (Sano et al., 2004).

1.1.7. Cultivo *in vitro*

A cultura de tecidos vegetais é uma ferramenta adequada para estudos de fitorremediação, porém, apesar do avanço nesta área, mais pesquisas são necessárias para esclarecer as interações entre células vegetais e elementos químicos tóxicos no ambiente (DORAM, 2009). Flocco & Giulietti (2007) defendem que as pesquisas básicas de fitorremediação devem acontecer em laboratório, com técnicas de cultivo de plantas desenvolvidas em condições controladas. Técnicas de cultivo *in vitro* permitem num curto período de tempo e sob condições controladas avaliar a exigência nutricional de uma planta, a tolerância ou a toxicidade de qualquer elemento, seja este, nutriente ou não.

Até o momento, não foram encontrados na literatura trabalhos relativos à tolerância ou toxicidade de metais potencialmente tóxicos em plantas de baru. Com relação à propagação *in vitro* da espécie, algumas pesquisas são direcionadas para outras espécies do gênero *Dypteryx*, como exemplo, o estabelecimento de protocolos para culturas de células em suspensão de *D. odorata* (Aubl.) Willd. e *D. oleifera* Benth (GÓMEZ et al, 2013), contudo o estudo foi direcionado a área farmacológica.

1.2. Objetivo geral

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a tolerância de plantas de baru (*Dypteryx alata* Vogel), germinadas e cultivadas *in vitro* em meio de cultivo suplementado com diferentes concentrações dos cátions alumínio, ferro e manganês.

1.2.1. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito de Al^{3+} , Fe^{3+} e Mn^{2+} em diferentes concentrações sobre percentual de germinação *in vitro* de baru;
- Avaliar o efeito de Al^{3+} , Fe^{3+} e Mn^{2+} em diferentes concentrações sobre o crescimento *in vitro* de baru;
- Avaliar a capacidade de acumulação dos metais Al^{3+} , Fe^{3+} e Mn^{2+} na biomassa das plantas de baru.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material biológico

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, da Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados - MS.

Como material vegetal foram utilizadas sementes obtidas do Assentamento Teijin, localizado no município de Nova Andradina – MS (S: 21°53' 53,22" e W: 53°11' 12,33").

Para atingir o objetivo proposto foram estudados três metais, alumínio - Al ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), ferro - Fe ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e manganês - Mn ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Para cada metal foi realizado um experimento em delineamento experimental inteiramente casualizado, totalizando seis tratamentos para cada metal. Cada tratamento foi constituído por três repetições, sendo cada repetição composta por um frasco de cultivo contendo cinco sementes cada. Os tratamentos consistiram de: Al^{3+} (0; 3,5; 7,0; 10,5; 21,0 ou 42,0 mg L^{-1}), Fe^{3+} (0; 2,5; 4,9; 7,4; 14,7 ou 29,4 mg L^{-1}) e Mn^{2+} (0; 0,4; 0,8; 1,2; 2,4 ou 4,8 mg L^{-1}), adicionadas ao meio de cultura WPM (Wood Plant Medium – LLOYD & MCCOWN, 1980). As concentrações estudadas foram baseadas utilizando como referência o limite máximo para águas subterrâneas, recomendado pela Resolução CONAMA nº 420 de 28 de dezembro de 2009 (CONAMA, 2009).

O meio WPM foi suplementado com os metais de acordo com cada tratamento (Tabela 1), 100 mg L^{-1} de mio-inositol, 30 g L^{-1} de sacarose e 6,0 g L^{-1} de ágar, sendo o pH ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar. Após a homogeneização, os meios foram fracionados e distribuídos em frascos de vidro transparente (80 mL em cada frasco com capacidade de 500 mL), fechados com papel alumínio, sendo em seguida esterilizados em autoclave a 121°C e 1,5 atm de pressão por 20 minutos. Após a esterilização dos meios

de cultivo, o pH foi aferido novamente, sendo constatado para todos os tratamentos o valor de 5,6, uma redução de 0,2.

Para a realização dos experimentos, em câmara de fluxo laminar, as sementes foram esterilizadas superficialmente por meio de imersão e agitação constante em três soluções desinfetantes conforme a ordem descrita a seguir. Solução de hidróxido de sódio (0,1M) por cinco minutos, em seguida álcool 70% por um minuto e por último hipoclorito de sódio (2,5%) por 15 minutos, sendo este último acrescido de detergente (TWEEN 80) na concentração de 0,5 mL L⁻¹. Após a esterilização superficial, as sementes foram lavadas em água destilada e esterilizada, por três vezes, e antes da inoculação, o resíduo de água superficial das sementes foi retirado por meio de secagem em papel filtro esterilizado.

Após a inoculação das sementes nos respectivos tratamentos, os frascos foram transferidos para sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com densidade de fluxo de fótons de $52,21 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas.

Aos 60 dias da inoculação foram avaliadas as seguintes variáveis numéricas: germinação (%), número médio de folhas por planta, comprimento da raiz principal (cm), comprimento da parte aérea (cm), massa fresca da parte aérea e do sistema radicular (g), massa seca da parte aérea e do sistema radicular (g), concentração do Al³⁺, Fe³⁺ e Mn²⁺ nas plantas (mg kg⁻¹).

2.2. Análise dos elementos minerais

Para a análise dos elementos minerais, determinou-se a concentração dos elementos estudados em amostras de sementes e do solo onde se encontram as plantas doadoras das sementes. Para análise dos metais nas plantas, as mesmas (parte aérea + sistema radicular, sendo os cotilédones retirados) foram secas em estufa de ar forçado a 70°C até a estabilização da massa. A massa seca obtida das plantas, amostras de sementes e amostras do solo onde foram coletadas as sementes foram envidas para análises da concentração de Al³⁺, Fe³⁺ e Mn²⁺, bem como, para a determinação do pH do solo. Os teores dos respectivos metais foram determinados em triplicata (três repetições com 15 plantas para cada tratamento; três repetições de 100 sementes cada; três amostras de solo), no Laboratório de Nutrição de Plantas, Departamento de Recursos Naturais/Ciência do Solo, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu, SP.

Para a determinação da concentração do metal apresentado na massa seca das plantas e das sementes foi utilizada a análise de tecido vegetal, onde foi feita a digestão

nitro-perclórica, seguida da leitura no Espectrofotômetro de Absorção Atômica - Perkin Elmer modelo 2380 (MALAVOLTA et al, 1997).

Para a determinação da concentração de metal no solo foram realizadas as seguintes análises químicas, de acordo com cada elemento:

Al: Alumínio trocável - Método: Cl;

Fe e Mn: Método DTPA - Espectrofotometria de absorção atômica (Espectrofotômetro de Absorção Atômica, Perkin Elmer modelo 2380) (RAIJ et al, 2001).

A análise de pH do solo foi determinada pela técnica pH (acidez ativa) - Método: CaCl_2 0,01 mol L⁻¹ e leitura em pH-metro Micronal modelo B474.

Para a análise dos resultados foi levado em consideração a presença de ferro (5,58 mg L⁻¹) e manganês (8,87 mg L⁻¹) na composição do meio WPM (Tabela 1).

Tabela 1. Concentrações de alumínio (Al), ferro (Fe) e manganês (Mn) encontradas no solo da região onde foram obtidas as sementes, concentração encontrada por semente e concentrações utilizadas no meio de cultivo (WPM) na propagação *in vitro* de baru (*Dipteryx alata*).

Al solo (mg dm ⁻³)	Al semente (1,0 g)	Concentração testada Al (mg L ⁻¹)	Concentração (Al Cl ₃ 6H ₂ O) meio (mg L ⁻¹)	Concentração final Al meio (mg L ⁻¹)	Σ: Al semente + Al meio (mg)
		0	-	0	0,1
		3,5**	-	3,5	3,6
		7,0	-	7,0	7,1
19 ^x	0,15 ^y	10,5	-	10,5	10,6
		21,0	-	21,0	21,1
		42,0	-	42,0	42,1
Fe solo (mg dm ⁻³)	Fe semente (1,0g)	Concentração testada Fe (mg L ⁻¹)	Fe (FeSO ₄ 7H ₂ O) meio (mg L ⁻¹)	Concentração final Fe meio (mg L ⁻¹)	Σ: Fe semente + Fe meio (mg)
		0	5,6	5,6	5,7
		2,5**	5,6	8,1	8,2
		4,9	5,6	10,5	10,6
82 ^x	0,89 ^y	7,4	5,6	13,0	13,1
		14,7	5,6	20,3	20,4
		29,4	5,6	35,0	35,1
Mn solo (mg dm ⁻³)	Mn semente (1,0g)	Concentração testada Mn (mg L ⁻¹)	Concentração Mn (MnSO ₄ H ₂ O) meio (mg L ⁻¹)	Concentração final Mn meio (mg L ⁻¹)	Σ: Mn semente + Mn meio (mg)
		0	8,9	8,9	9,0
		0,4**	8,9	9,3	9,4
		0,8	8,9	9,7	9,8
1,4 ^x	0,12 ^y	1,2	8,9	10,1	10,2
		2,4	8,9	11,3	11,4
		4,8	8,9	13,7	13,8

^x Latossolo Vermelho Distrófico (EMBRAPA, 2013), pH 3,7.

^y Massa fresca média por semente: 1,0 gramas.

** Valor limite - calculado com base em risco à saúde humana de acordo com a resolução CONAMA 420/2009 para águas subterrâneas.

2.3. Análise dos dados

Diferenças estatísticas entre os tratamentos foram determinadas por análise de variância (ANOVA) e as médias obtidas foram comparadas por regressão polinomial e/ou pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico Winstat (MACHADO et al, 1999). As análises dos dados foram realizadas individualmente para cada elemento estudado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a análise de variância (Tabela 2), nenhuma das variáveis numéricas relativas à germinação e crescimento *in vitro* de plantas de baru (*Dipteryx alata* Vogel) cultivadas em meio contendo diferentes concentrações de alumínio, ferro e manganês apresentaram diferenças estatísticas significativas pelo teste F. Isso demonstra que para os parâmetros analisados, a espécie estudada não apresentou características de toxicidade causada pelos tratamentos.

Contudo, a análise química (quantificação dos metais acumulados nas plantas) demonstrou que as concentrações de alumínio encontradas nas plantas variaram em função da concentração do elemento adicionada ao meio de cultivo, sendo verificada diferença estatística significativa entre as concentrações testadas, ao nível de 1% de probabilidade de erro. Semelhante ao alumínio, para as concentrações testadas de ferro foi possível observar uma diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade de erro. Para o manganês, não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações testadas nas plantas analisadas.

Tabela 2. Resumo da análise de variância para as variáveis quantitativas de crescimento *in vitro* de baru (*Dipteryx alata* Vogel) em meio WPM acrescido de diferentes concentrações de alumínio (Al^{3+}), ferro (Fe^{3+}) e manganês (Mn^{2+}).

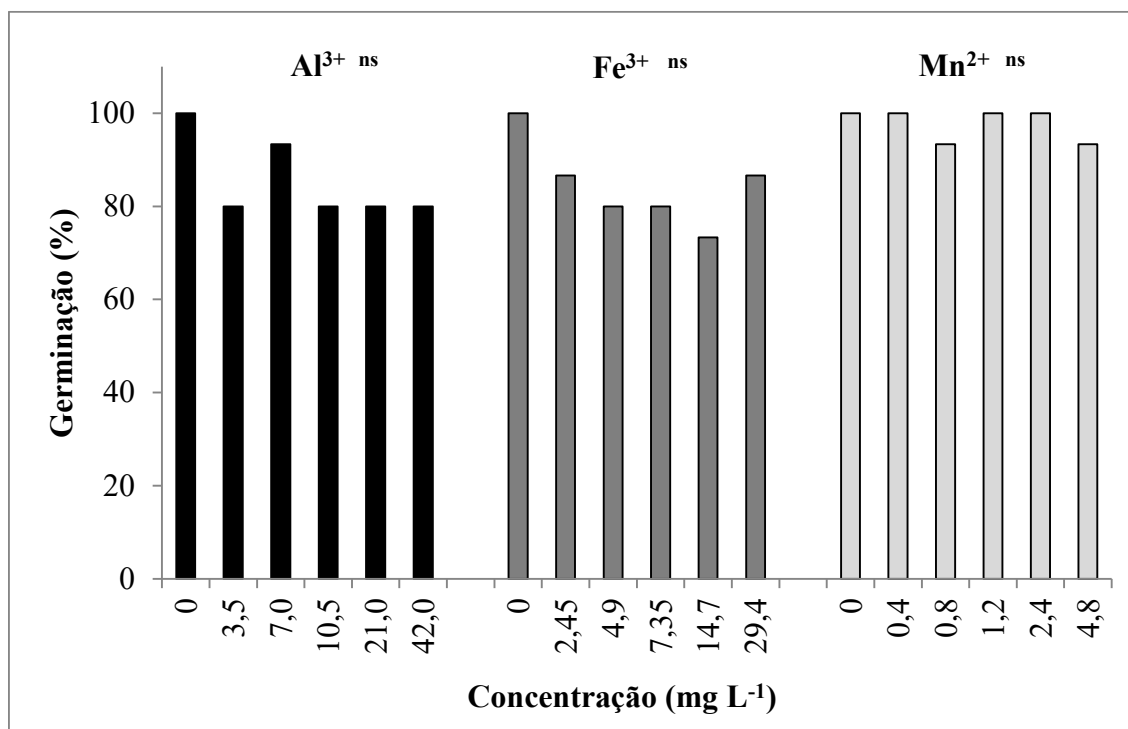
FV	GL	Quadrados Médios								
		G	CPA	CRP	NF	MFPA	MFSR	MSPA	MSSR	CMP
[Al]	5	235,56 ^{ns}	1,87 ^{ns}	20,0 ^{ns}	0,19 ^{ns}	0,07 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,007 ^{ns}	0,002 ^{ns}	1860,3**
Res	10	208,89	1,11	13,8	0,64	0,1	0,02	0,01	0,002	160,4
CV%		16,9	19,5	21,7	23,7	25,4	18,9	25,8	22,5	32,8
MG		85,6	5,4	17,1	3,4	1,25	0,8	0,36	0,19	36,6
FV	GL	Quadrados Médios								
		G	CPA	CRP	NF	MFPA	MFSR	MSPA	MSSR	CMP
[Fe]	5	342,22 ^{ns}	1,87 ^{ns}	20,0 ^{ns}	0,19 ^{ns}	0,07 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,007 ^{ns}	0,002 ^{ns}	812,8*
Res	10	208,89	1,11	13,8	0,64	0,1	0,02	0,01	0,002	226,6
CV%		16,5	19,5	21,7	23,7	25,4	18,9	25,8	22,5	21,1
MG		87,8	5,4	17,1	3,4	1,25	0,8	0,36	0,19	71,2
FV	GL	Quadrados Médios								
		G	CPA	CRP	NF	MFPA	MFSR	MSPA	MSSR	CMP
[Mn]	5	35,56 ^{ns}	1,87 ^{ns}	20,0 ^{ns}	0,19 ^{ns}	0,07 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,007 ^{ns}	0,002 ^{ns}	605,8 ^{ns}
Res	10	48,89	1,11	13,8	0,64	0,1	0,02	0,01	0,002	523,4
CV%		7,2	19,5	21,7	23,7	25,4	18,9	25,8	22,5	19,6
MG		97,8	5,4	17,1	3,4	1,25	0,8	0,36	0,19	116,9

FV – Fonte de Variação; GL – Graus de Liberdade; CV – Coeficiente de variação; Res – Resíduo; [Al] – concentração de alumínio; [Fe] concentração de ferro; [Mn] concentração de manganês; G – germinação (%); CPA – comprimento da parte aérea (cm); CRP – comprimento da raiz principal (cm); NF – número médio das folhas; MFPA e MFSR - massa fresca da parte aérea e do sistema radicular (g), MSPA e MSSR - massa seca da parte aérea e do sistema radicular (g); CMP – concentração do metal na planta (mg Kg^{-1}) **, * e ns - significativos a 1%, 5% de probabilidade de erro e não significativo respectivamente pelo teste F, respectivamente.

3.1. Germinação e crescimento *in vitro*

Sementes de baru, submetidas à germinação *in vitro* apresentaram 100% de germinação quando cultivadas em meio WPM controle. Quando germinadas em meio WPM suplementando com diferentes concentrações de alumínio, ferro e manganês apresentaram, respectivamente, uma média geral de 86, 84 e 98% (Figura 2). Os valores de germinação observados nos meios de cultivo com as concentrações testadas, independentemente do tipo de metal testado, não diferiram estatisticamente pelo teste aplicado.

Figura 2. Percentual de germinação de baru (*Dipteryx alata* Vogel) aos 60 dias de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de alumínio (Al^{3+}); ferro (Fe^{3+}) e manganês (Mn^{2+}).



ns – não significativo pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Diferentemente dos resultados observados neste experimento, em sementes de pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.), Machado et al. (2015) testaram diferentes concentrações de alumínio, aplicado na forma de solução em papel germitest e verificaram uma redução acentuada da germinação nas sementes. Nas concentrações de 20 e 40 mg L⁻¹, concentrações próximas às estudadas no nosso experimento, os mesmos autores verificaram aproximadamente 50 e 35% de germinação em relação à 73% nas sementes controle.

Em sementes de (*Vigna radiata* L.) uma gramínea, Verma & Pandey (2015) verificaram diferenças significativas entre diferentes concentrações de ferro 200, 300 e 500 μM e tratamento controle (100 μM). Os mesmos autores observaram uma diminuição da germinação de 96% (controle) para 81, 54 e 28%, respectivamente. Considerando que 200 μM equivalem à concentração máxima testada em nosso experimento, 57,2 mg L⁻¹ (27,8 mg L⁻¹ meio WPM + 29,4 mg L⁻¹ de suplementação), o valor observado (86,7%) neste experimento é semelhante ao verificado em *Vigna radiata* (L.) R.Wilczek, apesar deste valor não ter diferido estatisticamente do tratamento controle (100 %).

Kumari et al (2016), em experimento desenvolvido com *Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc., uma espécie de feijão, cultivada *in vitro* com altas concentrações de Mn

(1, 10, 20, 50 e 100 mg L⁻¹) acrescidas ao meio de cultivo obteve 100% de germinação das sementes. Neste caso ficou constatado que, mesmo em níveis tóxicos, o Mn não afetou o mecanismo de germinação.

Quanto ao crescimento *in vitro* de baru, cultivado em meio WPM suplementado com os metais alumínio, ferro e manganês e em diferentes concentrações, não foram observadas diferenças estatísticas significativas para nenhuma das variáveis estudadas (Tabela 3).

Tabela 3. Médias do comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz principal (CRP), número de folhas (NF), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa fresca do sistema radicular (MFSR), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca do sistema radicular (MSSR) de plantas de baru (*Dipteryx alata* Vogel) aos 60 dias de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de alumínio (Al³⁺), ferro (Fe³⁺) e manganês (Mn²⁺).

Concentração (mg L ⁻¹)	CPA (cm)	CRP (cm)	NF	MFPA (g)	MFSR (g)	MSPA (g)	MSSR (g)
Alumínio							
0	5,5 A*	14,6 A	3,6 A	1,28 A	0,77 A	0,35 A	0,18 A
3,5	6,2 A	19,1 A	3,7 A	1,48 A	0,89 A	0,44 A	0,21 A
7,0	4,8 A	19,9 A	3,4 A	1,22 A	0,65 A	0,35 A	0,16 A
10,5	5,1 A	14,5 A	3,1 A	1,26 A	0,76 A	0,36 A	0,18 A
21,0	4,4 A	15,3 A	3,2 A	0,99 A	0,78 A	0,28 A	0,18 A
42,0	6,4 A	19,4 A	3,2 A	1,25 A	0,95 A	0,36 A	0,23 A
Ferro							
0	5,5 A	14,6 A	3,6 A	1,28 A	0,77 A	0,35 A	0,18 A
2,45	6,5 A	18,5 A	3,7 A	1,29 A	0,94 A	0,35 A	0,22 A
4,9	7,0 A	14,6 A	3,2 A	1,29 A	0,64 A	0,37 A	0,17 A
7,35	4,8 A	14,6 A	3,3 A	1,20 A	0,70 A	0,36 A	0,17 A
14,7	6,1 A	13,6 A	3,5 A	1,24 A	0,61 A	0,35 A	0,14 A
29,4	4,5 A	18,8 A	3,6 A	0,91 A	0,76 A	0,28 A	0,20 A
Manganês							
0	5,5 A	14,6 A	3,6 A	1,28 A	0,77 A	0,35 A	0,18 A
0,4	5,9 A	15,5 A	3,8 A	1,22 A	0,63 A	0,37 A	0,16 A
0,8	4,5 A	18,5 A	2,8 A	1,00 A	0,79 A	0,28 A	0,19 A
1,2	6,5 A	17,9 A	3,8 A	1,23 A	0,76 A	0,33 A	0,18 A
2,4	6,5 A	16,6 A	4,1 A	1,22 A	0,73 A	0,32 A	0,18 A
4,8	6,2 A	17,7 A	3,1 A	1,35 A	0,69 A	0,35 A	0,17 A

*Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Os resultados observados neste experimento evidenciaram que mesmo em altas concentrações, metais potencialmente tóxicos como o alumínio, ferro e manganês, não causaram alterações no crescimento e desenvolvimento da planta, quando comparado com o tratamento onde não havia adição de metal (Tabela 3). No entanto, a toxicidade

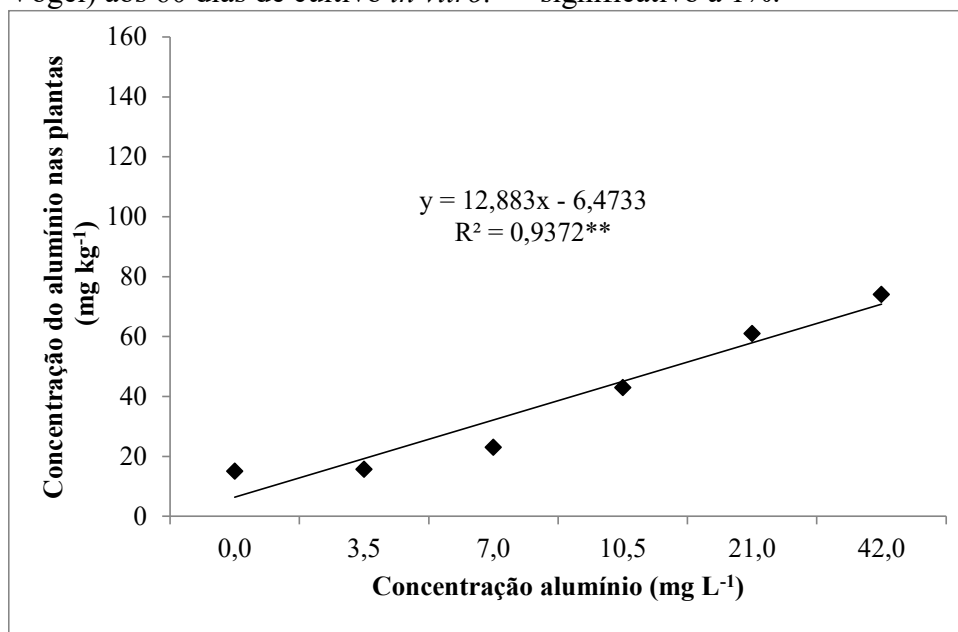
destes elementos está intimamente relacionada a alterações químicas causadas pela acidez do solo e por consequência a sua solubilização na solução do solo (KOCHIAN, 1995).

Neste trabalho o pH do meio de cultivo foi corrigido antes da esterilização em autoclave para 5,8, e após este processo foi verificado que baixou para 5,6. Na natureza, as plantas matrizes doadoras das sementes utilizadas neste experimento, se encontram em solo com pH médio de 3,7, ou seja, propício para a presença das formas tóxicas do alumínio e manganês, sendo encontrado na mesma análise concentrações de 19 mg dm^{-3} para o alumínio, 82 mg dm^{-3} para o ferro e $1,4 \text{ mg dm}^{-3}$ para o manganês. O fato das plantas de baru se desenvolverem num solo com pH ácido e alta concentração de Al^{3+} , Fe^{3+} e Mn^{2+} , indica a provável tolerância da espécie a estes metais e ausência de alterações no crescimento conforme observado neste experimento.

3.2. Análise química da biomassa vegetal

Em relação à concentração de alumínio encontrado na biomassa das plantas de baru (Figura 3) foi possível observar um aumento linear ascendente do metal com o aumento da concentração do elemento no meio de cultivo, significativo a 1% pelo teste aplicado. Ao analisar *in loco* o alumínio acumulado nas plantas de baru é possível observar a presença deste elemento nas plantas cultivadas em meio livre de Al ou meio controle. Provavelmente a presença de Al nas plantas controle (15 mg kg^{-1}) se deve a mobilização do mesmo da própria semente ($\sim 0,146 \text{ mg}$ por semente). Em plantas cultivadas em meio contendo $3,5 \text{ mg L}^{-1}$, menor valor de Al^{3+} testado verificou-se um acúmulo de Al na biomassa de $15,7 \text{ mg kg}^{-1}$, valor próximo ao encontrado nas plantas controle. No entanto, ao observar o alumínio acumulado nas plantas cultivadas em meio suplementado com concentrações de $7,0$ a $42,0 \text{ mg L}^{-1}$ verifica-se um acúmulo significativo nos tecidos (biomassa analisada), respectivamente, 23 e 74 mg L^{-1} .

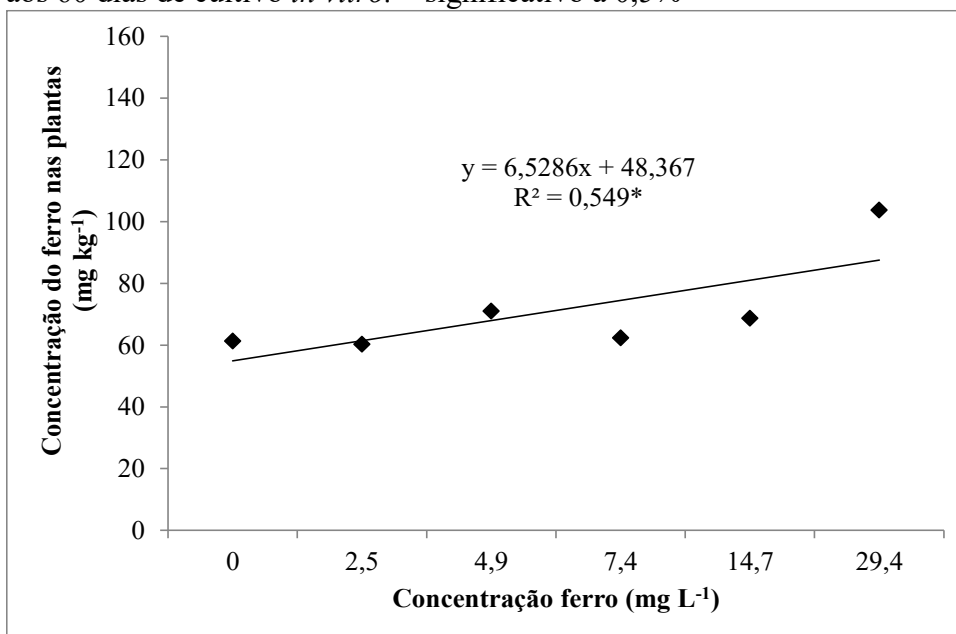
Figura 3. Concentração de alumínio encontrada nas plantas de baru (*Dipteryx alata* Vogel) aos 60 dias de cultivo *in vitro*. ** significativo a 1%.



Plantas acumuladoras de alumínio estão distribuídas por todo o planeta, porém são mais corriqueiras em florestas tropicais com solos ácidos (pH 3-5), com grande índice pluviométrico, abrangendo via de regra plantas lenhosas e perenes (JANSEN et al, 2002). Segundo Jansen et al (2002), uma planta é considerada acumuladora de alumínio quando apresenta mais de 1000 mg kg⁻¹. Neste experimento, considerando o curto período de cultivo (60 dias) e a concentração de alumínio encontrado na biomassa das plantas de baru, podemos inferir que a espécie tem a capacidade de acumular Al³⁺ ao longo do seu crescimento nos tecidos vegetativos (Figura 3), bem como ao final do seu desenvolvimento, nas sementes (Tabela 1).

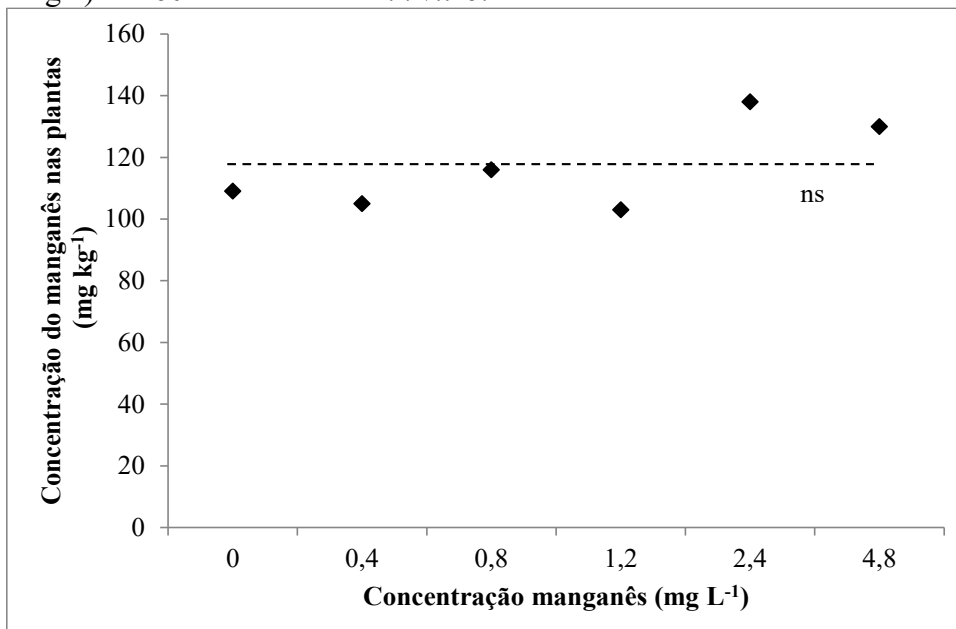
Com relação ao ferro, semelhante ao alumínio, podemos verificar um aumento linear ascendente na concentração de ferro encontrada na biomassa das plantas concomitante ao aumento do elemento no meio de cultivo, dentro da faixa de concentração do elemento utilizadas no estudo (Figura 4).

Figura 4. Concentração de ferro encontrada nas plantas de baru (*Dipteryx alata* Vogel) aos 60 dias de cultivo *in vitro*. * significativo a 0,5%



Quanto ao manganês encontrado na biomassa das plantas, as médias oscilaram entre 103 e 138 mg kg⁻¹, não havendo diferença significativa entre as concentrações testadas (Figura 5).

Figura 5. Concentração de manganês encontrada nas plantas de baru (*Dipteryx alata* Vogel) aos 60 dias de cultivo *in vitro*.



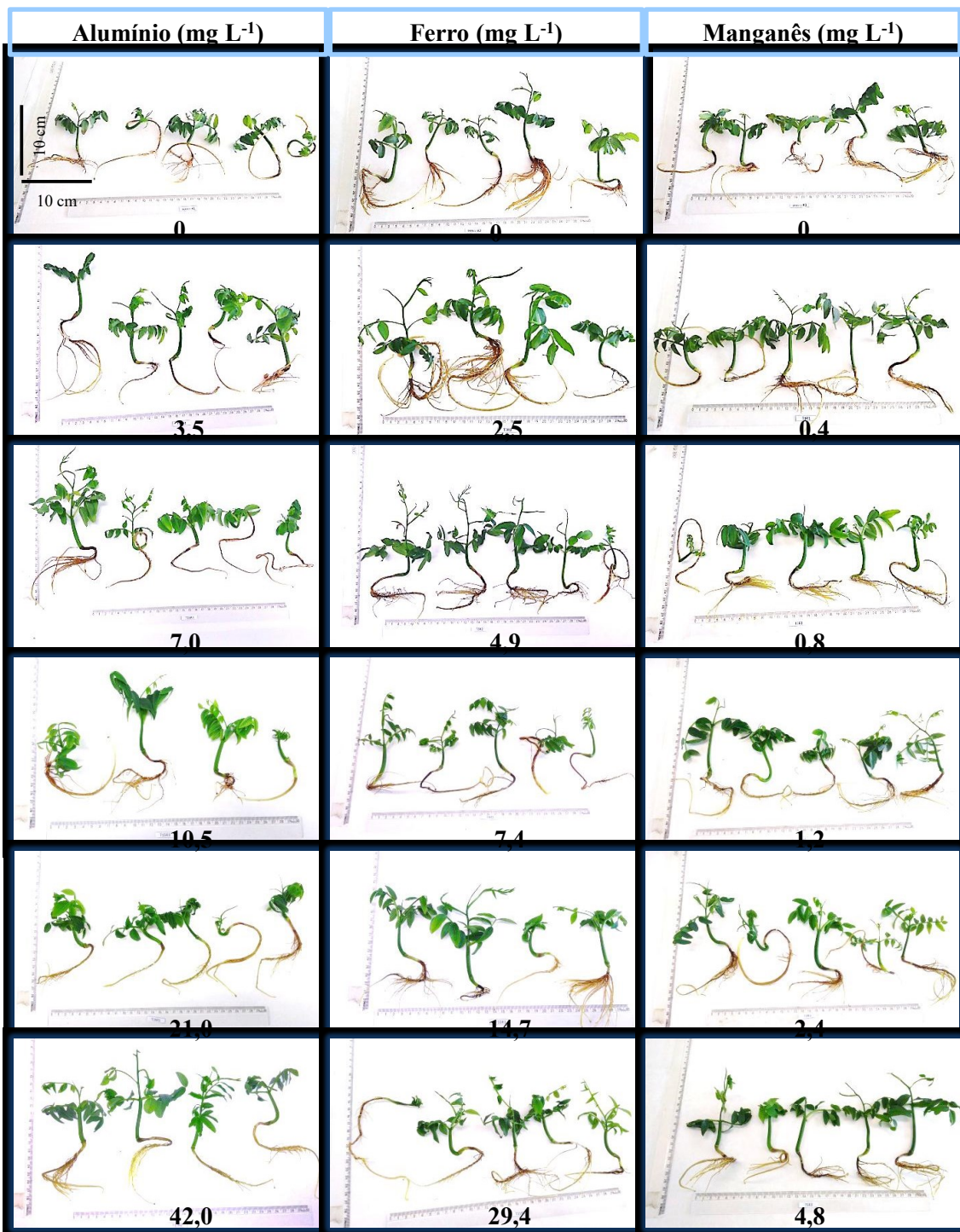
De acordo com Baker & Brooks (1989) plantas capazes de acumular 10000 mg kg⁻¹ de Mn²⁺, ou mais, em sua massa seca, são consideradas hiperacumuladoras. A maior

concentração de Mn presente na massa seca do baru, neste experimento, foi de 169 mg kg⁻¹. É válido considerar as concentrações de Mn²⁺ utilizadas neste trabalho, que podem ser insuficientes para que a planta apresente variações em seu desenvolvimento no período de tempo estudado.

3.3. Aspecto visual das plantas

Quanto ao aspecto visual (Figura 6), de modo geral não foram observadas diferenças expressivas no crescimento das plantas cultivadas em meios acrescidos de diferentes concentrações dos metais Al³⁺, Fe³⁺ e Mn²⁺ em comparação às plantas controle, indicando que concentrações iguais ou superiores as consideradas contaminantes para águas subterrâneas (3,5 mg L⁻¹ para o alumínio, 2,5 mg L⁻¹ para o ferro e 0,4 mg L⁻¹ para o manganês) de acordo com o CONAMA (2009), não exerceram efeitos tóxicos visualmente perceptíveis, como exemplo a clorose ou a oxidação dos tecidos sobre a espécie estudada após 60 dias de cultivo *in vitro*.

Figura 6. Aspecto visual de plantas de baru (*Dipteryx alata* Vogel) aos 60 dias de cultivo *in vitro* em meio WPM acrescido de diferentes concentrações de alumínio (Al^{3+}), ferro (Fe^{3+}) e manganês (Mn^{2+}).



Fonte: o autor

Um dos sintomas da toxicidade do Al^{3+} é em relação à morfoanatomia radicular, ocorrendo um inchaço não direcionado, que destoa do padrão convencional cilíndrico; a inibição do alongamento da raiz e a diminuição ou mesmo a inibição do crescimento de

raízes secundárias (CIAMPOROVA, 2002; JONES & RYAN, 2016). Como pode ser observado (Figura 6), nas concentrações testadas de Al^{3+} neste experimento, não foram observadas alterações na morfologia radicular das plantas de baru aos 60 dias de cultivo.

Já para o Mn^{2+} , os primeiros indícios da toxicidade deste metal são encontrados nos brotos, devido sua facilidade de transporte das raízes para a parte aérea jovem (brotos) nas plantas (ECKHARD et al, 2012). Os sintomas apresentados pelas plantas causados pela toxicidade do manganês podem ser: manchas marrons em folhas maduras, clorose e necrose intervenal, deformação de folhas jovens e retardo de crescimento (FOY et al., 1978; FOY, 1988; WISSEMEIER & HORST, 1992; BALDISSEROTTO et al., 2007; FERNANDO & LYNCH, 2015). O enrolamento foliar e a clorose em folhas jovens, são decorrentes da deficiência de Ca e Fe, respectivamente, que tem sua absorção diminuída pela sua competição com o Mn (ECKHARD et al, 2012).

Quanto aos sintomas causados pelo excesso de Fe^{3+} , Snowden & Wheeler (1993) relatam a diminuição do crescimento da planta e das folhas, a diminuição do teor de clorofila nas folhas mais novas, coloração vermelha e roxa nos caules e folhas mais velhas, murcha de brotos, amarelecimento e morte das folhas velhas, manchas necróticas em folhas velhas, escurecimento das pontas das folhas e bases dos caules; caules mais rígidos; nanismo de raiz; ausência de ramificação das raízes; flacidez da raiz e formação de precipitados nas raízes.

De acordo com os testes realizados, durante a avaliação do experimento, após 60 dias da inoculação das sementes nos meios de cultivo, não foram encontrados nenhum dos sintomas de toxicidade causado pela ação dos metais, como por exemplo clorose, necrose ou oxidação do tecido vegetal nas plantas de baru. Três hipóteses são possíveis para explicar a ausência de toxicidade. Na primeira hipótese, o pH do meio ajustado inicialmente para 5,8, não está baixo o suficiente para solubilizar totalmente os metais em questão; segundo, as concentrações dos metais estudados não foram altas o suficiente para desencadear este tipo de resposta e terceiro, o baru, por se desenvolver naturalmente em solos com pH ácidos, ricos em metais como o alumínio, ferro e manganês, pode ao longo do tempo ter se adaptado e se tornado uma espécie tolerante a presença destes metais.

4. CONCLUSÃO

O cultivo em meio suplementado com Al^{3+} nas concentrações de 3,5 a 42,0 mg L^{-1} , Fe^{3+} (2,5 a 29,4 mg L^{-1}) e Mn^{2+} (0,4 a 4,8 mg L^{-1}), em pH 5,6, não afeta a germinação e o crescimento *in vitro* de baru, sendo os valores observados nos diferentes tratamentos semelhante ao observado nas plantas controle, cultivadas em meio WPM na sua formulação original.

O acúmulo de alumínio e ferro observado na biomassa das plantas, simultâneo ao aumento das concentrações destes elementos no meio de cultivo, indica que a espécie é uma provável acumuladora destes elementos ao longo do seu desenvolvimento, haja vista à presença em concentrações significativas destes elementos também nas sementes.

A ausência de sintomas de toxicidade nas plantas de baru, na presença de alumínio, ferro e manganês indicam que esta espécie é tolerante a estes metais dentro do intervalo de concentrações estudadas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKOVA, D.G. Heavy metals and their general toxicity on plants. **Plant Science Today**, v.5, n.1, p.14-18, 2018.
- AHMAD, K.; EJAZ, A.; KHAN, Z.; GONDAL, S.; FARDOUS, A.; HUSSAIN, A.; SHER, M.; VALEEM, E.E.; ULLAH, SAMI. Evaluation of dynamics of iron and manganese from pasture to buffaloes: a case study of rural livestock farms. **Pakistan Journal of Botany**, v.42, p.3415–3421, 2010.
- ALVES, A.M.; MENDONÇA, A.L.; CALIARI M.; CARDOSO, S.R.A. Avaliação química e física de componentes do baru (*Dipteryx alata* Vogel.) para estudo da vida de prateleira. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, vol. 40, n. 3, p. 266–273, 2010.
- ARARUNA, E.C.; OLIVEIRA, J.P.R.; PEREIRA, V.J.; ASMAR, M.B. Salt concentrations in culture media for the development of *Dipteryx alata in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.52, n.12, p.1295-1300, 2017.
- ATKINS, P.; JONES, L. **Chemistry - Molecules, Matter and Change**. W. H. Freeman 7 Co (SD), New York, 3ed, 1997, 886p.
- BAKER, A.J.M.; BROOKS, R.R. Terrestrial higher plants which hyper-accumulate metallic elements - A review of their distribution, ecology and phytochemistry. **Biorecovery**, v.1, p.81–126, 1989.
- BALDISSEROTO, C.; FERRONI, L.; ANFUSO, E.; PAGNONI, A.; FASULO, M. P.; PANCALDI, S. Responses of *Trapa natans* L. floating laminae to high concentrations of manganese. **Protoplasma**, v.231, n.1-2, p.65–82, 2007.
- BASLAR, S.; KULA, I.; DOGAN, Y.; YILDIZ, D.; AY, G. A study of trace element contents in plants growing at Honaz Dagi-Denizli, Turkey. **Ekoloji**, v.18, n.72, p.1–7, 2009.
- BERNARDINO, C.; MAHLER, C.; PREUSSLER, K.; NOVO, L. State of the Art of Phytoremediation in Brazil - Review and Perspectives. **Water, Air & Soil Pollution**, v.227, n.8, p.272, 2016.
- BIENFAIT, H.F. Regulated redox process at the plasmalemma of plant root cells and their function in iron uptake, **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v.17, p.73-83, 1985.

BOLFE, E.F.; SANO, E.E.; CAMPOS, S.K. **Dinâmica agrícola no cerrado: análises e projeções**. Brasília, DF : Embrapa, 2020.

BRIAT, J.F.; LOBREAUX, S. Iron transport and storage in plants. **Trends in Plant Science**, v.2, n.5, p.187–193, 1997.

BRIAT, J.F.; CURIEURIE, C.; GAYMARD, F. Iron utilization and metabolism in plants. **Current Opinion Plant Biology**, v.10, p.276-282 2007.

BRIAT, J.F.; DUC, C.; RAVET, K.; GAYMARD, F. Ferritins and iron storage in plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1800, n.8, p.806–814, 2010.

BRUNNER, I.; LUSTER, J.; GÜNTHARDT-GOERG, M.D.; FREY, B. Heavy metal accumulation and phytostabilisation potential of tree fine roots in a contaminated soil. **Environmental Pollution**, v.152, n.3, p.559-568, 2008.

CAMPAGNA M.; LUCCHINI R.G.; ALESSIO, L. **Manganese Toxicity**. In: KRETSINGER, R.H.; UVERSKY, V.N.; PERMYAKOV, E.A. (eds) Encyclopedia of Metalloproteins. Springer, New York, 2013.

CARNEIRO, M.A.C.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S. Behavior of herbaceous species in soil mixes with different degree of contamination with heavy metal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.11, p.1629-1638, 2002.

CARVALHO, C.S. **Dipteryx**. In: Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB29628>. Acesso em março de 2020

CIAMPOROVA, M. Morphological and structural responses of plant roots to aluminium at organ, tissue, and cellular levels. **Biologia Plantarum**, v.45, p.161–171, 2002.

CLAIR, S.B.St.; LYNCH, J.P. Element accumulation patterns of deciduous and evergreen tree seedlings on acid soils: implications for sensitivity to manganese toxicity. **Tree Physiology**, v.25, p.85–92, 2005.

CNCFlora. **Dipteryx alata**. In: Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Dipteryx alata](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Dipteryx%20alata). Acesso em outubro de 2019.

CONAMA. 2009. **Resolução nº 420 de 28 de dezembro de 2009**. Disponível em: <http://www2.mma.gov.br/port/conama/res/res09/res42009.pdf>.

- CORRÊA, G.C.; NAVES, R.V.; ROCHA, M.R.; ZICA, L.F. Caracterização física de frutos de baru (*Dipteryx alata* Vog.) em três populações nos Cerrados do Estado de Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.30, n.2, p.5-11, 2000.
- DOGAN, Y.; UGULU, I.; BASLAR, S. Turkish red pine as a biomonitor: a comparative study of the accumulation of trace elements in needles and barks. **Ekoloji**, ed.75, p.88–96, 2010.
- DORAN, P.M. Application of plant tissue cultures in phytoremediation research: incentives and limitations. **Biotechnology and Bioengineering**, v.103, p.60-76, 2009.
- DOU, C.M.; Fu, X.P.; CHEN, X.C.; SHI, J.Y.; & CHEN, Y.X. Accumulation and detoxification of manganese in hyperaccumulator *Phytolacca americana*. **Plant Biology**, v.11, ed.5, p.664–670, 2009.
- DUCIC, T; POLLE, A. Transport and detoxification of manganese and copper in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v.17, n.1, p.103-112, 2005.
- DURKAN, N.; UGULU, I.; UNVER, M.C.; DOGAN, Y.; BASLAR, S. Concentrations of trace elements aluminum, boron, cobalt and tin in various wild edible mushroom species from Buyuk Menderes River Basin of Turkey by ICP-OES. **Trace Elements and Electrolytes**, v.28, n.4, p.242–248, 2011.
- ECKHARD, G.; HORST, W.J.; NEUMANN, E. **Adaptation of Plants to Adverse Chemical Soil Conditions**. In: Marschner, P. (Ed) *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*, p.409–472, 2012.
- EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3ed. Brasília, p353, 2013.
- EPA, U, Health Effects Support Document for Manganese, U.S. **Environmental Protection Agency Office of Water**, Washington, DC, 2003.
- FAGERIA, N.K.; STONE, L.F. **Manejo da acidez dos solos de Cerrado e de várzea do Brasil**. Embrapa Arroz e Feijão, 1999. 42p. (Documentos, 92).
- FERNANDO, D.R.; LYNCH, J.P. Manganese phytotoxicity: new light on an old problem. **Annals of Botany**, v.116, n.3, p.313–319, 2015.
- FERREIRA, C.M.; GABRIEL, G.H.; NEPOMUCENO, L.; CRUZ, V.S.; ARAUJO, E.G. **Caracterização botânica e cadeia produtiva da espécie *Dipteryx alata* Vogel**. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.15 n.28; p. 2018.

- FITTER, A.H.; HAY, R.K. **Environmental physiology of plants**. Academic Press, London, UK, 1989, 423p
- FLOCCO, C.G.; GIULIETTI, A.M. *In vitro* hairy root cultures as a tool for phytoremediation research. In: WILLEY, N. (Ed.), **Phytoremediation Methods in Biotechnology**, v.23, p.161–173, 2007.
- FOY, C.D. Plant adaptation to acid, aluminium-toxic soils. **Journal Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.19, p.959–987, 1988.
- FOY, C.D., CHANEY, R.L., WHITE, M.C. The physiology of metal toxicity in plants. **Annual Reviews Plant Physiology**, v.29, p.511–566, 1978.
- GOMEZ, M.; PAOLA, A.; ATEHORTUA, L. Cell cultures of Choibá *Dipteryx oleifera* Benth. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v.15, n.2, p.124-131, 2013.
- HAIGH, M., 2018. Building a ‘Cradle for Nature’: a paradigm for environmental reconstruction. In: PRASAD, M.N.V., DE CAMPOS, P.J., MAITI, S.K. (Eds.), **Bio-Geotechnologies for Mine Site Rehabilitation**. Elsevier, Amsterdam, 2018, pp.593–616.
- GRAEDEL, T.E. Inorganic elements, hydrides, oxides, and carbonates. In: Chemical compounds in the atmosphere. **New York: Academic Press**; 452 p, 1978.
- HALL, J.L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. **Journal Experimental Botany**, v.53, p.1–11, 2002.
- HARIDASAN, M. Nutritional adaptations of native plants of the cerrado biome in acid soils. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.20, n.3, p.183-195, 2008.
- IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2019-3. <https://www.iucnredlist.org> - Acesso em dezembro de 2019.
- JANSEN, S.; BROADLEY, M.R.; ROBBRECHT, E. Aluminium hyperaccumulation in angiosperms: a review of its phylogenetic significance. **The Botanical Review**, v.68, p.235-269, 2002.
- JONES, D.L.; RYAN, P.R. Aluminum Toxicity. **Plant Physiology and Development**, v.1, p.211-218, 2016.
- KALAIIVANAN, D.; GANESHAMURTHY, A.N. Mechanisms of heavy metal toxicity in plants. **Abiotic Stress Physiology of Horticultural Crops**. Springer, India, 2016, pp.85–102.

KAMPFENKEL, K.; MONTAGU, V.M.; INZÉ, D. Effects of iron excess on *Nicotiana plumbaginifolia* plants (implications to oxidative stress). **Plant Physiology**, v.107, n.3, p.725-735, 1995.

KHAN, A.; KHAN, S.; KHAN, M.A.; QAMAR, Z.; WAQUASA, M. The uptake and bioaccumulation of heavy metals by food plants, their effects on plants nutrients, and associated health risk: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v.22, p.13772–13799, 2015.

KINRAIDE, T.B; Reconsidering the rhizotoxicity of hydroxyl, sulphate, and fluoride complexes of aluminium. **Journal of Experimental Botany**, v.48, p.1115–1124, 1997.

KOCHIAN, L.; PIÑEROS, M.A.; LIU, J.; MAGALAES, J.V. Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum resistance. **Annual Review of Plant Biology**, v.66, p.571– 598, 2016.

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

KOGELMANN, W.J.; SHARPE, W.E. Soil acidity and manganese concentrations in sugar maple stands in Pennsylvania. **Journal of Environmental Quality**, v.35, n.2, p.433-441, 2006.

KOPITTKE, P.M.; MOORE, K.L.; LOMBI, E.; GIANONCELLI, A.; FERGUSON, B.J.; BLAMEY, F.P.C.; MENZIES, N.W.; NICHOLSON, T.M.; MCKENNA, B.A.; WANG, P.; GRESSHOFF, P.M.; KOUROUSIAS, G.; WEBB, R.I.; GREEN, K.; TOLLENAERE, A. Identification of the primary lesion of toxic aluminum in plant roots. **Plant Physiology**, v.167, p.1402–1411, 2015.

KUMARI, K.M.D.V.; NARASIMHAM, D., PARAMESH, K. CHANDRASEKHAR, T. Impacts of cadmium and manganese on *in vitro* seed germination and seedling growth of horsegram. **Indian Journal of Plant Sciences**, v.5, n.1, p.2319–3824, 2016.

KÜPPER, H.; ANDRESEN, E. Mechanisms of metal toxicity in plants. **Metallomics**, v.8, n.3, p.269-285, 2016.

LI, L.; WARD, D.M. Iron toxicity in yeast: transcriptional regulation of the vacuolar iron importer Ccc1. **Current genetics**, v.64, n.2, p.413-416, 2018.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot-tip culture. **Proceedings of the International Plant Propagation Society**, v.30, p.421- 427, 1980.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 5ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, v.1, 2008, 384p.

MACHADO, A. A.; SILVA, J. G. C.; SILVEIRA JUNIOR, P.; CONCEIÇÃO, A. R. **Winstat - Sistema de análise estatística para Windows**, 1999.

MACHADO, J.S.; STEINER, F.; ZOZ, F.; HONDA, G.B.; OLIVEIRA, B.L.N. Effects of aluminum on seed germination and initial growth of physic nut seedlings. **Revista de Agricultura Neotropical**, v.2, n.1, p.24-31, 2015.

MAGALHAES, R.M.A cadeia produtiva da amêndoa do baru (*Dipteryx alata* Vog.) no Cerrado: uma análise da sustentabilidade da sua exploração. **Ciência Florestal**, v.24, n.3, p.665-676, 2014.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. de. **Avaliação do Estado Nutricional das Plantas: princípios e aplicações**. 2ed. Piracicaba: Potafos, 1997. 319p.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**, 2nd edn. London, UK: Academic Press, 889p, 1995.

MARSCHNER, P.; CROWLEY, D.; RENGEL, Z. Rhizosphere interactions between microorganisms and plants govern iron and phosphorus acquisition along the root axis – model and research methods. **Soil Biology and Biochemistry**, v.43, n.5, p.883–894, 2011.

McCAIN, D.C.; MARKLEY, J.L. More manganese accumulates in maple sun leaves than shade leaves. **Plant Physiology**, v.90, p.1417–1421, 1989.

MELHEM, T.S.A. Entrada de água na semente de *Dipteryx alata* Vogel. **Hoehnea**, v.4, p.33-38, 1974.

MEMON, A.R.; SCHRODER, P. Implications of metal accumulation mechanisms to phytoremediation. **Environmental Science and Pollution Research**, v.16, n.2, p.162–175, 2008.

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

- NAGAJYOTI, P.C.; LEE, K.D.; SREEKANTH, T.V.M. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v.8, p.199–216, 2010
- OLDFIELD, S.; LUST, C.; MACKINVEN, A. **The World List of Threatened Trees**. Cambridge, UK: World Conservation Press, 1998. 650p.
- PANDEY, B.; SUTHAR, S.; SINGH, V. Accumulation and health risk of heavy metals in sugarcane irrigated with industrial effluent in some rural areas of Uttarakhand, India. **Process Safety and Environment Protection**, v.102, p.655–666, 2016.
- PEUKE, A.D.; RENNENBERG, H. Phytoremediation. **EMBO Journal**, v.6, p.497–501 2005.
- POGUE, A.I.; LUKIW, W.J. The mobilization of aluminum into the biosphere. **Frontiers in Neurology**, v.5, p.1–4; 2014.
- PULFORD, I.D.; WATSON, C. Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees - a review. **Environment International**, v.29, n.4, p.529–540, 2003.
- RAIJ, B.V.; ANDRADE, J.C. de; CANTARELLA, H.; QUAAGGIO, J.A. **Análise Química para Avaliação da Fertilidade de Solos Tropicais**. IAC, 2001. 285p.
- RIBEIRO, J.F.; WALTER, B.M.T. **Fitofisionomias do Bioma Cerrado**. In: Cerrado: ambiente e flora (SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P., eds.). EMBRAPA/CPAC, Planaltina, p.89-166, 1998.
- ROCHA, L. S.; CARDOSO S.; ANDRADE, R. Implicações nutricionais e sensoriais da polpa e casca de baru (*Dipterix Alata* Vogel.) na elaboração de pães. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.4, p.820-825, 2009.
- ROUT, G.R.; SAHOO, S. Role of iron in plant growth and metabolism. **Reviews in Agricultural Science**, v.3, p.1–24, 2015.
- SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F.; BRITO, M. A. **Baru: biologia e uso**. Embrapa Cerrado, 52 p. 2004 (Documentos, n.116).
- SANTOS, G. G. SILVA, M.R.; LACERDA, D.B.C.L.; MARTINS, D.M. de O.; ALMEIDA, R. de A. Aceitabilidade e qualidade físico-química de paçocas elaboradas com amêndoa de baru. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.42, n.2, p.159-165, 2012.
- SANTOS, E.F.; SANTINI, J.M.K.; PAIXÃO, A.P.; FURLANI Júnior, E.; LAVRES, J.; CAMPOS, M.; REIS, A.R. Physiological highlights of manganese toxicity symptoms in

soybean plants: Mn toxicity responses. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.113, p.6-19, 2017.

SCHMIDT, W.; THOMINE, S.; BUCKHOUT, T.J. Editorial: Iron Nutrition and Interactions in Plants. **Frontiers in Plant Science**, v.10, art.1670, p.1-4, 2020.

SCHMITT, M.; BORAS, S.; TJOA, A.; WATANABE, T.; JANSEN, S. Aluminium accumulation and intra-tree distribution patterns in three *Arbor aluminosa* (Symplocos) species from central sulawesi. **PLOS ONE**, v.11, p.1–18, 2016.

SILVA, T.J.; HANSTED, F.; TONELLO, P.S; GOVEIA, D. Phytoremediation of soils contaminated with metals: current outlook and prospects of use of forest species. **Revista Virtual de Química**, v.11, n.1, p.18-34, 2019.

SILVERIO, M.D.O.; CASTRO, C.F.S.; MIRANDA, A.R. Avaliação da atividade antioxidante e inibitória da tirosinase das folhas de *Dipteryx alata* Vogel (baru). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n.1, p.59-65, 2013.

SIVAGURU, M.; FUJIWARA, T.; SAMAJ, J.; BALUSKA, F.; YANG, Z.; OSAWA, M., T.; MORI, T.; VOLKMANN, D.; MATSUMOTO, H. Aluminum-induced 1→3β-D-glucan inhibits cell-to-cell trafficking of molecules through plasmodesmata. A new mechanism of aluminum toxicity in plants. **Plant Physiology**, v.124, p.991–1006, 2000.

SNOWDEN, R.E.D.; WHEELER, B.D. Iron toxicity to fen plant species. **Journal of Ecology**, v.81, p.35-46, 1993.

SOUSA, A.G.O.; FERNANDES, D.C.; ALVES, A.M.; FREITAS, J.B.; NAVES, M.M.V. Nutritional quality and protein value of exotic almonds and nut from the Brazilian Savanna compared to peanut. **Food Research International**, v.44, p.827- 834, 2011.

SOUZA, L.H.; NOVAIS, R.F.; ALVAREZ, V.; VICTOR, H.;VILLANI, E.M. A. . Efeito do pH do solo rizosférico e não rizosférico de plantas de soja inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum* na absorção de boro, cobre, ferro, manganês e zinco. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.34, n.5, p.1641-1652, 2010.

TABUCHI, A.; MATSUMOTO, H. Changes in cell-wall properties of wheat (*Triticum aestivum*) roots during aluminum - induced growth inhibition. **Physiologia Plantarum**, v.112, p.353–358, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6ed. Porto Alegre: Artmed, 2017, 858p.

TAVARES, S.R.L.; OLIVEIRA, S.A.; SALGADO, C.M. Avaliação de espécies vegetais na fitorremediação de solos contaminados por metais pesados. **Holos**, v.5, p.80-97, 2013.

UGULU, I.; DOGAN, Y.; BASLAR, S.; VAROL, O. Biomonitoring of trace element accumulation in plants growing at Murat Mountain. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v.9, p.527–534, 2012

VERMA, L.; PANDEY, L. The Effect of iron toxicity on seed germination and early seedling growth of green gram (*Vigna radiate* L. Wilczek). **International Journal of Science and Research**, v.6, n.5, p.2319-7064, 2015.

VIEIRA, R.F.; AGOSTINI-COSTA, T. da S.; SILVA, D.B. da; SANO, S.M.; FERREIRA, F.R. **Frutas nativas da região Centro-oeste do Brasil**. Ed. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica. 2010, 322 p.

WILLIAMS, M.; TODD, G.D., RONEY, N., CRAWFORD, J., COLES, C., MCCLURE, P.R.; GAREY, J.D.; ZACCARIA, K.; CITRA, M. **Toxicological profile for manganese**. Atlanta: Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US); 2012, 556p. Disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp.asp?id=102&tid=23>. Acesso em janeiro de 2020.

WISSEMEIER, A.H., HORST, W.J Effect of light intensity on manganese toxicity symptoms and callose formation in cowpea (*Vigna unguiculata*). **Plant Soil**, v.143, p.299–309, 1992.

WONG, M.H.; CHAN, K.C.; CHOY, C.K. The effect of the iron ore tailing on the costal environment of Tolo harbor, Hong Kong. **Environmental Research**, v.15, p.342– 356, 1978.

YANG, J.L.; ZHU, X.F.; PENG, Y.X.; ZHENG, C., LI, G.X.; LIU, Y.; SHI, Y.Z.; ZHENG, S.J. Cell wall hemicellulose contributes significantly to aluminum adsorption and root growth in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v.155, p.1885–1892, 2011.

ZHANG, M. K.; LIU, Z. Y.; WANG, H. Use of Single Extraction Methods to Predict Bioavailability of Heavy Metals in Polluted Soils to Rice. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.41, n.7, p.820–831, 2010.