

BRENDA VILA NOVA SANTANA

**A INFLUÊNCIA DE REGIÕES DE CONTATO ENTRE MEMBRANAS EM
Arabidopsis thaliana E DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM *Pfaffia glomerata* NA
RESISTÊNCIA AO ALUMÍNIO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientadora: Aristéa Alves Azevedo

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S232i
2022

Santana, Brenda Vila Nova, 1992-

A influência de regiões de contato entre membranas em *Arabidopsis thaliana* e da variabilidade genética em *Pfaffia glomerata* na resistência ao alumínio / Brenda Vila Nova Santana. – Viçosa, MG, 2022.

1 tese eletrônica (71 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Aristéa Alves Azevedo.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Vegetal, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.708>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Plantas - Efeito do alumínio. 2. Solos - Teor de alumínio.
3. Genética vegetal. 4. Plantas - Citologia. I. Azevedo, Aristéa
Alves, 1949-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Biologia Vegetal. Programa de Pós-Graduação em Botânica.
III. Título.

CDD 22. ed. 571.954673

Bibliotecário(a) responsável: Euzébio Luiz Pinto CRB-6/3317

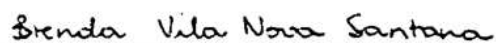
BRENDA VILA NOVA SANTANA

**A INFLUÊNCIA DE REGIÕES DE CONTATO ENTRE MEMBRANAS EM
Arabidopsis thaliana E DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM *Pfaffia glomerata* NA
RESISTÊNCIA AO ALUMÍNIO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 31 de agosto de 2022.

Assentimento:



Brenda Vila Nova Santana
Autora



Aristicéia Alves Azevedo
Orientadora

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Agradeço a minha orientadora Aristéa por todo o apoio, compreensão, conversas, sugestões, conhecimento e parceria dedicada. A senhora é digna de muita admiração! Também ao meu coorientador, Wagner Otoni, por toda a disponibilidade, agilidade e animação contagiante com a ciência.

Agradeço ao departamento de Biologia Vegetal pela estrutura para a condução das pesquisas, pelas disciplinas essenciais a minha formação e pelo apoio técnico, sempre tão eficiente. Salve, Ângelo!

Agradeço ao Abel Rosado, por ter me recebido de braços muito abertos no doutorado sanduíche; a Eun Kyoung que me ensinou desde extração de DNA a como cuidar de um jardim e como falar coreano; ao Matthew pelo divertimento e parceria diária; a Erica, Elisabeth, Ryan, Melissa e a todos os colegas que estiveram comigo na UBC, discutindo em um “journal club” ou bebendo um café no horário de almoço, tornando o Canadá um lugar mais acolhedor.

Agradeço ao pessoal do Laboratório de Anatomia Vegetal, pela convivência harmoniosa que temos. Em especial, obrigada a Naila que me ajudou nos primeiros experimentos e a Aurora e Rosana, que tornam tudo mais organizado e atendem com sorriso no rosto às nossas solicitações. Agradeço também ao pessoal do LCT, em especial a Tati, Evandro e Diego, sempre esclarecendo todas as dúvidas sobre a fáfia.

Agradeço a painho, mainha, Cinthia e, em especial, ao meu irmão Vinni, com quem tive muitos cafezinhos durante a pandemia – como foram significativos! Agradeço também à minha família de biólogos e a tantos outros que me deram suporte. Muito obrigada a quem ajudou e obrigada a quem salvou! É nosso :)

RESUMO

SANTANA, Brenda Vila Nova Santana, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2022. **A influência de regiões de contato entre membranas em *Arabidopsis thaliana* e da variabilidade genética em *Pfaffia glomerata* na resistência ao alumínio.** Orientador: Aristeia Alves Azevedo.

A toxidez do alumínio (Al^{3+}) é um dos maiores fatores limitantes da produtividade agrícola em solos ácidos, por isso, pesquisas sobre resistência ao metal em plantas têm sido de grande interesse. Para este trabalho, objetivou-se elucidar indutores do remodelamento de Regiões de Contato entre Membrana Plasmática e Retículo Endoplasmático (EPCS) em *Arabidopsis thaliana*, avaliando a importância destas regiões na resistência a íons trivalentes; e investigar as respostas de acessos (Ac22 e Ac43) e citótipos (diploide A22 e autopoliploide P28) de *Pfaffia glomerata* ao estresse por Al^{3+} . Plântulas de *A. thaliana* foram submetidas ao alumínio (Al^{3+} , 0 e 1000 μM), lantânio (La^{3+} , 0 e 500 μM) ou gadolínio (Gd^{3+} , 0 e 500 μM), os quais induziram alteração no padrão de organização da proteína SYT1 (responsável por estabilizar as EPCS), modificando-o de reticulado para expressivamente pontoadado. Entretanto, esta modificação não consistiu em um mecanismo de resistência, já que o crescimento de raiz do mutante *syt1* foi igual ao do genótipo selvagem Col-0. Enquanto o tratamento com Al^{3+} levou ao acúmulo do fosfoinositol PI(4)P e do PI(4,5)P₂ na membrana plasmática, La^{3+} e Gd^{3+} induziram o aumento de PI(4)P. Sugere-se que PI(4)P seja o responsável pela indução do padrão pontoadado das EPCS em resposta ao Al, La e Gd. No segundo ensaio, *P. glomerata* foi submetida a 0, 100 e 500 μM Al. Ac22 e Ac43 apresentaram redução gradual no valor de massa seca e o acúmulo de Al nas raízes foi expressivamente maior que nas folhas. Para ambos, o reagente Chrome Azurol S detectou Al nos vacúolos e núcleos na folha e na periferia das raízes, principalmente no ápice radicular, onde a descamação de células da coifa foi mais intensa. A baixa translocação de Al para a parte aérea e o armazenamento do metal em vacúolos garantiram a integridade dos tecidos foliares e a descamação de células da coifa apresentou-se como efeito da toxidez do Al, mas também como mecanismo de resistência. A variação na intensidade das respostas endossa a influência da variabilidade genética e sugerem o acesso 22 como o mais resistente. No terceiro ensaio, A22 e P28 de *P. glomerata* foram submetidos a 0 e 500 μM Al. Ambos os citótipos apresentaram redução significativa no comprimento de raiz, mas apenas a matéria seca foliar de A22 reduziu significativamente. A presença de Al na periferia das raízes e a descamação da coifa em P28 não foi tão marcante quanto em A22. Nas folhas, o Al foi detectado no vacúolo

em A22, e o resultado foi negativo em P28. Os valores de *Fv/Fm*, NPQ e ETR evidenciaram que não há limitação fotoquímica nos citótipos, mas houve redução significativa na taxa fotossintética de A22. A atividade de CAT, APX e SOD foi significativamente maior nas raízes do poliploide P28 em resposta ao estresse por Al. A poliploidia induzida de *P. glomerata* mostrou-se eficiente na criação de um genótipo mais resistente ao estresse por Al que o seu antecessor diploide A22.

Palavras-chave: Sinaptotagmina. Chrome Azurol S. Poliploidia. Cultivo *in vitro*. Metabolismo.

ABSTRACT

SANTANA, Brenda Vila Nova Santana, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2022.
The influence of membrane contact sites in *Arabidopsis thaliana* and genetic variability in *Pfaffia glomerata* on aluminum resistance. Adviser: Aristeia Alves Azevedo.

The toxicity of aluminum (Al^{3+}) is one of the biggest limiting factors of agricultural productivity in acidic soils, therefore, research on metal resistance in plants has been of great interest. For this work, the objective was to elucidate the remodeling inducers of Plasma Membrane and Endoplasmic Reticulum Contact Sites (EPCS) in *Arabidopsis thaliana*, evaluating the importance of these regions in the resistance to trivalent ions; and to investigate the responses of accessions (Ac22 and Ac43) and cytotypes (diploid A22 and autopolyploid P28) of *Pfaffia glomerata* to Al^{3+} stress. *A. thaliana* seedlings were subjected to aluminum (Al^{3+} , 0 and 1000 μM), lanthanum (La^{3+} , 0 and 500 μM) or gadolinium (Gd^{3+} , 0 and 500 μM). The analysis of the expression of the SYT1 protein (responsible for stabilizing the EPCS) shows a change in the pattern of organization after the treatments, changing it from reticulated to expressively punctate. However, this modification was not a resistance mechanism, since the root growth of the *syt1* mutant was the same as that of the wild type Col-0 genotype. While treatment with Al^{3+} led to the accumulation of phosphoinositol PI(4)P and PI(4,5) P_2 in the plasma membrane, La^{3+} and Gd^{3+} induced an increase in PI(4)P. It is suggested that PI(4)P is responsible for inducing the punctate pattern of the EPCS in response to Al, La and Gd. In the second assay, *P. glomerata* was subjected to 0, 100 and 500 μM Al. Ac22 and Ac43 showed a gradual reduction in the dry mass value and the accumulation of Al in the roots was significantly higher than in the leaves. For both, the Chrome Azurol S reagent detected Al in the vacuoles and nuclei in the leaf and in the periphery of the roots, mainly in the root apex, where the desquamation of cap cells was more intense. The low translocation of Al to the shoot and the storage of the metal in vacuoles ensured the integrity of the leaf tissues and the desquamation of the cap cells was an effect of Al toxicity, but also as a resistance mechanism. The variation in the intensity of responses endorses the influence of genetic variability and suggests Ac22 as the most resistant. In the third assay, A22 and P28 of *P. glomerata* were subjected to 0 and 500 μM Al. Both cytotypes showed a significant reduction in root length, but only A22 leaf dry matter significantly reduced. The presence of Al on the periphery of the roots and the desquamation of the cap in P28 was not as marked as in A22. In leaves, Al was detected in the vacuole at A22, and the result was negative at P28. The values of F_v/F_m , NPQ and ETR showed that there is

no photochemical limitation in the cytotypes, but there was a significant reduction in the photosynthetic rate of A22. CAT, APX and SOD activity was significantly higher in P28 polyploid roots in response to Al stress. The induced polyploidy of *P. glomerata* proved to be efficient in creating a genotype more resistant to Al stress than its diploid predecessor A22.

Keywords: Synaptotagmin. Chrome Azulol S. Polyploidy. *In vitro* culture. Metabolism.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	10
Capítulo I: Cátions trivalentes induzem a reorganização de regiões de contato entre a membrana plasmática e o retículo endoplasmático estabilizadas pela proteína SYT1 ...	17
Resumo.....	17
Abstract	18
Introdução	19
Material e métodos	20
Material vegetal, condições de crescimento e aplicação dos tratamentos.....	20
Avaliação do crescimento de raiz.....	21
Quantificação do padrão de distribuição de SYT1	21
Quantificação de inositois fosfato da membrana plasmática	21
Avaliação da dinâmica do Ca^{2+} citosólico.....	22
Análise estatística	22
Resultados e Discussão	22
Conclusão	29
Referências	29
 Capítulo II: Respostas diferenciadas de acessos de <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen ao estresse por alumínio	 33
Resumo.....	33
Abstract	34
Introdução	35
Material e Métodos	36
Obtenção de material vegetal e cultivo <i>in vitro</i>	36
Avaliação da estrutura da raiz	37
Massa seca.....	37
Quantificação de alumínio.....	38
Microscopia de luz	38
Análise estatística	38
Resultados e Discussão	38
Conclusão	44
Referências	45

Capítulo III: Poliploidia em <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen eleva a capacidade de defesa antioxidante em resposta ao estresse por alumínio	50
Resumo	50
Abstract	51
Introdução	52
Material e Métodos	54
Obtenção de material vegetal e cultivo <i>in vitro</i>	54
Parâmetros de crescimento	55
Localização de alumínio nos tecidos vegetais	55
Trocas gasosas e fluorescência da clorofila <i>a</i>	55
Determinação de metabólitos primários	56
Determinação da atividade de enzimas do sistema antioxidante	56
Análise estatística	57
Resultados e Discussão	57
Conclusão	65
Referências	65
 Conclusão Geral	 71

INTRODUÇÃO GERAL

O alumínio (Al) é o terceiro elemento mais abundante e compreende cerca de 7% da massa total da superfície da Terra (SINGH et al., 2017). Apesar da ampla distribuição, o metal não desempenha qualquer função biológica conhecida nas plantas e encontra-se indisponível para a absorção radicular, principalmente sob a forma de aluminossilicatos e óxidos de Al (GREVENSTUK; ROMANO, 2013; SINGH et al., 2017). Reações de solubilização ocorrem em solos ácidos, onde o pH é menor que 5.5, e levam à produção do íon Al^{3+} , altamente tóxico para as plantas (HEDE; SKOVMAND; LOPEZ-CESATI, 2001; MA; CHEN; SHEN, 2014; SINGH et al., 2017; VITORELLO; CAPALDI; STEFANUTO, 2005). A toxidez do Al é, atualmente, um dos maiores fatores limitantes da produtividade agrícola em solos ácidos, os quais ocorrem em cerca de 40% das terras aráveis do mundo (HEDE; SKOVMAND; LOPEZ-CESATI, 2001; KOCHIAN; HOEKENGA; PIÑEROS, 2004; VON UEXKÜLL; MUTERT, 1995); no Brasil, mais de 82% dos solos são ácidos (MENG et al., 2011).

A fitotoxidez é resultado da interação do Al com componentes apoplásticos, como a parede celular, e simplásticos, como membrana plasmática, DNA e componentes citosólicos (BRUNNER; SPERISEN, 2013; JONES; RYAN, 2016; KOCHIAN; HOEKENGA; PIÑEROS, 2004; SINGH et al., 2017). Na raiz, os efeitos são mais imediatos e intensos, onde há enrijecimento das paredes celulares, ruptura do citoesqueleto, inibição da atividade mitótica e/ou alteração das propriedades químicas em questão de minutos (BRUNNER; SPERISEN, 2013; SINGH et al., 2017; VITORELLO; CAPALDI; STEFANUTO, 2005). A perda induzida da plasticidade da parede celular é o sintoma mais característico e pode estar relacionada ao aumento no grau de lignificação da célula, o qual gera comprometimento irreversível do alongamento celular (KOCHIAN, 1995; WANG; KAO, 2006; WU et al., 2019). Na parte aérea, o metal atua indiretamente por meio do estresse oxidativo, prejudicando a assimilação de carbono através de danos gerados à estrutura dos tilacoides, fechamento estomático, redução do teor de pigmentos e/ou redução da taxa de transporte de elétrons no fotossistema II (CÁRCAMO et al., 2019; CHEN et al., 2005; GUO et al., 2018; PEIXOTO; DA MATTA; DA MATTA, 2002).

As plantas respondem à toxidez de maneiras diversas e os mecanismos de resistência ao Al podem ser classificados em dois grandes grupos: a exclusão, quando há evitação do Al no simplasto, e a tolerância, quando metal é absorvido atravessando a membrana plasmática (BRUNNER; SPERISEN, 2013; JONES; RYAN, 2016). A exclusão consiste principalmente

na quelação do Al na rizosfera por meio da ligação com ácidos orgânicos (citrato, malato e oxalato) (BRUNNER; SPERISEN, 2013; JONES; RYAN, 2016), fenilpropanoides (KIDD et al., 2001) e/ou benzoxazinoides (ZHAO et al., 2019). Outros mecanismos são o aumento do pH da rizosfera (KOCHIAN; HOEKENGA; PIÑEROS, 2004; YANG et al., 2011b) e a ligação do metal a componentes da parede celular, como hemiceluloses e pectinas, carregadas negativamente (YANG et al., 2008, 2011a). Já a tolerância é caracterizada pela quelação do Al^{3+} com substâncias orgânicas no citosol, imobilização do metal no vacúolo e parede celular das folhas, ativação de vias metabólicas em resposta à presença do Al (BRUNNER; SPERISEN, 2013).

Pesquisas voltadas para o estudo de mecanismos de resistência ao Al, sejam eles de exclusão ou tolerância, têm sido realizadas em todo o mundo (CÁRCAMO et al., 2019; GUO et al., 2018; MA; CHEN; SHEN, 2014; NUNES-NESI et al., 2014; POSCHENRIEDER, 2015; ZHANG et al., 2019). O objetivo dessas pesquisas é desenvolver tecnologias e produtos que possibilitem a geração de plantas mais resistentes ao estresse por Al, por meio do uso de ferramentas de genômica, transcriptômica, proteômica, metabolômica, bioinformática e transformação genética de plantas. Para este trabalho, foram selecionadas espécies que fornecem subsídio para a exploração de algumas das ferramentas citadas: *Arabidopsis thaliana* e *Pfaffia glomerata*.

A. thaliana é uma espécie amplamente estudada devido às diversas vantagens associadas, como ciclo de vida curto (6 semanas), grande produção de sementes, facilidade de cultivo em laboratório e sequenciamento de todo o genoma (DELATORRE; SILVA, 2008). Recentemente, uma família de proteínas das regiões de contato entre retículo endoplasmático e membrana plasmática (EPCS: *Endoplasmic reticulum - plasma membrane contact sites*) foram identificadas em *A. thaliana*: as sinaptotagminas, ou SYTs (CRAXTON, 2004; LEE et al., 2020; PÉREZ-SANCHO et al., 2015; YAMAZAKI et al., 2010). Estas proteínas agem promovendo a ligação e estabilização entre as membranas e gerando espaços intermembrana muito estreitos (15-20 nm), altamente especializados, capazes de promover a comunicação a curta distância através do transporte não-vesicular. Tais regiões são responsáveis pelo reparo da membrana plasmática, pela homeostase de Ca^{2+} citosólico e por modular respostas a diferentes fontes de estresse (BAYER et al., 2017; MCFARLANE et al., 2017; PÉREZ-SANCHO et al., 2016).

A membrana plasmática é o sítio primário de ligação do Al no simplasto, devido à alta afinidade do metal pelos grupos fosfato, negativamente carregados, da bicamada lipídica (PANDA; MATSUMOTO, 2007; WAGATSUMA et al., 2015). Esta interação altera a composição e as propriedades físicas e dinâmicas da membrana, já que o Al é capaz de promover indiretamente a peroxidação de lipídeos, deslocar íons positivamente carregados e influenciar mecanismos de transporte iônico (EZAKI et al., 2001; PANDA; MATSUMOTO, 2007; SINGH et al., 2017; WAGATSUMA et al., 2015; YAMAMOTO; KOBAYASHI; MATSUMOTO, 2001). Embora seja clara a possibilidade de prejuízos, a dinâmica de influência do Al sobre a membrana plasmática ainda é pouco compreendida e não há estudos que relatem o efeito do Al sobre os espaços intermembrana estabilizados, principalmente, pela proteína SYT1.

P. glomerata, popularmente conhecida como ginseng-do-pantanal ou ginseng-brasileiro, é a espécie de maior importância medicinal e comercial do gênero *Pfaffia* (Amaranthaceae) (NASCIMENTO et al., 2007). É uma espécie de fácil cultivo em laboratório, com propagação clonal, responsiva a diversos fatores ambientais e com o transcriptoma registrado em uma base de dados virtual (BATISTA et al., 2019; CORRÊA et al., 2015; FELIPE et al., 2019; SILVA et al., 2020). Quando exposta ao Al, *P. glomerata* apresentou respostas que variaram de modo intraespecífico; isto é, para a mesma espécie, o acesso BRA acumulou Al em concentração significativamente maior que o acesso JB/UFSM e, como consequência, BRA apresentou efeitos negativos mais pronunciados (MALDANER et al., 2015). Estes resultados demonstram a elevada variabilidade da espécie, mas, embora os autores tenham relatado os efeitos negativos do Al sobre parâmetros de crescimento, não foram avaliados quaisquer mecanismos de resistência ao Al possivelmente empregados pelos acessos de *P. glomerata*.

Em condição *ex vitro*, a poliploidização sintética de *P. glomerata* foi efetiva na produção de indivíduos com maior acúmulo de biomassa e produção de 20-hydroxyecdysone (20E), um metabólito secundário (CORRÊA et al., 2016; GOMES et al., 2014). Contudo, diploides e tetraploides de *P. glomerata* nunca foram confrontados em resposta ao Al, nem tampouco foram avaliadas as possíveis variações no padrão de respostas ao metal. Um único estudo, feito com triticale, aborda a relação entre o nível de ploidia e a toxidez do Al (RYAN et al., 2018). Os resultados são promissores e demonstram que a maior resistência do triticale octaploide se deve à expressão de genes provenientes tanto do trigo quanto do centeio, seus progenitores (RYAN et al., 2018). Embora a poliploidização tenha-se revelado eficaz na geração de indivíduos mais

produtivos e/ou resistentes, de modo geral, pouco se sabe sobre a importância da duplicação de um genoma sobre a diferenciação fisiológica entre citótipos.

Diante do exposto, objetivamos elucidar fatores que induzem o remodelamento de regiões de contato entre membrana plasmática e retículo endoplasmático em *A. thaliana*, avaliando a importância de tais regiões na resistência da espécie a íons trivalentes, como o Al^{3+} . E em um segundo ensaio, investigar as respostas de resistência apresentadas por acessos (Ac22 e Ac43) e citótipos (diploide A22 e poliploide P28) de *P. glomerata* em resposta ao Al^{3+} , avaliando a influência da variabilidade genética sobre parâmetros de crescimento e atividades metabólicas do vegetal. Apresentamos os resultados em três capítulos: I) Cátions trivalentes induzem a reorganização de regiões de contato entre a membrana plasmática e o retículo endoplasmático estabilizadas pela proteína SYT1. Deste, parte dos resultados já foram publicados na Journal of Experimental Botany, sob o título “Rare earth elements induce cytoskeleton-dependent and PI4P-associated rearrangement of SYT1/SYT5 ER-PM contact site complexes in *Arabidopsis*” (LEE et al., 2020); II) Respostas diferenciadas de acessos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen ao estresse por alumínio; e III) Poliploidia em *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen eleva a capacidade de defesa antioxidante em resposta ao estresse por alumínio.

Referências

- BATISTA, D. S. et al. *De novo* assembly and transcriptome of *Pfaffia glomerata* uncovers the role of photoautotrophy and the P450 family genes in 20-hydroxyecdysone production. **Protoplasma**, v. 256, n. 3, p. 601–614, 2019.
- BAYER, E. M. et al. From shaping organelles to signalling platforms: the emerging functions of plant ER–PM contact sites. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 40, n. September, p. 89–96, 2017.
- BRUNNER, I.; SPERISEN, C. Aluminum exclusion and aluminum tolerance in woody plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. June, p. 172, 2013.
- CÁRCAMO, M. P. et al. Aluminum stress differentially affects physiological performance and metabolic compounds in cultivars of highbush blueberry. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 11275, 2019.
- CHEN, L. S. et al. Aluminum-induced decrease in CO_2 assimilation in citrus seedlings is unaccompanied by decreased activities of key enzymes involved in CO_2 assimilation. **Tree Physiology**, v. 25, n. 3, p. 317–24, mar. 2005.

CORRÊA, J. P. O. et al. *In vitro* photoautotrophic potential and *ex vitro* photosynthetic competence of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen accessions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 121, n. 2, p. 289–300, 2015.

CORRÊA, J. P. O. et al. Induced polyploidization increases 20-hydroxyecdysone content, *in vitro* photoautotrophic growth, and *ex vitro* biomass accumulation in *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 52, n. 1, p. 45–55, 2016.

CRAXTON, M. Synaptotagmin gene content of the sequenced genomes. **BMC Genomics**, v. 5, p. 1–14, 2004.

DELATORRE, C. A.; SILVA, A. A. *Arabidopsis thaliana*: uma pequena planta um grande papel. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 31, n. 2, p. 58–67, 2008.

EZAKI, B. et al. Different mechanisms of four aluminum (Al)-resistant transgenes for Al toxicity in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 127, n. 3, p. 918–927, 2001.

FELIPE, S. H. S. et al. Salinity-induced modifications on growth, physiology and 20-hydroxyecdysone levels in Brazilian-ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 140, p. 43–54, 2019.

GOMES, S. S. L. et al. Karyotype, genome size, and *in vitro* chromosome doubling of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 118, n. 1, p. 45–56, 2014.

GREVENSTUK, T.; ROMANO, A. Aluminium speciation and internal detoxification mechanisms in plants: where do we stand? **Metallomics: integrated biometal science**, v. 5, n. 12, p. 1584–94, 2013.

GUO, P. et al. Aluminum effects on photosynthesis, reactive oxygen species and methylglyoxal detoxification in two *Citrus* species differing in aluminum tolerance. **Tree Physiology**, v. 38, n. 10, p. 1548–1565, 2018.

HEDE, A. R.; SKOVMAND, B.; LOPEZ-CESATI, J. Acid Soils and Aluminum Toxicity. In: REYNOLDS, M. P.; ORTIZ-MONASTERIO, J. I.; MCNAB, A. (Eds.). **Application of Physiology in Wheat Breeding**. Mexico: D.F.: CIMMYT, 2001. p. 172–182.

JONES, D. L.; RYAN, P. R. **Aluminum Toxicity**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier, 2016. v. 1

KIDD, P. S. et al. The role of root exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L.). **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 359, p. 1339–1352, 2001.

KOCHIAN, L. V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 46, n. 1, p. 237–260, 1995.

KOCHIAN, L. V.; HOEKENGA, O. A.; PIÑEROS, M. A. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, n. 1, p. 459–493, 2004.

- LEE, E. et al. Rare earth elements induce cytoskeleton-dependent and PI4P-associated rearrangement of SYT1/SYT5 ER-PM contact site complexes in Arabidopsis. **Journal of Experimental Botany**, p. eraa138, 2020.
- MA, J. F.; CHEN, Z. C.; SHEN, R. F. Molecular mechanisms of Al tolerance in gramineous plants. **Plant and Soil**, v. 381, p. 1–12, 2014.
- MALDANER, J. et al. Aluminum accumulation in two *Pfaffia glomerata* genotypes and its growth effects. **Ciência Rural**, v. 45, n. 6, p. 1013–1020, 2015.
- MCFARLANE, H. E. et al. Multiscale structural analysis of plant ER-PM contact sites. **Plant and Cell Physiology**, v. 58, n. 3, p. 478–484, 2017.
- MENG, L. et al. Sensitivity of wetland methane emissions to model assumptions: application and model testing against site observations. **Biogeosciences Discussions**, v. 8, n. 3, p. 6095–6160, 2011.
- NASCIMENTO, E. X. et al. Produção de biomassa de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Plantago major* L. em cultivo solteiro e consorciado. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 3, p. 724–730, 2007.
- NUNES-NESI, A. et al. The complex role of mitochondrial metabolism in plant aluminum resistance. **Trends in Plant Science**, v. 19, n. 6, p. 399–407, 2014.
- PANDA, S. K.; MATSUMOTO, H. Molecular physiology of aluminum toxicity and tolerance in plants. **The Botanical Review**, v. 73, n. 4, p. 326–347, out. 2007.
- PEIXOTO, H. P.; DA MATTA, F. M.; DA MATTA, J. C. Responses of the photosynthetic apparatus to aluminum stress in two sorghum cultivars. **Journal of Plant Nutrition**, v. 25, n. 4, p. 821–832, 2002.
- PÉREZ-SANCHO, J. et al. The Arabidopsis synaptotagmin1 is enriched in endoplasmic reticulum-plasma membrane contact sites and confers cellular resistance to mechanical stresses. **Plant Physiology**, v. 168, n. 1, p. 132–143, 2015.
- PÉREZ-SANCHO, J. et al. Stitching organelles: organization and function of specialized membrane contact sites in plants. **Trends in Cell Biology**, v. 26, n. 9, p. 705–717, 2016.
- POSCHENRIEDER, C. Localization and compartmentation of Al in the leaves and roots of tea plants. **Phyton**, v. 84, p. 87–99, 2015.
- RYAN, P. R. et al. Assessing how the aluminum-resistance traits in wheat and rye transfer to hexaploid and octoploid triticale. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1334, 15 out. 2018.
- SILVA, T. D. et al. Blue and red light affects morphogenesis and 20-hydroxyecdysone content of in vitro *Pfaffia glomerata* accessions. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 203, 1 jan. 2020.
- SINGH, S. et al. Toxicity of aluminium on various levels of plant cells and organism: A review. **Environmental and Experimental Botany**, v. 137, p. 177–193, 2017.
- VITORELLO, V. A.; CAPALDI, F. R.; STEFANUTO, V. A. Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, n. 1, p. 129–143, 2005.

VON UEXKÜLL, H. R.; MUTERT, E. Global Extent, Development and Economic-Impact of Acid Soils. **Plant and Soil**, v. 171, p. 1–15, 1995.

WAGATSUMA, T. et al. Significant role of the plasma membrane lipid bilayers in aluminum tolerance of plants. In: PANDA, S. K.; BALUSKA, F. (Eds.). **Aluminum stress adaptation in plants**. [s.l.] Springer International Publishing, 2015. p. 99–124.

WANG, J. W.; KAO, C. H. Aluminum-inhibited root growth of rice seedlings is mediated through putrescine accumulation. **Plant and Soil**, v. 288, n. 1–2, p. 373–381, 2006.

WU, Y. M. et al. Analysis of interacting proteins of aluminum toxicity response factor ALS3 and CAD in Citrus. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 19, 2019.

YAMAMOTO, Y.; KOBAYASHI, Y.; MATSUMOTO, H. Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in Pea roots. **Plant Physiology**, v. 125, n. 1, p. 199–208, 2001.

YAMAZAKI, T. et al. Arabidopsis synaptotagmin SYT1, a type I signal-anchor protein, requires tandem C2 domains for delivery to the plasma membrane. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 30, p. 23165–23176, 2010.

YANG, J. L. et al. Cell wall polysaccharides are specifically involved in the exclusion of aluminum from the rice root apex. **Plant Physiology**, v. 146, n. 2, p. 602–611, 2008.

YANG, J. L. et al. Cell wall hemicellulose contributes significantly to aluminum adsorption and root growth in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 155, n. 4, p. 1885–1892, 2011a.

YANG, Y. et al. Rhizosphere pH difference regulated by plasma membrane H⁺-ATPase is related to differential Al-tolerance of two wheat cultivars. **Plant, Soil and Environment**, v. 57, n. 5, p. 201–206, 2011b.

ZHANG, X. et al. Molecular mechanisms for coping with al toxicity in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 7, p. 1–16, 2019.

ZHAO, Z. et al. A unique aluminum resistance mechanism conferred by aluminum and salicylic-acid-activated root efflux of benzoxazinoids in maize. **Plant and Soil**, v. 437, n. 1–2, p. 273–289, 2019.

CAPÍTULO I:

CÁTIONS TRIVALENTES INDUZEM A REORGANIZAÇÃO DE REGIÕES DE CONTATO ENTRE A MEMBRANA PLASMÁTICA E O RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO ESTABILIZADAS PELA PROTEÍNA SYT1

Resumo

A comunicação não vesicular, essencial para a homeostase das células, é mediada em regiões de contato entre membranas. O padrão de contato entre a membrana plasmática e o retículo endoplasmático é estabelecido principalmente pela proteína SINAPTOTAGMINA 1 (SYT1) e varia em resposta a diferentes estresses. Visando determinar os fatores que induzem a reorganização de regiões de contato entre a membrana plasmática e o retículo endoplasmático (EPCS) e verificar a importância das EPCS na resistência a estresse, plântulas de *Arabidopsis thaliana* foram submetidas a tratamentos com os íons trivalentes alumínio (Al^{3+} , 0 e 1000 μM), lantânio (La^{3+} , 0 e 500 μM) ou gadolínio (Gd^{3+} , 0 e 500 μM). O mutante *syt1* – com perda de função da proteína SYT1 – apresentou a mesma média de comprimento de raiz que o genótipo selvagem Col-0, após exposição aos tratamentos, o que sugere que a comunicação entre retículo endoplasmático e membrana plasmática não se mostrou um mecanismo de resistência em resposta a íons trivalentes. A análise da expressão da proteína SYT1, marcada com uma *green fluorescent protein* (SYT1-GFP), evidencia alteração no padrão de organização das EPCS após os tratamentos, modificando-o de um padrão reticulado para um expressivamente pontado. O uso do marcador GCaMP3, um sensor de Ca^{2+} baseado na calmodulina, mostra que as variações iniciais na concentração de Ca^{2+} citosólico não foram responsáveis pelo remodelamento das EPCS. A reorganização ocorreu de forma lenta, como resultado de respostas adaptativas celulares a longo prazo (16 horas de exposição aos tratamentos). Enquanto o tratamento com Al^{3+} levou ao acúmulo significativo tanto do fosfoinositol PI(4)P quanto do PI(4,5) P_2 na membrana plasmática, o tratamento com La^{3+} e Gd^{3+} induziu o aumento do sinal de fluorescência apenas de PI(4)P. Embora PI(4,5) P_2 seja comumente acumulado na membrana plasmática em resposta a estresses abióticos, os resultados deste trabalho sugerem que PI(4)P seja o principal atuante na determinação do campo eletrostático da membrana e, portanto, o responsável pela indução do padrão pontado das EPCS em resposta ao Al, La e Gd.

Palavras-chave: Sinaptotagmina. Fosfoinositol. Ca^{2+} citosólico. GCaMP3. Estresse.

CHAPTER I:

TRIVALENT CATIONS INDUCE THE REORGANIZATION OF ENDOPLASMIC RETICULUM - PLASMA MEMBRANE CONTACT SITES STABILIZED BY SYT1 PROTEIN

Abstract

Non-vesicular communication, essential for cell homeostasis, is mediated in membrane contact sites. The contact pattern between the plasma membrane and the endoplasmic reticulum is mainly established by the protein SINAPTOTAGMIN 1 (SYT1) and varies in response to different stresses. In order to determine the factors that induce the reorganization of contact sites between the plasma membrane and the endoplasmic reticulum (EPCS) and verify the importance of EPCS in stress resistance, *Arabidopsis thaliana* seedlings were submitted to treatments with trivalent ions: aluminum (Al^{3+} , 0 and 1000 μM), lanthanum (La^{3+} , 0 and 500 μM) or gadolinium (Gd^{3+} , 0 and 500 μM). The *syt1* mutant – with loss of function of SYT1 protein – showed the same mean root length as the wild-type Col-0 genotype, after exposure to treatments, which suggests that the communication between the endoplasmic reticulum and the plasma membrane was not a resistance mechanism to trivalent ions. The analysis of the expression of SYT1 protein, labeled with a green fluorescent protein (SYT1-GFP), shows a change in the EPCS pattern after treatments, changing it from a reticulated pattern to an expressively punctate pattern. The use of GCaMP3 marker, a Ca^{2+} sensor based on calmodulin, shows that the initial variations in the concentration of cytosolic Ca^{2+} were not responsible for EPCS remodeling. The EPCS reorganization occurred slowly, as a result of long-term cellular adaptive responses (16 hours of exposure to treatments). While Al^{3+} treatment caused a significant accumulation of both phosphoinositol PI(4)P and PI(4,5)P₂ in the plasma membrane, treatments with La^{3+} and Gd^{3+} induced the fluorescence signal only for PI(4)P. Although PI(4,5)P₂ is commonly accumulated in the plasma membrane in response to abiotic stresses, the results of this work suggest that PI(4)P is the main factor in determining the electrostatic field of the membrane and, therefore, responsible for the induction of the EPCS punctate pattern in response to Al, La and Gd.

Keywords: Synaptotagmin. Phosphoinositol. Cytosolic Ca^{2+} . GCaMP3. Stress.

Introdução

Por serem organismos sésseis, as plantas apresentam uma marcante diversidade de mecanismos regulatórios em resposta a estresses, os quais envolvem tanto comunicação vesicular quanto não vesicular (CARTER; BEDNAREK; RAIKHEL, 2004; DICKSON; JENSEN; HILLE, 2016; LEVINE, 2002; MCFARLANE et al., 2017; QIAN et al., 2022). O transporte não vesicular entre organelas é mediado por regiões de contato entre as membranas (MCSs, do inglês *Membrane Contact Sites*), mecanismo tal que é evolutivamente conservado em células eucarióticas (SAHEKI; DE CAMILLI, 2017). Estas regiões estão envolvidas em processos essenciais, como a homeostase e sinalização de cálcio (Ca^{2+}) e no transporte e manutenção de lipídeos, mas também estão fortemente associadas às dinâmicas das membranas e à resposta celular ao estresse (PHILLIPS; VOELTZ, 2016; PRINZ, 2014; STEFAN; MANFORD; EMR, 2013).

Arabidopsis thaliana possui uma família de seis sinaptotagminas (SYT) (CRAXTON, 2001, 2004), das quais SYT1 é a mais abundante, altamente expressa e ocorre principalmente nas regiões de contato entre a membrana plasmática e o retículo endoplasmático (EPCS, do inglês *Endoplasmic Reticulum-Plasma Membrane Contact Sites*) (SCHAPIRE et al., 2008). A presença de SYT1 está associada à maior tolerância aos estresses salino, mecânico e ao congelamento, uma vez que os mutantes *syt1* com perda de função apresentaram hipersensibilidade quando expostos a tais estressores (KAWAMURA; UEMURA, 2003; LEE et al., 2019; PÉREZ-SANCHO et al., 2015; YAMAZAKI et al., 2009). Estudos revelaram que plantas com superexpressão de SYT1 apresentaram ainda menor peroxidação lipídica e induziram a expressão de proteínas de choque térmico, comumente envolvida em respostas a estresse (YAN et al., 2017).

Sob estresse iônico, SYT1 mediou a adaptação celular que resultou na expansão da área das EPCS (LEE et al., 2019). Esta reorganização dá suporte à proposta de que proteínas SYT agem como microdomínios sensíveis ao estresse e de que a maior conectividade entre retículo endoplasmático (ER) e membrana plasmática (MP) facilita a troca de informação no interior da célula (BOTELLA et al., 2007; LEVINE, 2002; ZHU, 2016). A expansão das EPCS em resposta ao estresse salino, por exemplo, está associada ao aumento na ocorrência de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato [$\text{PI}(4,5)\text{P}_2$] na membrana plasmática (LEE et al., 2019) e túbulos do retículo endoplasmático com a presença de SYT1 podem ser desorganizados por consequência da diminuição na concentração de Ca^{2+} intracelular (ISHIKAWA et al., 2018). Apesar disso, a especificidade de $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$, ou de outro fosfato, como um gatilho para a

expansão de EPCS e a dinâmica de organização em resposta à depleção ou excesso de Ca^{2+} permanecem em grande parte inexploradas.

O Ca^{2+} citosólico age, reconhecidamente, como um mensageiro secundário na célula, desencadeando diversos processos metabólicos essenciais e também induzindo respostas de resistência a estresses abióticos (GILROY; BETHKE; JONES, 1993; KNIGHT, 1999; SANDERS et al., 2002). O estresse por alumínio (Al^{3+}) leva ao comprometimento da homeostase deste íon e promove o aumento da concentração de Ca^{2+} no citosol, devido tanto ao maior influxo de Ca^{2+} apoplástico, como também pela maior liberação de Ca^{2+} do interior de organelas (RENGEL; ZHANG, 2003). Em contrapartida, outros íons trivalentes, como os metais de terras raras (ETRs) lantânio (La^{3+}) e gadolínio (Gd^{3+}), são amplamente utilizados como bloqueadores de canais de cátions não seletivos e/ou de canais permeáveis ao Ca^{2+} na membrana plasmática, o que levaria a uma redução na concentração de Ca^{2+} citosólico (DE VRIESE et al., 2018; ELINDER; ARHEM, 1994; ERMAKOV et al., 2010; LANSMAN, 1990). Entretanto, estudos recentes mostram que em tratamentos de longa duração o oposto é observado, e os ETRs promovem, na verdade, a internalização de Ca^{2+} e induzem a endocitose na célula vegetal (WANG et al., 2014, 2016, 2019).

Este trabalho visa avaliar a influência da concentração de Ca^{2+} citosólico e a participação de componentes da membrana plasmática como gatilhos para a reorganização de regiões de contato entre a membrana plasmática e o retículo endoplasmático, estabilizadas pela proteína SYT1. Para isso, Al^{3+} , La^{3+} e Gd^{3+} foram utilizados como agentes estressores em plântulas de *A. thaliana*, visando esclarecer também a importância da atuação das proteínas SYT1 na resistência de *A. thaliana* ao estresse causado por íons trivalentes.

Material e métodos

Material vegetal, condições de crescimento e aplicação dos tratamentos

Sementes de *A. thaliana* Columbia (Col-0) foram utilizadas como genótipo selvagem. Além delas, foram utilizadas sementes de *syt1-2* (LEE et al., 2019), um mutante com perda de função da proteína SYT1; SYT1-*green fluorescent protein* (GFP) (LEE et al., 2019), usadas para visualização da proteína SYT1 sob microscopia confocal; GCaMP3 (DEFALCO et al., 2017), usadas para visualização do cálcio citosólico na célula; e CITRINE-1 $\times$ PH^{FAPP} e CITRINE-2 $\times$ PH^{PLC} (SIMON et al., 2016), usadas para visualização de PI(4)P e PI(4,5)P₂, respectivamente.

As sementes foram semeadas em placas de Petri contendo meio Murashige e Skoog (MS) (MURASHIGE; SKOOG, 1962) a meia força iônica (Caisson Labs). As plântulas foram cultivadas a 22 °C, com ciclo de 16 h de luz/8 h de escuro. Após cinco dias, as plântulas foram transferidas para tratamento em meio MS líquido, a 1/10 de força iônica, suplementado com um dos tratamentos: 1000 μM de Al^{3+} na forma de AlCl_3 (pH 4,5), 500 μM de La^{3+} na forma de LaCl_3 (pH 5.7), 500 μM de Gd^{3+} na forma de GdCl_3 (pH 5.7), 5mM EGTA (pH 5.7) ou 250 μM bis-(o-aminophenoxy) ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid (BAPTA) (pH 5.7). Em paralelo, foram realizados os tratamentos controle em meio MS líquido, a 1/10 de força iônica, com pH 4,5 para tratamento com Al e pH 5,7 para o controle dos demais tratamentos. As plântulas foram submetidas aos tratamentos pelo período de 16 h, sob agitação constante.

Avaliação do crescimento de raiz

Para verificar a importância da EPCS na resposta de tolerância ao estresse por Al, La e Gd, sementes de *A. thaliana* Columbia (Col-0) e *sytl* foram semeadas conforme descrito anteriormente e, após cinco dias, as plântulas foram transferidas para meio MS sólido, 1/10 da força total, acrescido das diferentes concentrações de Al (0 e 1000 μM), La (0 e 500 μM) e Gd (0 e 500 μM), onde cresceram por uma semana. As imagens foram obtidas com o auxílio de um scanner e medidas de comprimento de raiz ($n = 30$) foram feitas utilizando o software Fiji (ImageJ).

Quantificação do padrão de distribuição de SYT1

Imagens em tempo real foram obtidas dos cotilédones de *A. thaliana* ($n = 30$), utilizando microscópio confocal de varredura a laser Nikon C1 equipado com filtros de emissão 488 e 515/30nm e lente objetiva de imersão em óleo Nikon Plan Apochromat, pertencente ao Laboratório de Dinâmica Celular, na University of British Columbia (UBC). As imagens confocais obtidas de cotilédones de plântulas de *Arabidopsis* carregando o marcador SYT1-GFP foram utilizadas para quantificação do padrão de distribuição de EPCS. Com o auxílio do software Fiji (ImageJ), foram selecionadas ao menos 50 regiões de interesse (15 μm x 15 μm) para a contagem do número de “pontos” indicativos da presença de SYT1-GFP, conforme descrito por (LEE et al., 2019).

Quantificação de inositois fosfato da membrana plasmática

As imagens confocais obtidas de cotilédones de plântulas de *A. thaliana* carregando os marcadores CITRINE-1xPH^{FAPP} e CITRINE-2xPH^{PLC}, para a detecção de PI(4)P e PI(4,5)P₂ respectivamente, foram utilizadas para quantificação relativa de inositois fosfato na membrana

plasmática (n = 30). A intensidade de fluorescência expressa pelos marcadores foi quantificada em ao menos 100 regiões de interesse (15 μm $\times$ 15 μm), utilizando a ferramenta de “medida de densidade integrada” do Fiji (ImageJ), conforme descrito por (LEE et al., 2019). Nesta análise, regiões próximas aos estômatos foram descartadas devido ao maior brilho naturalmente apresentado.

Avaliação da dinâmica do Ca^{2+} citosólico

A variação na concentração de Ca^{2+} citosólico foi verificada pela fluorescência emitida pelo sensor GCaMP3 nos cotilédones de *A. thaliana*, no tempo zero (0 hora) e após 16 h de exposição aos cátions trivalentes. As imagens foram obtidas em estereomicroscópio Nikon SMZ18 equipado com filtro de excitação 480/40nm, objetiva 0.5x Nikon P2-SHR Plan 13 Apo e câmera Nikon DS-Ri2. Foram selecionadas pelo menos 50 plântulas para quantificação da intensidade de fluorescência, utilizando a ferramenta de “medida de densidade integrada” do Fiji (ImageJ). Os dados foram normalizados usando a equação $\Delta F/F = (F - F_0)/F_0$, onde F_0 é a média da intensidade de fluorescência do plano de fundo da imagem, considerado como ruído.

Análise estatística

As médias obtidas a partir de cada análise foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e, quando significativa, ao teste de médias de Tukey, com alfa a 5%. Os gráficos e as análises foram feitos no programa estatístico R (R CORE TEAM, 2013).

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos podem ser agrupados em dois padrões de resposta: i) uma mais branda, sem relação clara com a sinalização de Ca^{2+} e associada ao acúmulo de PI(4)P e PI(4,5)P₂ na membrana plasmática, obtida em resposta ao tratamento com Al^{3+} , e ii) uma mais intensa, com expressiva reorganização das EPCS, associada à via de sinalização de Ca^{2+} e ao acúmulo de PI(4)P na membrana plasmática.

Avaliando o crescimento de raiz, o mutante *syt1* não apresentou uma especificidade de resposta em decorrência do estresse por Al. Após sete dias crescendo em meio com o acréscimo de 1000 μM Al, a média de comprimento de raiz do mutante *syt1* foi estatisticamente semelhante ao das plântulas do genótipo selvagem Col-0, com expressão regular da proteína SYT1 (Fig.1). Este resultado dá indícios de que a conectividade entre as membranas do retículo endoplasmático e a membrana plasmática não consiste em um mecanismo de tolerância de

Arabidopsis ao estresse por Al. Em exposição a 160mM NaCl, plântulas do mutante *syt1* apresentaram hipersensibilidade, com a inibição do crescimento radicular comprovadamente causada pela modificação no gene SYT1 (SCHAPIRE et al., 2008). Para La^{3+} e Gd^{3+} , também não foi identificada a redução significativa do crescimento de raiz em decorrência do estresse (LEE et al., 2020).

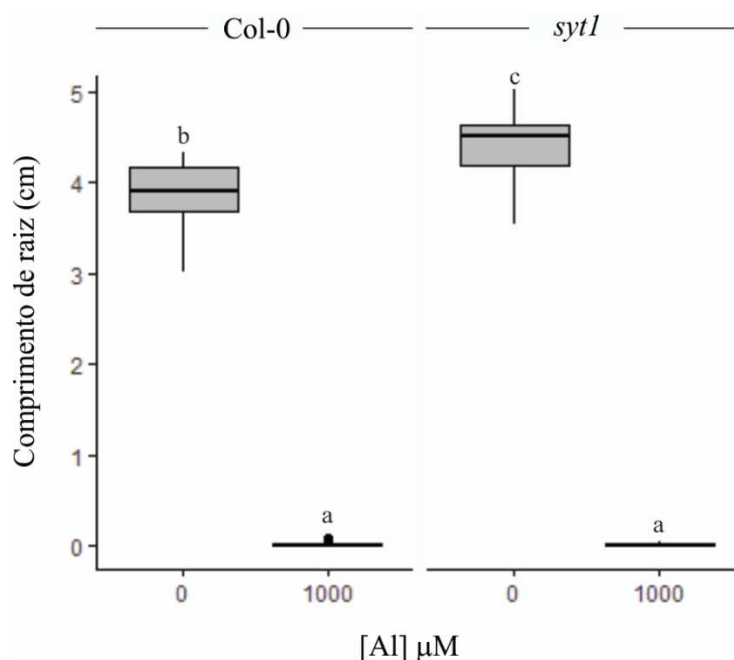


Figura 1 – Comprimento de raiz de *Arabidopsis thaliana* (Col-0: genótipo selvagem e *syt1*: mutante com perda de função da proteína SYT1) em resposta ao tratamento com Al. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa usando teste Tukey ($P < 0.05$).

Apesar disso, a análise da expressão da proteína SYT1, marcada com uma *green fluorescent protein* (GFP), comprova alteração no padrão de organização das EPCS (Fig.2). Em células epidérmicas de cotilédones de *Arabidopsis* do tratamento controle, eram observados cerca de 35 “pontos” a cada 225 μm^2 , enquanto no tratamento com 1000 μM Al, cerca de 40 “pontos” são encontrados na mesma área. Esta reorganização está associada ao aumento na proporção dos inosítois fosfato PI(4)P e PI(4,5)P₂ na membrana plasmática, cujas médias de fluorescência relativa foram estatisticamente maior em plântulas expostas por 16 h ao tratamento com 1000 μM Al (Fig.3).

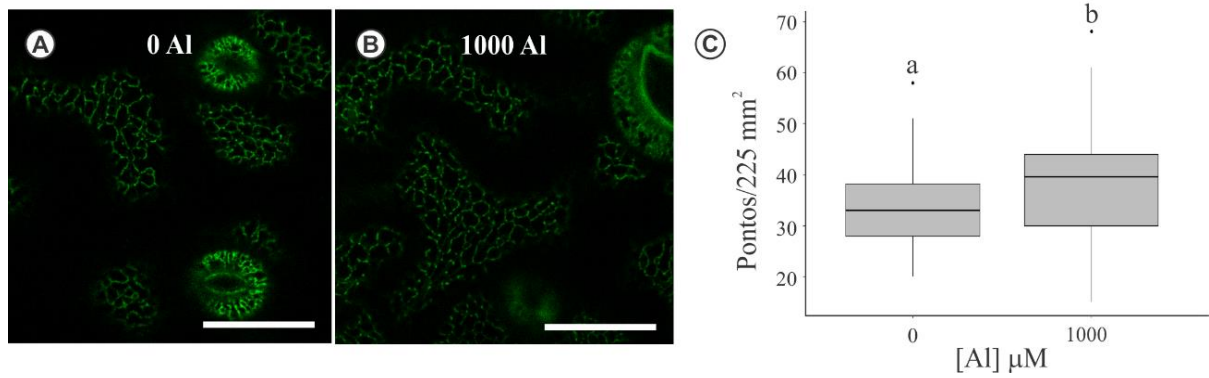


Figura 2 - Padrão de organização da proteína SYT1 em células epidérmicas de cotilédones de *Arabidopsis thaliana* portando o marcador SYT1-GFP, nos tratamentos com e sem Al. A e B: Imagens de microscopia confocal. C: Quantificação do sinal cortical de SYT1-GFP. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa usando teste Tukey ($P < 0.05$). Barra = 10 μm .

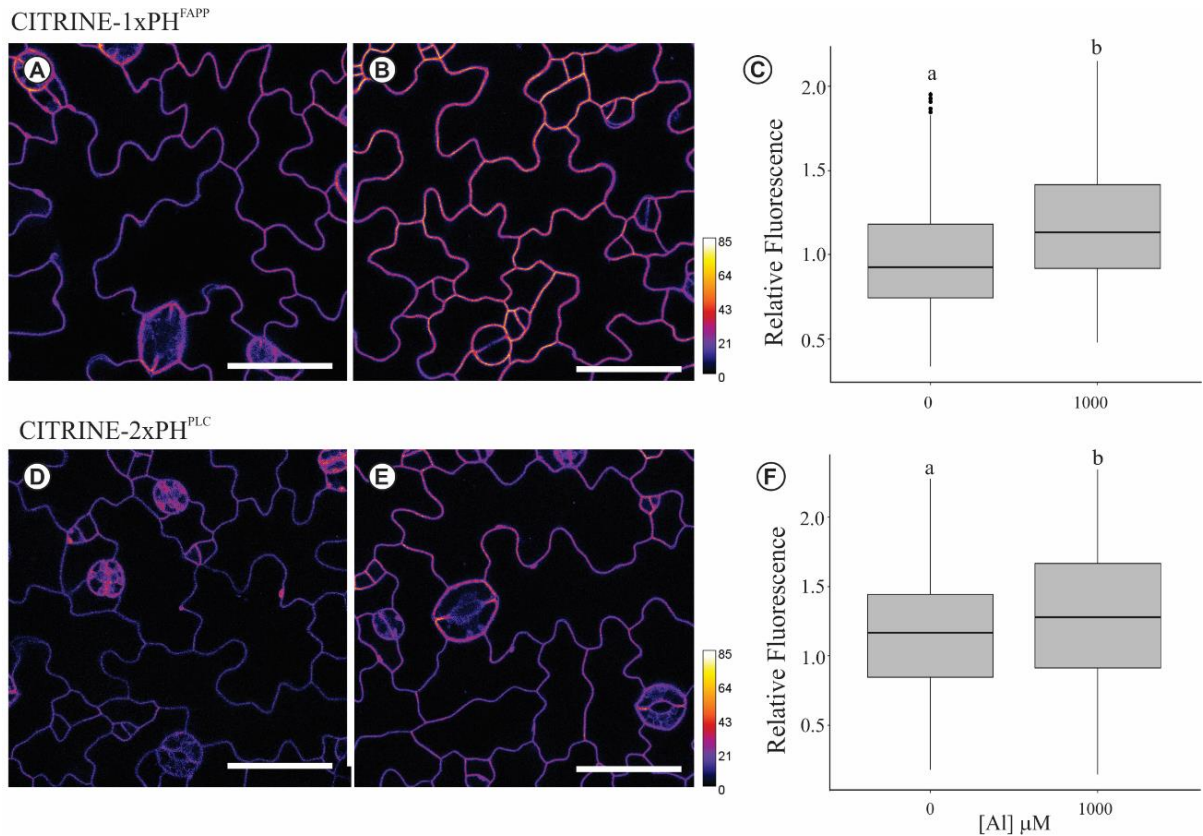


Figura 3 - Aumento na frequência relativa de inositois fostato (PI), após tratamento com Al, em células epidérmicas de cotilédones de *Arabidopsis thaliana* expressando os marcadores CITRINE-1xPH^{FAPP} para identificação de PI(4)P (A-B) e CITRINE-2xPH^{PLC} para identificação de PI(4,5)P₂ (D-E). A-B, D-E: Imagens de microscopia confocal. C e F: Quantificação da fluorescência relativa dos marcadores CITRINE-1xPH^{FAPP} e CITRINE-2xPH^{PLC}. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa usando teste Tukey ($P < 0.05$). Barra = 30 μm .

Em contraste ao tratamento com o Al^{3+} , os elementos de terras raras La^{3+} e Gd^{3+} induziram a redistribuição de SYT1-GFP para um padrão expressivamente pontoado (Fig.4). Após 16 h de tratamento, La^{3+} e Gd^{3+} induziram o aumento de 4 a 5 vezes no número de “pontos” em todas as células epidérmicas. Esta alteração está associada à lenta internalização dos ETRs para o citosol, como sugerido por Wang et al. (2014, 2016, 2019). Para provar isso, nós adicionamos EGTA, um quelante que forma complexos estáveis tanto com ETRs quanto com o Ca^{2+} (TEI et al., 2010), de modo a evitar a entrada de ETRs no simplasto e, portanto, evitar o remodelamento das EPCS. Em paralelo, tratamentos apenas com EGTA e BAPTA (BRAULT et al., 2004; NAKAGAWA et al., 2007), um outro quelante de Ca^{2+} extracelular, foram realizados a fim de verificar se a depleção de Ca^{2+} promoveria alteração no arranjo das EPCS (Fig.4). A suplementação com EGTA mostrou-se eficaz no impedimento do remodelamento das EPCS em tratamentos com La^{3+} e Gd^{3+} (Fig. 5) e a depleção de Ca^{2+} apoplástico induzida por EGTA e BAPTA, após 16 h de tratamento, gerou um aumento de apenas 1,5 a 1,8 vezes no número de “pontos” de SYT1. Estes resultados sugerem que a internalização de ETRs, e não a baixa concentração de Ca^{2+} , é responsável por induzir a reorganização das EPCS.

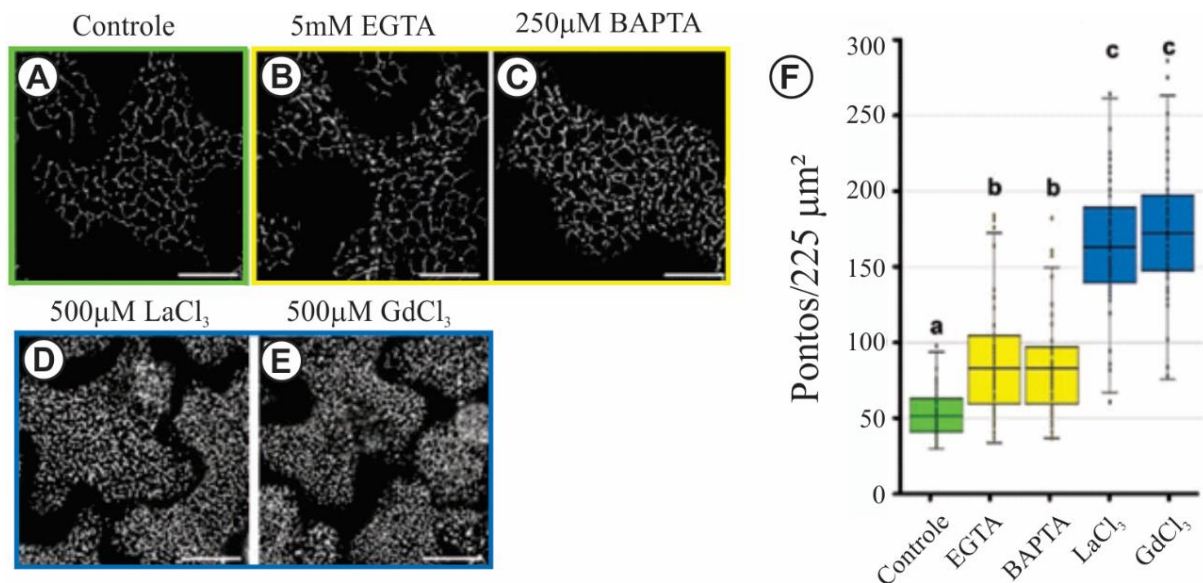


Figura 4 - Padrão de organização da proteína SYT1 em células epidérmicas de cotilédones de *Arabidopsis thaliana*. A-E: Imagens de microscopia confocal. A: tratamento controle. B: em depleção de Ca^{2+} extracelular (5mM EGTA). C: em 250µM BAPTA. D-E: na presença de elementos de terras raras (500µM LaCl_3 em D, 500 µM GdCl_3 em E). F: Quantificação do sinal cortical de SYT1-GFP. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa usando teste Tukey ($P < 0.05$). Barra = 20 µm. Imagens publicadas em Lee et al. (2020).

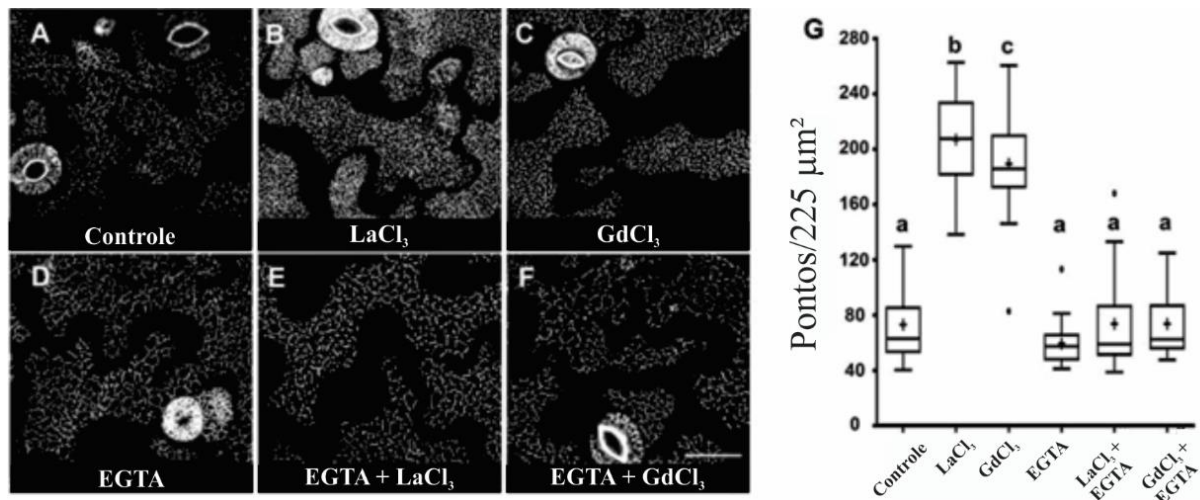


Figura 5 - Padrão de distribuição de SYT1-GFP em células epidérmicas cotiledonares de plântulas de *Arabidopsis thaliana* crescidas em meio controle (A) ou suplementado com LaCl_3 (B), GdCl_3 (C), EGTA (D), ou as combinações de EGTA e LaCl_3 (E) ou EGTA e GdCl_3 (F). G: Quantificação do sinal cortical de SYT1-GFP. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa usando teste Tukey ($P < 0.05$). Barra = 20 μm . Imagens publicadas em Lee et al. (2020).

As proteínas SYT possuem três domínios: um transmembrana, afixado no RE; um de transferência de moléculas; e dois subdomínios conservados com alta afinidade ao Ca^{2+} , o C2A e o C2B (SCHAPIRE et al., 2008). Associado a isso, o fato de SYTs em mamíferos serem sensíveis a mudanças na concentração de Ca^{2+} citosólico (SAHEKI; DE CAMILLI, 2017) corrobora a ideia de que a sinalização pelo Ca^{2+} possa influenciar a localização e a dinâmica de proteínas SYT. O uso do marcador GCaMP3 (TIAN et al., 2009), um sensor de Ca^{2+} baseado na calmodulina, mostra que, para o tratamento com Al^{3+} , não foi possível identificar variação na concentração de Ca^{2+} citosólico, após 16h de exposição (Fig. 6). Entretanto, nos tratamentos com La^{3+} e Gd^{3+} , o sinal de fluorescência de GCaMP3 foi de 2 a 3 vezes mais intenso após 16 h de exposição (Fig. 7). O tratamento combinado de ETRs com a adição de EGTA levou a um resultado semelhante ao encontrado para o tratamento controle, evidenciando que o sinal de fluorescência observado para GCaMP3 é oriundo da lenta internalização dos ETRs, os quais podem agir como substitutos do Ca^{2+} e podem se ligar a domínios com afinidade pelo íon (MILLS; JOHNSON, 1985; WANG et al., 2016; YE et al., 2005).

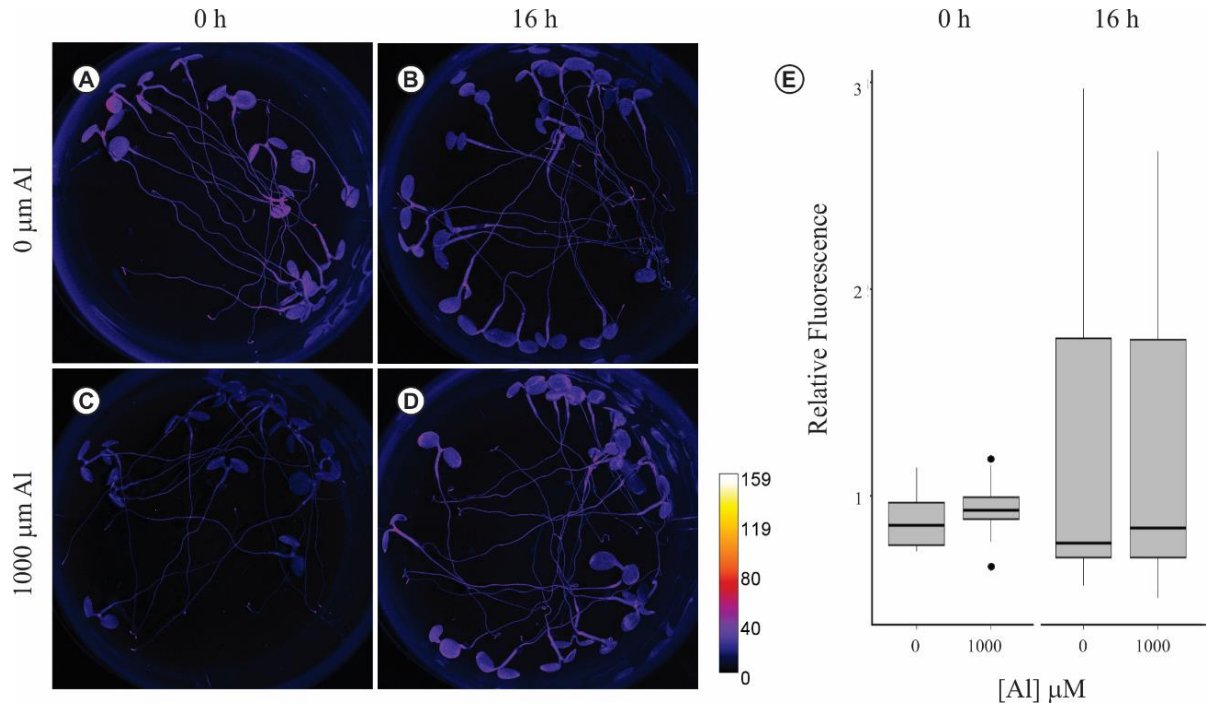


Figura 6 - Imagens de fluorescência de plântulas de *Arabidopsis thaliana* expressando o sensor de Ca^{2+} GCaMP3. A-D: Plântulas com e sem a adição de Al ao meio, no tempo 0 e após 16h de exposição. A atividade do sensor de Ca^{2+} é vista pela intensidade de cor, conforme a escala de 0 a 159. E: Quantificação da fluorescência de GCaMP3 relativa ao tratamento controle, no tempo 0.

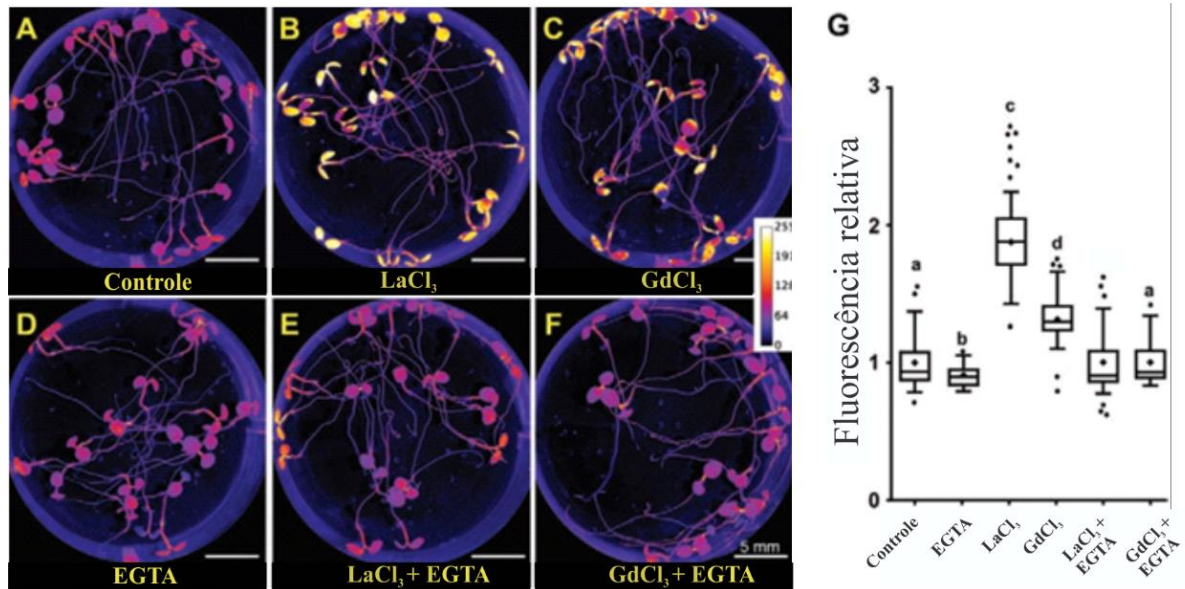


Figura 7 - Imagens de fluorescência de plântulas de *Arabidopsis thaliana* expressando o sensor de Ca^{2+} GCaMP3. A-F: Plântulas após 16h em meio controle (A) ou suplementado com LaCl_3 (B), GdCl_3 (C), EGTA (D), ou as combinações de EGTA e LaCl_3 (E) ou EGTA e GdCl_3 (F). A atividade do sensor de Ca^{2+} é vista pela intensidade de cor, conforme a escala apresentada. G: Quantificação da fluorescência de GCaMP3 relativa ao tratamento controle. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa usando teste Tukey ($P < 0.05$). Barra = 5 mm. Imagens publicadas em Lee et al. (2020).

Ishikawa et al. (2018) propuseram que SYT1 responde a uma diminuição, em vez de a um aumento na concentração de Ca^{2+} citosólico, devido à atividade do La^{3+} como bloqueador do canal de Ca^{2+} na membrana plasmática. Entretanto, os resultados deste trabalho mostram que, em tratamentos de longo prazo, ETRs são internalizados e são capazes de mimetizar sinais intracelulares de Ca^{2+} . Ao contrário dos tratamentos com NaCl , os quais levaram a uma expansão das EPCS dentro de poucas horas (LEE et al., 2019), aqui é sugerido que, uma vez internalizados, ETRs são capazes de promover mudanças lentas na comunicação entre retículo endoplasmático e membrana plasmática. Este efeito pode ocorrer tanto por meio da ativação da sinalização da calmodulina ou mesmo por ligação direta dos elementos aos domínios de ligação de SYT1, uma vez que, *in vitro*, os ETRs podem atuar como reguladores alostéricos da atividade das calmodulinas (MILLS; JOHNSON, 1985; WANG et al., 2016) e de proteínas contendo domínios C2 (ESSEN et al., 1997).

Enquanto o tratamento com Al^{3+} levou ao acúmulo significativo tanto de PI(4)P e PI(4,5)P_2 na membrana plasmática (Fig. 3), o tratamento com La^{3+} induziu o aumento do sinal de fluorescência de PI(4)P , mas não levou ao acúmulo de PI(4,5)P_2 (Fig. 8). Mudanças na proporção de inositois fosfato na membrana plasmática podem influenciar sua superfície eletrostática (SIMON et al., 2016) e regular a afinidade de componentes da proteína SYT1 em se ligar à membrana. Em plântulas de *Arabidopsis* expostas ao estresse salino, o acúmulo de ambos os PI(4)P e PI(4,5)P_2 esteve associado à reorganização das EPCS (SIMON et al., 2016). Entretanto, embora PI(4,5)P_2 seja comumente acumulado na membrana plasmática em resposta a estresses abióticos (QIAN et al., 2022), os resultados deste trabalho sugerem que PI(4)P seja o principal atuante na determinação do campo eletrostático da membrana, já que foi suficiente para o rearranjo pontado em resposta ao estresse por LaCl_3 .

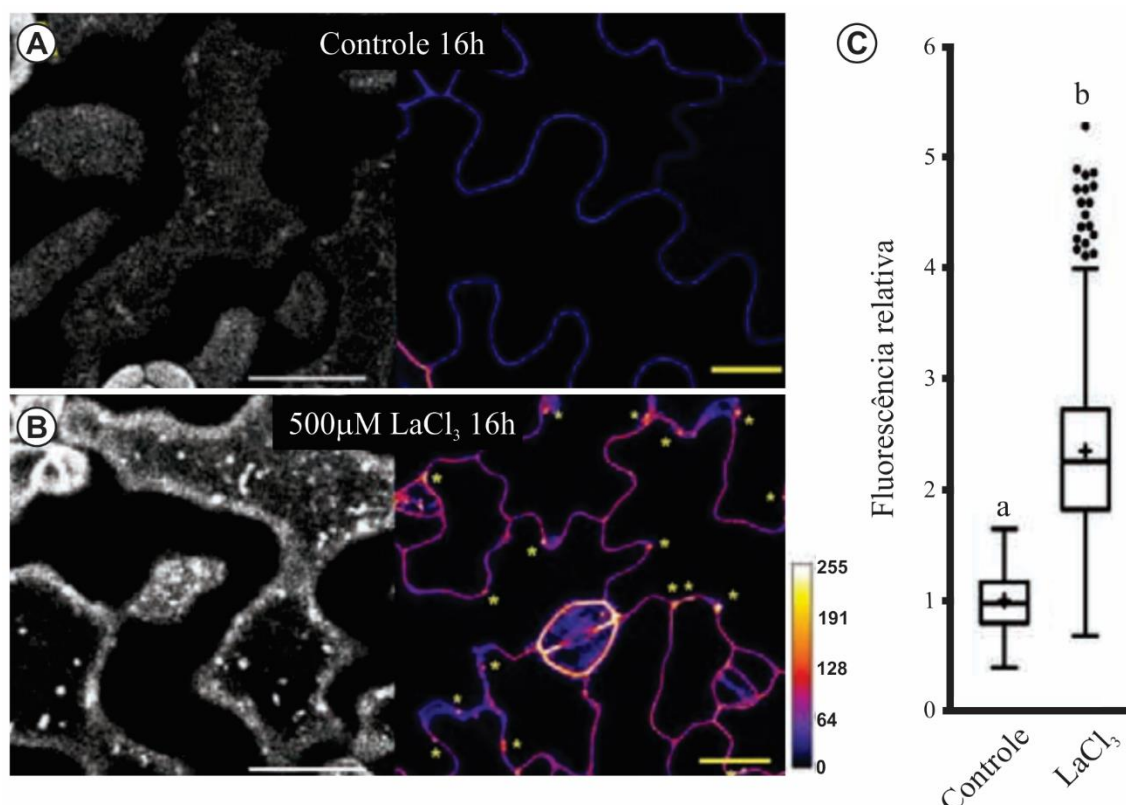


Figura 8 - Células epidérmicas de cotilédones de *Arabidopsis thaliana* expressando o marcador CITRINE-1xPH^{FAPP}, com e sem 500μM de LaCl₃, após 16h de tratamento. A-B: Imagens de microscopia confocal. A: Controle. B: Aumento na frequência relativa de PI(4)P após tratamento com LaCl₃. C: Quantificação da fluorescência relativa do marcador CITRINE-1xPH^{FAPP}. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa usando teste Tukey (P<0.05). Barra = 20 μm. Imagens publicadas em Lee et al. (2020).

Conclusão

Os resultados mostram que os cátions induziram a reorganização das EPCS, de modo a aumentar a quantidade de pontos de contato entre as membranas. Acredita-se que as respostas de SYT1 ao estresse por íons trivalentes não sejam guiadas por uma resposta rápida associada a alterações na concentração de cálcio citosólico, mas sim, como uma consequência de respostas adaptativas celulares a longo prazo. O remodelamento exige a modificação lenta na composição lipídica da membrana plasmática, com acúmulo especialmente de PI(4)P. A comunicação entre retículo endoplasmático e membrana plasmática não se mostrou um mecanismo de resistência essencial em resposta a íons trivalentes.

Referências

BOTELLA, M. A. et al. Plant Adaptive Responses to Salinity Stress. In: **Plant Abiotic Stress**. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2007. p. 37–70.

- BRAULT, M. et al. Plasma membrane depolarization induced by abscisic acid in *Arabidopsis* suspension cells involves reduction of proton pumping in addition to anion channel activation, which are both Ca^{2+} dependent. **Plant Physiology**, v. 135, n. 1, p. 231–243, 2004.
- CARTER, C. J.; BEDNAREK, S. Y.; RAIKHEL, N. V. Membrane trafficking in plants: New discoveries and approaches. **Current Opinion in Plant Biology** v. 7, n. 6, p.701-707, 2004.
- CRAXTON, M. Genomic analysis of synaptotagmin genes. **Genomics**, v. 77, n. 1–2, p. 43–49, 1 ago. 2001.
- CRAXTON, M. Synaptotagmin gene content of the sequenced genomes. **BMC Genomics**, v. 5, p. 1–14, 2004.
- DE VRIESE, K. et al. Pharmacological strategies for manipulating plant Ca^{2+} signalling. **International Journal of Molecular Science**, v. 19, n. 5, p. 1506, 18 maio 2018.
- DEFALCO, T. A. et al. Using GCaMP3 to Study Ca^{2+} Signaling in Nicotiana Species. **Plant and Cell Physiology**, v. 58, n. 7, p. 1173–1184, 1 jul. 2017.
- DICKSON, E. J.; JENSEN, J. B.; HILLE, B. Regulation of calcium and phosphoinositides at endoplasmic reticulum-membrane junctions. **Biochemical Society Transactions**, v. 44, n. 2, p. 467-473, 15 abr. 2016.
- ELINDER, F.; ARHEM, P. Effects of gadolinium on ion channels in the myelinated axon of *Xenopus laevis*: four sites of action. **Biophysical Journal**, v. 67, n. 1, p. 71–83, 1994.
- ERMAKOV, Y. A. et al. Gadolinium ions block mechanosensitive channels by altering the packing and lateral pressure of anionic lipids. **Biophysical Journal**, v. 98, n. 6, p. 1018–1027, 17 mar. 2010.
- ESSEN, L. O. et al. A ternary metal binding site in the C2 domain of phosphoinositide- specific phospholipase C- δ 1. **Biochemistry**, v. 36, n. 10, p. 2753–2762, 11 mar. 1997.
- GILROY, S.; BETHKE, P. C.; JONES, R. L. Calcium homeostasis in plants. **Journal of Cell Science**, v. 106, p. 453-462, 1993.
- ISHIKAWA, K. et al. Synaptotagmin-associated endoplasmic reticulum-plasma membrane contact sites are localized to immobile ER tubules. **Plant Physiology**, v. 178, n. 2, p. 641–653, 2018.
- KAWAMURA, Y.; UEMURA, M. Mass spectrometric approach for identifying putative plasma membrane proteins of *Arabidopsis* leaves associated with cold acclimation. **Plant Journal**, v. 36, n. 2, p. 141–154, out. 2003.
- KNIGHT, H. Calcium signaling during abiotic stress in plants. **International Review of Cytology**, v. 195, p. 269-324, 2000.
- LANSMAN, J. B. Blockade of current through single calcium channels by trivalent lanthanide cations: Effect of ionic radius on the rates of ion entry and exit. **Journal of General Physiology**, v. 95, n. 4, p. 679–696, 1 abr. 1990.
- LEE, E. et al. Ionic stress enhances ER–PM connectivity via phosphoinositide-associated SYT1 contact site expansion in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 4, p. 1420–1429, 2019.

- LEE, E. et al. Rare earth elements induce cytoskeleton-dependent and PI4P-associated rearrangement of SYT1/SYT5 ER-PM contact site complexes in Arabidopsis. **Journal of Experimental Botany**, v. 71, n. 14, p. 3986–3998, 2020.
- LEVINE, A. Regulation of stress responses by intracellular vesicle trafficking? **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 6–8, p. 531–535, 2002.
- MCFARLANE, H. E. et al. Multiscale structural analysis of plant ER-PM contact sites. **Plant and Cell Physiology**, v. 58, n. 3, p. 478–484, 2017.
- MILLS, J.; JOHNSON, J. Metal ions as allosteric regulators of calmodulin. **J Biol Chem.**, v. 260, n. 28, p. 15100–5, 1985.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962.
- NAKAGAWA, Y. et al. Arabidopsis plasma membrane protein crucial for Ca^{2+} influx and touch sensing in roots. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 9, p. 3639–3644, 27 fev. 2007.
- PÉREZ-SANCHO, J. et al. Plasma membrane lipid remodeling during cold acclimation is mediated by the ER-PM contact sites-localized synaptotagmins 1 and 3. XIII Reunión Biología Molecular de plantas, Universidad de Málaga, 2015.
- PHILLIPS, M. J.; VOELTZ, G. K. Structure and function of ER membrane contact sites with other organelles. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.17, p. 69–82, 2016.
- PRINZ, W. A. Bridging the gap: Membrane contact sites in signaling, metabolism, and organelle dynamics. **Journal of Cell Biology**, v. 205, n. 6, p. 759–769, 2014.
- QIAN, T. et al. Arabidopsis synaptotagmin 1 mediates lipid transport in a lipid composition-dependent manner. **Traffic**, v. 23, n. 6, p. 346–356, 13 jun. 2022.
- R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, Austria: [s.n.].
- RENGEL, Z.; ZHANG, W.-H. Role of dynamics of intracellular calcium in aluminium-toxicity syndrome. **New Phytologist**, v. 159, n. 2, p. 295–314, 1 ago. 2003.
- SAHEKI, Y.; DE CAMILLI, P. Endoplasmic reticulum-plasma membrane contact sites. **Annual Review of Biochemistry**, v. 86, p. 659–684, 2017.
- SANDERS, D. et al. Calcium at the crossroads of signaling. **Plant Cell**, v. 14, n. SUPPL., 2002.
- SCHAPIRE, A. L. et al. Arabidopsis synaptotagmin 1 is required for the maintenance of plasma membrane integrity and cell viability. **Plant Cell**, v. 20, n. 12, p. 3374–3388, 2008.
- SIMON, M. L. A. et al. A PtdIns(4)P-driven electrostatic field controls cell membrane identity and signalling in plants. **Nature Plants**, v. 2, n. 7, p. 1–10, 2 jul. 2016.
- STEFAN, C. J.; MANFORD, A. G.; EMR, S. D. ER-PM connections: Sites of information transfer and inter-organelle communication. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 25, n. 4, p. 434–442, 2013.
- TEI, L. et al. Dramatic increase of selectivity for heavy lanthanide (III) cations by tuning the flexibility of polydentate chelators. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 2, p. 616–625, 18 jan. 2010.

TIAN, L. et al. Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. **Nature Methods**, v. 6, n. 12, p. 875–881, 8 nov. 2009.

WANG, L. et al. Rare earth elements activate endocytosis in plant cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 35, p. 12936–12941, 2 set. 2014.

WANG, L. et al. Responses of plant calmodulin to endocytosis induced by rare earth elements. **Chemosphere**, v. 154, p. 408–415, 1 jul. 2016.

WANG, L. et al. Arabinogalactan protein–rare earth element complexes activate plant endocytosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 28, p. 14349–14357, 9 jul. 2019.

YAMAZAKI, T. et al. Calcium-Dependent Freezing Tolerance in *Arabidopsis* Involves Membrane Resealing via Synaptotagmin SYT1. **The Plant Cell**, v. 20, n. 12, p. 3389–3404, 28 jan. 2009.

YAN, Q. et al. SYTA has positive effects on the heat resistance of *Arabidopsis*. **Plant Growth Regulation**, v. 81, n. 3, p. 467–476, 1 abr. 2017.

YE, Y. et al. Probing site-specific calmodulin calcium and lanthanide affinity by grafting. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 11, p. 3743–3750, 23 mar. 2005.

ZHU, J. K. Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. **Cell**, v. 167, n. 2, p. 313–324, 2016.

CAPÍTULO II

RESPOSTAS DIFERENCIADAS DE ACESSOS DE *Pfaffia glomerata* (SPRENG.) PEDERSEN AO ESTRESSE POR ALUMÍNIO

Resumo

Em condições de baixo pH, o alumínio (Al) é solubilizado à forma Al^{3+} , íon potencialmente fitotóxico e capaz de reduzir significativamente a produtividade de plantas cultivadas sensíveis ao metal. *Pfaffia glomerata* é uma espécie nativa que ocorre amplamente no Brasil, onde grande parte dos solos são ácidos ($\text{pH} < 5.5$), apresenta alta variabilidade genética, é propagada de modo clonal em cultivo *in vitro* e é altamente plástica em resposta a estresses abióticos. Na escassez de informação sobre a relação de *P. glomerata* e o Al^{3+} , neste estudo, a espécie foi submetida ao tratamento controle e às concentrações de 100 e 500 μM de Al em cultivo *in vitro*, no intuito de avaliar as respostas de dois acessos (Ac22 e Ac43) à toxidez do Al. Os acessos 22 e 43 apresentaram redução gradual no valor de massa seca à medida que a disponibilidade de Al aumentou no meio de cultivo. Ambos os acessos acumularam Al nas raízes e folhas, mas principalmente nas raízes (8,524 g kg^{-1} no Ac22 e apenas 2,988 g kg^{-1} no Ac43). Para ambos os acessos, o teste histoquímico com Chrome Azurol S detectou o Al nos vacúolos e núcleos de células da folha e na periferia das raízes, principalmente no ápice radicular, onde a descamação de células da coifa foi mais intensa. A baixa translocação de Al para a parte aérea e o armazenamento do metal em vacúolos garantiram a integridade dos tecidos foliares e a descamação de células da coifa apresentou-se como efeito da toxidez do Al, mas também como mecanismo de resistência, por eliminação de células com alto teor do metal. Houve variação entre acessos na concentração de Al acumulado nas raízes e folhas e na intensidade dos efeitos causados. Nossos resultados endossam a influência da variabilidade genética nos padrões de resposta das plantas ao estresse e sugerem o Ac22 como o mais resistente, uma vez que acumulou até quatro vezes mais Al que o Ac43 sem que os danos fossem mais severos.

Palavras-chave: Chrome Azurol S. Ginseng brasileiro. Anatomia vegetal. Cultivo *in vitro*. Acúmulo de Al.

CHAPTER II

DIFFERENTIATED RESPONSES OF *Pfaffia glomerata* (SPRENG.) PEDERSEN ACCESSIONS TO ALUMINUM STRESS

Abstract

Under low pH conditions, aluminum (Al) is solubilized to form Al^{3+} , a potentially phytotoxic ion capable of significantly reducing the productivity of cultivated plants sensitive to the metal. *Pfaffia glomerata* is a native species that occurs widely in Brazil, where most soils are acidic ($\text{pH} < 5.5$), has high genetic variability, is clonally propagated in *in vitro* culture and is highly plastic in response to abiotic stresses. Due to the scarcity of information on the relationship between *P. glomerata* and Al^{3+} , in this study, the species was submitted to the control treatment and to concentrations of 100 and 500 μM of Al in *in vitro* culture, in order to evaluate the responses of two accessions (Ac22 and Ac43) to Al toxicity. Accessions 22 and 43 showed a gradual reduction in the dry mass value as Al availability increased in the culture medium. Both accessions accumulated Al in the roots and leaves, but mainly in the roots (8.524 g kg^{-1} in Ac22 and only 2.988 g kg^{-1} in Ac43). For both accessions, the histochemical test with Chrome Azurol S detected Al in the vacuoles and nuclei of leaf cells and on the periphery of the roots, mainly at the root apex, where the desquamation of cap cells was more intense. The low translocation of Al to the shoot and the storage of the metal in vacuoles ensured the integrity of leaf tissues and the desquamation of cells from the cap was presented as an effect of Al toxicity, but also as a resistance mechanism, by eliminating cells with high metal content. There was variation between accessions in the concentration of Al accumulated in the roots and leaves and in the intensity of the effects caused. Our results support the influence of genetic variability on plant response patterns to stress and suggest Ac22 as the most resistant, since it accumulated up to four times more Al than Ac43 without the damage being more severe.

Keywords: Chrome Azurol S. Brazilian ginseng. Plant anatomy. *In vitro* culture. Al accumulation.

Introdução

A acidificação dos solos é um processo natural que tem sido significativamente acelerado pela ação antrópica, devido a atividades industriais e agrícolas que aumentam a deposição de nitrogênio e enxofre no solo (GOULDING, 2016; MENG et al., 2019; RAZA et al., 2021). Este problema – de caráter global – pode levar a alterações substanciais na diversidade da microbiota, como também prejudicar o estabelecimento de espécies vegetais e limitar a produtividade agrícola (BRUNNER; SPERISEN, 2013; XIAO et al., 2020). Uma das maiores preocupações associadas à acidez dos solos é o aumento da saturação de alumínio trocável (Al^{3+}). Este íon é potencialmente fitotóxico, capaz de inibir o crescimento radicular dos vegetais e, por consequência, comprometer a absorção de nutrientes e processos metabólicos (HEDE; SKOVMAND; LOPEZ-CESATI, 2001; VITORELLO; CAPALDI; STEFANUTO, 2005). A toxidez do Al constitui um dos principais fatores limitantes da produtividade agrícola em solos ácidos na atualidade (HEDE; SKOVMAND; LOPEZ-CESATI, 2001; KOCHIAN; HOEKENGA; PIÑEROS, 2004).

Diversas espécies de interesse econômico – como soja, sorgo, milho e arroz – são amplamente exploradas no estudo de respostas ao estresse por Al, principalmente por permitirem a comparação entre genótipos sensíveis e resistentes da mesma espécie (KOLLMEIER; FELLE; HORST, 2000; SILVA et al., 2020a; TOO et al., 2014; YANG et al., 2008). *Pfaffia glomerata* (Amaranthaceae), planta nativa popularmente conhecida como ginseng-brasileiro, é a espécie de maior importância medicinal e comercial do gênero *Pfaffia* (NASCIMENTO et al., 2007; VIGO et al., 2004). Ela ocorre amplamente no Brasil, onde mais de 80% dos solos são ácidos (MENG et al., 2011), e tem ação comprovada no relaxamento físico e mental (LORENZI; MATOS, 2021; RATES; GOSMANN, 2002; VIGO; NARITA; MARQUES, 2003), no tratamento de distúrbios gastrointestinais (FREITAS et al., 2004), apresenta efeito anti-inflamatório e analgésico (NETO et al., 2005), além de atuar no tratamento de diabetes e reumatismo (MAGALHÃES, 2002).

A exploração extrativista desordenada e a comercialização das raízes de *P. glomerata* para o uso fitoterápico põem em risco a variabilidade genética da espécie, reunida hoje em diversos bancos de germoplasma (ALVES et al., 2006; CORRÊA et al., 2016; KAMADA et al., 2009). É, portanto, uma espécie com ampla variedade de acessos e passível de ser cultivada em laboratório por meio da propagação clonal, o que permite o fornecimento de um material vegetal homogêneo para a sua aplicação em estudos científicos. *P. glomerata* tem-se mostrado responsiva a diversos fatores ambientais, como qualidade de luz (FELIPE et al., 2019a;

FORTINI et al., 2020; SILVA et al., 2020b), concentrações de CO₂ (LOUBACK et al., 2021) e estresse salino (FELIPE et al., 2019b). Além disso, tem sido alvo de estudos para aplicação na fitorremediação de ambientes contaminados, uma vez que tolera altas concentrações de metais pesados no solo (CALGAROTO et al., 2011; GOMES et al., 2012; SKREBSKY et al., 2008) e apresenta alta adaptabilidade a condições climáticas e edáficas distintas (MAGALHÃES, 2002; MARCHIORETTO; MIOTTO; SIQUEIRA, 2010).

Apesar de ser objeto de estudo de tantos trabalhos, as informações são altamente escassas sobre as respostas de *P. glomerata* ao estresse por Al – problema edáfico de relevância atual (CÁRCAMO et al., 2019; GUO et al., 2018; MA; CHEN; SHEN, 2014; NUNES-NESI et al., 2014; POSCHENRIEDER, 2015; ZHANG et al., 2019). Maldaner et al. (2015) relataram redução nas variáveis de crescimento dos acessos BRA e JB/UFSM de *P. glomerata*, quando expostos a altas concentrações de Al, e revelaram o acúmulo de Al significativamente maior nas raízes do que nas folhas. Entretanto, diante da variabilidade genética de *P. glomerata* e das facilidades de aplicação laboratorial da espécie, as informações sobre a toxidez do Al são escassas e podem ainda ser vastamente exploradas. Neste trabalho, buscou-se determinar a distribuição do Al, a nível tecidual, no corpo da planta e avaliar as respostas morfológicas e anatômicas de dois acessos de *P. glomerata* (Ac22 e Ac43) ao estresse por Al, estabelecido em cultivo *in vitro*.

Material e Métodos

Obtenção de material vegetal e cultivo in vitro

Os acessos 22 e 43 de *Pfaffia glomerata*, ambos diploides, foram obtidos a partir da coleção de germoplasma do Laboratório de Cultura de Tecidos (LCT) do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). O voucher foi depositado no Herbário Leopoldo Krieger (UFJF, Juiz de Fora, MG, Brazil) sob o número CESJ 63317 e a licença junto ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN), está sob cadastro nº AA2A367.

Três segmentos nodais (~1,5 cm de comprimento) foram inoculados em cada frasco de vidro (capacidade 600 mL) contendo 100 mL de meio líquido MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 3% sacarose (p/v). Um suporte de polipropileno, confeccionado a partir de copos descartáveis, foi utilizado para apoiar os explantes, conforme exemplificado na figura 1. O pH do meio foi ajustado para 4,5 e duas

concentrações de Al (100 e 500 μM) foram filtroesterilizadas e acrescentadas ao meio depois da autoclavagem (1,5 atm, 120 °C, 20 min). Um controle, com a ausência de Al (0 μM) foi realizado em paralelo. Os frascos foram fechados com tampa de polipropileno com duas membranas, confeccionadas conforme protocolo de Saldanha et al. (2012), as quais permitiram trocas gasosas com o meio externo. O cultivo dos explantes foi realizado por 40 dias em sala de crescimento com temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 h, sob intensidade luminosa de $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ provida por lâmpadas fluorescentes (Sylvania HO TLT, São Paulo, Brasil).



Figura 1 - Unidade experimental composta por três explantes de *Pfaffia glomerata* apoiados em suporte de polipropileno e cultivados em meio líquido MS.

Avaliação da estrutura da raiz

A análise morfológica do sistema radicular ($n = 10$) foi realizada por meio do sistema WinRhizo Pro (Régent Instr. Inc.), acoplado a um scanner profissional Epson XL 10000 equipado com unidade de luz adicional (TPU) do Laboratório de Milho-Pipoca (UFV). As raízes foram dispostas em uma cuba de acrílico de 20 cm de largura por 30 cm de comprimento contendo água e, a partir das imagens obtidas, foram gerados dados de comprimento total de raiz (cm), área de superfície (cm^2), diâmetro médio (cm^2) e volume total (cm^3).

Massa seca

Todas as folhas e raízes das plantas de ambos os acessos ($n = 10$) foram coletadas em sacos de papel e desidratadas em estufa a 70°C , até que atingissem peso seco constante. Posteriormente, foram pesadas em balança de precisão, para fins de quantificação da matéria seca.

Quantificação de alumínio

A determinação da concentração de Al foi feita em amostras compostas, nas quais 0,2 g de folhas e raízes desidratadas foram trituradas manualmente a dimensões menores que 1 mm. Os extratos foram obtidos a partir da digestão em solução nitroperclórica (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1989) e o teor de Al foi determinado em espectrômetro de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES, Optima 7300 DV PerkinElmer, Inc. Shelton, CT, USA).

Microscopia de luz

Amostras de folhas do terceiro nó ($n = 5$), completamente expandidas, e amostras do ápice radicular ($n = 5$) foram fixadas em FAA50 (Johansen, 1940), desidratadas em série etílica, incluídas em glicolmetacrilato (Historesin, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha) e seccionadas transversalmente (5 μm de espessura) em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA). Para a histolocalização do Al utilizou-se o reagente Chrome Azurol S 0,5% (KUKACHKA; MILLER, 1980), mantendo-se os cortes imersos por 60 min no reagente. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água destilada, secas e montadas em Permount. As observações e a documentação fotográfica foram realizadas em fotomicroscópio (modelo AX70 TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) com câmera digital acoplada (Zeiss AxioCam HR3, Zeiss, Göttingen, Alemanha). Foi realizado um controle em paralelo ao teste histoquímico, no qual as secções não foram submetidas ao reagente Chrome Azurol S 0,5%. As análises anatômicas foram realizadas no Laboratório de Anatomia e Morfogênese de Plantas do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa.

Análise estatística

O delineamento foi fatorial (com dois acessos e três tratamentos), com 10 repetições por tratamento. A unidade experimental consistiu em um frasco, cada um com três explantes. Os dados foram submetidos a ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Resultados e Discussão

Após exposição ao Al, os acessos 22 e 43 de *Pfaffia glomerata* acumularam Al nas raízes e folhas, mas principalmente em suas raízes, conforme constatado também por Maldaner et al. (2015) para os acessos BRA e JB/UFSM (Tab. 1). O acesso 22, no tratamento com 500

μM de Al, apresentou valor oito vezes maior que o tratamento controle, enquanto o acesso 43, sob mesmo tratamento, acumulou apenas duas vezes mais que o controle. Apesar da translocação do Al pelo corpo da planta, a concentração de Al foi menor que 1 g kg^{-1} nas folhas, o que caracteriza *P. glomerata* como uma espécie não acumuladora de Al (JANSEN; WATANABE; SMETS, 2002).

Tabela 1 – Quantificação de Al na massa seca de raízes e folhas de *Pfaffia glomerata* após 40 dias de exposição ao tratamento com Al

Acesso	Tratamento (μM Al)	Al (g kg^{-1})	
		Raízes	Folhas
22	0	0,060	0,014
	100	0,610	0,057
	500	8,524	0,200
43	0	0,097	0,011
	100	0,443	0,043
	500	2,988	0,190

A presença de Al no meio de cultura levou à redução progressiva na massa seca de folhas e raízes dos acessos 22 e 43 de *P. glomerata*, resultado comprovado tanto visualmente (Fig. 2) quanto quantitativamente (Fig. 3). A redução no crescimento em resposta ao estresse por Al foi demonstrada em outros estudos (GUO et al., 2018; PHUKUNKAMKAEW et al., 2022; SAGALA et al., 2018; SALAZAR-CHAVARRÍA; SÁNCHEZ-NIETO; CRUZ-ORTEGA, 2020; ZISHIRI et al., 2022) e foi reportada também para os acessos BRA e JB/UFSM de *P. glomerata* (MALDANER et al., 2015).

A toxidez do Al comprometeu de modo significativo o desenvolvimento de plantas expostas a $500 \mu\text{M}$ de Al; entretanto, sob $100 \mu\text{M}$ de Al, ambos os acessos apresentaram um aumento visual no comprimento, área e volume das raízes (Fig. 4). Algumas plantas nativas, adaptadas a solos ácidos, apresentam indução do crescimento quando o Al é administrado em baixas concentrações (BOJÓRQUEZ-QUINTAL et al., 2017) e o mesmo pode ser observado em algumas espécies de interesse econômico, como o arroz (FAMOSO et al., 2011; MORENO-ALVARADO et al., 2017), o milho (em que o crescimento foliar foi induzido) (WANG et al., 2015) e a soja (YU et al., 2011). Embora não tenha sido estatisticamente comprovado, o resultado deste estudo é indicativo de que, em baixas concentrações, o estresse por Al pode

exercer um papel estimulante no aumento de biomassa de *P. glomerata*, e um ensaio futuro com baixas doses de Al é recomendado.



Figura 2 - Redução no crescimento dos acessos 22 e 43 de *Pfaffia glomerata* após 40 dias de exposição ao tratamento com Al. Barra = 1 cm.

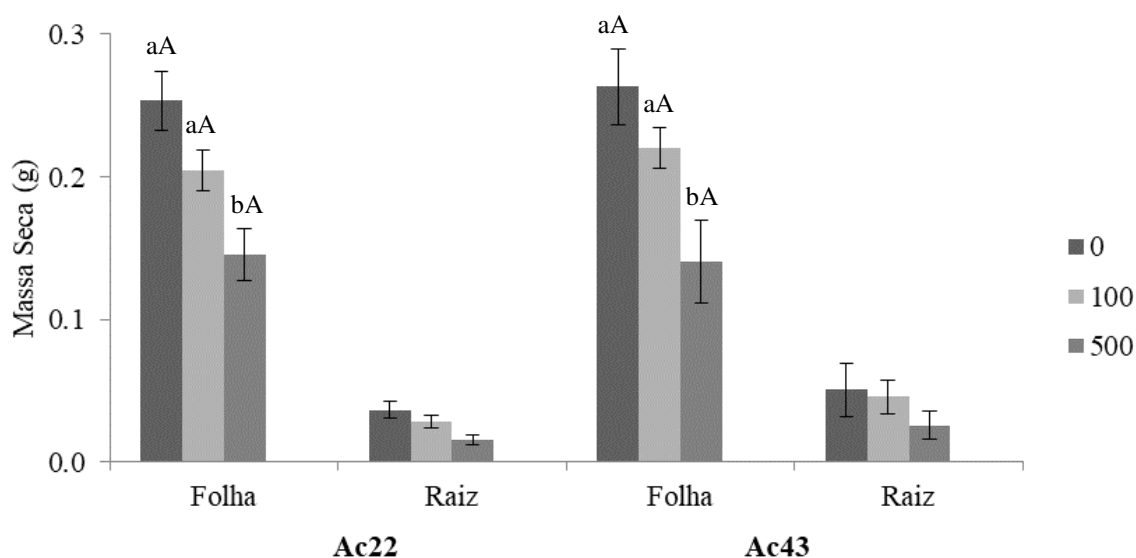


Figura 3 - Redução na massa seca dos acessos 22 e 43 de *Pfaffia glomerata* após 40 dias de exposição ao tratamento com Al, nas concentrações 0, 100 e 500 µM. As barras representam o desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste Tukey a 5%. Letras minúsculas comparam entre as diferentes concentrações de Al no mesmo acesso, letras maiúsculas comparam entre acessos sob a mesma concentração de Al.

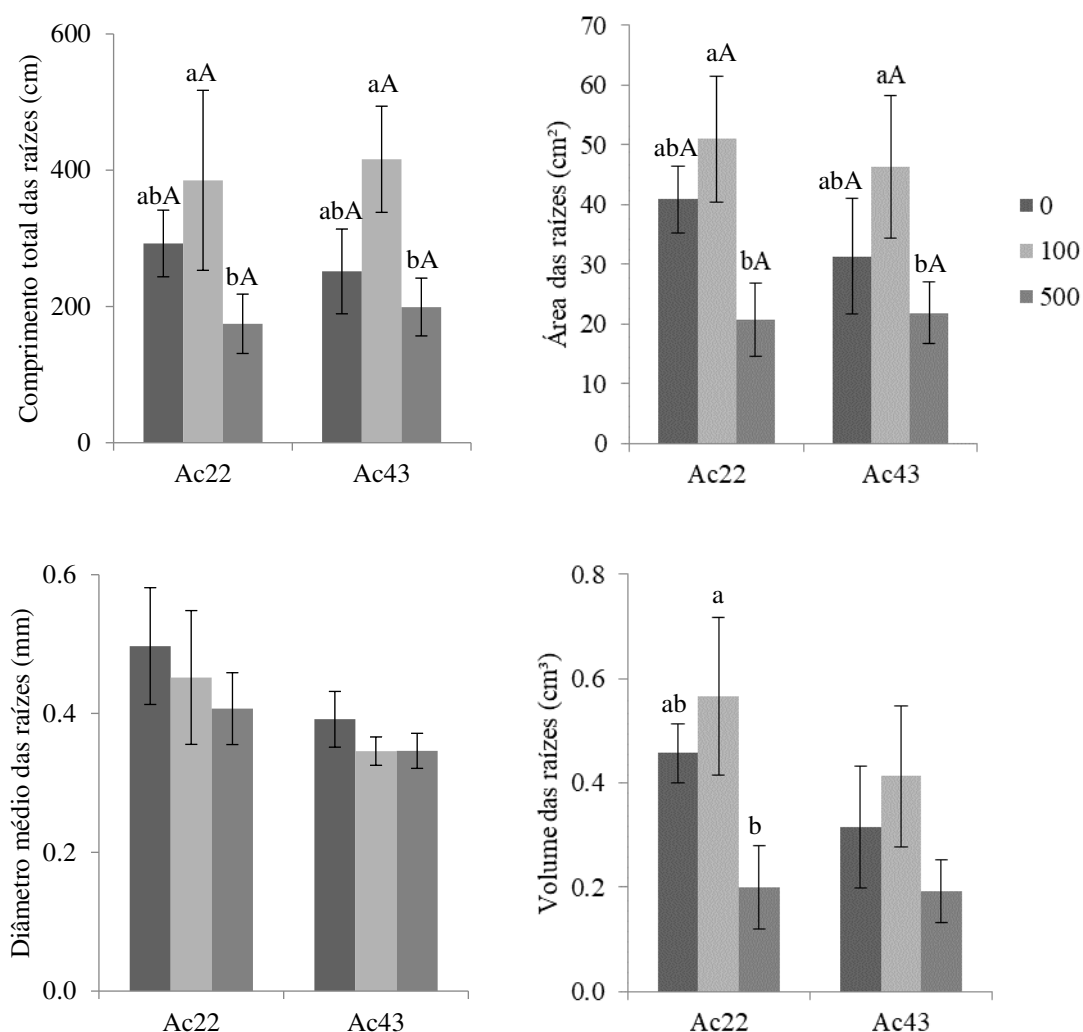


Figura 4 - Efeito do Al sobre as raízes dos acessos 22 e 43 de *Pfaffia glomerata* após 40 dias de exposição ao tratamento com Al, nas concentrações 0, 100 e 500 µM. As barras representam o desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste Tukey a 5%. Letras minúsculas comparam entre as diferentes concentrações de Al no mesmo acesso, letras maiúsculas comparam entre acessos sob a mesma concentração de Al.

A quantidade de Al translocada para as folhas de *P. glomerata* não foi suficiente para gerar modificações estruturais. Células da epiderme, do parênquima paliçádico e lacunoso apresentaram-se saudáveis (Fig. 5), com formato regular, e sintomas típicos de toxidez em plantas sensíveis, como alterações celulares e ultraestruturais, clorose e necrose (VITORELLO; CAPALDI; STEFANUTO, 2005), não foram detectados. À exceção de plantas acumuladoras de Al (BRUNNER; SPERISEN, 2013; JANSEN; WATANABE; SMETS, 2002; WATANABE; OSAKI, 2002), a translocação do metal para a parte aérea costuma ser baixa (VITORELLO; CAPALDI; STEFANUTO, 2005), principalmente em condições de alta umidade, como no cultivo *in vitro* de Ac22 e Ac43. Considerando que o Al é translocado de

acordo com o fluxo transpiratório (CARR et al., 2003; SHEN; MA, 2001), é esperado que baixo teor de Al seja detectado na parte aérea de plantas com baixa taxa de transpiração.

Embora cerca de 70 a 90% do Al na célula seja acumulado na parede celular (MA et al., 2004; SINGH et al., 2017), o teste histoquímico com o Chrome Azurol S indicou o armazenamento de Al em vacúolos de folhas de *P. glomerata*. A compartimentalização do metal é reconhecidamente uma estratégia das plantas em resposta ao estresse por Al, levando à preservação de componentes celulares (BRUNNER; SPERISEN, 2013; SINGH et al., 2017; WAGATSUMA et al., 2015; WATANABE; OSAKI, 2002). Este resultado sugere um mecanismo interno de detoxificação empregado por *P. glomerata*, promovendo o isolamento do metal.

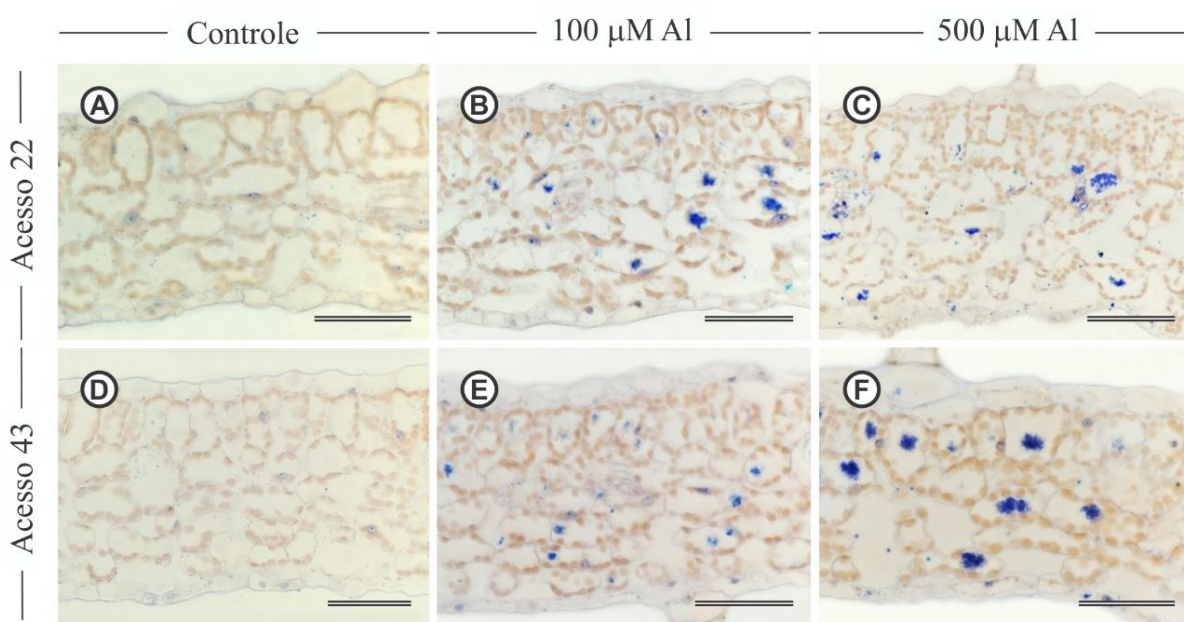


Figura 5 - Folhas de *Pfaffia glomerata* submetidas ao teste histoquímico com Chrome Azurol S para detecção de Al (cortes transversais em microscopia de luz). A reação positiva é indicada pela coloração azul. A-C: Acesso 22; D-F: Acesso 43, após 40 dias de exposição a 0, 100 e 500 µM Al. Barra = 50µm.

No ápice radicular, região de maior sensibilidade à toxidez do Al (VITORELLO; CAPALDI; STEFANUTO, 2005; ZHANG et al., 2014), foi observada intensa descamação da coifa (Fig. 6). Nesta região, a planta pode apresentar uma variedade de mecanismos de resistência, conhecidos como mecanismos de exclusão, capazes de evitar a penetração do Al no simplasto por meio da complexação com ácidos orgânicos, aumento de pH da rizosfera, secreção de mucilagem e ligação do metal a pectinas na parede celular (BOJÓRQUEZ-QUINTAL et al., 2017; SINGH et al., 2017). O teste com o Chrome Azurol S detectou a

presença de Al principalmente no entorno do ápice radicular, sugerindo a descamação mais intensa de células como um efeito da toxidez, mas também como um mecanismo de resistência apresentado por *P. glomerata*. De forma análoga, as células de borda – células que se separam e que ficam no entorno dos ápices radiculares (BOJÓRQUEZ-QUINTAL et al., 2017; IJIMA; BARLOW; BENGOUGH, 2003) – aumentam a resistência de algumas espécies ao Al por meio da secreção de mucilagem, pela indução de morte celular programada e pela imobilização do metal em suas paredes (MIYASAKA; HAWES, 2001; TAMÁS et al., 2005; YU et al., 2009). O benefício da mucilagem secretada pelas células de borda tem sido demonstrado em feijão (MIYASAKA; HAWES, 2001), milho (FENG LI et al., 2000), ervilha (YU et al., 2009) e arroz (CAI et al., 2011).

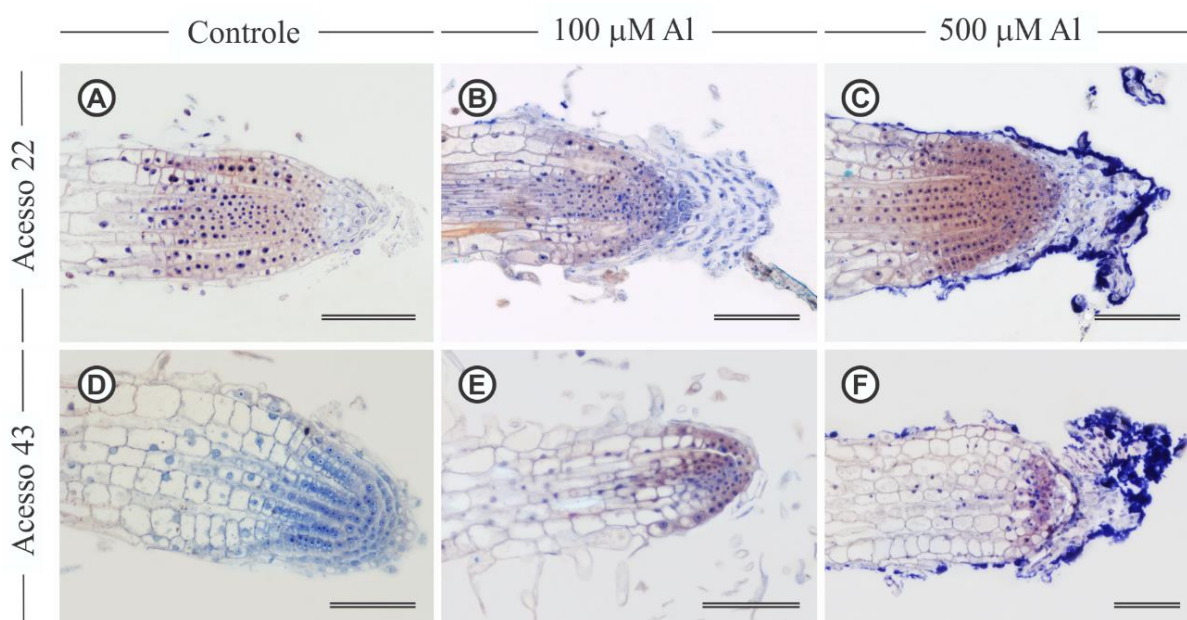


Figura 6 - Ápices radiculares de *Pfaffia glomerata*, após exposição a 0, 100 e 500 μM Al, submetidos ao teste histoquímico com Chrome Azurol S para detecção de Al (Cortes longitudinais em microscopia de luz). A reação positiva é indicada pela coloração azul. A-C: Acesso 22; D-F: Acesso 43. Barra = 100 μm .

Notavelmente, o Al foi detectado nos núcleos das células do ápice radicular de *P. glomerata*, tanto do tratamento controle quanto dos tratamentos com excesso de Al. Mesmo em baixas concentrações no solo, o acúmulo de Al tem sido relatado em núcleos de células vegetais (EEKHOUT; LARSEN; VEYLDER, 2017; KOPITTKE et al., 2016). A ligação do Al^{3+} às cargas negativas do esqueleto fosfodiéster do DNA podem resultar em rigidez da molécula, dificultar o desenrolamento da dupla hélice durante a replicação e, a longo prazo, causar redução no crescimento do órgão radicular (EEKHOUT; LARSEN; VEYLDER, 2017; KOCHIAN; PIÑEROS; HOEKENGA, 2005), como observado aqui. O mesmo resultado foi

reportado para plantas de outros acessos de *P. glomerata* no tratamento controle de exposição ao Al (MALDANER et al., 2015). Apesar deste resultado, a proporcionalidade direta observada entre a absorção do metal pela planta e a concentração disponibilizada no meio subsidia e valida os demais resultados obtidos.

Embora os efeitos causados pela toxidez do Al para os acessos 22 e 43 tenham sido os mesmos, houve variação na intensidade em que ocorreram e também no acúmulo diferenciado do metal nas raízes e folhas dos acessos. Estes resultados endossam a influência da variabilidade genética nos padrões de resposta das plantas ao estresse (YANG et al., 2005; TABALDI et al., 2009; CASTILHOS et al., 2011) e sugerem o acesso 22 como o mais resistente, uma vez que acumulou até quatro vezes mais Al que o acesso 43 sem que os danos fossem mais severos. Ainda que o maior interesse do trabalho seja em analisar as respostas de *P. glomerata* ao estresse por Al, é importante salientar que as raízes de *Pfaffia* são utilizadas no preparo de chá e que o Al, ao circular na cadeia alimentar, se torna uma ameaça para a saúde humana (ASHENEF, 2014; EXLEY, 2003; FERREIRA et al., 2008). A ingestão de Al pode causar sérios problemas aos humanos, estando associada à demência, ao Mal de Alzheimer e encefalopatia (EXLEY, 2003; FERREIRA et al., 2008; MEHRA; BAKER, 2007; YOKEL, 2000), ressaltando-se o alerta para o consumo de chás a partir de suas raízes.

Conclusão

Os acessos 22 e 43 de *P. glomerata* apresentaram padrão semelhante de resposta ao estresse por Al, entretanto, Ac22 acumulou quatro vezes mais Al nas raízes que Ac43 sem que os sintomas de toxidez fossem mais intensos. A baixa translocação de Al para a parte aérea e a compartimentalização do metal em vacúolos garantiram a integridade dos tecidos foliares em ambos os acessos. Nas raízes, a intensa descamação das células da coifa apresentou-se como efeito de toxidez do Al, mas também como mecanismo de resistência, eliminando células com alto teor de Al e, por consequência, protegendo células do meristema nas raízes. Os resultados deste trabalho endossam a influência da variabilidade genética nos padrões de resposta das plantas ao estresse e a comparação entre os acessos 22 e 43 é indicada em trabalhos futuros com excesso de Al.

Referências

- ALVES, R. et al. Brazilian Ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] Germplasm Conservation. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, p. 1–4, 2006.
- ASHENEF, A. Essential and toxic metals in tea (*Camellia sinensis*) imported and produced in Ethiopia. **Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance**, v. 7, n. 1, p. 30–36, jan. 2014.
- BOJÓRQUEZ-QUINTAL, E. et al. Aluminum, a friend or foe of higher plants in acid soils. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. 1767, p. 1–18, 12 out. 2017.
- BRUNNER, I.; SPERISEN, C. Aluminum exclusion and aluminum tolerance in woody plants. **Frontiers in plant science**, v. 4, n. June, p. 172, 2013.
- CAI, M. Z. et al. Developmental characteristics and aluminum resistance of root border cells in rice seedlings. **Plant Science**, v. 180, n. 5, p. 702–708, maio 2011.
- CALGAROTO, N. S. et al. Zinc alleviates mercury-induced oxidative stress in *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **BioMetals**, v. 24, n. 5, p. 959–971, out. 2011.
- CÁRCAMO, M. P. et al. Aluminum stress differentially affects physiological performance and metabolic compounds in cultivars of highbush blueberry. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 11275, 2019.
- CARR, H. P. et al. Accumulation and distribution of aluminium and other elements in tea (*Camellia sinensis*) leaves. **Agronomie**, v. 23, p. 705–710, 2003.
- CORRÊA, J. P. O. et al. Induced polyploidization increases 20-hydroxyecdysone content, in vitro photoautotrophic growth, and ex vitro biomass accumulation in *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 52, n. 1, p. 45–55, 2016.
- EEKHOUT, T.; LARSEN, P.; VEYLDER, L. DE. Modification of DNA checkpoints to confer aluminum tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 2, p. 102–105, 1 fev. 2017.
- EXLEY, C. A biogeochemical cycle for aluminium? **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 97, n. 1, p. 1–7, 15 set. 2003.
- FAMOSO, A. N. et al. Genetic architecture of aluminum tolerance in rice (*Oryza sativa*) determined through genome-wide association analysis and qtl mapping. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 8, ago. 2011.
- FELIPE, S. H. S. et al. Accessions of Brazilian ginseng (*Pfaffia glomerata*) with contrasting anthocyanin content behave differently in growth, antioxidative defense, and 20-hydroxyecdysone levels under UV-B radiation. **Protoplasma**, v. 256, n. 6, p. 1557–1571, 2019a.
- FELIPE, S. H. S. et al. Salinity-induced modifications on growth, physiology and 20-hydroxyecdysone levels in Brazilian-ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 140, p. 43–54, 2019b.
- FENG LI, X. et al. Mucilage strongly binds aluminum but does not prevent roots from aluminum injury in *Zea mays*. **Physiologia Plantarum**, v. 108, n. 2, p. 152–160, 1 fev. 2000.

FERREIRA, P. C. et al. Aluminum as a risk factor for Alzheimer's disease. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 16, n. 1, p. 151–157, fev. 2008.

FORTINI, E. A. et al. Photoperiod modulates growth and pigments and 20-hydroxyecdysone accumulation in Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] grown in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 142, n. 3, p. 595–611, 1 set. 2020.

FREITAS, C. S. et al. Involvement of nitric oxide in the gastroprotective effects of an aqueous extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen, Amaranthaceae, in rats. **Life Sciences**, v. 74, n. 9, p. 1167–1179, 16 jan. 2004.

GOMES, M. P. et al. Cd-tolerance markers of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen plants: anatomical and physiological features. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 24, n. 4, p. 293–304, dez. 2012.

GOULDING, K. W. T. Soil acidification and the importance of liming agricultural soils with particular reference to the United Kingdom. **Soil Use and Management**, v. 32, n. 3, p. 390–399, 1 set. 2016.

GUO, P. et al. Aluminum effects on photosynthesis, reactive oxygen species and methylglyoxal detoxification in two *Citrus* species differing in aluminum tolerance. **Tree Physiology**, v. 38, n. 10, p. 1548–1565, 2018.

HEDE, A. R.; SKOVMAND, B.; LOPEZ-CESATI, J. Acid Soils and Aluminum Toxicity. In: REYNOLDS, M. P.; ORTIZ-MONASTERIO, J. I.; MCNAB, A. (Eds.). **Application of Physiology in Wheat Breeding**. Mexico: D.F.: CIMMYT, 2001. p. 172–182.

IJIMA, M.; BARLOW, P. W.; BENGOUGH, A. G. Root cap structure and cell production rates of maize (*Zea mays*) roots in compacted sand. **New Phytologist**, v. 160, n. 1, p. 127–134, 14 out. 2003.

JANSEN, S.; WATANABE, T.; SMETS, E. Aluminium accumulation in leaves of 127 species in Melastomataceae, with comments on the order Myrtales. **Annals of Botany**, v. 90, p. 53–64, 2002.

KAMADA, T. et al. Variation of morphological and physiological characters in natural populations of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen and their correlation with β -ecdysone production. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 11, n. 3, p. 247–256, 2009.

KOCHIAN, L. V.; HOEKENGA, O. A.; PIÑEROS, M. A. How do crop plants tolerate acid soils? mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, n. 1, p. 459–493, 2004.

KOCHIAN, L. V.; PIÑEROS, M. A.; HOEKENGA, O. A. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. **Plant and Soil**, v. 274, n. 1–2, p. 175–195, jul. 2005.

KOLLMEIER, M.; FELLE, H. H.; HORST, W. J. Genotypical differences in aluminum resistance of maize are expressed in the distal part of the transition zone. Is reduced basipetal auxin flow involved in inhibition of root elongation by aluminum? **Plant Physiology**, v. 122, p. 945–956, 2000.

- KOPITTKKE, P. M. et al. Kinetics and nature of aluminium rhizotoxic effects: A review. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 15, p. 4451–4467, 1 ago. 2016.
- KUKACHKA, B. F.; MILLER, R. B. A chemical spot-test for aluminum and its value in wood identification. **IAWA Bulletin**, v. 1, n. 3, p. 104–109, 1980.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. 3^a ed. Nova Odessa (SP): Plantarum, 2021.
- LOUBACK, E. et al. CO₂ enrichment leads to altered cell wall composition in plants of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 145, n. 3, p. 603–613, 1 jun. 2021.
- MA, J. F. et al. Aluminum targets elongating cells by reducing cell wall extensibility in wheat roots. **Plant and Cell Physiology**, v. 45, n. 5, p. 583–589, maio 2004.
- MA, J. F.; CHEN, Z. C.; SHEN, R. F. Molecular mechanisms of Al tolerance in gramineous plants. **Plant and Soil**, v. 381, p. 1–12, 2014.
- MAGALHÃES, P. **Agrotecnologia para o cultivo da *Pfaffia***. Campinas: CPQBA-UNICAMP: [s.n.].
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba, SP: Potafos, 1989.
- MALDANER, J. et al. Aluminum accumulation in two *Pfaffia glomerata* genotypes and its growth effects. **Ciência Rural**, v. 45, n. 6, p. 1013–1020, 2015.
- MARCHIORETTO, M. S.; MIOTTO, S. T. S.; SIQUEIRA, J. C. DE. O gênero *Pfaffia* Mart. (Amaranthaceae) no Brasil. **Hoehnea**, v. 37, n. 3, p. 461–511, set. 2010.
- MEHRA, A.; BAKER, C. L. Leaching and bioavailability of aluminium, copper and manganese from tea (*Camellia sinensis*). **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1456–1463, 2007.
- MENG, C. et al. Global soil acidification impacts on belowground processes. **Environmental Research Letters**, v. 14, n. 7, 1 jul. 2019.
- MENG, L. et al. Sensitivity of wetland methane emissions to model assumptions: application and model testing against site observations. **Biogeosciences Discussions**, v. 8, n. 3, p. 6095–6160, 2011.
- MIYASAKA, S. C.; HAWES, M. C. Possible role of root border cells in detection and avoidance of aluminum toxicity. **Plant Physiology**, v. 125, n. 4, p. 1978–1987, 2001.
- MORENO-ALVARADO, M. et al. Aluminum enhances growth and sugar concentration, alters macronutrient status and regulates the expression of NAC transcription factors in rice. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 14 fev. 2017.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962.
- NASCIMENTO, E. X. et al. Produção de biomassa de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Plantago major* L. em cultivo solteiro e consorciado. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 3, p. 724–730, 2007.

- NETO, A. G. et al. Analgesic and anti-inflammatory activity of a crude root extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 1–2, p. 87–91, 4 jan. 2005.
- NUNES-NESI, A. et al. The complex role of mitochondrial metabolism in plant aluminum resistance. **Trends in Plant Science**, v. 19, n. 6, p. 399–407, 2014.
- PHUKUNKAMKAEW, S. et al. Aluminum uptake, translocation, physiological changes, and overall growth inhibition in rice genotypes (*Oryza sativa*) at vegetative stage. **Environmental Geochemistry and Health**, p. 1–11, 30 maio 2022.
- POSCHENRIEDER, C. Localization and compartmentation of Al in the leaves and roots of tea plants. **Phyton**, v. 84, n. JANUARY, p. 87–99, 2015.
- RATES, S. M. K.; GOSMANN, G. Gênero *Pfaffia*: aspectos químicos, farmacológicos e implicações para o seu emprego terapêutico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 2, p. 85–93, dez. 2002.
- RAZA, S. et al. Inorganic carbon losses by soil acidification jeopardize global efforts on carbon sequestration and climate change mitigation. **Journal of Cleaner Production**, v. 315, p. 128036, 15 set. 2021.
- SAGALA, D. et al. Effect of aluminum stress in early-stage growth of soybean. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 144, n. 1, p. 012067, 8 maio 2018.
- SALAZAR-CHAVARRÍA, V.; SÁNCHEZ-NIETO, S.; CRUZ-ORTEGA, R. *Fagopyrum esculentum* at early stages copes with aluminum toxicity by increasing ABA levels and antioxidant system. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 152, p. 170–176, 1 jul. 2020.
- SHEN, R.; MA, J. F. Distribution and mobility of aluminium in an Al-accumulating plant, *Fagopyrum esculentum* Moench. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 361, p. 1683–1687, 2001.
- SILVA, C. O. et al. Differential accumulation of aluminum in root tips of soybean seedlings. **Revista Brasileira de Botanica**, v. 43, n. 1, p. 99–107, 1 mar. 2020a.
- SILVA, T. D. et al. Blue and red light affects morphogenesis and 20-hydroxyecdysone content of *in vitro* *Pfaffia glomerata* accessions. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 203, 1 jan. 2020b.
- SINGH, S. et al. Toxicity of aluminium on various levels of plant cells and organism: A review. **Environmental and Experimental Botany**, v. 137, p. 177–193, 1 maio 2017.
- SKREBSKY, E. C. et al. Effect of cadmium on growth, micronutrient concentration, and δ -aminolevulinic acid dehydratase and acid phosphatase activities in plants of *Pfaffia glomerata*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 20, n. 4, p. 285–294, dez. 2008.
- TAMÁS, L. et al. Aluminum-induced cell death of barley-root border cells is correlated with peroxidase- and oxalate oxidase-mediated hydrogen peroxide production. **Plant Cell Reports**, v. 24, n. 3, p. 189–194, jun. 2005.
- TOO, E. J. et al. Cell membrane integrity, callose accumulation, and root growth in aluminum-stressed sorghum seedlings. **Biologia Plantarum**, v. 58, n. 4, p. 768–772, 24 out. 2014.

- VIGO, C. L. S. et al. Caracterização farmacognóstica comparativa de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Hebanthe paniculata* Martius - Amaranthaceae. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 6, n. 7, p. 7–19, 2004.
- 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, p. 46–49, 1 jan. 2003.
- VITORELLO, V. A.; CAPALDI, F. R.; STEFANUTO, V. A. Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, n. 1, p. 129–143, 2005.
- WAGATSUMA, T. et al. Significant role of the plasma membrane lipid bilayers in aluminum tolerance of plants. In: PANDA, S. K.; BALUSKA, F. (Eds.). **Aluminum stress adaptation in plants**. [s.l.] Springer International Publishing, 2015. p. 99–124.
- WANG, L. et al. Physiological characterization of maize tolerance to low dose of aluminum, highlighted by promoted leaf growth. **Planta**, v. 242, n. 6, p. 1391–1403, 1 dez. 2015.
- WATANABE, T.; OSAKI, M. Mechanisms of adaptation to high aluminum condition in native plant species growing in acid soils: a review. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 33, p. 1247–1260, 2002.
- XIAO, H. et al. Soil acidification reduces the effects of short-term nutrient enrichment on plant and soil biota and their interactions in grasslands. **Global Change Biology**, v. 26, n. 8, p. 4626–4637, 20 ago. 2020.
- YANG, J. L. et al. Cell wall polysaccharides are specifically involved in the exclusion of aluminum from the rice root apex. **Plant Physiology**, v. 146, n. 2, p. 602–611, 2008.
- YOKEL, R. A. The toxicology of aluminum in the brain: a review. **Neurotoxicology**, v. 21, n. 5, p. 813–828, 2000.
- YU, H. N. et al. The effect of aluminum treatments on the root growth and cell ultrastructure of two soybean genotypes. **Crop Protection**, v. 30, n. 3, p. 323–328, 1 mar. 2011.
- YU, M. et al. The role of root border cells in aluminum resistance of pea (*Pisum sativum*) grown in mist culture. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 172, n. 4, p. 528–534, 6 ago. 2009.
- ZHANG, H. et al. Accumulation and cellular toxicity of aluminum in seedling of *Pinus massoniana*. **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 1, p. 264, 30 set. 2014.
- ZHANG, X. et al. Molecular mechanisms for coping with al toxicity in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 7, p. 1–16, 2019.
- ZISHIRI, R. M. et al. growth response and dry matter partitioning of quality protein maize (*Zea mays* L.) genotypes under aluminum toxicity. **Agronomy**, v. 12, n. 6, p. 1262, 25 maio 2022.

CAPÍTULO III

POLIPLOIDIA EM *Pfaffia glomerata* (SPRENG.) PEDERSEN ELEVA A CAPACIDADE DE DEFESA ANTIOXIDANTE EM RESPOSTA AO ESTRESSE POR ALUMÍNIO

Resumo

A poliploidia é caracterizada pela presença de múltiplas cópias do genoma inteiro na célula e ocorre comumente em plantas. Em condições de estresse, os poliploides apresentam maior resistência que seus antecessores diploides, entretanto, o conhecimento sobre o efeito da poliploidia sobre mecanismos fisiológicos e moleculares permanece impreciso. Neste estudo, o acesso diploide A22 e seu derivado autopoliploide P28 de *Pfaffia glomerata* foram submetidos ao tratamento controle ou a 500 μM Al. Após 30 dias de exposição ao Al, ambos os citótipos apresentaram redução significativa no comprimento de raiz, mas apenas a matéria seca foliar de A22 reduziu significativamente. No diploide A22, o teste histoquímico com Chrome Azurol S detectou Al em agregados de aspecto precipitado na periferia das raízes e em associação com tecido radicular necrosado; houve maior descamação de células da coifa; e, na célula, a reação foi positiva nos núcleos. Comparativamente, no poliploide P28, a presença de Al no entorno das raízes não foi tão marcante quanto em A22 e a descamação da coifa foi menos intensa. Nas folhas, o Al foi detectado no vacúolo em A22, e em P28 não foi detectada a presença do metal. Os valores F_v/F_m , NPQ e ETR evidenciaram que não há limitação fotoquímica no processo fotossintético de nenhum dos citótipos, mesmo no tratamento com 500 μM Al, mas A22 apresentou redução significativa na taxa fotossintética. A atividade das enzimas do sistema antioxidante (CAT, APX e SOD) foi significativamente maior nas raízes do poliploide P28 em resposta ao estresse por Al, ao passo que o diploide A22 apresentou maior atividade apenas de SOD nas raízes. Nas folhas, apenas o poliploide P28 apresentou maior atividade da enzima SOD. A poliploidia induzida de *P. glomerata* mostrou-se eficiente na criação de um genótipo mais resistente ao estresse por Al que o seu antecessor diploide A22. A tolerância de P28 está diretamente associada à atuação de enzimas do sistema antioxidante, enquanto A22 apresentou mecanismos físicos de evitação ao Al.

Palavras-chave: Cultivo *in vitro*. Ginseng brasileiro. Anatomia vegetal. Metabolismo. Fotossíntese. Histoquímica.

CHAPTER III

POLYPLOIDIA IN *Pfaffia glomerata* (SPRENG.) PEDERSEN INCREASES ANTIOXIDANT DEFENSE CAPACITY IN RESPONSE TO ALUMINUM STRESS

Abstract

Polyploidy is characterized by the presence of multiple copies of the entire genome in the cell and commonly occurs in plants. Under stress conditions, polyploids show greater resistance than their diploid predecessors, however, the knowledge about the effect of polyploidy on physiological and molecular mechanisms remains imprecise. In this study, the accession diploid A22 and its autopolyploid P28 of *Pfaffia glomerata* were subjected to control treatment or to 500 μ M Al. After 30 days of Al exposure, both cytotypes showed a significant reduction in root length, but only A22 leaf dry matter significantly reduced. In diploid A22, the histochemical test with Chrome Azurol S detected Al in precipitated aggregates on the periphery of the roots and in association with necrotic root tissue; there was greater desquamation of the cap cells; and, in the cell, the reaction was positive in the nuclei. Comparatively, in the P28 polyploid, the presence of Al around the roots was not as marked as in A22 and the desquamation of the cap was less intense. In the leaves, Al was detected in the vacuole in A22, and in P28 the presence of the metal was not detected. The *Fv/Fm*, NPQ and ETR values showed that there is no photochemical limitation in the photosynthetic process of any of the cytotypes, even in the treatment with 500 μ M Al, but A22 showed a significant reduction in the photosynthetic rate. The activity of the antioxidant system enzymes (CAT, APX and SOD) was significantly higher in the P28 polyploid roots in response to Al stress, while the A22 diploid showed higher activity only of SOD in the roots. In leaves, only the P28 polyploid showed higher activity of the SOD enzyme. The induced polyploidy of *P. glomerata* proved to be efficient in creating a genotype more resistant to Al stress than its diploid predecessor A22. The tolerance of P28 is directly associated with the action of enzymes of the antioxidant system, while A22 showed physical mechanisms to avoid Al.

Keywords: *In vitro* culture; Brazilian ginseng. Plant anatomy. Metabolism. Photosynthesis. Histochemistry.

Introdução

A poliploidia é caracterizada pela presença de múltiplas cópias do genoma inteiro na célula e ocorre comumente em plantas (CHEN, 2010; SCHOLTES; PAIGE, 2015). Organismos poliploides podem ser rapidamente removidos da população por uma instabilidade genômica e anormalidades mitóticas e meióticas, entretanto, para quase todas as linhagens de angiospermas e samambaias, há evidências de eventos de duplicação do genoma na ancestralidade (SCHOLTES; PAIGE, 2015; VAN DE PEER et al., 2021). A variação genética aumentada destes organismos – ou populações – frequentemente está associada à maior resistência a ambientes extremos (VAN DE PEER et al., 2021; VAN DE PEER; MAERE; MEYER, 2009; VAN DE PEER; MIZRACHI; MARCHAL, 2017) e, do ponto de vista agrícola, a poliploidia é considerada como a chave para a domesticação de cultivares e para a evolução da resistência ao estresse (RENNY-BYFIELD; WENDEL, 2014; VAN DE PEER et al., 2021).

O sucesso ecológico da poliploidia levou à exploração e criação de organismos poliploides com maior valor econômico, o qual está associado ao aumento de biomassa e melhor qualidade e digestibilidade de grãos (RAUF et al., 2021). Em condições de estresse, os poliploides apresentam maior resistência à seca (CHANDRA; DUBEY, 2010; DENG et al., 2012), ao frio (DENG et al., 2012; SUGIYAMA, 1998), à luz UV (NIWA; SASAKI, 2003), ao estresse salino (SALEH et al., 2008), ao déficit nutricional (DENG et al., 2012) e ao alumínio (Al) (ANWAR, 2007), quando comparados com seus antecessores diploides. Em resposta ao estresse por Al, o triticale octaploide – um híbrido obtido a partir do trigo hexaploide e do centeio diploide – apresentou maior resistência que o hexaploide – obtido a partir do trigo tetraploide e do centeio diploide, ressaltando a importância de exploração da variabilidade genética na resistência das plantas a fatores de estresse (RYAN et al., 2018).

O estresse por Al é um dos maiores fatores limitantes da produtividade agrícola em solos ácidos. Isso se deve ao aumento de saturação de Al^{3+} no solo quando o pH é menor que 5.5, condição encontrada em cerca de 40% das terras aráveis do mundo e em mais de 80% dos solos do Brasil (HEDE; SKOVMAND; LOPEZ-CESATI, 2001; KOCHIAN; HOEKENGA; PIÑEROS, 2004; MENG et al., 2019, 2011; VON UEXKÜLL; MUTERT, 1995). Diversos mecanismos de exclusão (evitando a entrada de Al no simplasto) e de tolerância (por meio de detoxificação interna) ao Al já foram descritos na literatura (BRUNNER; SPERISEN, 2013; SINGH et al., 2017). Apesar disso, o conhecimento sobre o efeito da poliploidia sobre mecanismos fisiológicos e moleculares em resposta ao estresse por Al, bem como as mudanças adaptativas possivelmente adquiridas, permanece impreciso.

A espécie *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) ocorre naturalmente em todo o território brasileiro (MING; CORREA, 2002; NICOLOSO et al., 2001). Conhecida por “ginseng brasileiro”, *P. glomerata* é uma espécie de ampla aplicação em formulações cosméticas, complementos alimentares e na farmacêutica (CORRÊA-JÚNIOR et al., 2006; CORRÊA-JUNIOR; MING, 2004) e suas raízes são majoritariamente exportadas para o Japão e os Estados Unidos (MING; CORREA, 2002; MONTANARI JR., 2002). A espécie apresenta uma diversidade de acessos com diferenças significativas entre eles, no que diz respeito ao acúmulo de biomassa, potencial fotoautotrófico e produção de 20-hidroxiecdisona (20E), seu principal ingrediente ativo (CORRÊA et al., 2016; FIGUEIREDO et al., 2002). Além da variedade em acessos diploides, a poliploidização sintética de *P. glomerata* (GOMES et al., 2014) mostrou-se eficiente na produção de indivíduos tetraploides com maior potencial fotoautotrófico e acúmulo de biomassa (CORRÊA et al., 2016).

Visando a aplicabilidade econômica, diversos trabalhos exploram condições de cultivo e variadas fontes de estresse que possam levar ao melhor estabelecimento de *P. glomerata in vitro* e/ou a aumentar a produção de 20E (FELIPE et al., 2019a, 2019b; FORTINI et al., 2020; LOUBACK et al., 2021; SILVA et al., 2019, 2020). As respostas são genótipo dependentes, mas é consenso que o equilíbrio do sistema antioxidante de *P. glomerata* constitui um dos principais mecanismos de resistência da espécie. Embora sejam um subproduto comum do metabolismo, espécies reativas de oxigênio (EROs) podem gerar danos a membranas, proteínas e ácidos nucleicos se não forem rapidamente neutralizadas por enzimas do sistema antioxidante (APEL; HIRT, 2004; D'AUTRÉAUX; TOLEDANO, 2007). Em resposta ao tratamento com Al, diploides de *P. glomerata* apresentaram aumento na produção de superóxido dismutase, peroxidase e catalase em concentrações entre 50-150 mg L⁻¹ de Al (MALDANER et al., 2015). Não há dados na literatura sobre o estudo do comportamento de resposta de poliploides de *P. glomerata* ao estresse por Al.

Neste estudo, objetivou-se determinar a influência da poliploidia nas respostas de *P. glomerata* ao Al por meio da quantificação de dados relativos ao acúmulo de biomassa, como parâmetros de crescimento, atividade fotossintética e produção de metabólitos primários, além de determinar o acúmulo e a localização de Al nos órgãos e tecidos vegetais e verificar a importância da atividade de enzimas do sistema antioxidante na resistência de citótipos diploide e tetraploide. Nossos resultados mostram que a poliploidia induzida de *P. glomerata* mostrou-se eficiente na criação de um genótipo mais resistente ao estresse por Al que o seu antecessor diploide A22.

Material e Métodos

Obtenção de material vegetal e cultivo in vitro

O acesso 22 (diploide, A22) e seu derivado poliploide artificial 48 (tetraploide, P48) de *Pfaffia glomerata* (Spred.) Ped. (Amaranthaceae) foram obtidos a partir da coleção de germoplasma do Laboratório de Cultura de Tecidos (LCT) do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Três segmentos nodais (~1,5 cm de comprimento) foram inoculados em cada frasco de vidro (capacidade 600 mL) contendo 100 mL de meio líquido MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 3% sacarose (p/v) e pH ajustado para 4,5. Um suporte de polipropileno, confeccionado a partir de copos descartáveis, foi utilizado para apoiar os explantes, conforme exemplificado na figura 1. Os frascos foram fechados com tampa de polipropileno com duas membranas para trocas gasosas, confeccionadas conforme Saldanha et al. (2012). O cultivo dos explantes foi realizado em sala de crescimento climatizada com temperatura de 25±2°C e fotoperíodo de 16 h, sob intensidade luminosa de 35 µmol m⁻² s⁻¹ provida por lâmpadas fluorescentes (Sylvania HO TLT, São Paulo, Brasil). As plantas foram submetidas ao tratamento controle (0 µM de Al) e a 500 µM de Al, disponibilizado na forma de AlCl₃, do dia 0 ao dia 30, quando foi feita a avaliação.



Figura 1 - Unidade experimental composta por três explantes de *Pfaffia glomerata* apoiados em suporte de polipropileno e cultivados em meio líquido MS.

Parâmetros de crescimento

Para avaliação do efeito do Al sobre o crescimento dos citótipos de *P. glomerata*, foram analisados os seguintes parâmetros: massa seca de raiz, caule e folha (g), comprimento total da parte aérea (cm) e número de folhas. Para obtenção de valores de massa seca, todo o material vegetal ($n = 10$) foi coletado separadamente (raiz, caule e folha) em sacos de papel, desidratado em estufa a 70°C até que atingissem peso seco constante e pesado em balança de precisão. Para análise no sistema WinRhizo Pro (Régent Instr. Inc.), as raízes ($n = 10$) foram lavadas em água destilada e dispostas em uma cuba de acrílico de 20 cm de largura por 30 cm de comprimento contendo água. A partir das imagens obtidas, foram gerados dados de variáveis de comprimento total de raiz (cm), área superficial (cm²), diâmetro médio (cm) e volume total (cm³).

Localização de alumínio nos tecidos vegetais

Amostras de folhas do terceiro nó ($n = 5$), completamente expandidas, e amostras do ápice radicular ($n = 5$) foram fixadas em FAA₅₀ (JOHANSEN, 1940), desidratadas em série etanólica, incluídas em glicolmetacrilato (Historesin, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha) e seccionadas transversalmente (5 µm de espessura) em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA). Para a histolocalização do Al, foi utilizado o reagente Chrome Azurol S 0,5% (Kukachka and Miller 1980), onde os cortes permaneceram imersos por 60 min. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água destilada (5 min), secas e montadas em Permunt. As observações e a documentação fotográfica foram realizadas em fotomicroscópio (modelo AX70 TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) com câmera digital acoplada (Zeiss AxioCam HR3, Zeiss, Göttingen, Alemanha).

Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a

As medidas de trocas gasosas e a quantificação da taxa fotossintética *in vitro* foram realizadas em folhas de terceiro nó completamente expandidas ($n = 10$) utilizando um sistema com IRGA adaptado (modelo AQ-S151, Qubit Systems, ON, Canada) proposto por Costa et al. (2014) e modificado por Chagas (2019) e Chagas et al. (2022). A coleta dos dados foi realizada através do software LoggerLite (LoggerLite, 1.8.1, Vernier Software & Technology Caliper, Beaverton). As plantas foram mantidas na ausência de luz por um período de 8 h que antecederam a análise. A temperatura e a umidade do ar no frasco foram mensuradas através do sensor Espec (Thermo Recorder RS-11, Takai Espec Corp.). As medidas de fluorescência inicial (F_0) e fluorescência máxima (F_m) foram obtidas com o auxílio de um fluorômetro

JUNIOR-PAM (Walz, Effeltrich, Germany), após adaptação ao escuro por 30 min, e a razão F_v/F_m , sendo $F_v = F_m - F_0$, foi calculada para avaliação da eficiência quântica máxima do fotossistema II (PSII). Em folhas adaptadas à luz, foram obtidos valores de fluorescência antes do pulso de saturação (F_s) e de fluorescência máxima (F_m'), a partir dos quais foi calculado o coeficiente de extinção não fotoquímico [$NPQ = (F_m - F_m') - 1$] e taxa de transporte aparente de elétrons $\{ETR = [(F_m' - F_s)/F_m'] * 0,5 * 1000 * 0,84\}$, cujos fatores 0,5, 1200 e 0,84 significam fração de excitação distribuída para o FSII, fluxo de fótons fotossinteticamente ativos para indução da fotossíntese e fração de luz absorvida, respectivamente, conforme descrito por Konrad et al. (2005).

Determinação de metabólitos primários

Folhas e raízes (n = 10) foram coletadas em nitrogênio líquido, maceradas e 50 mg do material foi submetido à extração etanólica, conforme descrito por Gibon et al. (2004). A fração solúvel foi utilizada para determinação de clorofila *a* e clorofila *b*, enquanto o material insolúvel precipitado foi utilizado para quantificação de amido e proteína total. A determinação do conteúdo de clorofila foi feita de acordo com o protocolo descrito por Porra et al. (1989), em leitor de microplaca a 645 e 665 nm para clorofilas *b* e *a*, respectivamente. A quantificação de amido foi feita segundo a metodologia proposta por Fernie et al. (2001), a 340 nm, enquanto proteínas foram analisados segundo metodologia descrita por Cross et al. (2006) com leituras feitas a 595 nm.

Determinação da atividade de enzimas do sistema antioxidante

A atividade de enzimas do sistema antioxidativo foi determinada conforme descrito por (Felipe et al. 2019a). Foram quantificadas as enzimas Catalase (CAT, EC 1.11.1.6), Peroxidase do Ascorbato (APX, EC 1.11.1.11) e Superóxido Dismutase (SOD, EC 1.15.1.1). Para tanto, foram coletados 50 mg de massa fresca da parte aérea, que foi congelada e conservada em ultra freezer -80 °C. Para a obtenção do extrato bruto, o material foi macerado em almofariz de porcelana juntamente com 2 mL do meio de extração (Tampão fosfato de potássio a 0,1 M, pH 6.8; ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 0.1 mM; fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) a 1 mM e PVPP 1% (p/v). Após a maceração, o material foi centrifugado a 12000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, e o sobrenadante foi retirado e reservado em gelo.

Para a determinação da atividade da CAT foram adicionados 2,9 mL de meio de reação (Tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H₂O₂ 12,5 mM) e 10 µL do extrato em microplaca (HAVIR; MCHALE, 1987). A leitura foi realizada no comprimento de onda de 240 nm por 1

minuto (a cada 10 segundos), e o cálculo da atividade enzimática foi dado pelo decréscimo da absorbância, sendo expressa em $\mu\text{mol}^{-1} \text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ de massa fresca. A determinação da atividade da APX foi realizada através do acréscimo do meio de reação (Tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, ácido ascórbico 0,25 mM, EDTA 0,1 mM e H_2O_2 0,3 mM) com 10 μL do extrato em microplaca. Após a homogeneização, foi realizada a leitura em comprimento de onda de 290 nm durante um minuto. A absorbância foi decrescente e a quantificação da enzima foi dada por $\mu\text{mol}^{-1} \text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ massa fresca.

A quantificação da SOD foi preparada através da adição de 2,97 mL de meio de reação (Tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 μM , EDTA 0,1 mM e Riboflavina 2 μM) e 30 μL do extrato bruto em microplaca. A microplaca com as amostras foi mantida à 25 °C por 5 minutos em câmara de reação (iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W). Após este tempo, a placa foi retirada da iluminação interrompendo a reação. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 560 nm. A absorbância foi incrementada pela produção de formazana azul durante a reação, e o valor de absorbância foi subtraído do branco, que não possuía extrato enzimático. A atividade da superóxido dismutase foi representada em $\text{U min}^{-1} \text{g}^{-1}$ de massa fresca, sendo 1 U o equivalente a concentração necessária de SOD para inibir em 50% a fotoredução do NBT.

Análise estatística

O delineamento foi fatorial (dois acessos e dois tratamentos), com 10 repetições por tratamento. A unidade experimental consistiu em um frasco, cada um com três explantes. Os dados foram submetidos a ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, com alfa a 5%.

Resultados e Discussão

Os citótipos de *P. glomerata* responderam de modo diferenciado ao estresse por Al. Após 30 dias de exposição a 500 μM Al, apenas a matéria seca foliar de A22 apresentou redução significativa em suas médias, quando comparada ao tratamento controle. O acúmulo de biomassa em P28 não foi significativamente alterado em resposta ao estresse por Al, portanto, o tratamento e o controle apresentaram resultados semelhantes para os parâmetros de crescimento (Figs. 2 e 3). Embora Corrêa et al. (2016) descrevam um aumento efetivo no crescimento de P28, com maior acúmulo de biomassa em relação às plantas diploides quando cultivadas em meio semissólido, o crescimento em meio líquido não levou ao mesmo resultado. O acúmulo

de biomassa no diploide A22 e no tetraploide P28 foi estatisticamente semelhante em plantas do tratamento controle.

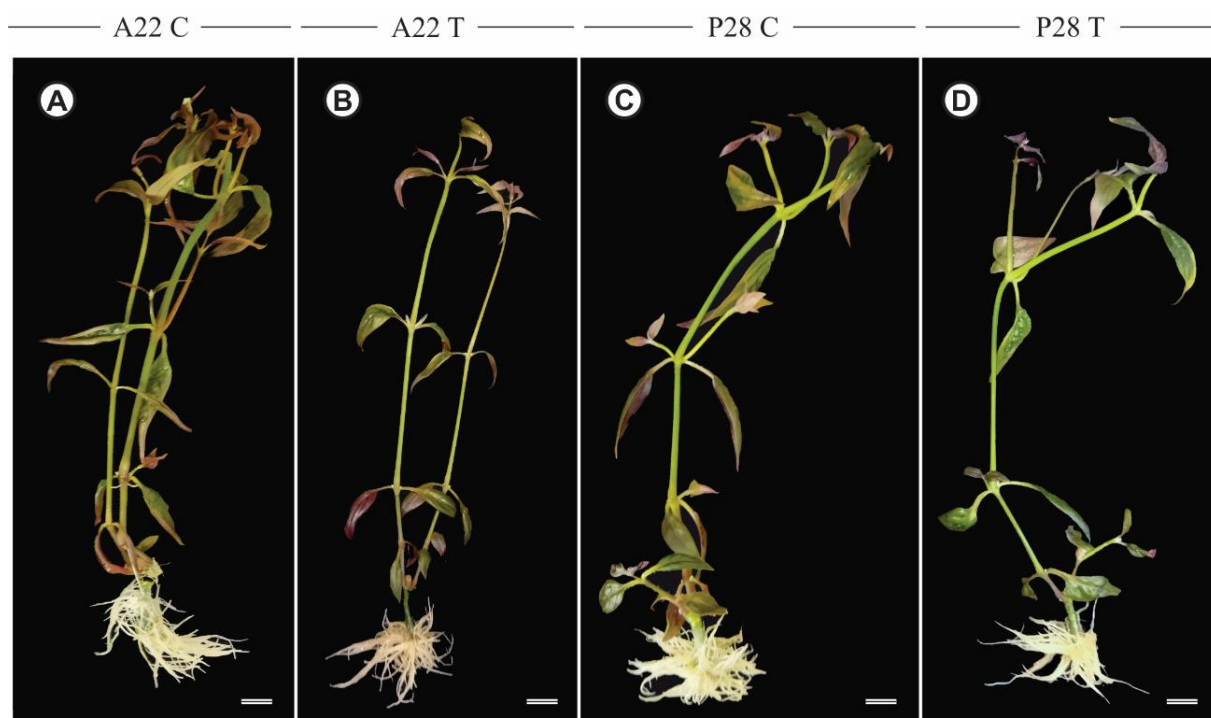


Figura 2 - Morfologia dos acessos A22 (diploide) e P28 (poliploide) de *Pfaffia glomerata* após 30 dias de exposição ao tratamento com Al. A: Planta de A22 do tratamento controle, B: Planta de A22 submetida a 500 µM Al, C: Planta de P28 do tratamento controle, D: Planta de P28 submetida a 500 µM Al. Barra = 1 cm.

Os efeitos do Al no crescimento radicular das plantas vêm sendo estudado em várias espécies e constitui uma das principais características na classificação de genótipos tolerantes ao Al (BOJÓRQUEZ-QUINTAL et al., 2017; RYAN et al., 2018; WANG; KAO, 2006; YU et al., 2011). Neste estudo, o diploide A22 apresentou redução significativa no comprimento e área de superfície de raiz, enquanto para o poliploide P28, o comprimento e o volume de raiz foram as variáveis que reduziram significativamente em resposta ao tratamento com Al (Fig. 3). No diploide A22, a histoquímica com Chrome Azurol S detectou o metal em agregados de aspecto precipitado e em associação com tecido necrosado; houve maior descamação de células da coifa e; na célula, a reação foi positiva nos núcleos (Fig. 4). Comparativamente, no poliploide P28, a presença de Al no entorno das raízes não foi tão marcante quanto em A22 e a descamação da coifa foi menos intensa.

As raízes são o primeiro órgão a apresentar sintomas de toxidez em resposta ao Al e, comumente, se tornam quebradiças, encurtadas e pouco funcionais, podendo restringir a absorção de nutrientes e o crescimento vegetal como um todo (NUNES-NESI et al., 2014;

VITORELLO; CAPALDI; STEFANUTO, 2005). Neste estudo, os efeitos na raiz evidenciaram o comportamento diferenciado entre os citótipos, sendo a evitação do metal um mecanismo observado principalmente no diploide A22, enquanto o poliploide P28 pode estar explorando mecanismos internos de detoxificação como estratégia de resistência mais eficiente (BOJÓRQUEZ-QUINTAL et al., 2017; BRUNNER; SPERISEN, 2013; POSCHENRIEDER et al., 2015). As variações causadas pelo Al na estrutura das raízes não foram suficientes para impactar de modo negativo o poliploide P28, ao passo que podem estar associadas à redução na matéria seca foliar de A22.

Nas plantas do tratamento controle de ambos os citótipos, o Al foi detectado associado aos núcleos (Fig. 4). Apesar de ser descrito o comprometimento da divisão celular em função do enrijecimento da dupla hélice pela ligação do Al^{3+} às cargas negativas do DNA (EEKHOUT; LARSEN; VEYLDER, 2017; KOCHIAN; PIÑEROS; HOEKENGA, 2005), o metal foi detectado mesmo em células em divisão mitótica (Fig. 4E). O acúmulo de Al em núcleos já havia sido relatado para o diploide A22 e para o acesso 43 de *P. glomerata* (Capítulo II) e, embora Maldaner et al. (2015) não tenham realizado o estudo de histolocalização do metal, os acessos BRA e JB/UFSM de *P. glomerata* acumularam Al no órgão radicular em plantas do tratamento controle. Mesmo em baixas concentrações disponíveis, nota-se a tendência ao acúmulo de Al em núcleos de células vegetais também em *P. glomerata* (EEKHOUT; LARSEN; VEYLDER, 2017; KOPITKE et al., 2016).

Nas folhas, o Al foi detectado nos vacúolos do diploide A22 e, possivelmente, o metal está sendo compartimentalizado nesta organela (Fig. 5), já que esta estratégia é comumente empregada pelas plantas em resposta a elementos estressores (BRUNNER; SPERISEN, 2013; SINGH et al., 2017; WAGATSUMA et al., 2015; WATANABE; OSAKI, 2002). Nas folhas do poliploide P28 não foi detectada a presença do metal. Neste estudo, a baixa translocação de Al para as folhas é confirmada em A22 e reportada para P28 com base na fraca detecção do metal no órgão foliar. O maior acúmulo de Al nas raízes e evitação da translocação de Al para a parte aérea é uma estratégia verificada em plantas conhecidas como exclusoras de Al, enquanto as acumuladoras de Al detêm mais de 1 g Al kg^{-1} de matéria seca nas folhas (BRUNNER; SPERISEN, 2013; JANSEN; WATANABE; SMETS, 2002; WATANABE; OSAKI, 2002).

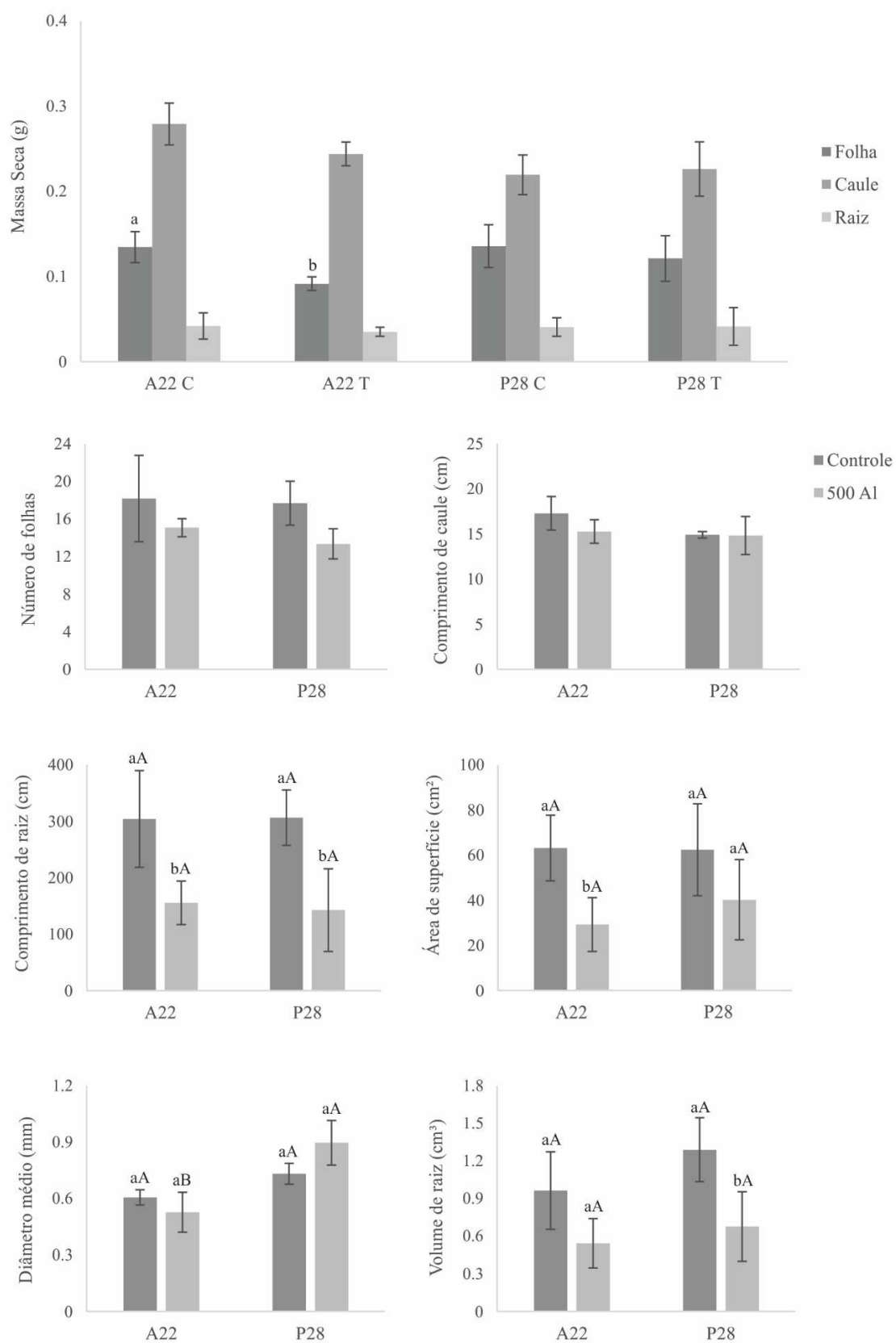


Figura 3 - Efeito do Al sobre variáveis de crescimento e parâmetros das raízes de A22 (diploide) e P28 (poliploide) de *Pfaffia glomerata* após 30 dias de exposição ao tratamento com Al, nas concentrações 0 e 500 μ M. Barra: desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste Tukey a 5%. Letras minúsculas comparam entre as diferentes concentrações de Al no mesmo acesso, letras maiúsculas comparam entre acessos sob a mesma concentração de Al.

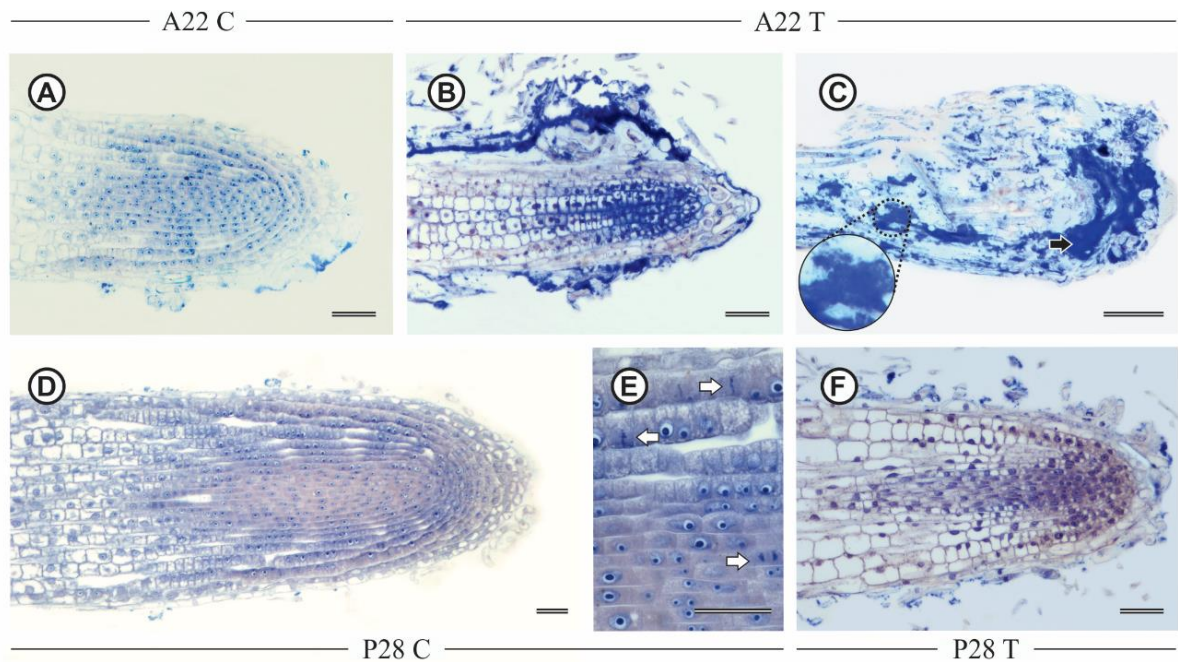


Figura 4 – Cortes longitudinais de ápices radiculares de *Pfaffia glomerata*, após 30 dias de exposição a 0 (controle) e 500 μM Al (tratamento), submetidos ao teste histoquímico com Chrome Azurol S para detecção de Al. A reação positiva é indicada pela coloração azul. A-C: Acesso 22; D-F: Poliploide 28. Detalhe em C indica a presença de Al em material precipitado, seta preta indica a presença de Al em tecido necrosado, seta branca indica a presença de Al em núcleos em processo de divisão celular. Barra = 50 μm .

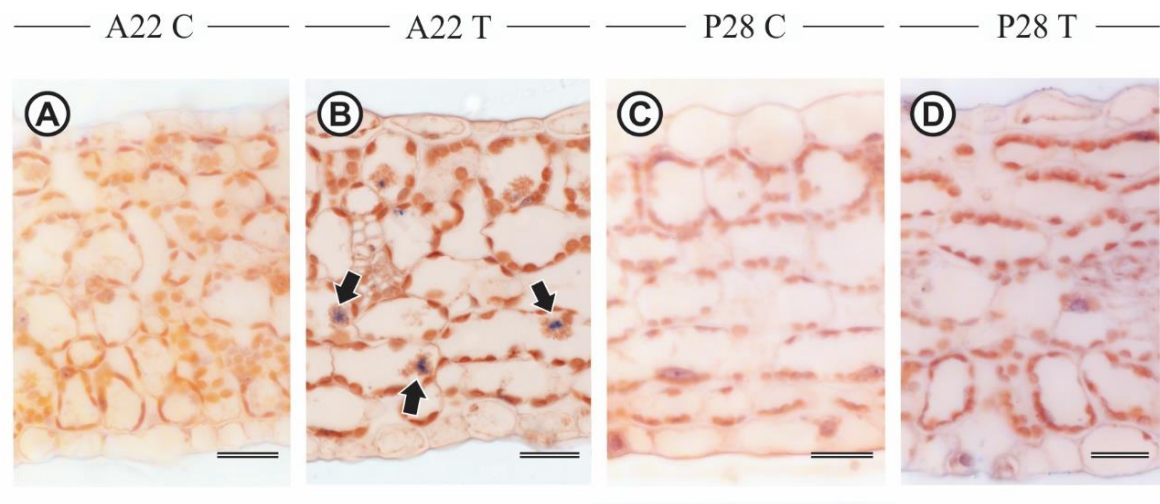


Figura 5 - Folhas de *Pfaffia glomerata*, após 30 dias de exposição a 0 e 500 μM Al, submetidas ao teste histoquímico com Chrome Azurol S para detecção de Al (cortes transversais em microscopia de luz). As setas pretas indicam a reação positiva, caracterizada pela coloração azul. A-B: Acesso 22; C-D: Poliploide 28,. Barra = 25 μm .

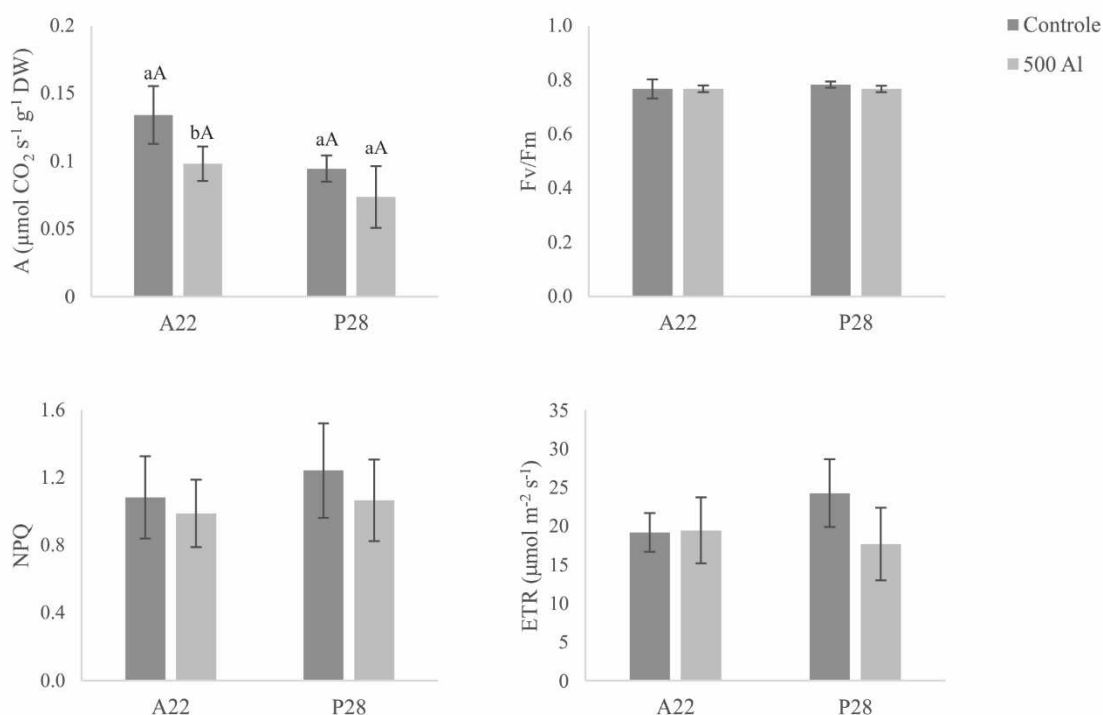


Figura 6 - Parâmetros fotossintéticos avaliados em folhas dos citótipos diploide (A22) e tetraploide (P28) de *Pfaffia glomerata*, após 30 dias de exposição a 0 e 500 μM Al. A: taxa de assimilação líquida de CO_2 ; F_v/F_m : rendimento quântico máximo da atividade do fotossistema II; NPQ: quenching não-fotoquímico; ETR: taxa de transporte de elétrons. Barra: desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste Tukey a 5%. Letras minúsculas comparam entre as diferentes concentrações de Al no mesmo acesso, letras maiúsculas comparam entre acessos sob a mesma concentração de Al.

Os valores de fluorescência (F_v/F_m), de coeficiente de extinção não fotoquímico (NPQ) e de taxa de transporte aparente de elétrons (ETR) evidenciaram que não há limitação fotoquímica no processo fotossintético de nenhum dos citótipos, mesmo no tratamento com 500 μM Al (Fig. 6). A relação F_v/F_m tem sido amplamente utilizada na literatura como uma estimativa da eficiência quântica máxima da atividade fotoquímica do PSII (BAKER; ROSENQVIST, 2004) em resposta a estresses bióticos e abióticos e o declínio em seus valores sugere a inibição da atividade fotoquímica em decorrência de danos estruturais nos tilacóides (KONRAD et al., 2005). Neste trabalho, os valores de F_v/F_m estiveram acima de 0,75 e não diferiram entre citótipos ou entre tratamentos. Em plantas sensíveis, o estresse por Al pode levar à redução de F_v/F_m , associada à redução da taxa de assimilação líquida de CO_2 , da condutância estomática, da taxa de transpiração e do teor de clorofilas (ANJUM et al., 2016; GUO, 2012; HASNI et al., 2015; OHKI, 1986; RIBEIRO et al., 2013).

Apesar da integridade dos tilacoides ter sido comprovada para ambos os citótipos, a taxa de assimilação líquida de carbono reduziu significativamente no diploide A22, no tratamento com 500 μM Al. Possivelmente, a fotossíntese nessas folhas não foi limitada por questões

fotoquímicas, como a redução na concentração de pigmentos (Fig. 6) e a menor eficiência de conversão fotoquímica do PSII (Fig. 6), mas provavelmente por limitações bioquímicas (OBATA; FERNIE, 2012; PEIXOTO; DA MATTA; DA MATTA, 2002). A menor assimilação de carbono registrada para o diploide A22 pode ser um dos fatores associados à redução da sua biomassa foliar após tratamento com Al. Apesar do comprometimento no crescimento deste citótipo, não foi observada insuficiência na produção de amido e proteínas em relação às plantas do tratamento controle (Fig. 7).

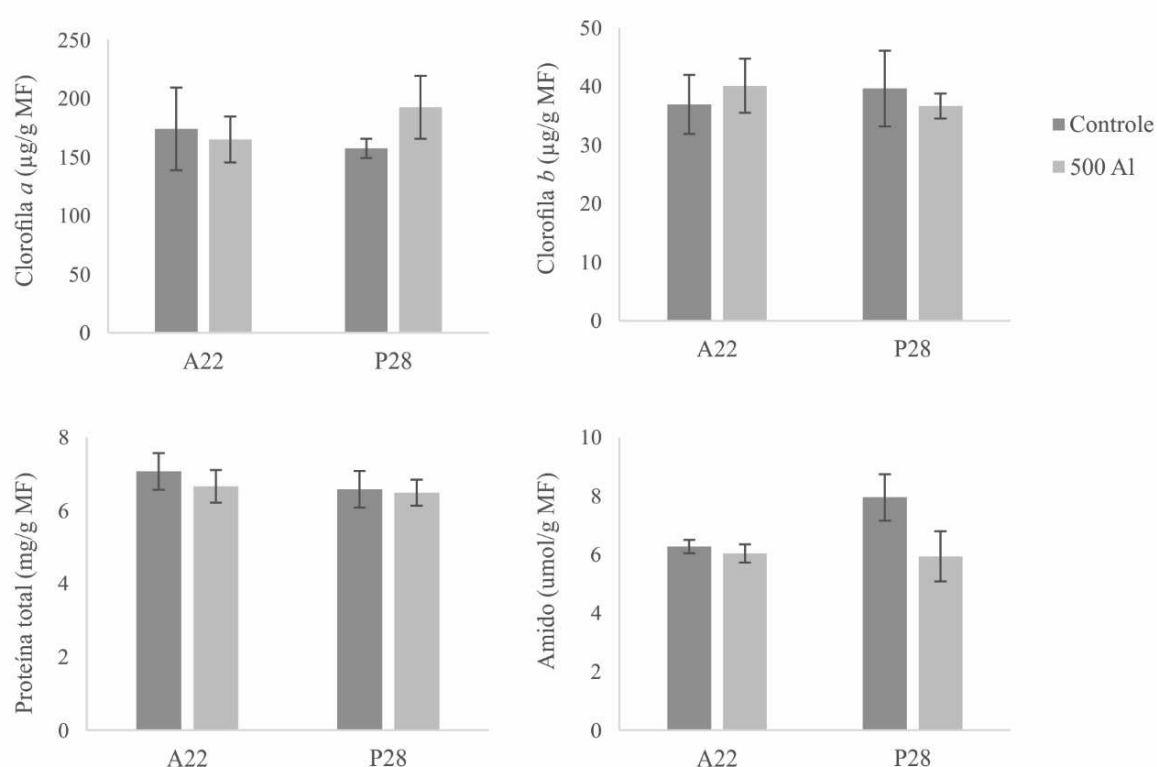


Figura 7 - Concentração de clorofila *a*, clorofila *b*, proteína total e amido em folhas dos citótipos diploide (A22) e tetraploide (P28) de *Pfaffia glomerata*, após 30 dias de exposição a 0 e 500 μM Al. Barra: desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste Tukey a 5%. Letras minúsculas comparam entre as diferentes concentrações de Al no mesmo acesso, letras maiúsculas comparam entre acessos sob a mesma concentração de Al.

A atividade das enzimas do sistema antioxidante (CAT, APX e SOD) foi significativamente maior nas raízes do poliploide P28 em resposta ao estresse por Al, ao passo que o diploide A22 apresentou maior atividade apenas de SOD nas raízes (Fig. 8). Nas folhas, órgão com menor interação com o Al neste estudo, a resposta foi menos intensa e apenas o poliploide P28 apresentou maior atividade da enzima SOD. CAT e APX são responsáveis por transformar peróxidos em espécies de oxigênio menos reativas, entretanto, SOD é a primeira

linha de defesa contra EROs acumuladas em resposta a um estresse abiótico e é o componente mais efetivo do sistema de defesa antioxidante na célula vegetal (SAIBI; BRINI, 2018). Em outras espécies, o aumento da capacidade antioxidante dos poliploides, em comparação com seus equivalentes diploides, garantiu maior tolerância também ao cádmio, ao frio, à seca, à luz UV e ao déficit nutricional (DENG et al., 2012; KEMESYTE; STATKEVICIUTE; BRAZAUSKAS, 2017; NIWA; SASAKI, 2003; TALUKDAR, 2014). Enquanto o diploide A22 empregou mecanismos externos na evitação do Al, o tetraploide P28 mostrou-se eficaz no emprego de mecanismos internos contra a toxidez do metal.

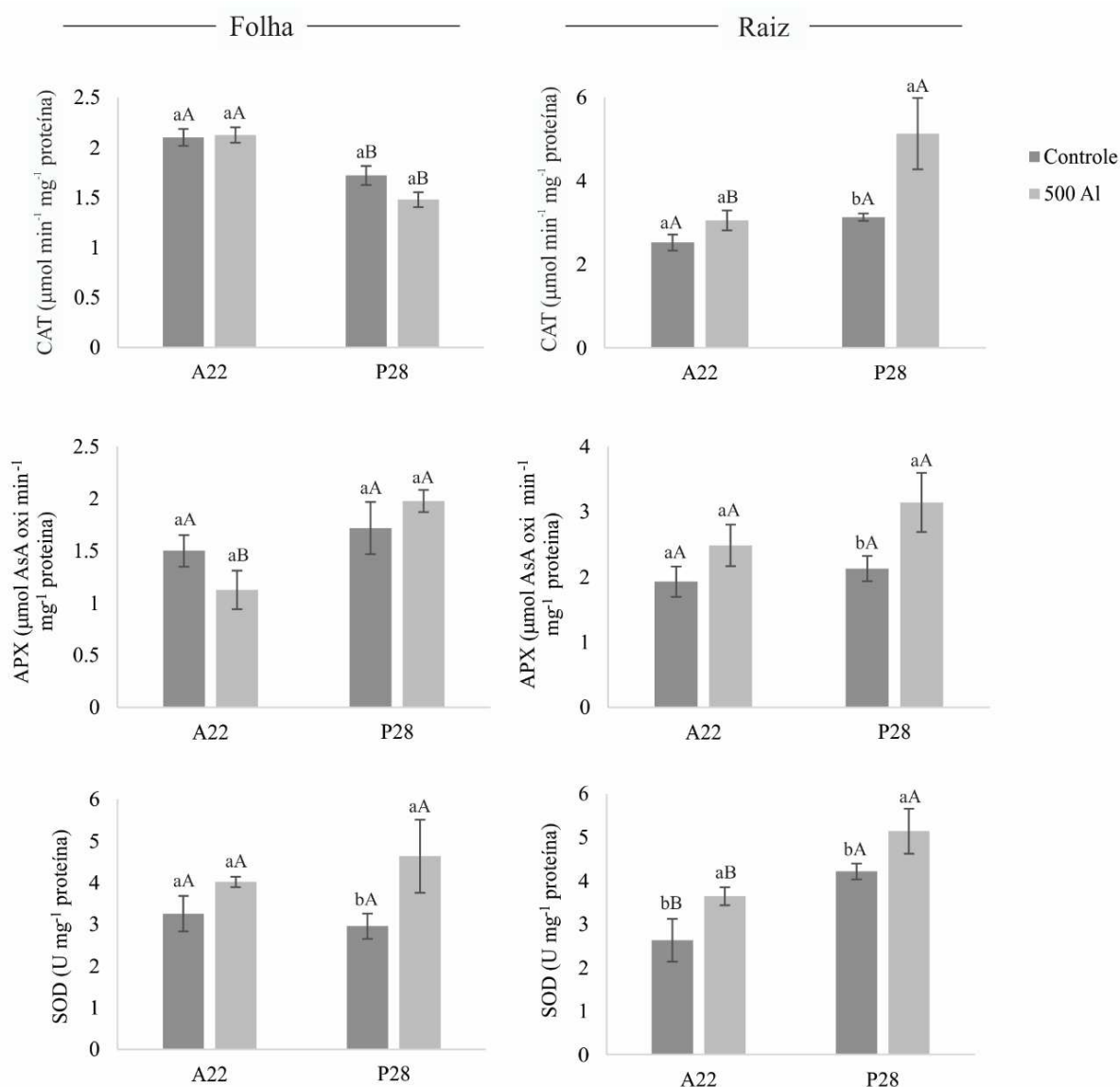


Figura 8 - Atividade de enzimas do sistema antioxidante de folhas e raízes dos citótipos diploide (A22) e tetraploide (P28) de *Pfaffia glomerata*, após 30 dias de exposição a 0 e 500 μM Al. Barra: desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste Tukey a 5%. Letras minúsculas comparam entre as diferentes concentrações de Al no mesmo acesso, letras maiúsculas comparam entre acessos sob a mesma concentração de Al.

Conclusão

A poliploidia induzida de *P. glomerata* mostrou-se eficiente na criação de um genótipo mais tolerante ao estresse por Al que o seu antecessor diploide A22. P28 não apresentou redução significativa no acúmulo de biomassa, na atividade fotossintética ou na produção de metabólitos e a sua resistência esteve diretamente associada à atuação de enzimas do sistema antioxidante. Por outro lado, A22 apresentou mecanismos físicos de evitação ao Al, como a descamação da coifa e a complexação do Al no entorno do ápice radicular, além da compartimentalização em vacúolo nas folhas.

Referências

- ANJUM, S. A. et al. Aluminum and chromium toxicity in maize: implications for agronomic attributes, net photosynthesis, physio-biochemical oscillations, and metal accumulation in different plant parts. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 227, n. 9, 2016.
- ANWAR, S. Genetic-phenotypic variability and correlation between morphology-anatomy-physiology characteristics and dry matter yield of polyploidized forage grasses under aluminum stressed condition. **Animal Production**, v. 9, n. 1, p. 23–29, 2007.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, n. 1, p. 373–399, 2004.
- BAKER, N. R.; ROSENQVIST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: An examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 403, p. 1607–1621, 2004.
- BOJÓRQUEZ-QUINTAL, E. et al. Aluminum, a friend or foe of higher plants in acid soils. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. 1767, p. 1–18, 12 out. 2017.
- BRUNNER, I.; SPERISEN, C. Aluminum exclusion and aluminum tolerance in woody plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. June, p. 172, 2013.
- CHAGAS, K. Morpho-physiological evaluation of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen accessions grown under photoautotrophy and water stress conditions. **Tese**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2019.
- CHAGAS, K. et al. Photosynthetic efficiency in diploid and polyploidy accessions of *Pfaffia glomerata* evaluated with a novel and rapid tool for in vitro whole-plant assays. **Submetido**, 2022.
- CHANDRA, A.; DUBEY, A. Effect of ploidy levels on the activities of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase, superoxide dismutase and peroxidase in *Cenchrus* species grown under water stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 1, p. 27–34, jan. 2010.
- CHEN, Z. J. Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 2, p. 57–71, 1 fev. 2010.

CORRÊA, J. P. O. et al. Induced polyploidization increases 20-hydroxyecdysone content, in vitro photoautotrophic growth, and ex vitro biomass accumulation in *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 52, n. 1, p. 45–55, 2016.

CORRÊA-JÚNIOR, C. et al. **Fáfia - O ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Sprengel) Pedersen): aspectos agronômicos e fitoquímicos**. Curitiba: Clichetec, 2006.

CORRÊA-JUNIOR, C.; MING, L. C. Fáfia (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen): o ginseng brasileiro. In: ALEXIADES, M. N.; SHANLEY, P. (Eds.). **Productos florestales, medios de subsistencia y conservacion: estudios de caso sobre sistemas de manejo de produtos florestales no maderables**. Jakarta: CIFOR, 2004. p. 349–362.

COSTA, A. C. et al. A reliable methodology for assessing the *in vitro* photosynthetic competence of two Brazilian savanna species: *Hyptis marruboides* and *Hancornia speciosa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 117, n. 3, p. 443–454, 2014.

CROSS, J. M. et al. Variation of enzyme activities and metabolite levels in 24 *Arabidopsis* accessions growing in carbon-limited conditions. **Plant Physiology**, v. 142, n. 4, p. 1574–1588, 2006.

D'AUTRÉAUX, B.; TOLEDANO, M. B. ROS as signalling molecules: Mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 10, p. 813–824, 2007.

DENG, B. et al. Antioxidant response to drought, cold and nutrient stress in two ploidy levels of tobacco plants: Low resource requirement confers polytolerance in polyploids? **Plant Growth Regulation**, v. 66, n. 1, p. 37–47, 28 jan. 2012.

EEKHOUT, T.; LARSEN, P.; VEYLDER, L. DE. Modification of DNA checkpoints to confer aluminum tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 2, p. 102–105, 1 fev. 2017.

FELIPE, S. H. S. et al. Accessions of Brazilian ginseng (*Pfaffia glomerata*) with contrasting anthocyanin content behave differently in growth, antioxidative defense, and 20-hydroxyecdysone levels under UV-B radiation. **Protoplasma**, v. 256, n. 6, p. 1557–1571, 2019a.

FELIPE, S. H. S. et al. Salinity-induced modifications on growth, physiology and 20-hydroxyecdysone levels in Brazilian-ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 140, p. 43–54, 2019b.

FERNIE, A. R. et al. Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: Fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling heterotrophic cells. **Planta**, v. 212, n. 2, p. 250–263, 2001.

FIGUEIREDO, L. S. et al. **Comportamento de 23 acessos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) nas condições de Campos do Goytacazes – RJ**. XVII Simpósio Brasileiro de Plantas Medicinais. **Anais**. Cuiabá - MT: 2002.

FORTINI, E. A. et al. Photoperiod modulates growth and pigments and 20-hydroxyecdysone accumulation in Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] grown in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 142, n. 3, p. 595–611, 1 set. 2020.

- GIBON, Y. et al. A Robot-based platform to measure multiple enzyme activities in *Arabidopsis* using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. **The Plant cell**, v. 16, p. 3304–3325, 2004.
- GOMES, S. S. L. et al. Karyotype, genome size, and in vitro chromosome doubling of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 118, n. 1, p. 45–56, 2014.
- GUO, T. R. Photosynthesis and antioxidant capacity in barley seedlings under the combined toxicity of cadmium and aluminum. **Advanced Materials Research**, v. 610–613, p. 467–471, 2012.
- HASNI, I. et al. Mechanism of interaction of Al^{3+} with the proteins composition of photosystem II. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–23, 2015.
- HEDE, A. R.; SKOVMAND, B.; LOPEZ-CESATI, J. Acid Soils and Aluminum Toxicity. In: REYNOLDS, M. P.; ORTIZ-MONASTERIO, J. I.; MCNAB, A. (Eds.). **Application of Physiology in Wheat Breeding**. Mexico: D.F.: CIMMYT, 2001. p. 172–182.
- JANSEN, S.; WATANABE, T.; SMETS, E. Aluminium accumulation in leaves of 127 species in Melastomataceae, with comments on the order Myrtales. **Annals of Botany**, v. 90, p. 53–64, 2002.
- JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw Hill Book, 1940.
- KEMESYTE, V.; STATKEVICIUTE, G.; BRAZAUSKAS, G. Perennial ryegrass yield performance under abiotic stress. **Crop Science**, v. 57, n. 4, p. 1935–1940, 15 jul. 2017.
- KOCHIAN, L. V.; HOEKENGA, O. A.; PIÑEROS, M. A. How do crop plants tolerate acid soils? mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, n. 1, p. 459–493, 2004.
- KOCHIAN, L. V.; PIÑEROS, M. A.; HOEKENGA, O. A. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. **Plant and Soil**, v. 274, n. 1–2, p. 175–195, jul. 2005.
- KONRAD, M. L. F. et al. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila em seis cultivares de cafeeiro sob estresse de alumínio. **Bragantia**, v. 64, n. 3, p. 339–347, 2005.
- KOPITTKKE, P. M. et al. Kinetics and nature of aluminium rhizotoxic effects: A review. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 15, p. 4451–4467, 1 ago. 2016.
- KUKACHKA, B. F.; MILLER, R. B. A chemical spot-test for aluminum and its value in wood identification. **IAWA Bulletin**, v. 1, n. 3, p. 104–109, 1980.
- LOUBACK, E. et al. CO₂ enrichment leads to altered cell wall composition in plants of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 145, n. 3, p. 603–613, 1 jun. 2021.
- MALDANER, J. et al. Aluminum accumulation in two *Pfaffia glomerata* genotypes and its growth effects. **Ciência Rural**, v. 45, n. 6, p. 1013–1020, 2015.
- MENG, C. et al. Global soil acidification impacts on belowground processes. **Environmental Research Letters**, v. 14, n. 7, 1 jul. 2019.

- MENG, L. et al. Sensitivity of wetland methane emissions to model assumptions: application and model testing against site observations. **Biogeosciences Discussions**, v. 8, n. 3, p. 6095–6160, 2011.
- MING, L. C.; CORREA, C. **Collection of Fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] in Northwestern State of Paraná - Brazil**. Acta Horticulturae. **Anais**. International Society for Horticultural Science, 30 abr. 2002. . Acesso em: 15 ago. 2022
- MONTANARI JR., I. Exploração econômica de plantas medicinais da Mata Atlântica. In: LINO, C. F.; SIMÕES, L. L. (Eds.). **Sustentável Mata Atlântica: A exploração de seus Recursos Florestais**. [s.l.] Ed. Senac, 2002. p. 35–54.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962.
- NICOLOSO, F. T. et al. Micropropagação do ginseng brasileiro *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 3, n. 2, p. 11–18, 2001.
- NIWA, Y.; SASAKI, Y. Plant self-defense mechanisms against oxidative injury and protection of the forest by planting trees of triploids and tetraploids. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 55, n. 1, p. 70–81, 2003.
- NUNES-NESI, A. et al. The complex role of mitochondrial metabolism in plant aluminum resistance. **Trends in Plant Science**, v. 19, n. 6, p. 399–407, 2014.
- OBATA, T.; FERNIE, A. R. The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, n. 19, p. 3225–3243, 2012.
- OHKI, K. Photosynthesis, Chlorophyll, and Transpiration Responses in Aluminum Stressed Wheat and Sorghum. **Crop Science**, v. 26, n. 3, p. 572–575, 1986.
- PEIXOTO, H. P.; DA MATTA, F. M.; DA MATTA, J. C. Responses of the photosynthetic apparatus to aluminum stress in two sorghum cultivars. **Journal of Plant Nutrition**, v. 25, n. 4, p. 821–832, 2002.
- PORRA, R. J.; THOMPSON, W. A.; KRIEDEMANN, P. E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 975, n. 3, p. 384–394, 1989.
- POSCHENRIEDER, C. et al. Mechanisms of hyper-resistance and hyper-tolerance to aluminum in plants. In: PANDA, S. K.; BALUŠKA, F. (Eds.). **Aluminum Stress Adaptation in Plants**. 1. ed. [s.l.] Springer Cham, 2015. v. 24p. 81–98.
- RAUF, S. et al. Induced Polyploidy: A Tool for Forage Species Improvement. **Agriculture**, v. 11, n. 3, p. 210, 4 mar. 2021.
- RENNY-BYFIELD, S.; WENDEL, J. F. Doubling down on genomes: Polyploidy and crop plants. **American Journal of Botany**, v. 101, n. 10, p. 1711–1725, 1 out. 2014.
- RIBEIRO, M. A. Q. et al. Aluminum Effects on Growth, Photosynthesis, and Mineral Nutrition of Cacao Genotypes. **Journal of Plant Nutrition**, v. 36, n. 8, p. 1161–1179, 2013.

RYAN, P. R. et al. Assessing how the aluminum-resistance traits in wheat and rye transfer to hexaploid and octoploid triticale. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1334, 15 out. 2018.

SAIBI, W.; BRINI, F. Superoxide Dismutase (SOD) and abiotic stress tolerance in plants: An overview. In: MAGLIOZZI, S. (Ed.). **Superoxide Dismutase**. [s.l.] Nova Science Publishers, Inc., 2018. p. 101–142.

SALDANHA, C. W. et al. A CO₂-enriched atmosphere improves in vitro growth of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 49, n. 4, p. 433–444, 2013.

SALEH, B. et al. Tetraploid citrus rootstocks are more tolerant to salt stress than diploid. **Comptes Rendus - Biologies**, v. 331, n. 9, p. 703–710, 1 set. 2008.

SCHOLLES, D. R.; PAIGE, K. N. Plasticity in ploidy: A generalized response to stress. **Trends in Plant Science**, v. 20, n. 3, p. 165–175, 1 mar. 2015.

SILVA, T. D. et al. Morphophysiological in vitro performance of Brazilian ginseng (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) based on culture medium formulations. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 55, n. 4, p. 454–467, 2019.

SILVA, T. D. et al. Blue and red light affects morphogenesis and 20-hydroxyecdysone content of in vitro *Pfaffia glomerata* accessions. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 203, 1 jan. 2020.

SINGH, S. et al. Toxicity of aluminium on various levels of plant cells and organism: A review. **Environmental and Experimental Botany**, v.137, p. 177-193, 1 maio 2017.

SUGIYAMA, S. Differentiation in competitive ability and cold tolerance between diploid and tetraploid cultivars in *Lolium perenne*. **Euphytica**, v. 103, n. 1, p. 55–59, 1998.

TALUKDAR, D. Increasing nuclear ploidy enhances the capability of antioxidant defense and reduces chromotoxicity in *Lathyrus sativus* roots under cadmium stress. **Turkish Journal of Botany**, v. 38, n. 4, p. 696–712, 16 maio 2014.

VAN DE PEER, Y. et al. Polyploidy: an evolutionary and ecological force in stressful times. **Plant Cell**, v. 33, n. 1, p. 11–26, 1 jan. 2021.

VAN DE PEER, Y.; MAERE, S.; MEYER, A. The evolutionary significance of ancient genome duplications. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 10, p. 725–732, out. 2009.

VAN DE PEER, Y.; MIZRACHI, E.; MARCHAL, K. The evolutionary significance of polyploidy. **Nature Reviews Genetics**, v. 18, n. 7, p. 411–424, 1 jul. 2017.

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

VON UEXKÜLL, H. R.; MUTERT, E. Global Extent, Development and Economic-Impact of Acid Soils. **Plant and Soil**, v. 171, p. 1–15, 1995.

WAGATSUMA, T. et al. Significant role of the plasma membrane lipid bilayers in aluminum tolerance of plants. In: PANDA, S. K.; BALUSKA, F. (Eds.). **Aluminum stress adaptation in plants**. [s.l.] Springer International Publishing, 2015. p. 99–124.

WANG, J. W.; KAO, C. H. Aluminum-inhibited root growth of rice seedlings is mediated through putrescine accumulation. **Plant and Soil**, v. 288, n. 1–2, p. 373–381, 2006.

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

YU, H. N. et al. The effect of aluminum treatments on the root growth and cell ultrastructure of two soybean genotypes. **Crop Protection**, v. 30, n. 3, p. 323–328, 1 mar. 2011.

CONCLUSÃO GERAL

As espécies utilizadas neste estudo, *A. thaliana* e *P. glomerata*, responderam de modo significativo ao estresse por Al. Os resultados mostram que, embora a comunicação entre retículo endoplasmático e membrana plasmática não seja um mecanismo de resistência a íons trivalentes em *A. thaliana*, houve a reorganização do sistema de comunicação não vesicular na célula. Acredita-se que o rearranjo do posicionamento das proteínas SYT1 em resposta ao estresse por íons trivalentes não seja guiado por alterações na concentração de cálcio citosólico, mas sim pela modificação lenta na composição lipídica da membrana plasmática, com acúmulo especialmente de PI(4)P. Em *P. glomerata*, a variação de intensidade de resposta entre os acessos 22 e 43 à toxidez do Al endossaram a influência da variabilidade genética na resposta das plantas ao estresse. De todo modo, o padrão apresentado pelos acessos foi semelhante e, portanto, a baixa translocação de Al para a parte aérea e a compartimentalização do metal em vacúolos garantiram a integridade dos tecidos foliares em ambos os acessos e, nas raízes, a intensa descamação das células da coifa apresentou-se como efeito de toxidez do Al, mas também como um mecanismo de resistência. Em comparação entre o diploide A22 e o autopoliploide P28 de *P. glomerata*, observou-se que P28 não apresentou redução significativa no acúmulo de biomassa, na atividade fotossintética ou na produção de metabólitos e a sua resistência esteve diretamente associada à atuação de enzimas do sistema antioxidante. Por outro lado, A22 apresentou mecanismos físicos de evitação ao Al, como a descamação da coifa, a complexação do Al no entorno do ápice radicular e a compartimentalização em vacúolo nas folhas. A poliploidia induzida de *P. glomerata* mostrou-se eficiente na criação de um genótipo mais tolerante ao estresse por Al que o antecessor diploide A22.