

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

Aluminum: the unexpected ally of *Borreria latifolia* (Aubl). K. Schum.
(Rubiaceae)

Elen Silma Oliveira Cruz Ximenes
Doctor Scientiae

VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025

ELEN SILMA OLIVEIRA CRUZ XIMENES

**Aluminum: the unexpected ally of *Borreria latifolia* (Aubl). K. Schum.
(Rubiaceae)**

Thesis submitted to the Plant Physiology
Graduate Program of the Universidade
Federal de Viçosa in partial fulfillment of
the requirements for the degree of *Doctor
Scientiae*.

Adviser: Cleberson Ribeiro

Co-advisers: Aristeia Alves Azevedo
Vitor Batista Pinto

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

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

T

X6a
2025

Ximenes, Elen Silma Oliveira Cruz, 1989-
Aluminum: the unexpected ally of *Borreria latifolia* (Aubl).
K. Schum. (Rubiaceae) / Elen Silma Oliveira Cruz Ximenes. –
Viçosa, MG, 2025.

1 tese eletrônica (131 f.): il. (algumas color.).

Texto em português e inglês.

Orientador: Cleberson Ribeiro.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Vegetal, 2025.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.586>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Borreria latifolia* - Efeito do alumínio. 2. *Borreria latifolia* - Crescimento. 3. Estresse oxidativo. I. Ribeiro, Cleberson, 1980-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. III. Título.

CDD 22. ed. 583.93

ELEN SILMA OLIVEIRA CRUZ XIMENES

**Aluminum: the unexpected ally of *Borreria latifolia* (Aubl). K. Schum.
(Rubiaceae)**

Thesis submitted to the Plant Physiology
Graduate Program of the Universidade
Federal de Viçosa in partial fulfillment of the
requirements for the degree of *Doctor
Scientiae*.

APPROVED: July 8, 2025.

Assent:

Elen Silma Oliveira Cruz Ximenes
Author

Clebson Ribeiro
Adviser

Essa tese foi assinada digitalmente pela autora em 17/09/2025 às 13:28:26 e pelo orientador em 18/09/2025 às 07:58:12. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **EXZO.3RXB.26NA** e clique no botão 'Validar documento'.

***À minha vó Rita (mãe solo de 6,
trabalhadora rural que faleceu tão perto
de testemunhar que mulher autista,
neta de analfabeta pode ser doutora)***

***À minha querida vó Alta
(trabalhadora rural que depois dos 50 anos
aprendeu a ler e escrever)***

***Às minhas sobrinhas Olívia e Theodora
(esperança de um mundo no qual
as mulheres sejam tratadas como seres humanos).
Não importa a luta, sejam
o que vocês quiserem!***

***A todas as mulheres que foram
impedidas de pelos pais,
maridos, excesso de atividades domésticas
ou pela falta de apoio assistencial...***

ACKNOWLEDGMENTS

Sou grata a Deus pela vida, pela oportunidade de estudar, pelas pessoas que me apoiaram nessa trajetória.

Agradeço ao meu esposo Wesley Ximenes pela parceria, apoio incondicional, gentileza, bondade e amor. Obrigada pelo cuidado em meio ao caos.

Aos meus pais (Elza e Gabriel) e irmã (Círia) por sempre acreditarem em mim e me apoiarem em todas as circunstâncias. À Olívia, pelo amor e por me alegrar com sua pureza. A todos os meus familiares, sogra, sogro, tias e tios, primos e primas que torceram por mim e me ajudaram de alguma forma.

Ao meu orientador, professor Cleberson Ribeiro, pela orientação dedicada, respeitosa e acessível.

Aos meus amigos de longe ou de perto por se importarem com minha vida acadêmica e vez ou outra perguntarem sobre os meus desafios e vivências. Em especial, agradeço à Carolina Castro, não só pela ajuda com as análises de trocas gasosas, mas por ter validado a minha dor no pior momento que passei durante o doutorado. Obrigada por ter me ajudado a entender que assédio moral é inadmissível! (Mulheres cientistas, violência psicológica precede à violência física. Assédio moral é crime. Denuncie!)

Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular de Plantas (LGMP) pela colaboração, principalmente ao Bruno Gonçalves pelos ensinamentos e descontração. À Thais Vida pela parceria fiel e trabalho dedicado (inclusive, braçal). A todas as colegas pela amizade feminina imprescindível.

Ao Laboratório de Anatomia Vegetal, representado pela minha coorientadora, professora Aristéa. Ao incrível colega de trabalho João Santana, pessoa e profissional excepcional! Obrigada, Joanito! Você foi minha companhia de trabalho favorita.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise. Aos servidores Karla e Gilmar, pelo profissionalismo, boa vontade e simpatia.

À Unidade de Crescimento de Plantas, em especial à Dora e ao professor Wagner Araújo.

Ao Laboratório de Citogenética e Citometria, ao professor Wellington, Fernanda e Ana Paula.

Ao meu coorientador, professor Vitor, pelos ensinamentos e parceria.

Ao Instituto BIOAGRO, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia

Vegetal e à Universidade Federal de Viçosa.

Às agências de fomento CAPES e CNPQ.

This work has been sponsored by the following Brazilian research agencies: Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES; Financing code 001), Minas Gerais State Foundation for Research Aid (FAPEMIG) and National Council of Scientific and Technological Development (CNPq).

**“Eu cheguei aonde cheguei, porque
tudo o que planejei deu errado.”**

Rubem Alves

ABSTRACT

XIMENES, Elen Silma Oliveira Cruz, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2025. **Aluminum: the unexpected ally of *Borreria latifolia* (Aubl.) K. Schum. (Rubiaceae).** Adviser: Cleberson Ribeiro. Co-advisers: Aristea Alves Azevedo and Vítor Batista Pinto.

Aluminum (Al) is a phytotoxic element for most crops. However, some species native to acidic soils accumulate large amounts of the metal without impairing their development. *Borreria latifolia* (Aubl.) K. Schum. (Rubiaceae) is a naturally occurring Al hyperaccumulator in the Cerrado. Some evidence points to positive effects of Al on this species. In this context, we investigated whether the development of *B. latifolia* depends on the presence and concentration of Al. In addition, the interaction between the metal and pH was also analyzed in plant growth. To this end, we conducted two experiments: I) plants grown in a hydroponic system under concentrations of 0, 250, 500, and 750 μM Al; II) factorial scheme of plant cultivation at two concentrations (0 or 750 μM Al) under three pH conditions (3.5, 4.5, and 5.5). Morphological, anatomical, ultrastructural, micromorphological, and biochemical analyses were performed. The 750 μM Al concentration at pH 4.5 provided the highest growth rates, while the absence of Al resulted in root apex necrosis and changes in the cells of the root meristematic region. On the other hand, in plants treated with Al, the metal was located in the nuclei in the meristematic region of the root and in the chloroplasts without any damage to the structures. Consequently, we understand that the absence of Al is a limiting factor for the development of *B. latifolia*. Considering these results, we proceeded to test the hypothesis of the essentiality of Al for this species. To be essential, in addition to the element being irreplaceable and the plant not completing its life cycle in the absence of the nutrient, it must be involved in the plant's metabolism. In this sense, we cultivated the plants in a hydroponic system under four treatments: I) absence (0 μM) or II) presence (750 μM) of Al for 57 days; III) absence of Al for 20 days, followed by addition of the metal (0 $\rightarrow$ 750 μM Al) for another 37 days; and IV) presence of Al for 20 days, followed by deprivation of the metal (750 $\rightarrow$ 0 μM Al) for another 37 days. Morphoanatomical, physiological, and biochemical analyses demonstrated that Al is indispensable for the development of *B. latifolia*. In the absence of the metal, the apical meristems died, inhibiting plant growth. No element considered essential provided the photosynthetic performance and antioxidant robustness of plants grown with Al. For the first time, we present the proteomic profile of the species, pointing out proteins exclusive to the 750 μM Al

concentration, in addition to proteins positively regulated by the metal, essential for biological functions related to energy metabolism. Therefore, Al meets all the criteria of essentiality for *B. latifolia*.

Keywords: Al hyperaccumulator; nuclear Al; Al responsive proteins; network topology

RESUMO

XIMENES, Elen Silma Oliveira Cruz, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2025. **Alumínio: o aliado de *Borreria latifolia* (Aubl.) K. Schum. (Rubiaceae).** Orientador: Cleberson Ribeiro. Coorientadores: Aristeia Alves Azevedo e Vítor Batista Pinto.

O alumínio (Al) é um elemento fitotóxico para a maioria das culturas. Entretanto, algumas espécies nativas de solos ácidos acumulam grandes quantidades do metal sem prejuízos no seu desenvolvimento. *Borreria latifolia* (Aubl.) K. Schum. (Rubiaceae) é uma herbácea hiperacumuladora de Al, de ocorrência natural no Cerrado. Algumas evidências apontam efeitos positivos do Al para essa espécie. Nesse contexto, investigamos se o desenvolvimento de *B. latifolia* depende da presença e da concentração de Al. Além disso, a interação entre o metal e o pH também foi analisada no crescimento das plantas. Com esta finalidade, conduzimos dois experimentos: I) plantas cultivadas em sistema de hidroponia sob as concentrações 0; 250; 500 e 750 μM de Al; II) esquema fatorial de cultivo das plantas em duas concentrações (0 ou 750 μM Al) em três condições de pH (3,5; 4,5; 5,5). Análises morfológicas, anatômicas, ultraestruturais, micromorfológicas e bioquímicas foram realizadas. A concentração 750 μM de Al em pH 4,5 proporcionou as maiores taxas de crescimento, enquanto a ausência de Al resultou em necrose do ápice radicular e alterações nas células da região meristemática radicular. Por outro lado, nas plantas tratadas com o Al, o metal foi localizado nos núcleos na região meristemática da raiz e nos cloroplastos sem qualquer dano às estruturas. Consequentemente, entendemos que a ausência de Al é um fator limitante para o desenvolvimento de *B. latifolia*. Considerando esses resultados, prosseguimos para testar a hipótese da essencialidade do Al para esta espécie. Para ser essencial, além do elemento ser insubstituível e a planta não completar seu ciclo de vida na ausência do nutriente, é preciso envolvimento no metabolismo do vegetal. Nesse sentido, cultivamos as plantas em sistema de hidroponia sob 4 tratamentos: I) ausência (0 μM) ou II) presença (750 μM) de Al por 57 dias; III) ausência de Al por 20 dias, seguido de adição do metal (0 $\rightarrow$ 750 μM Al) por mais 37 dias e IV) presença de Al por 20 dias, seguido de privação do metal (750 $\rightarrow$ 0 μM Al) por mais 37 dias. As análises morfoanatômicas, fisiológicas e bioquímicas demonstraram que o Al é indispensável para o desenvolvimento de *B. latifolia*. Na ausência do metal os meristemas apicais morreram, inibindo o crescimento da planta. Nenhum elemento considerado essencial proporcionou o desempenho fotossintético e a robustez antioxidante das plantas cultivadas com Al. De forma inédita, apresentamos o perfil

proteômico da espécie, apontando proteínas exclusivas na concentração de 750 μM Al, além de proteínas reguladas positivamente pelo metal, essenciais para funções biológicas relacionadas ao metabolismo energético. Portanto, o Al cumpre todos os critérios de essencialidade para *B. latifolia*.

Palavras-chave: hiperacumuladora de Al; Al nuclear; proteínas responsivas ao Al; topologia de rede

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	14
	REFERÊNCIAS	17
	Capítulo 1	19
	Capítulo 2	56
2	CONCLUSÃO GERAL	131

Capítulo 1

	Aluminum Modulates the Morphophysiological Plasticity of <i>Borreria latifolia</i> (Aubl.) K. Schum. (Rubiaceae) a Herbaceous Species from the Brazilian Cerrado.....	20
1	INTRODUCTION	23
2	MATERIALS AND METHODS	25
	2.1. Plant material and growing conditions	25
	2.2. Experiment 1: Dose-Response	26
	2.3. Experiment 2: Al and pH interactions	26
	2.4. Relative growth rate	26
	2.5. Detection of Al in root apices	27
	2.6. Quantification of Al concentration in dry matter	27
	2.7. Anatomical and histochemical analysis	27
	2.8. Scanning electron microscopy (SEM) combined with energy-dispersive X-ray spectrometry (EDS)	28
	2.9. Confocal Laser Scanning Microscopy	28
	2.10. Antioxidant enzyme activities	29
	2.11. Statistical Analysis.....	30
3	RESULTS	31
	3.1. Growth of <i>Borreria latifolia</i> depends on aluminum concentration	31
	3.2. The beneficial effect of Al on <i>Borreria latifolia</i> growth depends on pH.....	31
	3.3. Al deprivation induces anatomical changes, while Al accumulates in metabolically active tissues.....	32
	3.4. Al modulates the enzymatic antioxidant system in <i>Borreria latifolia</i>	34
4	DISCUSSION	35
5	CONCLUSION	38
	REFERENCES.....	39

TABLES AND FIGURES	45
SUPPLEMENTARY MATERIAL	54

Capítulo 2

Perfil proteômico e vias metabólicas envolvidas na essencialidade do alumínio para <i>Borreria latifolia</i> (Aubl.) K. Schum. (Rubiaceae)	56
1 INTRODUÇÃO	59
2 MATERIAL E MÉTODOS	62
2.1 Material vegetal e condições de cultivo	62
2.2 Caracterização morfológica	63
2.3 Avaliação do crescimento	63
2.4 Detecção de Al nos ápices radiculares por coloração com hematoxilina	63
2.5 Quantificação de Al e nutrientes na matéria seca	63
2.6 Anatomia e histoquímica dos meristemas apicais caulinares	64
2.7 Trocas gasosas foliares	65
2.8 Conteúdo Relativo de Água	65
2.9 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) e radical ânion superóxido (O ₂ ⁻)	66
2.10 Ensaio das enzimas antioxidantes	66
2.11 Extração de metabólitos	68
2.12 Pigmentos	68
2.13 Prolina	68
2.14 Aminoácidos totais	68
2.15 Proteínas totais	69
2.16 Compostos fenólicos	69
2.17 Malato e Fumarato	69
2.18 Glicose, frutose e sacarose	70
2.19 Amido	70
2.20 Medição do valor 1C nuclear, do nível de ploidia de DNA e do índice de endociclos	70
2.21 Análise proteômica comparativa	71
2.22 Análise de dados	72
3 RESULTADOS	74
3.1 O alumínio é essencial para o crescimento e desenvolvimento de <i>Borreria latifolia</i>	74

3.2	O estado nutricional dos órgãos vegetativos de <i>Borreria latifolia</i> varia em relação à presença ou ausência de Al	75
3.3	O alumínio é essencial para a integridade e o funcionamento do meristema apical caulinar	76
3.4	O alumínio potencializa as trocas gasosas e o estado hídrico de <i>Borreria latifolia</i>	77
3.5	O alumínio mitiga o estresse oxidativo e promove ativação das principais enzimas antioxidantes	78
3.6	Ausência ou presença de Al modula o metabolismo primário em <i>Borreria latifolia</i>	79
3.7	Ausência de alumínio altera o nível de ploidia e induz alteração no índice de endociclos entre raiz e folhas	80
3.8	O alumínio é requerido na regulação positiva de vias metabólicas essenciais para o crescimento e desenvolvimento de <i>Borreria latifolia</i>	81
3.9	Análise Multivariada de Componentes Principais	83
4	DISCUSSÃO	85
4.1	<i>Borreria latifolia</i> não completa seu ciclo de vida na ausência de alumínio...85	
4.2	O alumínio é insubstituível no crescimento e desenvolvimento de <i>Borreria latifolia</i>	86
4.3	O alumínio é necessário para a síntese de proteínas únicas e regula positivamente o metabolismo energético de <i>Borreria latifolia</i>	89
4.3.1	Proteínas exclusivas induzidas na presença de Al e compartilhadas entre os tratamentos revelam assinatura molecular da essencialidade desse metal 90	
4.3.2	Alumínio ativa proteínas essenciais do metabolismo energético para o desenvolvimento radicular em <i>Borreria latifolia</i>	91
5	CONCLUSÃO	95
	REFERÊNCIAS	96
	TABELAS E FIGURAS	107
	MATERIAL SUPLEMENTAR	128

1 INTRODUÇÃO GERAL

O alumínio (Al) é o terceiro elemento em maior quantidade e o metal mais abundante sobre a crosta terrestre (Orians; Bruland, 1985). No solo, ele é encontrado, principalmente, na forma de aluminossilicatos e óxidos insolúveis (Chauhan et al., 2021). Contudo, a diminuição do pH da solução do solo promove a hidrólise desses compostos, resultando dentre outras formas, na disponibilização do íon Al^{3+} , composto tóxico para a maioria das plantas (Ofoe et al., 2023).

Em regiões de solos ácidos, como no Cerrado brasileiro, é possível encontrar plantas que apresentam mecanismos que lhes permitem manter a vitalidade de crescimento na presença do Al. A maioria dessas espécies são arbóreas como *Qualea grandiflora* Mart. (Cury et al., 2020; Silva et al., 2023); *Vochysia tucanorum* Mart. (Bressan et al., 2021); *Eugenia dysenterica* (Mart.) D.C (Almeida Rodrigues et al., 2019), *Styrax camporum* Pohl (Bressan et al., 2020; Bittencourt et al., 2020) e *Qualea parviflora* Mart. (Nogueira et al., 2019).

Os efeitos positivos do Al sobre o desenvolvimento das plantas podem variar entre espécies. *Qualea grandiflora*, acumuladora obrigatória de Al, depende do metal para manutenção do seu crescimento (Cury et al., 2020). A falta de Al na solução nutritiva resultou em plantas cloróticas, com deformidades nos cloroplastos e níveis reduzidos de clorofila e carotenos. *Vochysia tucanorum*, outra hiperacumuladora de Al, apresentou paralização do crescimento, raízes marrons, clorose e queda das folhas quando cultivada sem Al. No entanto, folhas saudáveis com melhor performance fotoquímica, raízes brancas e alto grau de enraizamento foram observados quando as plantas foram expostas ao Al (Bressan et al., 2021).

Para um elemento ser considerado essencial, sua função no desenvolvimento da planta deve ser insubstituível. Quando ausentes, impossibilitam que a planta complete seu ciclo de vida. Além disso, os elementos essenciais estão diretamente envolvidos no metabolismo da planta (Arnon; Stout, 1939). O Al foi considerado essencial para as raízes de *Camelia sinensis* (L.) Kuntze (Sun et al., 2020), arbusto popularmente conhecido como chá, cuja distribuição ocorre em áreas tropicais e subtropicais. As plantas pararam de crescer quando transplantadas de solos ácidos para um sistema de solução nutritiva sem o suprimento de Al, contendo todos os macro e micronutrientes considerados essenciais para a maior parte das plantas. Após o fornecimento de Al, houve emergência de raízes brancas saudáveis. A

33 essencialidade do Al para as plantas de chá ocorre através da manutenção da
34 integridade do DNA e da atividade meristemática da raiz (Sun et al., 2020).

35 *Borreria latifolia* (Aubl.) K. Schum. conhecida popularmente como erva quente,
36 erva-de-botão-de-folhas-largas, é uma erva anual da família Rubiaceae que acumula
37 mais de 10 g de Al por kg de folha (Castro, 2013; Souza-Fernandes, 2019). Existem
38 vários sinônimos para esta espécie, dentre eles, destaca-se *Spermacoce latifolia* Aubl.
39 (Wiersema et al., 2017). A distribuição natural de *B. latifolia* inclui as Américas Central
40 e do Sul (Wiersema et al., 2017). No Brasil, *B. latifolia* pode ser encontrada
41 naturalmente em substratos rupícolas e terrícolas nos domínios fitogeográficos da
42 Amazônia, Caatinga, Mata Atlântica, Pampa e principalmente do Cerrado. A raiz desta
43 planta tem sido usada há algumas décadas como remédio tradicional para tratar
44 pacientes com malária (Manandhar, 1995). *B. latifolia* é rica em compostos
45 fitoquímicos com potencial para aplicações medicinais (Liu et al., 2022; Luo et al.,
46 2017; Shen et al., 2022).

47 O papel do Al na fisiologia e no metabolismo de *B. latifolia* carece de
48 investigações. A presença de Al em sítios de intensa atividade metabólica, como
49 núcleos e cloroplastos, sem qualquer desarranjo funcional ou estrutural (Marques et
50 al., 2025) demonstra a importância do Al para o metabolismo de *B. latifolia*.
51 Adicionalmente, diferentes parâmetros fotoquímicos avaliados indicaram melhor
52 performance no aparato fotossintético das plantas cultivadas com Al. O Al atua
53 positivamente na fotossíntese dessa espécie, proporcionando síntese de
54 fotoassimilados que sustentam uma quantidade adequada de açúcares na raiz. Esses
55 resultados sugerem, de forma pioneira, a essencialidade do Al para a herbácea *B.*
56 *latifolia* (Marques et al., 2025). Todavia, novas pesquisas são necessárias a fim de
57 fortalecer essa premissa.

58 Os elementos essenciais apresentam uma faixa ótima de concentração entre a
59 deficiência e o luxo, a qual é considerada a faixa ideal para o crescimento da planta.
60 Em baixas doses, a deficiência de nutrientes limita o crescimento; à medida que a
61 dose aumenta, o crescimento melhora até atingir um platô, além do qual doses
62 excessivas tornam-se tóxicas e prejudicam a planta (Alghofaili et al., 2024; Berry;
63 Wallace, 1981). Assim, é necessário avaliar o efeito de concentrações crescentes de
64 Al sobre o crescimento de *B. latifolia*. Além disso, carece considerar que o nível de
65 acidez do solo medeia as interações com o Al (Yang et al., 2020). Dessa forma, a
66 relação entre Al e condições de pH do meio de cultivo requerem análise.

O cultivo em hidroponia permite o controle da adição/restrição dos elementos, facilitando a avaliação do efeito exclusivo do Al. Entretanto, dos três critérios de essencialidade, o envolvimento do elemento na nutrição da planta é um dos mais difíceis de demonstrar (Brown; Zhao; Dobermann, 2022). Técnicas como microscopias eletrônicas, avaliação de trocas gasosas, citometria de fluxo e análise proteômica, possibilitam de forma precisa o entendimento da localização e função do Al na fisiologia e metabolismo de *B. latifolia*. Portanto, esta tese dividida em dois capítulos concentra-se na investigação abrangente das lacunas existentes na hipótese de essencialidade do Al para *B. latifolia*. No primeiro capítulo, objetivamos avaliar o crescimento de *B. latifolia* sob concentrações de Al e os efeitos da interação do metal e do pH. Após estabelecidas as condições ideais para o crescimento de *B. latifolia* em sistema de hidroponia, no segundo capítulo, demonstramos como o Al influencia o metabolismo da planta. Para alcançar esses objetivos utilizamos ferramentas de análises morfológicas, anatômicas, ultraestruturais, micromorfológicas, bioquímicas, citogenéticas e proteômicas.

A segunda maior formação vegetal da América do Sul, o Cerrado brasileiro é rico em espécies vegetais que sobrevivem em condições edafoclimáticas restritivas (Castro et al., 2022). Pesquisas com essas plantas e seus respectivos mecanismos de sobrevivência em ambiente de baixo pH e alta disponibilidade de Al são de extrema relevância para a conservação desse bioma cuja complexidade biológica levanta questões ainda a serem exploradas pela ciência. Essa pesquisa agrega na construção de estratégias para o manejo de áreas onde há teores excessivos de Al, além de fornecer subsídios para melhoramento de plantas visando cultivo em solos ácidos.

REFERÊNCIAS

- 90 ALGHOFAILI, Fatimah *et al.* Fine-tuning the element dose in nanoparticle synthesis is
91 the critical factor determining nanoparticle's impact on plant growth. **Plant Physiology**
92 **and Biochemistry**, v. 216, p. 109110, 1 nov. 2024.
- 93 ALMEIDA RODRIGUES, Arthur *et al.* Tolerance of *Eugenia dysenterica* to Aluminum:
94 Germination and Plant Growth. **Plants**, v. 8, n. 9, p. 317, set. 2019.
- 95 ARNON, D. I.; STOUT, P. R. THE ESSENTIALITY OF CERTAIN ELEMENTS IN
96 MINUTE QUANTITY FOR PLANTS WITH SPECIAL REFERENCE TO COPPER.
97 **Plant Physiology**, v. 14, n. 2, p. 371–375, abr. 1939.
- 98 BERRY, W. L.; WALLACE, A. Toxicity: The concept and relationship to the dose
99 response curve. **Journal of Plant Nutrition**, v. 3, n. 1–4, p. 13–19, jan. 1981.
- 100 BRESSAN, Anna C. G. *et al.* Physiological, anatomical and ultrastructural effects of
101 aluminum on *Styrax camporum*, a native Cerrado woody species. **Journal of Plant**
102 **Research**, v. 133, n. 5, p. 625–637, 1 set. 2020.
- 103 BRESSAN, Anna Carolina Gressler *et al.* Could the absence of aluminum (Al) impair
104 the development of an Al-accumulating woody species from Brazilian savanna?
105 **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 33, n. 3, p. 281–292, 1 set. 2021.
- 106 BROWN, Patrick H.; ZHAO, Fang-Jie; DOBERMANN, Achim. What is a plant nutrient?
107 Changing definitions to advance science and innovation in plant nutrition. **Plant and**
108 **Soil**, v. 476, n. 1, p. 11–23, 1 jul. 2022.
- 109 CHAUHAN, Devendra Kumar *et al.* Aluminum toxicity and aluminum stress-induced
110 physiological tolerance responses in higher plants. **Critical Reviews in**
111 **Biotechnology**, v. 41, n. 5, p. 715–730, ago. 2021.
- 112 CURY, Natalia F. *et al.* Root proteome and metabolome reveal a high nutritional
113 dependency of aluminium in *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae). **Plant and Soil**,
114 v. 446, n. 1, p. 125–143, 1 jan. 2020.
- 115 CASTRO, Laísa Maria Resende de *et al.* Molecular and physiological aspects of plant
116 responses to aluminum: what do we know about Cerrado plants? **Brazilian Journal**
117 **of Botany**, v. 45, n. 2, p. 545–562, 1 jun. 2022.
- 118 DE OLIVEIRA CARVALHO BITTENCOURT, Brenda Mistral *et al.* Aluminum (Al)-
119 induced organic acid exudation in an Al-accumulating species from the Brazilian
120 savanna. **Trees**, v. 34, n. 1, p. 155–162, 1 fev. 2020.
- 121 LIU, Shao-Bo *et al.* Polycyclic Phenol Derivatives from the Leaves of *Spermacoce*
122 *latifolia* and Their Antibacterial and α -Glucosidase Inhibitory Activity. **Molecules**, v. 27,
123 n. 10, p. 3334, jan. 2022.
- 124 LUO, Ying *et al.* A new anthraquinone and a new naphthoquinone from the whole plant
125 of *Spermacoce latifolia*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 19, n. 9, p.
126 869–876, 2 set. 2017.

- 127 MANANDHAR, N. An inventory of some vegetable drug resources of Makawanpur
128 District Nepal. **Fitoterapia**, 1995.
- 129 MARQUES, Ana Paula Pires *et al.* Aluminum: an essential element for the growth and
130 development of *Borreria latifolia* (Aubl.) K. Schum (Rubiaceae). **Planta** (artigo aceito),
131 2025.
- 132 NOGUEIRA, Matheus Armelin *et al.* Aluminum-accumulating Vochysiaceae species
133 growing on a calcareous soil in Brazil. **Plant and Soil**, v. 437, n. 1, p. 313–326, 1 abr.
134 2019.
- 135 OFOE, Raphael *et al.* Aluminum in plant: Benefits, toxicity and tolerance mechanisms.
136 **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 13 jan. 2023.
- 137 ORIAN, Kristin J.; BRULAND, Kenneth W. Dissolved aluminium in the central North
138 Pacific. **Nature**, v. 316, n. 6027, p. 427–429, ago. 1985.
- 139 SHEN, Hai-yan *et al.* Two new coumarin derivatives from the whole plant of
140 *Spermacoce latifolia*. **Phytochemistry Letters**, v. 51, p. 82–85, 1 out. 2022.
- 141 SILVA, G. S. *et al.* Absence of aluminium compromises root integrity, reduces leaf
142 hydration and Rubisco performance in *Qualea grandiflora*, an Al-accumulating species.
143 **Plant Biology**, v. 25, n. 5, p. 740–749, 2023.
- 144 SUN, Lili *et al.* Aluminium is essential for root growth and development of tea plants
145 (*Camellia sinensis*). **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 62, n. 7, p. 984–997,
146 2020.
- 147 WIERSEMA, John H. *et al.* A New Weed in Florida, *Spermacoce latifolia*, and the
148 Distinction between *S. alata* and *S. latifolia* (Spermacoceae, Rubiaceae). **Castanea**,
149 v. 82, n. 2, p. 114–131, set. 2017.
- 150 YANG, Tao-Yu *et al.* Interactive effects of pH and aluminum on the secretion of organic
151 acid anions by roots and related metabolic factors in *Citrus sinensis* roots and leaves.
152 **Environmental Pollution**, v. 262, p. 114303, 1 jul. 2020.

Capítulo 1

Aluminum Modulates the Morphophysiological Plasticity of *Borreria latifolia* (Aubl.) K. Schum. (Rubiaceae) a Herbaceous Species from the Brazilian Cerrado¹

¹ *Manuscript submitted to the journal Plant and Soil*

Plant and Soil Office <em@editorialmanager.com>

09:01 (há 54 minutos) ☆ ↶ ⋮

para mim ▼

Re: "Aluminum Modulates the Morphophysiological Plasticity of *Borreria latifolia* (Aubl.) K. Schum. (Rubiaceae) a Herbaceous Species from the Brazilian Cerrado"

Submission ID: PLSO-D-25-02342

Full author list: Elen Silma Oliveira Cruz Ximenes; Thaís Vida Catini; João Santana-Tomaz; Karla Veloso Gonçalves Ribeiro; Gisele Gomes Parnaíba Lopes; Aristéa Alves Azevedo; Cleberson Ribeiro

Dear Mrs Ximenes,

We have received the submission entitled: "Aluminum Modulates the Morphophysiological Plasticity of *Borreria latifolia* (Aubl.) K. Schum. (Rubiaceae) a Herbaceous Species from the Brazilian Cerrado" for possible publication in *Plant and Soil*, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Dr. Prof. Cleberson Ribeiro who will be able to track the status of the paper through his/her login.

If you have any objections, please contact the editorial office as soon as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

With kind regards,
Springer Journals Editorial Office
Plant and Soil

Aluminum Modulates the Morphophysiological Plasticity of *Borreria latifolia* (Aubl.) K. Schum. (Rubiaceae) a Herbaceous Species from the Brazilian Cerrado

Elen Silma Oliveira Cruz Ximenes¹, Thaís Vida Catini², João Santana-Tomaz³, Karla Veloso Gonçalves Ribeiro⁴, Gisele Gomes Parnaíba Lopes¹, Aristéa Alves Azevedo³, Cleberson Ribeiro⁵

¹Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Avenida Peter Henry Rolfs, s/n, *Campus* Universitário, Viçosa, MG, 36570-900, Brasil. ORCID: 0000-0003-4054-7441, ORCID: [0000-0003-1007-7338](https://orcid.org/0000-0003-1007-7338)

²Universidade Federal de Viçosa (UFV), Departamento de Biologia Geral, Avenida Peter Henry Rolfs, s/n, *Campus* Universitário, Viçosa, MG, 36570-900, Brasil. ORCID: [0009-0007-6282-0361](https://orcid.org/0009-0007-6282-0361)

³Laboratório de Anatomia Vegetal, Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Departamento de Biologia Geral, Avenida Peter Henry Rolfs, s/n, *Campus* Universitário, Viçosa, MG, 36570-900, Brasil. ORCID: 0009-0001-4121-457X, ORCID: [0000-0002-8098-6767](https://orcid.org/0000-0002-8098-6767)

⁴Núcleo de Microscopia e Microanálise, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900 Viçosa, Minas Gerais, Brasil. ORCID: [0000-0003-1268-6751](https://orcid.org/0000-0003-1268-6751)

⁵Laboratório de Genética Molecular de Plantas (LGMP), Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Avenida Peter Henry Rolfs, s/n, *Campus* Universitário, Viçosa, MG, 36570-900, Brasil. cleberson.ribeiro@ufv.br ORCID: [0000-0001-7063-1068](https://orcid.org/0000-0001-7063-1068)

ABSTRACT

XIMENES, Elen Silma Oliveira Cruz. Universidade Federal de Viçosa, July, 2025.
Aluminum modulates the morphophysiological plasticity of *Borreria latifolia* (Aubl.) K. Schum. (Rubiaceae) a herbaceous species from the Brazilian Cerrado.
Adviser: Cleberson Ribeiro. Co-advisers: Aristéa Alves Azevedo, Vitor Batista Pinto.

Borreria latifolia (Aubl.) K. Schum. is an aluminum (Al) hyperaccumulator species naturally occurring in the Cerrado biome of South America ('Brazilian Savanna'). We investigated whether Al acts as a limiting factor for the development of this species by evaluating the effects of increasing concentrations of this metal and its interaction with different pH values on growth rates. To this end, we assessed Al accumulation sites in plant tissues using confocal microscopy and scanning electron microscopy coupled with X-ray microanalysis, as well as the morphophysiological alterations induced by the presence of Al. The beneficial effects on both root and shoot development varied according to Al concentration and medium pH. The concentration of 750 μ M Al at pH 4.5 induced the highest plant growth. Conversely, Al deprivation triggered anatomical modifications, such as necrosis of root apical cells and alterations in the cells of the root and shoot meristematic regions. In contrast, Al-treated plants exhibited morphological similarity to field-grown specimens, with the metal localized in tissues with high metabolic activity, such as nuclei within the root meristematic region and chloroplasts. The presence of Al in these cellular sites suggests that this metal is involved in vital physiological functions, contributing to the maintenance of the subapical root and apical shoot meristems. Antioxidant enzyme activities were higher in leaves than in roots, and superoxide dismutase (SOD) activity was elevated in both roots and leaves following exposure to 750 μ M Al. Thus, we conclude that the absence of Al is a limiting factor for the development of *Borreria latifolia*.

Keywords: Al hyperaccumulator, Nuclear Al, Al accumulation sites, Antioxidant metabolism, Apical meristems.

RESUMO

XIMENES, Elen Silma Oliveira Cruz. Universidade Federal de Viçosa, julho de 2025.
Aluminum modulates the morphophysiological plasticity of *Borreria latifolia* (Aubl.) K. Schum. (Rubiaceae) a herbaceous species from the Brazilian Cerrado.
Orientador: Cleberson Ribeiro. Coorientadores: Aristéa Alves Azevedo, Vitor Batista Pinto.

175 *Borreria latifolia* (Aubl.) K. Schum. é uma espécie hiperacumuladora de alumínio (Al)
176 que ocorre naturalmente no bioma Cerrado da América do Sul ("Brazilian Savanna").
177 Nós investigamos se o Al atua como um fator limitante para o desenvolvimento dessa
178 espécie, avaliando os efeitos de concentrações crescentes desse metal e sua
179 interação com diferentes valores de pH sobre as taxas de crescimento. Para tanto,
180 foram avaliados os sítios de acúmulo de Al nos tecidos vegetais por meio de
181 microscopia confocal e microscopia eletrônica de varredura acoplada à microanálise
182 de raios X, bem como as alterações morfofisiológicas induzidas pela presença de Al.
183 Os efeitos benéficos no desenvolvimento das raízes e parte aérea variaram conforme
184 a concentração de Al e o pH do meio. A concentração de 750 μM de Al a pH 4,5 induziu
185 o maior crescimento das plantas. Por outro lado, a privação de Al provocou
186 modificações anatômicas, como a necrose das células apicais da raiz e alterações
187 nas células das regiões meristemáticas radicular e caulinar. Em contraste, as plantas
188 tratadas com Al apresentaram semelhança morfológica com os espécimes cultivados
189 no campo, com o metal localizado em tecidos com alta atividade metabólica, como
190 núcleos na região meristemática da raiz e nos cloroplastos. A presença de Al nestes
191 locais celulares sugere que este metal está envolvido em funções fisiológicas vitais,
192 contribuindo para a manutenção dos meristemas subapicais da raiz e apical da parte
193 aérea. As atividades das enzimas antioxidantes foram mais elevadas nas folhas do
194 que nas raízes, e a atividade da superóxido dismutase (SOD) foi elevada tanto nas
195 raízes como nas folhas após a exposição a 750 μM de Al. Assim, concluímos que
196 a ausência de Al é um fator limitante para o desenvolvimento de *Borreria latifolia*.

197 Palavras-chave: Hiperacumuladora de Al, Al no núcleo, Sítios de acúmulo de Al,
198 Metabolismo antioxidante, Meristemas.

1 INTRODUCTION

Aluminum (Al), commonly regarded as a highly phytotoxic element, is, surprisingly, accumulated in large quantities by certain plant species native to acidic soils (Silva et al., 2023). The existence of Al-hyperaccumulating plants challenges current understanding of the biological roles of this metal, indicating the presence of complex resistance mechanisms and suggesting beneficial (Castro et al., 2024; Nogueira et al., 2024) or even essential (Sun et al., 2020) functions in some plant species.

The detrimental effects of Al toxicity have been extensively studied in major crop species, including soybean (Silva et al., 2020; Andrade et al., 2023), rice (Phukunkamkaew et al., 2021), wheat (Liang et al., 2021), cotton (Kundu & Ganesan, 2023), and maize (Yoshida et al., 2025). In contrast, positive effects of Al in plant species adapted to acidic soils remain insufficiently explored (Carvalho et al., 2024; Nogueira et al., 2024). Further research on Al-accumulating species is essential to clarify the morphophysiological and metabolic adaptations that allow plants to thrive under high Al availability, a key aspect of plant-soil interactions in acid soils.

The Cerrado biome of South America—the Brazilian savanna—comprises diverse vegetation types with high plant biodiversity, but faces increasing threats from climate change and agricultural expansion (Machado et al., 2024). Cerrado soils are strongly acidic ($\text{pH} < 5$), nutrient-poor, and characterized by high Al saturation (Almeida et al., 2021). In this environment, some species accumulate over 1 g Al per kg leaf dry mass (Nogueira et al., 2019; Rodrigues et al., 2019; Bittencourt et al., 2020). These plants exhibit adaptive traits that mitigate Al toxicity and maintain physiological function (Castro et al., 2022).

Among Cerrado plants, members of the Rubiaceae, Melastomataceae, and Vochysiaceae families are prominent Al accumulators (Bressan et al., 2020; Zaia et al., 2022). Certain species not only tolerate, but require Al to maintain growth and vitality, such as *Qualea grandiflora* Mart. (Cury et al., 2020) and *Vochysia tucanorum* Mart. (Silva et al., 2023). In these species, the absence of Al leads to root growth inhibition, leaf chlorosis, defoliation, and chloroplast deformation.

The beneficial effects of Al vary according to species and Al dose (Rodrigues et al., 2019; Bressan et al., 2020). Molecular and physiological studies have shown that Al modulates key processes in native species. In *Vochysia tucanorum*, Al enhances

rooting and photochemical performance (Bressan et al., 2021), while in *Qualea grandiflora*, it increases chlorophyll content, biomass accumulation, and leaf hydration (Cury et al., 2020; Silva et al., 2023). Notably, in *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, Al is essential for normal development; plants transferred to Al-free hydroponic solutions cease growing, but resume root development upon Al supplementation. In this species, Al has been associated with the maintenance of DNA integrity and root meristematic activity (Sun et al., 2020).

Borreria latifolia (Aubl.) K. Schum. - commonly known as “erva quente” or “poaia-do-campo” - is an annual herb of the Rubiaceae family, occurring in the Cerrado. As an Al accumulator, its responses to varying Al concentrations and pH levels may provide valuable insights into plant-soil relationships under acid soil conditions (Yang et al., 2020). Moreover, understanding the survival strategies of such species is critical for developing conservation approaches and informing crop breeding efforts for acid soils, thereby enhancing agricultural resilience.

Given the current lack of studies on *B. latifolia*, we hypothesized that Al functions as a limiting factor for its development. The aims of this study were to: (i) assess whether the growth of *B. latifolia* depends on both the presence and concentration of Al, and (ii) evaluate the interactive effects of Al and pH on plant growth. Through morphological, anatomical, micromorphological, and physiological analyses, we demonstrate that this herbaceous Cerrado species exhibits pronounced nutritional plasticity, with impaired growth in the absence of Al.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1. Plant material and growing conditions

Plants of *Borreria latifolia* (Aubl.) K.Schum. in the vegetative stage, without branches and with a height between 10 and 15 cm, were collected with soil in the Floresta Nacional de Paraopeba (FLONA) located in Paraopeba, Minas Gerais – Brazil (19°20' S and 44°20' W). The FLONA climate is humid subtropical, with a rainy summer and a dry season from April to September, the average annual precipitation is 1236 mm and the water deficit is 93 mm (Thorntwaite and Mather, 1957). The average annual temperature ranges from 20 to 23°C, with highs varying between 29 and 31°C and lows between 16 and 18°C. The average annual humidity varies between 65 and 70%, and in the hottest months averages below 60% predominate, with lows of up to 48% (Nascimento; Novais, 2020).

In this conservation area, where the Cerrado is preserved, the soils have been classified as Dark Red Latosol, Red-Yellow Latosol and Yellow Latosol (Thibau et al., 1975). In the area around the plants, samples of Yellow Latosol were taken at a depth of 10 cm to be used for acclimatizing the seedlings, and six soil samples were chemically analyzed (Table 1).

As a reference for field conditions, three plants were used to quantify the concentration of Al in the root and aerial part, and another three plants were used for anatomical analysis. The other plants were acclimatized in Cerrado soil for 60 days in a greenhouse with a transparent polyethylene cover and 50% shading on the sides. Subsequently, after washing the roots in distilled water, the plants selected according to root and shoot uniformity were transferred to a hydroponics system with continuous aeration, in a cultivation chamber at 25 ± 1 °C, light intensity of 200 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 80% relative humidity and a 12-hour photoperiod.

The plants were acclimatized in hydroponics for 15 days, in three liters-pots containing Clark's nutrient solution (Clark, 1975), 1/3 strength, pH 4.5, which was adjusted daily and the solution replaced weekly. After acclimatization, the plants were exposed to treatment with the absence or presence of Al.

2.2. Experiment 1: Dose-Response

To evaluate the effects of Al and determine the appropriate concentration for growing *B. latifolia* in hydroponics, the plants were grown in ½ strength Clark's nutrient solution containing: 0, 250, 500, 750 μM AlCl_3 for 40 days. The solutions were updated weekly and the pH adjusted daily to 4.5 ± 0.1 . Each pot containing an individual of *B. latifolia* was considered a sampling unit. The design was entirely randomized with five replicates for each treatment. The analyses carried out were: relative growth rate, detection of Al in the root apices, quantification of Al in the dry matter, anatomy and histochemistry, scanning electron microscopy (SEM) and microanalysis by SEM-coupled energy dispersive X-ray spectrometer (SEM-EDS), confocal microscopy and antioxidant enzyme activities.

2.3. Experiment 2: Al and pH interactions

To investigate the effect of the interaction between Al and pH on the growth of *B. latifolia*, the plants were grown in ½ strength Clark's nutrient solution in the absence (0 μM) or presence of Al (750 μM), in combination with pH 3.5, 4.5 or 5.5. for 40 days. The sampling unit consisted of a pot containing an individual of *B. latifolia*. The design was entirely randomized with four replicates for each treatment, in a 2 x 3 factorial scheme, with two concentrations of Al and three pH values. Growth was assessed using the relative growth rate.

2.4. Relative growth rate

The whole plants and roots were sampled, washed using distilled water, dried on filter paper, oven dried at 65°C until reaching constant weight and weighed using an analytical balance. To determine the relative growth rate (RGR), plants and roots were sampled before starting the Al application (initial time, $t_1 = 0$ days) and weighed (initial fresh weight, w_1). At the end of the experiment (final time, $t_2 = 40$ days), the w_2 of plants and roots (final fresh weight, w_2) was used to estimate the RGR, using the Hunt's equation (1978):

$$\text{RGR} = \frac{(\ln w_2 - \ln w_1)}{(t_2 - t_1)}$$

2.5. Detection of Al in root apices

One-centimeter-long root apices were immersed in a solution of 0.2% (w/v) ferric hematoxylin and 0.02% (w/v) NaIO_3 for 30 seconds (Polle et al., 1978). The samples were washed in distilled water for 15 minutes. Finally, the roots were photographed using an Olympus EP50 camera; Olympus Life Science, Tokyo, Japan coupled to an Olympus SZX7 magnifier.

2.6. Quantification of Al concentration in dry matter

Samples of roots and aerial parts (stems + leaves) were washed in distilled water, dried in an oven at 65°C until reaching a constant weight, then ground and digested using nitro-perchloric solution (4:1). The digestion was kept until the solution turned transparent. The inductively coupled plasma optical emission spectrophotometry (ICP-OES) (OPTMA 7300 DV, Perkin Elmer) was used to measure the amount of Al present in the filtered solution. (Tedesco et al., 1995).

2.7. Anatomical and histochemical analysis

The median portion of the youngest fully expanded leaf from the second node from the apex and 1 cm samples from the median region of the stem were collected from three individuals in Cerrado conditions and five individuals in experimental conditions. In addition, 1 cm-segments of the root apex were collected from five individuals in experimental conditions.

After two 30-minutes washes in sodium phosphate buffer (0.1 M) pH 7.2, the samples were fixed in 2.5% (v/v) glutaraldehyde and dehydrated with an increasing ethanol series (30 to 95% for x minutes each). The material was pre-infiltrated under vacuum with a mixture of 95% ethanol and in hydroxyethyl-methacrylate (Leica Histoiresin® Plus), 1:1, for 24 hours. Then the samples were embedded in hydroxyethyl-methacrylate following the manufacturer's recommendations.

Transverse and longitudinal-sections of 5 μm thick were made with the aid of an automatic rotary microtome (model RM2255, Leica Microsystems Inc., Deerfield, Illinois, USA). The slides were stained with: 0.05% Toluidine Blue in citrate buffer (pH 4.7) for ten minutes (O'Brien et al., 1964); Chrome Azurol'S (CAS) for one hour (Kukachka; Miller, 1980) and Lugol's reagent for 10 minutes (Johansen, 1940). The slides were mounted in Permount (Fisher Scientific Mounting Medium). Images were captured with a U-Photo system and a digital camera (Zeiss HRC model) coupled to an Olympus® AX70TRF model) optical microscope (Olympus® AX70TRF).

2.8. Scanning electron microscopy (SEM) combined with energy-dispersive X-ray spectrometry (EDS)

Root apices, median portions of the leaf vein and stems of three plants from the 0 and 750 μM Al treatments were fixed in 2.5% (v/v) glutaraldehyde. The samples were then dehydrated with an increasing ethanol series (30 to 100% for ten minutes each), immediately dried using CO_2 in a critical point dryer apparatus (CPD 030, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein), mounted and metallized with gold (FDU 010, Balzers, Liechtenstein) for SEM analysis (LEO 1430 VP, Zeiss, Cambridge, UK). For elemental analysis, the dried plant material was coated with carbon (Quorum Q150T, East Grinstead, West Sussex, UK) and analyzed using an X-ray probe (X-EDS, IXRF systems, Houston, TX, USA) coupled to the SEM. The map of distribution of aluminum and silicon (Si) were also taken. The accelerating voltage was 15 kV for both analyses.

2.9. Confocal Laser Scanning Microscopy

Root apices of 0.5 cm were fixed in 4% paraformaldehyde, were washed twice in 0.1 M acetate buffer (pH 5.2), and then incubated with the 10 μM lumogallion (in 0.1 M acetate buffer, pH 5.2) for 60 min at 50°C in the dark (Kataoka; Nakanishi, 2001). Subsequently, the samples were washed in acetate buffer and the fluorescence was observed on a laser scanning confocal microscope (LSM 900 Axio Observer 7, Carl Zeiss MicroImaging, Thornwood, USA) using a 488 nm laser. Images were taken on the Z axis ("Z stacks") at intervals of 2.46 μm for the control and 5.53; 6.88 and 17.80 μm for the 250; 500 and 750 μM Al treatments, respectively.

2.10. Antioxidant enzyme activities

To determine the activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1), catalase (CAT) (EC 1.11.1.6), total peroxidase (POX) (EC 1.11.1.7) and ascorbate peroxidase (APX) (EC 1.11.1.11), 0.3 g of root samples and 0.3 g of fresh leaves from each treatment were frozen and then macerated in liquid nitrogen. Five biological replicates were used per treatment.

The samples were homogenized in an extraction medium containing 2 mL of 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.8) with 0.1 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) dissolved in p.a. ethanol and 1% polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) (w/v). The crude extract was centrifuged at 12,000 g for 15 minutes at 4 °C and then the supernatant was collected for enzymatic analysis (Ribeiro et al., 2012) and protein dosages (Bradford, 1976).

To quantify SOD activity, the crude enzyme extract was added to a reaction medium containing 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.8, 0.1 mM EDTA, 13 mM methionine, 75 mM nitro blue tetrazolium (NBT) and 2 µM riboflavin. The reaction was carried out at 25 °C in an LED light chamber ($\cong$ 1000 lumens). After three minutes of exposure to light, the blue formazan produced by the photoreduction of NBT was measured at 560 nm (Giannopolitis; Ries, 1977). One unit of SOD was defined as the amount of enzyme capable of inhibiting half of the photoreduction of NBT.

CAT activity was determined by adding the crude enzyme extract to a reaction medium containing 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0 and 12.5 mM hydrogen peroxide (Havir; Mchale, 1987). The decrease in absorbance was recorded at 240 nm for one minute at 30 °C. The CAT activity was calculated using the molar extinction coefficient of $36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Anderson et al., 1995).

To determine POX activity, the crude enzyme extract was added to a reaction medium containing 25 mM potassium phosphate buffer, pH 6.8, 20 mM pyrogallol and 20 mM hydrogen peroxide. The increase in the absorbance was analyzed during a one-minute reaction at 420 nm at 30 °C (Kar; Mishra, 1976). Enzyme activity was calculated using the molar extinction coefficient of $2.47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Chance; Maehley, 1955).

APX activity was determined by adding the crude enzyme extract to a reaction medium containing 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, with 0.1 mM EDTA, 4.8 mM ascorbic acid and 1 mM hydrogen peroxide. The decline in the absorbance

was measured at 290 nm at 30 °C for 1 minute. The activity of the enzyme was measured using the molar extinction coefficient of $2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Nakano; Asada, 1981).

2.11. Statistical Analysis

The homogeneity of variance and normality of the data were checked using the Bartlett and Shapiro-Wilk tests, respectively, both at 5% significance. The data was then subjected to analysis of variance (F test, $p \leq 0.05$). One-way ANOVA was carried out in experiment 1 and two-way ANOVA in experiment 2. When significant, the means of the variables were compared using the Tukey test ($p \leq 0.05$). All statistical tests were carried out using R software version 4.3.1 (R Development Core Team, 2018).

3 RESULTS

3.1. Growth of *Borreria latifolia* depends on aluminum concentration

The shoot and root phenotypes of *B. latifolia*, as well as relative growth rates (RGR), were markedly modulated by Al availability (Fig. 1a, c). In the presence of Al, plants exhibited an upright growth, whereas Al-deprived plants displayed stem bending. The highest root RGRs were observed at 500 and 750 μM Al, while the absence of Al resulted in lower root growth and biomass accumulation (Fig. 1b). Whole-plant RGR (Fig. 1d) followed the same trend as root RGR, with higher growth rates observed at the highest Al concentrations compared to Al-free controls.

Hematoxylin staining confirmed Al accumulation in the roots of Al-treated plants (Fig. 2a), with greater intensity in the root apex and elongation zones. No staining was detected in control plants (Fig. 2a). Moreover, root Al concentration in plants grown in 750 μM Al was five times higher than in Al-deprived plants (Fig. 2b).

In the absence of Al, plants exhibited necrosis in leaf apices and shoot apical meristems (Fig. 3a). In contrast, plants grown with 500 or 750 μM Al displayed healthy leaf morphology and necrosis-free shoot apical meristems. At 250 μM Al, shoot meristems remained healthy, although leaf apex necrosis was still observed (Fig. 3a). As in roots, shoot tissues of plants grown in 750 μM Al accumulated five times more Al than control plants (Fig. 3b).

Higher Al concentrations promoted increased growth rates and the development of healthy root and shoot apices compared to Al-free controls (Figs. 1–3). No significant growth differences were observed between 500 and 750 μM Al. Based on the superior phenotype observed at 750 μM Al, this concentration was selected for subsequent experiments investigating the combined effects of Al and pH on plant growth.

3.2. The beneficial effect of Al on *Borreria latifolia* growth depends on pH

Optimal root and shoot growth of *B. latifolia* requires aluminium at pH 4.5. Combined effects of aluminium and pH on root architecture and shoot viability in *B. latifolia*. Root growth was consistently lowest in the absence of Al across all pH conditions (Fig. 4a), whereas Al supplementation markedly enhanced root formation,

with the greatest response observed at pH 4.5 (Fig. 4b). Without Al, shoot apices exhibited chlorosis followed by necrosis across all pH levels (Fig. 4a). In contrast, 750 μ M Al promoted healthy leaf and shoot apical meristem development irrespective of pH, with the most vigorous phenotype occurring at pH 4.5 (Fig. 4b).

In Al-free treatments, RGR was unaffected by pH variation (Fig. 4c). However, in the presence of 750 μ M Al, the highest plant growth occurred at pH 4.5. At pH 5.5 and 3.5, RGR decreased by 36% and 46%, respectively, relative to pH 4.5 (Fig. 4c).

3.3. Al deprivation induces anatomical changes, while Al accumulates in metabolically active tissues

The leaf epidermis of *B. latifolia* plants grown exclusively in the field is uniseriate, consisting of papillate cells on the adaxial surface (Fig. 5a) and non-glandular trichomes (Fig. 5b). Leaves are amphistomatic, with a dorsiventral mesophyll composed of a single layer of palisade parenchyma, paravenal parenchyma, and crystal idioblasts containing raphides (Fig. 5a, inset), along with a few layers of spongy parenchyma. Vascular bundles are collateral, and annular collenchyma is present in the midrib (Fig. 5b). Al was detected in the cell walls and nuclei of epidermal, collenchyma, and phloem cells, as well as in the nuclei and chloroplasts of palisade and spongy parenchyma cells (Fig. 5c, d).

The stem epidermis is also uniseriate, with papillate cells, trichomes, and stomata (Fig. 5e). Crystal idioblasts with raphides, annular collenchyma in the wing regions, a narrow cortex filled with parenchyma, and early secondary growth marked by secondary xylem were observed (Fig. 5e). Aluminium was detected in the nuclei of epidermal and wing collenchyma cells, in the phloem, in the xylem rays, and in the nuclei and chloroplasts of cortical parenchyma cells (Fig. 5f).

In contrast, the leaf epidermis of *B. latifolia* plants grown hydroponically in the absence of Al exhibited necrosis of the root apex, changes in cell shape and size, and abnormal divisions in the meristematic region (Fig. 6a–d). In these roots, Al was detected only in the nuclei (Fig. 6a, inset). Leaves lacked differentiated collenchyma in the midrib and showed altered differentiation of vessel elements (Fig. 6b). No collenchyma formed in the stem wings. In the cortical region, cell lysis and rupture of crystal idioblasts were observed (Fig. 6c). Vessel elements developed abnormally, with

sinuous cell walls (Fig. 6c). Similar to roots, Al in the aerial parts was detected only in cell nuclei (Fig. 6d).

In the presence of Al, anatomical structures resembled those of field-grown *B. latifolia* plants (Fig. 6e–m). Roots exhibited healthy apices with a well-defined meristematic region (Fig. 6e) and developing lateral roots, with no morphological changes except at 250 μ M Al, where roots resembled those of Al-deprived plants (data not shown). At 500 and 750 μ M Al, Al was restricted to the nuclei and cytoplasm of cells in the root cap and meristematic region (Fig. 6f, inset).

Leaves of Al-treated plants showed no structural damage, except at 250 μ M Al, where collenchyma failed to form and vascular bundles in the midrib were altered (Fig. 6g). The leaf morphology at higher Al concentrations was similar to that of field-grown plants. Al was localized in the cell walls of primary tissues, as well as in nuclei and chloroplasts (Fig. 6h). Collenchyma in the midrib and collateral vascular bundles formed normally, with no alterations in vessel differentiation (Fig. 6i). In all Al treatments, stems showed collenchyma in the wing regions, and no damage was observed in cortical, vascular, or pith tissues (Fig. 6j, k). At higher Al concentrations, starch accumulation was observed in the pith (Fig. 6j, inset), and Al was detected in all pectocellulosic cell wall tissues, nuclei, and chloroplasts (Fig. 6l, m).

Al distribution maps obtained by SEM-EDS in roots (Fig. 7d–f), leaves (Fig. 7j–l), and stems (Fig. 7p–r) of plants grown at extreme Al concentrations (0 and 750 μ M) corroborated light microscopy results, confirming Al accumulation in the nuclei of root meristematic zone cells (Fig. 7f). In the leaf lamina, Al was detected predominantly on the abaxial surface in both treatments (Fig. 7j, k), including in trichomes (Fig. 7l). In stems, Al was detected throughout the radial structure, with some overlap with silicon (Si) in pith cell walls (Fig. 7p–r).

In roots treated with Al, the Al-lumogallion complex exhibited strong fluorescence intensity (Fig. 8b–d) compared to the Al-deprived treatment (Fig. 8a). Similar results were observed at different tissue depths using Z-stacks (Fig. S1). In addition to the weak fluorescence, root cells grown in the absence of Al exhibited irregular and sinuous shapes (Fig. 8a). At higher Al concentrations, fluorescence was observed in cell walls and nuclei (Fig. 8c, d), confirming light microscopy results. Furthermore, cells in the division zone were larger in plants treated with high Al concentrations than in Al-deprived plants (Fig. 8a, d, and S1).

3.4. Al modulates the enzymatic antioxidant system in *Borreria latifolia*

The activities of the antioxidant enzymes SOD, CAT, POX, and APX were generally higher in leaves than in roots across all treatments (Fig. 9), except for SOD, whose activity in leaves under 250 μ M Al was comparable to that observed in roots under 750 μ M Al. In the absence of Al, SOD activity was lower in both roots and leaves compared to the 750 μ M Al treatment (Fig. 9a, b).

In contrast, CAT activity in leaves decreased progressively with increasing Al concentrations (Fig. 9d), while no significant differences were observed in roots (Fig. 9c). In the presence of Al, POX activity in roots was similar across all treatments; however, it was significantly higher than in the Al-deprivation condition (Fig. 9e). In leaves, POX activity remained unchanged across treatments (Fig. 9f). Similarly, APX activity did not differ significantly among Al concentrations in either roots or leaves (Fig. 9g, h).

4 DISCUSSION

This study demonstrates that aluminium (Al) deprivation impairs the development of *Borreria latifolia*. Plant growth is not only dependent on the presence and concentration of Al but also modulated by pH. Al deprivation induced adverse morpho-anatomical changes in both roots and leaves. The accumulation of Al in metabolically active sites—such as nuclei and chloroplasts—without structural damage suggests that Al is involved in vital physiological functions, including lateral root formation and maintenance of root and shoot apical meristems. Moreover, the Al-mediated modulation of antioxidant enzymes indicates a key role for Al in redox metabolism in *B. latifolia*.

The positive effects of Al on root and shoot development were concentration- and pH-dependent. Given the impaired root and shoot development under Al deprivation—and according to recently proposed criteria for defining plant nutrient (Brown et al., 2022; Santa-María et al., 2023)—Al can be considered a limiting nutrient for *B. latifolia*. All other essential nutrients were supplied at optimal levels in all treatments. Morphological and anatomical disorganization was observed only under Al-deprivation, suggesting a specific nutritional requirement of *B. latifolia* for Al. Accordingly, Al deprivation affected cellular organization at the root apex and triggered alterations in root and shoot architecture. Root architectural modifications are closely linked to cell elongation, cell division, and water and nutrient acquisition (Kundu & Ganesan, 2023; Wang et al., 2024). In our study, the absence of Al suppressed lateral root formation while enhancing primary root growth, as reported in other Al-accumulating species such as *Eugenia dysenterica* (Rodrigues et al., 2019), *Qualea grandiflora* (Cury et al., 2020), and *Vochysia tucanorum* (Bressan et al., 2021), all of which also showed reduced lateral root density under Al deprivation.

It is likely that plants maintained physiological activity in the absence of external Al due to residual Al accumulated during early development in Cerrado soil. The detection of Al in the nuclei of root meristematic cells suggests possible remobilization from older root tissues. This points to a critical function of Al in maintaining DNA integrity in meristematic cells. In *Camellia sinensis*, nuclear Al was associated with DNA stabilization and mitotic activity, promoting the emergence and elongation of roots (Sun et al., 2020). Metabolomic and proteomic analyses in *Qualea grandiflora* have also suggested Al-dependent cell wall synthesis pathways in roots (Cury et al., 2020).

Taken together with our findings, the strong correlation between relative growth rate (RGR), root branching, and Al concentration supports a pivotal role for Al—particularly its nuclear localization—in promoting cell proliferation.

Comparative analysis of shoot phenotypes between Al-deprived and Al-treated plants revealed that Al is also crucial for the maintenance of shoot apical meristems. Al accumulation in chloroplasts occurred without causing any morphoanatomical or physiological disorder in leaves; on the contrary, shoot apices remained viable in the presence of Al, whereas necrosis was observed in Al-deprived plants. Similar chloroplast-localized Al accumulation without toxicity has been reported in other Cerrado species such as *Eugenia dysenterica* (Rodrigues et al., 2019), *Hancornia speciosa* Gomes (Rodrigues et al., 2017), *Miconia rubiginosa* (Bonpl.) DC. (Bressan et al., 2016), *Qualea grandiflora*, *Callisthene major* Mart. & Zucc. (Andrade et al., 2011), and *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. (Malta et al., 2016). However, the physiological mechanisms underlying this tolerance to Al accumulation in the chloroplast remain unclear.

Soil pH is a key determinant of Al chemical speciation and bioavailability (Yang et al., 2020). While cultivated plants typically benefit from increased pH due to reduced Al³⁺ bioavailability (Wu et al., 2022), *B. latifolia* growth was not enhanced by increasing pH from 4.5 to 5.5. The beneficial effect of Al in mitigating H⁺ toxicity in acid-tolerant species (Muhammad et al., 2019) does not apply to *B. latifolia*, whose development at pH 3.5 was inferior to that at pH 4.5. Extremely low pH (< 4.0) promotes Al precipitation or complexation with organic compounds, reducing its bioavailability (Bojórquez-Quintal et al., 2017). Our findings thus highlight a direct, positive role of Al in *B. latifolia* metabolism and establish pH 4.5 as optimal for its hydroponic cultivation.

As a common Cerrado species, *B. latifolia* is expected to possess stress-adaptive metabolic traits. Al-induced growth stimulation may be linked to the activation of antioxidant defense systems. SOD (superoxide dismutase) acts as a frontline enzyme converting superoxide radicals (O₂^{•-}) into hydrogen peroxide (H₂O₂) (Yang et al., 2021), followed by detoxification by H₂O₂-scavenging enzymes such as CAT (catalase) and POX (peroxidases) (Ribeiro et al., 2022). In our study, Al modulated the activities of these enzymes, notably CAT in leaves.

CAT plays a prominent role in detoxifying high levels of H₂O₂ due to its high Michaelis constant (K_m) and independence from reductants (Mishra et al., 2023), unlike POX and APX (ascorbate peroxidase), which mediate fine-tuned H₂O₂ regulation via

low K_m values (Hatami & Ghorbanpour, 2024). APX activity remained unchanged across treatments, suggesting that H_2O_2 levels remained within physiological limits. However, POX activity increased in roots with Al addition—organs that also exhibited higher growth rates. Similar results were reported for *Eugenia dysenterica* roots grown with 200 μM Al (Rodrigues et al., 2019), indicating a beneficial role of Al in modulating antioxidant enzyme systems.

The higher activity of SOD, CAT, POX, and APX in leaves compared to roots may reflect lower Al allocation to the shoot, necessitating stronger ROS detoxification to prevent oxidative stress. These responses further underscore the vulnerability of *B. latifolia* to oxidative imbalance under Al deprivation or low Al supply.

5 CONCLUSION

This study presents the first dose–response analysis of aluminum (Al) and its interaction with pH on the growth of *Borreria latifolia*. The findings indicate that the optimal condition for hydroponic cultivation of this species is 750 μM Al at pH 4.5, a combination that enhances the bioavailability of Al^{3+} ions. Aluminum deprivation markedly impaired both root and shoot apical meristems, resulting in stunted growth and pronounced morphological and anatomical abnormalities. Thus, the absence of Al constitutes a limiting factor for the development of *Borreria latifolia*.

Conversely, the detection of Al in metabolically active cellular compartments, without associated structural damage, suggests a physiological requirement of Al for normal development and redox regulation in *Borreria latifolia*. These insights may inform future research on the potential application of this herbaceous species in revegetation programs, ecological restoration, and phytoremediation of areas contaminated by aluminum industry by-products or degraded by bauxite mining. Accordingly, the present study contributes to the development of strategies aimed at conserving native flora in Al-rich environments, while also providing a foundation for the genetic improvement of crop species for cultivation in acid soils.

REFERENCES

- Almeida LLS, Frazão LA, Lessa TAM, Fernandes LA, Veloso ALC, Lana AMQ, Souza IA, Pegoraro RF, Ferreira EA (2021) Soil carbon and nitrogen stocks and the quality of soil organic matter under silvopastoral systems in the Brazilian Cerrado. **Soil Till Res** 205:104785 <https://doi.org/10.1016/j.still.2020.104785>
- Anderson JS, Lall SP, Anderson DM, Mcaniven MA (1995) Availability of aminoacids from various fish meals fed to Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquac** 138:291-301 [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01131-5](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01131-5)
- Andrade LRM., Barros LM, Echevarria GF, Amaral LIV, Cotta MG, Rossatto DR, Haridasan M, Franco AC (2011) Al-hyperaccumulator Vochysiaceae from the Brazilian Cerrado store aluminum in their chloroplasts without apparent damage. **Environ Exp Bot** 70:37-42 <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.05.013>
- Andrade R, Souza GA, Brito DS, Gonçalves BG, Valadares SV, Dal-Bianco M, Ribeiro C (2023) Malate and cell wall aluminum immobilization act as resistance mechanisms in soybean roots. **Bragantia** 82 <https://doi.org/10.1590/1678-4499.20230120>
- Bittencourt BMO, Silva CMS, Filho SZ, Habermann G (2020) Aluminum (Al)-induced organic acid exudation in an Al-accumulating species from the Brazilian savanna. **Trees** 34:155-162 <https://doi.org/10.1007/s00468-019-01907-5>
- Bojórquez-Quintal E, Escalante-Magaña C, Echevarria-Machado I, Martínez-Estévez M (2017) Aluminum, a friend or foe of higher plants in acid soils. **Front Plant Sci** 8:1767 <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01767>
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** 72:248-254
- Bressan ACG, Bittencourt BMOC, Silva GS, Habermann G (2021) Could the absence of aluminum (Al) impair the development of an Al-accumulating woody species from Brazilian savanna? **Theor Exp Plant Physiol** 33: 281-292 <https://doi.org/10.1007/s40626-021-00216-y>
- Bressan ACG, Coan AI, Habermann G (2016) X-ray spectra in SEM and staining with chrome Azurol S show Al deposits in leaf tissues of Al-accumulating and non-accumulating plants from the Cerrado. **Plant Soil** 404:293-306 <https://doi.org/10.1007/s11104-016-2841-1>
- Bressan ACG, Silva GS, Banhos OFAA, Tanaka FAO, Habermann G (2020) Physiological, anatomical and ultrastructural effects of aluminum on *Styrax camporum*, a native Cerrado woody species. **J Plant Res** 133 625-637 <https://doi.org/10.1007/s10265-020-01210-2>
- Brown PH, Zhao F, Dobermann A (2022) What is a plant nutrient? Changing definitions to advance science and innovation in plant nutrition. **Plant Soil** 476:11–23. <https://doi.org/10.1007/s11104-021-05171-w>

- 667 Carvalho BMO, Brunner I, Habermann G (2024) Does aluminum induce high proline
668 concentration in *Pinus sylvestris*, an Al-tolerant species? **Theor Exp Plant Physiol**
669 36:21-31 <https://doi.org/10.1007/s40626-023-00302-3>
- 670 Castro LMR, Vinson CC, Gordo SM, Williams TCR, Cury NFC, Souza MC, Pereira
671 LAR (2022) Molecular and physiological aspects of plant responses to aluminum: what
672 do we know about Cerrado plants? **Braz J Bot** 45:545-562
673 <https://doi.org/10.1007/s40415-021-00781-1>
- 674 Castro, LMR. Vinson CC, Almeida AL, Cury NF, André MSF, Williams TCR, Pereira
675 LAR (2024) *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae) seed reserves and aluminum:
676 Usage and mobilization during germination and seedling development. **Plant Species**
677 **Biol** 39:205-219 <https://doi.org/10.1111/1442-1984.12469>
- 678 Chance B, Maehly AC (1955) Assay of Catalase and Peroxidase. **Methods in**
679 **Enzymol** 2: 764-775 <https://doi.org/10.1002/9780470110171.ch14>
- 680 Clark RB (1975) Characterization of phosphatase of intact maize roots. **J Agric Food**
681 **Chem** 23:458-460
- 682 Cury NF, Silva RCC, Andre MSF, Fontes W, Ricart CAO, Castro MS, Silveira CES,
683 Williams TCR, Sousa MV, Pereira LAR (2020) Root proteome and metabolome reveal
684 a high nutritional dependency of aluminum in *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae).
685 **Plant Soil** 446:125-143 <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04323-3>
- 686 Fallah S, Yusefi-Tanha E, Peralta-Videa JR (2024) Interaction of nanoparticles and
687 reactive oxygen species and their impact on macromolecules and plant production.
688 **Plant Nano Biol** 10:100105 <https://doi.org/10.1016/j.plana.2024.100105>
- 689 Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superóxido dismutases: I. ocorrência em plantas
690 superiores. **Plant Physiol** 59:309–314 <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>
- 691 Hatami M, Ghorbanpour M (2024) Metal and metal oxide nanoparticles-induced
692 reactive oxygen species: Phytotoxicity and detoxification mechanisms in plant cell.
693 **Plant Physiol Biochem** 213:108847 <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2024.108847>
- 694 Havir EA, Mchale NA (1987) Biochemical and developmental characterization of
695 multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiol** 84:450–455
696 <https://doi.org/10.1104/pp.84.2.450>
- 697 Hunt R (1978) **Plant growth analysis**. In: Studies in Biology Series No. 96. Edward
698 Arnold Ltd., London, U.K. 57p.
- 699 Johansen DA (1940) **Plant Microtechnique**. McGraw-Hill, New York 523
- 700 Kar M, Mishra D (1976) Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during
701 rice leaf senescence. **Plant Physiol** 57:315–319 <https://doi.org/10.1104/pp.57.2.315>
- 702 Kataoka T, Nakanishi TM (2001) Aluminum distribution in soybean root tip for a short
703 time Al treatment. **J Plant Physiol** 158:731-736 <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00163>
704

- 705 Kukachka BF, Miller RB (1980) A chemical spot-test for aluminum and its value in wood
706 identification. **IAWA Bull** 1: 104-09 <https://doi.org/10.1163/22941932-90000699>
- 707 Kundu A, Ganesan M (2023) Low pH stress activates several genes for lateral root
708 formation and detoxification of aluminum ions in Cotton plants. **Plant Stress** 9:100188
709 <https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100188>
- 710 Li Y, Zhang W, Huang Y, Cui G, Zhang X (2024) Exogenous silicon improved the cell
711 wall stability by activating non-structural carbohydrates and structural carbohydrates
712 metabolism in salt and drought stressed *Glycyrrhiza uralensis* stem. In **J Biol**
713 **Macromol** 283:137817 <https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2024.137817>
- 714 Liang X, Ou Y, Zhao H, Zhou W, Sun C, Lin X (2021) Lipid peroxide-derived short-
715 chain aldehydes are involved in aluminum toxicity of wheat (*Triticum aestivum*) Roots.
716 **J Agric Food Chem** 69:10496-10505 <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c03975>
- 717 Lu C, Tian Z, Hao Y, Xu M, Lin Y, Wei J, Zhao Y (2023) Overexpression of soybean
718 microRNA156b enhanced tolerance to phosphorus deficiency and seed yield in
719 *Arabidopsis*. **Sci Rep** 13 <https://doi.org/10.1038/s41598-023-27847-2>
- 720 Machado RB, Aguiar LMS, Bustamante MMC (2024) Why is it so easy to undergo
721 devegetation in the Brazilian Cerrado? **Perspect Ecol Conserv** 22:209-2012
722 <https://doi.org/10.1016/j.pecon.2024.08.003>
- 723 Malta PG, Arcanjo-Silva S, Ribeiro C, Campos NV, Azevedo AA (2016) *Rudgea*
724 *viburnoides* (Rubiaceae) overcomes the low soil fertility of the Brazilian Cerrado and
725 hyperaccumulates aluminum in cell walls and chloroplasts. **Plant Soil** 408:369–384
726 <https://doi.org/10.1007/s11104-016-2926-x>
- 727 McManus JFA (1948) **Histological and histochemical uses of periodic acid**. *Stain*
728 *Technol* 23:99-108.
- 729 Mishra N, Jiang C, Cjen L, Paul A, Chatterjee A, Shen G (2023) Achieving abiotic stress
730 tolerance in plants through antioxidative defense mechanisms. **Front Plant Sci** 14
731 <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1110622>
- 732 Muhammad N, Zvobgo G, Zhang G-P (2019) A review: The beneficial effects and
733 possible mechanisms of aluminum on plant growth in acidic soil. **J Integr Agric**
734 18:1518-1528 [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(18\)61991-4](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(18)61991-4)
- 735 Nagaraju S, Ramesh M, Mujjassim NE, Reddy S, Vijayaraghavareddy P, Sreeeman S
736 (2024) Rice night-time thirst: Genotype nutrient needs reflected in nocturnal
737 transpiration. **Rhizosphere** 32:100956 <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2024.100956>
- 738 Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific
739 peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiol** 22:867–880
740 <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>
- 741 Nascimento DTF, Novai, GT (2020) Clima do Cerrado: dinâmica atmosférica e
742 características, variabilidades e tipologias climáticas. **Élisée** 9:e922021

- 743 Nogueira MA, Bressan ACG, Pinheiro MHO, Habermann G (2019) Aluminum-
744 accumulating Vochysiaceae species growing on calcareous soil in Brazil. **Plant Soil**
745 437:313-326 <https://doi.org/10.1007/s11104-019-03978-2>
- 746 Nogueira MA, Gavassi MA, Cardoso JC, Habermann G (2024) Aluminum influence
747 on in vitro germination of isolated embryos of two Vochysiaceae Al-accumulating
748 species. **Plant Cell Tiss Organ Cult** 59 <https://doi.org/10.1007/s11240-024-02891-6>
- 749 O'brien, TP, Feder N, Mccully ME (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by
750 toluidine blue O. **Protoplasma** 59:368-373 <https://doi.org/10.1007/BF01248568>
- 751 Ofoe R, Thomas RH, Asiedu SK, Wang-Pruski G, Fofana B, Abbey L (2023) Aluminum
752 in plant: Benefits, toxicity and tolerance mechanisms. **Front Plant Sci** 13, 2023
753 <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1085998>
- 754 Phukunkamkaew S, Tisarum R, Pipatsitee P, Samphumphuang T, Maksup S, Cha-Um
755 S (2021) Morpho-physiological responses of indica rice (*Oryza sativa* sub. *indica*) to
756 aluminum toxicity at seedling stage. **Environ Sci Pollut Res** 28:29321-29331
757 <https://doi.org/10.1007/s11356-021-12804-1>
- 758 Polle E, Konkazak CF, Kittrick JA (1978) Visual detection of aluminum tolerance leaves
759 in wheat by hematoxylin staining of seedling roots. **Crop Sci** 18:823-827
760 <https://doi.org/10.2135/cropsci1978.0011183X001800050035x>
- 761 Ribeiro C, Cambraia J, Peixoto PHP, Fonseca Júnior EMD (2012) Antioxidant system
762 response induced by aluminum in two rice cultivars. **Braz J Plant Physiol** 24:107-116
763 <https://doi.org/10.1590/S1677-04202012000200004>
- 764 Ribeiro C, Lapaz AM, Freitas-Silva L, Ribeiro KVG, Yoshida CHP, Dal-Bianco M,
765 Cambraia J (2022) Aluminum promotes changes in rice root structure and ascorbate
766 and glutathione metabolism. **Physiol Mol Biol Plants** 28:2085-2098
767 <https://doi.org/10.1007/s12298-022-01262-9>
- 768 Rodrigues AA, Vasconcelos Filho SC, Müller C, Rodrigues DA, Sales JF, Nascimento
769 KJT, Teles EMG, Rehn LS (2017) Aluminum influence on *Hancornia speciosa* seedling
770 emergence, nutrient accumulation, growth and root anatomy. **Flora** 236-237: 9-14
771 <https://doi.org/10.1016/j.flora.2017.09.008>
- 772 Rodrigues AA, Vasconcelos-Filho SC, Müller C, Rodrigues DA, Sales JF, Zuchi J,
773 Costa AC, Rodrigues CL, Silva AA, Barbosa DP (2019) Tolerance of *Eugenia*
774 *dysenterica* to aluminum: Germination and plant growth. **Plants** 8:317-331
775 <https://doi.org/10.3390/plants8090317>
- 776 Santa-María GE, Lavres J, Rubio G (2023) The concept of mineral plant nutrient in the
777 light of evolution. **Plant Sci** 334: 111747 <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2023.111747>
- 778 Shi J, Wang Y, Fan X, Li R, Yu C, Peng Z, Ga, Y, Liu Z, Duan L (2024) A novel plant
779 growth regulator B2 mediates drought resistance by regulating reactive oxygen
780 species, phytohormone signaling, phenylpropanoid biosynthesis, and starch
781 metabolism pathways in *Carex breviculmis*. **Plant Physiol Biochem** 213:108860
782 <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2024.108860>

- 783 Silva CO, Brito DS, da Silva AA, Rosa VR, Santos MFS, Souza GA, Azevedo AA, Dal-
 784 Bianco M, Oliveira JA, Ribeiro C (2020) Differential accumulation of aluminum in root
 785 tips of soybean seedlings. **Braz. J. Bot** 43:99–107 [https://doi.org/10.1007/s40415-](https://doi.org/10.1007/s40415-020-00593-9)
 786 [020-00593-9](https://doi.org/10.1007/s40415-020-00593-9)
- 787 Silva GS, Rodrigues JS, Carvalho BMO, Gavassi MA, Bressan ACG, Habermann G
 788 (2023) Absence of aluminium compromises root integrity, reduces leaf hydration and
 789 Rubisco performance in *Qualea grandiflora*, an Al-accumulating species. **Plant Biol**
 790 25:740-749 <https://doi.org/10.1111/plb.13535>
- 791 Sun L, Zhang M, Liu X, Mao Q, Shi C, Kochian LV, Liao H (2020) Aluminum is essential
 792 for root growth and development of tea plants (*Camellia sinensis*). **J Integr Plant Biol**
 793 6:984-997 <https://doi.org/10.1111/jipb.12942>
- 794 Szurman-Zubrzycka M, Chwialkoswka K, Niemira M, Kwasniewski M, Nawrot M,
 795 Gajacka M, Larsen PB, Szarejko I (2021) Aluminum or Low pH – Which Is the Bigger
 796 Enemy of Barley? Transcriptome Analysis of Barley Root Meristem Under Al and Low
 797 pH Stress. **Front Genet** 12:675260 <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.675260>
- 798 Tedesco MJ, Gianello C, Bissani CA, Bohen H, Volkweiss SJ (1995) **Análise de solos,**
 799 **plantas e outros materiais.** UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 800 Thibau CE, Heiseke DH, Moura PV, Lamas JM, Cesar RL (1975) Inventário preliminar
 801 expedido na Estação Florestal de Experimentação de Paraopeba em Minas Gerais.
 802 **Bras Florest** 6: 34-71
- 803 Thornwaite CW, Mather JR (1957) **Instructions and tables for computing potential**
 804 **evapotranspiration and water balance.** New Jersey: Drexel Institute of Technology,
 805 311p.
- 806 Wang H, Wang H, Liu H, Wan T, Li Y, Zhang K, Shabala, S, Li X, Chen Y, Yu M (2024)
 807 Aluminium stress-induced modulation of root gravitropism in pea (*Pisum sativum*) via
 808 auxin signalling. **Plant Physiol Biochem** 206:108315
 809 <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.108315>
- 810 Wu B, Zhang J, Huang W, Yang L, Huang Z, Gu, J, Wu J, Chen L (2022) Molecular
 811 mechanisms for pH-mediated amelioration of aluminum-toxicity revealed by conjoint
 812 analysis of transcriptome and metabolome in *Citrus sinensis* roots. **Chemosphere**
 813 299:134335 <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134335>
- 814 Xiao D, Li X, Zhou Y, Wei L, Keovongkod C, He H, Zhan J, Wang A, He L (2021)
 815 Transcriptome analysis reveals significant difference in gene expression and pathways
 816 between two peanut cultivars under Al stress. **Gene** 781:145535
 817 <https://doi.org/10.1016/j.gene.2021.145535>
- 818 Yang L, Wang Y, Chen S, Fu Q, Ren Y, Lin X, Ye X, Chen L (2024) Effects of aluminum
 819 (Al) stress on the isoprenoid metabolism of two *Citrus species* differing in Al-tolerance.
 820 **Ecotoxicol Environ Saf** v. 280, 116545 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.116545>
- 821 Yang TY, Qi YP, Huang HY, Wu FL, Huang WT, Deng CL, Yang LT, Chen LS (2020)
 822 Interactive effects of pH and aluminum on the secretion of organic acid anions by roots

- 823 and related metabolic factors in *Citrus sinensis* roots and leaves. **Environ Pollut**
824 262:114303. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114303>
- 825 Yang X, Lu M, Wang Y, Liu Z, Chen S (2021) Response Mechanism of Plants to
826 Drought Stress. **Horticulturae** 7 <https://doi.org/10.3390/horticulturae7030050>
- 827 Yao H, Zhang S, Zhou W, Liu Y, Liu Y, Wu Y (2020) The effects of exogenous malic
828 acid in relieving aluminum toxicity in *Pinus massoniana*. **Int J Phytoremediation**
829 22:669-678 <http://dx.doi.org/10.1080/15226514.2019.1707162>
- 830 Yoshida, CHP, de Marcos Lapaz, A, de Rodrigues, FA, Araújo, WL, Martins, AO,
831 Pacheco, AC, Ribeiro, (2025) Silicon supplementation enhances the tolerance of
832 popcorn maize plants to aluminum toxicity. **Theor Exp Plant Physiol** 37:1-18.
833 <https://doi.org/10.1007/s40626-024-00349-w>
- 834 Zaia M, Timpone LT, Habermann G (2022) Do aluminum (Al)-accumulating species
835 from the Brazilian savanna accumulate Al in the roots? **Trees** 36:1677-168.
836 <https://doi.org/10.1007/s00468-022-02301-4>
- 837 Zhang X, Liu L, Luo S, Ye X, Wen W (2023) Research advances in aluminum tolerance
838 and accumulation in tea plant (*Camellia sinensis*). **Beverage Plant Res** 3
839 <https://doi.org/10.48130/BPR-2023-0018>
- 840 Zhao N, You G, Wang Q, Wang R. Zhang J, Liu C, He N (2019) Conservative allocation
841 strategy of multiple nutrients among major plant organs: From species to community.
842 **J Ecol** 108:267-278 <https://doi.org/10.1111/1365-2745.13256>
- 843 Zhao A, Xu C, Luan Y, Shi W, Tang Y, Tao J (2021) Silicon enhances stem strength by
844 promoting lignin accumulation in herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) **Int J Biol**
845 **Macromol** 190:769-779 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.016>

TABLES AND FIGURES

Table 1 - Chemical attributes of the Cerrado soil used to acclimatize the *Borreria latifolia* seedlings in pots.

Al (μM)	SB ($\text{cmol}_\text{c}/\text{dm}^3$)	ECEC ($\text{cmol}_\text{c}/\text{dm}^3$)	CEC ($\text{cmol}_\text{c}/\text{dm}^3$)	BS (%)	AISI (%)	pH in H_2O
646 ± 84	1.42 ± 0.78	3.58 ± 0.58	8.71 ± 1.57	14.6 ± 6.06	63.93 ± 15.87	4.96 ± 0.05

Data are means $\pm$ standard deviation of 6 soil samples. Al: Aluminum concentration. SB: Sum of Exchangeable Bases. ECEC: Effective Cation Exchange Capacity. CEC: Cation Exchange Capacity at pH 7.0. BS: Percent base saturation. AISI: Aluminum Saturation Index.

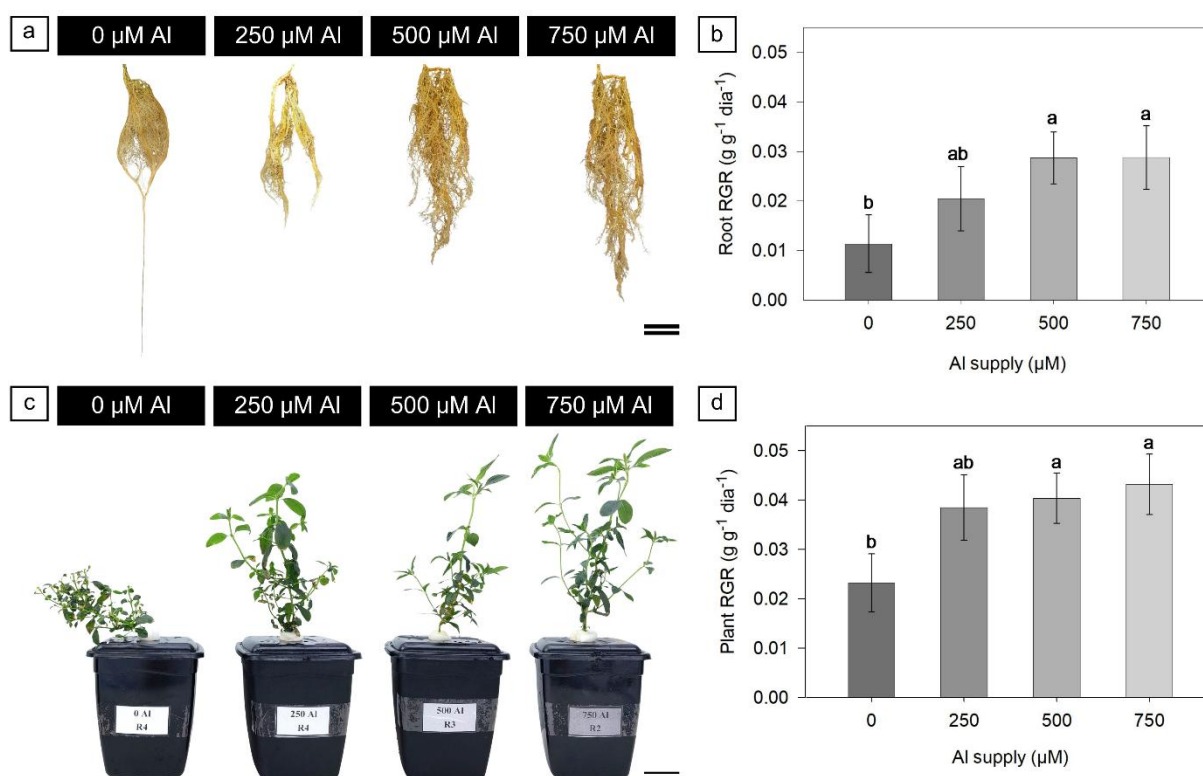


Figure 1 - Effect of increasing concentrations of Al on the growth of *Borreria latifolia*. Plants exposed to nutrient solution containing 0, 250, 500 or 750 μM Al, at pH 4.5 for 40 days. **a** Root system phenotype. **b** Root relative growth rate (RGR). **c** Aerial part phenotype. **d** Plant RGR. Data are averages with standard deviation represented by vertical bars ($n = 5$ plants). Different letters indicate significant differences by Tukey's test ($p < 0.05$). Bars: 6 cm (**a**), 4 cm (**c**)

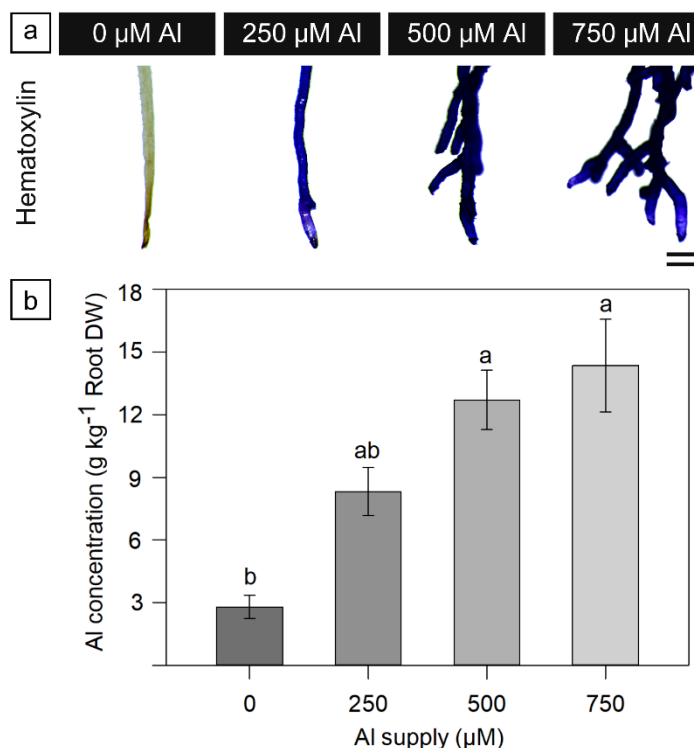


Figure 2 - Hematoxylin staining and Al concentration in the roots of *Borreria latifolia*. Individuals exposed to nutrient solution containing 0, 250, 500 or 750 µM Al, at pH 4.5 for 40 days. **a** Marking of Al by the hematoxylin dye. The blue color indicates a positive reaction. **b** Al concentration in the roots. Data are averages with standard deviation represented by vertical bars (n= 5 plants). Different letters indicate significant differences by Tukey's test (p<0.05). Bar = 2 mm

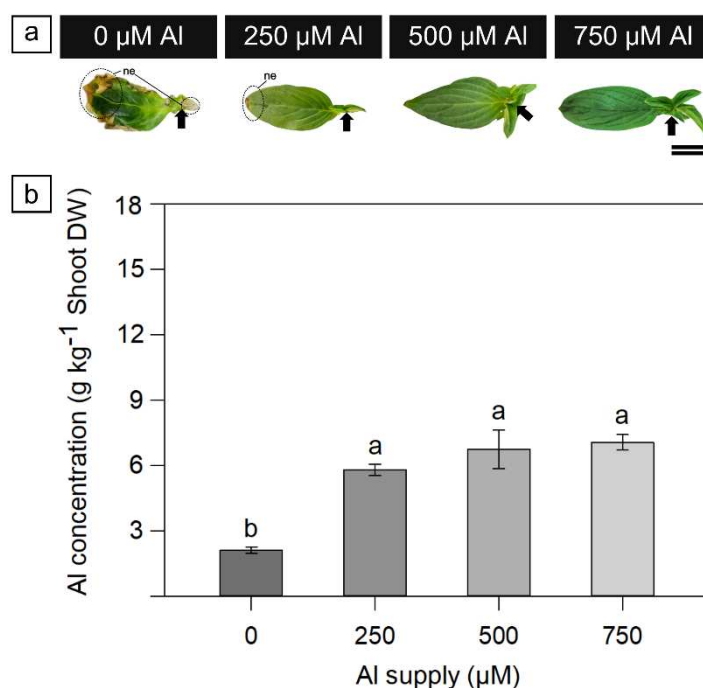
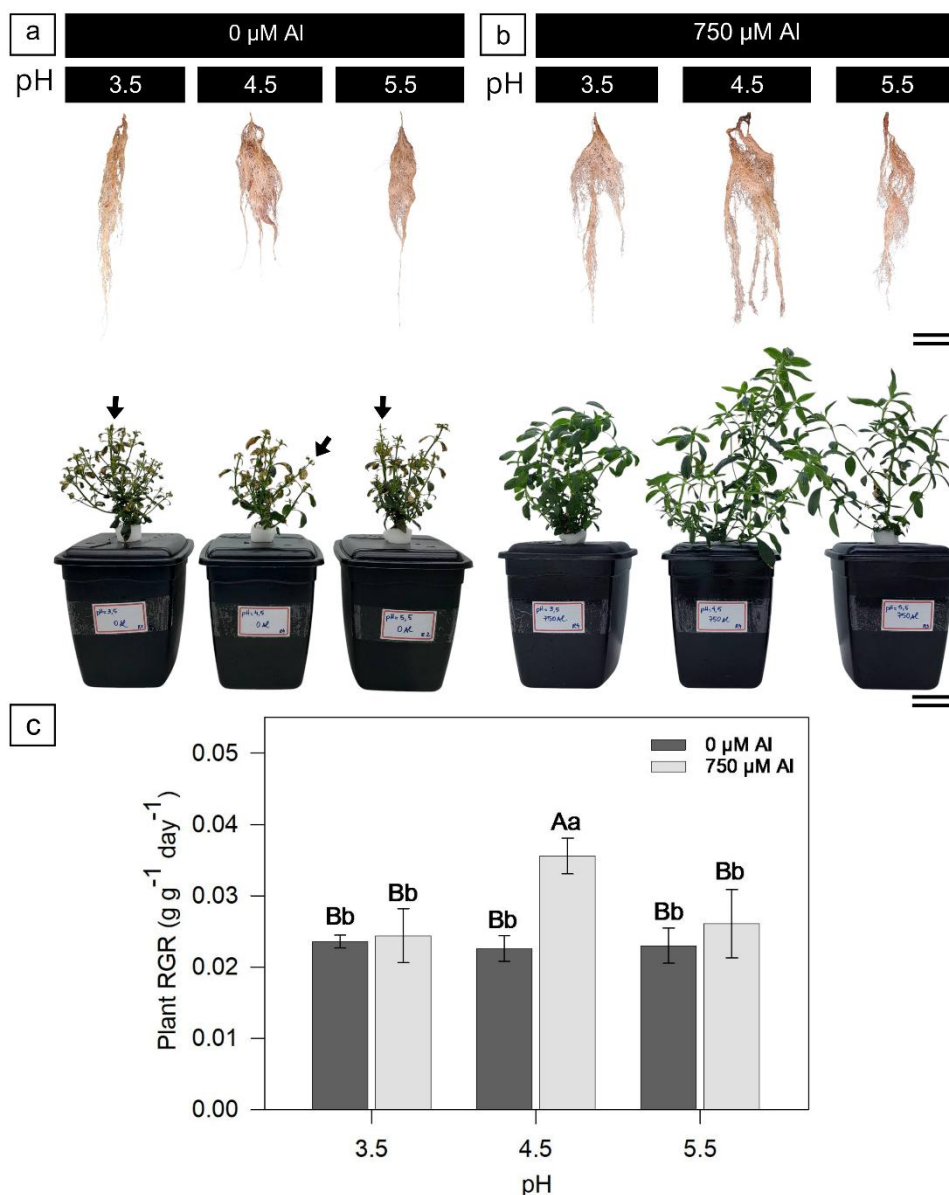


Figure 3 - Phenotypes of stem apical meristems and Al concentration in the aerial part of *Borreria latifolia*. Individuals exposed to nutrient solution containing 0, 250, 500 or 750 μM of Al, at pH 4.5 for 40 days. **a** Phenotypes of stem apices under the effect of Al concentrations. Abbreviation: ne necrosis. Black arrow: stem apical meristems. **b** Al concentration in the aerial part (stem + leaf). Data are averages with standard deviation represented by vertical bars ($n= 5$ plants). Different letters indicate significant differences by Tukey's test ($p<0.05$). Bar: 0.5 cm (0 μM Al), 1 cm (250, 500 and 750 μM Al)



871 **Figure 4** - Effects of the interaction between pH and the absence or presence of Al on
 872 the growth of *Borreria latifolia*. **a**, **b** Phenotypes of the root system and aerial part of
 873 plants exposed to nutrient solution containing 0 or 750 μM of Al, at pH 3.5; 4.5 or 5.5
 874 for 40 days. **c** Relative plant growth rate (RGR). Black arrows: stem apical meristems.
 875 Data are averages with standard deviation represented by vertical bars ($n=4$ plants).
 876 Different letters indicate significant differences by Tukey's test ($p<0.05$). Uppercase
 877 letters refer to differences within a condition of aluminum supply (0 or 750 μM) at
 878 different pH values; lowercase letters refer to differences between the absence and
 879 presence of Al within the same pH condition. Bars: 8 cm (Root), 4 cm (Shoot)

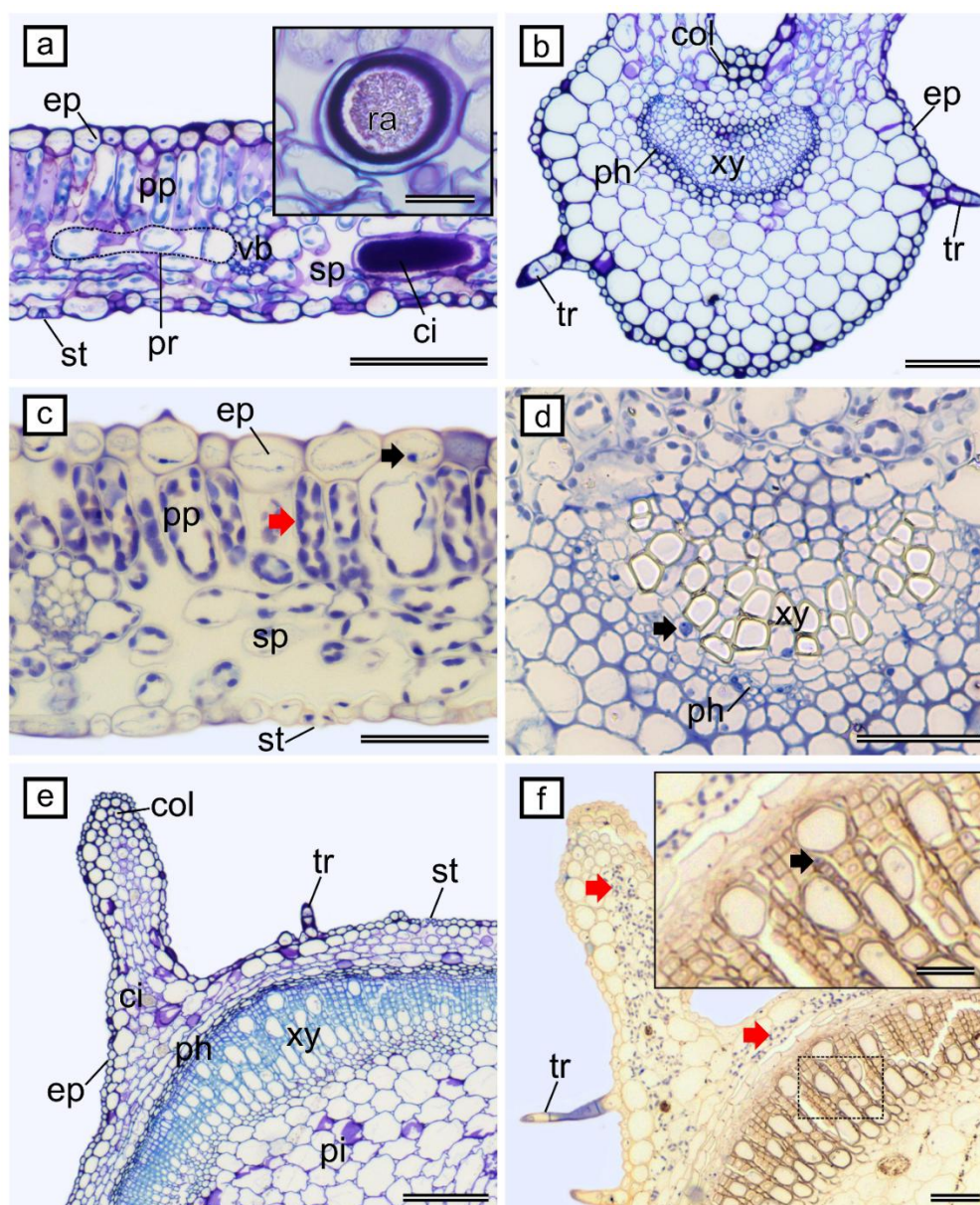
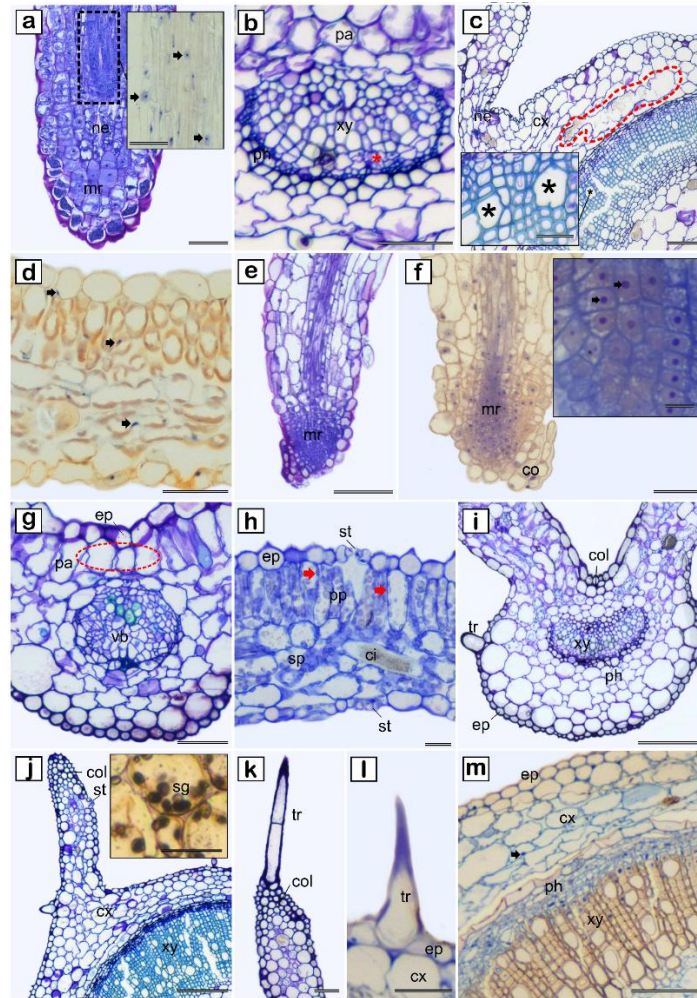
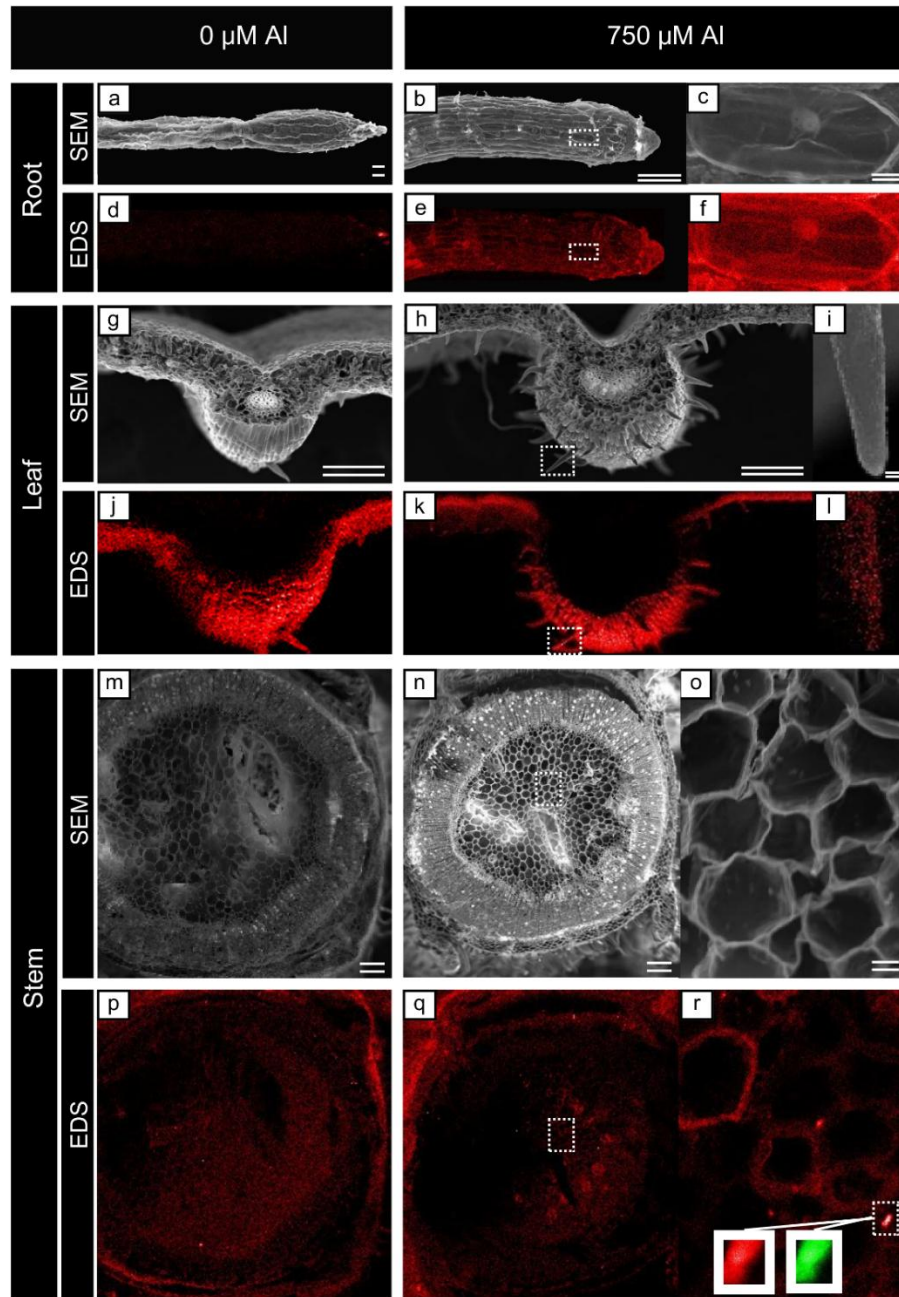


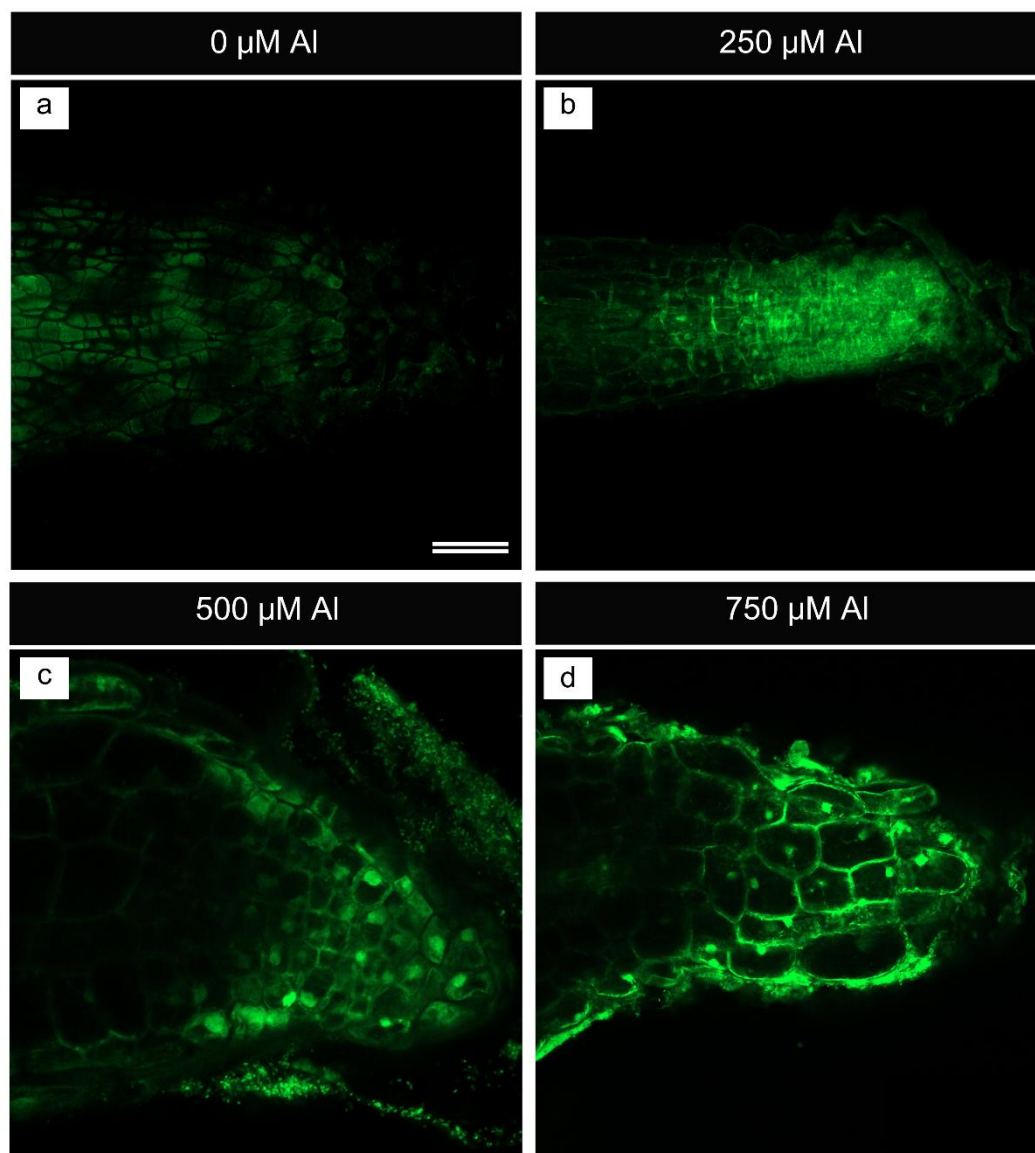
Figure 5 - Anatomy and histochemistry of the aerial part of *Borreria latifolia* collected in a Cerrado environment. **a, b, e** Staining with Toluidine Blue. **c, d, f** Histochemical test with Chorme Azurol S to detect aluminum: blue staining indicates a positive reaction. **a** Leaf limb anatomy. **b** Anatomy of the median vein. **c, d** Histolocalization of Al in the leaf limb and midrib. **e** Stem anatomy. **f** Histolocalization of Al in the stem. Abbreviations: ep epidermis. ci crystal idioblast. col collenchyma. pi stem pith. ph phloem. pp palisade parenchyma. pr paravenal parenchyma. ra raphid. sp spongy parenchyma. st stomata. tr trichome. vb vascular bundle. xy xylem. Red arrows: chloroplasts. Black arrows: nuclei. Scale bars: 20 μ M (**a** detail), 50 μ M (**c, d, f** detail), 100 μ M (**a, b, e, f**)



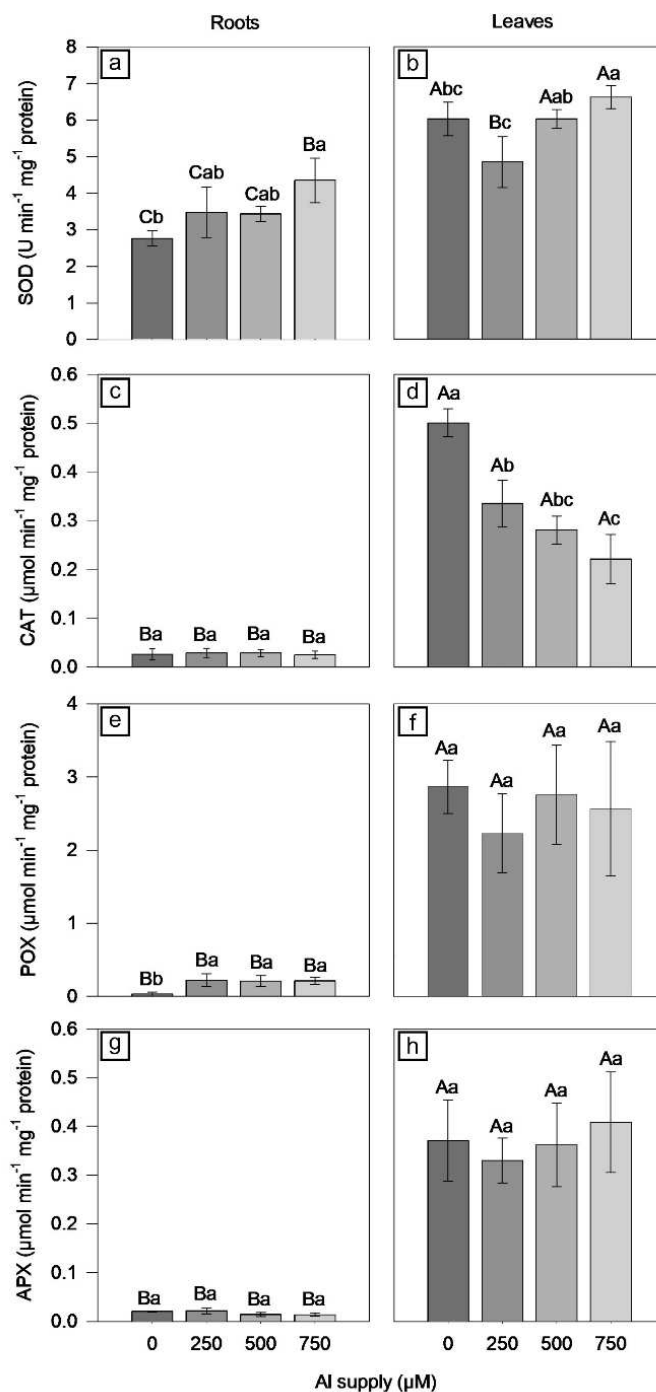
890 **Figure 6** - Anatomy and histochemistry of *Borreria latifolia* grown in increasing
 891 concentrations of Al for 40 days in pots in a hydroponic system. **a-d** Samples of
 892 *Borreria latifolia* treated with 0; **g** 250; **e, f, h, m** 500 and, **i-l** 750 μM of Al. **a, e, f**
 893 Longitudinal sections of roots and **b, d, g, h, i** leaves. **c, j-m** Cross-sections of stems.
 894 **a-c, e, g, i, j, k** Staining with Toluidine Blue. **a detail, d, f, h, l, m** Histochemical test
 895 with Chrome Azurol S to detect aluminum; **c** blue staining indicates positive reaction.
 896 Red dotting indicates cell lysis in the cortical region of the stem. **g** Red dotting indicates
 897 changes in the vascular bundle of the median vein. **j detail** Positive result (purple stain)
 898 for the presence of starch grains, using Lugol's reagent in the medullary parenchyma.
 899 Abbreviations: ep epidermis. ci crystal idioblast. col collenchyma. pi stem pith. ph
 900 phloem. pp palisade parenchyma. sp spongy parenchyma. st stomata. tr trichome. vb
 901 vascular bundle. xy xylem. Red arrows indicate chloroplasts. Black arrows indicate
 902 nuclei. * vessel element. Scale bars: 10 μm (**f detail**), 20 μm (**j detail, k, l**), 30 μm (**c**
 903 **detail**) 50 μm (**a detail, b, d, f-h, k, m**), 100 μm (**a, c, e, h-j**)



904 **Figure 7** - Morphology and distribution of Al in the organs of *Borreria latifolia* by
 905 scanning electron microscopy and X-ray probe. The plants were grown in nutrient
 906 solution in the absence (0 μM) or presence of aluminum (750 μM) for 40 days. **a-c**
 907 Samples of root apices; **g-i** leaves and stems; **m-o** were analyzed using a scanning
 908 electron microscope (SEM). **d-f, j-l, p-r** Maps for the distribution of aluminum and **r**
 909 **detail** silicon were generated from microanalyses using an X-ray probe coupled to a
 910 scanning electron microscope. Dotted areas in **b, e, h, k, n, q** were respectively
 911 magnified in **c, f, i, l, o, r**. Red color: aluminum. Green color: silicon. Bars: 20 μm (**a**);
 912 100 μm (**b**); 8 μm (**c**); 200 μm (**g, h**); 18 μm (**i**); 200 μm (**m, n**); 25 μm (**o**)



913 **Figure 8** - Localization of Al by the fluorophore lumogallion in confocal microscopy in
 914 root apices of *Borreria latifolia* exposed to increasing concentrations of Al. **a** Absence
 915 of Al supply. **b** Addition of 250; **c** 500 and **d** 750 μM of Al for 40 days. Green color
 916 shows Al fluorescence emission after reaction with lumogallion fluorescent probe. Bar:
 917 500 μm



918 **Figure 9** - Effect of Al on the activity of enzymes of the antioxidant system in roots and
 919 leaves of *Borreria latifolia* under increasing concentrations of Al for 40 days. **a, b**
 920 Activities of the enzymes SOD; **c, d** CAT; **e, f** POX and **g, h** APX. **a, c, e, g** Roots. **b,**
 921 **d, f, h** Leaves. Data are averages with standard deviation represented by vertical bars
 922 ($n = 5$ plants). Uppercase letters refer to differences between roots and leaves;
 923 lowercase letters refer to aluminum concentrations for the same organ by Tukey's test
 924 ($p < 0.05$).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

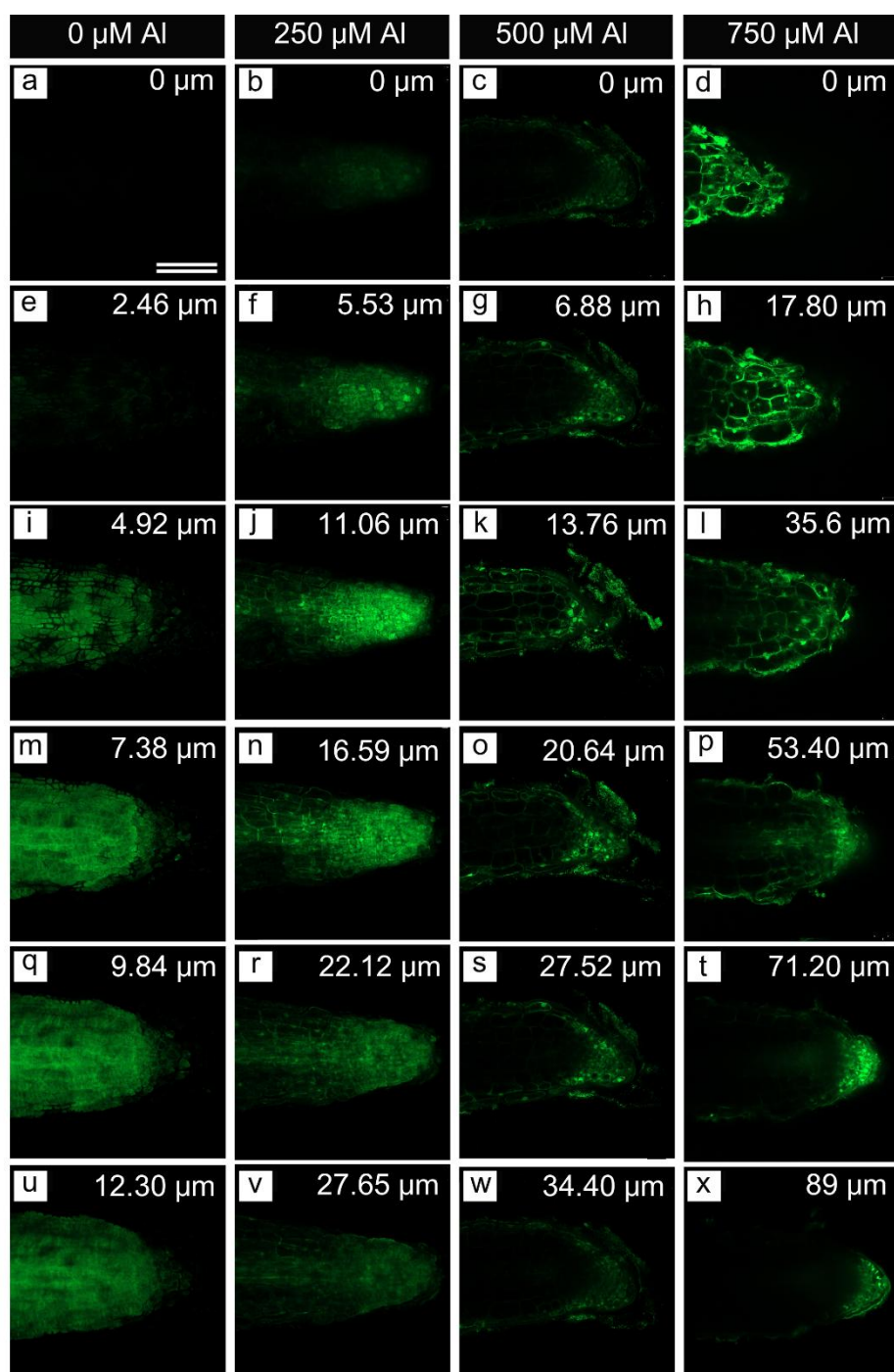


Figure S1 - Localization of Al by the lumogallion fluorophore by confocal microscopy in root apices of *Borreria latifolia* exposed to increasing concentrations of Al. The green color shows the emission of Al fluorescence after reaction with the lumogallion fluorescent probe. The images were taken from different depths of the root tips using

929 the “Z *stacks*” technique. Intervals of 2.46 μm for the absence of Al and 5.53, 6.88 and
930 17.80 μm for the 250, 500 and 750 μM Al treatments, respectively. Bar: 100 μm

Capítulo 2

Perfil proteômico e vias metabólicas envolvidas na essencialidade do alumínio para *Borreria latifolia* (Aubl.) K. Schum. (Rubiaceae)¹

¹ *Manuscrito em construção para submissão*

Elen Silma Oliveira Cruz Ximenes

Orientador: Cleberson Ribeiro

Coorientadores: Aristéa Alves Azevedo

Vítor Batista Pinto

RESUMO

XIMENES, Elen Silma Oliveira Cruz, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2025. **Perfil proteômico e vias metabólicas envolvidas na essencialidade do alumínio para *Borreria latifolia* (Aubl.) K. Schum.** Orientador: Cleberson Ribeiro. Coorientadores: Aristéa Alves Azevedo, Vitor Batista Pinto.

O objetivo deste estudo foi compreender como o Al atua no desenvolvimento da espécie acumuladora *Borreria latifolia*, por meio das respostas fisiológicas, citogenéticas, metabólicas e proteômicas. Para isso, plantas de *B. latifolia* foram cultivadas em sistema hidropônico sob os tratamentos: I) 0 μM de Al e, II) 750 μM de Al por 57 dias; III) 0 μM de Al por 20 dias mais 750 μM de Al por mais 37 dias e IV) 750 μM de Al por 20 dias mais 0 μM de Al por mais 37 dias. Na ausência do Al, houve morte dos meristemas apicais caulinares e as plantas não completaram o seu ciclo de vida. Entretanto, na presença do Al, esses meristemas apresentaram desenvolvimento saudável e o metal foi localizado no núcleo dessas células. Embora supridas com todos os elementos essenciais, na ausência do Al as plantas apresentaram menor fotossíntese e acúmulo de sacarose. A peroxidação lipídica e o $\text{O}_2^{\cdot-}$ aumentaram na ausência de Al. Contudo, o Al foi relacionado à maior atividade das enzimas SOD, CAT e APX. Houve maior acúmulo de prolina nas raízes na ausência de Al. Núcleos $\text{S}_{4\text{C}-8\text{C}}$ e 8C só ocorreram na ausência do metal, sugerido uma resposta plástica ao estresse. A análise proteômica apontou proteínas exclusivas reguladas pelo Al em raízes e folhas. A topologia de rede demonstrou que as proteínas ativadas pelo Al, piruvato quinase, citrato sintase e succinato desidrogenase, são proteínas centrais nas vias do metabolismo de carbono e, portanto, essenciais para a função celular. Com base em evidências morfoanatômicas, fisiológicas e bioquímicas afirmamos que o Al é essencial para essa espécie. A essencialidade do Al ocorre através da ativação de proteínas-chave na regulação da glicólise e do ciclo TCA, potencializando o metabolismo energético que sustenta o desenvolvimento da planta.

Palavras-chave: Hiperacumuladora de Al. Proteínas responsivas ao Al. Metabolismo energético. Topologia de Rede.

ABSTRACT

XIMENES, Elen Silma Oliveira Cruz, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2025. **Proteomic profile and metabolic pathways involved in aluminum essentiality for *Borreria latifolia* (Aubl.) K. Schum. (Rubiaceae).** Adviser: Cleberson Ribeiro. Co-advisers: Aristéa Alves Azevedo, Vitor Batista Pinto.

The objective of this study was to understand how Al acts on the development of the accumulator species *Borreria latifolia* through physiological, cytogenetic, metabolic, and proteomic responses. For this purpose, *B. latifolia* plants were grown in a hydroponic system under the following treatments: I) 0 μM Al and II) 750 μM Al for 57 days; III) 0 μM Al for 20 days plus 750 μM Al for another 37 days; and IV) 750 μM Al for 20 days plus 0 μM Al for another 37 days. In the absence of Al, the apical stem meristems died and the plants did not complete their life cycle. However, in the presence of Al, these meristems developed healthily and the metal was located in the nucleus of these cells. Although supplied with all essential elements, in the absence of Al, the plants showed lower photosynthesis and sucrose accumulation. Lipid peroxidation and $\text{O}_2^{\cdot-}$ increased in the absence of Al. However, Al was related to higher activity of the enzymes SOD, CAT, and APX. There was greater accumulation of proline in the roots in the absence of Al. S4C-8C and 8C nuclei only occurred in the absence of the metal, suggesting a plastic response to stress. Proteomic analysis identified unique proteins regulated by Al in roots and leaves. Network topology showed that Al-activated proteins, pyruvate kinase, citrate synthase, and succinate dehydrogenase, are central proteins in carbon metabolism pathways and, therefore, essential for cellular function. Based on morphoanatomical, physiological, and biochemical evidence, we affirm that Al is essential for this species. The essentiality of Al occurs through the activation of key proteins in the regulation of glycolysis and the TCA cycle, enhancing the energy metabolism that sustains plant development.

Keywords: Al hyperaccumulator. Al responsive proteins. Energy metabolism. Network topology.

1 INTRODUÇÃO

Embora o alumínio (Al) seja amplamente conhecido por sua toxicidade, seus efeitos positivos sobre o crescimento de algumas espécies vegetais têm sido investigados (Castro et al., 2022; Fan et al., 2019; Jiang et al., 2023). Para plantas nativas de regiões de solos ácidos, os benefícios do metal envolvem estímulo à absorção de nutrientes (Liu et al., 2020; Mahmud and Burslem, 2020), maiores taxas fotossintéticas (Bressan et al., 2021a; Silva et al., 2023), ativação de enzimas antioxidantes (Almeida Rodrigues et al., 2019; Nogueira et al., 2023) e de rotas metabólicas (Cury et al., 2020). Entretanto, os processos fundamentais a nível molecular ou celular envolvendo o papel do Al ainda não foram completamente elucidados.

Os critérios de essencialidade para os nutrientes minerais foram estabelecidos no século XX (Arnon and Stout, 1939) e são aceitos até hoje; I) na ausência do elemento, a planta é incapaz de completar seu estágio vegetativo ou reprodutivo; II) somente por meio da ação do elemento a deficiência pode ser corrigida ou prevenida; III) o elemento deve estar envolvido diretamente no metabolismo da planta. O cultivo em hidroponia facilita a verificação desses requisitos, uma vez que é possível controlar com precisão os elementos fornecidos no meio de cultivo. Até o momento, o Al é considerado essencial apenas para *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (Sun et al., 2020). Esse arbusto hiperacumulador de Al, conhecido popularmente como chá, apresentou raízes danificadas quando cultivado na ausência do metal. A ultraestrutura da ponta das raízes revelou que o Al é essencial para o desenvolvimento desse órgão, promovendo melhor atividade na zona meristemática.

As ferramentas biotecnológicas facilitam a pesquisa científica, impulsionando avanços em diversas áreas do conhecimento. As ciências ômicas têm revolucionado a compreensão precisa e direcionada da fisiologia vegetal (Dikobe; Masenya; Manganyi, 2023; Hurgobin; Lewsey, 2022). Entre essas estratégias, a análise do perfil proteômico tem se tornado uma abordagem valiosa para compreender a adaptação de plantas diante dos desafios ambientais globais (Winck; Dos Santos; Calderan-Rodrigues, 2021).

Estímulos ambientais provocam alterações significativas nas proteínas, afetando sua abundância relativa, localização celular, mudanças pós-traducionais e interações moleculares (Kosová et al., 2018). Essas respostas permitem o reajuste

1010 dinâmico de mecanismos moleculares cruciais para a sobrevivência vegetal (Kausar
1011 et al., 2022). Várias pesquisas elucidaram as alterações no perfil proteômico de
1012 plantas a agentes estressores, sobretudo em resposta a metais traço, como o Al, em
1013 culturas agrícolas (Niedziela et al., 2022; Pinto et al., 2021; Potts et al., 2022; Rahman
1014 et al., 2022; Wei et al., 2020) e espécies nativas (Cury et al., 2020; Fan et al., 2019;
1015 Huang et al., 2021). Portanto, a proteômica é uma ferramenta precisa para analisar as
1016 mudanças que ocorrem nas plantas, seja a nível bioquímico, molecular ou fisiológico.

1017 Apesar de várias pesquisas apontarem proteínas responsivas ao Al em plantas
1018 cultivadas, estudos ômicos em plantas acumuladoras de Al são escassos. Esta lacuna
1019 precisa ser preenchida, visto que essas plantas revelam mecanismos únicos de
1020 lidar com o metal. Em plantas de *C. sinensis*, o Al aumentou a abundância de
1021 proteínas do metabolismo glicolítico e fotossintético (Xu et al., 2017). A análise do
1022 proteoma e do metaboloma das raízes de *Qualea grandiflora*, demonstrou a
1023 importância do Al para biossíntese de componentes da parede celular, como a lignina;
1024 processamento de material genético e regulação do metabolismo de ácidos orgânicos
1025 (Cury et al., 2020).

1026 Adicionalmente às proteínas, múltiplos fitormônios e genes formam uma
1027 cascata transcricional hierárquica envolvida no crescimento radicular induzido pelo Al
1028 em plantas de *C. sinensis* (Cheng et al., 2021). A promoção do crescimento das raízes
1029 é mediada principalmente pela síntese e transporte de auxina. A expressão dos genes
1030 YUC8 e AMI1, regulados positivamente pelo metal, foi relacionada ao acúmulo do
1031 fitormônio (Gao et al., 2022). O Al também induz a expressão de CsUGT84J2 da UDP
1032 glicosiltransferase em *C. sinensis*. A glicosilação de ácidos fenólicos, flavonóis e
1033 auxinas é catalisada pela CsUGT84J2, promovendo homeostase da auxina (Jiang et
1034 al., 2023). A via da biossíntese do flavonol do tipo F2 é estimulada pelo Al e contribui
1035 para a formação de raízes laterais (Lai et al., 2025).

1036 O Cerrado, bioma também conhecido como “savana brasileira”, um dos mais
1037 importantes *hotspots* de biodiversidade vegetal do mundo, abriga diversas espécies
1038 acumuladoras de Al (Castro et al., 2022; Haridasan, 1982). *Borreria latifolia* é uma
1039 herbácea, de ocorrência natural no Cerrado, que não apenas tolera grandes
1040 quantidades de Al, mas seu crescimento e desenvolvimento dependem do metal
1041 (Marques et al., 2025). No entanto, nenhum estudo demonstrou como o Al atua no
1042 metabolismo dessa nativa. Portanto, hipotetizamos que o Al seja um elemento
1043 essencial para *B. latifolia*. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi analisar as

- 1044 respostas fisiológicas, citogenéticas, metabólicas e proteômicas de *B. latifolia* ao Al, a
1045 fim de compreender a magnitude da importância do metal para essa espécie.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e condições de cultivo

Plantas de *Borreria latifolia* (Aubl.) K. Schum. (Rubiaceae) sem ramificações e com altura entre 10 e 15 cm foram coletadas com solo na Floresta Nacional de Paraopeba, Minas Gerais (MG) – Brasil (19° 20' S e 44° 20' W). A região apresenta clima subtropical úmido, com verões chuvosos e estação seca de abril a setembro (Thorntwaite e Mather, 1957). A precipitação média anual é de 1236 mm, com déficit hídrico de 93 mm. As temperaturas médias anuais variam de 20 a 23°C (máximas de 29-31°C; mínimas de 16-18°C). A média da umidade do ar anual oscila entre 65-70%, reduzindo abaixo de 60% (mínimas de 48%) nos meses mais quentes (Hofmann et al., 2021)

As plantas foram aclimatadas em casa de vegetação em vasos contendo solo natural da região de coleta, classificado como Latossolo Amarelo (Thibau et al., 1975). Após 60 dias, as plantas foram selecionadas de acordo com a uniformização da parte aérea e do sistema radicular, e transferidas para uma nova aclimação em um sistema de hidroponia em ambiente controlado, com sistema de aeração contínua, temperatura de 25 ± 1 °C, intensidade de luz de $200 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 80% de umidade relativa e ciclo claro/escuro de 12 h. O cultivo foi realizado em vasos de 3L contendo solução nutritiva de Clark (Clark, 1975) a pH 4,5. Durante a aclimação, as plantas foram mantidas em solução de Clark 1/3 da força.

Para avaliar a essencialidade do Al, as mudas foram cultivadas por 57 dias em solução de Clark ½ força contendo 0 ou 750 μM de Al fornecido na forma de AlCl_3 . Os tratamentos aplicados foram: I) ausência contínua de Al (0 μM Al) durante 57 dias; II) presença contínua de Al (750 μM Al) durante 57 dias; III) ausência de Al por 20 dias, seguido de adição do metal (0 $\rightarrow$ 750 μM Al) por mais 37 dias e IV) presença de Al por 20 dias, seguido de privação do metal (750 $\rightarrow$ 0 μM Al) por mais 37 dias. As soluções foram renovadas semanalmente e o pH ajustado diariamente para $4,5 \pm 0,1$. Cada vaso contendo uma planta de *B. latifolia* foi considerado uma unidade amostral. O delineamento foi inteiramente casualizado com sete repetições para cada tratamento.

2.2 Caracterização morfológica

As alterações morfológicas nos órgãos vegetativos de *B. latifolia* foram analisados diariamente e registrados em fotografias.

2.3 Avaliação do crescimento

A taxa de crescimento relativo radicular (Root RGR) e da planta (Plant RGR) foram mensuradas a partir da biomassa seca inicial, obtida através da massa seca antes da aplicação dos tratamentos (w_0), e da massa seca final (w_{57}), obtida no 57º dia após a aplicação dos tratamentos, conforme equação proposta por Hunt (1978):

$$RGR = \frac{(\ln w_{57} - \ln w_0)}{(t_{57} - t_0)}$$

em que, RGR foi expressa em termos de ganho de massa seca, em gramas, ao longo do período experimental; $\ln$: logaritmo neperiano; $t_{57} - t_0$: duração do experimento em dias.

2.4 Detecção de Al nos ápices radiculares por coloração com hematoxilina

Para a histolocalização do Al nos ápices radiculares utilizou-se o corante hematoxilina férrica (Polle et al., 1978). Pontas de raízes com um centímetro de comprimento foram imersas em solução de hematoxilina férrica 0,2 % (p/v) e NaIO_3 0,02% (p/v), durante 30 segundos. Os ápices foram lavados em água destilada por 15 minutos para eliminar o excesso do corante. Por fim, as amostras foram coletadas e fotografadas em câmera Olympus EP50; Olympus Life Science, Tokyo, Japan acoplada a uma lupa Olympus SZX7.

2.5 Quantificação de Al e nutrientes na matéria seca

Amostras de raízes, folhas e caules coletadas aos 57 dias foram secas em estufa a 65°C por 72 horas e moídas em moinho de bolas. A concentração de N foi

determinada a partir de digestão sulfídrica. Para quantificação do Al, dos demais macro (P, K, S, Ca e Mg) e micronutrientes (Cu, Fe, Zn, Mn e B) as amostras foram submetidas à digestão nitroperclórica (Tedesco *et al.*, 1995) e analisadas por espectrofotometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) (OPTMA 7300 DV, Perkin Elmer).

O fator de translocação (TF) do Al foi calculado a partir da concentração do metal na massa seca (DW), para avaliar a capacidade da planta de translocar Al das raízes para a parte aérea (Marchiol *et al.*, 2004):

$$TF = \frac{\text{mg Al kg}^{-1} \text{ Stem DW} + \text{Leaf DW}}{\text{mg Al kg}^{-1} \text{ Root DW}}$$

2.6 Anatomia e histoquímica dos meristemas apicais caulinares

Ápices caulinares foram coletados de cinco repetições de cada tratamento ao final do período experimental. As amostras foram fixadas em solução de FAA 50 (formaldeído 37%, ácido acético e etanol 50%, 1:1: 18) (Kukachka and Miller, 1980) (Johansen, 1940). O material foi pré-infiltrado a vácuo com a mistura de etanol 95% e historesina (Leica Historesin® Plus), na proporção de 1:1, por 24 horas. As amostras foram mantidas em vácuo diário, com trocas em intervalo de uma hora, para inclusão em historesina metacrilato.

Cortes transversais e longitudinais de 5 µm foram realizados em micrótomo rotativo automático (modelo RM2255, Leica Microsystems Inc., Deerfield, Illinois, EUA). Os seguintes testes foram realizados aos cortes: azul de Toluidina 0,05% (pH 4,7) para discriminação dos tecidos (O'Brien *et al.*, 1964); Chrome Azurol'S (CAS) para histolocalização do Al (Kukachka and Miller, 1980); cloreto de ferro III para detecção de compostos fenólicos e vermelho de Rutênio para detecção de mucilagem (Johansen, 1940). Os cortes não submetidos às reações foram considerados como branco para esses testes.

As lâminas foram montadas em Permount (Fisher Scientific Mounting Medium). As imagens foram capturadas em sistema U-Photo e câmera digital acoplada (modelo: Zeiss HRC) em microscópio de luz (modelo Olympus® AX70TRF). Para visualização de cristais de oxalato de cálcio, as lâminas foram analisadas em luz

polarizada. Ápices caulinares representativos de cada tratamento foram fotografados em estereomicroscópio Olympus SZX7.

2.7 Trocas gasosas foliares e fluorescência

As avaliações de trocas gasosas foram realizadas utilizando um analisador de gás infravermelho LI-6400XT (LI-COR) na folha completamente expandida mais jovem localizada no terço médio da parte aérea. As condições dentro da câmara foliar foram: 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD (Photosynthetic photon flux density) (10% de luz azul), 400 $\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1} \text{ar}$ e temperatura 25°C. A taxa de assimilação líquida de CO_2 (A_n), condutância estomática (gs), concentração interna de CO_2 (C_i), transpiração (E) e taxa de transporte de elétrons (ETR) foram analisadas. As medidas foram realizadas em 4 repetições de cada tratamento. A eficiência do uso da água (WUE) foi calculada a partir da razão entre assimilação líquida de CO_2 e transpiração (A_n/E). As medições ocorreram aos 20 dias após a implementação (DAI) do experimento; um dia (21 DAI) e uma semana (28 DAI) após a suplementação ou restrição com o Al e no término do período experimental (57 DAI).

2.8 Conteúdo Relativo de Água

Aos 57 dias de experimento, três folhas jovens completamente expandidas de tamanhos semelhantes, foram coletadas de três plantas de cada tratamento e imediatamente pesadas para obtenção do peso fresco (FW). Em seguida, os pecíolos das folhas foram imersos em água destilada, mantidas em câmara úmida até atingirem peso túrgido (TW) constante e então pesadas. Posteriormente, as folhas foram secas em estufa de circulação de ar a 85°C, por 3h e o peso seco (DW) foi determinado (Turner, 1981). O teor relativo de água (RWC) foi calculado conforme a equação:

$$\text{RWC} = \frac{(\text{FW} - \text{DW})}{(\text{TW} - \text{DW})} \times 100$$

2.9 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radical ânion superóxido (O₂⁻)

Para estimar a peroxidação lipídica a partir do conteúdo de TBARS, 0,2 g de raízes e de folhas frescas congeladas foram homogeneizadas em 2 mL de TCA 1% (p/v) e centrifugadas a 12.000 g a 4 °C por 15 minutos. Uma alíquota do sobrenadante foi adicionada a uma mistura de reação contendo 0,5% TBA (p/v) em 20% TCA (p/v), em seguida incubada a 95 °C por 30 min e centrifugada a 10.000 g a 4 °C por dez minutos (Heath and Packer, 1968). A leitura da absorbância do sobrenadante foi feita em dois comprimentos de onda (535 nm e 600 nm). A concentração do complexo MDA-TBA foi estimada usando um coeficiente de extinção molar de $155 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Para determinar a concentração de H₂O₂, 100 mg de raízes e de folhas frescas congeladas foram homogeneizadas em 2 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,5) com hidroxilamina 1 mM, e centrifugado a 10.000 g a 4 °C por 15 min. Uma alíquota do sobrenadante foi adicionada a uma mistura de reação contendo 250 µM FeNH₄(SO₄) em 25 mM H₂SO₄, 100 mM sorbitol e 250 µM laranja de xilenol. Dessa forma, as amostras foram mantidas no escuro por 30 minutos (Gay and Gebicki, 2000). Em um leitor de microplacas, a absorbância do sobrenadante foi registrada a 560 nm. O cálculo do teor de H₂O₂ foi baseado em uma curva de calibração com padrões autênticos de H₂O₂.

Para a determinação da concentração de O₂⁻, 50 mg de amostras de raízes e de folhas frescas congeladas foram picadas em fragmentos menores e adicionadas a uma mistura contendo 20 mM de tampão de fosfato de sódio (pH 7,8), 20 µM de NADH, 0,1 mM de Na₂-EDTA e 25,2 mM de epinefrina em 0,1 N de HCl (Mohammadi and Karr, 2001). Após cinco minutos de incubação a 28 °C, os fragmentos das amostras foram retidos por filtração e a absorbância lida em 480 nm. O conteúdo de radicais de ânion superóxido foi calculado com base no coeficiente de extinção molar de $4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.10 Ensaio das enzimas antioxidantes

Para determinar a atividade das enzimas, superóxido dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1), catalase (CAT) (EC 1.11.1.6), peroxidase (POX) (EC 1.11.1.7) e peroxidase do ascorbato (APX) (EC 1.11.1.11), 0,3 g de amostras de raízes e de folhas frescas foram coletadas ao final do experimento e congeladas. Posteriormente, as amostras foram maceradas em nitrogênio líquido.

As amostras foram homogeneizadas em meio de extração contendo 2 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 6,8) EDTA 0,1 mM, 1 mM de fenilmetilsulfonil fluoride (PMSF) dissolvido em etanol e 1 % de polivinilpolipirrolidona (PVPP) (p/v). O extrato bruto foi centrifugado a 12.000 g a 4°C, durante 15 minutos e subsequentemente, o sobrenadante foi coletado para as avaliações das atividades enzimáticas (Ribeiro et al., 2012) e dosagens de proteína (Bradford, 1976).

Para quantificação da atividade da SOD, adicionou-se 20 µL do extrato bruto a um meio de reação contendo tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, EDTA 0,1 mM, metionina 13 mM, tetrazólio nitroazul (NBT) 75 mM e 2 µM de riboflavina. A reação foi induzida em uma câmara de luz LED ($\cong$ 1000 lúmens) a 25 °C por 3 minutos. A formazana azul produzida pela fotorredução de NBT foi lida em 560 nm (Giannopolitis and Ries, 1977). Uma unidade de SOD foi definida como quantidade de enzima capaz de inibir metade da fotorredução de NBT.

A atividade da CAT foi quantificada a partir da adição de 30 µL do extrato enzimático bruto a 170 µL de meio de reação composto de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e peróxido de hidrogênio 12,5 mM (Havir and McHale, 1987). A queda da absorbância foi registrada a 240 nm, a 30°C, por um minuto. O cálculo da atividade da CAT foi baseado no coeficiente de extinção molar de 36 M⁻¹cm⁻¹ (Anderson et al., 1995).

A determinação da atividade da POX iniciou-se com a adição de 2 µL do extrato enzimático bruto a 298 µL do meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e peróxido de hidrogênio 20 mM. O acréscimo na absorbância foi registrado durante um minuto de reação a 420 nm, a 30°C (Kar and Mishra, 1976). Para o cálculo da atividade enzimática considerou-se o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM⁻¹cm⁻¹ (Chance and Maehly, 1955)

Para determinar a atividade da APX adicionou-se 20 µL do extrato bruto enzimático ao meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 com EDTA 0,1 mM, ácido ascórbico 4,8 mM e peróxido de hidrogênio 1 mM. A redução na absorbância foi computada a 290 nm, no decurso de um minuto. A atividade da

enzima calculada através do coeficiente de extinção molar de $2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Nakano and Asada, 1981).

2.11 Extração de metabólitos

Amostras de 0,1 g de raízes ou de folhas totalmente expandidas foram coletadas entre 12h e 14h aos 57 DAI e imediatamente armazenadas a -80°C . Após o processo de liofilização, o material foi submetido à extração metanólica (Lisec et al., 2006). As concentrações de pigmentos, prolina, aminoácidos totais, fenóis totais, malato e fumarato, glicose, frutose e sacarose, foram determinadas a partir da fração solúvel. Proteínas totais e amido foram quantificados na fração precipitada.

2.12 Pigmentos

As concentrações de clorofila *a* e *b* e de carotenoides foram determinados por espectrofotometria com base nas leituras a 666, 653 e 470 nm, respectivamente (Lichtenthaler and Wellburn, 1983; Wellburn, 1994). Adicionalmente, as concentrações totais de clorofila (*a* + *b*) e a razão clorofila *a/b* foram calculadas.

2.13 Prolina

Para determinar a concentração de prolina, o extrato foi adicionado a um meio de reação composto por niidrina 1% (p/v), etanol 20% (v/v) e ácido acético 60% (v/v). Devidamente vedada, a placa foi agitada em termomixer a 95°C por 20 minutos. A absorbância foi medida a 520 nm (Carillo and Gibon, 2011). O cálculo da concentração de prolina foi feito com base na curva padrão.

2.14 Aminoácidos totais

O total de aminoácidos foi determinado a partir da adição do extrato a um meio de reação contendo 1M de tampão citrato de sódio (pH 5,2), 0,2% de ácido ascórbico (p/v), 1% de niidrina (dissolvida em 70% de etanol, p/v). A placa foi vedada com fita alumínica termo resistente e agitada em termomix, a 95°C , por 20 minutos (Yemm et

al., 1955). A leitura da absorbância foi feita em 570 nm e a concentração total calculada com base na curva de calibração utilizando leucina.

2.15 Proteínas totais

A fração precipitada resultante da extração metanólica foi ressuspensa em NaOH 0,1 M e incubada a 95°C sob agitação de 750 rpm, durante 1 h (Cross et al., 2006). Posteriormente, em temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 13500 rpm a 4°C por 5 minutos. Em seguida, 5 µL de suspensão foram adicionados a uma microplaca contendo 250 µL de reagente de Bradford (Bradford, 1976). Após dez minutos no escuro, a absorbância foi lida a 595 nm. Para aferir a concentração total de proteína, o padrão utilizado para a curva de calibração foi a albumina sérica bovina (BSA).

2.16 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos foram determinados a partir da adição do extrato a um meio de reação contendo folin 1M e Na₂CO₃ 20 % (m/v). Após 40 minutos de incubação no escuro, a 25°C, a absorbância foi lida a 725 nm. Para o cálculo da concentração de fenóis totais foi feita uma curva padrão com ácido tânico 0,1 mg/mL.

2.17 Malato e Fumarato

As concentrações de malato e fumarato foram determinadas adicionando-se o extrato a um meio de reação constituído de tampão Tricina/KOH (pH 9) 0,4 M, 20 mM de MgCl₂, 10 mM de MTT (brometo de metiltiazolildifenil-tetrazólio), 60 mM de NAD⁺, 20 mM de PES (etossulfato de fenazina) e 10% de Triton X-100 (v/v). Em um leitor de microplacas, a absorbância foi lida a 570 nm em intervalos de um min. Respeitando o intervalo de tempo para estabilização das reações, as seguintes enzimas foram adicionadas: 1 U de malato desidrogenase e 0,1 U de fumarase (Nunes-Nesi et al., 2007). Curvas de linearidade foram feitas para calcular as concentrações de malato e fumarato.

2.18 Glicose, frutose e sacarose

Para determinar as concentrações de glicose, frutose e sacarose, uma alíquota da fração solúvel foi adicionada a um meio de reação contendo 0,1 M de tampão HEPES/KOH, 3 mM de $MgCl_2$, 109 mM de ATP, 48,4 mM de $NADP^+$, 700 U mL^{-1} de G6PDH. Conforme estabilização da redução de $NADP^+$, registrada a 340 nm, as seguintes enzimas foram adicionadas: 1,5 U de hexoquinase, 0,7 U de fosfoglicose isomerase e 5 U de invertase (Fernie et al., 2001). Para o cálculo das concentrações de açúcares, considerou-se: $NADPH (\mu mol) = \Delta OD / (2,85 \times 6,22)$.

2.19 Amido

A fração ressuspensa do extrato foi neutralizada com ácido acético 1M. Para degradação do amido, as amostras foram pipetadas em uma placa contendo solução 50 mM de acetato de sódio (pH 4,9), 170 U mL^{-1} de amiloglucosidase e 325 U mL^{-1} de α -amilase. A placa foi vedada e mantida por 12 horas a 37°C. Posteriormente, um meio de reação foi preparado contendo 1 mM de tampão HEPES/KOH (pH 7), 30 mM de $MgCl_2$, 109 mM de ATP, 48,4 mM de $NADP^+$, 700 U mL^{-1} de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e extrato. Após a estabilização da densidade óptica, 2 U de hexoquinase foi adicionada para completar a reação e a redução de $NADP^+$ foi lida a cada 60 segundos, a 340 nm (Fernie et al., 2001).

2.20 Medição do valor 1C nuclear, do nível de ploidia de DNA e do índice de endociclos

O valor 1C nuclear, o nível de ploidia de DNA e o índice de endociclos das plantas de *B. latifolia* foram mensurados por meio da citometria de fluxo. No final do período experimental (57 DAI), os meristemas apicais das raízes e as folhas jovens foram coletadas de cinco plantas de *B. latifolia* para cada tratamento. *Solanum lycopersicum* L. foi utilizado como padrão interno foliar. Cada meristema apical da raiz e cada fragmento foliar (2 cm^2) foi individualmente seccionado em uma placa de Petri contendo 500 μL de tampão de extração OTTO-I (0,1 M de ácido cítrico, 2,0 mM de ditiotreitól, 0,5% v/v–1 Tween 20®, pH 2,3, (Otto, 1990). Após três minutos, 500 μL do

mesmo tampão foram acrescentados e cada suspensão foi filtrada através de uma membrana de náilon de 30 μm (Partec GmbH®) em um microtubo de 2,0 mL, e centrifugada a 100 g por 5 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado, e 100 μL de tampão de extração OTTO-I foram adicionados ao precipitado. Cada suspensão foi agitada em vortex e incubada por 10 min. As suspensões nucleares foram coradas com 500 μL de solução OTTO-II (0,4 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2,0 mM ditioneitol, 50 g mL^{-1} RNase, 75 μM iodeto de propídio, pH 7,8), mantidas no escuro por 30 minutos à temperatura ambiente (Praça-Fontes et al., 2011; Siqueira et al., 2022).

Subsequentemente, as suspensões foram filtradas em membrana de náilon de 20 μm em tubo de citometria e então, analisadas em citômetro de fluxo BD Accuri C6 (Accuri cytometers, Belgium) com laser 488 nm (50 mW), para análise dos parâmetros de dispersão direta (FSC), dispersão lateral (SSC. Filtros FL2 (585/640) e FL3 (670 LP) foram usados para detecção da fluorescência emitida pelos núcleos corados.

Os histogramas foram analisados no software BD Csampler (Flow Cytometry within reach) e o número de núcleos foi quantificado com base nos dados disponibilizados por histogramas monoparamétricos (fluorescência de iodeto de propídio $\times$ contagem de núcleos) e biparamétricos (fluorescência de iodeto de propídio $\times$ granularidade de núcleos e/ou densidade nuclear – SSC $\times$ contagem de núcleos) (Fioresi et al., 2020)

A partir do nível de ploidia de DNA, o número de núcleos em G_0/G_1 (nível de ploidia de DNA 2C), S e G_2/M (nível de ploidia do DNA 4C) foi determinado para cada suspensão, e o número total de núcleos das suspensões obtido de cada planta.

2.21 Análise proteômica comparativa

Para análise proteômica, três réplicas biológicas de cada tratamento foram selecionadas. Raízes (0,45 g) e folhas (0,3 g) frescas foram coletadas e armazenadas a -80°C . Posteriormente, o material foi macerado em nitrogênio líquido, liofilizado e precipitado com tampão TCA/Acetona 10%, contendo 20 mM ditioneitol (DTT). Em seguida, as proteínas foram extraídas com tampão de extração Uréia/Tiouréia (7 M de Uréia, 2 M de Tiouréia, 2% Triton X-100, 1% de DTT, e 1 mM de PMSF). A

concentração de proteína foi determinada através do método de Bradford (Bradford, 1976).

As amostras foram avaliadas comparativamente pela estratégia proteômica *shotgun label-free*. Inicialmente, para a digestão de proteínas com a enzima tripsina a preparação de amostra auxiliada por filtro (FASP) foi utilizada (Burrieza et al., 2019). A concentração dos peptídeos obtidos de cada repetição biológica foi determinada utilizando o espectrofotômetro NanoDrop a 205 nm.

Subsequentemente, um nanoACQUITY UPLC ligado a um espectrômetro de massa SYNAPT G2 Si S (Waters) para análise de LC-ESI-MS/MS foi utilizado para aquisição dos espectros de acordo com as configurações descritas por Pinto et al., 2021. O processamento dos espectros, identificação e quantificação label-free das proteínas foram realizados através dos programas ProteinLynx Global Server (PLGS; versão 3.0.2) e ISOQuant. Para a identificação de proteínas foram utilizados os bancos de dados disponíveis da espécie *Oldenlandia corymbosa* L. var. *corymbosa*. (<https://www.uniprot.org/proteomes/UP001161247>).

As proteínas foram consideradas reguladas, quando atenderam aos critérios do t-test ($p < 0,05$) e do Log2 fold change (FC) significativo ($\text{Log}_2 \text{FC} > 0,585 = \text{Up-acumulado}$ e $< -0,585 = \text{Down-acumulado}$). Para a classificação funcional e anotação das proteínas identificadas utilizamos o software OmicsBox (www.biobam.com/omicsbox).

Análise de enriquecimento de ontologia gênica e vias KEGG foram realizadas utilizando o software shinyGO (<https://bioinformatics.sdstate.edu>) e plantREGMap (<http://plantregmap.gao-lab.org/>). Redes de interação proteína-proteína foram construídas por meio do software STRING (<https://string-db.org/>) e Cytoscape (Shannon et al., 2003). Para as análises funcionais de enriquecimento e de redes de interação proteína-proteína foram utilizadas informações de ortólogos de *Coffea canephora*.

2.22 Análise de dados

A normalidade e a homogeneidade de variância dos dados foram verificadas pelo teste Shapiro-Wilk e de Bartlett, respectivamente, ambos a 5% de significância. As variáveis que não atenderam aos pressupostos de normalidade foram transformadas utilizando a metodologia Box-Cox (Box and Cox, 1964) para normalizar

1397 os resíduos. Valores de $\lambda = -1,7$ (prolina), 0,3 (aminoácidos), 0,1 (proteínas), -0,05
1398 (fenóis), -1,55 (fumarato), 0,15 (glicose) e 0,05 (amido). Após transformação, os
1399 dados foram submetidos à análise de variância (Teste F, $p \leq 0,05$). Quando
1400 significativas, as médias das variáveis foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq$
1401 0,05).

1402 Na ausência de normalidade após transformação, o teste não paramétrico de
1403 Kruskal-Wallis foi aplicado. Em caso de diferenças significativas ($p < 0,05$), foi
1404 realizada uma comparação pareada dos grupos usando teste de Dunn com ajuste de
1405 Bonferroni. Os dados não paramétricos foram representados por boxplots. A linha
1406 horizontal dentro da caixa fornece uma visão gráfica da mediana (Q2), o primeiro
1407 quartil (Q1) é a linha da base da caixa e o terceiro quartil (Q3) a linha do topo. A linha
1408 superior representa o menor valor máximo de x ($Q3 + 1,5 \times$ intervalo interquartil);
1409 enquanto a linha inferior está localizada no maior valor mínimo de x ($Q1 - 1,5 \times$
1410 intervalo interquartil).

1411 A Análise de Componentes Principais (PCA) foi utilizada para avaliação
1412 multivariada dos dados cujos testes de variância anteriores foram significativos ($p \leq$
1413 0,05). Após padronização das observações separadas por órgão (raiz e folha), a
1414 matriz de correlação foi gerada e os autovalores e autovetores foram calculados. Os
1415 componentes principais foram determinados a partir da combinação linear entre dados
1416 padronizados e autovetores. Os dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2)
1417 foram utilizados para determinar a similaridade entre tratamentos. A contribuição de
1418 cada variável resposta foi determinada através da correlação entre seus valores e os
1419 valores dos eixos principais.

1420 Todos os testes estatísticos foram realizados no software R versão 4.4.2 (R
1421 Development Core Team, 2024).

3 RESULTADOS

3.1 O alumínio é essencial para o crescimento e desenvolvimento de *Borreria latifolia*

Os sintomas da ausência de Al sobre o fenótipo de *B. latifolia* foram observados a partir do 15º dia de cultivo. Nas raízes, a ausência do metal (0 μ M) afetou a ramificação lateral (Fig. 1a). Contudo, a adição de Al (0 $\rightarrow$ 750 μ M) aos 20 DAI estimulou a emissão de novas raízes e o alongamento das raízes mais antigas (Fig. 1c). Plantas cultivadas inicialmente com Al (750 μ M) paralisaram a emissão de raízes laterais depois de submetidas à privação do metal (750 $\rightarrow$ 0 μ M) (Fig. 1 b, d).

A parte aérea das plantas cultivadas em solução nutritiva com 0 μ M Al apresentou necrose nos meristemas apicais caulinares e amarelecimento seguido de necrose nos ápices foliares (Fig. 2a). Com a adição de Al (0 $\rightarrow$ 750 μ M), esses sintomas não persistiram e a parte aérea das plantas voltou a se desenvolver, exibindo aos 57 DAI folhas saudáveis resultantes das novas brotações (Fig. 2c). Por outro lado, nos meristemas apicais caulinares e nos ápices das folhas dos indivíduos tratados continuamente com Al não houve necrose (Fig. 2b). No entanto, a privação do metal (750 $\rightarrow$ 0 μ M) a partir do 20º dia induziu necrose nos meristemas caulinares e ápices foliares, que até então, estavam íntegros (Fig. 2d).

As taxas de crescimento relativo confirmaram que a ausência de Al inibe o crescimento das raízes. Houve redução de 70% na RGR das raízes cultivadas sem adição de Al, enquanto a presença desse elemento foi essencial para a ramificação e desenvolvimento radicular (Fig. 3a, b). Na ausência de Al, com a morte dos meristemas apicais caulinares, várias brotações laterais foram emitidas, porém não progrediram (Fig. 3c). Quando o metal foi adicionado, as gemas laterais se desenvolveram, entretanto, o contrário ocorreu quando o Al foi omitido na solução. As plantas que cresceram na presença contínua de Al não manifestaram nenhum sinal anormal no desenvolvimento da parte aérea. A taxa de crescimento dessas plantas foi 64% superior ao tratamento com privação do metal (Fig. 3c, d).

Aos 20 DAI, a coloração das raízes com hematoxilina apresentou reação positiva (cor azul/arroxeadas) para a presença do Al apenas no tratamento com fornecimento do metal. Aos 57 DAI, a reação positiva foi observada nas raízes de

todas as plantas tratadas com Al nos últimos 37 DAI (Fig. 4a). As plantas tratadas com Al por todo período experimental e aquelas tratadas com Al aos 20 DAI apresentaram concentrações de Al nas raízes superiores ao tratamento sem adição de Al (Fig. 4b). No caule, o tratamento com adição do metal aos 20 DAI apresentou maior concentração de Al em relação ao tratamento 0 Al (Fig. 4c). A adição perene de Al resultou em maior concentração de Al nas folhas comparado ao tratamento com restrição constante do metal na solução nutritiva (Fig. 4d).

O TF das plantas cultivadas na ausência do metal (0,35) sinalizou que a reserva de Al oriunda do ambiente de coleta, se manteve nas raízes (TF<1). Nos demais tratamentos, o Al foi acumulado na parte aérea (TF >1). A maior translocação para a parte aérea ocorreu no tratamento com suplementação de Al aos 20 DAI (TF = 3,51), enquanto o TF dos tratamentos 750 e 750 → 0 µM Al foram iguais a 1,19 e 1,57, respectivamente.

3.2 O estado nutricional dos órgãos vegetativos de *Borreria latifolia* varia em relação à presença ou ausência de Al

Não houve diferenças para a concentração de nitrogênio (N) no caule. Por outro lado, a adição de Al após os 20 DAI favoreceu os níveis de N foliar (Fig. 5a, b). A concentração de fósforo (P) nas raízes não apresentou diferenças. No caule, a adição de Al após privação desse metal, elevou a concentração de P em relação ao tratamento com presença contínua de Al. Enquanto nas folhas, a omissão de Al na solução nutritiva beneficiou os níveis de P (Fig. 5c, d, e). A ausência constante de Al potencializou as concentrações do K nas raízes, o qual não apresentou diferenças nos demais órgãos (Fig. 5f, g, h).

A presença constante de Al na solução nutritiva aumentou a concentração de cálcio (Ca) nas raízes. Todavia, no caule, o Ca foi favorecido pela ausência do metal. Nas folhas, a ausência de Al durante todo o experimento e a restrição nos últimos 37 DAI elevou os níveis de Ca em relação ao tratamento com privação seguida de adição de Al (Fig. 5i, j, k). O magnésio (Mg) não apresentou diferenças nas raízes. No entanto, no caule e nas folhas os tratamentos com privação de Al maximizaram a concentração de Mg comparados ao fornecimento contínuo do metal (Fig. 5l, m, n). A concentração de enxofre (S) em todos os órgãos vegetativos foi maior nos tratamentos em que houve restrição (raízes e caule) ou ausência (folhas) de Al (Fig. 5o, p, q).

O cobre (Cu) não apresentou diferenças nas raízes. No caule e nas folhas a restrição do Al elevou a concentração de Cu (6a, b, c). Não houve diferenças significativas para o ferro (Fe) (Fig. 6d, e, f). Zinco (Zn) (Fig. 6g, h, i) e manganês (Mn) (Fig. 6j, k, l) apresentaram maiores concentrações na restrição (raízes e caule) e ausência (folhas) de Al, enquanto as maiores concentrações de boro (B) ocorreram apenas na ausência de Al, tanto nas raízes quanto nas folhas.

3.3 O alumínio é essencial para a integridade e o funcionamento do meristema apical caulinar

Ápices caulinares saudáveis foram observados nas plantas cultivadas continuamente na presença de Al (750 μ M) (Fig. 7a). Nenhum sinal de alteração nas divisões anticlinais e periclinais e na diferenciação dos tecidos foram observadas na estrutura interna (Fig. 7b). Na medula caulinar, grande concentração de cristais de oxalato de cálcio do tipo drusa foi constatada (Fig. 7b). Estípulas e primórdios foliares diferenciados, sem nenhuma deformação foram detectados (Fig. 7b). O promeristema estava facilmente distinguível e as células apresentaram citoplasma denso e núcleos bem evidentes (Fig. 7c). Não houve reação positiva para a presença de compostos fenólicos. O Al foi evidenciado por todo o ápice caulinar, isto é, núcleos (Fig. 7c1) e parede celular de todas as células meristemáticas e tecidos diferenciados (Fig. 7c). Os coléteres apresentaram-se diferenciados, com gotas de secreção evidentes. Além disso, houve acúmulo de mucilagem e Al no vacúolo das células secretoras (Fig. 7c2). Por fim, ráfides foram observadas no eixo parenquimático da estrutura.

Com a restrição de Al na solução nutritiva (750 $\rightarrow$ 0 μ M), os ápices caulinares das plantas apresentaram danos morfoanatômicos (Fig. 7d). Houve necrose de todo o meristema apical. Não foi possível distinguir o promeristema de outros tecidos (Fig. 7e). Um padrão de divisão anormal e consequente formação de tecidos deformados foram claramente perceptíveis (Fig. 7e - círculo com tracejado vermelho). As estípulas e primórdios foliares não apresentaram formato regular, resultado da ausência do Al durante a formação dessas estruturas (Fig. 7e). A reação foi positiva para Al nos núcleos (Fig. 7f), o que, provavelmente, é um resquício do Al acumulado nas fases iniciais do experimento, remobilizado para as regiões formadas após a retirada do elemento. Não foram observadas drusas na medula caulinar, como ocorreu em 750

1520 μM de Al. A maior parte dos coléteres colapsou e os que persistiram se encontravam
1521 em fase de senescência.

1522 Nas plantas cultivadas sem Al ($0 \mu\text{M}$), as alterações morfológicas dos ápices
1523 caulinares foram expressivas. A região meristemática e as folhas jovens ficaram
1524 totalmente necrosadas (Fig. 7g). Na ausência de Al não foi possível distinguir as
1525 camadas das células meristemáticas do ápice, tampouco observar algum sinal de
1526 divisão celular regular (Fig. 7h). Assim como em $750 \rightarrow 0 \mu\text{M}$ Al, as drusas estavam
1527 pouco presentes na medula caular e, em algumas vezes, ausentes. As estípulas que
1528 protegem a região estavam totalmente deterioradas (Fig. 7h). Os coléteres, em sua
1529 maioria, apresentaram alterações estruturais, como colapso das células secretoras e
1530 do eixo parenquimático (Fig. 7i). O teste de polissacarídeos apresentou reação
1531 negativa. O Al não foi detectado em nenhuma região do ápice caular, nem sequer
1532 nos núcleos celulares. O teste histoquímico para detecção de compostos fenólicos
1533 apresentou reação positiva nas regiões necrosadas (Fig. 7j).

1534 Em contrapartida, após a suplementação de Al na solução nutritiva ($0 \rightarrow 750$
1535 μM), novos ramos foram originados sem nenhum sinal de morte na região apical (Fig.
1536 7k). A anatomia revelou uma região meristemática saudável (Fig. 7l). As camadas da
1537 túnica e do corpo apresentaram-se íntegras e as divisões anticlinais e periclinais
1538 ocorreram normalmente (Fig. 7m). As estruturas que protegem o ápice caular
1539 (estípulas, primórdios foliares e coléteres) foram formadas sem qualquer deformação
1540 estrutural (Fig. 7l). A reação para compostos fenólicos foi negativa para toda a região
1541 do meristema apical. O Al foi detectado nos núcleos de todas as células, com destaque
1542 para as células do promeristema (Fig. 7m). Os tecidos meristemáticos já diferenciados
1543 e os tecidos maduros também foram sítios de acúmulo do elemento. Os coléteres,
1544 totalmente íntegros e em plena atividade secretora, apresentaram reação positiva
1545 para Al nos núcleos e no vacúolo das células secretoras (Fig. 7n), sendo essa última
1546 organela região de acúmulo de mucilagem. No eixo parenquimático da estrutura foram
1547 identificados idioblastos contendo cristais de oxalato de cálcio, do tipo ráfide,
1548 envolvidos por uma matriz mucilagínosa (Fig. 7n1) e aluminosa (Fig. 7n2), conforme
1549 verificado pelo teste com vermelho de rutênio e Chrome Azurol'S, respectivamente.

1551 **3.4 O alumínio potencializa as trocas gasosas e o estado hídrico de *Borreria***

1552 ***latifolia***

O desempenho fotossintético das plantas de *B. latifolia* foi afetado pela depleção de Al (Fig. 8). Aos 20 DAI, a taxa fotossintética reduziu 36% entre os tratamentos 750 e 0 μM Al. Essa redução permaneceu após os 21, 28 e 57 DAI (Fig. 8a, b, c, d). Por outro lado, nos intervalos de um dia (21 DAI) e uma semana (28 DAI) após a privação do metal (750 $\rightarrow$ 0 μM), a diferença reduziu para 6 e 27%, respectivamente. Aos 57 DAI, a redução chegou a 44%. Adicionalmente, a adição de Al (0 $\rightarrow$ 750 μM) promoveu acréscimos de 7, 24 e 37% em relação a ausência do metal nas avaliações aos 21, 28 e 57 DAI, respectivamente.

Após uma semana da depleção de Al (28 DAI), a condutância estomática (g_s) dessas plantas (750 $\rightarrow$ 0 μM) foi cerca de duas vezes menor comparado ao tratamento com adição do metal (0 $\rightarrow$ 750 μM). O mesmo efeito foi observado na última avaliação das trocas gasosas (Fig. 8h). A concentração interna de CO_2 (C_i) não variou entre os tratamentos em nenhum período avaliado (Fig. 8i, j, k, l). Na ausência de Al (0 μM), a ETR foi inferior a todos os demais tratamentos em todos os períodos avaliados (Fig. 8m, n, o, p). Entretanto, adicionar Al à solução nutritiva (0 $\rightarrow$ 750 μM) elevou a ETR em 65% em apenas um dia após o fornecimento do metal (Fig. 8n).

A transpiração (E), eficiência no uso da água (WUE) e o conteúdo relativo de água (RWC) nas folhas de *B. latifolia* também foram afetados negativamente pela ausência de Al (Fig. 9). Em todos os períodos avaliados, os tratamentos que receberam alguma adição de Al apresentaram E maior que as plantas cultivadas na ausência de Al (Fig. 9a, b, c, d). A maior diferença ocorreu aos 20 DAI, com 35% de redução comparado à 750 μM Al (Fig. 9a). A WUE foi menor na ausência de Al apenas nos dois primeiros períodos avaliados (Fig. 9e, f, g, h).

O RWC foi menor nos tratamentos 0 μM Al e 0 $\rightarrow$ 750 μM Al em comparação com 750 μM Al (Fig. 9i). O RWC das plantas que receberam Al constantemente foi igual a 99,55%, valor superior aos tratamentos com privação do metal inicialmente, cujos valores foram de 95,35% e 97,14%, respectivamente. As plantas tratadas com Al inicialmente com subsequente suspensão do fornecimento do metal apresentaram RWC igual a 95,88%, não se diferenciando dos demais tratamentos (Fig. 9i).

3.5 O alumínio mitiga o estresse oxidativo e promove ativação das principais enzimas antioxidantes

No sistema radicular, as plantas tratadas continuamente com o Al apresentaram níveis de MDA 50 e 62% menores que os tratamentos $0 \rightarrow 750$ e $750 \rightarrow 0$ μM Al, respectivamente (Fig. 10a). Nas folhas, a concentração de MDA no tratamento 750 μM Al foi 20% menor que no tratamento $0 \rightarrow 750$ μM Al (Fig. 10b). Em todos os tratamentos, o MDA foi menor nas folhas do que nas raízes (Fig. 10a, b).

Por outro lado, a concentração de H_2O_2 foi maior nas folhas, enquanto nas raízes não houve diferenças entre os tratamentos (Fig. 10c, d). Nas folhas, a concentração de H_2O_2 foi maior nos tratamentos em que houve variação de Al (acréscimo ou omissão) em comparação com os tratamentos contínuos (0 e 750 μM) (Fig. 10c, d).

Nas raízes, a adição de Al ($0 \rightarrow 750$ μM) aumentou a concentração do radical ânion superóxido (Fig. 10e). Nas folhas, a concentração do radical ânion superóxido no tratamento contínuo com Al foi 80% menor em comparação com a ausência contínua de Al (Fig. 10f). Em relação à diferença entre órgãos, os maiores níveis de radical ânion superóxido ocorreram nas raízes.

Ao contrário da CAT, as atividades da SOD, POX e APX foram maiores nas raízes do que nas folhas em todos os tratamentos (Fig. 10g-n). O acréscimo ou omissão de Al na solução nutritiva diminuiu em 60% a atividade da SOD nas raízes em relação ao tratamento 750 μM Al (Fig. 10g). Para a CAT, nas raízes e folhas, tanto o tratamento contínuo com Al quanto $0 \rightarrow 750$ μM Al desencadearam aumentos na atividade da CAT (Fig. 10i, j).

A atividade da POX também aumentou 35% nas raízes quando o Al passou a ser adicionado à solução nutritiva, entretanto, não houve diferenças nas folhas (Fig. 10k, l). Para a atividade da APX nas raízes, o tratamento 750 μM Al foi superior 54 e 34 % em relação aos tratamentos 0 e $750 \rightarrow 0$ μM Al, respectivamente. Nas folhas, a atividade da APX aumentou cerca de quatro vezes com a adição de Al ($0 \rightarrow 750$ μM) e reduziu 82% quando o metal não foi mais fornecido ($750 \rightarrow 0$ μM) (Fig. 10m, n).

3.6 Ausência ou presença de Al modula o metabolismo em *Borreria latifolia*

Apesar da manifestação de clorose seguida de necrose no ápice foliar, e manchas cloróticas no limbo de algumas folhas nos tratamentos 0 e $750 \rightarrow 0$ μM Al, não houve diferenças nas concentrações dos pigmentos foliares entre os tratamentos (Fig. S1a, b, c, d, e, f).

Na ausência de Al, a concentração de prolina nas raízes foi maior que nas folhas (Fig. 11 a, b). O acréscimo do metal ($0 \rightarrow 750 \mu\text{M}$) reduziu em 56% a concentração desse aminoácido nas raízes (Fig. 11a). Independentemente do órgão e do tratamento, não houve diferenças para o total de aminoácidos (Fig. 11c, d). A concentração de proteínas foi maior nas folhas do que na raiz, mas não houve diferenças entre tratamentos (Fig. 11e, f).

Não houve diferenças para as médias das concentrações de malato e fumarato (Fig. 11g, h, i, j), contudo as concentrações de fumarato foram maiores nas raízes (Fig. 11i, j). A concentração dos fenóis não foi alterada nas raízes (Fig. 11k). Contudo nas folhas, a adição de Al ($0 \rightarrow 750 \mu\text{M}$) aumentou em 1,5 vezes a concentração de compostos fenólicos (Fig. 11l). No tratamento sem Al, os fenóis foram maiores nas raízes do que nas folhas (Fig. 11k, l).

A concentração de glicose foi maior nas raízes do que nas folhas, porém não houve diferenças entre os tratamentos (Fig. 11m, n). A concentração de frutose não apresentou diferenças (Fig. 11o, p). A omissão de Al ($750 \rightarrow 0 \mu\text{M}$) reduziu a concentração de sacarose tanto nas raízes (50%) quanto nas folhas (43%). Além disso, na ausência do metal, a concentração de sacarose foi maior nas raízes do que nas folhas (Fig. 11q, r). Por outro lado, a concentração de amido foi maior nas folhas do que nas raízes em todos os tratamentos, com exceção de $750 \mu\text{M}$ Al, no qual não houve diferença entre os órgãos (Fig. 11s, t). Nas raízes, a concentração de amido no tratamento $750 \rightarrow 0 \mu\text{M}$ foi cerca de duas vezes maior em relação ao tratamento $0 \rightarrow 750 \mu\text{M}$ Al. Nas folhas, a concentração de amido na ausência de Al foi duas vezes maior que o tratamento contínuo com o Al.

3.7 Ausência de alumínio altera o nível de ploidia e induz alteração no índice de endociclos entre raiz e folhas

Borreria latifolia possui valor 2C médio de $1,323 \pm 0,073$ pg, equivalente a $1\text{C} = 0,6615$ pg e 646,947 Mbp. O nível de ploidia de DNA 2C predominou tanto no meristema apical radicular quanto nas folhas jovens, seguido pelo 4C, e núcleos na fase S entre 2C e 4C ($\text{S}_{2\text{C}-4\text{C}}$). Núcleos 2C, $\text{S}_{2\text{C}-4\text{C}}$ e 4C ocorrem em todos os tratamentos nos dois órgãos. Núcleos nas fases S entre 4C e 8C ($\text{S}_{4\text{C}-8\text{C}}$) e núcleos

8C foram evidenciados apenas nos tratamentos com privação constante de Al ou restrição a partir de 20 DAI, tanto na parte radicular quanto na foliar (Fig. 12a, b).

Em todos os tratamentos em que houve adição de Al, seja no início do experimento ou aos 20 DAI, os índices de endociclos da raiz foram superiores aos foliares (Fig. 12c, d).

3.8 O alumínio é requerido na regulação positiva de vias metabólicas essenciais para o crescimento e desenvolvimento de *Borreria latifolia*

A análise do perfil proteômico de *Borreria latifolia* indicou um total de 754 proteínas identificadas na raiz e 636 nas folhas. Na raiz, o contraste entre ausência e presença contínua de Al (0 μ M/750 μ M) resultou em 262 proteínas diferencialmente abundantes (DAPs), entre a restrição de Al e a presença constante do metal (750 $\rightarrow$ 0 μ M/750 μ M) foram identificadas 75 DAPs e na comparação entre adição do metal pela presença constante (0 $\rightarrow$ 750/750 μ M) foram identificadas 55 DAPs. Os três grupos comparados compartilharam 20 proteínas em comum. Entre 0 μ M/750 μ M Al houve 197 DAPs não compartilhadas com os demais grupos, enquanto entre 0 $\rightarrow$ 750 μ M/750 μ M Al apenas 12 DAPs e, entre 750 $\rightarrow$ 0/750 μ M Al foram 23 DAPs não compartilhadas (Fig. 13a).

Nas folhas, um total de 96 DAPs foram obtidas a partir da comparação entre 0 μ M/750 μ M Al; 76 entre 0 $\rightarrow$ 750 μ M/750 μ M Al e 112 entre 750 $\rightarrow$ 0 μ M/750 μ M Al. Dessas DAPs, 18 foram compartilhadas entre os três grupos. Enquanto 40, 32 e 44 DAPs estavam presentes apenas nas condições 0; 0 $\rightarrow$ 750 e 750 $\rightarrow$ 0 μ M Al respectivamente, comparadas à 750 μ M Al (Fig. 13b).

A análise de agrupamento hierárquico permitiu a separação das amostras de cada grupo com base na similaridade nos padrões de expressão (Fig. S2). Na comparação 0 μ M/750 μ M Al, 55% das DAPs foram down-acumuladas, 19% up-acumuladas, 23% foram consideradas únicas no tratamento com presença contínua de Al, e apenas 2% das DAPs da raiz foram acumuladas exclusivamente em 0 μ M Al. Os tratamentos com adição (0 $\rightarrow$ 750 μ M) e restrição de Al aos 20 dias (750 $\rightarrow$ 0 μ M) apresentaram maior número de proteínas down-acumuladas do que up-acumuladas em relação à regulação das proteínas radiculares do tratamento com suplementação contínua com Al.

Dentre as DAPs detectadas nas folhas, na comparação 0 μ M/750 μ M Al, 38% proteínas foram down-acumuladas, 53% up-acumuladas, 7% únicas do tratamento 750 μ M Al e 5% exclusivas do tratamento 0 μ M Al. Nos tratamentos 0 $\rightarrow$ 750 e 750 $\rightarrow$ 0 μ M Al foi evidenciado maior número de proteínas up-acumuladas do que down-acumuladas.

Na análise funcional de enriquecimento de ontologia gênica (GO) das DAPs identificadas nas raízes, os processos biológicos mais enriquecidos (Fold Enrichment > 20) na comparação 0 μ M/750 μ M Al foram processos de metabolismo energético (Fig. S3a). Na condição 0 $\rightarrow$ 750 μ M Al, além do metabolismo energético houve enriquecimento de proteínas importantes no transporte vesicular (Fig. S3c). No tratamento 750 $\rightarrow$ 0 μ M Al, foram enriquecidos processos relacionados à síntese e reparo de proteínas (Fig. S3e).

Para as DAPs identificadas nas folhas, os termos mais enriquecidos (Fold Enrichment > 8) foram processos metabólicos do malato e organização plastidial na condição 0 μ M Al (Fig. S3b); processos envolvidos na quebra e detoxificação do metilglioal na condição 0 $\rightarrow$ 750 μ M Al (Fig. S3d), processos biossintéticos (amido, peptídeos) e tradução de proteínas para a condição 750 $\rightarrow$ 0 μ M Al (Fig. S3f).

A análise de enriquecimento de vias KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) revelou 15 vias significativas no sistema radicular. Na condição 0 μ M Al o maior número de proteínas ativadas ocorreu na biossíntese de metabólitos secundários e o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA ou ciclo de Krebs) foi o mais enriquecido, considerando-se um Fold Enrichment >20 (Fig. 14a). Na comparação 0 $\rightarrow$ 750 μ M/750 μ M Al, a biossíntese de metabólitos secundários manteve elevado número de proteínas, e outras vias também foram enriquecidas: glicólise, via das pentoses fosfatadas, biossíntese de nucleotídeos, metabolismo de frutose e manose, ácido alfa-linolênico e endocitose (Fig. 14c). Na condição 750 $\rightarrow$ 0 μ M Al, houve maior enriquecimento para as vias metabólicas da histidina e dos glicerolipídios (Fig. 14e).

Nas folhas, ao comparar a ausência com a presença de Al, as vias mais enriquecidas (Fold Enrichment > 20) foram: metabolismo de piruvato, nitrogênio, dicarboxilato e glioxilato, galactose, TCA, fixação de CO₂ e biossíntese de RNA (Fig. 14b). As plantas que receberam o tratamento 0 $\rightarrow$ 750 μ M Al apresentaram enriquecimento das vias de metabolismo do piruvato, glioxilato, dicarboxilato e fixação de CO₂ (Fig. 14d). A restrição do Al a partir dos 20 dias, resultou em enriquecimento

nas vias de metabolismo do enxofre, compostos de selênio e ácido cianoamino (Fig. 14f).

Nas raízes, um total de seis proteínas foram acumuladas exclusivamente no tratamento com presença constante de Al nas três condições de comparação (Tabela 1). Enquanto nas folhas, quatro proteínas únicas foram encontradas no tratamento 750 μ M Al. Algumas dessas proteínas ainda não foram anotadas, no entanto, suas funções já são conhecidas (Tabela 1).

A partir da rede de interação proteína-proteína das DAPs identificadas nas raízes durante a ausência de Al ao longo do desenvolvimento de *B. latifolia*, foi possível observar predominância de grupos de interação entre proteínas que apresentaram redução do seu acúmulo quando privadas da disponibilidade de Al no meio de cultivo (Fig. 15). A partir das conexões densamente observadas, foram selecionadas proteínas enriquecidas nas vias KEGG de funções de biossíntese de metabólitos secundários; ribossomos; ciclo do ácido cítrico e biossíntese de aminoácidos.

A análise de topologia de rede permitiu identificar proteínas centrais (*hubs*) que apresentaram alto grau de conexão (grau > 26), das quais destacam-se: succinato desidrogenase [subunidades de ferro-enxofre e de flavoproteína; (A0AAV1DWR2, A0AAV1DS77)], citrato sintase (A0AAV1D8D4, A0AAV1C2S8) e piruvato quinase (A0AAV1CPL3) (Fig. 16a). A análise de coeficiente de agrupamento (CC) revelou altos valores (CC = 1) para proteínas pertencentes às vias de biossíntese de aminoácidos e TCA, com destaque para proteínas ribossomais formando um complexo proteico coeso. Além disso, proteínas do TCA com elevado grau apresentaram CC mediano (0,41 – 0,31), reforçando seu papel como proteínas essenciais para o processo biológico (Fig. 16b).

3.9 Análise Multivariada de Componentes Principais

A análise de componentes principais mostrou que os dois primeiros componentes explicaram 65,2% da variabilidade dos dados relacionados às raízes (PC1: 47,9% e PC2: 17,3%) e 66,5% da variação dos dados foliares (PC1: 54,4% e PC2: 12,1%). A distribuição das elipses no espaço multivariado dos dois órgãos analisados, evidenciou uma distinção entre pares dos tratamentos 0 e 750 $\rightarrow$ 0 μ M Al

em relação a 0→750 e 750 μ M Al. Contudo, houve sobreposição dos pares das elipses representativas dos tratamentos 0 e 750 → 0 μ M Al; e entre 0 → 750 e 750 μ M Al, indicando que esses tratamentos não diferem entre si (Fig. 17a, b).

Considerando-se o sistema radicular, as variáveis que mais contribuíram para a distinção entre os tratamentos no eixo PC1 foram: RGR, concentração de Al, atividade da CAT, prolina, concentração de Ca, K, B, Mn, S, Zn. Em contrapartida, as variáveis de maior peso no eixo PC2 foram: MDA, SOD, $O_2^{\cdot-}$, sacarose e índice de endociclos. (Fig. 17a).

Para as análises foliares, as variáveis mais importantes no eixo PC1, foram as concentrações de Mg, Al, APX e $O_2^{\cdot-}$. Por outro lado, as variáveis que mais contribuíram para o eixo PC2 foram: ETR, g_s e E (Fig. 20b).

4 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstram que o Al atende a todos os critérios de essencialidade (Arnon and Stout, 1939) para *Borreria latifolia*. Na ausência do metal, a planta foi incapaz de completar seu ciclo de vida, o crescimento e o metabolismo foram comprometidos, embora todos os elementos tradicionalmente considerados essenciais tenham sido fornecidos. Todavia, quando o Al foi reintroduzido na solução nutritiva, os meristemas apicais foram ativados. Consequentemente a planta retomou seu vigor fisiológico ao emitir novas raízes e brotações, evidenciando o papel insubstituível desse elemento. Além disso, de forma inédita, demonstramos que a presença contínua de Al é necessária para o acúmulo de proteínas exclusivas e de proteínas associadas às vias metabólicas essenciais à produção de energia na planta.

4.1 *Borreria latifolia* não completa seu ciclo de vida na ausência de alumínio

A relevância do Al para *B. latifolia* é fenotipicamente evidente, corroborada quantitativamente pelas taxas de crescimento e qualitativamente pela anatomia dos meristemas apicais caulinares. O acúmulo do metal nas plantas tratadas com Al nos últimos 37 DAI foi maior que 10 g kg^{-1} de massa seca tanto na raiz quanto na parte aérea, o que confirma a característica hiperacumuladora da espécie (Metali et al., 2012). Constatamos que na ausência de Al, a raiz é o órgão que possui maior exigência do metal, visto que, nessas condições, 78% do Al ficou retido no sistema radicular. Por outro lado, nos demais tratamentos, nos quais o Al foi adicionado em algum momento, as raízes apresentaram valores pouco maiores que as folhas, enquanto no caule o acúmulo de Al foi substancialmente inferior aos demais órgãos. Ao comparar as raízes com a parte aérea (caule + folhas), só na ausência de Al que o acúmulo do metal é maior nas raízes. Além disso, nos tratamentos com algum fornecimento de Al, os valores do TF indicam que *B. latifolia* apresenta eficiência na absorção do Al e redistribuição para os demais órgãos vegetativos.

Nossos dados revelam consistência entre a depleção de Al e a morte do ápice caulinar, culminando em crescimento atrofiado das plantas. Na maioria das espécies da família Rubiaceae, o meristema apical caulinar é protegido pelos coléteres, estruturas secretoras multicelulares desenvolvidas a partir da protoderme e do

meristema fundamental (Paiva Pinheiro et al., 2019). Durante o crescimento ativo, as substâncias secretadas cobrem os tecidos meristemáticos e primórdios foliares, formando um escudo higroscópico, que protege o ápice caulinar de patógenos, dessecação e luminosidade intensa (Dourado et al., 2022; Pereira et al., 2025). Na ausência de Al, os coléteres colapsaram, enquanto na presença do metal, apresentaram plena atividade secretora. Dessa forma, o Al está conectado à proteção química e física das gemas, uma estratégia importante para sustentar o crescimento das plantas nas condições edafoclimáticas restritivas do Cerrado (Gonçalves et al., 2024).

A detecção de Al no núcleo das células meristemáticas confirma seu papel crítico na manutenção da integridade do meristema apical caulinar. Essa evidência é corroborada pela ausência de deformidades morfoanatômicas e no desenvolvimento de plantas tratadas com 750 μM Al. Por outro lado, a ausência de Al nuclear coincidiu com a irregularidade no padrão de divisão das células meristemáticas do ápice caulinar. A depleção de Al em *C. sinensis* resultou em redução da atividade meristemática da raiz devido a maior incidência de quebras de DNA nuclear. Desta forma, foi sugerido que o papel do Al no reparo do DNA esteja relacionado à possível interação eletroestática entre o cátion metálico com os grupos fosfato carregados negativamente, conferindo mais estrutura e estabilidade à espinha dorsal do fosfodiéster (Sun et al., 2020).

As células-tronco presentes no meristema apical do caule fornecem as condições necessárias para a divisão celular que sustenta a atividade meristemática e impulsiona o crescimento (Kean-Galeno et al., 2024). Além disso, na zona periférica, nas laterais do meristema, está localizada a área de geração de novos primórdios de órgãos, inclusive o meristema floral, o qual forma os órgãos reprodutivos (Demesa-Arevalo et al., 2024). A ausência de Al leva à morte dos meristemas apicais caulinares, impedindo *B. latifolia* de completar o seu ciclo vegetativo e, conseqüentemente, alcançar a fase reprodutiva. A incapacidade de concluir esses estágios de desenvolvimento, atende ao primeiro critério de essencialidade de elementos minerais.

4.2 O alumínio é insubstituível no crescimento e desenvolvimento de *Borreria latifolia*

Borreria latifolia é uma espécie adaptada a solos ácidos, de baixa fertilidade e disponibilidade limitada de nutrientes (Camargo et al., 2024). Embora tolere bem essas condições adversas, nossos dados sugerem que há uma dependência do Al para o seu desenvolvimento. As deficiências nutricionais impactam negativamente na conversão de energia luminosa em energia química (Lu et al., 2025). No entanto, apesar da maior concentração de alguns macro e micronutrientes, principalmente nas folhas de plantas cultivadas sem Al, o desempenho fotossintético foi inferior ao tratamento 750 μ M Al. Não houve diferenças para g_s , WUE e C_i entre a ausência e presença de Al aos 57 DAI. No entanto, em 0 μ M Al houve redução significativa dos parâmetros A_n , ETR e E ; possivelmente, a ausência do metal desencadeia alguma limitação bioquímica na fixação do CO₂. As espécies acumuladoras de Al, nativas do Cerrado, *Qualea grandiflora* Mart. (Silva et al., 2023) e *Vochysia tucanorum* Mart. (Bressan et al., 2021b) apresentaram redução do desempenho fotoquímico na ausência de Al. Por outro lado, a adição do metal resultou em ganhos na assimilação de CO₂ e melhor estado hídrico, assim como ocorreu com *B. latifolia*.

O conteúdo de sacarose tanto na folha quanto na raiz diminuiu com a restrição de Al na solução nutritiva (750 $\rightarrow$ 0 μ M). A fotossíntese é o processo fisiológico mais importante para a produção de biomassa vegetal. Inibições nas taxas fotossintéticas reduzem a concentração de sacarose, produto final da incorporação de CO₂ (Lu et al., 2025). A regulação do metabolismo de sacarose e amido é uma das respostas aclimatativas das plantas a condições ambientais adversas (Kausar et al., 2022; Li et al., 2023; Zhang et al., 2025). Adicionalmente, a concentração de sacarose na ausência de Al foi maior na raiz do que nas folhas. Enquanto lida com uma produção de energia comprometida, a planta exporta sacarose, suprimindo a demanda metabólica de drenos prioritários, como as raízes. O transporte de sacarose evita que seu acúmulo nas folhas decline ainda mais a eficiência fotossintética (Wang et al., 2022). Nossos resultados sugerem que a redução do conteúdo de sacarose e a repartição de carbono em *B. latifolia* sob privação de Al, revelam um padrão típico de estresse. Em contraste, em plantas cultivadas, como o milho-pipoca, o aumento na concentração de sacarose e a degradação do amido foram associados à tolerância ao metal (Pinto et al., 2021).

O acúmulo significativo de prolina nas raízes de *B. latifolia* na ausência de Al, não apenas sugere o estado de estresse metabólico, mas também evidencia que esta espécie possui alta capacidade intrínseca de produzir respostas aclimatativas. Assim,

ativa mecanismos de proteção para mitigar os danos causados pela deficiência deste metal. Achados comparáveis foram observados em *Camellia japonica*, espécie ornamental lenhosa acumuladora de Al (Liu et al., 2020). Na ausência de Al, a concentração de prolina foi quase três vezes maior que no tratamento com 1 mM de Al. A prolina é um aminoácido multifuncional acumulado em plantas sob diferentes estresses ambientais (Alvarez et al., 2022 ; Yusuf et al., 2025). Para ajustar o metabolismo de plantas em condições de estresse, a prolina protege as estruturas celulares, aumentando a integridade da parede e membrana celular, além de estimular a atividade de enzimas relacionadas à detoxificação de ROS (Semida et al., 2020; Ullah et al., 2024).

A depleção de Al elevou os níveis de MDA nas raízes de *B. latifolia*, indicando intensa peroxidação lipídica. De forma consistente, na ausência de Al, *Camellia japonica* também apresentou maiores valores de MDA nas raízes (Liu et al., 2020). No entanto, a presença de Al aumentou a atividade da SOD, exibindo eficiência contra o estresse oxidativo. Esses dados comprovam que a presença do Al confere robustez ao sistema antioxidante. A homeostase redox é obtida através do equilíbrio entre a formação de ROS e sua eliminação através da atividade de enzimas antioxidantes (Alam et al., 2022; Jia et al., 2025).

Sob concentrações estatisticamente iguais de H_2O_2 , as atividades das peroxidases CAT e APX nas raízes, foram superiores no tratamento 750 μM em relação à 0 μM Al. Nas folhas a adição de Al (0 $\rightarrow$ 750 μM) regulou positivamente a atividade da APX, enquanto a restrição do metal (750 $\rightarrow$ 0 μM) resultou em uma regulação negativa. O aumento de ROS em células-guarda de algodão reduziu a condutância estomática, afetando as taxas fotossintéticas (Guo et al., 2020). A APX detoxifica H_2O_2 principalmente nas células-guarda estomáticas, protegendo o fotossistema II ao usar ascorbato como doador de elétrons (Maruta and Ishikawa, 2022; Wu et al., 2021). Assim o ciclo ascorbato-glutationa é regulado positivamente e protege os cloroplastos de danos oxidativos (Celi et al., 2023).

A ausência de Al nos últimos 37 DAI aumentou o conteúdo de DNA, considerando que núcleos na fase S_{4C-8C} e 8C foram detectados apenas nos tratamentos 0 e 750 $\rightarrow$ 0 μM Al. O nível de ploidia do DNA é outro indicador de que a depleção de Al é uma condição desfavorável para *B. latifolia*. O valor C em células somáticas vegetais pode variar de 2 a 4 (Kołodziejczyk et al., 2023). Em algumas células, pode ocorrer ciclos repetidos de replicação sem citocinese durante a

diferenciação, resultando em aumento do conteúdo de DNA da célula de 2C para 4C, 8C, 16C, 32C (Bhosale et al., 2019; Carneiro et al., 2021; Tourdot et al., 2023).

Alterações no conjunto de genes podem ser uma tentativa de ativar mecanismos de defesa mais eficientes e garantir a integridade fisiológica principalmente quando ocorrem danos ao DNA (Gentric et al., 2021). Associando os níveis de ploidia do DNA com os resultados de histolocalização de Al, conjecturamos que o aumento no conteúdo de DNA seja devido a possíveis danos ao material genético na ausência de Al. Como uma espécie adaptada ao ambiente do Cerrado, *B. latifolia* deve possuir robustos mecanismos aclimatativos a condições não ideais. Evolutivamente, é importante as plantas aumentarem o genoma e garantir plasticidade celular para adaptar às condições flutuantes do ambiente (Heslop-Harrison et al., 2023; Vukašinović et al., 2025). Mais pesquisas aprofundadas são necessárias para entender os mecanismos moleculares subjacentes e o significado fisiológico da endoreduplicação em *B. latifolia*.

Nossas evidências comprovam que o Al é insubstituível para o crescimento e desenvolvimento de *B. latifolia*. Dessa forma, o segundo critério de essencialidade é satisfeito para esta espécie: nenhum elemento tradicionalmente considerado essencial é capaz de substituir o Al em suas funções fisiológicas, metabólicas, bioquímicas e citogenéticas.

4.3 O alumínio é necessário para a síntese de proteínas únicas e regula positivamente o metabolismo energético de *Borreria latifolia*

Este é o primeiro trabalho a analisar o perfil proteômico de raízes e folhas de *Borreria latifolia*. As proteínas são os principais integrantes da maioria dos processos celulares e metabólicos (Kosová et al., 2018). Este estudo é pioneiro ao demonstrar como a dependência de Al em *B. latifolia* regula o seu proteoma, ativando vias energéticas e induzindo o acúmulo de proteínas exclusivas, além de moldar seus traços morfofisiológicos e citogenéticos.

4.3.1 Proteínas exclusivas induzidas na presença de Al e compartilhadas entre os tratamentos revelam assinatura molecular da essencialidade desse metal

A proteína UDP-arabinopyranose mutase (UAM, A0AAV1DSF3) foi regulada nas raízes apenas na presença constante de Al. Esta enzima catalisa a conversão crucial de UDP-arabinopyranose para UDP-arabinofuranose, substrato essencial para a biossíntese de pectinas e hemiceluloses da parede celular (Ateeq et al., 2025; Jin et al., 2025). Plantas mutantes, com essa proteína silenciada, apresentam raízes com alterações estruturais, impactando negativamente na função e no desenvolvimento desse órgão (Dugard et al., 2016; Konishi et al., 2011). Portanto, nossos resultados indicam que a UAM desempenha um papel fundamental no crescimento e desenvolvimento radicular de *B. latifolia*, em um processo diretamente regulado pela presença de Al.

A proteína RABA1f (A0AAV1BW73) pertence ao grupo das GTPases da subfamília RabA1 associada ao tráfego de membranas. As Rab GTPases podem atuar na formação da placa celular durante a citocinese (Shi et al., 2023), sinalização de ABA (Qin et al., 2021), regulação de aquaporinas (Gómez-Méndez et al., 2023), endo e exocitose (Ito and Uemura, 2022), expansão e direcionamento do crescimento de pelos radiculares (Yang et al., 2020). Outras duas proteínas, não caracterizadas (A0AAV1D057 e A0AAV1ECK9), com função de GTPases e que compõem o sistema de endomembranas e membrana plasmática também foram encontradas nas raízes. Em arroz, o ativador da GTPase RAC/ROP integra estímulos hormonais, ligando a sinalização de auxina e citocininas na formação da arquitetura radicular (Liu et al., 2023).

A 4-hidroxi-4-metil-2-oxoglutarato aldolase (A0AAV1BYA9), também conhecida como HMG/CHA aldolase, cliva o 4-hidroxi-4-metil-2-oxoglutarato (HMG) em duas moléculas de piruvato, ou o 4-carboxi-4-hidroxi-2-oxoadipato (CHA) em piruvato e oxaloacetato (Kim et al., 2020). Esse processo conecta o metabolismo de compostos aromáticos ramificados (via ramificada C5) à produção de metabólitos que alimentam o ciclo de Krebs, gerando ATP, NADH e esqueletos carbônicos que podem ser usados na síntese de nucleotídeos. Além disso, a HMG/CHA aldolase está associada a respostas ao estresse (Cui et al., 2019).

Em *Chenopodium quinoa*, o gene que codifica a HMG/CHA aldolase foi regulado positivamente sob estresse salino, desencadeando maior expressão de

chaperonas e proteínas ribossomais (Ruiz et al., 2019). Em *B. latifolia*, essa mesma enzima (A0AAV1BYA9) foi acumulada em raízes sob suplementação contínua de Al. Além disso, observou-se o acúmulo específico da chaperona mitocondrial CPN60-2 (A0AAV1DJH6), componente do grupo de proteínas que apresentam papel essencial no correto dobramento de proteínas recém-importadas para a mitocôndria (Nagaraju et al., 2021; Singh et al., 2024). Dessa forma, as proteínas atuantes na respiração e outros componentes mitocondriais se mantêm viáveis, contribuindo para o crescimento radicular, absorção de nutrientes e desenvolvimento de *B. latifolia*.

Nas folhas, proteínas contendo o domínio EF-hand (A0AAV1D0M6) atuam principalmente como sensores e transdutores de sinais de Ca^{2+} . Essas proteínas são fundamentais na regulação do movimento estomático como resposta aos estímulos do ambiente (Kundu et al., 2022; Mandal et al., 2022; Upadhyay, 2023). Em *B. latifolia*, hipotetizamos que as proteínas contendo o domínio EF-hand foram fundamentais para a maior abertura estomática observada em 750 μM Al em comparação à redução de g_s ao restringir Al na solução nutritiva (750 $\rightarrow$ 0 μM). Uma maior condutância estomática facilita a entrada de CO_2 na folha, aumentando a disponibilidade desse gás para fotossíntese (Yamori et al., 2020). Desde que não haja outras limitações, isso potencializa a carboxilação no cloroplasto (Sakoda et al., 2021), como observado em *B. latifolia* na presença de Al.

A proteína 48 homóloga do ciclo de divisão celular (CDC48, A0AAV1CME5) é uma ATPase da família AAA+, altamente traduzida em células que estão em divisão e em expansão. Por meio do sistema ubiquitina-proteassoma, a CDC48 é essencial no controle de qualidade e na regulação de proteínas do ciclo celular (Inès et al., 2025). O domínio ATPase AAA+ (A0AAV1CFJ6) compõe uma superfamília de proteínas responsáveis por degradação e remodelagem proteica, tráfego de membranas, importação de proteínas para o estroma do cloroplasto, respostas a estresses e regulação do ciclo celular (Khan et al., 2022; Waters et al., 2024). Em conjunto com outras proteínas envolvidas no ciclo celular, a ativação de CDC48 pode ser crucial para garantir a divisão celular nos ápices caulinares, garantindo o desenvolvimento de *B. latifolia* em ambiente suplementado com Al.

4.3.2 Alumínio ativa proteínas essenciais do metabolismo energético para o desenvolvimento radicular em *Borreria latifolia*

O perfil proteômico de raízes na comparação 0/750 μM Al reforça a essencialidade deste metal na regulação molecular para o desenvolvimento de *Borreria latifolia*. O armazenamento de energia, o crescimento e as respostas da planta ao estresse são sustentados pelos carboidratos produzidos pela fotossíntese. A glicólise e a gliconeogênese são vias catabólicas centrais na produção de energia, biossíntese e adaptação a mudanças do meio. Na glicólise, ocorre degradação de sacarose e de outros carboidratos para gerar ATP, fornecendo piruvato ao ciclo TCA (Zheng et al., 2025). A gliconeogênese por outro lado, sintetiza açúcares a partir de ácidos orgânicos, aminoácidos e lipídeos (Walker et al., 2021). O ciclo TCA é fundamental para o metabolismo vegetal, fornecendo energia e esqueletos de carbono para a biossíntese, regulando o estresse e o desenvolvimento das plantas (Zhang et al., 2023a).

A piruvato quinase (PK, A0AAV1CPL3), enzima chave na última etapa da glicólise (Duan et al., 2025), foi abundante na presença de Al. Conforme as análises de topologia de rede, essa proteína apresentou elevado grau de conexões e coeficiente de agrupamento mediano. Esses resultados indicam a PK como uma das proteínas centrais no metabolismo radicular de *B. latifolia*, sugerindo um aumento na capacidade glicolítica e, conseqüentemente, na produção de energia (ATP) demandada para o maior crescimento constatado na presença de Al.

Além disso a PK conecta vias diversas, evidência do seu papel como enzima regulatória central, provavelmente, relacionada à adaptação da planta a elevadas concentrações do metal. Em *Arabidopsis thaliana*, foram identificadas cinco isoformas citosólicas de PK, cada uma com padrões de expressão específicos de acordo o tecido e estágio de desenvolvimento (Wulfert et al., 2020). A diversidade e conservação evolutiva das isoformas de PK em plantas (Chen et al., 2025) levantam a hipótese que adaptações antigas foram mantidas para permitir flexibilidade metabólica. Assim, a planta modula o fluxo de carboidratos dependendo das necessidades, diante de diferentes desafios ambientais.

Adicionalmente, a análise de topologia de rede mostrou que as proteínas citrato sintase (CS, A0AAV1C2S8) e succinato desidrogenase (SDH, A0AAV1DWR2 e A0AAV1DS77) ativadas na presença contínua de Al, apresentaram altíssimo grau de conexões. Desta forma, CS e SDH são destacadas como proteínas essenciais para a função celular das raízes de *B. latifolia*. A análise de coeficiente de agrupamento, indicou valores intermediários, ressaltando o potencial dessas proteínas na resposta

biológica adaptativa da planta às condições de solo ácido. A maior abundância de CS e SDH aponta para um metabolismo respiratório altamente ativo (Zhang et al., 2023a), constatado pelo crescimento das plantas e pela robustez do sistema antioxidante enzimático. Portanto, na presença de Al, *B. latifolia* possui uma capacidade acentuada de gerar energia (ATP). Dessa forma, a planta é capaz de sustentar processos de crescimento intenso e responder eficazmente a estresses ambientais (Zhang et al., 2023b), regulando a produção de ROS e mantendo o balanço energético.

A forte conexão entre PK, CS e SDH demonstra que essas proteínas centrais desempenham papéis regulatórios importantes na presença de Al. A homeostase celular depende da regulação dessas proteínas (Le and Millar, 2023). Consequentemente, o fluxo metabólico do TCA é crucial para a produção de biomoléculas necessárias na produção de energia e síntese de macromoléculas como polipeptídios, lipídeos e nucleotídeos, essenciais para a sobrevivência da planta

Além do TCA a biossíntese de aminoácidos e metabólitos secundários foram vias responsivas ao Al. As plantas ajustam a biossíntese de aminoácidos como parte de seus mecanismos de defesa (Feduraev et al., 2020). Além da síntese de proteínas, uma vasta gama de metabólitos secundários cruciais para o crescimento e aclimação das plantas são produzidos a partir de aminoácidos aromáticos sintetizados pela via do chiquimato (Zagoskina et al., 2023). Os metabólitos secundários conferem proteção antioxidante aos tecidos vegetais, para que estes desempenhem suas funções fisiológicas mesmo quando a produção de ROS se torna significativa.

As proteínas ribossomais (RPs) ativadas na ausência de Al, apresentaram grau de conexão mediano e altíssimo coeficiente de agrupamento, o que denota um complexo proteico coeso. Possivelmente, essas RPs estão envolvidas na tradução de proteínas para a planta lidar com o estresse pela falta do metal. O acúmulo de RPs é um fator que pode ter contribuído para a maior concentração de prolina em *B. latifolia* no cultivo sem Al. As RPs são agentes multifuncionais, não apenas formando o núcleo estrutural dos ribossomos para a síntese proteica, mas também participando de processos translacionais adicionais, regulando o desenvolvimento durante a aclimação a condições adversas (Cheong et al., 2021; Reiter et al., 2020). Além disso, essas proteínas interagem com fitormônios e regulam a tradução dinâmica de proteínas importantes na modulação das respostas ao estresse (Yu et al., 2020).

2061 Em suma, o perfil proteômico de *B. latifolia* revelou proteínas exclusivas
2062 moduladas pelo Al, essenciais para a biossíntese de parede celular, controle do ciclo
2063 celular, crescimento de pelos radiculares e proteção contra estresses. Além disso, o
2064 Al regulou positivamente o acúmulo de proteínas centrais da glicólise e do ciclo TCA,
2065 envolvidas no metabolismo de carbono das plantas. Consequentemente, o terceiro
2066 critério para essencialidade é satisfeito. O Al participa da nutrição de *B. latifolia* através
2067 da regulação positiva do metabolismo energético e de carboidratos, representado pelo
2068 maior acúmulo de sacarose. As vias de defesa enriquecidas pelo metal, como
2069 biossíntese de metabólitos secundários e da proteína SDH, conferem maior resiliência
2070 endógena às plantas em condições estressantes. Por fim, as proteínas exclusivas
2071 envolvidas no crescimento e desenvolvimento radicular, demonstram o caráter
2072 indispensável do metal.

5 CONCLUSÃO

Este estudo fornece evidências morfoanatômicas, fisiológicas e bioquímicas que comprovam o caráter indispensável do alumínio (Al) para o desenvolvimento de *Borreria latifolia*, uma herbácea do Cerrado brasileiro. Além disso, pela primeira vez apresentamos o perfil proteômico dessa espécie, sustentando a hipótese da essencialidade desse metal para a ativação de vias metabólicas cruciais para o crescimento e desenvolvimento dessa espécie.

Na ausência do Al ocorre a morte dos meristemas apicais caulinares, prejudicando o crescimento vegetal e assim a planta não completa seu ciclo de vida. Nenhum elemento tradicionalmente considerado essencial, presente na solução nutritiva foi capaz de reproduzir o desempenho fotossintético e a robustez antioxidante observada nas plantas cultivadas com Al. Pelo contrário, a ausência de Al desencadeia mecanismos comuns de condições estressantes, como alteração nos níveis de sacarose, formação de ROS, peroxidação lipídica e aumento no conteúdo de DNA.

Todavia, a presença do Al modula a abundância de várias proteínas essenciais para a estrutura e homeostase celular das plantas. Além disso, o Al regula positivamente proteínas envolvidas no metabolismo energético e de carboidratos, através de enzimas chaves do ciclo da glicólise e do TCA, bem como aquelas das vias de biossíntese de aminoácidos e de metabólitos secundários e proteínas ribossomais. O alto grau de conexões nas redes de interação proteína-proteína, reforçam o papel-chave da ativação das enzimas PK, CS e SDH nas raízes de *B. latifolia* na presença de Al. Nossa hipótese é sustentada pelas análises de topologia de rede, na quais, essas proteínas aparecem como proteínas centrais, portanto, são essenciais para a função celular. Adicionalmente, as proteínas PK, CS e SDH apresentaram valores intermediários de agrupamento, indicando funções de sinalização ou aclimatativas.

Por fim, através de abordagens multidisciplinares demonstramos que o Al atende a todos os critérios de essencialidade para *Borreria latifolia*. Esses achados destacam a importância da conservação do Cerrado, cuja biodiversidade engloba espécies vegetais de mecanismos adaptativos únicos.

REFERÊNCIAS

- 2102 Alam, P., Arshad, M., Al-Kheraif, A.A., Azzam, M.A., Al Balawi, T., 2022. Silicon
2103 Nanoparticle-Induced Regulation of Carbohydrate Metabolism, Photosynthesis, and
2104 ROS Homeostasis in *Solanum lycopersicum* Subjected to Salinity Stress. **ACS Omega**
2105 7, 31834–31844. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c02586>
- 2106 Almeida Rodrigues, A., Carvalho Vasconcelos Filho, S., Müller, C., Almeida Rodrigues,
2107 D., de Fátima Sales, J., Zuchi, J., Carlos Costa, A., Lino Rodrigues, C., Alves da Silva,
2108 A., Pereira Barbosa, D., 2019. Tolerance of *Eugenia dysenterica* to Aluminum:
2109 Germination and Plant Growth. **Plants** 8, 317. <https://doi.org/10.3390/plants8090317>
- 2110 Anderson, J.S., Lall, S.P., Anderson, D.M., McNiven, M.A., 1995. Availability of amino
2111 acids from various fish meals fed to Atlantic salmon (*Salmo solar*). **Aquac** 138, 291–
2112 301. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01131-5](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01131-5)
- 2113 Arnon, D.I., Stout, P.R., 1939. The essentiality of certain elements in minute quantity
2114 for plants with special reference to copper. **Plant Physiol.** 14, 371–375.
2115 <https://doi.org/10.1104/pp.14.2.371>
- 2116 Ateeq, M., Zhang, D., Xiao, J., Zhang, H., Shen, X., Meng, J., Yang, J., Alam, S.M.,
2117 Kaleem, M.M., Khan, M.A., Zhu, K., Li, G., Liu, J., 2025. Decoding submergence
2118 tolerance in *Prunus persica*: Integrated transcriptomic and metabolomic acclimations
2119 of antioxidant system, cell wall dynamics, and hormonal signaling. **Hortic. Adv.** 3, 5.
2120 <https://doi.org/10.1007/s44281-024-00058-z>
- 2121 Bhosale, R., Maere, S., De Veylder, L., 2019. Endoreplication as a potential driver of
2122 cell wall modifications. **Curr. Opin. Plant Biol.**, 51, 58–65.
2123 <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.04.003>
- 2124 Box, G.E.P., Cox, D.R., 1964. An Analysis of Transformations. **J. R. Stat. Soc. Ser. B**
2125 **Methodol.** 26, 211–243. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1964.tb00553.x>
- 2126 Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
2127 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72,
2128 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- 2129 Bressan, A.C.G., de Oliveira Carvalho Bittencourt, B.M., Silva, G.S., Habermann, G.,
2130 2021a. Could the absence of aluminum (Al) impair the development of an Al-
2131 accumulating woody species from Brazilian savanna? **Theor. Exp. Plant Physiol.** 33,
2132 281–292. <https://doi.org/10.1007/s40626-021-00216-y>
- 2133 Bressan, A.C.G., de Oliveira Carvalho Bittencourt, B.M., Silva, G.S., Habermann, G.,
2134 2021b. Could the absence of aluminum (Al) impair the development of an Al-
2135 accumulating woody species from Brazilian savanna? **Theor. Exp. Plant Physiol.** 33,
2136 281–292. <https://doi.org/10.1007/s40626-021-00216-y>
- 2137 Camargo, T.A. de, Alves, L.A., Mendes, I.C., Gasques, L.R., Oliveira, L.G.S. de, Pires,
2138 G.C., Almeida, T.O., Carvalho, P.C. de F., Souza, E.D. de, 2024. Enhancing soil quality
2139 and grain yields through fertilization strategies in integrated crop-livestock system

- 2140 under no-till in Brazilian Cerrado. **Eur. J. Soil Biol.** 121, 103613.
2141 <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2024.103613>
- 2142 Carillo, P., Gibon, Y., 2011. Protocol: Extraction and determination of proline. **CSIRO**
2143 **Publishing**, pp. 1–5.
- 2144 Carneiro, A.K., Montessoro, P. da F., Fusaro, A.F., Araújo, B.G., Hemerly, A.S., 2021.
2145 Plant CDKs—Driving the Cell Cycle through Climate Change. **Plants** 10, 1804.
2146 <https://doi.org/10.3390/plants10091804>
- 2147 Castro, L.M.R., Vinson, C.C., da Gordo, S.M.C., Williams, T.C.R., Cury, N.F., de Souza,
2148 M.C., Pereira, L.A.R., 2022. Molecular and physiological aspects of plant responses to
2149 aluminum: what do we know about Cerrado plants? **Braz. J. Bot.** 45, 545–562.
2150 <https://doi.org/10.1007/s40415-021-00781-1>
- 2151 Celi, G.E.A., Gratão, P.L., Lanza, M.G.D.B., Reis, A.R. dos, 2023. Physiological and
2152 biochemical roles of ascorbic acid on mitigation of abiotic stresses in plants. **Plant**
2153 **Physiol. Biochem.** 202, 107970. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.107970>
- 2154 Chance, B., Maehly, A.C., 1955. [136] Assay of catalases and peroxidases:, in:
2155 **Methods in Enzymology**. Academic Press, pp. 764–775.
2156 [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(55\)02300-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(55)02300-8)
- 2157 Chen, G., Chen, S., Peng, Z., Zou, Z., Cheng, B., Wan, X., Zheng, Z., Yang, B., 2025.
2158 Genome-Wide Identification of Peanut Pyruvate Kinase Gene Family and Their
2159 Potential Roles in Seed Germination and Drought Stress Responses. **Horticulturae**
2160 11, 200. <https://doi.org/10.3390/horticulturae11020200>
- 2161 Cheng, L., Liu, H., Zhao, J., Dong, Y., Xu, Q., Yu, Y., 2021. Hormone Orchestrates a
2162 Hierarchical Transcriptional Cascade That Regulates Al-Induced De Novo Root
2163 Regeneration in Tea Nodal Cutting. **J. Agric. Food Chem.** 69, 5858–5870.
2164 <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c01100>
- 2165 Cheong, B.E., Beine-Golovchuk, O., Gorka, M., Ho, W.W.H., Martinez-Seidel, F.,
2166 Firmino, A.A.P., Skirycz, A., Roessner, U., Kopka, J., 2021. Arabidopsis REI-LIKE
2167 proteins activate ribosome biogenesis during cold acclimation. **Sci. Rep.** 11, 2410.
2168 <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81610-z>
- 2169 Clark, R.B., 1975. Characterization of phosphatase of intact maize roots. **J. Agric.**
2170 **Food Chem.** 23, 458–460. <https://doi.org/10.1021/jf60199a002>
- 2171 Cross, J.M., Von Korff, M., Altmann, T., Bartzetko, L., Sulpice, R., Gibon, Y., Palacios,
2172 N., Stitt, M., 2006. Variation of Enzyme Activities and Metabolite Levels in 24
2173 Arabidopsis Accessions Growing in Carbon-Limited Conditions. **Plant Physiol.** 142,
2174 1574–1588. <https://doi.org/10.1104/pp.106.086629>
- 2175 Cui, J., Davanture, M., Zivy, M., Lamade, E., Tcherkez, G., 2019. Metabolic responses
2176 to potassium availability and waterlogging reshape respiration and carbon use
2177 efficiency in oil palm. **New Phytol.** 223, 310–322. <https://doi.org/10.1111/nph.15751>
- 2178 Cury, N.F., e Silva, R.C.C., Fayad, M., Fontes, W., Ricart, C.A.O., Castro, M. de S.,
2179 Silveira, C.E. dos S., Valle de Sousa, M., Pereira, L.A.R., 2019. Proteome Dataset of

- 2180 *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae) by LC–MS/MS Label-Free Identification in
 2181 Response to Aluminum. **PROTEOMICS** 19, 1900148.
 2182 <https://doi.org/10.1002/pmic.201900148>
- 2183 Cury, N.F., Silva, R.C.C., Andre, M.S.F., Fontes, W., Ricart, C.A.O., Castro, M.S.,
 2184 Silveira, C.E.S., Williams, T.C.R., de Sousa, M.V., Pereira, L.A.R., 2020. Root
 2185 proteome and metabolome reveal a high nutritional dependency of aluminium in
 2186 *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae). **Plant Soil** 446, 125–143.
 2187 <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04323-3>
- 2188 Demesa-Arevalo, E., Narasimhan, M., Simon, R., 2024. Intercellular Communication
 2189 in Shoot Meristems. **Annu. Rev. Plant Biol.** 75, 319–344.
 2190 <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-070523-035342>
- 2191 Dikobe, T., Masenya, K., Manganyi, M., 2023. Molecular technologies ending with
 2192 ‘omics’: The driving force toward sustainable plant production and protectio.
 2193 <https://doi.org/10.12688/f1000research.131413.1>
- 2194 Dourado, D.M., Rocha, D.I., Kuster, V.C., Fernandes, V.F., Delgado, M.N., Francino,
 2195 D.M.T., Dalvi, V.C., 2022. Structural similarity versus secretion composition in colleters
 2196 of congeneric species of *Prepusa* (Gentianaceae). **Flora** 294, 152120.
 2197 <https://doi.org/10.1016/j.flora.2022.152120>
- 2198 Duan, X., Xu, Y., Zhang, K., Liu, Z., Yu, Y., 2025. The pyruvate kinase gene family in
 2199 soybean: genome-wide investigation and expression profiling. **Acta Physiol. Plant.**
 2200 47, 43. <https://doi.org/10.1007/s11738-025-03792-7>
- 2201 Dugard, C.K., Mertz, R.A., Rayon, C., Mercadante, D., Hart, C., Benatti, M.R., Olek,
 2202 A.T., SanMiguel, P.J., Cooper, B.R., Reiter, W.-D., McCann, M.C., Carpita, N.C., 2016.
 2203 The Cell Wall Arabinose-Deficient *Arabidopsis thaliana* Mutant murus5 Encodes a
 2204 Defective Allele of REVERSIBLY GLYCOSYLATED POLYPEPTIDE2. **Plant Physiol.**
 2205 171, 1905–1920. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01922>
- 2206 Fan, K., Wang, M., Gao, Y., Ning, Q., Shi, Y., 2019. Transcriptomic and ionic
 2207 analysis provides new insight into the beneficial effect of Al on tea roots’ growth and
 2208 nutrient uptake. **Plant Cell Rep.** 38, 715–729. <https://doi.org/10.1007/s00299-019-02401-5>
 2209
- 2210 Feduraev, P., Skrypnik, L., Riabova, A., Pungin, A., Tokupova, E., Maslennikov, P.,
 2211 Chupakhina, G., 2020. Phenylalanine and Tyrosine as Exogenous Precursors of
 2212 Wheat (*Triticum aestivum* L.) Secondary Metabolism through PAL-Associated
 2213 Pathways. **Plants** 9, 476. <https://doi.org/10.3390/plants9040476>
- 2214 Fernie, A.R., Roscher, A., Ratcliffe, R.G., Kruger, N.J., 2001. Fructose 2,6-
 2215 bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase
 2216 and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells.
 2217 **Planta** 212, 250–263. <https://doi.org/10.1007/s004250000386>
- 2218 Fioresi, V.S., de Cássia Ribeiro Vieira, B., de Campos, J.M.S., da Silva Souza, T.,
 2219 2020. Cytogenotoxic activity of the pesticides imidacloprid and iprodione on *Allium*
 2220 *cepa* root meristem. **Environ. Sci. Pollut. Res.** 27, 28066–28076.
 2221 <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09201-5>

- 2222 Gao, Y., Wang, M., Shi, Yifan, Yang, L., Hu, J., Fan, K., Shi, Yuanzhi, 2022. IAA
2223 Accumulation Promotes the Root Growth of Tea Plants under Aluminum. **Agronomy**
2224 12, 1110. <https://doi.org/10.3390/agronomy12051110>
- 2225 Gay, C., Gebicki, J.M., 2000. A Critical Evaluation of the Effect of Sorbitol on the Ferric–
2226 Xylenol Orange Hydroperoxide Assay. **Anal. Biochem.** 284, 217–220.
2227 <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4696>
- 2228 Gentric, N., Genschik, P., Noir, S., 2021. Connections between the Cell Cycle and the
2229 DNA Damage Response in Plants. **Int. J. Mol. Sci.** 22, 9558.
2230 <https://doi.org/10.3390/ijms22179558>
- 2231 Giannopolitis, C.N., Ries, S.K., 1977. Superoxide Dismutases: I. Occurrence in Higher
2232 Plants. **Plant Physiol.** 59, 309–314. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>
- 2233 Gómez-Méndez, M.F., Amezcua-Romero, J.C., Rosas-Santiago, P., Hernández-
2234 Domínguez, E.E., de Luna-Valdez, L.A., Ruiz-Salas, J.L., Vera-Estrella, R., Pantoja,
2235 O., 2023. Ice plant root plasma membrane aquaporins are regulated by clathrin-coated
2236 vesicles in response to salt stress. **Plant Physiol.** 191, 199–218.
2237 <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac515>
- 2238 Gonçalves, J.R., de Paula-Souza, J., Kuster, V.C., Dalvi, V.C., 2024. Leaf anatomy of
2239 species from the *Pombalia lanata* complex (Violaceae) with implications for taxonomy
2240 and ecology. *Flora* 312, 152471. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2024.152471>
- 2241 Guo, K., Li, Z., Tian, H., Du, X., Liu, Z., Huang, H., Wang, P., Ye, Z., Zhang, X., Tu, L.,
2242 2020. Cytosolic Ascorbate Peroxidases Plays a Critical Role in Photosynthesis by
2243 Modulating Reactive Oxygen Species Level in Stomatal Guard Cell. **Front. Plant Sci.**
2244 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00446>
- 2245 Haridasan, M., 1982. Aluminium accumulation by some cerrado native species of
2246 central Brazil. **Plant Soil** 65, 265–273. <https://doi.org/10.1007/BF02374657>
- 2247 Havir, E.A., McHale, N.A., 1987. Biochemical and Developmental Characterization of
2248 Multiple Forms of Catalase in Tobacco Leaves. **Plant Physiol.** 84, 450–455.
2249 <https://doi.org/10.1104/pp.84.2.450>
- 2250 Heath, R.L., Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics
2251 and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Arch. Biochem. Biophys.** 125, 189–198.
2252 [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
- 2253 Heslop-Harrison, J.S. (Pat), Schwarzacher, T., Liu, Q., 2023. Polyploidy: its
2254 consequences and enabling role in plant diversification and evolution. **Ann. Bot.** 131,
2255 1–10. <https://doi.org/10.1093/aob/mcac132>
- 2256 Hofmann, G.S., Cardoso, M.F., Alves, R.J.V., Weber, E.J., Barbosa, A.A., de Toledo,
2257 P.M., Pontual, F.B., Salles, L. de O., Hasenack, H., Cordeiro, J.L.P., Aquino, F.E., de
2258 Oliveira, L.F.B., 2021. The Brazilian Cerrado is becoming hotter and drier. **Glob.**
2259 **Change Biol.** 27, 4060–4073. <https://doi.org/10.1111/gcb.15712>

- 2260 Huang, D., Gong, Z., Chen, X., Wang, H., Tan, R., Mao, Y., 2021. Transcriptomic
2261 responses to aluminum stress in tea plant leaves. **Sci. Rep.** 11, 5800.
2262 <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85393-1>
- 2263 Hurgobin, B., Lewsey, M.G., 2022. Applications of cell- and tissue-specific 'omics to
2264 improve plant productivity. **Emerg. Top. Life Sci.** 6, 163–173.
2265 <https://doi.org/10.1042/ETLS20210286>
- 2266 Inès, D., Leray ,Aymeric, Winckler ,Pascale, Courty ,Pierre-Emmanuel, Wendehenne,
2267 David, and Rosnoblet, C., 2025. The nuclear dynamic of CDC48 is affected during the
2268 immune response in plants. **Plant Signal. Behav.** 20, 2488104.
2269 <https://doi.org/10.1080/15592324.2025.2488104>
- 2270 Ito, E., Uemura, T., 2022. RAB GTPases and SNAREs at the trans-Golgi network in
2271 plants. **J. Plant Res.** 135, 389–403. <https://doi.org/10.1007/s10265-022-01392-x>
- 2272 Jia, X., Zhang, B., Han, Y., Guan, J., Gao, H., Guo, P., 2025. Role of reactive oxygen
2273 species (ROS) on biochar enhanced chromium phytoremediation in the soil–plant
2274 system: Exploration on detoxification mechanism. **Environ. Int.** 199, 109471.
2275 <https://doi.org/10.1016/j.envint.2025.109471>
- 2276 Jiang, X., Lai, S., Kong, D., Hou, X., Shi, Y., Fu, Z., Liu, Y., Gao, L., Xia, T., 2023. Al-
2277 induced CsUGT84J2 enhances flavonol and auxin accumulation to promote root
2278 growth in tea plants. **Hortic. Res.** 10, uhad095. <https://doi.org/10.1093/hr/uhad095>
- 2279 Jin, Q., Wang, Q., Zhang, L., Zhang, Y., Liu, Z., 2025. Integrated transcriptome and
2280 metabolome analyses reveal regulatory mechanisms governing carbohydrate
2281 biosynthesis in *Panax ginseng*. **Plant Sci.** 358, 112573.
2282 <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2025.112573>
- 2283 Johansen, D. A. (1940) **Plant Microtechnique**. McGraw-Hill, New York, 523.
- 2284 Kar, M., Mishra, D., 1976. Catalase, Peroxidase, and Polyphenoloxidase Activities
2285 during Rice Leaf Senescence 1. **Plant Physiol.** 57, 315–319.
2286 <https://doi.org/10.1104/pp.57.2.315>
- 2287 Kausar, R., Wang, X., Komatsu, S., 2022. Crop Proteomics under Abiotic Stress: From
2288 Data to Insights. **Plants** 11, 2877. <https://doi.org/10.3390/plants11212877>
- 2289 Kean-Galeno, T., Lopez-Arredondo, D., Herrera-Estrella, L., 2024. The Shoot Apical
2290 Meristem: An Evolutionary Molding of Higher Plants. **Int. J. Mol. Sci.** 25, 1519.
2291 <https://doi.org/10.3390/ijms25031519>
- 2292 Khan, Y.A., White ,K. Ian, and Brunger, A.T., 2022. The AAA+ superfamily: a review of
2293 the structural and mechanistic principles of these molecular machines. **Crit. Rev.**
2294 **Biochem. Mol. Biol.** 57, 156–187. <https://doi.org/10.1080/10409238.2021.1979460>
- 2295 Kim, J.-T., Yi, G., Kim, M.-J., Son, B.-Y., Bae, H.-H., Go, Y.S., Kim, S.-L., Baek, S.-B.,
2296 Kim, S.-H., Chung, I.-M., 2020. Glycolysis stimulation and storage protein
2297 accumulation are hallmarks of maize (*Zea mays* L.) grain filling. **Appl. Biol. Chem.** 63,
2298 54. <https://doi.org/10.1186/s13765-020-00538-6>

- 2299 Kołodziejczyk, I., Tomczyk, P., Kaźmierczak, A., 2023. Endoreplication—Why Are We
2300 Not Using Its Full Application Potential? **Int. J. Mol. Sci.** 24, 11859.
2301 <https://doi.org/10.3390/ijms241411859>
- 2302 Konishi, T., Aohara, T., Igasaki, T., Hayashi, N., Miyazaki, Y., Takahashi, A., Hirochika,
2303 H., Iwai, H., Satoh, S., Ishii, T., 2011. Down-regulation of UDP-arabinopyranose
2304 mutase reduces the proportion of arabinofuranose present in rice cell walls.
2305 **Phytochemistry** 72, 1962–1968. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.07.012>
- 2306 Kosová, K., Vítámvás, P., Urban, M.O., Prášil, I.T., Renaut, J., 2018. Plant Abiotic
2307 Stress Proteomics: The Major Factors Determining Alterations in Cellular Proteome.
2308 **Front. Plant Sci.** 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00122>
- 2309 Kukachka, B.F., Miller, R.B., 1980. **A Chemical Spot-Test for Aluminum and Its**
2310 **Value in Wood Identification.** IAWA J. 1, 104–109. [https://doi.org/10.1163/22941932-](https://doi.org/10.1163/22941932-90000699)
2311 [90000699](https://doi.org/10.1163/22941932-90000699)
- 2312 Kundu, P., Nehra, A., Gill, R., Tuteja, N., Gill, S.S., 2022. Unraveling the importance of
2313 EF-hand-mediated calcium signaling in plants. **South Afr. J. Bot.** 148, 615–633.
2314 <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.04.045>
- 2315 Lai, S., Wang, W., Shen, T., Li, X., Kong, D., Hou, X., Chen, G., Gao, L., Xia, T., Jiang,
2316 X., 2025. Crucial Role of Aluminium-Regulated Flavonol Glycosides (F2-Type)
2317 Biosynthesis in Lateral Root Formation of *Camellia sinensis*. **Plant Cell Environ.** 48,
2318 3573–3589. <https://doi.org/10.1111/pce.15372>
- 2319 Le, X.H., Millar, A.H., 2023. The diversity of substrates for plant respiration and how to
2320 optimize their use. **Plant Physiol.** 191, 2133–2149.
2321 <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac599>
- 2322 Li, Y., Chu, Y., Yao, K., Shi, C., Deng, X., Lin, J., 2023. Response of sugar metabolism
2323 in the cotyledons and roots of *Ricinus communis* subjected to salt stress. **Plant Biol.**
2324 25, 62–71. <https://doi.org/10.1111/plb.13475>
- 2325 LICHTENTHALER, H.K., WELLBURN, A.R., 1983. Determinations of total carotenoids
2326 and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. **Biochem. Soc. Trans.**
2327 11, 591–592. <https://doi.org/10.1042/bst0110591>
- 2328 Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L., Fernie, A.R., 2006. Gas
2329 chromatography mass spectrometry–based metabolite profiling in plants. **Nat. Protoc.**
2330 1, 387–396. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.59>
- 2331 Liu, H., Huang, J., Zhang, X., Liu, G., Liang, W., Zhu, G., Dong, M., Li, M., Zhang, J.,
2332 Yang, W., Xiao, W., Cheung, A.Y., Tao, L.-Z., 2023. The RAC/ROP GTPase activator
2333 OsRopGEF10 functions in crown root development by regulating cytokinin signaling in
2334 rice. **Plant Cell** 35, 453–468. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac297>
- 2335 Liu, Y., Tao, J., Cao, J., Zeng, Y., Li, X., Ma, J., Huang, Z., Jiang, M., Sun, L., 2020.
2336 The Beneficial Effects of Aluminum on the Plant Growth in *Camellia japonica*. **J. Soil**
2337 **Sci. Plant Nutr.** 20, 1799–1809. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00251-9>

- 2338 Lu, Z., Ren, T., Li, Y., Cakmak, I., Lu, J., 2025. Nutrient limitations on photosynthesis:
2339 from individual to combinational stresses. **Trends Plant Sci.**
2340 <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2025.03.006>
- 2341 Mahmud, K., Burslem, D.F.R.P., 2020. Contrasting growth responses to aluminium
2342 addition among populations of the aluminium accumulator *Melastoma malabathricum*.
2343 **AoB PLANTS** 12, plaa049. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plaa049>
- 2344 Mandal, V.K., Jangam, A.P., Chakraborty, N., Raghuram, N., 2022. Nitrate-responsive
2345 transcriptome analysis reveals additional genes/processes and associated traits viz.
2346 height, tillering, heading date, stomatal density and yield in japonica rice. **Planta** 255,
2347 42. <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03816-9>
- 2348 Marchiol, L., Assolari, S., Sacco, P., Zerbi, G., 2004. Phytoextraction of heavy metals
2349 by canola (*Brassica napus*) and radish (*Raphanus sativus*) grown on
2350 multicontaminated soil. **Environ. Pollut.** 132, 21–27.
2351 <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.04.001>
- 2352 Marques, A. P. P., Becari-Viana, I.; Brito, D. S.; Santana-Tomaz, J.; Ribeiro, C.;
2353 Azevedo, A. A. Aluminum: an essential element for the growth and development of
2354 *Borreria latifolia* (Aubl.) K. Schum (Rubiaceae). **Planta** (artigo aceito), 2025.
- 2355 Maruta, T., Ishikawa, T., 2022. Analysis of Ascorbate Metabolism in Arabidopsis Under
2356 High-Light Stress, in: Mhamdi, A. (Ed.), **Reactive Oxygen Species in Plants:
2357 Methods and Protocols**. Springer US, New York, NY, pp. 15–24.
2358 https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2469-2_2
- 2359 Metali, F., Salim, K.A., Burslem, D.F.R.P., 2012. Evidence of foliar aluminium
2360 accumulation in local, regional and global datasets of wild plants. **New Phytol.** 193,
2361 637–649. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03965.x>
- 2362 Mohammadi, M., Karr, A.L., 2001. Superoxide anion generation in effective and
2363 ineffective soybean root nodules. **J. Plant Physiol.** 158, 1023–1029.
2364 [https://doi.org/10.1078/S0176-1617\(04\)70126-1](https://doi.org/10.1078/S0176-1617(04)70126-1)
- 2365 Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific
2366 Peroxidase in Spinach Chloroplasts. **Plant Cell Physiol.** 22, 867–880.
2367 <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>
- 2368 Niedziela, A., Domżalska, L., Dynkowska, W.M., Pernisová, M., Rybka, K., 2022.
2369 Aluminum Stress Induces Irreversible Proteomic Changes in the Roots of the Sensitive
2370 but Not the Tolerant Genotype of Triticale Seedlings. **Plants** 11, 165.
2371 <https://doi.org/10.3390/plants11020165>
- 2372 Nogueira, M.A., Marin, V.R., Habermann, G., Cardoso, J.C., 2023. In vitro
2373 organogenesis, content phenols, and antioxidant capacity of two aluminum
2374 accumulator plant species from the Cerrado region, Brazil. **Vitro Cell. Dev. Biol. -
2375 Plant** 59, 734–743. <https://doi.org/10.1007/s11627-023-10371-3>
- 2376 Nunes-Nesi, A., Carrari, F., Gibon, Y., Sulpice, R., Lytovchenko, A., Fisahn, J., Graham,
2377 J., Ratcliffe, R.G., Sweetlove, L.J., Fernie, A.R., 2007. Deficiency of mitochondrial
2378 fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal

- 2379 function. **Plant J. Cell Mol. Biol.** 50, 1093–1106. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03115.x>
2380
- 2381 O'Brien, T.P., Feder, N., McCully, M.E., 1964. Polychromatic staining of plant cell walls
2382 by toluidine blue O. **Protoplasma** 59, 368–373. <https://doi.org/10.1007/BF01248568>
- 2383 Otto, F., 1990. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear
2384 DNA. **Methods Cell Biol.** 33, 105–110. [https://doi.org/10.1016/s0091-679x\(08\)60516-6](https://doi.org/10.1016/s0091-679x(08)60516-6)
2385
- 2386 Paiva Pinheiro, S.K., Teófilo, F.B.S., Lima, A.K.M., Cordoba, B.V., Miguel, T.B.A.R., de
2387 Castro Miguel, E., 2019. Ontogenesis and secretion mechanism of *Morinda citrifolia* L.
2388 (Rubiaceae) colleters. **South Afr. J. Bot.** 121, 26–33.
2389 <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.10.015>
- 2390 Pereira, T.A.R., Louback, E., Harthman, V. de C., de Araújo, H.H., Meira, R.M.S.A., da
2391 Silva, L.C., 2025. Morphoanatomy, ontogeny and histochemistry of internal mucilage-
2392 secreting structures in the bracts and flowers of three genera of Bromeliaceae. **Flora**
2393 324, 152679. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2025.152679>
- 2394 Pinto, V.B., Almeida, V.C., Pereira-Lima, Í.A., Vale, E.M., Araújo, W.L., Silveira, V.,
2395 Viana, J.M.S., 2021a. Deciphering the major metabolic pathways associated with
2396 aluminum tolerance in popcorn roots using label-free quantitative proteomics. **Planta**
2397 254, 132. <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03786-y>
- 2398 Polle, E., Konzak, C.F., Kattrick, J.A., 1978. Visual Detection of Aluminum Tolerance
2399 Levels in Wheat by Hematoxylin Staining of Seedling Roots. **Crop Sci.** 18,
2400 crops1978.0011183X001800050035x.
2401 <https://doi.org/10.2135/cropsci1978.0011183X001800050035x>
- 2402 Praça-Fontes, M.M., Carvalho, C.R., Clarindo, W.R., Cruz, C.D., 2011. Revisiting the
2403 DNA C-values of the genome size-standards used in plant flow cytometry to choose
2404 the “best primary standards.” **Plant Cell Rep.** 30, 1183–1191.
2405 <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1026-x>
- 2406 Qin, Y., Cui, S., Cui, P., Zhang, B., Quan, X., 2021. *TaFLZ2D* enhances salinity stress
2407 tolerance via superior ability for ionic stress tolerance and ROS detoxification. **Plant**
2408 **Physiol. Biochem.** 168, 516–525. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.11.014>
- 2409 Rahman, S.U., Nawaz, M.F., Gul, S., Yasin, G., Hussain, B., Li, Y., Cheng, H., 2022.
2410 State-of-the-art OMICS strategies against toxic effects of heavy metals in plants: A
2411 review. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 242, 113952.
2412 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113952>
- 2413 Reiter, B., Vamvaka, E., Marino, G., Kleine, T., Jahns, P., Bolle, C., Leister, D., Rühle,
2414 T., 2020. The Arabidopsis Protein CGL20 Is Required for Plastid 50S Ribosome
2415 Biogenesis. **Plant Physiol.** 182, 1222–1238. <https://doi.org/10.1104/pp.19.01502>
- 2416 Ribeiro, C., Cambraia, J., Peixoto, P.H.P., Fonseca Júnior, É.M. da, 2012. Antioxidant
2417 system response induced by aluminum in two rice cultivars. **Braz. J. Plant Physiol.**
2418 24, 107–116. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202012000200004>

- 2419 Sakoda, K., Yamori, W., Groszmann, M., Evans, J.R., 2021. Stomatal, mesophyll
2420 conductance, and biochemical limitations to photosynthesis during induction. **Plant**
2421 **Physiol.** 185, 146–160. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiaa011>
- 2422 Semida, W.M., Abdelkhalik, A., Rady, M.O.A., Marey, R.A., Abd El-Mageed, T.A., 2020.
2423 Exogenously applied proline enhances growth and productivity of drought stressed
2424 onion by improving photosynthetic efficiency, water use efficiency and up-regulating
2425 osmoprotectants. **Sci. Hortic.** 272, 109580.
2426 <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109580>
- 2427 Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N.,
2428 Schwikowski, B., Ideker, T., 2003. Cytoscape: A Software Environment for Integrated
2429 Models of Biomolecular Interaction Networks. **Genome Res.** 13, 2498–2504.
2430 <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>
- 2431 Shi, Y., Luo, C., Xiang, Y., Qian, D., 2023. Rab GTPases, tethers, and SNAREs work
2432 together to regulate Arabidopsis cell plate formation. **Front. Plant Sci.** 14.
2433 <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1120841>
- 2434 Silva, G.S., Rodrigues, J.S., Carvalho, B.M. d. O., Gavassi, M.A., Bressan, A.C.G.,
2435 Habermann, G., 2023. Absence of aluminium compromises root integrity, reduces leaf
2436 hydration and Rubisco performance in *Qualea grandiflora*, an Al-accumulating species.
2437 **Plant Biol.** 25, 740–749. <https://doi.org/10.1111/plb.13535>
- 2438 Siqueira, J.A., Wakin, T., Batista-Silva, W., Silva, J.C.F., Vicente, M.H., Silva, J.C.,
2439 Clarindo, W.R., Zsögön, A., Peres, L.E.P., De Veylder, L., Fernie, A.R., Nunes-Nesi, A.,
2440 Araújo, W.L., 2022. A long and stressful day: Photoperiod shapes aluminium tolerance
2441 in plants. **J. Hazard. Mater.** 432, 128704.
2442 <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128704>
- 2443 Sun, L., Zhang, M., Liu, X., Mao, Q., Shi, C., Kochian, L.V., Liao, H., 2020. Aluminium
2444 is essential for root growth and development of tea plants (*Camellia sinensis*). **J.**
2445 **Integr. Plant Biol.** 62, 984–997. <https://doi.org/10.1111/jipb.12942>
- 2446 Tourdot, E., Mauxion, J.-P., Gonzalez, N., Chevalier, C., 2023. Endoreduplication in
2447 plant organogenesis: a means to boost fruit growth. **J. Exp. Bot.** 74, 6269–6284.
2448 <https://doi.org/10.1093/jxb/erad235>
- 2449 Turner, N.C., 1981. Techniques and experimental approaches for the measurement of
2450 plant water status. **Plant Soil** 58, 339–366. <https://doi.org/10.1007/BF02180062>
- 2451 Ullah, A., Lin, Y.-J., Tian, P., Yu, X.-Z., 2024. Exogenous proline regulates pectin
2452 demethylation by rescuing pectin methylesterase functioning of cell wall from Cr(VI)
2453 toxicity in rice plants. **Chem. Biol. Technol. Agric.** 11, 80.
2454 <https://doi.org/10.1186/s40538-024-00603-y>
- 2455 Upadhyay, S.K., 2023. Calcium Channels, OST1 and Stomatal Defence: Current
2456 Status and Beyond. **Cells** 12, 127. <https://doi.org/10.3390/cells12010127>
- 2457 Varunjikar, M.S., Bøhn, T., Sanden, M., Belghit, I., Pineda-Pampliega, J., Palmblad, M.,
2458 Broll, H., Braeuning, A., Rasinger, J.D., 2023. Proteomics analyses of herbicide-

- 2459 tolerant genetically modified, conventionally, and organically farmed soybean seeds.
2460 **Food Control** 151, 109795. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.109795>
- 2461 Vukašinović, N., Hsu, C.-W., Marconi, M., Li, S., Zachary, C., Shahan, R., Szekley, P.,
2462 Aardening, Z., Vanhoutte, I., Ma, Q., Pinto, L., Krupař, P., German, N., Zhang, J.,
2463 Simon--Vezo, C., Perez-Sancho, J., Quijada, P.C., Zhou, Q., Lee, L.R., Cai, J., Bayer,
2464 E.M., Fendrych, M., Truernit, E., Zhou, Y., Savaldi-Goldstein, S., Wabnik, K., Nolan,
2465 T.M., Russinova, E., 2025. Polarity-guided uneven mitotic divisions control
2466 brassinosteroid activity in proliferating plant root cells. **Cell** 188, 2063-2080.e24.
2467 <https://doi.org/10.1016/j.cell.2025.02.011>
- 2468 Walker, R.P., Chen, Z.-H., Famiani, F., 2021. Gluconeogenesis in Plants: A Key
2469 Interface between Organic Acid/Amino Acid/Lipid and Sugar Metabolism. **Molecules**
2470 26, 5129. <https://doi.org/10.3390/molecules26175129>
- 2471 Wang, L., Zhai, Y., Wu, J., Stevanato, P., Sha, S., Geng, G., Xu, Y., Yu, L., Wang, Y.,
2472 2022. Low night temperature-induced feedback inhibition of photosynthesis through
2473 sucrose accumulation in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. **Environ. Exp. Bot.** 204,
2474 105083. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2022.105083>
- 2475 Waters, E.R., Bezanilla, M., Vierling, E., 2024. ATAD3 Proteins: Unique Mitochondrial
2476 Proteins Essential for Life in Diverse Eukaryotic Lineages. **Plant Cell Physiol.** 65,
2477 493–502. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcad122>
- 2478 Wei, Y., Jiang, C., Han, R., Xie, Y., Liu, L., Yu, Y., 2020. Plasma membrane proteomic
2479 analysis by TMT-PRM provides insight into mechanisms of aluminum resistance in
2480 tamba black soybean roots tips. **Plant Biol** 8, e9312.
2481 <https://doi.org/10.7717/peerj.9312>
- 2482 Wellburn, A.R., 1994. The Spectral Determination of Chlorophylls *a* and *b*, as well as
2483 Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different
2484 Resolution. **J. Plant Physiol.** 144, 307–313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)
- 2486 Winck, F.V., dos Santos, A.L.W., Calderan-Rodrigues, M.J., 2021. **Plant Proteomics**
2487 **and Systems Biology**, in: Vischi Winck, F. (Ed.), *Advances in Plant Omics and*
2488 *Systems Biology Approaches*. Springer International Publishing, Cham, pp. 51–66.
2489 https://doi.org/10.1007/978-3-030-80352-0_3
- 2490 Wu, L., Feng, Y., Zeibig, F., Alam, M., Frei, M., 2021. High Throughput Analyses of
2491 Ascorbate-turnover Enzyme Activities in Rice (*Oryza sativa* L.) Seedlings. **BIO-Protoc.**
2492 11. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4190>
- 2493 Wulfert, S., Schilasky, S., Krueger, S., 2020. Transcriptional and Biochemical
2494 Characterization of Cytosolic Pyruvate Kinases in *Arabidopsis thaliana*. **Plants** 9, 353.
2495 <https://doi.org/10.3390/plants9030353>
- 2496 Xu, Q., Wang, Y., Ding, Z., Fan, K., Ma, D., Zhang, Y., Yin, Q., 2017. Aluminum induced
2497 physiological and proteomic responses in tea (*Camellia sinensis*) roots and leaves.
2498 **Plant Physiol. Biochem.** 115, 141–151. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.03.017>

- 2499 Xu, Q., Wang, Yu, Ding, Z., Song, L., Li, Y., Ma, D., Wang, Yi, Shen, J., Jia, S., Sun,
2500 H., Zhang, H., 2016. Aluminum induced metabolic responses in two tea cultivars. **Plant**
2501 **Physiol. Biochem.** 101, 162–172. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.02.001>
- 2502 Yamori, W., Kusumi, K., Iba, K., Terashima, I., 2020. Increased stomatal conductance
2503 induces rapid changes to photosynthetic rate in response to naturally fluctuating light
2504 conditions in rice. **Plant Cell Environ.** 43, 1230–1240.
2505 <https://doi.org/10.1111/pce.13725>
- 2506 Yang, T., Zhu, Y., Yu, F., Estevez, J., Li, C., Li, L., Guo, H., Wang, Y., Liu, X., Zhu, S.,
2507 Liao, H., Pacheco, J.M., 2020. The RALF1-FERONIA complex phosphorylates eIF4E1
2508 to promote protein synthesis and polar root hair growth. **Mol. Plant.**
2509 <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.12.014>
- 2510 Yemm, E.W., Cocking, E.C., Ricketts, R.E., 1955. The determination of amino-acids
2511 with ninhydrin. **Analyst** 80, 209–214. <https://doi.org/10.1039/AN9558000209>
- 2512 Yu, H., Kong, X., Huang, H., Wu, W., Park, J., Yun, D.-J., Lee, B., Shi, H., Zhu, J.-K.,
2513 2020. STCH4/REIL2 Confers Cold Stress Tolerance in Arabidopsis by Promoting rRNA
2514 Processing and CBF Protein Translation. **Cell Rep.** 30, 229-242.e5.
2515 <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.12.012>
- 2516 Yusuf, M., Khan, T.A., AlBlooshi, F.S., Alharmoudi, A., AlAlawi, M.S., Alshkeili, A.M.,
2517 Albedwawi, A., Masih, J., Buty Alghfeli, M.M., 2025. Unveiling the protective role of
2518 silicon dioxide nanoparticles against copper-induced oxidative damage in soybean
2519 plants through altered proline metabolism and antioxidants. **Plant Nano Biol.** 12,
2520 100149. <https://doi.org/10.1016/j.plana.2025.100149>
- 2521 Zagorskina, N.V., Zubova, M.Y., Nechaeva, T.L., Kazantseva, V.V., Goncharuk, E.A.,
2522 Katanskaya, V.M., Baranova, E.N., Aksenova, M.A., 2023. Polyphenols in Plants:
2523 Structure, Biosynthesis, Abiotic Stress Regulation, and Practical Applications
2524 (Review). **Int. J. Mol. Sci.** 24, 13874. <https://doi.org/10.3390/ijms241813874>
- 2525 Zhang, T., Noll, S.E., Peng, J.T., Klair, A., Tripka, A., Stutzman, N., Cheng, C., Zare,
2526 R.N., Dickinson, A.J., 2023a. Chemical imaging reveals diverse functions of
2527 tricarboxylic acid metabolites in root growth and development. **Nat. Commun.** 14,
2528 2567. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38150-z>
- 2529 Zhang, T., Peng, J.T., Klair, A., Dickinson, A.J., 2023b. Non-canonical and
2530 developmental roles of the TCA cycle in plants. **Curr. Opin. Plant Biol.** 74, 102382.
2531 <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2023.102382>
- 2532 Zhang, Z., Zhao, Q., Wang, W., Feng, R., Cao, Y., Wang, G., Du, J., Du, Y., 2025.
2533 Starch-sucrose metabolic homeostasis in germinating soybean reserve mobilization
2534 with different levels of salt stress. **Plant Physiol. Biochem.** 225, 110050.
2535 <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2025.110050>
- 2536 Zheng, K., Martinez, M. del P., Bouzid, M., Balparda, M., Schwarzländer, M., Maurino,
2537 V.G., 2025. Regulation of plant glycolysis and the tricarboxylic acid cycle by
2538 posttranslational modifications. **Plant J.** 122, e70142. <https://doi.org/10.1111/tpj.70142>

TABELAS E FIGURAS

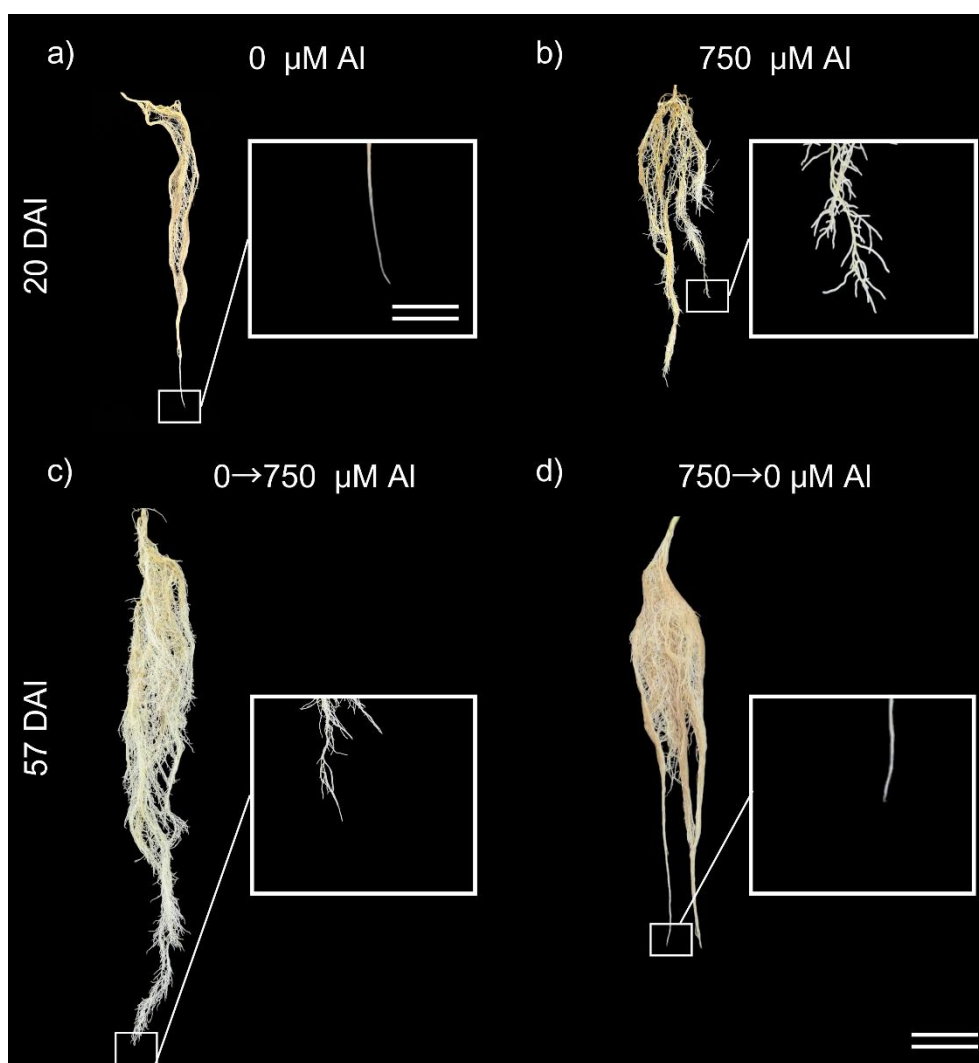


Figura 1 - Efeito do Al sobre a morfologia radicular de *Borreria latifolia*. Plantas foram cultivadas em solução nutritiva pH 4,5: 20 dias na ausência de Al (a), 20 dias na presença de 750 μM de Al (b), 20 dias na ausência de Al + 37 dias de adição de 750 μM de Al (total 57 dias) (c) 20 dias de presença de 750 μM de Al + 37 dias de ausência do metal (total 57 dias) (d). DAI: dias após a implementação. Barras: 5 cm, 0,5 cm (Detalhes).

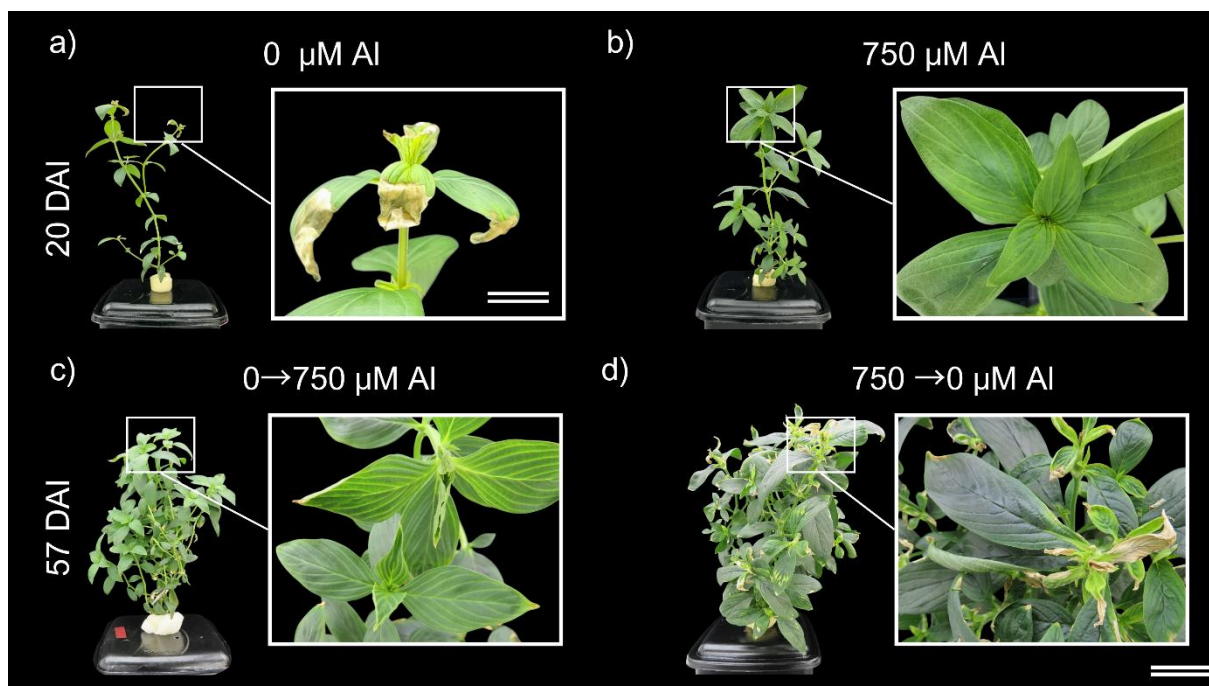


Figura 2 - Efeito do Al sobre a morfologia da parte aérea e do meristema apical caulinar de *Borreria latifolia*. Espécimes cultivados em hidroponia com presença ou ausência de Al conforme descrito na legenda da figura 1. Parte aérea e ápice caulinares aos 20 (a e b) e aos 57 dias (c e d). DAI: dias após a implementação. Barras: 4,5 cm, 1,5 (Detalhes).

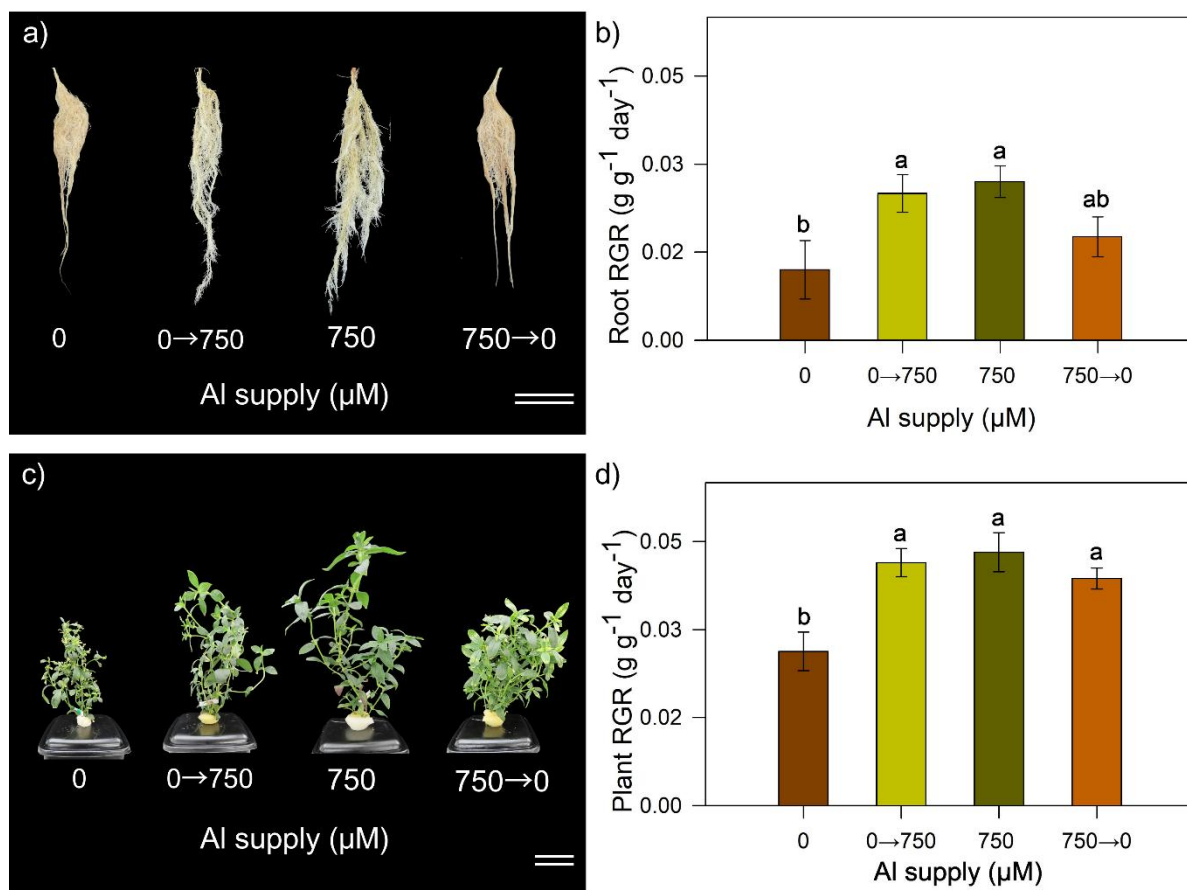


Figura 3 - Fenótipos de *Borreria latifolia* e taxa de crescimento relativo da raiz e da planta inteira. Plantas coletadas em solos ácidos foram aclimatadas e transferidas para solução nutritiva com: ausência contínua de Al durante 57 dias (0 μM Al); presença contínua de Al durante 57 dias (750 μM Al); ausência de Al por 20 dias + adição do metal por mais 37 dias (0→750 μM Al) e presença de Al por 20 dias + privação do metal por mais 37 dias (750→0 μM Al). Fenótipos do sistema radicular (a). Taxa de crescimento relativo (RGR) da raiz (b). Fenótipos da parte aérea (c). RGR da planta inteira (d). Os dados são médias com desvio padrão representado pelas barras verticais (n= 5 plantas). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey (p<0,05). Barras: 4 cm

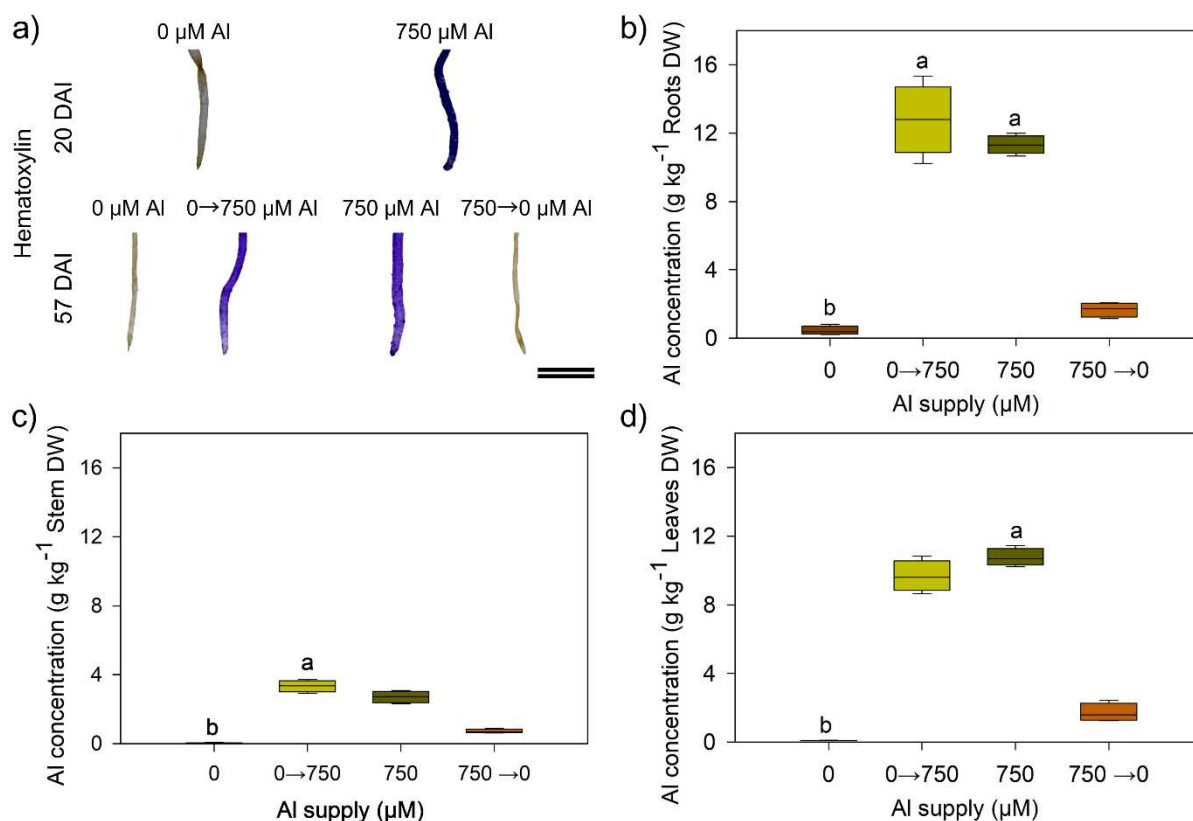
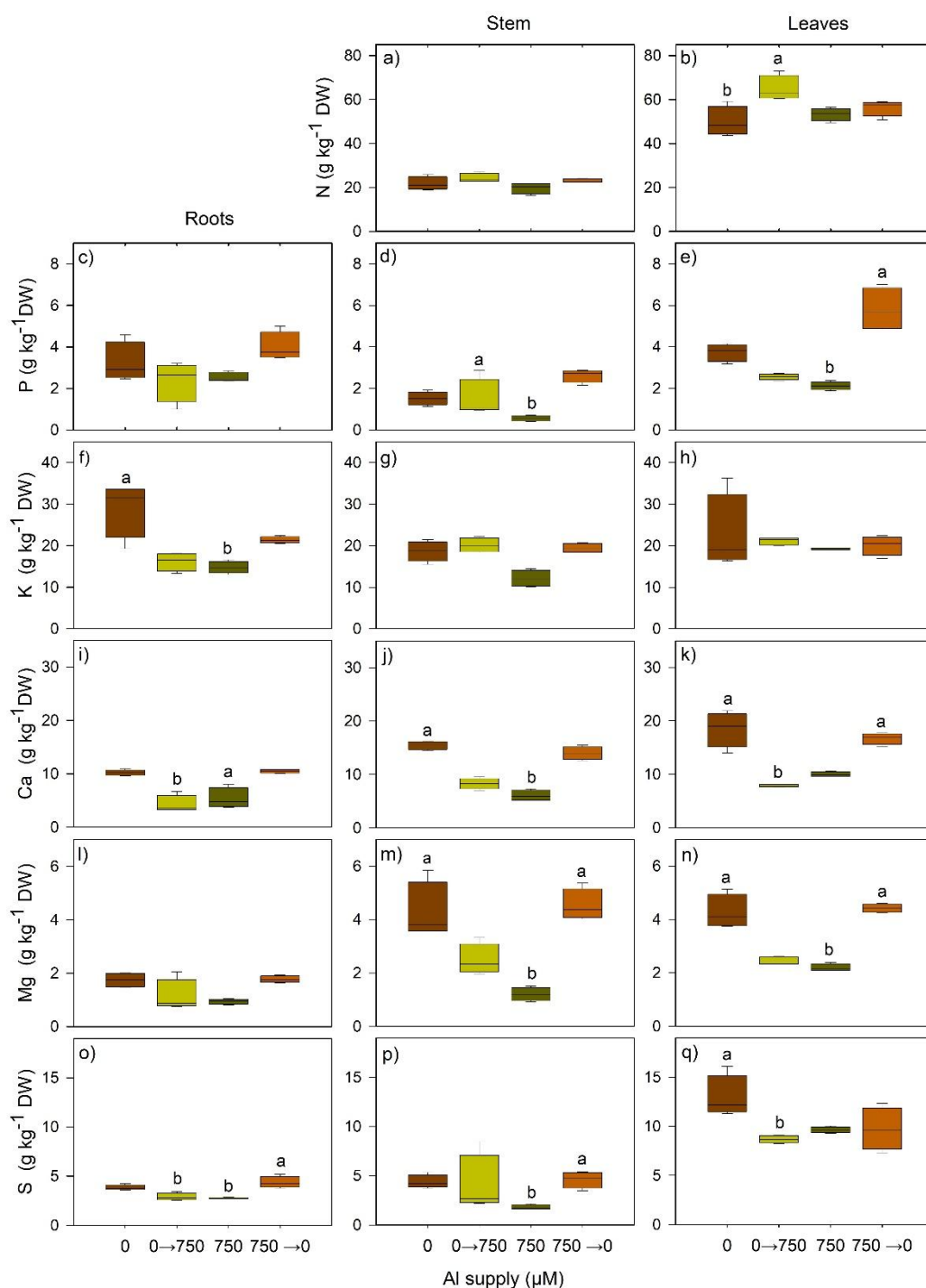
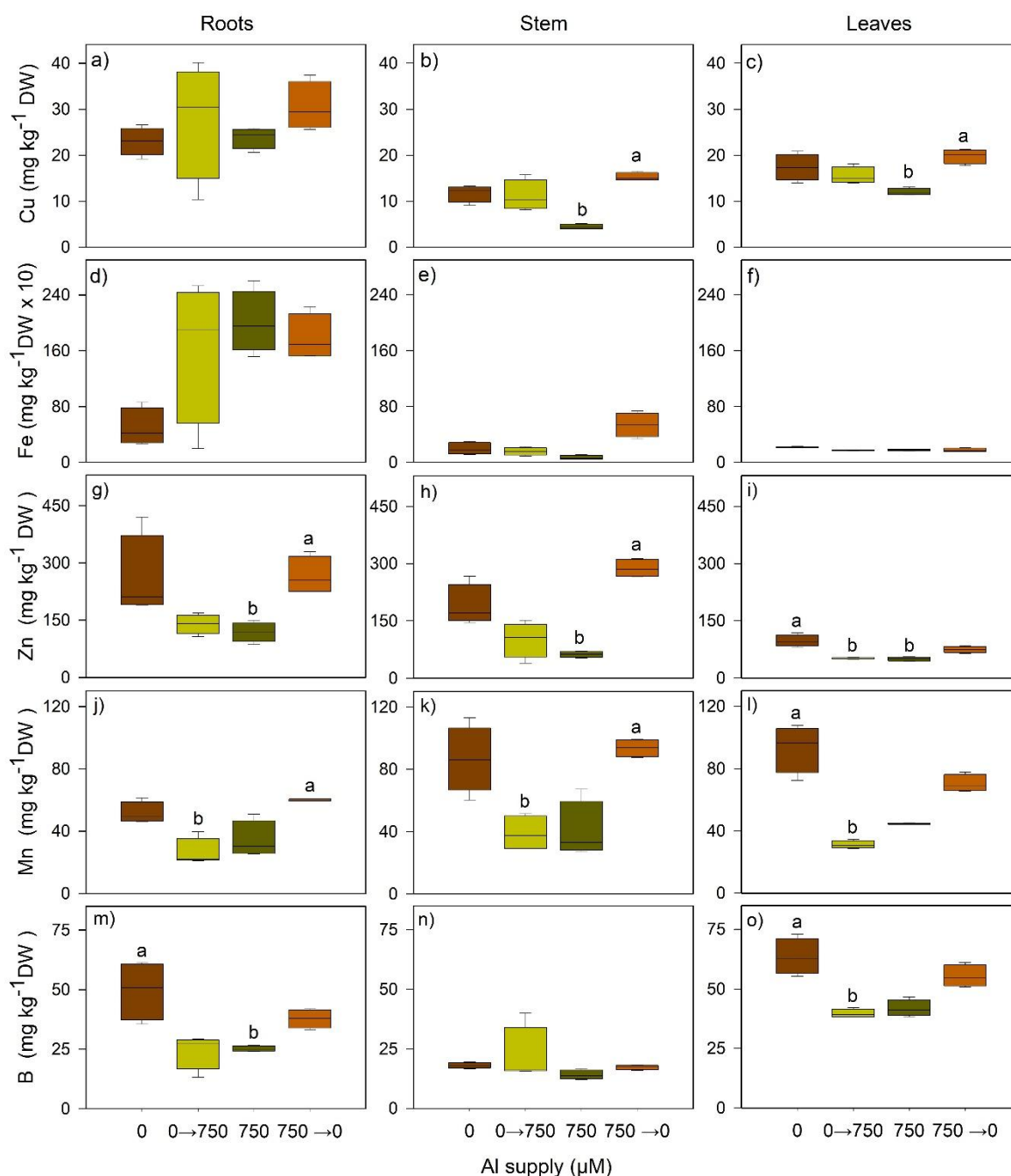


Figura 4 - Localização do Al pelo corante hematoxilina em ápices radiculares de *Borreria latifolia* e concentração de Al nos órgãos vegetativos. Plantas coletadas e tratadas conforme descrito na legenda da figura 3. Coloração do Al pelo corante hematoxilina, a cor azul indica reação positiva para a presença do metal (a). Boxplot da concentração de Al nas raízes (b), caule (c) e folhas (d) de plantas tratadas com a presença e, ou ausência de Al. Diferentes letras significam diferenças entre os tratamentos de acordo o teste de Dunn ($p < 0,05$). DAI: dias após a implementação. Barra = 0,25 cm



2568 **Figura 5** - Estado nutricional de macronutrientes em *Borreria latifolia*. Boxplot das
 2569 concentrações de nitrogênio (a, b), fósforo (c, d, e), potássio (f, g, h), cálcio (i, j, k),
 2570 magnésio (l, m, n) e enxofre (o, p, q) em raízes, caule e folhas. Plantas coletadas e
 2571 tratadas conforme descrito na legenda da figura 3. Diferentes letras significam
 2572 diferenças entre os tratamentos de acordo o teste de Dunn ($p < 0.05$). (n= 4 plantas)



2573 **Figura 6** - Estado nutricional de micronutrientes em *Borreria latifolia*. Boxplot das
 2574 concentrações de cobre (a, b, c), ferro (d, e, f) zinco (g, h, i), manganês (j, k, l) e boro
 2575 (m, n, o) em raízes, caule e folhas. Plantas coletadas e tratadas conforme descrito na
 2576 legenda da figura 3. Diferentes letras significam diferenças entre os tratamentos de
 2577 acordo o teste de Dunn ($p < 0,05$). ($n = 4$ plantas)

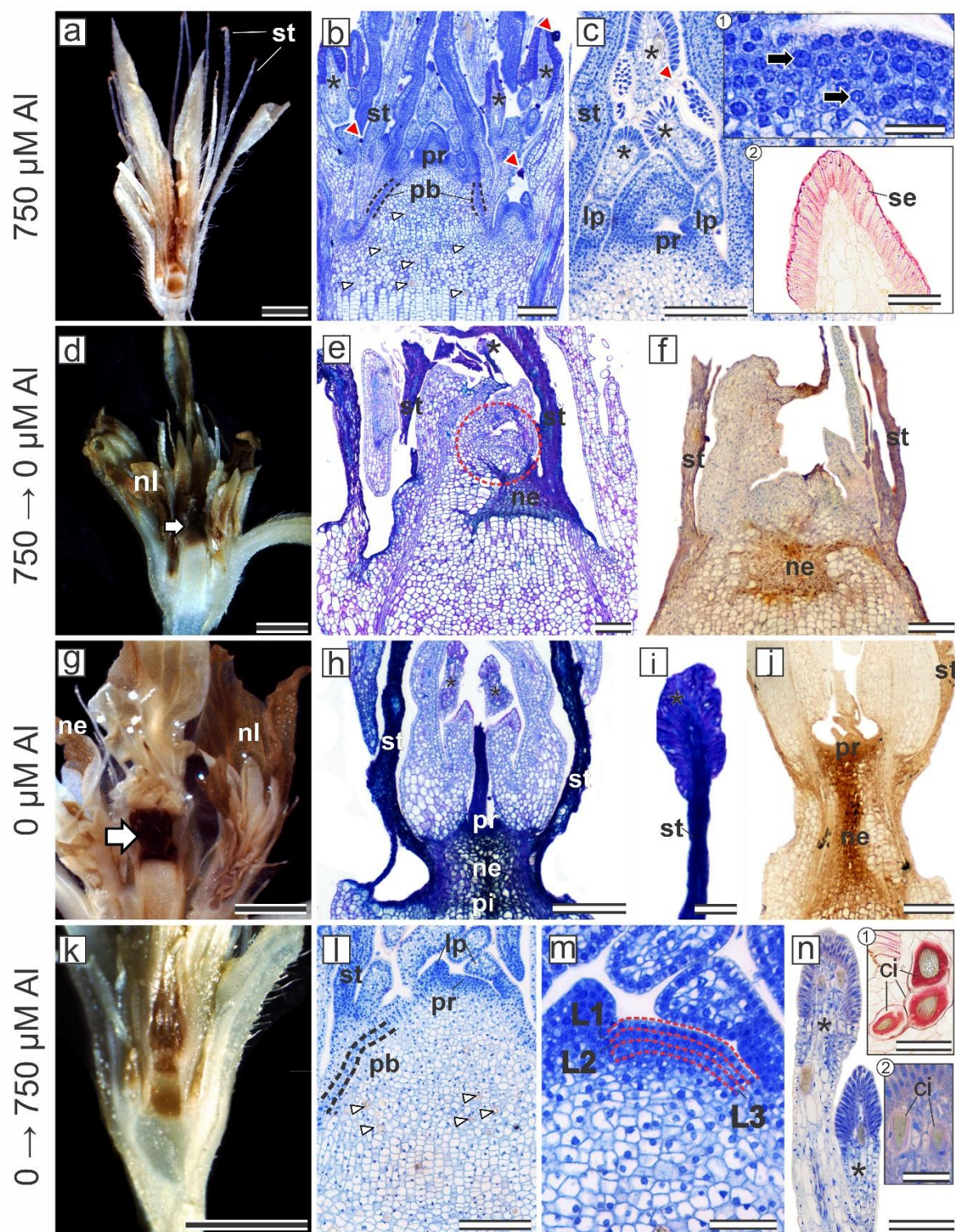


Figura 7 - Análise anatômica dos ápices caulinares de plantas de *Borreria latifolia*, cultivadas em diferentes tratamentos suplementados ou não com alumínio (Al). Ápices caulinares em estereomicroscópio (a, d, g, k) - a despigmentação dos fragmentos é consequência do processo de fixação. Demais imagens- secções longitudinais. Coloração com Azul de toluidina (b, e, h, i), detecção de compostos fenólicos (cor marrom) com Cloreto Férrico (j), detecção de alumínio (cor azul) com Chrome Azurol'S

2584 (c, c1, f, l, m, n, n2). Ápice íntegro de plantas cultivadas em 750µM Al (a) com
 2585 promeristema, primórdios foliares e coléteres bem formados e desenvolvidos (b). Al
 2586 detectado em todas as células meristemáticas (c), núcleos (c1) e coléteres em fase
 2587 de secreção, confirmada pela detecção de mucilagem (c2). Alterações morfológicas
 2588 no ápice caulinar após restrição de Al no cultivo (750 → 0 µM Al) (d). Necroses, má
 2589 formação dos tecidos e padrão anormal de divisão celular na região meristemática do
 2590 ápice caulinar (círculo com tracejado vermelho) (e). Al detectado nos núcleos (m).
 2591 Ápice com região escurecida indicando morte da região meristemática, folhas
 2592 necrosadas e em processo de necrose de plantas cultivadas na ausência de Al (0µM
 2593 Al) (g). Estípulas danificadas e região meristemática necrosada sem diferenciação das
 2594 camadas do promeristema (h). Coléter estipular deformado (i). Detecção de
 2595 compostos fenólicos nas regiões colapsadas (j). Ápice sem sinais de deformação,
 2596 provenientes de ramos saudáveis originados após a suplementação de Al (0 → 750
 2597 µM) (k). Al detectado na parede celular e núcleo do promeristema e células dos tecidos
 2598 adjacentes (l). Presença de Al nos primórdios foliares e camadas da túnica (L1 e L2)
 2599 e do corpo (L3) íntegros (m). Coléter em fase de secreção sem alterações (n). Ráfides
 2600 no eixo parenquimático com mucilagem evidenciada pelo Vermelho de Rutênio (g1) e
 2601 Al (g2). Abreviações: ci – idioblasto cristalífero, L1 e L2 – camadas de células da
 2602 túnica, L3 – camada de célula do corpo, lp – primórdio foliar, ne – necrose, nl – folha
 2603 necrosada, pb – procâmbio, pi – medula, pr – promeristema, ra – ráfide, se – epiderme
 2604 secretora, st – estípula, * - coléter, seta branca – necrose na região meristemática do
 2605 ápice, seta preta – alumínio no núcleo, círculo com tracejado vermelho – região
 2606 meristemática do ápice com padrão anormal de divisão celular, linha tracejada preta
 2607 – camadas de procâmbio, cabeça de seta branca – drusa, cabeça de seta vermelha –
 2608 secreção dos coléteres . Barras de escalas: 2mm (a, d, g, k), 50 µm (c2, i, m, n1, n2),
 2609 150 µm (b,c,e,f, h,j,l,n).

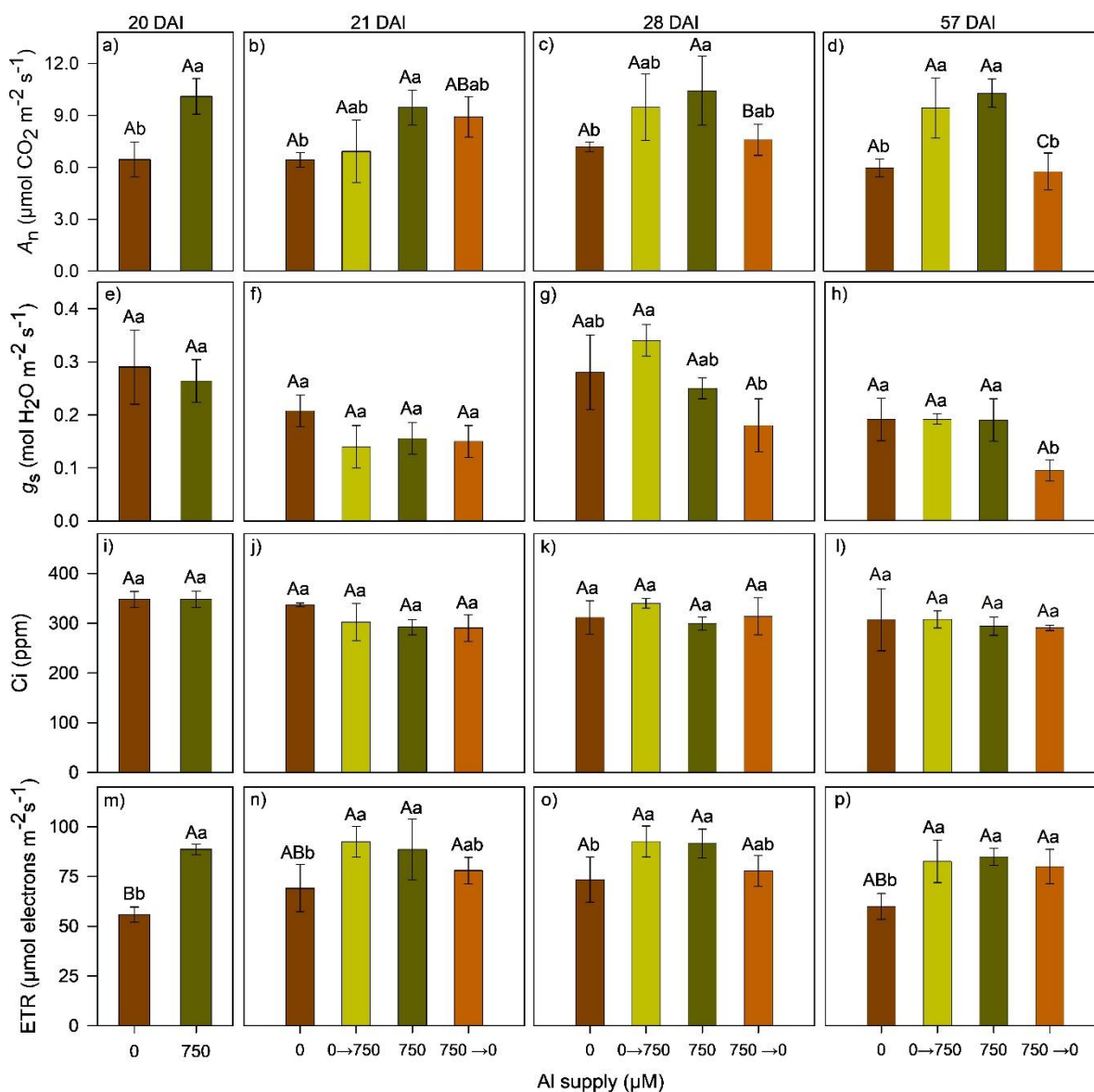


Figura 8 - Efeito do Al sobre as trocas gasosas de *Borreria latifolia*. Plantas coletadas e tratadas conforme descrito na legenda da figura 3. Taxa de assimilação líquida de CO₂ (a, b, c, d), condutância estomática (e, f, g, h), concentração interna de CO₂ (i, j, k, l), taxa de transporte de elétrons (m, n, o, p). Os dados são médias com desvio padrão representado pelas barras verticais (n= 4 plantas). Letras maiúsculas se referem a diferenças dentro de um tratamento ao longo do tempo de avaliação; letras minúsculas representam diferenças entre os tratamentos para um mesmo tempo pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). A_n : taxa de assimilação líquida de CO₂. g_s : condutância estomática. C_i : concentração interna de CO₂. ETR: taxa de transporte de elétrons. DAI: dias após a implementação.

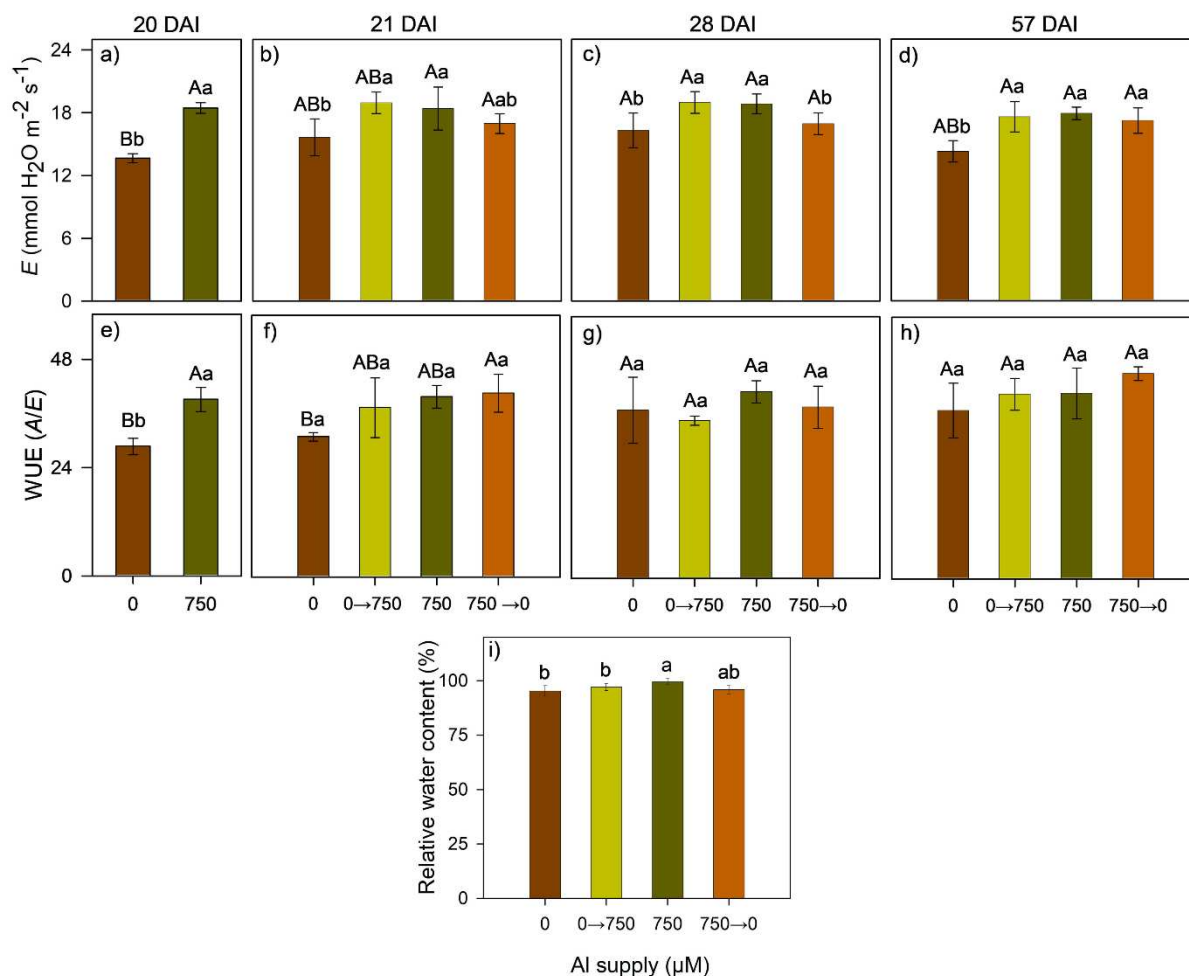


Figura 9 - Efeito do Al sobre o status hídrico de *Borreria latifolia*. Transpiração (E) (a, b, c, d), eficiência no uso da água (WUE) (e, f, g, h) e conteúdo relativo de água (RWC) (i) das plantas coletadas e tratadas conforme descrito na legenda da figura 3. E e WUE foram medidos aos 20, 21, 28 e 57 dias de experimento, e RWC apenas aos 57 dias. Os dados são médias com desvio padrão representado pelas barras verticais. E e WUE ($n=4$ plantas), RWC ($n=3$ plantas). Letras maiúsculas referem a diferenças dentro de um tratamento ao longo do tempo de avaliação; letras minúsculas representam diferenças entre os tratamentos para um mesmo tempo pelo teste de Tukey ($p<0,05$). E : Transpiração. WUE: Eficiência no uso da água. RWC: Teor Relativo de Água. DAI: dias após a implementação.

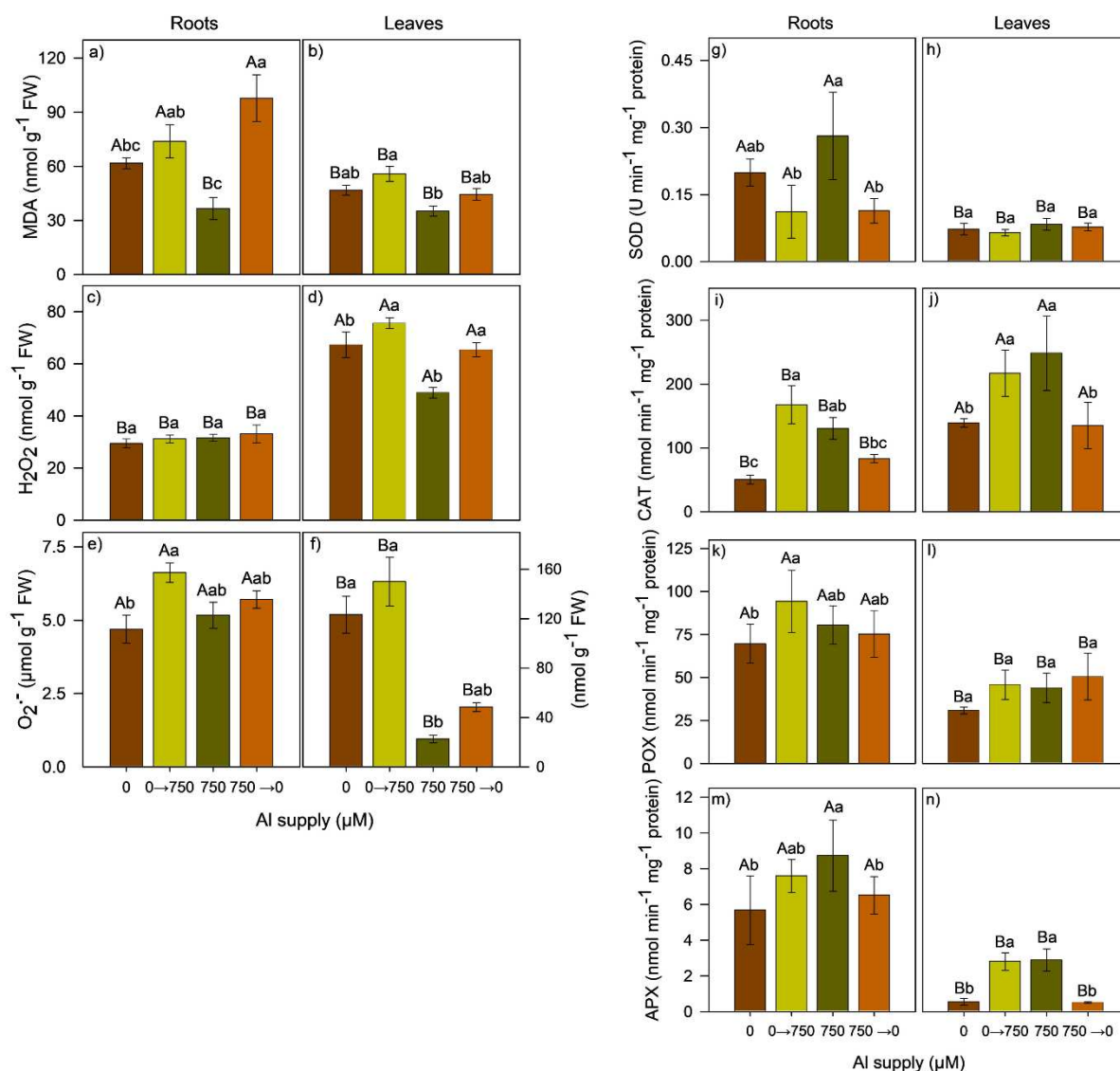


Figura 10 - Peroxidação lipídica, espécies reativas de oxigênio e respostas antioxidantes de *Borreria latifolia*. Concentração de malondialdeído (a, b), peróxido de hidrogênio (c, d) e radical ânion superóxido (e, f), atividade da superóxido dismutase (SOD)(g, h), catalase (CAT) (i, j), peroxidase total (POX) (k, l) e ascorbato peroxidase (APX) (m, n) em raízes e folhas. Plantas coletadas e tratadas conforme descrito na legenda da figura 3. Os dados são médias com desvio padrão representado pelas barras verticais (n= 5 plantas). Letras maiúsculas referem a diferenças entre órgãos dentro de um mesmo tratamento; letras minúsculas representam diferenças entre os tratamentos pelo teste de Tukey (p<0,05).

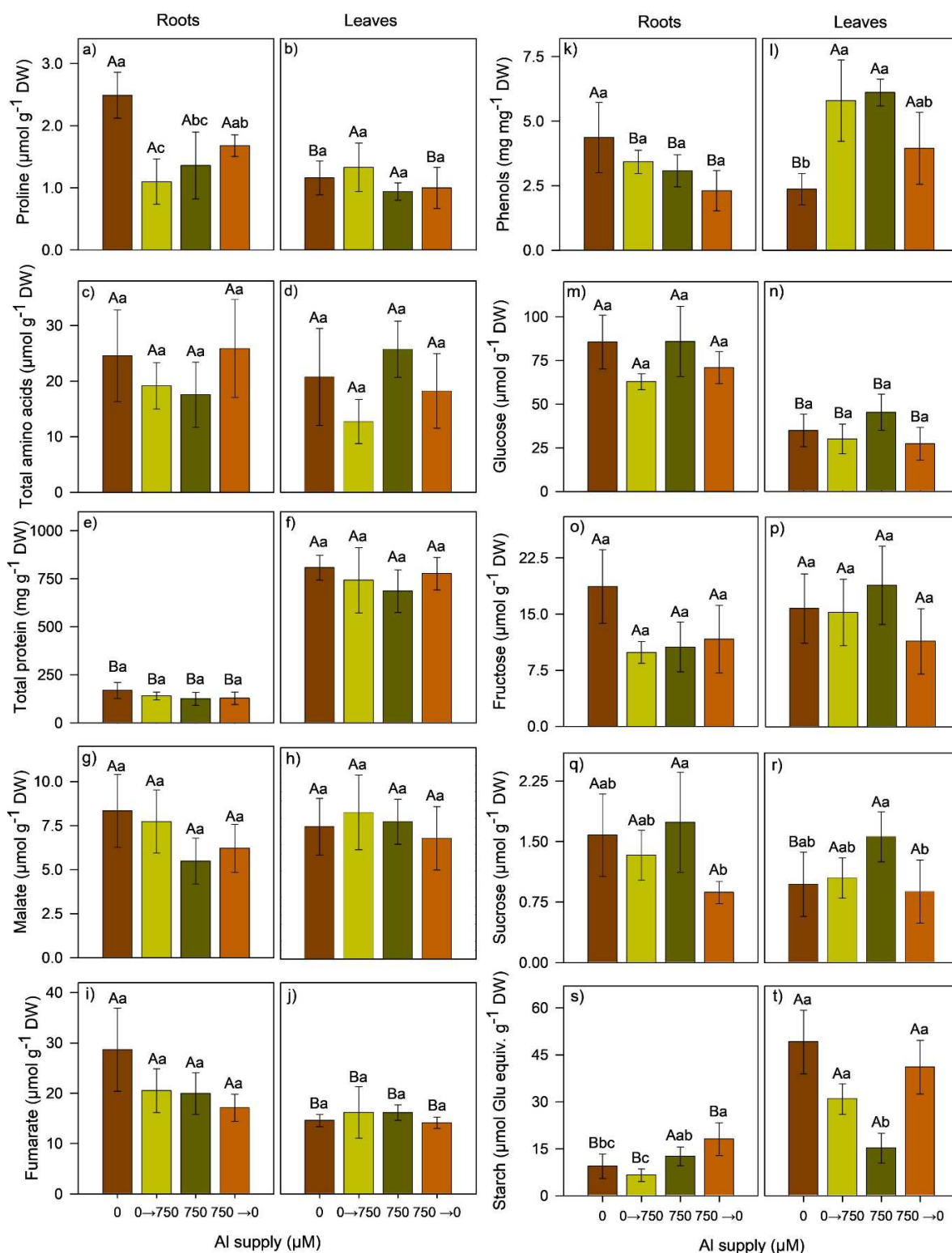
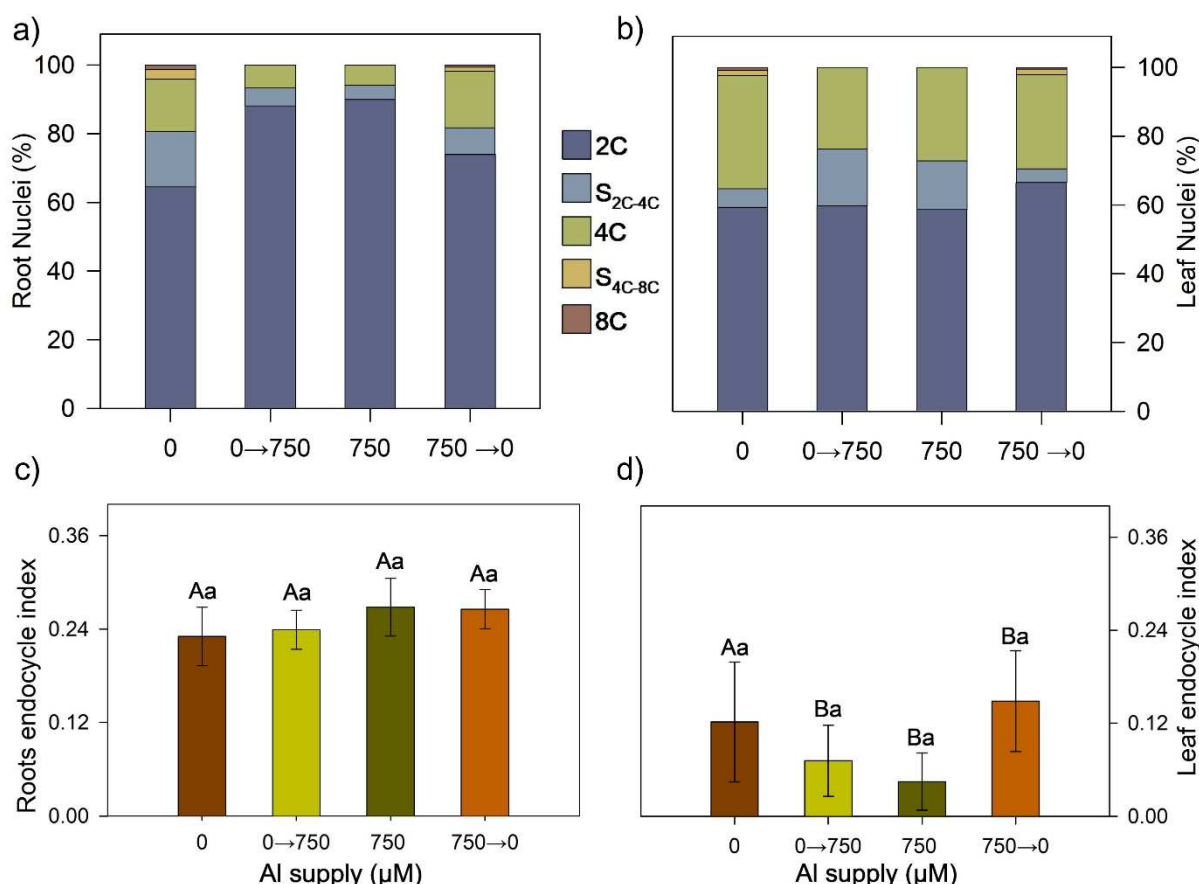
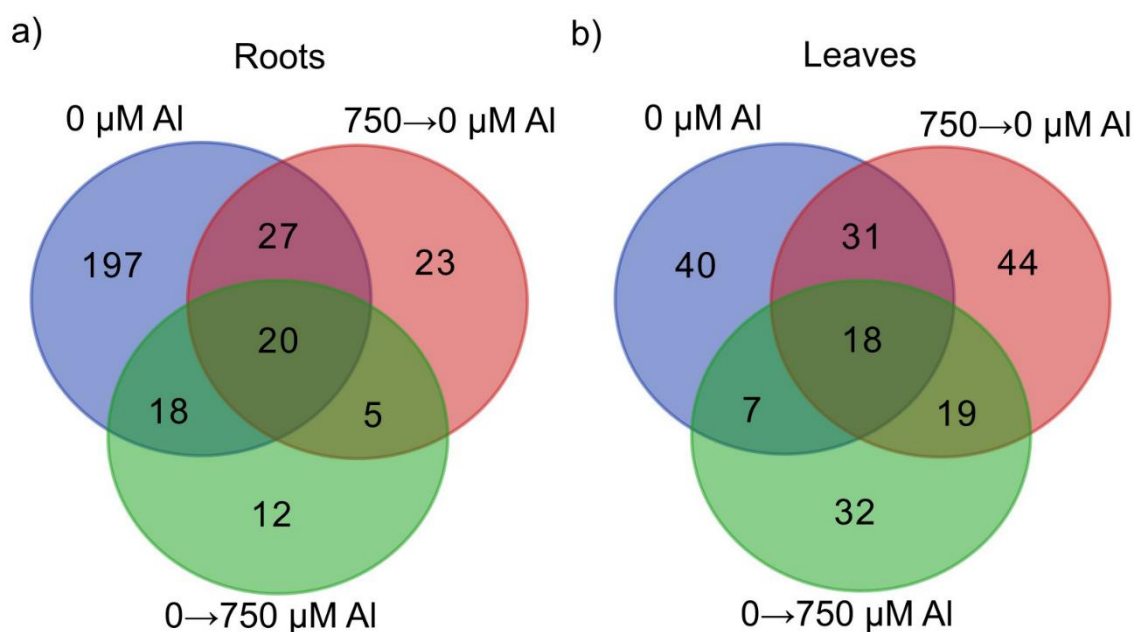


Figura 11 - Metabólitos primários e compostos fenólicos. Concentração de prolina (a, b), aminoácidos (c, d), proteínas totais (d, e), malato (g, h), fumarato (i, j), fenóis (k, l), glicose (m, n), frutose (o, p), sacarose (q, r) e amido (s, t) em raízes e folhas de *Borreria latifolia*. Plantas coletadas e tratadas conforme descrito na legenda da figura 3. Médias dos valores originais (colunas) com desvio padrão representado pelas barras

2644 verticais (n= 5 plantas). Estatística (letras) calculada com dados transformados por
 2645 BoxCox. Letras maiúsculas se referem a diferenças entre órgãos dentro de um mesmo
 2646 tratamento; letras minúsculas representam diferenças entre os tratamentos em cada
 2647 órgão pelo teste de Tukey ($p<0,05$).



2648 **Figura 12** - Nível de ploidia de DNA e índice de endociclos. Proporção de núcleos
 2649 para cada nível de ploidia de DNA e índice de endociclos do meristema apical radicular
 2650 (a, c) e de folhas jovens (b, d) de *Borreria latifolia*. Espécimes coletados e tratados
 2651 conforme descrito na legenda da Fig. 3 Nos gráficos de endociclo (c, d) os dados são
 2652 médias com desvio padrão representado pelas barras verticais (n= 4 plantas).
 2653 Conteúdo relativo de DNA expresso em unidades universais (C). Letras maiúsculas
 2654 se referem a diferenças entre órgãos dentro de um mesmo tratamento; letras
 2655 minúsculas representam diferenças entre os tratamentos pelo teste de Tukey
 2656 ($p<0,05$).



2657 **Figura 13** - Diagrama de Venn. Sobreposição das proteínas diferencialmente
 2658 acumuladas nas raízes (a) e folhas (b) de *Borreria latifolia* cultivada em hidroponia na
 2659 ausência (0 μM) ou presença (750 μM) de Al por 57 dias, ou por 20 dias seguidos de
 2660 adição (0 $\rightarrow$ 750 μM) ou privação (750 $\rightarrow$ 0 μM) de Al. Todos os contrastes foram feitos
 2661 em relação à presença contínua de Al (750 μM). (n=3 plantas)

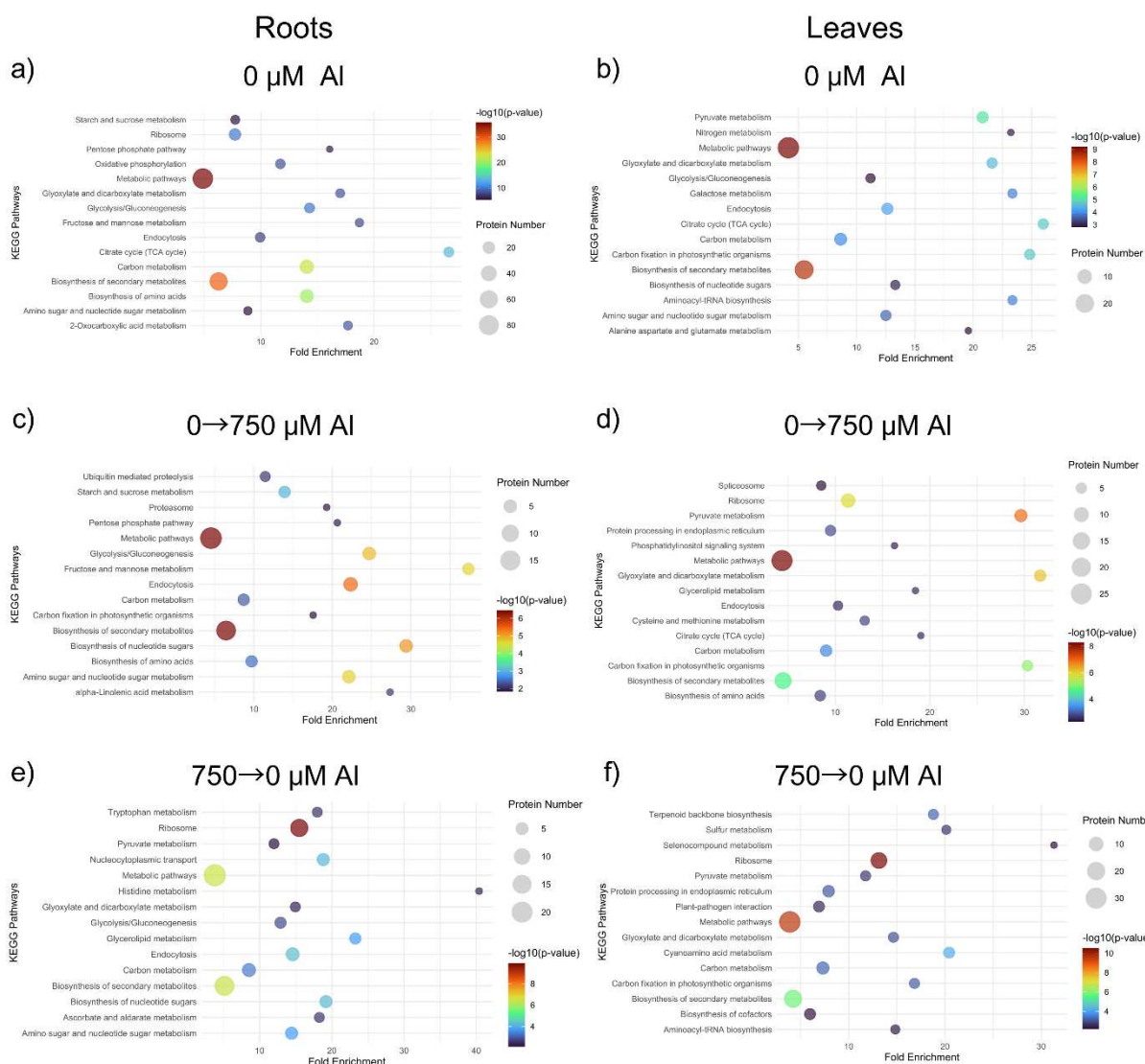


Figura 14 - Análise de enriquecimento da via KEGG ($p < 0,05$) de proteínas diferencialmente acumuladas nas raízes (a, c, e) e folhas (b, d, f) de *Borreria latifolia* cultivada em hidroponia na ausência (0 μ M) ou presença (750 μ M) de Al por 57 dias, ou por 20 dias seguidos de adição (0 $\rightarrow$ 750 μ M) ou privação (750 $\rightarrow$ 0 μ M) de Al. Dotplot das vias metabólicas mais enriquecidas. Foram utilizados ortólogos de *Coffea canephora* para análise de enriquecimento.

2668 **Tabela 1** - Proteínas únicas acumuladas em *Borreria latifolia* cultivada por 57 dias em
 2669 solução nutritiva suplementada com 750 μM Al, nas três condições de comparação:
 2670 ausência contínua de Al durante 57 dias (0 μM Al), ausência de Al por 20 dias + adição
 2671 do metal por mais 37 dias (0 $\rightarrow$ 750 μM Al) e presença de Al por 20 dias + privação do
 2672 metal por mais 37 dias (750 $\rightarrow$ 0 μM Al).

Protein ID	Annotation of <i>O. corymbosa</i>	Orthologs of <i>Coffea canephora</i>	Tissue	Biological Function
A0AAV1DSF3	UDP-arabinopyranose mutase	UDP-arabinopyranose mutase	Root	Precursor for cell wall components, regulation of UDP-sugar pools.
A0AAV1D057	OLC1v1038508C1	Uncharacterized protein	Root	GTPase activity.
A0AAV1BW73	OLC1v1021404C1	Ras-related protein RABA1f	Root	GTPase activity.
A0AAV1ECK9	OLC1v1018819C1	Uncharacterized protein	Root	GTPase activity.
A0AAV1BYA9	4-hydroxy-4-methyl-2-oxoglutarate aldolase	4-hydroxy-4-methyl-2-oxoglutarate aldolase	Root	Regulation of RNA metabolic process
A0AAV1DJH6	OLC1v1006851C1	Chaperonin CPN60-2, mitochondrial	Root	ATP binding, ATP-dependent protein folding chaperone and protein refolding.
A0AAV1DWZ4	OLC1v1012795C1	Uncharacterized protein	Leaf	Glutathione transferase activity, translation elongation factor activity.
A0AAV1D0M6	OLC1v1038319C1 (Fragment)	EF-hand domain-containing protein	Leaf	Calcium ion binding.
A0AAV1CME5	OLC1v1032989C1	Cell division cycle protein 48 homolog	Leaf	Autophagosome maturation, mitotic spindle disassembly and retrograde protein transport, ER to cytosol
A0AAV1CFJ6	OLC1v1025179C1	AAA+ ATPase domain-containing protein	Leaf	Protein import into chloroplast stroma and proteolysis

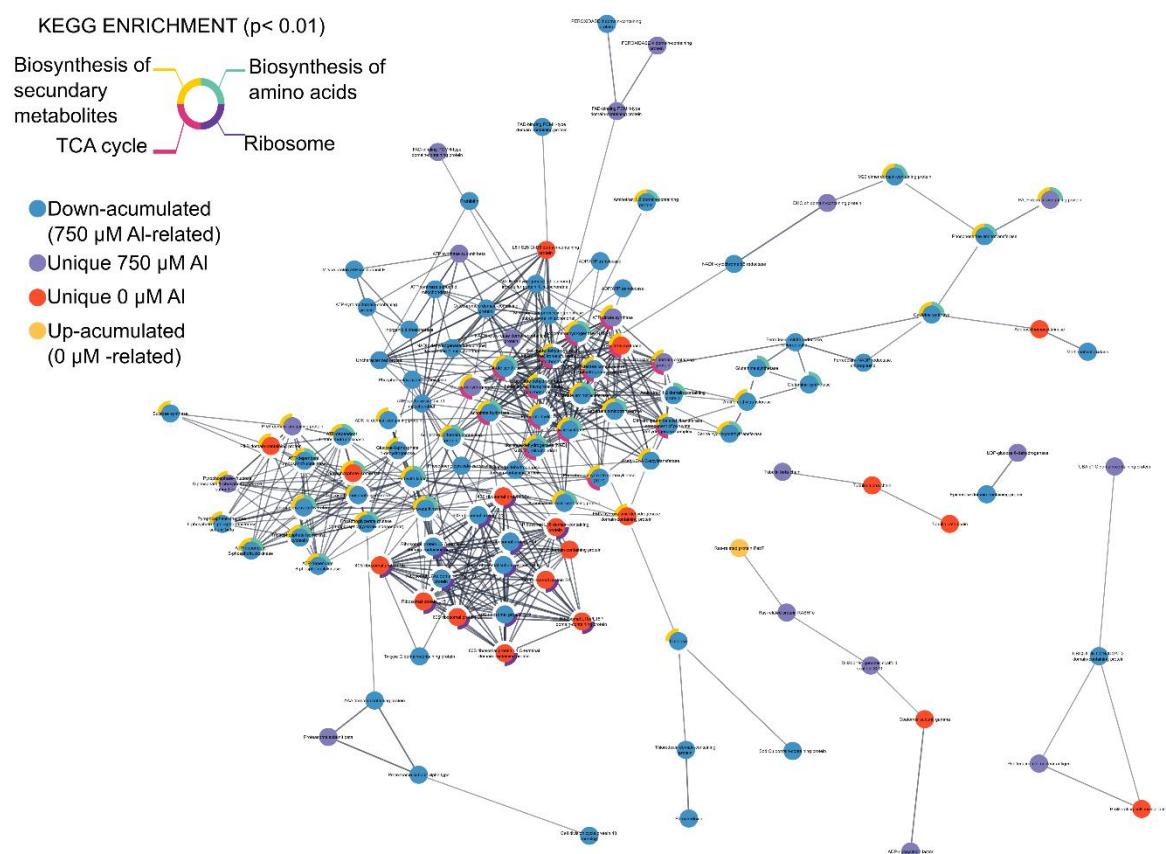
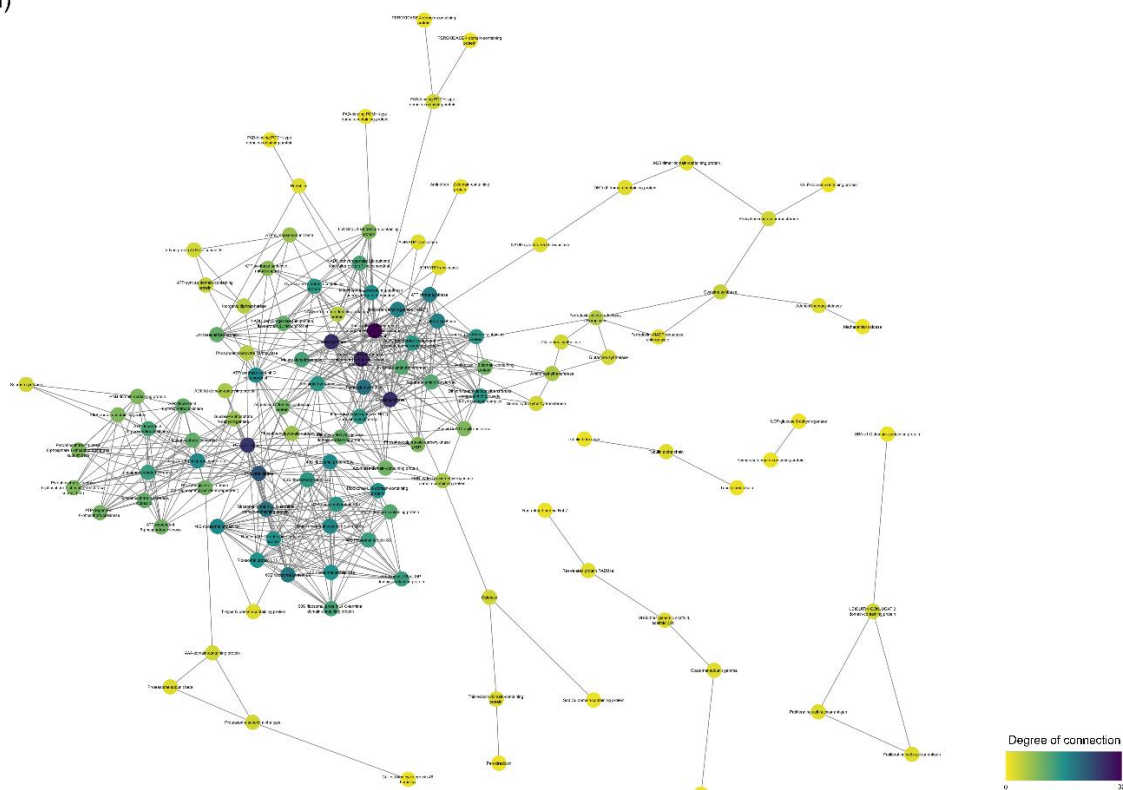
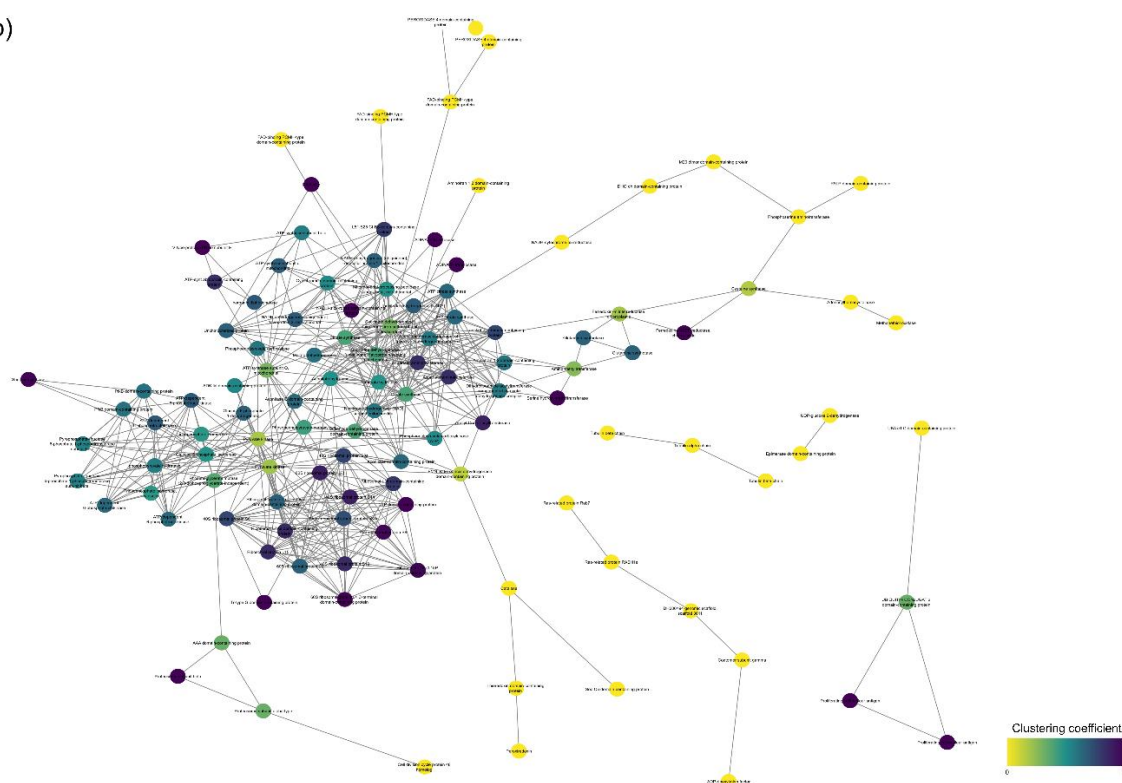


Figura 15 - Rede de interação proteína-proteína (PPI) das DAPs radiculares de *Borreria latifolia* cultivada em hidroponia na ausência (0 μ M) ou presença (750 μ M) de Al por 57 dias. Interações entre potenciais alvos e as vias biológicas (KEGG). Cada nó (círculos) representa um tipo de proteína. As arestas (linhas entre dois nós) indicam a presença de interação.

a)

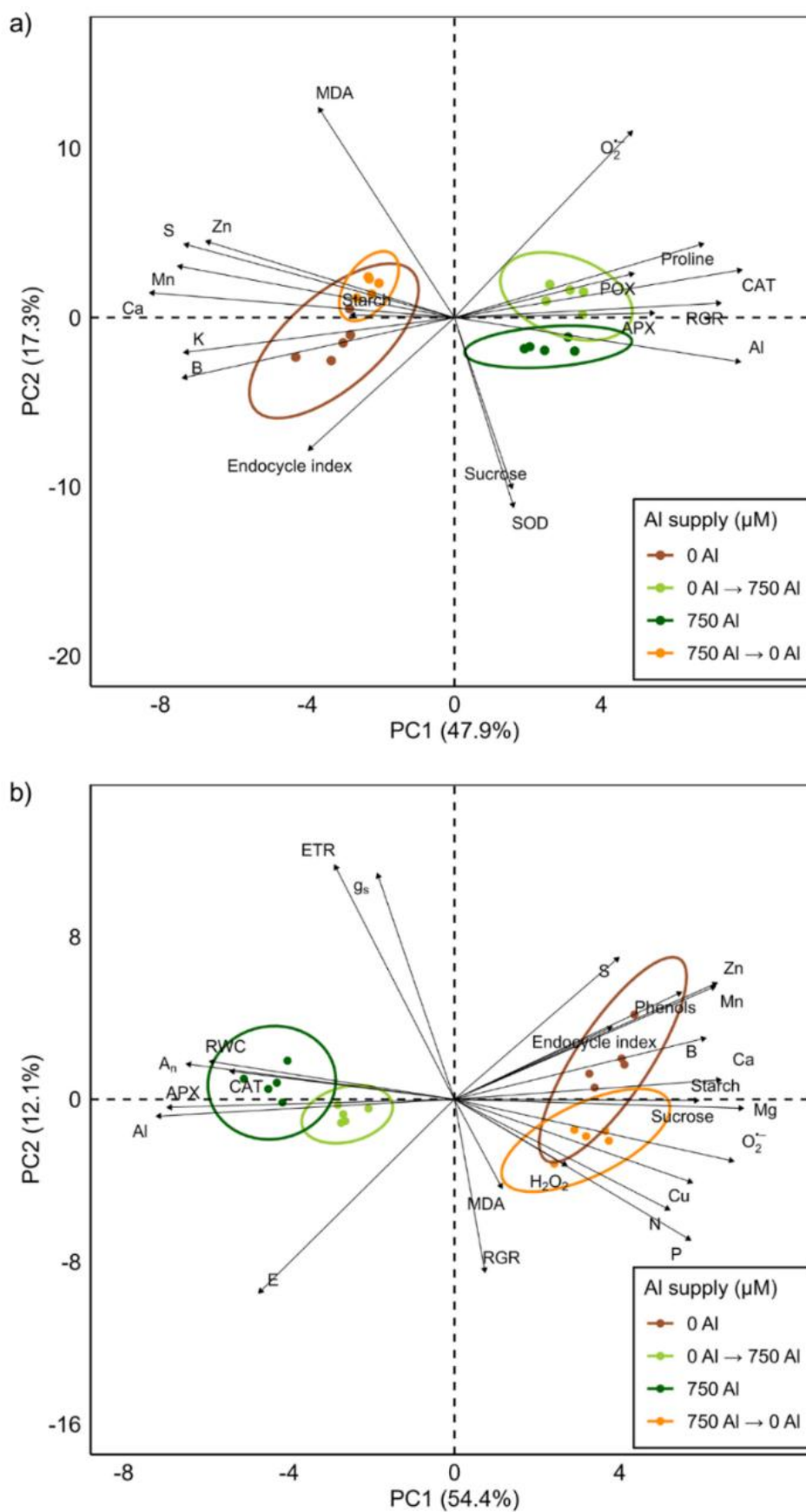


b)



2673 **Figura 16** - Grau de conectividade (a) e Coeficiente de Agrupamento (b) dentro da
 2674 rede de interação proteína-proteína de raízes de *Borreria latifolia* cultivada em

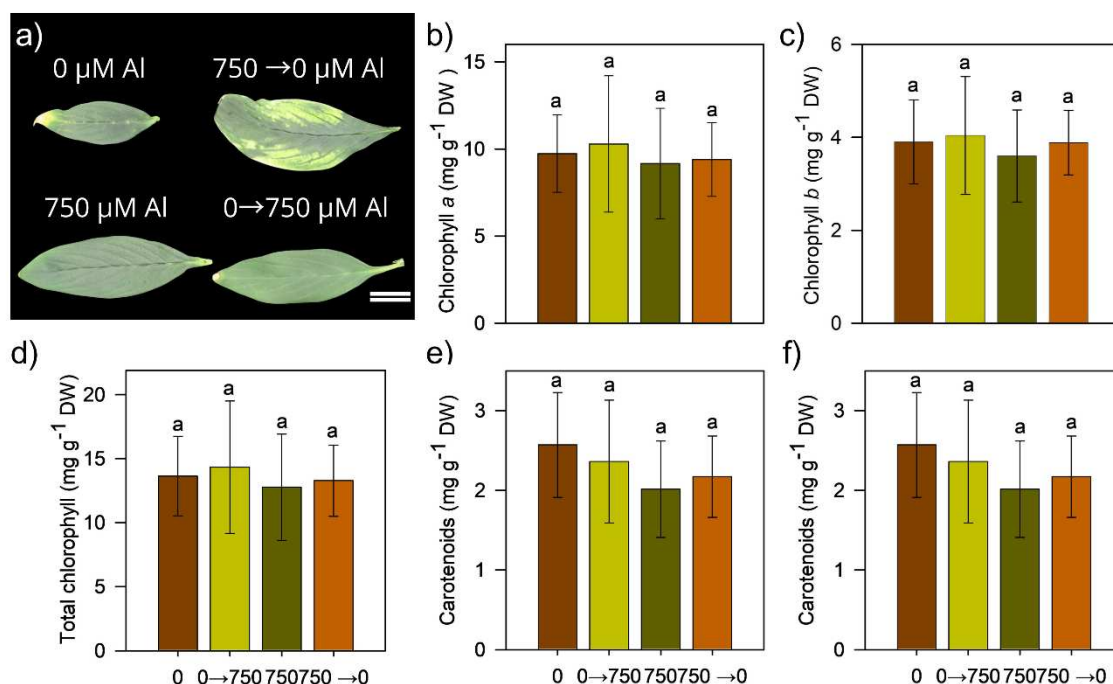
2675 hidroponia na ausência (0 μM) ou presença (750 μM) de Al por 57 dias. Valores mais
2676 próximo do grau máximo ($g = 32$), indicam proteínas centrais (*hubs*). Valor máximo do
2677 coeficiente de agrupamento para um nó = 1.



2678 **Figura 17** - Análise de Componentes Principais (PCA) para as variáveis significativas
 2679 ($p < 0,05$). PCA para as variáveis do sistema radicular (a) e das folhas (b) de *Borreria*

2680 *latifolia* cultivada conforme legenda descrita na figura 3. Pontos nos gráficos:
2681 repetições dos tratamentos. Elipses: região de confiança (95%) dos tratamentos.
2682 Direção das setas: indica para qual lado do gráfico a variável está mais associada.
2683 Comprimento das setas: importância ou contribuição da variável para a separação dos
2684 tratamentos nos componentes principais. Ângulo entre setas: correlação entre as
2685 variáveis. RGR: Taxa de Crescimento Relativo. A_n : taxa de assimilação líquida de CO₂.
2686 g_s : condutância estomática. ETR: taxa de transporte de elétrons. E : transpiração.
2687 WUE: eficiência do uso da água. RWC: conteúdo relativo de água. SOD: superóxido
2688 dismutase. CAT: catalase. POX: peroxidase. APX: peroxidase do ascorbato. MDA:
2689 malondialdeído. H₂O₂: peróxido de hidrogênio. O₂^{•-}: radical ânion superóxido.

MATERIAL SUPLEMENTAR



2690 **Figura S1** - Pigmentos de *Borreria latifolia* cultivada na ausência e, ou presença de
 2691 Al. Concentração de clorofila *a* (b), *b* (c), clorofila total (*a*+*b*) (d), relação clorofila *a*/*b*
 2692 (e) e carotenóides (f) nas folhas de *Borreria latifolia* coletada e tratada conforme
 2693 descrito na legenda da Fig. 1. Os dados são médias com desvio padrão representado
 2694 pelas barras verticais (n= 5 plantas). Letras representam diferenças entre os
 2695 tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Folhas coletados no segundo nó.

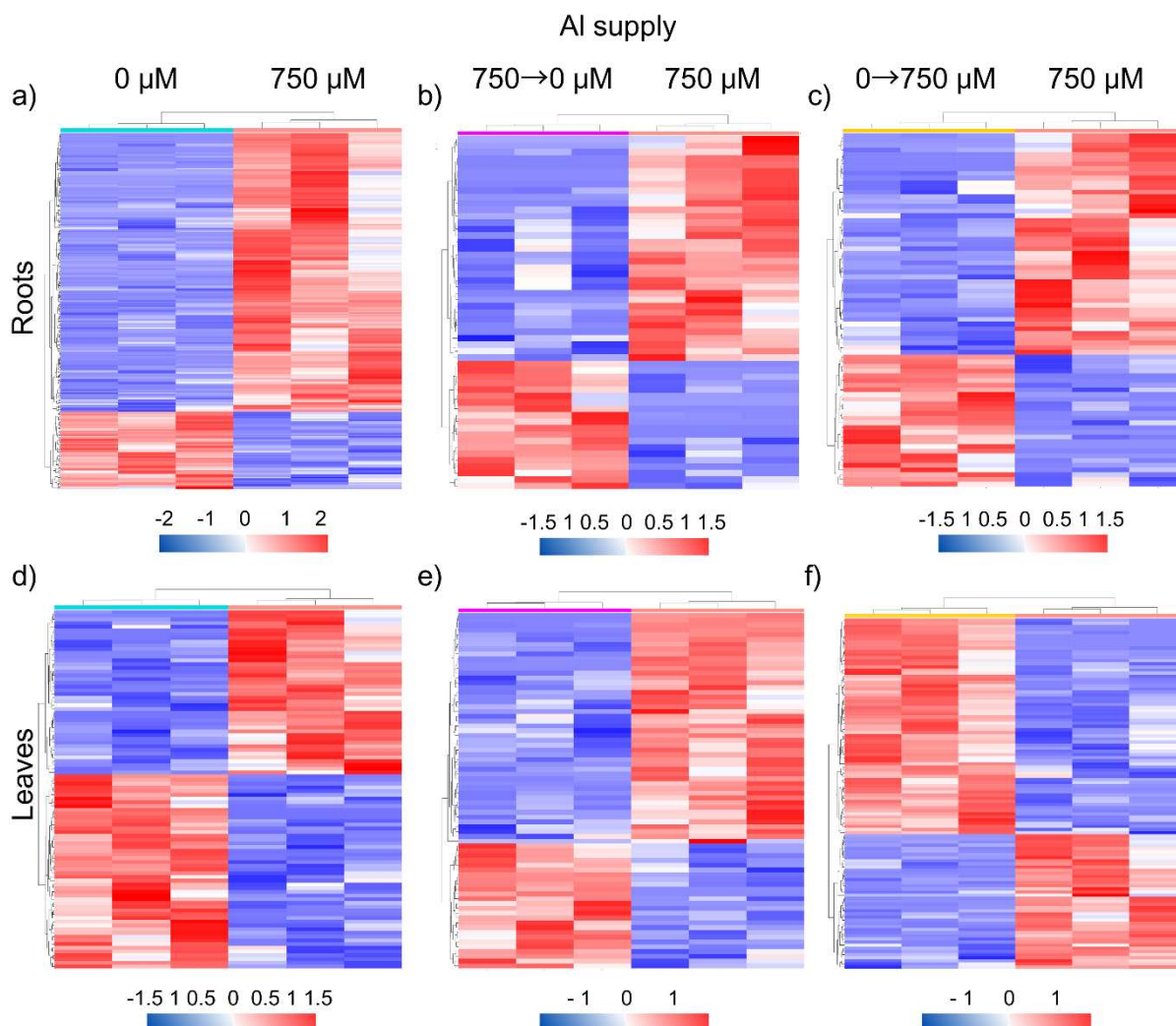


Figura S2 - Heatmap do padrão das proteínas diferencialmente acumuladas nas raízes (a, b, c) e folhas (d, e, f) de *Borreria latifolia* cultivada em hidroponia na ausência (0 μM) ou presença (750 μM) de Al por 57 dias, ou por 20 dias seguidos de adição (0 $\rightarrow$ 750 μM) ou privação (750 $\rightarrow$ 0 μM) de Al. Todos os contrastes foram feitos em relação à presença contínua de Al (750 μM). As três faixas verticais em cada tratamento se referem às réplicas biológicas. As barras de escala representam a abundância relativa, em que a cor azul representa menor abundância e a cor vermelha maior abundância. Branco representa ausência de alteração proteica. (n=3 plantas)

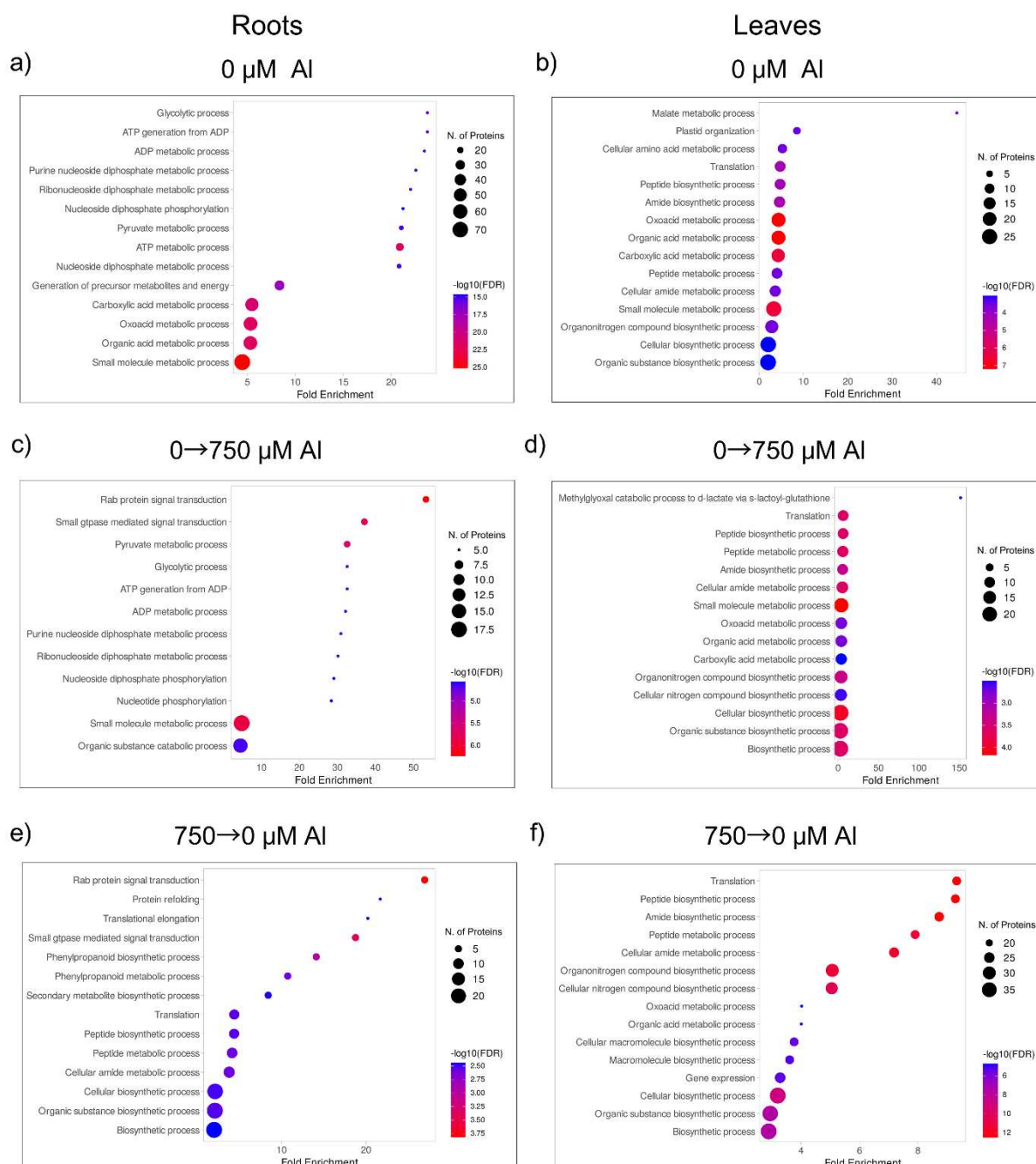


Figura S3 - Análise de enriquecimento funcional da Gene Ontology dos 15 principais termos GO de proteínas diferencialmente acumuladas nas raízes (a, c, e) e folhas (b, d, f) de *Borreria latifolia* cultivada em hidroponia na ausência (0 μ M) ou presença (750 μ M) de Al por 57 dias, ou por 20 dias seguidos de adição (0 $\rightarrow$ 750 μ M) ou privação (750 $\rightarrow$ 0 μ M) de Al. Dotplot de todos os 15 processos biológicos mais enriquecidos. Foram utilizadas ortólogos de *Coffea canephora* para análise de enriquecimento.

2 CONCLUSÃO GERAL

Pela primeira vez foi demonstrada a resposta de crescimento da herbácea *Borreria latifolia* a concentrações crescentes de Al. A concentração de 750 μM Al em pH igual a 4.5 é a condição ideal para o desenvolvimento das plantas em sistema de hidroponia. *B. latifolia* depende do metal para a diferenciação e morfogênese dos meristemas apicais radiculares e caulinares. Na ausência do Al, a planta não completa seu ciclo de vida, visto que os meristemas apicais são comprometidos. Nenhum elemento essencial é capaz de substituir o papel do Al na maximização da fotossíntese e modulação positiva das respostas antioxidantes. Outra contribuição inédita deste trabalho é a análise do perfil proteômico de *B. latifolia*. Nossos resultados mostraram que o Al é fundamental na regulação de proteínas exclusivas envolvidas na síntese de parede, controle do ciclo celular, crescimento de pelos radiculares e defesa contra estresses. Adicionalmente, na presença de Al, proteínas centrais do metabolismo energético são ativadas. Diante de todas as evidências relatadas, concluímos que o Al é um elemento essencial para *B. latifolia*. Considerando que esta planta precisa do Al para sobreviver, entendemos que seus mecanismos refinados de regulação molecular podem ser explorados para o melhoramento de culturas agrícolas para áreas subótimas, visando a expansão da produção em cultivos sustentáveis.