

**IVAN BECARI VIANA**

**AÇÃO DO ALUMÍNIO (Al) EM *Cococypselum aureum* (RUBIACEAE), ESPÉCIE  
DO CERRADO ACUMULADORA DE Al: UMA ABORDAGEM  
MORFOFISIOLÓGICA**

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

Orientadora: Aristéa Alves Azevedo

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2021**

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

T

V614a  
2021 Viana, Ivan Becari, 1989-  
Ação do alumínio (Al) em *Coccocypselum aureum*  
(Rubiaceae), espécie do cerrado acumuladora de Al: uma  
abordagem morfofisiológica / Ivan Becari Viana. – Viçosa, MG,  
2021.

1 tese eletrônica (65 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Aristéa Alves Azevedo.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Biologia Vegetal, 2021.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2021.203>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Coccocypselum aureum*. 2. Cerrados. 3. Plantas - Efeito  
do alumínio. I. Azevedo, Aristéa Alves, 1949-. II. Universidade  
Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa  
de Pós-Graduação em Botânica. III. Título.

CDD 22. ed. 583.93

Ativar o Winc  
Acesse Configura

Bibliotecário(a) responsável: Renata de Fátima Alves CRB6/2578

IVAN BECARI VIANA

**AÇÃO DO ALUMÍNIO (AL) EM *Cococypselum aureum* (RUBIACEAE), ESPÉCIE DO CERRADO ACUMULADORA DE AL: UMA ABORDAGEM MORFOFISIOLÓGICA**

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

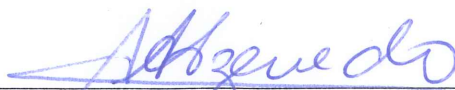
APROVADA: 21 de julho de 2021.

Assentimento:



---

Ivan Becari Viana  
Autor



---

Aristéa Alves Azevedo  
Orientadora

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por toda LUZ durante a caminhada.

A minha família. Base de toda trajetória.

À CAPES pela bolsa de doutorado.

À Universidade Federal de Viçosa por mais uma etapa de realização profissional.

Ao Departamento de Biologia Vegetal pela estrutura necessária para o desenvolvimento do trabalho.

A todos os professores do programa de Pós-Graduação em Botânica UFV pelos ensinamentos.

À professora Aristéa Alves Azevedo pelos anos de convivência, orientação e ensinamentos. Pelas oportunidades e bons momentos durante minha jornada acadêmica.

Ao professor Cléberon pela coorientação.

Ao professor Fábio da Mata pela disponibilidade de uso do laboratório e equipamentos.

À Doutora Danielle Santos Brito pela orientação nas análises bioquímicas e fisiológicas. Pela amizade construída.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

As técnicas Aurora, Patrícia e Rosana pela assistência técnica e amizade.

Ao Gilmar Valente pelas excursões de campo em Paraopeba-MG.

À administração e demais funcionários da FLONA de Paraopeba-MG.

Ana Paula (Aninha) pela parceria e amizade no decorrer do doutorado. Dias mais leves e felizes em meio ao trabalho.

Aos estagiários João Santana e Maria das Graças pela ajuda na montagem de experimentos e processamento de material.

Aos colegas da fisiologia vegetal pela ajuda na execução de protocolos

As amizades valiosas construídas ao longo desses anos no ambiente da anatomia vegetal. Sem citar nomes para não correr o risco de esquecer de ninguém!

Aos momentos de distração e boas risadas no cafezinho da anatomia vegetal.

Momento terapêutico do dia!

Ao Gleyson pela amizade e companheirismo. Por estar junto nessa caminhada.

À cidade de Viçosa por toda a vivência e amadurecimento. A UEMG-Unidade Carangola pelos novos desafios, vivências e realizações que se abrem em minha vida.

Obrigado!

*“Escrevo em um bilhete, ame tudo que puder, seja o que  
for, venha o que vier”*  
(Bilhetes- Tiago Iorc)

## BIOGRAFIA

Ivan Becari Viana, filho de Maria Becari Viana e Osvaldo Viana, nasceu em Guiricema, Minas Gerais, em 07 de setembro de 1989.

Cursou o ensino fundamental e médio na Escola Estadual Prefeito Antônio Arruda, em Guiricema, Minas Gerais, durante o período de 2001-2007. Foi aluno da primeira turma do curso noturno de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa com ingresso em março de 2009. Obteve o título de licenciado em Ciências Biológicas em julho de 2013. Durante a graduação, participou de atividades de pesquisa, ensino e extensão. Dentre as principais, destacam-se as como bolsista de extensão pelo Departamento de Biologia Vegetal (PIBEX), bolsista pelo Programa Institucional de Bolsas de Iniciação à Docência (PIBID) e bolsista de iniciação científica (FAPEMIG) no laboratório de anatomia vegetal, onde trabalhou na linha de pesquisa de respostas morfofisiológicas de poluentes em plantas.

Em agosto de 2013 iniciou o mestrado no programa de Pós-Graduação em Botânica do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, concluindo o curso em agosto de 2015 com dissertação intitulada “Estudo morfoanatômico do rizoma em Dennstaedtiaceae (Pteridophyta). Em julho de 2015 tomou posse como professor efetivo de Ciências e Biologia na Escola Estadual São José, no município de Ubá, Minas Gerais. Em janeiro de 2016 foi removido (a pedido) para Escola Estadual Emílio Jardim, Coimbra-MG, assumindo de forma concomitante, como professor designado na Escola Estadual Capitão Arnaldo Dias Andrade, Cajuri-MG.

Ingressou no curso de doutorado em Botânica em agosto de 2016, ocasião na qual exonerou-se do cargo de professor da educação básica. Durante o doutorado trabalhou na linha de pesquisa mecanismos de resistência de plantas nativas do cerrado ao alumínio. Em março de 2020 assumiu como professor efetivo da educação superior da área de Botânica na Universidade do Estado de Minas Gerais – Unidade Carangola. Em julho de 2021 defendeu a tese intitulada “ Ação do alumínio (Al) em *Cocccypselum aureum* (Rubiaceae), espécie do cerrado acumuladora de Al: uma abordagem morfofisiológica”.

## RESUMO

VIANA, Ivan Becari, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2021. **Ação do alumínio (Al) em *Coccolpsetum aureum* (Rubiaceae), espécie do cerrado acumuladora de Al: uma abordagem morfofisiológica.** Orientadora: Aristéa Alves Azevedo.

Os efeitos do Al sobre espécies nativas acumuladoras de Al como *Coccolpsetum aureum* (Rubiaceae), herbácea que cresce em solos do cerrado, ainda são pouco compreendidos. Neste estudo foi avaliado os efeitos do Al sobre parâmetros morfológicos anatômicos, bioquímicos e fisiológicos de *C. aureum* a fim de verificar se o Al é um elemento benéfico para a espécie e atua como estimulante no metabolismo primário e secundário. Indivíduos de *C. aureum* foram coletados em solo do cerrado e submetidos por 60 dias aos seguintes tratamentos em hidroponia: tratamento 1 sem Al por 60 dias; tratamento 2 sem Al durante 30 dias e 500  $\mu\text{M}$  de Al por 30 dias subsequentes e tratamento 3 com 250  $\mu\text{M}$  de Al nos primeiros 30 dias e 500  $\mu\text{M}$  por mais 30 dias. No tratamento 1 após 60 dias de ausência de Al, as plantas de *C. aureum* apresentaram nas folhas cloroses e necroses, e na raiz, região do meristema apical, células com citoplasma e núcleo pouco densos o que esteve relacionado a elevada concentração de Zn nesse órgão. Plantas do tratamento 2 exibiram nos primeiros 30 dias a ocorrência de necroses e cloroses foliares, porém após a adição de Al nos 30 dias subsequentes houve uma total recuperação da parte aérea, além de um maior crescimento radicular. Em plantas do tratamento 3 após 60 dias, foram verificados os menores teores nutricionais, o menor crescimento radicular e produção de folhas, porém ainda assim, com aspecto morfológico sadio. No mesmo período de tempo, um destacamento de células semelhantes a células de borda próximo a região apical foi observado em ambos tratamentos com Al. Houve acúmulo do metal na epiderme (exceto folha), tecidos fundamentais e células do floema na raiz, caule e folha. Adicionalmente, acúmulo de Al também foi registrado em coléteres. Nas análises bioquímicas e fisiológicas, realizadas para os tratamentos 1 e 2, foi verificado que após 30 dias da adição de Al, as plantas do tratamento 2 apresentaram maior teor de clorofila *a* e *b*, maior taxa de fotossíntese, condutância estomática, transpiração e as maiores concentrações de glicose, frutose, amido na raiz e de proteínas na raiz e na folha. Apenas a concentração de sacarose foi superior na folha na ausência de Al.

Ainda no tratamento 2 houve maior eficiência fotoquímica do PSII em 24, 48 h e 30 dias, após adição de Al, e um incremento significativo na taxa de transporte de elétrons em 48h e, em especial, aos 30 dias. Neste mesmo período, plantas do tratamento 2 também apresentaram maior produção de compostos fenólicos na raiz e na folha, sendo que na folha ocorreu uma sobreposição dos sítios de acúmulo de Al com fenólicos e alcaloides. Adicionalmente, na presença do metal aos 30 dias, houve aumento na abundância relativa de Al na raiz, no caule e na folha e de N, K, Mg e Fe na folha, de Fe e Cu no caule e P, S, Cu e Zn na raiz. Assim, concluímos que as plantas de *C. aureum* não se desenvolvem normalmente na ausência de Al e apresentam um desenvolvimento mais saudável na presença desse elemento, principalmente a folha, embora esse desenvolvimento tenha sido mais lento. Portanto, como já documentado para outras espécies acumuladoras de Al de diferentes famílias botânicas, o Al exerce uma ação benéfica sobre a espécie *C. aureum*.

Palavras-chave: Herbácea. Cerrado. Acúmulo de Al.

## ABSTRACT

BECARI-VIANA, Ivan, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2021. **Action of Aluminum (Al) on *Cocccypselum aureum* (Rubiaceae), a species from the Al-accumulating cerrado: a morphophysiological approach.** Advisor: Aristéa Alves Azevedo.

The effects of aluminum (Al) on native species that accumulate this element, such as *Cocccypselum aureum* (Rubiaceae), an herbaceous plant that grows in Cerrado soils, are still poorly understood. This study evaluated the effects of Al on morphological, anatomical, biochemical and physiological parameters of *C. aureum* in order to verify if Al is a beneficial element for this species and acts as a stimulant in primary and secondary metabolism. Individuals of *C. aureum* were collected in Cerrado soil and submitted to the following treatments in hydroponics for 60 days: treatment 1 - without Al for 60 days; treatment 2 - without Al for 30 days and with 500  $\mu\text{M}$  of Al for the subsequent 30 days; and treatment 3 - with 250  $\mu\text{M}$  of Al for 30 days and with 500  $\mu\text{M}$  for the subsequent 30 days. In treatment 1, after 60 days of absence of Al, *C. aureum* plants presented chlorosis and necrosis in leaves and cells with low density cytoplasm and nucleus in the region of the apical meristem of the root. Plants of treatment 2 exhibited, in the first 30 days, leaf necrosis and chlorosis, but after the addition of Al during the subsequent 30 days there was full recovery of this symptomatology, in addition to greater root growth. Treatment 3 plants, after 60 days, had the lowest nutritional levels, lowest root growth and lowest leaf production, which presented a healthy morphology appearance. A detachment of cells, similar to border cells, near the apical region of the root was observed in both Al treatments. There was an accumulation of metal in the epidermis (except leaf), fundamental tissues and phloem cells in the root, stem and leaf, as well as in collenchyma. Biochemical and physiological analyses carried out for treatments 1 and 2 revealed that, 30 days after the addition of Al, plants in treatment 2 had higher chlorophyll *a* and *b* content; higher photosynthesis rate, stomatal conductance and transpiration; and higher concentrations glucose, fructose and starch in the root and protein in root and leaf. Only the concentration of sucrose was higher, and only in the leaf, in the absence of Al. Also in treatment 2, there was higher photochemical efficiency of PSII at 24, 48 h and 30 days after Al addition, and a significant increase in the rate of electron transport at 48h and, in particular, at

30 days. In the same period, plants from treatment 2 also showed higher production of phenolic compounds in root and leaf, and there was an overlap of Al accumulation sites with phenolics and alkaloids in the leaf. Additionally, in the presence of Al for 30 days, there was an increase in the relative abundance of Al in root, stem and leaf and of N, K, Mg and Fe in leaf, Fe and Cu in stem and P, S, Cu and Zn in root. Thus, we conclude that *C. aureum* plants do not develop normally in the absence of Al and have healthier development in the presence of this element, especially the leaf, although this development was slower. Therefore, as has been documented for Al-accumulating species from different botanical families, Al exerts a beneficial action on the species *C. aureum*.

Keywords: Herbaceous. Cerrado. Al accumulation.

## SUMÁRIO

|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| 1. Introdução geral .....           | 12 |
| 2. Referências bibliográficas ..... | 15 |
| 3. Considerações finais.....        | 65 |

### CAPÍTULO 1

Alumínio: um elemento benéfico para *Coccocypselum aureum* (Rubiaceae)?

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| 1. Resumo.....              | 18 |
| 2. Abstract.....            | 19 |
| 3. Introdução .....         | 20 |
| 4. Material e métodos ..... | 22 |
| 5. Resultados .....         | 25 |
| 6. Discussão .....          | 28 |
| 7. Conclusão .....          | 32 |
| 8. Referências.....         | 32 |

### CAPÍTULO 2

Alumínio induz respostas fisiológicas benéficas na espécie do Cerrado  
*Coccocypselum aureum* (Rubiaceae)

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| 1. Resumo.....              | 45 |
| 2. Abstract.....            | 46 |
| 3. Introdução .....         | 47 |
| 4. Material e métodos ..... | 48 |
| 5. Resultados .....         | 51 |
| 6. Discussão .....          | 53 |
| 7 Conclusão .....           | 55 |
| 8. Referências.....         | 56 |

## Introução geral

O alumínio (Al) é um elemento metálico e corresponde a 7% da massa da crosta terrestre (Brunner e Sperisen, 2013; Singh et al., 2017). É o terceiro elemento em termos de abundância, atrás apenas do oxigênio e do silício (Sade et al., 2016). Como constituinte dos solos minerais, sua presença pode ser notificada em diferentes formas de vida (Poschenrieder, 2008), sendo que, no entanto, nenhuma função biológica foi atribuída a esse elemento (Schmitt et al., 2016). A maior parte do Al no solo está fixado em minerais ou ligado à superfície de partículas como óxidos e aluminos silicatos (Grevenstuk e Romano, 2013), porém em solos ácidos (pH abaixo de 5,0) o elemento passa por um processo de solubilização havendo a liberação de cátions trivalentes ( $Al^{3+}$ ), forma fitotóxica para grande maioria das plantas. Solos ácidos e com alta concentração de  $Al^{3+}$  possuem uma ampla distribuição mundial em regiões tropicais e subtropicais (Brunner e Sperisen, 2013).

Além dos solos naturalmente ácidos, nos últimos anos em todo o mundo o intensivo uso de fertilizantes por setores da produção agrícola e a ocorrência de chuvas ácidas, dada a maior liberação de gases tóxicos na atmosfera, têm contribuído para a intensificação de processos de acidificação (Singh et al., 2017). A solubilização da forma tóxica  $Al^{3+}$  para a solução do solo, mesmo que em baixa concentração, é o suficiente para promover o comprometimento de várias funções fisiológicas e metabólicas das plantas (Grevenstuk e Romano, 2013; Singh et al., 2017) e reduzir a produtividade das culturas.

Devido ao contato direto com solo, a raiz é o órgão vegetal que apresenta os primeiros e maiores efeitos tóxicos provocados pelo Al (Kopittke et al., 2008). Dentre esses efeitos podem ser destacados a redução do crescimento com a inibição da formação de raízes laterais e pelos radiculares, atrofia, alteração de cor e engrossamento (Kochian et al., 2004; Doncheva et al., 2005). O Al também interfere na absorção ou transporte de diferentes nutrientes como Ca, K, P, Mg, Fe e N (Silva et al., 2010; Bityutskii et al., 2017; Zhao e Shen, 2018), além de promover um aumento da produção de mucilagem por células da borda (Cai et al., 2011; Okamoto e Yano, 2017). Na parte aérea, a principal sintomatologia da fitoxidade do Al consiste em deficiência nutricional, clorose e necrose foliar, redução da abertura estomática, da respiração e da taxa fotossintética com consequente perda de biomassa (Nunes-Nesi et al., 2014). Além disso, o Al induz aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), da peroxidação de fosfolípídeos (Ezaki et al., 2000; Yamamoto et al., 2002; Wang e Yang, 2005), das enzimas do sistema antioxidativo, dos ácidos orgânicos, dos compostos fenólicos, dentre outros (Matsumoto e Motoda, 2012; Ezaki et al., 2013).

Os mecanismos de resistência ao Al são variáveis entre as espécies e podem ser classificados como mecanismos de exclusão, presente em espécies exclusoras e mecanismos de tolerância em espécies acumuladoras (Brunner e Sperisen, 2013; Kochian et al., 2015). Através dos mecanismos de exclusão, a planta impede que o Al entre no apoplasto e simplasto do sistema radicular (Grevenstuk e Romano, 2013; Kochian et al., 2015). Esses mecanismos envolvem principalmente a liberação de ácidos orgânicos e compostos fenólicos para a rizosfera. Mecanismos de tolerância, por sua vez, são ativados com a entrada de Al na planta e envolvem a desintoxicação e sequestro do elemento através da complexação com ácidos orgânicos, proteínas, fenólicos e outros ligantes orgânicos e seu armazenamento no vacúolo ou na parede celular (Grevenstuk e Romano, 2013; Kochian et al., 2015). A complexação do Al com ácidos orgânicos, principalmente malato, fumarato e citrato, tem sido descrita como um mecanismo comum entre espécies agricultáveis, sendo ainda, pouco entendido e estudado entre espécies nativas. Além dos ácidos orgânicos, a complexação do Al com compostos fenólicos, como as catequinas, tem sido apontada como um importante mecanismo de tolerância ao Al (Nagata et al., 1992; Grevenstuk e Romano, 2013; Zhang et al., 2016).

Embora o Al seja fitotóxico para a maioria das plantas e responsável pela geração de diversos distúrbios no corpo dos vegetais, esse elemento tem sido considerado benéfico para algumas espécies, especialmente nativas de solos ácidos (Bojórquez-Quintal et al., 2017; Muhammad et al., 2019). O estímulo do crescimento da raiz e parte aérea tem sido observado entre espécies nativas quando submetidas a baixas concentrações do elemento, assim como a melhoria da absorção de alguns nutrientes tais como nitrogênio, fósforo, potássio e magnésio (Bojórquez-Quintal et al., 2017). Espécies acumuladoras de Al podem apresentar aumento da taxa fotossintética, produção de biomassa, bem como ativação de defesas antioxidativas, além de maior tolerância aos ataques de herbívoros e patógenos (Watanabe et al., 2006; Hajiboland et al., 2013; Kaur et al., 2016; Liu et al., 2020).

Espécies nativas ou ocorrentes no domínio do cerrado, domínio da área central do Brasil, conseguem prosperar em solos ácidos e com alta disponibilidade de Al (Haridasan, 1988; Andrade et al., 2011; Malta et al., 2016). A vegetação do cerrado é diversa, especialmente no estrato herbáceo, e encontra-se adaptada a condição de altas concentrações de Al disponível, seja por mecanismos de exclusão ou de acúmulo, ou ambos. Em se tratando de espécies acumuladoras, ainda é desconhecido se o Al atua como benéfico para as espécies desse ambiente. Foi demonstrado que *Miconia albicans* (Melastomataceae) e *Vochysia thyrsoidea* (Vochysiaceae), ambas do cerrado, apresentam inibição do crescimento da parte aérea na

ausência de Al e estímulo do crescimento na presença do mesmo (Haridasan, 1988). Em linhas gerais, há um desconhecimento sobre a influência do Al no desenvolvimento de plantas nativas ou ocorrentes no cerrado, em particular entre plantas herbáceas, dado que a maioria dos estudos têm contemplado espécies arbóreas. Rubiaceae é uma das famílias mais representativas do estrato herbáceo (Chaves et al., 2012; Paro, 2013) e possui espécies tipicamente acumuladoras de Al, principalmente espécies da subfamília Rubioideae (Jansen et al., 2002). Estudos do nosso grupo de pesquisa (dados não publicados) têm indicado que o Al é um elemento necessário para o desenvolvimento normal dos primórdios foliares em *Borreria latifolia*, Rubiaceae herbácea hiperacumuladora de Al ocorrente no cerrado, mas ainda pouco se conhece dos efeitos do Al para outras espécies da família.

A investigação de mecanismos de resistência ao Al em plantas nativas encontra alguns desafios. Dentre eles, cabe destacar as limitações e dificuldades em pesquisas que envolvam estudo em campo principalmente se o objetivo consiste em amostrar as raízes. Em razão disso, estudos em casa de vegetação utilizando técnicas de hidroponia são fundamentais, pois permitem com mais facilidade a coleta das raízes e a uma padronização das condições do ambiente. Adicionalmente, espécies nativas requerem condições nutricionais muito específicas e ainda pouco conhecidas. Assim, a seleção de espécies que se aclimatem ao cultivo em hidroponia é uma etapa fundamental para êxito em pesquisas com esse interesse.

*Coccocypselum aureum* é uma espécie herbácea da família Rubiaceae (subfamília Rubioideae), de ciclo de vida anual, caracterizada morfológicamente pelos frutos de cor azul e por coléteres estipulares (Kuhlmann, 2018). É uma espécie acumuladora de Al (cerca 5 g.kg<sup>-1</sup> de Al nas folhas) que cresce em solos do cerrado brasileiro, principalmente em áreas de cerrado sensu-stricto (Castro, 2013). A subfamília Rubioideae é definida filogeneticamente como acumuladora de Al (Jansen et al., 2000, 2002). Com exceção de *Coccocypselum guianensis*, todas as 30 espécies estudadas do gênero são acumuladoras de Al (Jansen et al., 2000). A evolução do acúmulo de Al nessa subfamília e em especial no gênero *Coccocypselum* coloca em discussão se o metal desempenha alguma função no seu desenvolvimento.

Em nossos estudos preliminares, *C. aureum* apresentou uma boa aclimação em sistema hidropônico e um estímulo do crescimento na presença de Al, no entanto os mecanismos responsáveis pelo crescimento, bem como de resistência ao elemento ainda não foram elucidados. A subfamília Rubioideae a qual *C. aureum* pertence, além de tipicamente acumuladora de Al, produz diversos metabólitos secundários da classe dos alcaloides e compostos fenólicos (Martin e Nunez, 2015). No entanto, em espécies dessa subfamília, não

existe nenhuma associação do papel dos fenólicos e em especial dos alcaloides na resistência ao metal.

Nesta pesquisa nós apresentamos os resultados obtidos com indivíduos de *C. aureum* submetidos em sistema hidropônico a condições de cultivo sem e com Al na solução nutritiva. Os resultados da pesquisa estão apresentados em dois capítulos:

**Capítulo 1:** Alumínio: um elemento benéfico para *Coccocypselum aureum* (Rubiaceae)?

**Capítulo 2:** Alumínio induz respostas fisiológicas benéficas na espécie do Cerrado *Coccocypselum aureum* (Rubiaceae)

No primeiro capítulo foi avaliado o efeito do Al sobre a morfonomia e o crescimento de *C. aureum* e trabalhamos com a hipótese de que o Al é um elemento benéfico para a espécie. No segundo capítulo caracterizamos alguns mecanismos fisiológicos e bioquímicos subjacentes aos efeitos do Al e trabalhamos com hipótese de que este elemento atua como estimulante no metabolismo primário e secundário de *C. aureum*.

Os objetivos específicos desta pesquisa foram:

- Caracterizar os efeitos do Al sobre a morfologia e anatomia da raiz e parte aérea;
- Avaliar os efeitos do Al sobre o crescimento da raiz e parte aérea;
- Investigar ocorrência de morte celular na folha;
- Identificar os sítios de acúmulo de Al nos tecidos da raiz, caule e folha;
- Analisar a influência do Al sobre a nutrição mineral de macro e micronutrientes;
- Analisar os efeitos do Al sobre as trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*, bem como dos pigmentos clorofila *a* e *b*;
- Mensurar o efeito do Al sobre parâmetros bioquímicos tais como os teores de açúcares, amido e proteínas;
- Quantificar compostos fenólicos e localizar seus sítios de acúmulo;
- Localizar sítios de acúmulo de alcaloides.

### Referências bibliográficas

Andrade L.R.M., Barros L.M.G., Echevarria G.F., Amaral L.I.V., Cotta M.G., Rossatto D.R., Haridasan F.A.C. (2011). Al-hyperaccumulator Vochysiaceae from the Brazilian Cerrado store aluminum in their chloroplasts without apparent damage. *Environmental and Experimental Botany*: 70: 37-42.

Bojórquez-Quintal E., Escalante-Magaña C., Echevarria-Machado I., Martínez-Estévez M. (2017). Aluminum, a friend or foe of higher plants in acid soils. *Frontiers in Plant Science* 8: 1-18.

Brunner I., Sperisen C. (2013). Aluminum exclusion and aluminum tolerance in wood plants. *Frontiers in Plant Science* 4: 1-12.

- Cai M-Z., Wang F-M., Li R-F., Zhang S-N., Wang N., Xu G-D. (2011). Response and tolerance of root border cells to aluminum toxicity in soybean seedlings. *Journal of Inorganic Biochemistry* 105: 966-971.
- Castro, L.M.R. (2013). Anatomia e histolocalização de alumínio em espécies herbáceas e Sub-arbustivas do Cerrado. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa.
- Chaves E., Soares-Silva L.H. (2012). Floristic Survey of the Herbaceous-Shrub Layer of a Gallery Forest in Alto Paraíso de Goiás - Go, Brazil. *Brazilian archives of biology and technology* 55:715-724.
- Doncheva S., Amenós M., Poschenrieder C., Barceló J. (2005). Root cell patterning: a primary target for aluminium toxicity in maize. *Journal of Experimental Botany* 56: 1213-1220.
- Ezaki B., Jayaram K., Higashi A., Takahashi K. (2013). A combination of five mechanisms confers a high tolerance for aluminum to a wild species of Poaceae, *Anthropogony virginicus* L. *Environmental and Experimental Botany* 93: 35-44.
- Ezaki B., Gardner R.C., Ezaki Y., Matsumoto H. (2000). Expression of Aluminum-Induced genes in transgenic *Arabidopsis* plants can ameliorate aluminum stress and/or oxidative stress. *Plant Physiology* 122: 657-665.
- Grevenstuck T., Romano A. (2013). Aluminium speciation and internal detoxification mechanisms in plants: where do we stand? *Metallomics* 5: 1584-1594.
- Haridasan M. (1988). Performance of *Miconia albicans* (sw.) Triana, na aluminum accumulating species, in acidic and calcareous soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 19: 7-12, 1091-1103.
- Hajiboland R., Rad S.B., Barceló J., Poschenrieder C. (2013a). Mechanisms of aluminum-induced growth stimulation in tea (*Camellia sinensis*). *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 176: 616-625.
- Jansen S., Broadley M.R., Robbrecht E., Smets E. (2002). Aluminum hyperaccumulation in Angiosperms: a review of its phylogenetic significance. *The Botanical Review* 68: 235-269.
- Jansen S., Dessein S., Piesschaert F., Robbrecht E., Smets E. (2000). Aluminium Accumulation in Leaves of Rubiaceae: Systematic and Phylogenetic Implications. *Annals of Botany* 85: 91-101.
- Kaur S., Kaur N., Siddique K. H. M., Nayyar H. (2016). Beneficial elements for agricultural crops and their functional relevance in defense against stresses. *Archives Agronomy and Soil Science* 62: 905-920.
- Kochian L.V., Piñeros M.A., Liu J., Magalhaes J.V. (2015). Plant Adaptation to Acid Soils: The Molecular Basis for Crop Aluminum Resistance. *Annual Review of Plant Biology* 66: 571-598.
- Kochian L.V., Hoekenga O.A., Pineros M.A. (2004). How do crop plants tolerate acid soil? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous deficiency. *Annual Review of Plant Biology* 55: 459-493.
- Kopittke P.M., Blamey F.P.C., Menzies N.W. (2008) Toxicities of soluble Al, Cu, and La include ruptures to rhizodermal and root cortical cells of cowpea. *Plant Soil* 303:217-227.
- Kuhlmann M. (2018). Frutos e sementes do Cerrado. Ipsis Gráfica e Editora, Santo André.
- Liu Y., Tao J., Cao J., Zeng Y., Li X., Ma J., Huang Z., Jiang M., Sun L. (2020). The Beneficial Effects of Aluminum on the Plant Growth in *Camellia japonica*. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00251-9>.
- Martins D., Nunez C.V. (2015). Secondary Metabolites from Rubiaceae Species. *Molecules* 20: 13422-13495.
- Matsumoto H., Motoda H. (2012). A chemical spot-test for aluminum and its value in woods identification in root apices. Possible association with oxidative stress. *Plant Science* 185: 1-8.
- Malta P.G., Arcanjo-Silva S., Ribeiro C., Campos N.V., Azevedo A.A. (2016). *Rudgea viburnoides* (Rubiaceae) overcomes the low soil fertility of the Brazilian Cerrado and hyperaccumulates aluminum in cell walls and chloroplast. *Plant Soil* 408:369-384.
- Muhammad N., Zvobgo G., Guo-ping Z. (2019). The beneficial effects and possible mechanisms of aluminum on plant growth in acidic soil. *Journal of Integrative Agriculture* 18: 1518-1528.

- Nagata T., Hayatsu M., Kosuge N. (1992). Identification aluminum forms in tea leaves by  $^{27}\text{Al}$  NMR. *Phytochemistry* 31:1215-1218.
- Nunes-Nesi, A., Brito D. S., Inostroza-Blancheteau, C., Fernie A. R., Araújo W. L. (2014). The complex role of mitochondrial metabolism in plant aluminum resistance. *Trends in Plant Science* 19: 399-407.
- Okamoto K., Yano K. (2017). Al resistance and mechanical impedance to roots in *Zea mays*: Reduced Al toxicity via enhanced mucilage production. *Rhizosphere* 3: 60-66.
- Paro, S.P. (2013). A influência de fatores abióticos na diversidade de espécies do estrato herbáceo-subabustivo em cerrado, Flona de Paraopeba, MG. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa
- Poschenrieder C., Gunsé B., Corrales I., Barceló J. (2008). A glance into aluminum toxicity and resistance in plants. *Science of the Total Environment* 400:356-368.
- Sade H., Meriga B., Surapu V., Gadi J., Sunita MSL., Suravajhala P., Kishor P.B.K. (2016). Toxicity and tolerance of aluminum in plants: Tailoring plants to suit to acid soils. *Biometals* 29:187-210.
- Schmitt M., Boras S., Tjoa A., Watanabe T., Jansen, S. (2016). Aluminium accumulation and intra-tree distribution patterns in three arbor aluminosa (*Symplocos*) species from Central Sulawesi. *PLOS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0149078.
- Silva S., Pinto-Carnide O., Martins-Lopes P., Matos M., Guedes-Pinto H., Santos C. (2010). Differential aluminium changes on nutrient accumulation and root differentiation in an Al sensitive vs. tolerant wheat. *Environmental and Experimental Botany* 68: 91-98.
- Singh S., Tripathi D.K., Singh S., Sharma S., Dubey N.K., Chauhana D.K., Vaculík M. (2017). Toxicity of aluminium on various levels of plant cells and organism: A review. *Environmental and Experimental Botany* 137: 177-193.
- Wang Y-S., Yang Z-M. (2005). Nitric Oxide Reduces Aluminum toxicity by preventing oxidative stress in the roots of *Cassia tora* L. *Plant Cell Physiology* 46: 1915-1923.
- Watanabe T., Jansen S., Osaki M. (2006). Al-Fe interactions and growth enhancement in *Melastoma malabathricum* and *Miscanthus sinensis* dominating acid sulphate soils. *Plant, Cell and Environment* 29: 2124-2132.
- Yamamoto Y., Kobayashi Y., Devi S.R., Rikiishi S., Matsumoto H. (2002). Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiology* 128: 63-72.
- Zhao X.Q., Shen R.F. (2018). Aluminum-Nitrogen interactions in the soil-plant system. *Frontiers in Plant Science* 9:1-15.
- Zhang L., Liu R., Gung B.W., Tindall S., Gonzalez J.M., Halvorson J.J., Hagerman A.E. (2016). Polyphenol-Aluminum Complex Formation: Implications for Aluminum Tolerance in Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64: 3025-3033.

## CAPÍTULO 1

### **Alumínio: um elemento benéfico para *Coccocypselum aureum* (Rubiaceae)?**

#### **Resumo**

Embora o alumínio (Al) seja um elemento fitotóxico para muitas plantas, existe uma diversidade de espécies nativas, acumuladoras ou não de Al, que crescem em regiões de solos ácidos e com disponibilidade do metal. Os efeitos do Al sobre espécies nativas acumuladoras como *Coccocypselum aureum* (Rubiaceae), herbácea que cresce em solos do cerrado, ainda são pouco compreendidos. Indivíduos de *C. aureum*, coletados em solo de cerrado, foram cultivados em sistema de hidroponia na ausência de Al e em diferentes concentrações do elemento a fim de investigar a ação do Al sobre o desenvolvimento da espécie. Na ausência de Al plantas de *C. aureum* apresentaram cloroses e necroses foliares, havendo uma total recuperação da parte aérea e maior crescimento radicular quando o Al foi adicionado ao cultivo. Plantas que cresceram durante todo período experimental na presença de Al apresentaram os menores teores nutricionais, a menor produção de folhas e crescimento radicular, mas permaneceram com aspecto morfológico sadio. No tratamento sem Al o meristema apical radicular apresentou células com citoplasma e núcleo menos densos o que provavelmente está relacionado com a elevada concentração de Zn na raiz. Sugerimos que o Al possa aliviar possíveis efeitos tóxicos do Zn em *C. aureum*. Um destacamento de células semelhantes a células de borda próximo a região apical foi observado na presença de Al. Os locais de acúmulo desse elemento foram epiderme (exceto folha), tecidos fundamentais e células do floema na raiz, caule e folha. Coléteres estão envolvidos no acúmulo e secreção de Al, o que indica a participação dessa estrutura secretora na tolerância ao metal. O desenvolvimento foliar normal de *C. aureum* na presença de Al pode estar relacionado a menor concentração de Ca na folha, indicando que a espécie seja calcífuga. Assim como relatado para outras espécies, *C. aureum* depende do Al para o desenvolvimento normal das folhas. Ressaltamos que análises bioquímicas e estudos ultraestruturais serão essenciais para melhor esclarecer a ação do Al em *C. aureum*.

**Palavras-chave:** Cerrado, herbácea do cerrado, acúmulo de Al, coléteres

## CHAPTER 1

### **Aluminum: a beneficial element for *Coccocypselum aureum* (Rubiaceae)?**

#### **Abstract**

Although aluminum (Al) is a phytotoxic element for many plants, there is a diversity of native species, Al-accumulating or not, which grow in regions with acidic soils and with high availability of the metal. The effects of Al on native herbaceous Al-accumulating species, such as *Coccocypselum aureum* (Rubiaceae), which grows in Cerrado soils, are still poorly understood. Individuals of *C. aureum* collected in Cerrado soil were cultivated in a hydroponics system in the absence of Al and in different concentrations of the element in order to investigate the action of this element on the development of the species. In the absence of Al, *C. aureum* plants showed chlorosis and leaf necrosis, with total shoot recovery and greater root growth when Al was added to the nutrient solution. Plants that grew during the entire experimental period in the presence of Al had the lowest nutritional content and the lowest leaf production and root growth, but still presented a healthy morphological appearance. In the treatment without Al, the root apical meristem showed cells with less dense cytoplasm and nucleus, which may be related to the high concentration of Zn in the root. We suggest that Al may alleviate possible toxic effects of Zn on *C. aureum*. A detachment of cells near the apical region of the root, similar to border cells, was observed in the presence of Al. The places of accumulation of Al were epidermis (except leaf), fundamental tissues and phloem cells in root, stem and leaves. Al was also detected in colleters, which must be involved in Al accumulation and secretion, indicating the participation of this secretory structure in metal tolerance. The normal leaf development of *C. aureum* in the presence of Al may be related to a lower concentration of Ca in the leaf, indicating that the species is a calcifuge. As reported for other species, *C. aureum* depends on Al for normal leaf development. We emphasize that biochemical analyses and ultrastructural studies will be essential to better clarify the action of Al on *C. aureum*.

**Keywords:** Cerrado, herbaceous Cerrado species, Al accumulation, colleters

## Introdução

Em solos ácidos, o alumínio (Al) encontra-se na forma de cátion trivalente ( $Al^{3+}$ ) que é fitotóxica para a maioria das espécies vegetais (Grevenstuk e Romano, 2013; Bojórquez-Quintal et al., 2017). Entretanto, muitas espécies de plantas nativas em diversas regiões subtropicais e tropicais, como as de cerrado, na porção central do Brasil, são resistentes ao  $Al^{3+}$  e conseguem prosperar bem em solos naturalmente ácidos e com elevados teores deste elemento (Haridasan, 2008; Pilon-Smits et al., 2009; Bojórquez-Quintal et al., 2017; Muhammad et al., 2019). A resistência ao Al pode ocorrer através do acúmulo do elemento pelo vegetal, com a entrada do elemento no simplasto celular e a ativação de mecanismos de tolerância, e ou, por meio da exclusão, quando a planta evita a entrada do Al no simplasto celular (Grevenstuk e Romano, 2013; Bojórquez-Quintal et al., 2017). Os dois mecanismos podem ocorrer simultaneamente (Ezaki et al., 2013).

Entre as plantas que acumulam Al, as quais apresentam em seus tecidos concentrações superiores a 1000 mg/kg desse elemento na matéria seca (Chenery, 1948; Jansen et al., 2002), destacam-se espécies de diferentes famílias botânicas, incluindo vasculares com sementes como Rubiaceae, Melastomataceae, Vochysiaceae, Symplocaceae (Jansen et al., 2002) e vasculares sem sementes como Lycopodiaceae, Gleicheniaceae e Cyatheaceae (Campos et al., 2014; Olivares et al., 2009; Schmitt et al., 2017). Os mecanismos de tolerância predominantes em espécies acumuladoras envolvem processos como complexação do Al com ligantes orgânicos (ácidos orgânicos, compostos fenólicos, proteínas), além do sequestro e armazenamento deste metal no vacúolo ou na parede celular (Brunner e Sperisen, 2013; Grevenstuk e Romano, 2013; Kochian et al., 2015). A secreção do Al por tricomas glandulares também tem sido destacado como importante mecanismo de tolerância (Ezaki et al., 2013), mas ainda é desconhecido se outras estruturas secretoras, como coléteres, podem estar envolvidas nessa eliminação. A compreensão dos sítios de acúmulo, bem como os efeitos do Al na estrutura interna do corpo do vegetal, utilizando diferentes técnicas, têm auxiliado na compreensão dos mecanismos de resistência e ação do Al a nível celular (Bressan et al., 2016; Malta et al., 2016; Sun et al., 2020). Entretanto, essa abordagem necessita ser melhor explorada entre as espécies nativas.

Embora a maioria das pesquisas aponte o lado vilão ou a ação fitotóxica do Al, nos últimos anos, estudos têm demonstrado o seu papel benéfico ou até mesmo essencial no crescimento e desenvolvimento de plantas (Bojórquez-Quintal et al., 2017; Muhammad et al., 2019, Sun et al., 2020) sem contudo esclarecer a ação do metal, em especial nas acumuladoras de Al. Espécies como *Vochysia thyrsoidea* e *Miconia albicans* quando cultivadas em solos sem

Al apresentam uma redução do crescimento com surgimento de cloroses e necroses foliares, porém após cultivo em solo com Al as espécies retomam o crescimento sem a ocorrência de deficiências (Haridasan 1998, 2008). Esse mesmo comportamento foi também descrito para *Melastoma malabathricum*. Além disso, o Al aumenta nessa espécie o crescimento das raízes e da parte aérea e evita a toxicidade do ferro (Watanabe et al., 2006). Em plantas de chá, *Camellia sinensis*, o Al além de estimular o crescimento das raízes (Hajibolande et al., 2013), é considerado um elemento essencial para o desenvolvimento desse órgão, dado que na ausência de Al ocorre inibição da divisão celular e do crescimento da raiz (Sun et al., 2020). Em espécies sensíveis a alta disponibilidade de Ca no solo, as chamadas calcífugas, o Al atua reduzindo os efeitos tóxicos da alta concentração de Ca (Souza et al. 2017; Souza et al. 2018).

A ação fitotóxica do Al se deve principalmente a sua interferência na dinâmica de absorção e translocação de elementos minerais como P, Ca, S, K e Mg (Rahman et al., 2018). A redução de absorção ocorre devido a injúrias causadas na morfoanatomia da raiz como inibição da divisão e expansão celular e conseqüente atrofiamento (Kochian et al., 2004; Doncheva et al., 2005) e, ou, através da complexação do Al com elementos minerais ainda no solo, de modo a reduzir a sua disponibilidade para a planta (Sade et al., 2016). Foi demonstrado, por exemplo, que o Al tende a se complexar com fósforo (P) tornando-o menos disponível para as plantas o que leva a uma severa limitação de crescimento (Chen et al., 2016). De modo geral, os sintomas da fitotoxicidade ao Al e de deficiência nutricional ocorrem primeiramente na raiz e posteriormente na parte aérea (Grevenstuck e Romano, 2013; Rahman et al., 2018).

No Cerrado, domínio fitogeográfico predominante na área central do Brasil, há uma grande diversidade de plantas nativas que crescem sobre solos ácidos, pobre em nutrientes e com alta concentração de Al (Haridasan, 2008). Estudos realizados nesse domínio têm investigado mecanismos de tolerância ao Al em plantas arbóreas acumuladoras (Bressan et al., 2016; Malta et al., 2016; Souza et al. 2017; Nogueira et al., 2019; Souza et al. 2018) sendo o estrato herbáceo, apesar de diverso, ainda pouco estudado. Herbáceas mais representativas do Cerrado brasileiro estão distribuídas nas famílias Poaceae, Asteraceae e Rubiaceae (Chaves et al., 2012; Paro, 2013). Rubiaceae se destaca como uma família com muitas espécies acumuladoras de Al, em especial a subfamília Rubioideae (Jansen et al., 2000, 2002).

*Coccocypselum aureum* (Rubiaceae) é uma espécie herbácea, de ciclo de vida anual, caracterizada morfológicamente por inflorescência séssil, folhas oval-lanceoladas ou lanceoladas, com base aguda ou arredondada (Costa et al., 2002). É uma espécie acumuladora de Al (cerca 5 g.kg<sup>-1</sup> de Al nas folhas) que cresce em solos do cerrado brasileiro, principalmente

em áreas de cerrado *sensu-strictu* (Castro, 2013). A subfamília Rubioideae é definida filogeneticamente como acumuladora de Al (Jansen et al., 2000, 2002). Com exceção de *Coccocypselum guianensis*, todas as 30 espécies estudadas do gênero são acumuladoras de Al (Jansen et al., 2000). A evolução do acúmulo de Al nessa subfamília e em especial no gênero *Coccocypselum* coloca em discussão se o metal desempenha alguma função no seu desenvolvimento.

Testes preliminares realizado por nosso grupo de pesquisa com *C. aureum* (dados não publicados) mostraram que a espécie apresenta seu desenvolvimento comprometido quando cultivada na ausência de Al. Neste estudo nós avaliamos o efeito do Al em *C. aureum* através de cultivo em hidroponia e trabalhamos com a hipótese de que o Al é um elemento benéfico para a espécie ao atuar como um bioestimulante no crescimento e na manutenção da estrutura foliar e radicular.

## **Material e métodos**

### *Material botânico, delineamento experimental e padronização de coleta*

O estudo foi realizado com plantas de *Coccocypselum aureum* (Spreng.) Cham. & Schlttdl. provenientes do cerrado *sensu strictu*, sobre latossolo amarelo, da FLONA de Paraopeba no município de Paraopeba – MG (19°20'S e 44°20'W). O clima da região é do tipo AW segundo a classificação de Köppen, com verão chuvoso e estação seca de abril a setembro (Tolentino, 2011). A FLONA mostra um gradiente solo-vegetação bem marcado, com fitofisionomias variando de savana (Cerrado *sensu stricto*), que ocorre em solos distróficos, a formação florestal (Cerradão) em solos mesotróficos e distróficos (Neri et al. 2007).

Plantas de *C.aureum* com cerca de 15 pares de folhas foram coletadas no período do verão (janeiro 2019) e transferidas para saco plástico preto (volume de 2 L) contendo solo da própria área. Em seguida, as plantas foram levadas para casa de vegetação para um período de aclimação de 15 dias, no qual foram irrigadas com 50 ml de água destilada a cada dois dias. Após esse período, as raízes foram inicialmente lavadas em água destilada para retirada do solo e em seguida desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 5% durante 10 minutos. As plantas foram submetidas a três tratamentos, em cultivo hidropônico, por 60 dias: tratamento 1(0) - sem Al; tratamento 2 (0 + 500) - sem Al durante 30 dias e 500  $\mu$ M de Al nos 30 dias subsequentes; tratamento 3 (250 + 500) - 250  $\mu$ M de Al nos primeiros 30 dias e 500  $\mu$ M por mais 30 dias. Foi utilizada a solução nutritiva de Clark (1975),  $\frac{1}{2}$  força iônica, em recipientes plásticos pretos, capacidade de 3,8 L, envolvidos com papel alumínio. O Al foi fornecido na forma de  $AlCl_3$ , o pH da solução mantido em 4,5 e a aeração constante, com renovação da

solução a cada 7 dias. Os experimentos foram desenvolvidos no verão (janeiro a março) sendo a unidade amostral um recipiente (3,8L) contendo uma planta de *C. aureum*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco plantas por tratamento.

Após 60 dias de cultivo hidropônico foram realizadas coletas de amostras para microscopia de luz, microscopia confocal, detecção de morte celular, extravasamento de eletrólitos e determinação dos sítios de acúmulo de órgãos/regiões crescidos sob efeito dos diferentes tratamentos. Para a quantificação química de Al e nutrientes na matéria seca foi utilizada a biomassa total das plantas.

#### *Caracterização visual e morfológica*

A avaliação visual das plantas foi realizada diariamente e o registro fotográfico da morfologia da parte aérea e sistema radicular aos 30 e 60 dias de cultivo utilizando uma câmera fotográfica (Canon EOS 77D DSLR).

#### *Acúmulo de Al nas raízes*

Solução de hematoxilina 0,2% foi utilizada para evidenciar Al na raiz. A intensidade de coloração azul desse corante indica maior acúmulo de Al. Ápices radiculares foram mergulhados em solução de hematoxilina 0,2 % durante 15 minutos (Polle et al., 1978) e, em seguida lavados em água destilada por 5 minutos, para retirar o excesso de corante. A documentação fotográfica foi feita em estereomicroscópio (modelo DV4, Zeiss Stemi).

#### *Microscopia de luz: análise anatômica e testes histoquímicos*

Amostras de raiz, caule, estípula e folha foram coletados de acordo com a seguinte padronização: amostras da região apical e zona de ramificação em estrutura primária e secundária na raiz; meristema apical e entre-nó imediatamente abaixo deste no caule; estípulas de primeiro nó; região mediana de folhas completamente expandidas do terceiro nó.

Amostras foram fixadas em solução de FAA 50 (Johansen, 1940), em seguida desidratadas em série etílica, incluídas em metacrilato (Historesina - Leica) e seccionadas transversal e longitudinalmente (apenas meristema do caule e raiz) a 5 µm de espessura em micrótomo rotativo (modelo Spencer 820, American Optical Corporation, EUA). As secções foram submetidas à coloração com azul de toluidina 0,05% em tampão acetato 0,1M, pH 4,7 por 5 minutos (O'Brien et al., 1964) e lâminas permanentes montadas em Permout (Fisher Scientific Permout Mounting Medium).

Para histolocalização dos sítios de acúmulo de Al, amostras de material fresco, seguindo a mesma padronização, foram seccionadas transversalmente em micrótomo de mesa (modelo LPC, Rolemberg e Bhering Comércio e Importação LTDA, Brasil, American Optical Corporation, EUA) e submetidas ao corante Solochrome Azurine por 40 minutos, com posterior diferenciação em álcool etílico 95% por 5 minutos (Denton e Oughton, 1993).

Estípulas incluídas em metacrilato foram adicionalmente submetidas ao Reagente de Schiff / solução de ácido periódico - PAS - (McManus, 1948) para detecção de polissacarídeos e amostras frescas submetidas ao teste para alcaloide utilizando o Reagente de Wagner (Furr e Mahlberg, 1981). Estípulas íntegras (não seccionadas) foram imersas em solução de Solochrome Azurine para investigar a presença de Al no exsudado dos coléteres.

Registro fotográfico foi realizado em fotomicroscópio (modelo AX70 TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) com câmera digital acoplada (Zeiss Axio Cam HR3, Zeiss, Göttingen, Alemanha).

#### *Microscopia confocal*

Ápices radiculares com 2 cm de comprimento foram fixados em paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M e posteriormente submetidas ao fluoróforo lumogallion 10  $\mu$ M, em tampão acetato 0,1 M (pH 5,2), durante 1 h a 50 °C (Kataoka e Nakanishi, 2001). Em seguida, as amostras foram lavadas em solução tampão acetato e a fluorescência observada em Microscópio Confocal de Varredura (Zeiss, LSM510 META) utilizando dois conjuntos de filtros ELFP para excitação e emissão (488 nm e 520 nm, respectivamente).

#### *Parâmetros de crescimento da raiz e parte aérea*

O crescimento da parte aérea foi avaliado através da diferença do número total de folhas. Para isso foi realizada a contagem do número de folhas no início e no final do período experimental. Todas as folhas foram contadas independentemente do estágio de desenvolvimento ou presença de sintomatologia.

O crescimento da raiz foi avaliado através do volume, comprimento, número de ramificações e número de ápices radiculares. Raízes foram escaneadas por um scanner (Image scanner III com imagem DPI 23,6 pixels.mm<sup>-1</sup>) e as imagens analisadas pelo programa WinRhizo (WinRhizo Pro Régent Instruments, Québec, Canada) (Meng-Ben, 2009; McCormac et al., 2015).

#### *Extravasamento de eletrólitos*

O extravasamento de eletrólitos foi determinado através da condutividade elétrica da água Milli-Q (5 mL), na qual seis discos foliares de 1 cm de diâmetro, de folhas completamente expandidas do terceiro nó, foram incubados por 12 h à temperatura ambiente. A condutividade elétrica inicial da água (C1) foi aferida e, em seguida a condutividade final (C2) foi obtida após o aquecimento das amostras em banho-maria à 95°C por 30 min. O extravasamento de eletrólitos (EE) foi determinado através da equação:  $EE (\%) = (C1/C2) \times 100$ , onde os resultados são expressos como porcentagem do total de condutividade (Szalai et al., 1996).

#### *Deteção de morte celular na folha*

Para investigar morte celular, discos foliares (1,5 cm diâmetro), de folhas completamente expandidas do terceiro nó, foram imersos em solução de Azul de Evans 0,1% durante 40 min. Em seguida clarificados em álcool 95% em estufa a 65°C (Kato et al., 2007). Lâminas foram montadas em gelatina e fotografadas em estereomicroscópio (modelo DV4, Zeiss Stemi).

#### *Quantificação de Al e nutrientes na matéria seca*

Raízes, caules e folhas de toda planta foram separados e secos em estufa a 70°C e trituradas em moinho tipo Wiley (3383-L10, 47 Thomas Scientific, EUA). Amostras de 0,5 g foram digeridas com ácido nítrico e fluorídrico em tubos de digestão fechados em bloco de grafite (adaptado de Paye, 2014). As soluções resultantes foram arrefecidas até à temperatura ambiente e o seu volume final foi completado para 12 mL com água desionizada. O teor de Al e dos nutrientes N, P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe, Zn, Mn e B foram determinados nas amostras por espectrometria de emissão atômica por plasma indutivamente acoplado (ICP-AES; Optima 8300 DV, Perkin Elmer, Shelton, CT, EUA).

#### *Análise estatística*

Dados quantitativos obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias, comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade, utilizando o software Sisvar (Ferreira, 2011).

### **Resultados**

Plantas que cresceram na ausência de Al apresentaram ao final de 60 dias de cultivo raízes com coloração amarronzada (Fig. 1A). Os testes histoquímicos não detectaram a presença do Al nas raízes nesse tratamento (Fig. 1G; 2A) ou a sua marcação foi pouco evidente (Fig. 1J). O meristema apical apresentou células com núcleo e citoplasma pouco densos (Fig. 1D). Além

disso, a raiz apresentou menor volume, comprimento, número de ramificações e ápices radiculares (Fig. 3A-D).

Plantas de *C. aureum* que receberam 500  $\mu\text{M}$  de Al (tratamento 2) exibiram raízes com coloração avermelhada (Fig. 1B) e o Al foi fortemente marcado na superfície da região do ápice radicular (Fig. 1H, K). O meristema apical apresentou células com núcleo e citoplasma mais densos (Fig. 1E) e na superfície da raiz nessa região ocorreu um destacamento de células (Fig. 1E – setas pretas). As raízes de plantas desse tratamento também exibiram maior volume, comprimento, número de ramificações e ápices radiculares (Fig. 3A-D). O acúmulo de Al foi detectado na parede celular e no simplasto das células da epiderme, córtex e floema, havendo principalmente forte reação para o núcleo celular das células da região do meristema apical (semelhante a 2B-D). No tratamento 3, no qual as plantas cresceram durante todo período experimental na presença de Al, as raízes exibiram coloração acastanhada (Fig. 1C) e o Al foi também fortemente marcado na superfície radicular (Fig. 1I, L). O meristema apical da raiz também apresentou células com núcleo e citoplasma denso (Fig. 1F) de forma semelhante ao observado no tratamento 2, além dos mesmos sítios de acúmulo de Al (Fig. 2B-D). No entanto, os menores valores de parâmetro de crescimento radicular foram observados (Fig. 3A-D). Nos três tratamentos, não foram visualizadas diferenças na estrutura e secundário, na zona de ramificação da raiz.

Na parte aérea, no decorrer dos primeiros 30 dias de cultivo na ausência de Al, as folhas jovens e posteriormente as adultas tornaram-se cloróticas e em seguida necróticas (Fig. 4B). Folhas jovens não completaram o processo de expansão da lâmina e folhas adultas tornaram-se encarquilhadas com agravamento dessa sintomatologia aos 60 dias de cultivo na ausência de Al (Fig. 4D, 5A). A progressão de cloroses e necroses ocorreram da região marginal e apical em direção a porção mediana. As necroses progrediram com um colapso inicial das células da epiderme e do mesofilo (Fig. 5E - asteriscos) até uma total desestruturação dos tecidos (Fig. 5F - asteriscos) e morte celular evidenciada pelo teste com azul de Evans (Fig. 5A – detalhe) e pelo alto valor de extravasamento de eletrólitos (Fig. 3F). Embora tenha ocorrido uma considerável produção de novas folhas ((Fig. 3E), estas não apresentavam desenvolvimento saudável, conforme exposto. Não houve marcação histoquímica de nenhum sítio de acúmulo de Al (Fig. 2E, H).

Plantas com a sintomatologia descrita na ausência de Al por 30 dias (Fig. 4B) após receberem 500  $\mu\text{M}$  do elemento, e permanecerem nessa condição por igual período de tempo, apresentaram uma total recuperação da parte aérea (Fig. 4E). As folhas novas produzidas

exibiram aspecto saudável, sem cloroses ou necroses, e a lâmina foliar expandiu normalmente (Fig. 4E, 5B). Folhas adultas tornaram-se túrgidas, sem o aspecto encarquilhado, e as áreas necrosadas sofreram abscisão. Não foram visualizadas alterações na organização dos tecidos da lâmina foliar (Fig. 5G), nenhuma marcação de morte celular foi detectada (Fig. 5B - detalhe) e os valores de extravasamento de eletrólitos (Fig. 3F) foram baixos. Uma coloração levemente arroxeadada de folhas adultas e da parte mais basal do caule foi observada em alguns indivíduos. A produção de novas folhas foi estatisticamente semelhante ao tratamento 1 (Fig. 3E), porém as folhas apresentavam aspecto saudável com total expansão da lâmina foliar.

A parte aérea de *C. aureum* cultivada inicialmente por 30 dias em 250  $\mu\text{M}$  de Al (Fig. 4C) e por mais 30 em 500  $\mu\text{M}$  de Al (Fig. 4F) apresentou crescimento saudável, ainda que lento e com menor produção de novas folhas (Fig. 3E). As folhas novas expandiam-se mais lentamente, mas sem o surgimento de cloroses e necroses (Fig. 4F) e as folhas adultas mantiveram-se túrgidas (Fig. 5C). A lâmina foliar não apresentou alterações celulares nem na organização celular dos tecidos do mesofilo (Fig. 5H), e assim como no tratamento 2, também não foi detectada nenhuma marcação de morte celular (Fig. 5C - detalhe), sendo baixo o valor de extravasamento de eletrólitos (Fig. 3F). Caule e folhas, em especial mais velhos, ganharam uma forte coloração arroxeadada (Fig. 5C) e um acúmulo de antocianina nas células epidérmicas foi observado nesses órgãos (Fig. 5D – tricomas indicado por seta e células epidérmicas ordinárias indicado por asteriscos). Em ambos os tratamentos com Al houve acúmulo deste elemento na parede celular e no conteúdo celular das células do parênquima paliçádico, parênquima lacunoso, incluindo cloroplastos, e floema da folha (Fig. 2I, J). No caule o Al foi também detectado na parede e no conteúdo celular de tricomas, e demais células epidérmicas, colênquima, parênquimas cortical e medular e células do floema (parênquima e elemento de tubo crivado) (Fig. 2F, G).

Apesar da sintomatologia foliar, em especial na ausência de Al, o meristema apical caulinar apresentou uma organização similar, sem alterações estruturais, entre os três tratamentos (Fig. 5I-K). Na região mais madura do caule, em corte transversal, também não foram identificadas alterações anatômicas. Coléteres estipulares do tipo padrão (Fig. 6A, B) mantiveram sua estrutura independente do tratamento sendo detectados polissacarídeos e alcaloides nas células secretoras em paliçada com PAS (Fig. 6C) e Reagente de Wagner (Fig. 6D), respectivamente. Houve acúmulo de Al na epiderme secretora em paliçada nos tratamentos com Al (Fig. 6F), o que não foi visualizado no tratamento sem o metal (Fig. 6E). O Al também foi detectado na secreção presente na superfície dos coléteres (Fig. 6G).

As maiores concentrações de Al em raízes e folhas foram correlacionadas com a concentração de Al na solução e com tempo de exposição de plantas (tabela 1). Plantas que cresceram o tempo todo na presença de Al (tratamento 3) apresentaram quase que o dobro de acúmulo deste elemento em comparação ao tratamento 1, enquanto nas do tratamento 2 (0+500) o aumento foi de mais de 50%, considerando o acúmulo total de Al ( raiz, caule e folhas). Em plantas dos tratamentos 2 e 3 a maior proporção (63%) de Al foi acumulada na parte aérea, sendo o caule o principal órgão de acúmulo do elemento. Acúmulo considerável de Al foi encontrado nas plantas cultivadas na ausência de Al, mas neste tratamento somente 13% do Al total permaneceu nas raízes e dos 87% da parte aérea.

Na análise de nutrientes, no tratamento sem Al foram observados valores significativamente maiores de Zn (raiz e caule), P (caule e folhas), Cu (raiz) e Ca (folhas). Neste tratamento, o Zn é mais do que o dobro do encontrado nas raízes de plantas cultivadas na presença de Al. No tratamento com a presença de Al durante 60 dias, a concentração de vários elementos foi significativamente menor do que nos outros tratamentos: P em todos os órgãos; S na parte aérea; K, Ca, Mg e Cu na raiz; K e S no caule; e S, Cu e Zn nas folhas. No tratamento onde o Al foi fornecido por 30 dias, quando comparado com o tratamento sem Al, ocorreu redução na concentração de Mg, Cu e Zn na raiz; de P, Mg, S e Zn no caule; e de P e Ca nas folhas, onde também ocorreu o aumento de K (tabela 1).

## **Discussão**

Nossos resultados mostram que dependendo do momento em que o Al é fornecido a *C. aureum*, ele atua estimulando o crescimento da espécie, como observado no tratamento 2. A ação do Al como benéfico está relacionada dentre vários fatores a idade fisiológica, as condições de crescimento e duração da exposição ao metal (Bojórquez-Quintal *et al.*, 2017). De fato plantas de *C.aureum* cultivadas por 60 dias com Al apresentaram os menores valores de crescimento de raiz e parte aérea e menores concentrações de nutrientes, porém, ainda assim, o Al se mostrou benéfico em decorrência da manutenção da estrutura foliar sem o aparecimento de cloroses e necroses e sem indicação de morte celular foliar. Esta pode ser uma importante condição adaptativa de plantas de diferentes espécies do cerrado que se desenvolvem de forma saudável mesmo sobre solos com baixos teores de nutrientes e alta concentração de Al (Haridasan, 2000; 2008). A ação benéfica do Al foi também relada para *Miconia albicans*, *Vochysia thyrsoidea*, *Melastoma malabathricum* e *Camelia sinensis* (Haridasan, 2008;

Watanabe *et al.*, 2006; Hajiboland *et al.*, 2013), espécies nativas acumuladoras que crescem em solos ácidos com altas concentrações do metal.

O acúmulo de Al nos órgãos de *C.aureum* e partes da células mostram que a espécie apresenta diferentes mecanismos internos de compartimentalização do elemento na parede celular e no simplasto. Esses mecanismos, em especial a ligação do Al na parede celular, foram verificados dentre espécies acumuladoras do cerrado, como por exemplo em espécies arbóreas (Malta *et al.*, 2016; Andrade *et al.*, 2011; Bressan *et al.*, 2016). A presença de pectinas com sua carga negativa devido aos grupos carboxílicos na parede celular é um dos fatores determinantes para a forte ligação do Al a esse compartimento da célula (Watanabe *et al.*, 2008). No simplasto celular o Al pode se complexar com diferentes quelantes, como os compostos fenólicos (Bojórquez-Quintal *et al.*, 2017). Uma coloração azul esverdeada como a obtida na lâmina foliar submetida Azul de Toluidina no tratamento 3 é um indicativo de compostos fenólicos na presença de Al. O azul de toluidina é um corante metacromático e uma coloração verde ou azul esverdeado é resultado da reação desse corante com substâncias polifenólicas (O'Brien *et al.*, 1964). A complexação do Al com compostos fenólicos tem sido considerada como uma importante estratégia de resistência ao metal (Zhang *et al.*, 2016).

Considerando ainda, o simplasto celular, o acúmulo de Al nos cloroplastos, juntamente com o desenvolvimento foliar mais saudável das plantas nos tratamentos com Al, ainda que mais lento, como no tratamento 3, mostra que este elemento pode estar correlacionado com processos fisiológicos e bioquímicos de crescimento da espécie. No entanto, essa hipótese precisa ser melhor investigada. Acúmulo de Al em cloroplastos de plantas nativas já foi relatado para outras espécies de famílias acumuladoras, como *Rudgea virbunoides* (Malta *et al.*, 2016), *Qualea grandiflora* e *Callisthene major* (Andrade *et al.*, 2011).

O acúmulo de Al nas células dos coléteres e na sua secreção, em *C. aureum*, confirma que esta estrutura secretora deve estar envolvida no processo de tolerância ao metal. Esse mecanismo de tolerância com a participação de estruturas secretoras ainda está pouco explorado entre espécies acumuladoras de Al. O acúmulo de Al e a liberação do elemento na secreção de tricomas foliares foi documentada para a gramínea *Andropogon virginicus* (Ezaki *et al.*, 2013). Entretanto, os tricomas de *A. virginicus* possuem organização mais simples do que a de um coléter. Além de presente em estruturas secretoras externas, como em *C. aureum* e *A. virginicus*, o Al também foi detectado em estruturas internas, como no epitélio de cavidades secretoras, em folhas de *Miconia rubinosa* (Bressan *et al.*, 2016).

Tem sido considerado que a ação benéfica do Al entre espécies acumuladoras ocorre em razão desse elemento atuar aliviando os sintomas de toxicidade provocada por prótons  $H^+$  e por outros metais (Hajiboland et al., 2013; Bojórquez-Quintal et al., 2017; Muhammad et al., 2019). Em plantas de *C. aureum*, de ambos tratamentos com Al, a morfologia foliar sem alterações significativas pode estar relacionada as menores concentrações de Ca, indicando um possível comportamento calcífugo da espécie, dado que na maior concentração de Ca, na ausência de Al, foram verificadas necroses. Comportamento calcífugo têm sido descrito em espécies acumuladoras de Al do cerrado como *Miconia albicans*, *Vochysia thysioidea* e *V. tucanorum* (Haridasan, 1988, 2008; Souza et al., 2017). Em *Vochysia tucanorum*, assim como em *C. aureum*, o surgimento de necroses foliares foi associado com maiores concentrações de cálcio na folha (Souza et al., 2017).

Adicionalmente, os dados sugerem que possa haver relação entre a recuperação da parte aérea de *C. aureum*, após a adição de Al no tratamento 2, com o incremento da concentração de K nas folhas. O K é um elemento essencial no processo de divisão celular através da polimerização de actina (Alberts et al., 2010) e no alongamento celular que é dependente do turgor causado pelo acúmulo vacuolar de K (Frensch, 1997). Em *Arabidopsis thaliana* a condição individualizada de estresse por baixo pH facilita o efluxo de K, enquanto a combinação de baixo pH e Al induz o influxo de K e H nos tecidos (Bose et al., 2010). Influxo de K em arroz foi também induzido na presença de Al utilizando  $^{38}K$  como marcador. É sugerido que o Al induza a expressão de proteínas de transporte e altere o potencial da membrana e o fluxo de prótons (H), que por sua vez promove o fluxo de nutrientes nas plantas (Bojórquez-Quintal et al., 2017). Por outro lado, em plantas de *C. aureum* que cresceram o tempo todo na presença de Al houve uma redução na concentração foliar de K sem surgimento de cloroses e necroses. Desta forma é importante considerar que a manutenção da estrutura foliar pode estar diretamente relacionada a uma redução da fitotoxicidade por baixo pH pela presença de Al na solução. O Al em *C. aureum* pode ter atuado de forma a aliviar os efeitos da fitoxidade de baixo pH durante todo tempo de cultivo como no tratamento 3 ou quando adicionado à solução hidropônica como no tratamento 2. A ação tóxica do pH ácido para plantas têm sido apontada (Vitarello et al., 2005; Long et al., 2017), mas a forma de ação do Al de forma a aliviar a fitoxidade ainda precisa ser melhor compreendida.

Na ausência de Al as raízes apresentaram alta concentração de Zn que pode ter exercido uma ação tóxica evidenciada pela presença de células do meristema apical com núcleos pouco proeminentes e citoplasma pouco denso. A toxicidade do Zn em sistema radicular depende de

sua concentração e da sensibilidade da espécie, sendo sua ação fitotóxica associada a restrição na divisão celular e do alongamento celular (Rout et al., 2003). Como o Al pode inibir a absorção de Zn (Zhou et al., 2019), possivelmente a presença desse cátion trivalente esteja restringindo a absorção de Zn e aliviando ou reduzindo a ação tóxica do elemento sobre as raízes de *C. aureum* nos tratamentos 2 e 3. Nestes tratamentos, onde as concentrações de Zn foram bem menores, as células do meristema apical apresentaram citoplasma mais denso e núcleo mais proeminente, além disso houve maior crescimento radicular, como observado no tratamento 2.

Além de possivelmente evitar a toxicidade por Zn nas raízes, a forte marcação histoquímica para Al no núcleo e citoplasma das células do meristema das plantas dos tratamentos com Al, indicam que esse último elemento atue estimulando o metabolismo celular dessa região. Relação semelhante a observada em *C. aureum* foi descrita para *Camellia sinensis*, uma hiperacumuladora de Al, para a qual foi adicionalmente demonstrado que o Al é essencial para o crescimento e desenvolvimento da raiz em decorrência de ser um elemento necessário para a manutenção da integridade do DNA em células do meristema (Sun et al., 2020). Cabe ressaltar que no tratamento sem Al foi detectada a presença desse elemento nos tecidos, uma vez que, antes da hidroponia as plantas tiveram seu desenvolvimento inicial em solo do cerrado. Entretanto, apenas 13% do Al estava retido nas raízes enquanto nos tratamentos com Al este percentual foi bem maior (cerca de 40%). Desta forma, o Al parece ser essencial para o desenvolvimento das raízes de *C. aureum*.

A presença de Al na solução e sua capacidade de complexação com P (Rahman et al., 2018) devem estar relacionada às menores concentrações de P na parte aérea de *C. aureum*, nos tratamentos com Al. O arroxamento acentuado de caule e folhas, devido ao acúmulo de antocianina, e também a expansão foliar mais lenta em *C. aureum* cultivado por 60 dias com Al está relacionada a menor concentração de P presente nesses órgãos, uma vez que estes são sintomas característicos de deficiência desse elemento (Taiz et al., 2013). Esses resultados em *C. aureum* são contraditórios com os observados em *Melastoma malabathricum*, *Quercus serrata* e *Camellia sinensis*, nas quais a absorção e o acúmulo de P nas raízes e folhas das plantas aumentaram na presença de Al (Bojórquez-Quintal et al., 2017). Em *C. aureum* na ausência de Al o P foi significativamente maior na parte aérea.

O destacamento de células na região do ápice radicular na presença de Al em *C. aureum* é um mecanismo que necessita ser melhor investigado a fim de compreender se são células originadas da descamação da coifa, ou seja, células de borda (Hawes et al., 2016), e sua possível

função em resposta ao Al. Em espécies cultivadas, como milho e arroz, as células de borda podem inibir e reduzir a absorção de Al pela planta (Miyasaka e Hawes, 2001; Hawes et al., 2016; Cai et al., 2018; Nagayama et al., 2019). Em soja, a maior capacidade de exclusão de Al, em cultivar resistente ao Al, está relacionada à imobilização e desintoxicação de Al pela mucilagem secretada no ápice da raiz pela coifa e pelas células de borda (Cai et al 2011). No entanto, em *C. aureum*, espécie na qual o Al atua como um elemento benéfico, ainda não sabemos se as células destacadas próximas ao meristema apical possuem alguma função de proteção. Destacamentos semelhantes a células da borda também foram visualizados em plantas de *Pteris vittata* submetida a tratamento com cádmio (Balestri et al., 2014) e em *Pityrogramma calomelanos* em tratamento com arsênio (Campos et al., 2018). Nessas espécies, no entanto, os destacamentos ocorreram devido a danos causados na estrutura dos tecidos radiculares (Balestri et al., 2014; Campos et al., 2018), o que não foi observado em *C. aureum* na presença de Al.

## Conclusão

Na espécie *C. aureum* o Al exerce um papel benéfico no desenvolvimento da espécie. Nossa hipótese foi corroborada pela recuperação da parte aérea após a adição do Al na solução de cultivo e a manutenção da estrutura foliar em plantas que cresceram durante todo período experimental na presença do elemento. A secreção do Al por coléteres, até então não registrado para espécies acumuladoras, confirma que esta estrutura secretora está relacionada com a tolerância ao metal. O papel benéfico do Al em *C. aureum* pode estar relacionado a uma redução dos teores de Ca na folha, de Zn na raiz e a alívio do pH ácido na solução. Ressaltamos que estudos com enfoque bioquímico e fisiológico se fazem necessários para melhor avaliar a atuação do Al como um elemento benéfico ao desenvolvimento de *C. aureum*, bem como, obter melhor compreensão dos mecanismos de tolerância interna dessa espécie acumuladora. Em estudos futuros, serão imprescindíveis análises parciais a fim de acompanhar a evolução do teor nutricional, no início do experimento e logo após os 30 dias, antes da alteração ou aplicação das dosagens de Al.

## Referências

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2010.) Biologia molecular da célula. ARTMED, 5. Ed., Porto Alegre.
- Andrade L.R.M., Barros L.M.G., Echevarria G.F., Amaral L.I.V., Cotta M.G., Rossatto D.R., Haridasan., Franco A.C. (2011). Al-hyperaccumulator Vochysiaceae from the Brazilian Cerrado store aluminum in their chloroplasts without apparent damage. *Environmental and Experimental Botany*: 70: 37-42.

- Balestri M., Ceccarini A., Forino LM., Zelko I., Martinka M., Lux A., Castiglione MR. (2014). Cadmium uptake, localization and stress induced morphogenic response in the fern *Pteris vittata*. *Planta* 239:1055-1064.
- Bojórquez-Quintal E., Escalante-Magaña C., Echevarria-Machado I., Martínez-Estévez M. (2017). Aluminum, a friend or foe of higher plants in acid soils. *Frontiers in Plant Science* 8: 1-18.
- Bose J., Babourina O., Shabala S., Rengel Z. (2010). Aluminum-dependent dynamics of ion transport in *Arabidopsis*: specificity of low pH and aluminum responses. *Physiologia Plantarum* 139: 401-412.
- Bressan A.C.G., Coan A.I., 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.
- Brunner I., Sperisen C. (2013). Aluminum exclusion and aluminum tolerance in wood plants. *Frontiers in Plant Science* 4: 1-12.
- Cai M., Zhang S., Xing C., Wang F., Wang N., Zhu L. (2011). Developmental characteristics and aluminum resistance of root border cells in rice seedlings. *Plant Science* 2011: 702-708.
- Campos, N. V., Pereira, T.A.R., Machado, M. F., Guerra, M. B.B., Tolentino, G. S., Araújo, J. S., Rezende, M.Q., Silva, M. C. N.A., Schaefer, C.E.G.R. (2014). Evaluation of Micro-Energy Dispersive X-Ray Fluorescence and Histochemical Tests for Aluminium Detection in Plants From High Altitude Rocky Complexes, Southeast Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências (Impresso)* 86: 285-296
- Campos N.V., Arcanjo-Silva S., Freitas-Silva L., Araújo T.O., Souza-Fernandes D.P., Azevedo A.A. (2018). Arsenic hyperaccumulation in *Pityrogramma calomelanos* L. (Link): adaptive traits to deal with high metalloid concentrations. *Environmental Science and Pollution Research* 25:10720-10729.
- Castro L.M.R (2013). Anatomia e histolocalização de alumínio em espécies herbáceas e subarbustivas do cerrado. Dissertação, Universidade Federal de Viçosa.
- Costa, C. B., Mamede, M. C. H. (2002). Sinopse do gênero *Coccocypselum* P. Browne (Rubiaceae) no estado de São Paulo, Brasil. *Biota Neotropica* 2: 1-13.
- Chaves E., Soares-Silva L.H. (2012). Floristic Survey of the Herbaceous-Shrub Layer of a Gallery Forest in Alto Paraíso de Goiás - Go, Brazil. *Brazilian archives of biology and technology* 55:715-724.
- Chen, Z.C., Liao, H. (2016). Organic acid anions: An effective defensive weapon for plants against aluminum toxicity and phosphorus deficiency in acidic soils. *Journal of Genetics Genomics* 43: 631-638.
- Chenery E.M. (1948). Aluminium in plants and its relation to plant pigments. *Annals of Botany* 12: 121-136.
- Denton J., Oughton D.H. (1993). The use of an acid solochrome azurine stain to detect and assess the distribution of aluminum in *Sphagnum moss*. *Ambio* 22: 19-21.
- Doncheva S., Amenós M., Poschenrieder C., Barceló J. (2005). Root cell patterning: a primary target for aluminium toxicity in maize. *Journal of Experimental Botany* 56: 1213-1220.

- Ezaki B., Jayaram K., Higashi A., Takahashi K. (2013). A combination of five mechanisms confers a high tolerance for aluminum to a wild species of Poaceae, *Andropogon virginicus* L. *Environmental and Experimental Botany* 93: 35-44.
- Ferreira D.F. (2011) Sisvar: A computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia* 35: 1039-1042.
- Frensch J. (1997). Primary responses of root and leaf elongation to water deficits in the atmosphere and soil solution. *Journal of Experimental Botany* 48: 985-999.
- Furr Y., Mahlberg P.G. (1981). Histochemical analysis of lactifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. *Journal of Natural Products* 44: 153-159.
- Grevenstuck T., Romano A. (2013). Aluminium speciation and internal detoxification mechanisms in plants: where do we stand? *Metallomics* 5: 1584-1594.
- Hajiboland R., Rad S.B., Barceló J., Poschenrieder C. (2013). Mechanisms of aluminum-induced growth stimulation in tea (*Camellia sinensis*). *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 176: 616-625.
- Haridasan M. (2008). Nutritional adaptations of native plants of the cerrado biome in acid soils. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 20:183-195.
- Haridasan M. (2008). Nutrição mineral de plantas nativas do cerrado. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12: 54-64.
- Haridasan M. (1988). Performance of *Miconia albicans* (sw.) Triana, na aluminum accumulating species, in acidic and calcareous soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 19: 7-12, 1091-1103.
- Hawes M.C.; McLain J., Ramirez-Andreotta M., Curlango-Rivera G., Flores-Lara Y., Brigham L.A. (2016). Extracellular Trapping of Soil Contaminants by Root Border Cells: New Insights into Plant Defense. *Agronomy* 6: 2-9.
- Jansen S., Broadley M.R., Robbrecht E., Smets E. (2002). Aluminum hyperaccumulation in Angiosperms: a review of its phylogenetic significance. *The Botanical Review* 68: 235-269.
- Jansen S., Desein S., Piesschaert F., Robbrecht E., Smets E. (2000). Aluminium Accumulation in Leaves of Rubiaceae: Systematic and Phylogenetic Implications. *Annals of Botany* 85: 91-101.
- Johansen D.A. (1940). *Plant Microtechnique*. New York, McGraw Hill Book.
- Kato T., Sato N., Hayama S. (2007). Activation of Holliday junction recognizing protein involved in the chromosomal stability and immortality of cancer cells. *Cancer research* 67: 44-53.
- Kataoka T., Nakanishi T.M. (2001). Highly Sensitive analytical method for aluminum movement in soybean root through lumogallion staining. *Journal of Plant Research* 158: 731-736.
- Kochian L.V., Piñeros M.A., Liu J., Magalhaes J.V. (2015). Plant Adaptation to Acid Soils: The Molecular Basis for Crop Aluminum Resistance. *Annual Review of Plant Biology* 66: 571-598.

- Kochian L.V., Hoekenga O.A., Pineros M.A. (2004). How do crop plants tolerate acid soil? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous deficiency. *Annual Review of Plant Biology* 55: 459-493.
- Long A., Zhang J., Yang L-T., Ye X., Lai N-W., Tan L-L., Lin D., Chen L-S. (2017). Effects of low pH on photosynthesis, related physiological parameters, and nutrient profiles of Citrus. *Frontiers in Plant Science* 185: 1-22.
- Malta P.G., Arcanjo-Silva S., Ribeiro C., Campos N.V., Azevedo A.A. (2016). *Rudgea viburnoides* (Rubiaceae) overcomes the low soil fertility of the Brazilian Cerrado and hyperaccumulates aluminum in cell walls and chloroplast. *Plant Soil* 408:369-384.
- Meng-Ben W., Qiang Z. (2009). Issues in using the WinRHIZO system to determine physical characteristics of plant fine roots. *Acta Ecologica Sinica* 29: 136-138.
- Miyasaka S.C., Hawes M.C. (2001). Possible Role of Root Border Cells in Detection and Avoidance of Aluminum Toxicity. *Plant Physiology* 125: 1978-1987.
- McCormack M.L., Dickie I.A., Eissenstat D.M., Fahey T.J., Fernandez C.W., Guo D., Helmisaari H.S., Pregitzer K.S., Pritchard S.G., Rewald B., Zadworny M. (2015). Redefining fine roots improves understanding of below-ground contributions to terrestrial biosphere processes. *New Phytologist* 207: 505-518.
- McManus J.F.A. (1948). Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technology* 23: 99-108.
- Muhammad N., Zvobgo G., Guo-ping Z. (2019). The beneficial effects and possible mechanisms of aluminum on plant growth in acidic soil. *Journal of Integrative Agriculture* 18: 1518-1528.
- Nagayama T., Nakamura A., Yamaji N., Satoh S., Furukawa J., Iwai H. (2019). Changes in the Distribution of Pectin in Root Border Cells Under Aluminum Stress. *Frontiers in Plant Science* 10: 1-8.
- Neri A.V. (2007). Gradiente Pedológico-Vegetacional de Cerrado em Paraopeba, MG. Tese. Universidade Federal de Viçosa.
- Nogueira M.A., Bressan A.C. G., Pinheiro M.H.O., Habermann G. (2019). Aluminum-accumulating Vochysiaceae species growing on a calcareous soil in Brazil. *Plant Soil* 437:313-326.
- Olivares E., Peña E., Marcano E., Mostacero J., Aguiar G., Benítez M., Rengifo E. (2009). Aluminum accumulation and its relationship with mineral plant nutrients in 12 pteridophytes from Venezuela. *Environmental and Experimental Botany* 65:132-141.
- O'Brien T.P., Feder N., McCully M.E. (1964). Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59: 368-373.
- Paro, S.P. (2013). A influência de fatores abióticos na diversidade de espécies do estrato herbáceo-subabustivo em cerrado, Flona de Paraopeba, MG. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa
- Pilon-Smits E.A.H., Quinn C.F., Tapken W., Malagoli M., Schiavon M. (2009). Physiological functions of beneficial elements. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 267-274.

- Polle E., Konzak C.F., Kittrick J.A. (1978). Visual detection of aluminum tolerance leaves in wheat by hematoxylin staining of seedling roots. *Crop Science* 18: 823-827.
- Paye H.S. (2014). Teor e distribuição de elementos terras raras e comparação de métodos de extração de elementos traço em solos brasileiros. Tese, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil: 84 pp.
- Rahman M. A., Lee Sang-Hoon., Ji H.C., Kabir A.H., Jones C.S., Lee Ki-Won. (2018). Importance of Mineral Nutrition for Mitigating Aluminum Toxicity in Plants on Acidic Soils: Current Status and Opportunities. *International Journal of Molecular Sciences* 19:4-28.
- Rout G.R., Das P. (2003). Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism: I. Zinc. *Agronomie* 23: 3-11.
- Sade H., Meriga B., Surapu V., Gadi J., Sunita MSL., Suravajhala P., Kishor P.B.K. (2016). Toxicity and tolerance of aluminum in plants: Tailoring plants to suit to acid soils. *Biometals* 29:187-210.
- Schmitt M., Mehlreter K., Sundue M., Testo W., Watanabe T., Jansen S. (2017). The evolution of aluminum accumulation in ferns and lycophytes. *American Journal of Botany* 104: 573-583.
- Souza M.C., Scalon M.C., Poschenrieder C., Tolrà R., Venâncio T., Teixeira S.P., Costa F.B. (2018). Aluminium detoxification in facultative (*Passovia ovata* (Pohl ex DC.) Kuijt and *Struthanthus polyanthus* Mart.-Loranthaceae) and dependente (*Psittacanthus robustus* (Mart.) Marloth - Loranthaceae) Al-accumulating mistletoe species from the Brazilian savana. *Phytochemistry* 153: 58-63.
- Souza M.C., Habermann G., Amaral C. L., Rosa A.L., Pinheiro M.H.O., Costa F.B. (2017). *Vochysia tucanorum* Mart.: an aluminum-accumulating species evidencing calcifuge behavior. *Plant and soil* 419: 377-389.
- Sun L., Zhang M., Liu X., Mao Q., Shi C., Kochian L.V., Liao H. (2020). Aluminium is essential for root growth and development of tea plants (*Camellia sinensis*). *Jornal of Integrative Plant Biology* 62: 984-997.
- Szalai G., Janda T., Paldi E., Szigeti Z. (1996). Role of light in the development of post-chilling symptoms in maize. *Plant Cell Physiology* 148: 378-383.
- Taiz L., Zeiger E. (2013). *Fisiologia vegetal*. ARTMED, 5. Ed., Porto Alegre.
- Tolentino G.S. (2011). Composição e partição de nicho em gradientes de solo e luz no Cerrado. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa.
- Vitorello V.A., Capaldi F.R., Stefanuto V.A. (2005). Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17: 129-143.
- Watanabe, T., Misawa, S., Hiradate, S., and Osaki, M. (2008). Root mucilage enhances aluminum accumulation in *Melastoma malabathricum*, an aluminum accumulator. *Plant Signaling and Behavior* 3: 603-605.
- Watanabe T., Jansen S., Osaki M. (2006). Al-Fe interactions and growth enhancement in *Melastoma malabathricum* and *Miscanthus sinensis* dominating acid sulphate soils. *Plant, Cell and Environment* 29: 2124-2132.

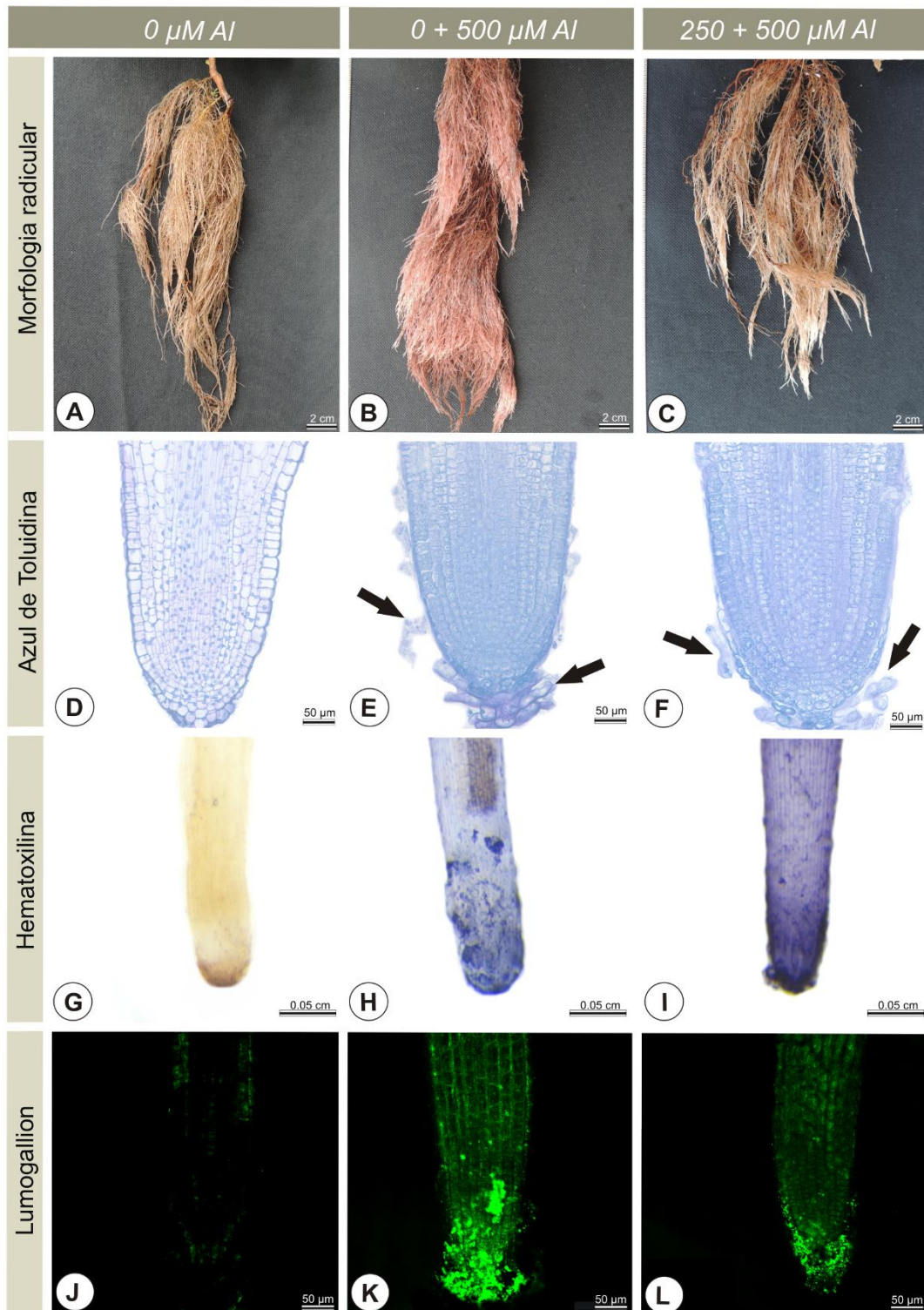
Zhang L., Liu R., Gung B.W., Tindall S., Gonzalez J.M., Halvorson J.J., Hagerman A.E. (2016). Polyphenol-Aluminum Complex Formation: Implications for Aluminum Tolerance in Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64: 3025-3033.

Zhou J., Li Z., Zhou T., Zaijun X., Wu L., Luo Y., Christie P. (2019). Aluminum toxicity decreases the phytoextraction capability by cadmium/zinc hyperaccumulator *Sedum plumbizincicola* in acid soils. *Science of the Total Environment*: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134591>

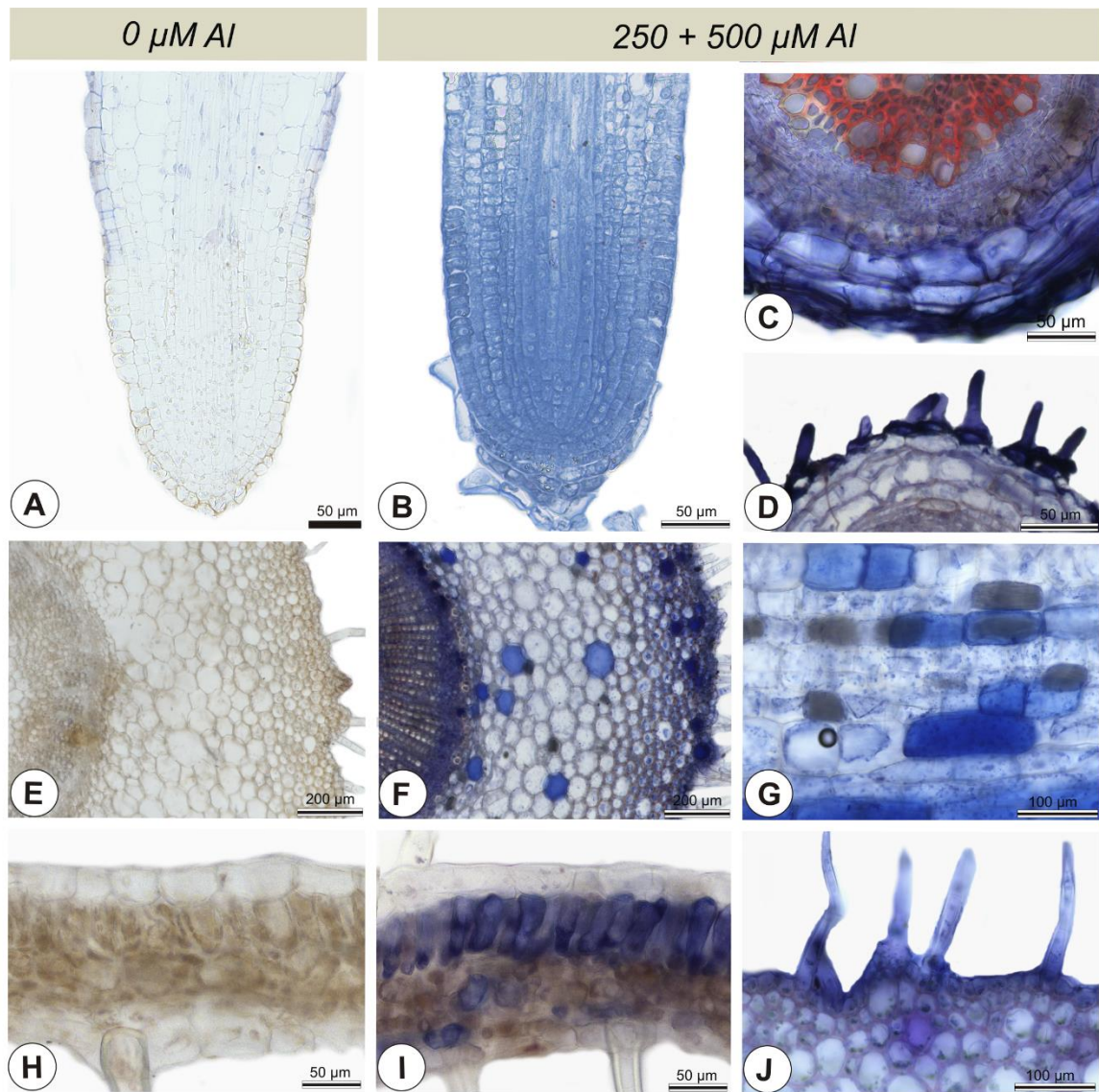
**Tabela 1:** Concentração de macro e micronutrientes na raiz, caule e folha de plantas de *Coccocypselum aureum*, após 60 dias de cultivo hidropônico em três tratamentos distintos (ausência de Al, 0 + 500 e 250 + 500  $\mu\text{M}$  de Al).

| Órgão/Tratamento         | N (dag/kg)        | P (dag/kg)       | K (dag/kg)        | Ca (dag/kg)      | Mg (dag/kg)       | S (dag/kg)        | Cu (mg/kg)        | Fe (mg/kg)             | Zn (mg/kg)          | Mn (mg/kg)            | B (mg/kg)          | Al (mg/kg)             |
|--------------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------------|---------------------|-----------------------|--------------------|------------------------|
| 0                        | 2,20ab $\pm$ 0,65 | 0,20a $\pm$ 0,06 | 1,73a $\pm$ 0,85  | 0,84a $\pm$ 0,05 | 0,10a $\pm$ 0,01  | 0,38a $\pm$ 0,14  | 28,99a $\pm$ 4,19 | 1592,58ab $\pm$ 455,15 | 103,84a $\pm$ 28,73 | 27,42a $\pm$ 13,42    | 22,27a $\pm$ 4,57  | 1306,60c $\pm$ 238,79  |
| <b>RAIZ</b>              |                   |                  |                   |                  |                   |                   |                   |                        |                     |                       |                    |                        |
| 0+500                    | 2,81a $\pm$ 0,28  | 0,22a $\pm$ 0,01 | 1,62a $\pm$ 0,22  | 0,67b $\pm$ 0,06 | 0,08a $\pm$ 0,01  | 0,28ab $\pm$ 0,05 | 23,37b $\pm$ 1,26 | 1134,54b $\pm$ 264,04  | 50,32b $\pm$ 5,11   | 12,89a $\pm$ 6,75     | 25,01a $\pm$ 5,17  | 5975,36b $\pm$ 197,09  |
| 250+500                  | 1,87b $\pm$ 0,26  | 0,10b $\pm$ 0,03 | 0,66b $\pm$ 0,36  | 0,72b $\pm$ 0,08 | 0,05b $\pm$ 0,01  | 0,14c $\pm$ 0,04  | 17,84c $\pm$ 2,09 | 1725,45a $\pm$ 261,83  | 39,38b $\pm$ 11,07  | 23,25a $\pm$ 7,45     | 21,87a $\pm$ 2,82  | 7383,28a $\pm$ 444,65  |
| 0                        | 1,45a $\pm$ 0,43  | 0,24a $\pm$ 0,03 | 2,50a $\pm$ 0,19  | 1,19a $\pm$ 0,08 | 0,20a $\pm$ 0,02  | 0,36a $\pm$ 0,02  | 6,93a $\pm$ 0,32  | 2758,81a $\pm$ 1102,13 | 105,35a $\pm$ 7,29  | 230,75ab $\pm$ 145,39 | 18,11a $\pm$ 2,61  | 5509,32b $\pm$ 521,80  |
| <b>CAULE</b>             |                   |                  |                   |                  |                   |                   |                   |                        |                     |                       |                    |                        |
| 0+500                    | 1,59a $\pm$ 0,12  | 0,13b $\pm$ 0,02 | 2,38a $\pm$ 0,47  | 1,20a $\pm$ 0,11 | 0,15b $\pm$ 0,01  | 0,30b $\pm$ 0,04  | 6,38ab $\pm$ 0,91 | 1906,56a $\pm$ 545,99  | 80,84b $\pm$ 16,56  | 144,71b $\pm$ 81,36   | 21,38a $\pm$ 1,82  | 6200,18ab $\pm$ 754,00 |
| 250+500                  | 1,81a $\pm$ 0,40  | 0,03c $\pm$ 0,0  | 1,55b $\pm$ 0,21  | 1,18a $\pm$ 0,18 | 0,18ab $\pm$ 0,04 | 0,12c $\pm$ 0,02  | 5,45b $\pm$ 0,48  | 2207,87a $\pm$ 572,69  | 61,04b $\pm$ 13,38  | 289,51a $\pm$ 58,78   | 19,65a $\pm$ 3,73  | 7388,53b $\pm$ 1057,50 |
| 0                        | 1,73ab $\pm$ 0,14 | 0,20a $\pm$ 0,04 | 1,43b $\pm$ 0,22  | 1,51a $\pm$ 0,13 | 0,17a $\pm$ 0,02  | 0,65a $\pm$ 0,19  | 6,70a $\pm$ 1,02  | 1104,20a $\pm$ 424,31  | 33,73a $\pm$ 3,33   | 62,58a $\pm$ 18,69    | 27,36a $\pm$ 4,11  | 3580,41b $\pm$ 467,84  |
| <b>FOLHA</b>             |                   |                  |                   |                  |                   |                   |                   |                        |                     |                       |                    |                        |
| 0+500                    | 1,88a $\pm$ 0,24  | 0,11b $\pm$ 0,01 | 2,02a $\pm$ 0,06  | 1,25b $\pm$ 0,06 | 0,16ab $\pm$ 0,02 | 0,50a $\pm$ 0,06  | 6,10a $\pm$ 0,45  | 964,70a $\pm$ 361,36   | 33,79a $\pm$ 4,44   | 46,75a $\pm$ 11,49    | 27,92a $\pm$ 3,31  | 3967,92b $\pm$ 828,33  |
| 250+500                  | 1,53b $\pm$ 0,16  | 0,03c $\pm$ 0,01 | 1,22b $\pm$ 0,09  | 1,11b $\pm$ 0,09 | 0,12b $\pm$ 0,04  | 0,19b $\pm$ 0,04  | 4,53b $\pm$ 0,34  | 1177,48a $\pm$ 243,27  | 25,79b $\pm$ 3,64   | 81,51a $\pm$ 18,04    | 27,59a $\pm$ 3,29  | 5204,28a $\pm$ 276,13  |
| <b>Tratamento/ Órgão</b> |                   |                  |                   |                  |                   |                   |                   |                        |                     |                       |                    |                        |
| 0                        |                   |                  |                   |                  |                   |                   |                   |                        |                     |                       |                    |                        |
| Raiz                     | 2,20A $\pm$ 0,65  | 0,20A $\pm$ 0,06 | 1,73B $\pm$ 0,85  | 0,84C $\pm$ 0,05 | 0,10B $\pm$ 0,01  | 0,38B $\pm$ 0,14  | 28,99A $\pm$ 4,19 | 1592,58B $\pm$ 455,15  | 103,84A $\pm$ 28,73 | 27,42B $\pm$ 13,42    | 22,27AB $\pm$ 4,57 | 1306,60C $\pm$ 238,79  |
| Caule                    | 1,45B $\pm$ 0,43  | 0,24A $\pm$ 0,03 | 2,50A $\pm$ 0,19  | 1,19B $\pm$ 0,08 | 0,20A $\pm$ 0,02  | 0,36B $\pm$ 0,02  | 6,93B $\pm$ 0,32  | 2758,81A $\pm$ 1102,13 | 105,35A $\pm$ 7,29  | 230,75A $\pm$ 145,39  | 18,11B $\pm$ 2,61  | 5509,32A $\pm$ 521,80  |
| Folha                    | 1,73AB $\pm$ 0,14 | 0,20A $\pm$ 0,04 | 1,43B $\pm$ 0,22  | 1,51A $\pm$ 0,13 | 0,17A $\pm$ 0,02  | 0,65A $\pm$ 0,19  | 6,70B $\pm$ 1,02  | 1104,20B $\pm$ 424,31  | 33,73B $\pm$ 3,33   | 62,58B $\pm$ 18,69    | 27,36A $\pm$ 4,11  | 3580,41B $\pm$ 467,84  |
| 0+500                    |                   |                  |                   |                  |                   |                   |                   |                        |                     |                       |                    |                        |
| Raiz                     | 2,81A $\pm$ 0,28  | 0,22A $\pm$ 0,01 | 1,62B $\pm$ 0,22  | 0,67B $\pm$ 0,06 | 0,08B $\pm$ 0,01  | 0,28B $\pm$ 0,05  | 23,37A $\pm$ 1,26 | 1134,54B $\pm$ 264,04  | 50,32B $\pm$ 5,11   | 12,89B $\pm$ 6,75     | 25,01AB $\pm$ 5,17 | 5975,36A $\pm$ 197,09  |
| Caule                    | 1,59B $\pm$ 0,12  | 0,13B $\pm$ 0,02 | 2,38A $\pm$ 0,47  | 1,20A $\pm$ 0,11 | 0,15A $\pm$ 0,01  | 0,30B $\pm$ 0,04  | 6,38B $\pm$ 0,91  | 1906,56A $\pm$ 545,99  | 80,84A $\pm$ 16,56  | 144,71A $\pm$ 81,36   | 21,38B $\pm$ 1,82  | 6200,18A $\pm$ 754,00  |
| Folha                    | 1,88B $\pm$ 0,24  | 0,11B $\pm$ 0,01 | 2,02AB $\pm$ 0,06 | 1,25A $\pm$ 0,06 | 0,16A $\pm$ 0,02  | 0,50A $\pm$ 0,06  | 6,10B $\pm$ 0,45  | 964,70C $\pm$ 361,36   | 33,79B $\pm$ 4,44   | 46,75B $\pm$ 11,49    | 27,92A $\pm$ 3,31  | 3967,92B $\pm$ 828,33  |
| 250+500                  |                   |                  |                   |                  |                   |                   |                   |                        |                     |                       |                    |                        |
| Raiz                     | 1,87A $\pm$ 0,26  | 0,10A $\pm$ 0,03 | 0,66B $\pm$ 0,36B | 0,72B $\pm$ 0,08 | 0,05C $\pm$ 0,01  | 0,14B $\pm$ 0,04  | 17,84A $\pm$ 2,09 | 1725,45AB $\pm$ 261,83 | 39,38B $\pm$ 11,07  | 23,25B $\pm$ 7,45     | 21,87AB $\pm$ 2,82 | 7383,28A $\pm$ 444,65  |
| Caule                    | 1,81A $\pm$ 0,40  | 0,03B $\pm$ 0,00 | 1,55A $\pm$ 0,21A | 1,18A $\pm$ 0,18 | 0,18A $\pm$ 0,04  | 0,12C $\pm$ 0,02  | 5,45B $\pm$ 0,48  | 2207,87A $\pm$ 572,69  | 61,04A $\pm$ 13,38  | 289,51A $\pm$ 58,78   | 19,65B $\pm$ 3,73  | 7388,53A $\pm$ 1057,50 |
| Folha                    | 1,53A $\pm$ 0,16  | 0,03B $\pm$ 0,01 | 1,22A $\pm$ 0,09A | 1,11A $\pm$ 0,09 | 0,12B $\pm$ 0,04  | 0,19A $\pm$ 0,04  | 4,53B $\pm$ 0,34  | 1177,48B $\pm$ 243,27  | 25,79B $\pm$ 3,64   | 81,51B $\pm$ 18,04    | 27,59A $\pm$ 3,29  | 5204,28B $\pm$ 276,13  |

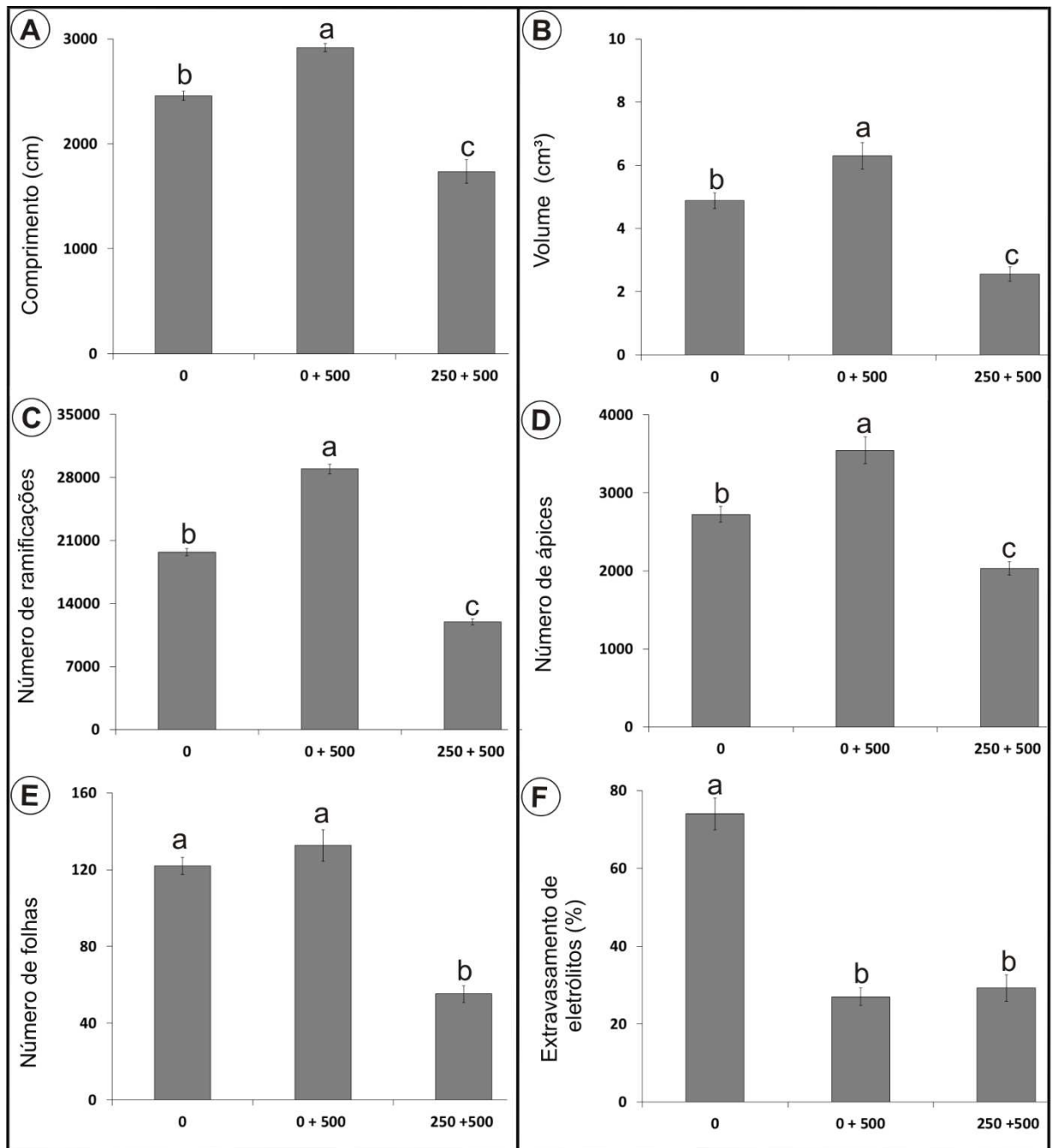
Média  $\pm$  desvio padrão (n = 5). Valores com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p = 0,05). Letras minúsculas são referentes a comparação dos tratamentos dentro dos órgãos, letras maiúsculas são referentes a comparação dos órgãos dentro dos tratamentos.



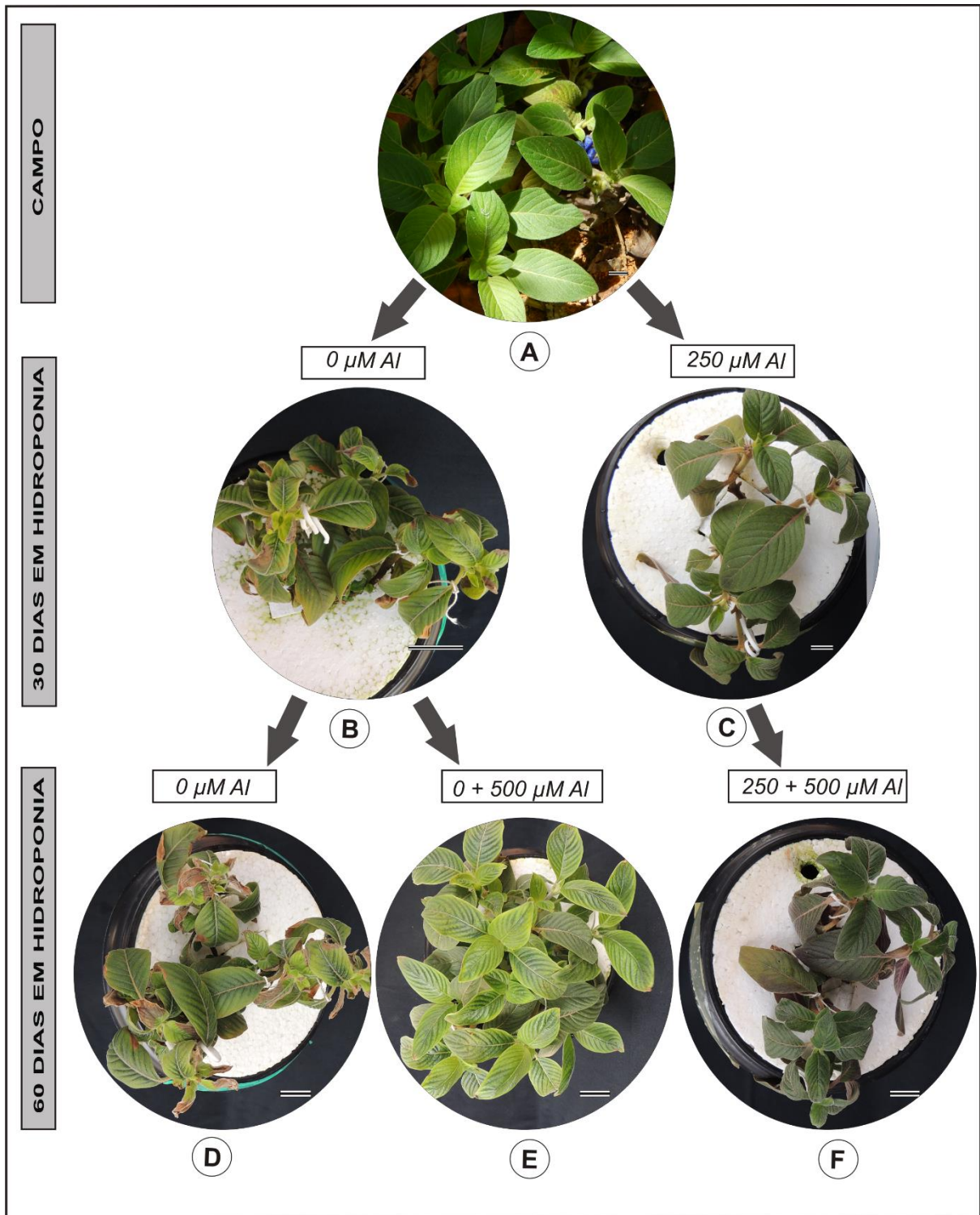
**Figura 1** – Morfoanatomia da raiz de plantas de *Coccocypselum aureum* submetidas a 0 (A, D, G, J), 0 + 500 (B, E, H, K) e 250 + 500  $\mu\text{M}$  Al (C, F, I, L) em sistema hidropônico por 60 dias. A-C: morfologia geral da raiz. D-F: corte longitudinal do meristema apical radicular. Setas pretas indicam descolamento de células semelhantes a células de borda em E e F. G-I: ápices radiculares imersos em solução de hematoxilina 0,2 % no tratamento controle (G) e nos tratamentos com Al (H e I), onde a cor azul indica a presença do Al. J-L: raízes submetidas ao Lumogallion 10  $\mu\text{M}$  para detecção de Al em microscopia confocal. Forte fluorescência em K e L evidenciam a localização do Al.



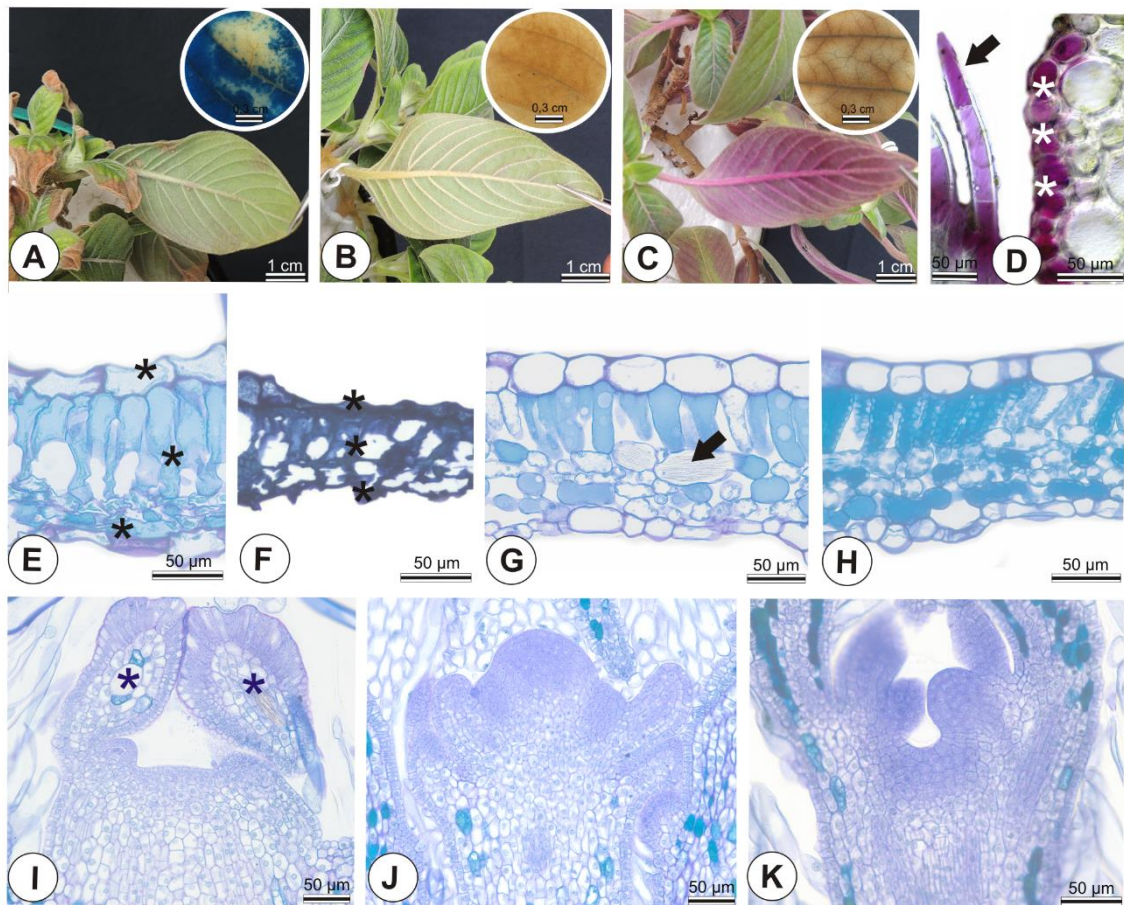
**Figura 2:** Sítios de acúmulo de Al, detectados pelo teste histoquímico com Solochrome Azurinel, em raiz, caule e folha de *Coccocypselum aureum* submetidas a 0 (A, E, H) e 250 + 500 (B, C, D, F, G, I, J)  $\mu\text{M}$  Al em sistema hidropônico por 60 dias. A e B: corte longitudinal do meristema apical radicular. C e D: cortes transversais da raiz na região de ramificação (C) e zona pilífera (D). E-G: Caule. Corte transversal (E e F) e longitudinal (G). H – J: folha em corte transversal. Região da lâmina foliar (H e I) e nervura central com destaque para tricomas (J). Tecidos marcados na cor azul em B, C, D, F, G, I, J são sítios de acúmulo de Al.



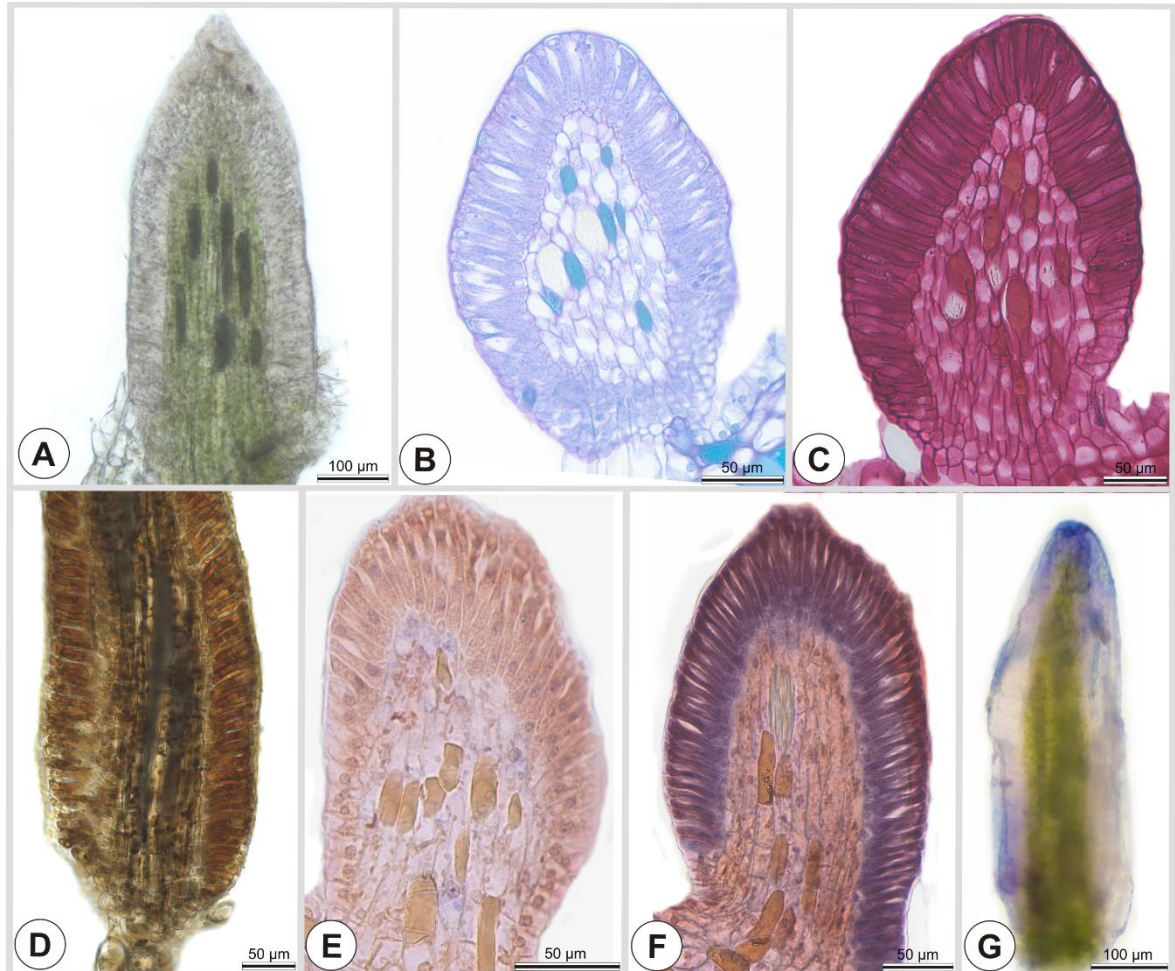
**Figura 3:** Parâmetros de crescimento e porcentagem de extravasamento de eletrólitos em plantas de *Coccocypselum aureum* submetidas a 0, 0 + 500 e 250 + 500  $\mu\text{M}$  de Al em sistema hidropônico por 60 dias. A – Comprimento da raiz (cm). B - Volume da raiz ( $\text{cm}^3$ ). C – Número de ramificações da raiz. D – Número de ápices da raiz. E – Número total de folhas novas. F- Porcentagem foliar de extravasamento de eletrólitos. Barras verticais indicam o erro padrão (n = 5), e letras diferentes indicam diferença significativa (Tukey 5 %).



**Figura 4:** Morfologia da parte aérea de *Coccocypselum aureum* submetidas a 0, 0 + 500 e 250 + 500  $\mu\text{M}$  de Al durante 60 dias de experimento em sistema hidropônico. A: planta coletada em condição de campo em solo de cerrado *sensu strictu*. B – folhas cloróticas e necróticas após 30 dias de cultivo na ausência de Al. C: folhas com aspecto normal após 30 dias de cultivo em 250  $\mu\text{M}$  Al. D: cloroses e necroses foliares em estágio mais avançado após 60 dias de cultivo na ausência de Al. E: recuperação da morfologia foliar em 30 dias subsequentes após mudança de tratamento para 500  $\mu\text{M}$  Al (0 + 500). F: ausência de necroses e cloroses em plantas crescidas por 60 dias na presença de Al (250 + 500  $\mu\text{M}$ ). Notar menor produção de folhas (F), porém sem o surgimento de cloroses e necroses. Escalas = 2 cm.



**Figura 5** – Morfoanatomia da parte aérea de plantas de *Coccocypselum aureum* submetidas a 0 (A, E, F, I), 0 + 500 (B, G, J) e 250 + 500  $\mu\text{M}$  de Al (C, D, H, K) em sistema hidropônico por 60 dias. A-D: morfologia da parte aérea. Detalhes no canto superior direito são discos foliares submetidos ao reagente Azul de Evans para detecção de morte celular (coloração em azul). Note no disco foliar em A forte marcação de morte celular e na ausência de Al por 60 dias. Seta preta e asteriscos em D indicam, respectivamente, tricomas e células ordinárias da epiderme com acúmulo de antocianina em plantas crescidas por 60 dias na presença de Al. E-H: cortes transversais da lâmina foliar. Asteriscos em E indicam início da desestruturação das células epidérmicas e dos tecidos do mesófilo e o total colapso, em F, na ausência de Al por 60 dias. Seta preta em G indica idioblasto com ráfide. Forte coloração azul esverdeada do parênquima paliçádico e lacunoso em H indica compostos fenólicos. I-K: corte longitudinal do meristema apical do caule sem alteração independente do tratamento. Asteriscos em I indicam coléteres.



**Figura 6** – Anatomia e histolocalização de Al, alcaloides e polissacarídeos em coléter do tipo padrão em plantas de *Coccocypselum aureum* submetidas a 0 (A, B, E) e 250 + 500  $\mu\text{M}$  Al (C, D, F, G) em sistema de hidroponia por 60 dias. A-F: Cortes longitudinais; G: coléter inteiro (não seccionado). A – coléter do tipo padrão sem coloração (branco). B: coléter corado com azul de toluidina. C: teste histoquímico para polissacarídeos. Intensa cor rosa indica reação positiva na epiderme secretora. D: teste histoquímico para alcaloides. Cor acastanhada-avermelhada é resultado positivo na epiderme secretora. E-F: coléteres dos tratamentos 0 e 250 + 500, respectivamente, submetidos ao reagente Solochrome Azurine. Reação azul em F indica sítio de acúmulo de Al. G: coléter imergido em solução de Solochrome Azurine. Reação em azul mostra a presença de Al na secreção exsudada para superfície.

## CAPÍTULO 2

### **Alumínio induz respostas fisiológicas benéficas na espécie do Cerrado *Coccocypselum aureum* (Rubiaceae)**

#### **Resumo**

Espécies de plantas nativas acumuladoras de alumínio (Al) apresentam estímulo do metabolismo quando cultivadas na presença desse elemento. Este mecanismo, no entanto, ainda é pouco compreendido em razão da fitotoxicidade do Al para um grande número de espécies. Avaliamos o efeito do Al sobre parâmetros fisiológicos e bioquímicos, bem como possíveis sítios de complexação do elemento e abundância relativa de nutrientes em *Coccocypselum aureum* (Rubiaceae), espécie herbácea acumuladora de Al, que ocorre no cerrado onde os solos são ricos em Al. Indivíduos da espécie coletados em solo do cerrado foram submetidos a dois tratamentos em hidroponia: tratamento 1 sem Al por 60 dias e tratamento 2 sem Al durante 30 dias e 500  $\mu\text{M}$  de Al por 30 dias subsequentes. Após 30 dias da adição de Al, plantas do tratamento 2 apresentaram maior teor de clorofila *a* e *b*, maior taxa de fotossíntese, condutância estomática, transpiração e as maiores concentrações de glicose, frutose, amido na raiz e de proteínas na raiz e na folha. Apenas a concentração de sacarose foi superior na folha na ausência de Al. Ainda no tratamento 2 houve maior eficiência fotoquímica do PSII em 24, 48 h e 30 dias, após adição de Al, e um incremento significativo na taxa de transporte de elétrons em 48h e, em especial, aos 30 dias. Neste mesmo período, plantas que receberam Al também apresentaram maior produção de compostos fenólicos na raiz e na folha e uma sobreposição dos sítios de acúmulo de Al com compostos fenólicos e alcaloides, além de um aumento na abundância relativa de Al na raiz, no caule e na folha. Adicionalmente, na presença do metal aos 30 dias, foram verificados as maiores abundâncias relativas de N, K, Mg e Fe na folha, de Fe e Cu no caule e P, S, Cu e Zn na raiz. O Al exerce efeito benéfico sobre o metabolismo primário e secundário de *C.aureum*. Alcaloides e compostos fenólicos podem estar envolvidos na complexação do Al, na parte aérea da espécie, dada sobreposição dos sítios de acúmulo.

**Palavras-chave:** acumuladora, fotossíntese, fenólicos, resistência, metal

## CHAPTER 2

### Aluminum induces beneficial physiological responses in the Cerrado species

#### *Coccocypselum aureum* (Rubiaceae)

#### Abstract

Native plant species that accumulate aluminum (Al) exhibit a stimulated metabolism when cultivated in the presence of the element. This mechanism, however, is still poorly understood due to the phytotoxicity of Al for a large number of species. We evaluated the effects of Al on physiological, and biochemical parameters in *Coccocypselum aureum* (Rubiaceae), an Al-accumulating cerrado herbaceous species that occurs in Al rich soils. Plants collected in Cerrado soil were subjected to two treatments in hydroponic system: treatment 1 without Al for 60 days and treatment 2 without Al for 30 days and with 500  $\mu$ M Al for the subsequent 30 days. After 30 days of Al addition, plants from treatment 2 had higher chlorophyll *a* and *b* content; higher photosynthesis rate, stomatal conductance and transpiration; and higher concentrations of glucose, fructose and starch in the root and proteins in root and leaf. Only the concentration of sucrose was higher in leaf in the absence of Al. Also in treatment 2, there was higher photochemical efficiency of PSII at 24, 48 h and 30 days after Al addition, and a significant increase in the rate of electron transport at 48h and, in particular, at 30 days. In the same period, plants that received Al also showed higher production of phenolic compounds in root and leaf and an overlap of Al accumulation sites with phenolic compounds and alkaloids, in addition to an increase in the relative abundance of Al in root, stem and leaf. Additionally, in the presence of Al for 30 days, the highest relative concentrations of N, K, Mg and Fe in the leaf, of Fe and Cu in the stem and P, S, Cu and Zn in the root were verified. Al has a beneficial effect on primary and secondary metabolism of *C. aureum*. Alkaloids and phenolic compounds must be involved in Al complexation in the aerial part of the species, given the overlapping of accumulation sites.

**Keywords:** Al accumulation, photosynthesis, phenolics, Al resistance

## Introdução

Em solos ácidos o alumínio (Al) é o principal fator responsável pela redução do crescimento de plantas (Rahman et al., 2018). O Al é o terceiro elemento mais abundante da crosta terrestre e em baixo pH é convertido a  $Al^{3+}$  que é fitotóxico para a maiorias das espécies vegetais (Singh et al., 2017). A ação tóxica do Al ocorre devido a injúrias provocadas primeiramente na estrutura da raiz e em seguida na parte aérea do vegetal (Kollmeier et al., 2000; Rao et al., 2016). Entretanto, efeitos benéficos do Al têm sido descritos para algumas espécies cultivadas, como arroz e milho (Moreno-Alvarado, 2017; Wang et al., 2015), e nativas adaptadas a altas concentrações desse elemento no solo (Haridasan 1998, 2008; Souza et al., 2017; Bojórquez-Quintal et al., 2017; Cury et al., 2019; Muhammad et al., 2019).

De acordo com o mecanismo de resistência ao Al, as espécies vegetais são classificadas como acumuladoras ou exclusoras (Kochian et al., 2015). Espécies exclusoras reduzem a entrada do Al no simplasto celular e o acúmulo do elemento nos tecidos é inferior a 1000 mg/kg de matéria seca na parte aérea. Espécies com valores superiores a essa concentração são consideradas acumuladoras (Jansen et al., 2003; Grevenstuk e Romano, 2013; Kochian et al., 2015). Nestas, ocorre a entrada de Al no simplasto celular e seu acúmulo em diversos compartimentos celulares como parede e vacúolo (Grevenstuk e Romano, 2013), incluindo cloroplastos como em espécies nativas do Cerrado (Andrade et al., 2011; Malta et al., 2016). A ativação de mecanismos internos de tolerância em plantas acumuladoras envolve a síntese de ácidos orgânicos, compostos fenólicos, compostos protéicos, dentre outros (Brunner e Sperisen, 2013; Grevenstuk e Romano, 2013).

Espécies nativas como *Melaleuca cajuputi* (Myrtaceae), *Arnica montana* (Asteraceae), *Deschampsia flexuosa* (Poaceae), *Hydrangea paniculata* (Hydrangeaceae), *Melastoma malabathricum* (Melastomataceae), *Vochysia thyrsoidea* (Vochysiaceae), *Miconia albicans*, *Symplocos paniculata* (Symplocaceae), *Tabebuia chrysantha* (Bignoniaceae), dentre outras que crescem em regiões de solos ácidos e com alta saturação por Al, apresentam estímulo de crescimento na parte aérea e raiz quando cultivadas na presença do elemento (Haridasan, 1998; Watanabe et al., 2006, Rehmus et al., 2014; Schmitt et al., 2016; Muhammad et al., 2019). Algumas exibem alterações no crescimento e sintomas foliares quando cultivadas na ausência de Al (Haridasan, 1998; Watanabe et al., 2006).

Os principais efeitos benéficos provocados do Al relatados na literatura (Muhammad et al., 2019) tem sido atribuídos à redução da toxicidade provocadas por H, Fe e Mn, bem como estímulo da absorção de elementos essenciais como N, P e K e a atração de rizobactérias através

de exsudados radiculares. Além disso, aumento da taxa fotossintética, bem como do teor de clorofila *a* e *b*, de metabólitos primários (açúcares) e secundários (fenólicos) foram observados em espécies nativas cultivadas na presença de Al (Hajiboland et al., 2013a; Xu et al., 2016). A complexação do Al com compostos fenólicos, como as catequinas, é um importante mecanismo de tolerância (Grevenstuck e Romano, 2013) e o maior crescimento das raízes em tratamentos com Al têm sido associado a uma maior produção de glicose (Moriyama et al., 2015). Embora haja importantes pesquisas sobre os efeitos do Al em plantas, os mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos nas respostas de estímulo ao crescimento, em especial entre as nativas, necessitam ser esclarecidos.

No Cerrado, domínio fitogeográfico predominante na área central do Brasil, há uma grande diversidade de plantas nativas que crescem sobre solos ácidos, pobres em nutrientes e com alta concentração de Al (Haridasan, 2008). Estudos realizados nesse domínio têm investigado mecanismos de tolerância ao Al, especialmente em plantas arbóreas, sendo o estrato herbáceo, apesar de diverso, menos estudado. Herbáceas mais representativas do Cerrado brasileiro estão distribuídas nas famílias Poaceae, Asteraceae e Rubiaceae (Paro, 2012). Rubiaceae se destaca como uma família com muitas espécies acumuladoras de Al, em especial a subfamília Rubioideae (Jansen et al., 2000, 2002).

*Coccocypselum aureum* é uma espécie herbácea tolerante e acumuladora de Al da subfamília Rubioideae que cresce principalmente em áreas de *cerrado sensu strictu* (Castro, 2013). Em estudos preliminares a espécie exibiu um maior crescimento na presença de Al, no entanto os mecanismos responsáveis pelo estímulo do crescimento, bem como pela tolerância interna ao elemento ainda não foram elucidados. A subfamília Rubioideae a qual *C. aureum* pertence, além de tipicamente acumuladora de Al, produz diversos metabólitos secundários da classe dos alcaloides e compostos fenólicos (Martin e Nunez, 2015) os quais ainda não foram associados com a resistência ao Al. Assim, é necessário esclarecer se estes metabólitos exercem algum papel na resistência ao metal.

Este trabalho teve como objetivo avaliar alguns mecanismos fisiológicos e bioquímicos de *C. aureum*, na ausência e presença de Al. Foi testada a hipótese de que o Al atua estimulando o metabolismo primário e secundário da espécie.

## **Material e métodos**

*Material botânico, delineamento experimental e padronização de coleta*

Plantas de *Coccocypselum aureum* (Spreng.) Cham. & Schltdl. com cerca de 15 pares de folhas foram coletadas no período do verão em latossolo amarelo do Cerrado *sensu stricto* na Floresta Nacional de Paraopeba no município de Paraopeba – MG (19°20'S e 44°20'W).

As raízes das plantas foram inicialmente lavadas em água destilada para retirada do solo e em seguida desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 10% durante 10 minutos. As plantas foram cultivadas em sistema hidropônico, em baldes plásticos (3,8 l) pretos recobertos por papel alumínio, com solução nutritiva de Clark ½ força (Clark, 1975), sob aeração constante, em casa de vegetação (Viçosa, MG). Dois tratamentos foram utilizados: ausência de Al durante 60 dias (tratamento 1); e ausência de Al durante 30 dias e após este período acréscimo de 500 µM de Al por mais 30 dias (tratamento 2: 0 + 500). O Al foi fornecido na forma de AlCl<sub>3</sub> com pH mantido em 4,5 e renovação das soluções a cada 7 dias, na estação do verão (meses de janeiro e fevereiro). A unidade experimental consistiu de um balde contendo uma planta de *C. aureum* e o delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Foram amostradas 5 plantas por tratamento.

#### *Fluorescência da clorofila a e trocas gasosas*

Os parâmetros de fluorescência de clorofila (*Chl a*) e simultaneamente trocas gasosas foram determinados em folhas totalmente expandidas do terceiro nó em 24h, 48h e 30 dias após adição de Al. As avaliações foram feitas utilizando um sistema analisador de troca de gases com infravermelho de fluxo aberto (LI-6400XT; LI-COR Inc., Lincoln, NE) equipado com uma câmara de fluorescência integrada (LI-6400-40; LI-COR Inc.). Os parâmetros de fluorescência inicial ( $F_0$ ), máxima ( $F_m$ ), variável ( $F_v = F_m - F_0$ ) e o rendimento quântico máximo de PSII ( $F_v/F_m$ ) foram avaliados em folhas aclimatadas no escuro por 90 minutos. Folhas aclimatadas à luz foram usadas para medir a fluorescência inicial ( $F'_0$ ) e máxima ( $F'_m$ ). Cálculos foram feitos para a eficiência de captura de excitação de PSII aberto ( $F'_v/F'_m$ ), *queching* fotoquímico ( $qP$ ), *queching* não fotoquímico ( $NPQ$ ), rendimento quântico efetivo do PSII ( $\Phi_{PSII}$ ), e taxa linear de transporte de elétrons ( $ETR$ ), de acordo com Oxborough (2004).

Os parâmetros de trocas gasosas foram medidos em paralelo com as medições de fluorescência de *Chl a*, na mesma folha, no horário compreendido entre 8 e 12 h da manhã. Foram padronizados radiação de 1000 µmol fótons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, concentração atmosférica de CO<sub>2</sub> de 400 µmol mol<sup>-1</sup>, temperatura entre 25 e 28 °C, e umidade relativa de 70 a 77 %. Foram avaliados a taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> ( $A$  - µmol CO<sub>2</sub> m<sup>2</sup>s<sup>-1</sup>), a condutância estomática ( $g_s$  - µmol H<sub>2</sub>O.

$\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), a transpiração ( $E$  -  $\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), a concentração interna de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$  -  $\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$ ) e a razão entre a concentração interna e externa de  $\text{CO}_2$  ( $C_i/C_a$ ).

#### *Análises bioquímicas de metabólitos*

Ao final do experimento, folhas de terceiro nó e porções da raiz com cerca de 5 centímetros a partir do ápice foram coletadas no horário das 11 horas da manhã e congeladas rapidamente em nitrogênio líquido, sendo posteriormente armazenadas a  $-80^\circ\text{C}$  em ultra freezer. Amostras foram liofilizadas por 72 horas, moídas em moinho de bola e alíquotas de aproximadamente 15 mg utilizadas para análises de metabólitos. As alíquotas foram submetidas à extração com uma mistura de metanol-clorofórmio-água de acordo com Lisec et al. (2006). O metanol, fase solúvel, foi transferido para um tubo de 1,5 mL para a quantificação de açúcares e compostos fenólicos. O sedimento resultante foi sujeito a três lavagens com a mesma solução de extração. As concentrações de amido e proteína total foram quantificadas no sedimento obtido (Ferne et al. 2001). Os sobrenadantes e os sedimentos foram armazenados a  $-20^\circ\text{C}$  até análises posteriores. O amido e os açúcares solúveis (glicose, frutose e sacarose) foram analisados como descrito por Daloso et al. (2015) e Stitt et al. (1989). As concentrações de proteínas totais foram quantificadas como descrito por Cross et al. (2006) e os compostos fenólicos pela metodologia de Folin-Ciocalteu como descrito por Sun et al. (2007). A quantificação dos pigmentos clorofilas *a* e *b* foi realizada no primeiro passo da extração após a adição de metanol às amostras (antes da adição de clorofórmio e água). Todas as medições foram realizadas em um leitor de microplacas VersaMax™ (Molecular Devices®).

#### *Histoquímica para Al, compostos fenólicos e alcaloides no caule e folha*

Ao final do experimento, foram coletadas amostras da região mediana de folhas de terceiro nó e da região internodal imediatamente abaixo, para análises histoquímicas. Amostras frescas (sem fixação em nenhum reagente) foram seccionadas em micrótomo de mesa e as secções foram submetidas ao reagente Solochrome Azurine (Denton e Oughton, 1993) para detecção de Al e ao reagente de Wagner (Furr e Mahlberg, 1981) para detecção de alcaloides. Lâminas de ambos os testes foram montadas em gelatina glicerinada. Adicionalmente, amostras de caule e folha, com a mesma padronização e período de tempo, foram coletados e fixados em solução de formalina 4% com sulfato ferroso 10%, por 72 horas, para histoquímica de compostos fenólicos. O controle do teste foi feito com amostras coletadas e armazenadas em metanol P.A., por 72 horas e posteriormente transferidas para a solução de formalina 4% com sulfato ferroso 10% onde permaneceram por mais 72 horas. Amostras depois de lavadas em

água destilada, foram submetidas à desidratação em série etílica (Johansen, 1940), incluídas em metacrilato (Historesina - Leica), seccionadas a 5 µm em micrótomo rotativo (modelo Spencer 820, American Optical Corporation, EUA). Lâminas histológicas foram montadas em Permout.

Registro fotográfico foi feito em fotomicroscópio (modelo AX70 TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) com câmera digital acoplada (Zeiss Axio Cam HR3, Zeiss, Göttingen, Alemanha).

#### *Abundância relativa de elementos por microanálise de raios-X (MEV-EDS)*

Amostras de caule e folha foram coletadas de acordo com a mesma padronização das análises de microscopia de luz. Nas raízes foram coletadas amostras apicais com 2cm de comprimento. As amostras foram fixadas em FAA 50% (Johansen, 1940), por 48h, e estocadas em álcool 70%. Após desidratação, em série etílica, as amostras foram secas ao ponto crítico em CO<sup>2</sup> (CPD 030, BalTec, Balzers, Liechtenstein), afixadas em suportes metálicos e recobertas com carbono em evaporador Quorum (Q 150 T-E) para análise da abundância relativa (%) dos elementos Al, N, Mg, P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu e Zn nos diferentes órgãos da planta. A análise foi realizada em microscópio eletrônico de varredura (1430 VP, LEO, Cambridge, Inglaterra), com sonda de raio-X acoplada, do Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

#### *Estatística*

Foi realizada estatística descritiva e obtidas as médias e desvios-padrões. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para detectar as diferenças entre os valores médios. Para verificar possíveis diferenças entre as médias dos grupos, foi aplicado teste de Tukey a 5 % de probabilidade, utilizando o software Sisvar (Ferreira, 2011).

### **Resultados**

Não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros de trocas gasosas nos tempos de 24 e 48h após adição de Al (Figura 1). Estes valores não diferiram dos obtidos no tratamento sem Al. Entretanto, plantas submetidas a 500 µM de Al por 30 dias apresentaram maior taxa de assimilação de carbono ( $A$ ), acompanhada de uma maior condutância estomática ( $g_s$ ) e transpiração ( $E$ ), do que no tratamento sem Al (Figs. 1A-B, E). A taxa fotossintética ( $A$ ) e a condutância estomática ( $g_s$ ) após 30 dias em plantas cultivadas com Al, foram, respectivamente, duas e três vezes maiores que as plantas crescidas na ausência do elemento. Não houve variações nos valores de carbono interno ( $C_i$ ) e na razão  $C_i/C_a$  nos três tempos avaliados em ambos os tratamentos (Fig. 1C-D). Em plantas tratadas com Al ocorreu um

incremento de clorofilas *a* e *b*, um maior teor de clorofilas totais, não havendo diferença significativa na razão *Chl a / Chl b* (Fig. 1F-H).

Nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* não foram verificadas diferenças na eficiência fotoquímica máxima ( $F_v/F_m$ ) e na eficiência de captura de excitação ( $F'_v/F'_m$ ) do PSII nos tempos de 24h, 48h e 30 dias após a adição de Al na solução (Tabela 1). Por outro lado, a eficiência fotoquímica do PSII foi maior em plantas tratadas com Al nos três tempos avaliados (Tabela 1). Maior *quenching* fotoquímico (*qP*) foi verificado nos três tempos em plantas tratadas com Al, e maior *quenching* não fotoquímico (*NPQ*) apenas em 24h e 48h desse mesmo tratamento (Tabela 1). Além disso, incremento significativo na taxa de transporte de elétrons (*ETR*) ocorreu em plantas tratadas com Al em 48h e, em especial, aos 30 dias (Tabela 1). Neste último tempo, plantas tratadas com Al apresentaram *ETR* 50% superior ao de plantas cultivadas sem o elemento.

A concentração de açúcares solúveis e amido foi semelhante nas folhas de plantas de ambos os tratamentos (Tabela 2). Apenas o teor de sacarose foi significativamente maior nas folhas de plantas cultivadas sem Al (Tabela 2). Por outro lado, na raiz, as concentrações de glicose, frutose e amido foram maiores nas plantas tratadas com Al (Tabela 2). Adicionalmente, plantas desse tratamento também apresentaram maior concentração de proteínas totais na folha e na raiz, sendo que na folha, a concentração foi duas vezes maior que nas plantas crescidas na ausência de Al (Tabela 2).

A concentração de compostos fenólicos na raiz e na folha foi significativamente maior nas plantas cultivadas com Al (Tabela 2). Além disso, os sítios de localização dos compostos fenólicos se sobrepuseram aos de Al em ambos os órgãos (Fig. 2 e 3). Na folha houve sobreposição de sítios no parênquima paliçádico e lacunoso (Fig. 2B, D) e no caule em células parenquimáticas do córtex e medula (Fig. 3B, D). Também verificamos a mesma sobreposição dos sítios de alcaloides com Al (Fig. 2B, F; Fig. 3B, F), conforme visualizado para os compostos fenólicos.

Houve aumento significativo na proporção relativa de Al na raiz, no caule e na folha de plantas do tratamento com Al (Tabela 3). Nessas plantas a raiz apresentou a maior abundância relativa de Al, sendo o dobro da abundância relativa da folha e cerca de 50% a mais do que o caule (Tabela 3). Além disso, plantas crescidas na presença de Al também apresentaram maiores porcentagens de N, K, Mg e Fe na folha, de Fe e Cu no caule e P, S, Cu e Zn na raiz (Tabela 3). Plantas cultivadas sem Al exibiram maiores porcentagens de P, Ca, Cu e Zn na folha e de N, Ca e Mn na raiz (Tabela 3). A abundância relativa da maior parte dos elementos

analisados não diferiu em ambas as condições de tratamento no caule, assim como as concentrações de S e Mn na folha e K, Mg e Fe na raiz (Tabela 3).

## Discussão

Os resultados confirmam investigações anteriores de campo que relatam *C. aureum* como uma espécie acumuladora de Al (Castro, 2013), que não apenas exhibe alta resistência ao Al, mas que também apresenta alterações do metabolismo primário e secundário na ausência do elemento. As respostas de *C. aureum* frente a exposição ao Al podem ser interpretadas como uma adaptação da espécie a solos do Cerrado que são ácidos e com alta concentração de Al. Respostas semelhantes têm sido documentadas entre espécies acumuladoras de diferentes famílias botânicas como *Melastoma malabathricum* (Melastomataceae) (Watanabe et al., 2006), *Camellia sinensis* (Hajiboland et al., 2013a) e *Camellia japonica* (Theaceae) (Liu et al., 2020).

A redução da condutância estomática nas plantas do tratamento sem Al aos 30 dias pode ter sido responsável pela redução da taxa de transpiração, mas não da taxa fotossintética, uma vez que a relação  $C_i/C_a$  não sofreu alteração (Fig. 1). Nesse caso, a restrição na assimilação líquida de carbono pode ter ocorrido devido a alterações na atividade das enzimas envolvidas no processo e ao menor conteúdo de clorofilas a e b, que podem estar relacionadas as concentrações relativas de K, Fe e Mg nas folhas (Tabela 3), uma vez que esses elementos participam da estrutura e ativação das enzimas e pigmentos relacionados à fotossíntese (Broadley et al., 2012; Hawkesford et al., 2012).

Por outro lado, o aumento da taxa fotossintética nas plantas de *C. aureum* cultivadas com Al está associado ao maior teor de clorofilas a e b (Fig. 1F-G) e ao aumento considerável dos níveis de compostos de nitrogênio e de carbono na raiz e compostos de nitrogênio na folha (Tabela 2). Efeito semelhante com espécies acumuladoras cultivadas em sistema hidropônico foi observado em *Camellia sinensis* exposta a 300  $\mu\text{M}$  de Al (Hajiboland et al., 2013a) e *Camellia japonica* exposta a 500 e 1000  $\mu\text{M}$  de Al (Liu et al., 2020). Em espécies arbóreas acumuladoras de Al, *Quercus serreata* e *Qualea grandiflora*, um estímulo dos parâmetros bioquímicos também foram observados (Moriyama et al., 2015; Cury et al., 2019).

Plantas cultivadas com ou sem Al não apresentaram alterações nas razões de  $F_v/F_m$  e  $F'_v/F'_m$  (Tabela 1), sendo que o valor médio de  $F_v/F_m$  de ambos tratamentos nos três tempos avaliados foi em torno de 0,77; o que indica que não houve danos ao aparelho fotossintético (Bolhàr-Nordenkamp et al., 1989). Adicionalmente, em 24h, 48h e 30 dias o tratamento com

Al em *C. aureum* estimulou o *quenching* fotoquímico ( $qP$ ), a maior eficiência fotoquímica do *PSII* e em 48h e 30 dias a taxa de transporte de elétrons (*ETR*) (Tabela 1). O aumento do  $qP$  indica que o Al parece ter estimulado a eficiência fotossintética desde os tempos iniciais de 24 e 48h até aos 30 dias. Proporcionalmente, nos mesmos tempos, o *PSII* apresentou o maior valor de rendimento quântico efetivo, indicando que não houve prejuízos ao seu funcionamento, fato que pode ser reforçado pela maior taxa de transporte de elétrons (*ETR*) (Tabela 1). O aumento do *NPQ* nas plantas tratadas com Al apenas nos tempos de 24 e 48h demonstra que o excesso de energia, que possa ter sido gerado pela aclimatação inicial à adição de Al, foi dissipado de maneira não fotoquímica, evitando assim, a ocorrência de danos fotoquímicos. Resultado divergente foi encontrando em *Camellia sinensis* que não apresentou nenhuma alteração dos parâmetros de fluorescência da clorofila *a*, mesmo com aumento significativo nas trocas gasosas em condição de cultivo na presença de Al por 60 dias (Hajiboland et al., 2013a).

Abundância relativa considerável de Al foi encontrada nas raízes e na parte aérea de plantas de *C. aureum* cultivadas na ausência de Al em hidroponia (tabela 3). Esta abundância relativa se deve ao fato de as plantas terem crescido inicialmente em solo do Cerrado. Para análise foram amostradas folhas e regiões do caule e raízes que se desenvolveram após transferência das plantas para o sistema de hidroponia. Assim, é plausível supor que ocorreu uma redistribuição do Al acumulado em partes mais velhas, provenientes de campo, para as partes jovens. Plantas crescidas na presença de Al em hidroponia, também apresentaram maiores proporções relativas de importantes elementos como N, K, Mg e Fe na folha, e P, S, Cu e Zn na raiz (Tabela 3), o que pode em parte, conforme exposto acima, ter contribuído para as melhores respostas metabólicas e bioquímicas nesse tratamento. A maior abundância relativa dos elementos Mg e N estiveram associadas, respectivamente, ao aumento do teor na folha de clorofilas *a* e *b* (Fig. 1F) e maior teor de proteínas (Tabela 2). O Mg e o N são elementos essenciais que compõem a estrutura da clorofila, adicionalmente o N está envolvido na composição da estrutura química dos aminoácidos, os monômeros das proteínas (Hawkesford et al., 2012). Proteínas induzidas pela presença de Al podem estar envolvidas no metabolismo de ácidos orgânicos ou no transporte de ânions de ácidos orgânicos (Ma et al., 2001) que por sua vez, contribuem para a tolerância ao Al (Brunner e Sperisen, 2013; Grevenstuk e Romano, 2013)

Nossos resultados também mostraram um incremento na abundância relativa de Fe na parte aérea e uma baixa proporção relativa desse elemento na raiz de plantas do tratamento com Al comparadas as do tratamento sem Al (Tabela 3). O Fe está associado ao maior teor de

clorofilas, dado que esse elemento é necessário para a síntese de alguns dos complexos clorofila-proteína no cloroplasto, além de compor a estrutura dos citocromos (Broadley et al., 2012). Nossos resultados estão de acordo com os obtidos para, *Camellia japonica* que quando submetida a 1000  $\mu\text{M}$  de Al exibiu um aumento da concentração de Fe nas folhas (Liu et al., 2020). Por outro lado, as espécies *Melastoma malabathricum* e *Camellia sinensis* apresentaram uma redução no teor de Fe foliar em tratamentos com 500 e 300  $\mu\text{M}$  com Al, respectivamente (Watanabe et al., 2006; Hajiboland et al., 2013b). Esses resultados divergentes indicam que a relação Fe-Al precisa ser melhor investigada entre espécies acumuladoras de Al.

A abundância relativa de P nas raízes de *C. aureum* tratadas com Al foi superior as não tratadas (Tabela 3). A formação de complexos de Al com P é um dos principais fatores responsáveis pela redução da concentração de P em espécies sensíveis (Rahman et al., 2018), entretanto em espécies acumuladoras, o Al parece não exercer este mesmo efeito, pelo contrário, tem-se verificado um aumento da concentração interna nos tecidos, especialmente na raiz (Cury et al., 2019; Liu et al., 2020).

A sobreposição dos sítios de acúmulo de Al com os de compostos fenólicos e alcaloides nas células parenquimáticas do caule e no parênquima clorofiliano da folha de *C. aureum* (Fig. 2 e 3) sugere que a complexação do Al por esses compostos do metabolismo secundário seja um mecanismo de tolerância da espécie. De fato, em plantas de *C. aureum* tratadas com Al houve uma maior produção de fenólicos (Tabela 2). Em *Camellia sinensis* foi também verificado um aumento da concentração de compostos fenólicos em tratamentos com 15, 200 e 400  $\mu\text{M}$  de Al (Mukhopadyay et al., 2012). A complexação do Al com compostos fenólicos, em especial os com alto peso molecular, tem sido apontado como uma importante estratégia de resistência em espécies acumuladoras, em razão da alta afinidade e capacidade de ligação desses compostos com o  $\text{Al}^{3+}$  (Nagata et al., 1992; Zhang et al., 2016), mas as participações dos alcaloides não têm sido considerada. Espécies de Rubioideae além de serem acumuladoras de Al, são descritas como típicas produtoras de metabólitos secundários, da classe dos alcaloides indólicos e iridoides, sendo muitos inclusive de interesse farmacológico (Martin e Nunez, 2015; Moreira et al., 2015). Apesar de nenhum estudo apontar a participação dos alcaloides como mecanismo de resistência, nossos testes histoquímicos sugerem, em decorrência da sobreposição de acúmulo, o envolvimento desses compostos na resistência ao Al.

## Conclusão

Nesse estudo verificamos um efeito benéfico do Al sobre o metabolismo primário e secundário de *C. aureum* em decorrência de um estímulo da fotossíntese, dos parâmetros da

fluorescência da clorofila *a*, da maior concentração de glicose, frutose e amido na raiz e proteínas na raiz e na folha, bem como um aumento da produção de compostos fenólicos, quando comparamos com dados obtidos em plantas cultivadas na ausência deste elemento. A maior abundância relativa de nutrientes como Fe, Mg e N estiveram relacionados ao melhoramento desses parâmetros em plantas que receberam Al. Alcaloides e compostos fenólicos devem estar envolvidos na complexação do Al na parte aérea de *C. aureum* dada sobreposição dos sítios de acúmulo, em especial os compostos fenólicos que além disso, foram produzidos em maior concentração em plantas cultivadas na presença de Al.

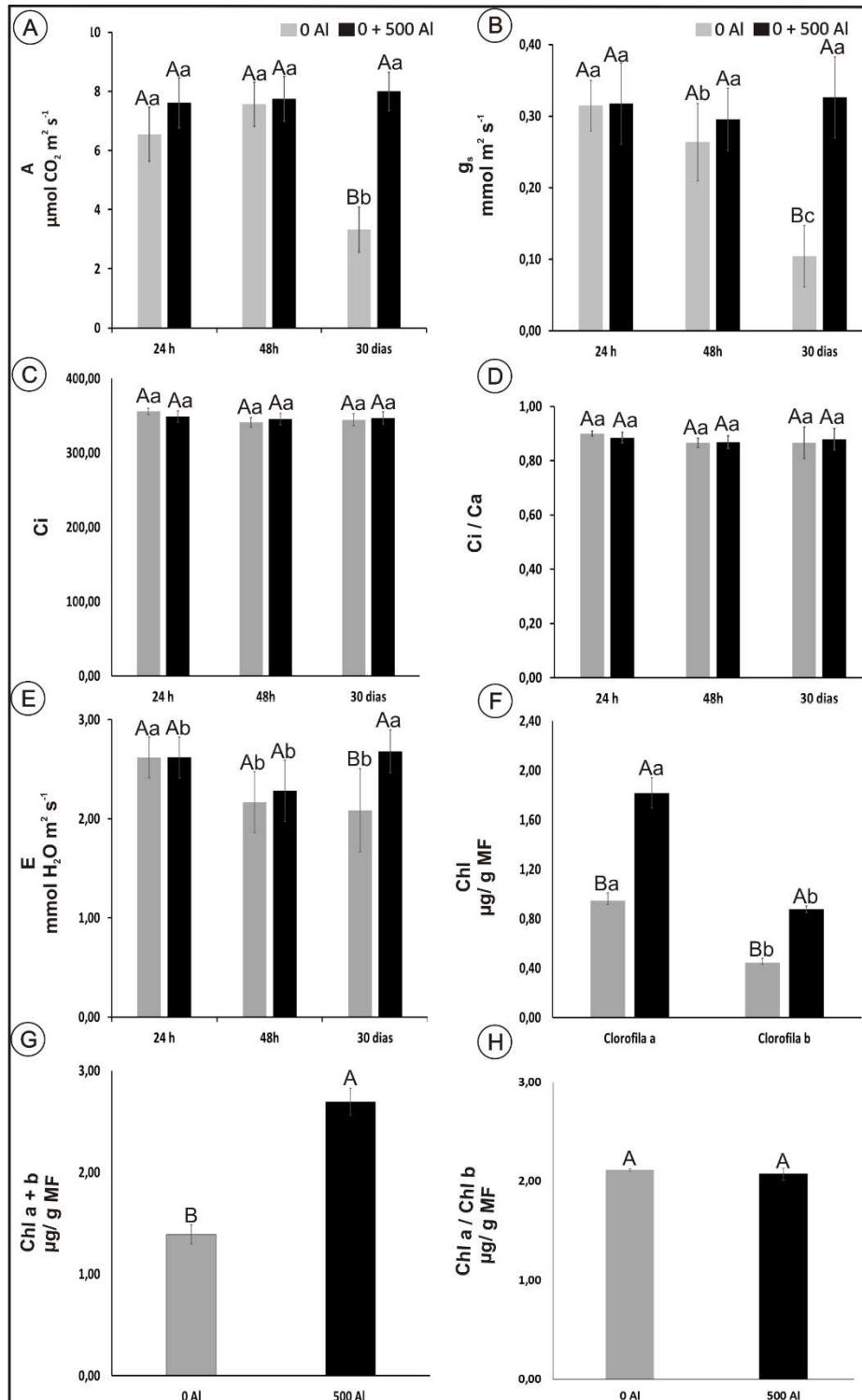
### Referências

- Andrade L.R.M., Barros L.M.G., Echevarria G.F., Amaral L.I.V., Cotta M.G., Rossatto D.R., Haridasan M., Franco A.C. (2011). Al-hyperaccumulator Vochysiaceae from the Brazilian Cerrado store aluminum in their chloroplasts without apparent damage. *Environmental and Experimental Botany* 70: 37-42.
- Bojórquez-Quintal E., Escalante-Magaña C., Echevarria-Machado I., Martínez-Estévez M. (2017). Aluminum, a friend or foe of higher plants in acid soils. *Frontiers in Plant Science* 8: 1-18.
- Bolhar-Nordenkamp H. R., Long S. P., Baker N. R., Oquist G., Schreiber U., Lechner E. G. (1989). Chlorophyll fluorescence as probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrument. *Functional Ecology* 3: 497-514.
- Broadley M., Brown P., Cakmak I., Rengel Z., Zhao F. (2012). Function of Nutrients: Micronutrients. In: Marschner P (Ed.). *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. 3 ed. London: Academic Press.
- Brunner I., Sperisen C. (2013). Aluminum exclusion and aluminum tolerance in woody plants. *Frontiers in Plant Science* 4:1-12.
- Castro L.M.R. (2013). Anatomia e histolocalização de alumínio em espécies herbáceas e subarborescentes do Cerrado. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa.
- Clark R.B. (1975). Characterization of phosphatase of intact maize roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 23:458-460.
- Cross J.M., Korff M., Altmann T., Bartzetko L., Sulpice R., Gibon Y., Palacios N., Stitt M. (2006). Variation of enzyme activities and metabolite levels in *Arabidopsis* accessions growing in carbon-limited conditions. *Plant Physiology* 142: 1574-1588.
- Cury N.F., Silva R.C.C., Andre M. S. F., Fontes W., Ricart C.A.O., Castro M.S., Silveira C.E.S., Williams T.C.R., Sousa M.V., Pereira L.A.R. (2019). Root proteome and metabolome reveal a high nutritional dependency of aluminium in *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae). *Plant Soil* 446:125-143.
- Daloso D.M., Antunes W.C., Pinheiro D.P., Waquim J.P., Araújo W.L., Loureiro M.E., Fernie A.R., Williams T.C.R. (2015). Tobacco guard cells fix CO<sub>2</sub> by both Rubisco and PEPcase while sucrose acts as a substrate during light-induced stomatal opening. *Plant Cell & Environment* 38: 2353-2371.

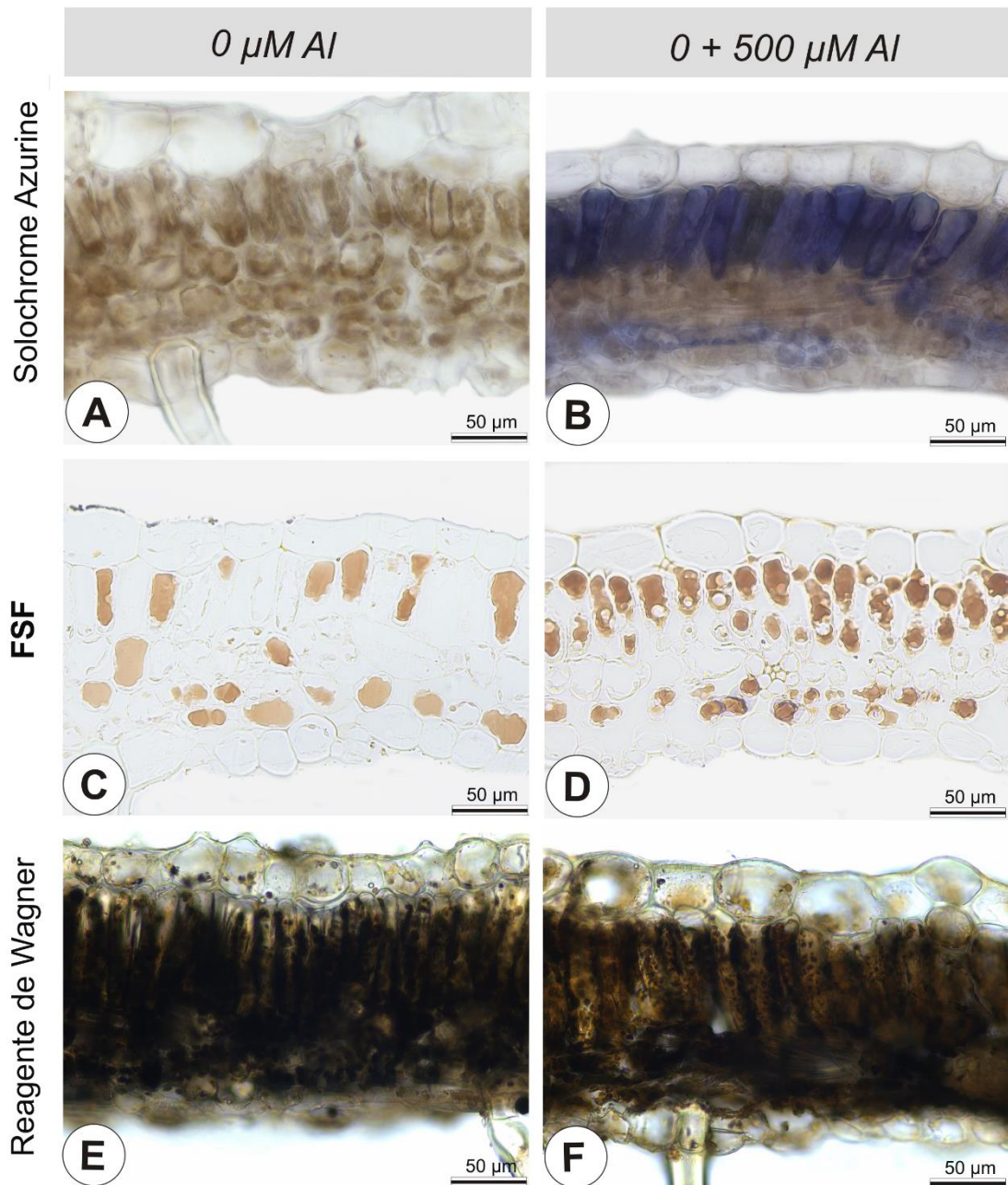
- Denton J., Oughton D.H. (1993). The use of an acid solochrome azurine stain to detect and assess the distribution of aluminum in *Sphagnum moss*. *Ambio* 22: 19-21.
- Fernie A.R., Roscher A., Ratcliffe R.G., Kruger N.J. (2001). Fructose 2,6- bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1- phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta* 212: 250-263.
- Ferreira D.F. (2011) Sisvar: A computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia* 35: 1039-1042.
- Furr Y., Mahlberg P.G. (1981). Histochemical analysis of lactifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. *Journal of Natural Products* 44: 153-159.
- Grevenstuk T., Romano A. (2013). Aluminium speciation and internal detoxification mechanisms in plants: where do we stand? *Metallomics* 5: 1584-1594.
- Hajiboland R., Rad S.B., Barceló J., Poschenrieder C. (2013a). Mechanisms of aluminum-induced growth stimulation in tea (*Camellia sinensis*). *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 176: 616-625.
- Hajiboland R., Barceló J., Poschenrieder C., Tolrà R. (2013b). Amelioration of Iron Toxicity: a Mechanism for Aluminum-Induced Growth Stimulation in Tea Plants. *Journal of Inorganic Biochemistry* 128: 183-187.
- Haridasan M. (2008). Nutritional adaptations of native plants of the cerrado biome in acid soils. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 20:183-195.
- Haridasan M. (1988). Performance of *Miconia albicans* (sw.) Triana, na aluminum accumulating species, in acidic and calcareous soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 19: 7-12, 1091-1103.
- Hawkesford M., Horst W., Kichey T., Lambers H., Schjoerring J., Møller I.S., White P. (2012). Functions of Macronutrients. In: Marschner P (Ed.). *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. 3 ed. London: Academic Press.
- Jansen S., Watanabe T., Dessein S., Smets E., Robbrecht E. (2003). A comparative study of metal levels in leaves of some Al-accumulating Rubiaceae. *Annals of Botany* 91: 657-663.
- Jansen S., Broadley M.R., Robbrecht E., Smets E. (2002). Aluminum hyper accumulation in Angiosperms: a review of its phylogenetic significance. *The Botanical Review* 68: 235-269.
- Jansen S., Dessein S., Piesschaert F., Robbrecht E., Smets E. (2000). Aluminium Accumulation in Leaves of Rubiaceae: Systematic and Phylogenetic Implications. *Annals of Botany* 85: 91-101.
- Johansen D.A. (1940). *Plant Microtechnique*. New York, McGraw Hill Book.
- Kochian L.V., Piñeros M.A., Liu J., Magalhaes J.V. (2015). Plant Adaptation to Acid Soils: The Molecular Basis for Crop Aluminum Resistance. *Annual Review of Plant Biology* 66: 571-598.
- Kollmeier M., Felle H.H., Horst W.J. (2000). Genotypical differences in aluminum resistance of maize are expressed in the distal part of the transition zone. Is reduced basipetal auxin flow involved in inhibition of root elongation by aluminum? *Plant Physiology* 122: 945-956.

- Lisec J., Schauer N., Kopka J., Willmitzer L., Fernie A.R. (2006). Gas Chromatography Mass Spectrometry-Based Metabolite Profiling in Plants. *Nature Protocols* 1: 387-396.
- Liu Y., Tao J., Cao J., Zeng Y., Li X., Ma J., Huang Z., Jiang M., Sun L. (2020). The Beneficial Effects of Aluminum on the Plant Growth in *Camellia japonica*. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00251-9>.
- Ma J.F., Ryan P.R., Delhaize E. (2001). Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends in Plant Science* 6: 273-278.
- Malta P.G., Arcanjo-Silva S., Ribeiro C., Campos N.V., Azevedo A.A. (2016). *Rudgea viburnoides* (Rubiaceae) overcomes the low soil fertility of the Brazilian Cerrado and hyperaccumulates aluminum in cell walls and chloroplast. *Plant Soil* 408:369-384.
- Martins D., Nunez C.V. (2015). Secondary Metabolites from Rubiaceae Species. *Molecules* 20: 13422-13495.
- Moreno-Alvarado M., García-Morales S., Trejo-Téllez L.I., Hidalgo-Contreras J. V., Gómez-Merino F.C. (2017). Aluminum enhances growth and sugar concentration, alters macronutrient status and regulates the expression of NAC transcription factors in rice. *Frontiers in Plant Science* 8:73. doi: 10.3389/fpls.2017.00073.
- Moreira V.F., Vieira I.J.C., Braz-Filho R. (2015). Chemistry and Biological Activity of Condamineeae Tribe: A Chemotaxonomic Contribution of Rubiaceae Family. *American Journal of Plant Sciences* 6: 2612-2631.
- Moriyama U., Tomioka R., Kojima M., Sakakibara H., Takenaka C. (2015). Aluminum effect on starch, soluble sugar, and phytohormone in roots of *Quercus serrata* Thunb. Seedlings. *Trees* 30: 405-413.
- Muhammad N., Zvobgo G., Guo-ping Z. (2019). The beneficial effects and possible mechanisms of aluminum on plant growth in acidic soil. *Journal of Integrative Agriculture* 18: 1518-1528.
- Mukhopadhyay M., Bantawa P., Das A., Sarkar B., Bera B., Ghosh P., Mondal T.K. (2012). Changes of growth, photosynthesis and alteration of leaf antioxidative defence system of tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] seedlings under aluminum stress. *Biometals* 25:1141-1154.
- Nagata T., Hayatsu M., Kosuge N. (1992). Identification aluminum forms in tea leaves by <sup>27</sup>Al NMR. *Phytochemistry* 31:1215-1218.
- Oxborough K. (2004): Imaging of chlorophyll a fluorescence: theoretical and practical aspects of an emerging technique for the monitoring of photosynthetic performance. *Journal of Experimental Botany* 55: 1195-1205.
- Paro, S.P. (2013). A influência de fatores abióticos na diversidade de espécies do estrato herbáceo-subabustivo em cerrado, Flona de Paraopeba, MG. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa
- Rahman M. A., Lee S.H., Ji H.C., Kabir A.H., Jones C.S., Lee K.W. (2018). Importance of Mineral Nutrition for Mitigating Aluminum Toxicity in Plants on Acidic Soils: Current Status and Opportunities. *International Journal of Molecular Sciences* 19:4-28.
- Rao I.M., Miles J.W., Beebe S.E., Horst W.J. (2016). Root adaptations to soils with low fertility and aluminium toxicity *Annals of Botany* 118: 593-605.

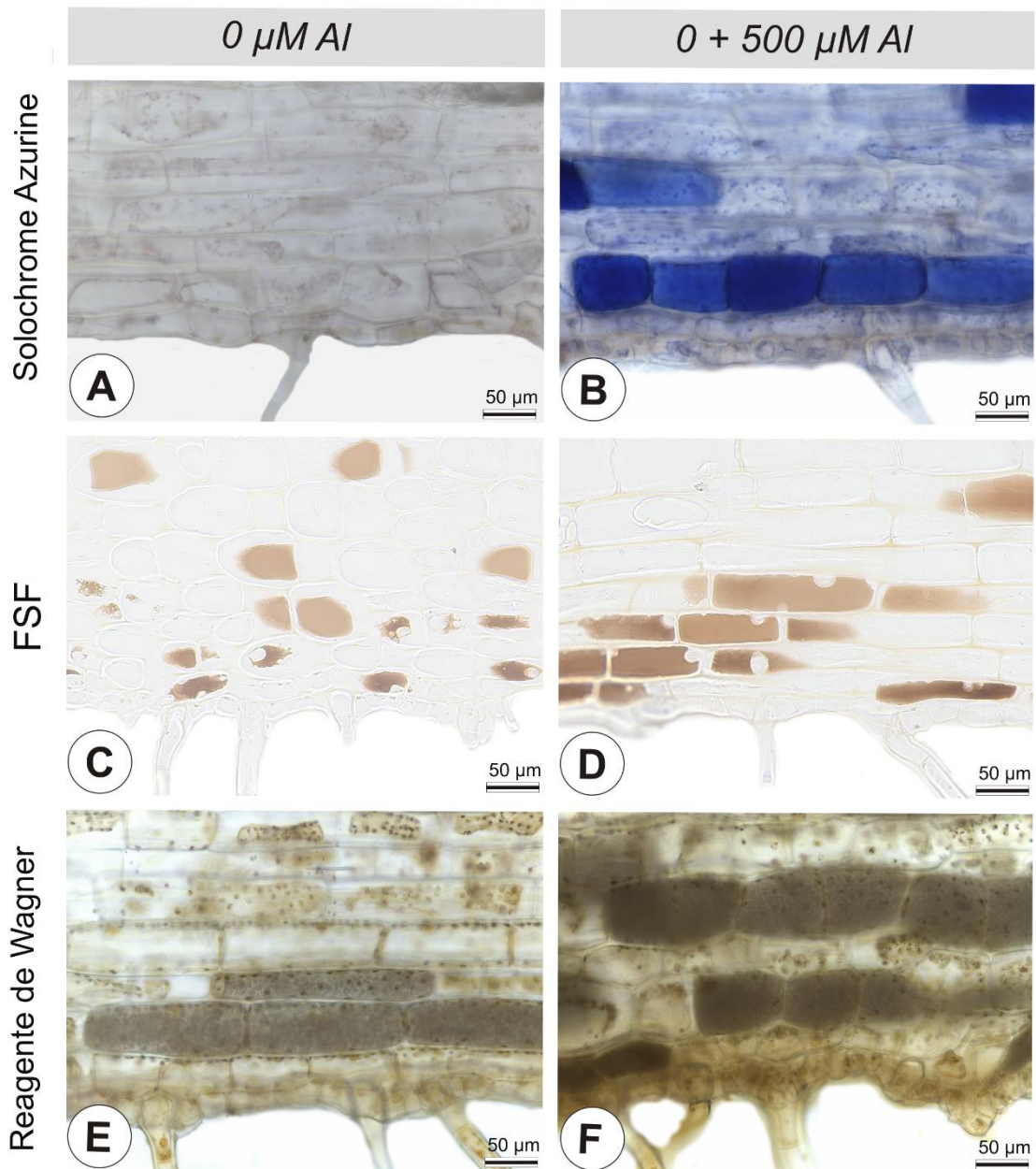
- Rehmus A., Bigalke M., Valarezo C., Mora-Castillo J., Wilcke W. (2014). Aluminum toxicity to tropical montane forest tree seedlings in southern Ecuador: response of biomass and plant morphology to elevated Al concentrations. *Plant Soil* 382: 301-315.
- Schmitt M., Boras S., Tjoa A., Watanabe T., Jansen, S. (2016). Aluminium accumulation and intra-tree distribution patterns in three arbor aluminosa (*Symplocos*) species from Central Sulawesi. *PLOS ONE* 11(2): e0149078.doi: 10.1371/journal.pone.0149078.
- Singh S., Tripathi D.K., Singh S., Sharma S., Dubey N.K., Chauhana D.K., Vaculík M. (2017). Toxicity of aluminium on various levels of plant cells and organism: A review. *Environmental and Experimental Botany* 137: 177-193.
- Stitt M., Lilley R.M., Gerhardt R., Heldt H.W. (1989). Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. *Methods in Enzymology* 174: 518-552.
- Souza M.C., Habermann G., Amaral C. L., Rosa A.L., Pinheiro M.H.O., Costa F.B. (2017). *Vochysia tucanorum* Mart.: an aluminum-accumulating species evidencing calcifuge behavior. *Plant and soil* 419: 377-389.
- Sun T., Xu Z., Wu C.T., Janes M., Prinyawiwatkul W., No H.K. (2007). Antioxidant Activities of Different Colored Sweet Bell Peppers (*Capsicum annuum* L.). *Journal of food science* 72: 98-102.
- Wang L., Fan X.W., Pan J.L., Huang Z.B., Li Y.Z. (2015). Physiological characterization of maize tolerance to low dose of aluminum, highlighted by promoted leaf growth. *Planta* 242: 1391-1403.
- Watanabe T., Jansen S., Osaki M. (2006). Al-Fe interactions and growth enhancement in *Melastoma malabathricum* and *Miscanthus sinensis* dominating acid sulphate soils. *Plant, Cell and Environment* 29: 2124-2132.
- Xu Q., Wang Y., Ding Z., Song L., Li Y., Ma D., Wang Y., Shen J., Jia S., Sun H., Zhang H. (2016). Aluminum induced metabolic responses in two tea cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry* 101: 162-172.
- Zhang L., Liu R., Gung B.W., Tindall S., Gonzalez J.M., Halvorson J.J., Hagerman A.E. (2016). Polyphenol-Aluminum Complex Formation: Implications for Aluminum Tolerance in Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64: 3025-3033.



**Figura 1:** Parâmetros de trocas gasosas e teor de Clorofila *a* e *b* em plantas de *Coccocypselum aureum* cultivadas por 60 dias, em hidroponia, sem Al (0) e com adição de Al (0 + 500 μM) após 30 dias sem Al. Análises de trocas gasosas realizadas em 24h, 48h e 30 dias após adição de Al e teor de clorofilas ao final do experimento (60 dias). Taxa líquida de assimilação de carbono (*A*), condutância estomática (*g<sub>s</sub>*), carbono interno (*C<sub>i</sub>*), relação entre carbono interno e externo (*C<sub>i</sub>/C<sub>a</sub>*), transpiração (*E*), teor de clorofila *a* e *b* (*Chl*), teor de clorofila total (*Chl a + b*) e razão de clorofila *a* e *b* (*Chl a / Chl b*). Cada coluna representa a média ± desvio padrão (*n* = 5). Letras maiúsculas indicam diferenças significativas (*p* ≤ 0,05) entre os tratamentos em cada tempo e letras minúsculas denotam diferenças significativas (*p* ≤ 0,05) entre os tempos em cada tratamento, de acordo com o teste de Tukey.



**Figura 2:** Localização histoquímica de Al, compostos fenólicos e alcaloides em folhas (cortes transversais) de plantas de *Coccocypselum aureum* cultivadas por 60 dias, em hidroponia, sem Al (0), em A, C, E; e com adição de Al (0+500  $\mu$ M), B, D, F, após 30 dias na ausência de Al. Análise realizada ao final do experimento. A e B: teste com Solochrome Azurine. Cor azul em B indica presença de Al. C e D: teste com formalina em sulfato ferroso (FSF). Cor marron indica presença de compostos fenólicos. E e F: teste com Reagente de Wagner. Cor acastanhada escura indica presença de alcaloides.



**Figura 3:** Localização histoquímica de Al, compostos fenólicos e alcaloides na região cortical do caule (cortes transversais) de plantas de *Coccocypselum aureum* cultivadas por 60 dias, em hidroponia, sem Al (0), em A, C, E; e com adição de Al (0+500  $\mu\text{M}$ ) B, D, F, após 30 dias na ausência de Al. Análise realizada ao final do experimento. A e B: teste com Solochrome Azurine. Cor azul em B indica presença de Al. C e D: teste com formalina em sulfato ferroso (FSF). Cor marron indica presença de compostos fenólicos. E e F: teste com Reagente de Wagner. Cor acastanhada escura indica presença de alcaloides.

**Tabela 1:** Parâmetros de fluorescência da clorofila *a* em *Coccocypselum aureum* cultivado por 60 dias, em hidroponia, sem Al (0) e com adição de Al (0+500 µM) após 30 dias na ausência de Al. Análises realizadas em 24h, 48h e 30 dias após adição de Al à solução.

| PARÂMETROS            | Tratamento sem Al |                 |                 | Tratamento com Al (0 + 500 µM) |                 |                 |
|-----------------------|-------------------|-----------------|-----------------|--------------------------------|-----------------|-----------------|
|                       | 24h               | 48h             | 30 dias         | 24h                            | 48h             | 30 dias         |
| <b><i>Fv/Fm</i></b>   | 0,77 ± 0,01 Aa    | 0,77 ± 0,01 Aa  | 0,77 ± 0,01 Aa  | 0,77 ± 0,01 Aa                 | 0,77 ± 0,01 Aa  | 0,77 ± 0,01 Aa  |
| <b><i>F'v/F'm</i></b> | 0,56 ± 0,02 Aa    | 0,54 ± 0,01 Aa  | 0,54 ± 0,04 Aa  | 0,55 ± 0,02 Aa                 | 0,53 ± 0,03 Aa  | 0,56 ± 0,03 Aa  |
| <b><i>qP</i></b>      | 0,18 ± 0,01 Ba    | 0,22 ± 0,04 Ba  | 0,19 ± 0,01 Ba  | 0,27 ± 0,02 Aa                 | 0,30 ± 0,02 Aa  | 0,28 ± 0,03 Aa  |
| <b><i>NPQ</i></b>     | 1,22 ± 0,11 Bb    | 1,37 ± 0,10 Bb  | 2,37 ± 0,39 Aa  | 1,61 ± 0,21 Ab                 | 2,05 ± 0,23 Aa  | 1,52 ± 0,33 Bb  |
| <b><i>ΦPSII</i></b>   | 0,10 ± 0,01 Bb    | 0,13 ± 0,01 Ba  | 0,09 ± 0,00 Bb  | 0,13 ± 0,01 Ab                 | 0,16 ± 0,01 Aa  | 0,14 ± 0,01 Ab  |
| <b><i>ETR</i></b>     | 50,08 ± 6,64 Aa   | 56,78 ± 4,42 Ba | 40,32 ± 1,48 Bb | 57,25 ± 2,51 Ab                | 68,72 ± 3,71 Aa | 60,95 ± 4,26 Ab |

\**Fv/Fm* - Eficiência fotoquímica máxima do *PSII*, eficiência de captura de excitação do *PSII* (*F'v/F'm*), *quenching* fotoquímico (*qP*), *quenching* não fotoquímico (*NPQ*), rendimento quântico efetivo do *PSII* (*ΦPSII*) e taxa linear de transporte de elétrons (*ETR*).

Dados representam médias ± desvio padrão (n = 5). Letras maiúsculas indicam diferenças significativas (p ≤ 0,05) entre os tratamentos em relação a cada período de tempo e letras minúsculas denotam diferenças significativas (p ≤ 0,05) entre os tempos dentro de cada tratamento, de acordo com o teste de Tukey.

**Tabela 2:** Teor de proteínas totais, açúcares (glicose, frutose e sacarose), amido e fenóis totais na folha e raiz de *Coccocypselum aureum* cultivado por 60 dias, em hidroponia, sem Al (0) e com adição de Al (0+500 µM) após 30 dias na ausência de Al. Análise realizada 30 dias após adição de Al à solução.

| Parâmetros                                 | Tratamentos com Al |                     |                  |                     |
|--|--------------------|---------------------|------------------|---------------------|
|  | Folha              |                     | Raiz             |                     |
|  | Sem Al             | Com Al (0 + 500 µM) | Sem Al           | Com Al (0 + 500 µM) |
| <b>Proteínas</b> (mg g <sup>-1</sup> FW)   | 2,43 ± 0,40 Bb     | 5,74 ± 0,25 Ab      | 7,35 ± 0,49 Ba   | 8,65 ± 0,83 Aa      |
| <b>Glicose</b> (mmol Kg <sup>-1</sup> FW)  | 151,11 ± 0,40 Aa   | 150,73 ± 2,83 Aa    | 133,12 ± 1,43 Bb | 146,57 ± 4,33 Aa    |
| <b>Frutose</b> (mmol Kg <sup>-1</sup> FW)  | 150,34 ± 2,26 Aa   | 150,22 ± 3,22 Aa    | 124,23 ± 1,75 Bb | 130,33 ± 1,65 Ab    |
| <b>Sacarose</b> (mmol Kg <sup>-1</sup> FW) | 77,98 ± 2,47 Ab    | 68,34 ± 1,36 Bb     | 127,32 ± 9,44 Aa | 126,29 ± 11,30 Aa   |
| <b>Amido</b> (mmol Kg <sup>-1</sup> FW)    | 123,21 ± 12,89 Aa  | 117,60 ± 14,83 Aa   | 7,57 ± 0,33 Bb   | 9,67 ± 0,45 Ab      |
| <b>Fenóis</b> (ug mg <sup>-1</sup> FW)     | 17,00 ± 2,55 Ba    | 63,60 ± 6,66 Aa     | 4,87 ± 1,88 Bb   | 12,31 ± 2,19 Ab     |

Os dados representam médias ± desvio padrão (n = 5). Letras maiúsculas indicam diferenças significativas (p ≤ 0,05) entre os tratamentos dentro dos órgãos e letras minúsculas denotam diferenças significativas (p ≤ 0,05) dos órgãos dentro de cada tratamento, de acordo com o teste de Tukey.

**Tabela 3:** Abundância relativa de N, P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe, Mn, Zn e Al na raiz, caule e folha de *Coccocypselum aureum* cultivado por 60 dias, em hidroponia, sem Al (0) e com adição de Al (0+500  $\mu$ M) após 30 dias na ausência de Al. Análise realizada ao final do experimento (60 dias).

| Órgão | Tratamento | N (%)             | P (%)             | K (%)            | Ca (%)            | Mg (%)           | S (%)             | Cu (%)           | Fe (%)            | Mn (%)           | Zn (%)           | Al (%)            |
|-------|------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|-------------------|
| RAIZ  | 0          | 40,40 $\pm$ 0,92a | 12,13 $\pm$ 0,3b  | 1,89 $\pm$ 0,18a | 15,78 $\pm$ 0,47a | 4,33 $\pm$ 0,36a | 6,94 $\pm$ 0,22b  | 1,79 $\pm$ 0,10b | 10,03 $\pm$ 1,11a | 0,14 $\pm$ 0,02a | 0,63 $\pm$ 0,07b | 5,89 $\pm$ 0,22b  |
|       | 0 + 500    | 27,08 $\pm$ 1,00b | 16,49 $\pm$ 0,60a | 1,97 $\pm$ 0,15a | 6,14 $\pm$ 0,41b  | 3,57 $\pm$ 0,27a | 8,88 $\pm$ 0,38a  | 7,74 $\pm$ 0,34a | 12,05 $\pm$ 0,46a | 0,08 $\pm$ 0,01b | 1,56 $\pm$ 0,13a | 14,47 $\pm$ 0,52a |
| CAULE | 0          | 29,28 $\pm$ 0,78a | 5,07 $\pm$ 1,12a  | 2,27 $\pm$ 0,43a | 34,65 $\pm$ 5,08a | 2,46 $\pm$ 0,21a | 18,60 $\pm$ 1,08a | 0,64 $\pm$ 0,17b | 1,75 $\pm$ 0,42b  | 0,33 $\pm$ 0,04a | 0,96 $\pm$ 0,06a | 5,90 $\pm$ 0,40b  |
|       | 0 + 500    | 29,91 $\pm$ 1,76a | 3,71 $\pm$ 0,40a  | 1,61 $\pm$ 0,13a | 33,41 $\pm$ 1,51a | 3,07 $\pm$ 0,18a | 14,95 $\pm$ 1,35a | 1,33 $\pm$ 0,15a | 3,13 $\pm$ 0,24a  | 0,45 $\pm$ 0,06a | 0,80 $\pm$ 0,04a | 10,39 $\pm$ 0,50a |
| FOLHA | 0          | 26,43 $\pm$ 1,62b | 4,67 $\pm$ 0,39a  | 1,64 $\pm$ 0,17b | 30,28 $\pm$ 1,55a | 2,85 $\pm$ 0,08b | 27,68 $\pm$ 2,37a | 2,42 $\pm$ 0,17a | 0,72 $\pm$ 0,07b  | 0,23 $\pm$ 0,05a | 2,21 $\pm$ 0,31a | 3,15 $\pm$ 0,24b  |
|       | 0 + 500    | 32,00 $\pm$ 0,40a | 3,12 $\pm$ 0,49b  | 2,46 $\pm$ 0,16a | 25,00 $\pm$ 0,91b | 3,28 $\pm$ 0,19a | 24,54 $\pm$ 1,31a | 1,04 $\pm$ 0,25b | 1,18 $\pm$ 0,12a  | 0,27 $\pm$ 0,03a | 0,57 $\pm$ 0,12b | 7,50 $\pm$ 0,41a  |

Os dados representam médias  $\pm$  desvio padrão (n = 5). Letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos dentro de cada órgão de acordo com o teste de Tukey.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Experimento utilizando o cultivo hidropônico permitiu um melhor entendimento das respostas de *C. aureum* ao Al. Destacamos, no entanto, que há necessidade se estabelecer metodologia de cultivo em laboratório ou em casa de vegetação da espécie para a obtenção de plantas matrizes a serem utilizadas. Não foi possível a obtenção dos indivíduos em número adequado, a partir de sementes ou estacas, e como método alternativo foram utilizados indivíduos provenientes diretamente de campo, o que foi responsável por uma alta carga de Al mesmo nas plantas do tratamento sem Al. Como o Al se mostrou benéfico para o crescimento normal da espécie no estágio vegetativo que utilizamos nesse estudo, inferimos que ele também se fará necessário em protocolos de cultivo em condições laboratoriais, como no cultivo em cultura de tecidos. Mesmo considerando essa hipótese, esse tipo de metodologia será vantajoso, pois será possível controlar a dosagem de Al utilizada e a obtenção de uma matriz de plantas mais homogênea, além do estudo da espécie nas etapas de germinação e de implantação do desenvolvimento da plântula.

Em estudos futuros, a realização de análises parciais, a fim de acompanhar a evolução dos parâmetros selecionados, no início do experimento e logo após os 30 dias, antes da alteração ou aplicação das dosagens de Al, será essencial. Além disso, testes com dosagens inferiores a 250  $\mu\text{M}$  de Al para plantas que serão cultivadas durante todo período experimental na presença de Al serão necessários. Os pontos destacados anteriormente serão de fundamental relevância para a melhor compreensão da ação do Al em *C. aureum* em se tratando principalmente da nutrição mineral.