

ANA PAULA PIRES MARQUES

**ALUMÍNIO: ELEMENTO BENÉFICO OU ESSENCIAL PARA A ESPÉCIE DE
CERRADO *Borreria latifolia* (RUBIACEAE)?**

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

M357a
2021 Marques, Ana Paula Pires, 1990-
Alumínio: elemento benéfico ou essencial para a espécie de cerrado *Borreria latifolia* (Rubiaceae)? / Ana Paula Pires Marques. – Viçosa, MG, 2021.

1 tese eletrônica (87f.): 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.2022.289>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Borreria latifolia*. 2. Plantas - Efeito do alumínio.
3. Meristemas. 4. Fotossíntese. 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

Bibliotecário(a) responsável: Bruna Silva CRB6/2552


ANA PAULA PIRES MARQUES

**ALUMÍNIO: ELEMENTO BENÉFICO OU ESSENCIAL PARA A ESPÉCIE DE
CERRADO *Borreria latifolia* (RUBIACEAE)?**

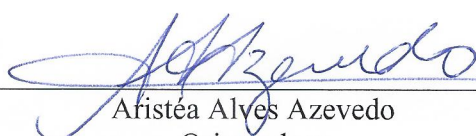
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 29 de outubro de 2021.

Assentimento:



Ana Paula Pires Marques
Autora



Aristéa Alves Azevedo
Orientadora

“Quando a saudade é demais, ela transborda pelos olhos”.

Dedicado ao meu pai, Moacir Eugênio F. Marques.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo sustento nos momentos difíceis e a minha família pelo amor incondicional.

Ao meu pai por tudo que conquistei e me tornei.

A minha mãe pelo exemplo de força e perseverança.

Ao meu irmão pelo cuidado e proteção.

Ao meu companheiro Gabriel pela amizade e por caminhar ao meu lado durante todos esses anos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

A Universidade Federal de Viçosa - UFV por essa realização profissional.

Ao Departamento de Biologia Vegetal, principalmente ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, pela estrutura necessária para o desenvolvimento do trabalho.

Aos professores das disciplinas que cursei por todo conhecimento transmitido.

A minha orientadora Aristéa Alves Azevedo pelos bons e inesquecíveis momentos vividos durante todos esses anos de parceria. Pelos ensinamentos, paciência e carinho.

Ao professor Cleberson Ribeiro pela coorientação.

A Danielle S. Brito pelo auxílio nas análises bioquímicas.

Aos funcionários do Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV pelas orientações nas análises de microscopia confocal e de varredura.

As técnicas Aurora e Rosana pela assistência técnica e conversas descontraídas.

Ao Programa de Fisiologia Vegetal, em nome dos professores Fábio Murilo da Matta, Adriano Nunes Nesi e Wagner Araújo por cederem os equipamentos e laboratórios.

Aos amigos que fiz no laboratório de Anatomia Vegetal, que tanto me ajudaram na realização desse trabalho, em especial aos estagiários João Santana e Maria das Graças pelo auxílio na montagem do experimento e processamento de material.

Ao meu querido amigo Ivan Becari pelos bons momentos vividos nessa caminhada, pelas risadas e companhia. Você foi um dos grandes presentes que recebi em todos esses anos!

A todos que de alguma forma contribuíram para a minha conquista.

Obrigada!

BIOGRAFIA

Ana Paula Pires Marques, filha de Moacir Eugênio Fadini Marques e Maria Emília Pires, nasceu em Belo Horizonte, MG, em 03 de outubro de 1990. cursou o ensino médio no Centro de Educação e Cultura (CEC) Diocesano na cidade de Janaúba, Minas Gerais, no período de 2006 a 2008. Ingressou na Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES) em fevereiro de 2010, e concluiu o curso de bacharelado em Ciências Biológicas em dezembro de 2013. Durante a graduação, participou de atividades de pesquisa, ensino e extensão, dentre as quais se destacam: bolsista de iniciação científica, CNPq e Petrobras (PFRH), no laboratório de Micropropagação Vegetal, onde trabalhou com organogênese e morfoanatomia vegetal; monitora na disciplina de Anatomia Vegetal (1º semestre de 2012); membro do colegiado de Ciências Biológicas Bacharelado (2012 - 2013) e da comissão organizadora do II Simpósio do PPGCB, XIV Semana da Biologia e IX Encontro Norte Mineiro de Biólogos (2012). Em março de 2014 iniciou o mestrado em Botânica, ênfase em anatomia vegetal, pelo Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (UFV), concluindo o curso em março de 2016 com a defesa da dissertação intitulada “Acúmulo e fitotoxicidade do flúor em *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae)”. Em março de 2016 ingressou no curso de doutorado em Botânica da UFV, durante o qual trabalhou investigando os mecanismos de resistência de plantas nativas do cerrado ao alumínio. Durante o doutorado, participou como membro da comissão organizadora do XIII Congresso de Ecologia do Brasil e III International Symposium of Ecology and Evolution (2017) e como palestrante da mesa redonda "Climatologia de Eventos Extremos no Brasil" no XV Congresso Nacional de Meio Ambiente de Poços de Caldas e II Simpósio de Apicultura (2018). Ministrou minicursos/exposições na área de botânica nos eventos: 38º Encontro Regional de Botânicos de Minas Gerais, Bahia e Espírito Santo – ERBOT (2018); 4º e 5º edição do Ciências na Praça (2018) e Simpósio de Integração Acadêmica - SIA (2019). Em dezembro de 2020 assumiu como técnica de laboratório em microscopia no Centro de Formação de Professores da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) - Campus Amargosa. Em outubro de 2021 defendeu a tese intitulada “Alumínio: elemento benéfico ou essencial para a espécie de cerrado *Borreria latifolia* (Rubiaceae)?”

RESUMO

MARQUES, Ana Paula Pires, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2021. **Alumínio: elemento benéfico ou essencial para a espécie de cerrado *Borreria latifolia* (Rubiaceae)?** Orientadora: Aristéa Alves Azevedo.

O íon trivalente de alumínio (Al^{3+}) é tóxico para maioria das plantas em solos ácidos, porém para algumas espécies nativas este metal é considerado benéfico. Recentemente, foi comprovada a essencialidade do metal para a espécie hiperacumuladora *Camellia sinensis* (chá-da-índia) e relatado que o desenvolvimento da lenhosa de cerrado *Vochysia tucanorum* é prejudicado na ausência deste elemento. Entretanto, ainda não há relatos da essencialidade do Al para espécies do cerrado e o seu efeito no metabolismo de plantas hiperacumuladoras, como a herbácea *Borreria latifolia* (Rubiaceae), não foi totalmente elucidado. Neste trabalho avaliamos as repostas morfológicas, anatômicas, bioquímicas e fisiológicas de indivíduos de *B. latifolia*, coletados em solo de cerrado, e submetidos, em hidroponia, a 0 μM de Al^{3+} por 57 dias (T0) e 0 μM de Al^{3+} por 40 dias, acrescentando-se, após esse período, 500 μM de Al^{3+} por mais 17 dias (T0+500). A princípio, plantas T0+500 permaneceriam 40 dias sem e 40 dias com o Al, porém o tempo de exposição ao metal teve que ser reduzido para 17 dias pois alguns indivíduos T0 morreram, indicando que as demais plantas desse tratamento não sobreviveriam por mais tempo. Após 57 dias de cultivo na ausência do Al (T0), plantas de *B. latifolia* apresentaram raízes escurecidas e gelatinosas, folhas necrosadas e morte de gemas axilares e de meristemas apicais caulinares. Diversos danos histológicos, como hipertrofia, alterações mitóticas, descolamento de células na raiz e senescência de coléteres, foram observados nesse tratamento. Nos 40 dias sem Al, indivíduos T0+500 exibiam necroses em folhas, em ápices de raízes e de caules. Porém, após a adição de Al, observou-se produção de raízes saudáveis de coloração clara e de brotações caulinares, sem alterações anatômicas, que se desenvolveram a partir de gemas adventícias. Houve acúmulo do Al em todos os tecidos dos órgãos vegetativos, inclusive em células condutoras do xilema. Adicionalmente, o Al foi registrado em coléteres, indicando uma possível exsudação do elemento, e em núcleos e nucléolos de células meristemáticas, o que pode estar relacionado com sua participação na manutenção da integridade do DNA. O Al reduziu o teor de malonaldeído e eletrólitos extravasados e elevou, no geral, o estado nutricional de *B. latifolia*. Como consequência, houve aumento no índice Spad das folhas e na produção de biomassa total pelas plantas T0+500. A análise de trocas

gasosas confirmou que o Al aumentou os valores de todos os parâmetros, exceto da eficiência do uso da água, nos três tempos de avaliação (24 horas, 48 horas e 17 dias após adição do Al na solução de plantas T0+500). O mesmo foi observado para a taxa de transporte de elétrons, a eficiência de excitação e o rendimento efetivo do PSII na presença de Al, juntamente com a redução do coeficiente não fotoquímico. Já o cultivo sem Al apresentou o CO₂ intracelular aumentado concomitante a queda do rendimento máximo do PSII e do coeficiente fotoquímico no final do cultivo. Em paralelo, o teor de amido nas raízes desse tratamento foi maior que na presença do metal, enquanto os teores de fenóis não diferiram entre os tratamentos. O Al, em plantas T0+500, aumentou os teores de clorofilas *a* e *b*, de proteínas nas folhas, acompanhado pelas maiores abundâncias relativas de Al, S e Zn, em relação a T0. Além disso, o Al promoveu o incremento de açúcares solúveis na raiz, associado ao aumento na proporção relativa de Al e K e a redução dos percentuais de Zn, Cu e Fe em T0+500 com relação a T0. Maiores percentuais de N, Mg e Cu na folha foram observadas em T0. Esses resultados evidenciam que o Al nuclear é essencial para *B. latifolia* ao manter a atividade e integridade de células meristemáticas e que o metal atua estimulando a fotossíntese, através do reequilíbrio nutricional. A retomada do crescimento e do desenvolvimento se deu com a elevação da síntese de proteínas, provavelmente as envolvidas no reparo de danos oxidativos e no processo de fotossíntese, e com relação fonte-dreno sendo restabelecida no metabolismo de açúcares.

Palavras-chave: Hiperacumuladora de alumínio; Alumínio essencial; Meristemas; Fotossíntese; Herbáceas do cerrado.

ABSTRACT

MARQUES, Ana Paula Pires, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2021. **Aluminum: a beneficial or essential element for the cerrado species *Borreria latifolia* (Rubiaceae)?** Adviser: Aristéa Alves Azevedo.

The trivalent aluminum ion (Al^{3+}) is toxic to most plants in acidic soils, but for some native species this metal is considered beneficial. Recently, the essentiality of the metal was confirmed for the hyperaccumulating species *Camellia sinensis* (Indian tea) and it was reported that the development of the woody cerrado species *Vochysia tucanorum* is impaired in the absence of this element. However, there are still no reports of Al essentiality for cerrado species and its effect on the metabolism of hyperaccumulator plants, such as the herbaceous *Borreria latifolia* (Rubiaceae), has not been fully elucidated. In this work, we evaluated the morphological, anatomical, biochemical and physiological responses of individuals of *B. latifolia*, collected in cerrado soil, and submitted, in hydroponics, to 0 μM of Al^{3+} for 57 days (T0) and 0 μM of Al^{3+} for 40 days, adding, after this period, 500 μM of Al^{3+} for another 17 days (T0+500). At first, T0+500 plants would remain 40 days without and 40 days with Al, but the exposure time to the metal had to be reduced to 17 days because some T0 individuals died, indicating that the other plants of this treatment would not survive longer. After 57 days of cultivation in the absence of Al (T0), *B. latifolia* plants showed darkened and gelatinous roots, necrotic leaves and death of axillary buds and stalk apical meristems. Several histological damages, such as hypertrophy, mitotic alterations, root cell detachment and colleter senescence, were observed in this treatment. In the 40 days without Al, T0+500 individuals exhibited necrosis in leaves, roots and stems. However, after the addition of Al, it was observed production of healthy roots and of light color and stems buds, without anatomical changes, which developed from adventitious buds. There was accumulation of Al in all tissues of vegetative organs, including conducting cells of the xylem. Additionally, Al was recorded in collaters, indicating a possible exudation of the element, and in nuclei and nucleoli of meristematic cells, which may be related to its participation in the maintenance of DNA integrity. Al reduced the content of malonaldehyde and extravasated electrolytes and increased, in general, the nutritional status of *B. latifolia*. As a consequence, there was an increase in the Spad index of the leaves and in the production of total biomass by T0+500 plants. The gas exchange analysis confirmed that Al increased the values of all parameters, except for water use efficiency, in the three evaluation times (24 hours,

48 hours and 17 days after addition of Al in the T0+500 plant solution). The same was observed for the electron transport rate, the excitation efficiency and the effective yield of PSII in the presence of Al, together with the reduction of the non-photochemical coefficient. On the other hand, the cultivation without Al presented increased intracellular CO₂ concomitantly with the decrease in the maximum yield of PSII and the photochemical coefficient at the end of the cultivation. In parallel, the starch content in the roots of this treatment was higher than in the presence of the metal, while the phenol content did not differ between treatments. Al, in T0+500 plants, increased the levels of chlorophylls *a* and *b*, of proteins in the leaves, accompanied by higher relative abundances of Al, S and Zn, in relation to T0. In addition, Al promoted an increase in soluble sugars in the root, associated with an increase in the relative proportion of Al and K and a reduction in the percentages of Zn, Cu and Fe at T0+500 in relation to T0. Higher percentages of N, Mg and Cu in the leaf were observed at T0. These results show that nuclear Al is essential for *B. latifolia* to maintain the activity and integrity of meristematic cells and that the metal acts by stimulating photosynthesis, through nutritional rebalance. The resumption of growth and development occurred with the increase in protein synthesis, probably those involved in the repair of oxidative damage and in the photosynthesis process, and with the source-sink relationship being reestablished in the metabolism of sugars.

Keywords: Aluminum hyperaccumulator; Essential aluminum; Meristems; Photosynthesis; Cerrado herbaceous plants.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	12
2. REFERÊNCIAS.....	15
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	87
CAPÍTULO 1 - Alumínio: um elemento essencial para o crescimento e o desenvolvimento da espécie de cerrado <i>Borreria latifolia</i> (Aubl.) K. Schum	
4.1. Resumo.....	20
4.2. Abstract.....	21
4.3. Introdução.....	22
4.4. Material e métodos.....	24
4.4.1. <i>Material vegetal, condições de cultivo e desenho experimental.....</i>	24
4.4.2. <i>Quantificação de Al e nutrientes na matéria seca.....</i>	25
4.4.3. <i>Parâmetros de crescimento: WinRhizo e Biomassa seca.....</i>	25
4.4.4. <i>Caracterização morfológica.....</i>	25
4.4.5. <i>Microscopia de luz: anatomia e histoquímica.....</i>	25
4.4.6. <i>Microscopia Confocal.....</i>	26
4.4.7. <i>Abundância relativa do Al na parede dos elementos de vasos no xilema.....</i>	26
4.4.8. <i>Detecção de morte celular na folha.....</i>	27
4.4.9. <i>Teor de aldeído malônico (MDA) e extravasamento de eletrólitos (EE).....</i>	27
4.4.10. <i>Índice Spad.....</i>	28
4.4.11. <i>Análise estatística.....</i>	28

4.5. Resultados	28
4.6. Discussão	32
4.7. Referências	37
4.8. Tabelas e figuras	46
CAPÍTULO 2 - Impacto do alumínio sobre parâmetros fisiológicos e bioquímicos da espécie de cerrado <i>Borreria latifolia</i> (Rubiaceae)	
5.1. Resumo	57
5.2. Abstract	58
5.3. Introdução	59
5.4. Métodos	62
5.4.1. <i>Material vegetal, condições de cultivo e design experimental</i>	62
5.4.2. <i>Trocas gasosas e parâmetros fotoquímicos</i>	62
5.4.3. <i>Análise bioquímica de metabólitos</i>	63
5.4.3.1. <i>Pigmentos fotossintéticos</i>	63
5.4.3.2. <i>Determinação dos teores de fenólicos, açúcares solúveis, amido e proteínas totais</i>	63
5.4.4. <i>Abundância relativa de Al e de nutrientes nos tecidos</i>	64
5.4.5. <i>Análise de dados</i>	64
5.5. Resultados	65
5.6. Discussão	67
5.7. Conclusões	71
5.8. Referências	72
5.9. Tabelas e figuras	80

1. INTRODUÇÃO GERAL

O alumínio (Al) é o metal mais abundante e o terceiro elemento em maior quantidade na crosta terrestre, logo após o oxigênio e o silício (Sade et al. 2016), ocorrendo naturalmente no ambiente em complexos minerais, óxidos ou aluminossilicatos (Grevenstuk e Romano 2013). Nos solos ácidos ($\text{pH} < 5$), entretanto, o Al mineralizado, não tóxico para as plantas, é solubilizado em íons trivalentes (Al^{3+}), forma altamente fitotóxica, e disponibilizado na solução do solo (Bojórquez-Quintal et al. 2017). Espécies vegetais sensíveis, como a maioria das cultivadas, têm o seu desenvolvimento, crescimento e produtividade reduzidos na presença do Al^{3+} (Kochian et al. 2015).

Por estar em contato direto com o Al no solo, a raiz é o órgão mais afetado pelo metal, sendo o seu crescimento reduzido, o diâmetro aumentado, os ápices escurecidos e a formação de raízes laterais e de pelos radiculares inibida (Alvarez et al. 2012; Grevenstuk e Romano 2013; Jaskowiak et al. 2019). Essas mudanças morfológicas na raiz refletem as alterações no padrão de divisão, expansão e de morte celular, que ocorre principalmente no meristema apical (Yang et al. 2011; Li et al. 2019). Além disso, o Al limita a absorção e o transporte de nutrientes, principalmente de cálcio, potássio, magnésio, ferro, nitrogênio e fósforo (Bityutskii et al. 2017; Zhao e Shen 2018).

Já na parte aérea, os principais sintomas de toxidez do Al^{3+} são a perda de biomassa e a formação de clorose e necrose foliar, decorrentes da deficiência nutricional (Zhang et al. 2007), da redução nas taxas respiratórias e fotossintéticas (Nunes-Nesi et al. 2014) e de deformações estruturais em células e tecidos (Castro 2013). O Al ainda eleva os níveis de espécies reativas de oxigênio e de peroxidação de fosfolipídios em plantas sensíveis (Ezaki et al. 2000; Yamamoto et al. 2002; Wang e Yang 2005). Como consequência, a produção de enzimas antioxidantes, ácidos orgânicos e compostos fenólicos é aumentada (Matsumoto e Motoda 2012; Ezaki et al. 2013).

Apesar da sensibilidade de muitas espécies ao Al, existem plantas que resistem ao metal através de dois mecanismos conhecidos: exclusão e tolerância (Brunner e Sperisen 2013; Kochian et al. 2015). Plantas exclusoras produzem e exsudam em seus ápices radiculares compostos orgânicos, como ácidos orgânicos e fenólicos, promovendo a elevação do pH da rizosfera e a quelatação do Al^{3+} , reduzindo a sua absorção (Grevenstuk e Romano 2013; Kochian et al. 2015). Na tolerância, o Al^{3+} absorvido pelas raízes das plantas penetra no simplasto, podendo ser transportado e acumulado na parte aérea, onde é quelado por ligantes orgânicos no

citosol e no vacúolo e/ou imobilizado na parede celular (Kochian et al. 2015; Riaz et al. 2018). Plantas acumuladoras de Al apresentam concentrações do metal acima de 1 g kg^{-1} de matéria seca de folhas (Hutchinson e Wollack 1943; Robinson e Edgington 1945; Chenery 1948). Algumas plantas chegam a hiperacumular o Al, exibindo teores superiores à 10 g kg^{-1} na matéria seca em suas folhas (Jansen et al. 2002; Olivares et al. 2010). Os mecanismos de exclusão e de tolerância podem ocorrer simultaneamente na mesma espécie, como foi demonstrado para *Andropogon virginicus* (Ezaki et al. 2013).

Para algumas espécies tolerantes ao Al, oriundas de regiões com solos ácidos, o metal é considerado benéfico por estimular o crescimento e desenvolvimento das mesmas (Bojórquez-Quintal et al. 2017). Nessas espécies, o metal estimula a absorção de nutrientes, como nitrogênio, fósforo, potássio e magnésio, e eleva a taxa fotossintética, promovendo o alongamento da raiz e a produção de biomassa na parte aérea (Hajiboland et al. 2013; Muhammad et al. 2019; Liu et al. 2020). A atividade de enzimas do sistema de defesa antioxidante e a tolerância a herbívoros e a patógenos podem ser aumentadas pelo Al (Kaur et al. 2016). Nas espécies de cerrado *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae), *Miconia albicans* (Melastomataceae), *Vochysia thyrsoidea* (Vochysiaceae), *Vochysia tucanorum* (Vochysiaceae) e *Qualea grandiflora* (Vochysiaceae), acumuladoras obrigatórias do metal, o Al é fundamental para promover o desenvolvimento normal dos indivíduos (Haridasan 2008; Rodrigues et al. 2016; Cury et al. 2019; Bressan et al. 2021). Entretanto, nenhuma função foi atribuída ao Al no metabolismo dessas espécies.

Estudos recentes têm sugerido um possível papel do Al no metabolismo de algumas plantas acumuladoras (Rodrigues et al. 2016, Muhammad et al. 2019; Liu et al. 2020; Bressan et al. 2021) e, pela primeira vez, Sun et al. (2020) constataram a essencialidade do metal para uma espécie vegetal. Os autores verificaram que a produção de raízes saudáveis em *Camellia sinensis* é dose dependente do Al e que a falta do metal no cultivo leva ao escurecimento e a morte do órgão. Assim, conclui-se que o Al nuclear é crucial para manter a integridade do DNA em *C. sinensis*, promovendo a proliferação de células meristemáticas e o alongamento radicular. Apesar dessa descoberta em *C. sinensis*, ainda é desconhecido se o Al pode ser essencial para espécies acumuladoras nativas do cerrado.

Segundo Arnon e Stout (1939), um elemento é essencial quando os sintomas de sua deficiência são revertidos apenas após o seu fornecimento e quando este atua diretamente no metabolismo (p. ex., participa de uma reação química ou constitui uma molécula), sendo fundamental para que a planta complete o seu ciclo de vida. Diferente dos elementos essenciais,

a ausência dos elementos benéficos no cultivo não é limitante para a maioria das espécies, apesar destes também estimularem o crescimento e o desenvolvimento das plantas quando presentes (Pilon-Smits et al. 2009).

O cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, ocupando um quarto do território nacional, o correspondente a 2 milhões de km² distribuídos, principalmente, pelo Planalto Central (Myers et al. 2000). Seus solos são naturalmente ácidos, deficientes em nutrientes e ricos em Al (Dezzeo et al. 2004). A alta diversidade florística, o grande endemismo e as elevadas taxas de degradação tornam o cerrado um dos *hotspots* para a conservação da biodiversidade mundial (Myers et al. 2000). A riqueza de espécies herbáceas e subarborescentes no cerrado é consideravelmente maior que a de arbóreas, entretanto a maioria dos trabalhos sobre as estratégias de resistência ao Al em plantas nativas são realizadas com arbóreas (Bustamante et al. 2012; Malta et al. 2016; Nogueira et al. 2019; Bressan et al. 2021).

Rubiaceae é uma das famílias mais representativas do estrato herbáceo-subarborescente (Chaves et al. 2012), sendo que 32% de suas espécies acumulam o Al na parte aérea (Jansen et al. 2002). O acúmulo de Al em plantas herbáceas do cerrado foi relatado em trabalho do nosso grupo de pesquisa, no qual *Borreria latifolia* (Rubiaceae) se destacou por hiperacumular o metal em tecidos da folha e do caule (Castro 2013). Os sítios de acúmulo do metal foram identificados, no entanto os aspectos metabólicos e fisiológicos da tolerância ao Al, tanto na parte aérea quanto na raiz, não foram contemplados. Além disso, nenhuma informação sobre o sistema radicular de *B. latifolia* foi apresentada.

Em testes recentes, *B. latifolia* apresentou alterações visuais nas folhas, necrose dos meristemas e interrupção do crescimento no cultivo sem Al. O crescimento normal das plantas só foi retomado após a adição do elemento na solução. Essas observações nos levaram a indagar sobre os mecanismos de acúmulo do Al e a sua essencialidade para *B. latifolia*. A partir de análises de crescimento, morfoanatomia, bioquímica e fisiologia realizadas em indivíduos de *B. latifolia* cultivados, em hidroponia, na ausência e presença do Al, buscamos esclarecer: 1) A ação do metal sobre o crescimento e o desenvolvimento dessa espécie, testando a hipótese que o Al é um elemento essencial para a mesma, descrito no Capítulo 1 - Alumínio: um elemento essencial para o crescimento e o desenvolvimento da espécie de cerrado *Borreria latifolia* (Aubl.) K. Schum. 2) Como o Al afeta alguns processos fisiológicos e bioquímicos em *B. latifolia*, testando a hipótese que o metal tem impacto positivo sobre o metabolismo das plantas, descrito no Capítulo 2 - Impacto do alumínio sobre parâmetros fisiológicos e bioquímicos da espécie de cerrado *Borreria latifolia* (Rubiaceae).

2. REFERÊNCIAS

Alvarez I, Sam O, Reynaldo I, Testillano P, Risueno MC, Arias M (2012) Morphological and cellular changes in rice roots (*Oryza sativa* L.) caused by Al stress. *Bot Stud* 53: 67-73.

Arnon DI, Stout PR (1939) The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper. *Plant Physiol* 14: 371-375.

Bityutskii NP, Yakkonen KL, Petrova AI, Shavarda AL (2017) Interactions between aluminum, iron and silicon in *Cucumber sativus* L. grown under acidic conditions. *J Plant Physiol* 218: 100-108.

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

Bressan ACG, de Oliveira Carvalho Bittencourt BM, Silva GS, Habermann G (2021) Could the absence of aluminum (Al) impair the development of an Al-accumulating woody species from Brazilian savanna? *Theor Exp Plant Physiol* 33: 281-292.

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

Bustamante MMC, Brito DQ, Kozovits AR, Luedemann G, Mello TRB, Pinto AS, Munhoz CBR, Takahashi FSC (2012). Effects of nutrient additions on plant biomass and diversity of the herbaceous-subshrub layer of a Brazilian savanna (Cerrado). *Plant Ecol* 213: 795-808.

Castro LMR (2013) Anatomia e histolocalização de alumínio em espécies herbáceas e subarbustivas do cerrado. Dissertação, Universidade Federal de Viçosa - UFV, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Chaves E, Soares-Silva LH (2012) Floristic survey of the herbaceous-shrub layer of a gallery forest in Alto Paraíso de Goiás - Go, Brazil. *Braz Arch Biol Technol* 55:715-724.

Chenery EM (1948) Aluminum in the plant world: I general survey in dicoyledons. Kew Bull 2: 173-183.

Cury NF, Silva RCC, Andre MSF, Fontes W, Ricart CAO, Castro MS, Silveira CES, Williams TCR, Sousa MV, Pereira LAR (2019). Root proteome and metabolome reveal a high nutritional dependency of aluminum in *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae) Plant Soil 446:125-143.

Dezseo N, Chacón N, Sano JAE, Picón G (2004) Changes in soil properties and vegetation characteristics along a forest-savanna gradient in southern Venezuela. Forest Ecol Manag 200: 183-193.

Ezaki B, Gardner RC, Ezaki Y, Matsumoto H (2000) Expression of aluminum-induced genes in transgenic *Arabidopsis* plants can ameliorate aluminum stress and/or oxidative stress. Plant Physiol 122: 657-665.

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. Environ Exp Bot 93: 35-44.

Grevenstuk T, Romano A (2013) Aluminum speciation and internal detoxification mechanisms in plants: Where do we stand? Metallomics 5: 1584-1594.

Hajiboland R, Rad SB, Barceló J, Poschenrieder C (2013) Mechanisms of aluminum-induced growth stimulation in tea (*Camellia sinensis*). J Plant Nutr Soil Sci 176: 616-625.

Haridasan M (2008) Nutritional adaptations of native plants of the cerrado biome in acid soils. Braz J Plant Physiol 20: 183-195.

Hutchinson GE, Wollack A (1943) Biological accumulators of aluminum. Trans Conn Acad Arts Sci 35: 73-128.

Jansen S, Broadley MR, Robbrecht E, Smets E (2002) Aluminum hyperaccumulation in Angiosperms: A review of its phylogenetic significance. The Bot Rev 68: 235-269.

Jaskowiak J, Kwasniewska J, Milewska-Hendel A, Kurczynska EU, Szurman-Zubrzycka M, Szarejko I (2019) Aluminum alters the histology and pectin cell wall composition of barley roots. *Int J Mol Sci* 20: 3039.

Kaur S, Kaur N, Siddique KHM, Nayyar H (2016) Beneficial elements for agricultural crops and their functional relevance in defense against stresses. *Arch Agron Soil Sci* 62: 905-920.

Kochian LV, Piñeros MA, Liu J, Magalhaes JV (2015) Plant Adaptation to Acid Soils: The molecular basis for crop aluminum resistance. *Annu Rev Plant Biol* 66: 571-598.

Li CX, Yan JY, Ren JY, Sun L, Xu C, Li GX, Ding ZJ, Zheng SJ (2019) A WRKY transcription factor confers aluminum tolerance via regulation of cell wall modifying genes. *J Integr Plant Biol* 8: 1176-1192.

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*. *J Soil Sci Plant Nutr* 20:1799-1809.

Lorenzi H (2008) Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. Plantarum, Nova Odessa.

Malta PG, Arcanjo-Silva S, Ribeiro C, Campos NV, Azevedo AA (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.

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 Sci* 185: 1-8.

Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.

Moreira HJC, Bragança HBN (2011) Manual de identificação de plantas infestantes: hortifrúti. FMC Agric Products, Campinas 812-814.

Muhammad N, Zvobgo G, G-p Z (2019) A review: The beneficial effects and possible mechanisms of aluminum on plant growth in acidic soil. *J Integr Agr* 18:1518-1528.

Nogueira MA, Bressan ACG, Pinheiro MHO, Habermann G (2019) Aluminum accumulating Vochysiaceae species growing on a calcareous soil in Brazil. *Plant Soil* 437:313-326.

Nunes-Nesi A, Brito DS, Inostroza-Blancheteau C, Fernie AR, Araújo WL (2014). The complex role of mitochondrial metabolism in plant aluminum resistance. *Trend Plant Sci* 19: 399-407.

Olivares E, Colonnello G, Peña E, Rodriguez L (2010) Aluminum accumulation in nineteen Melastomataceae species from three contrasting plant formations in acid soils. *J Plant Nutr Soil Sci* 173: 453-460.

Pilon-Smits EAH, Quinn CF, Tapken W, Malagoli M, Schiavon M (2009) Physiological functions of beneficial elements. *Curr Opin Plant Biol* 12: 267–274.

Riaz M, Yan L, Wu X, Hussain S, Aziz O, Jiang C (2018). Mechanisms of organic acids and boron induced tolerance of aluminum toxicity: A review. *Ecotoxicol Environ Saf* 165: 25-35.

Robinson WO, Edgington G (1945) Minor elements in plants and some accumulator plants. *Soil Sci* 60: 15-28.

Sade H, Meriga B, Surapu V, Gadi J, Sunita MSL, Suravajhala P, Kishor PBK (2016) Toxicity and tolerance of aluminum in plants: Tailoring plants to suit to acid soils. *Biometals* 29:187-210.

Sun L, Zhang M, Liu X, Mao Q, Shi C, Kochian LV, Liao H (2020) Aluminum is essential for root growth and development of tea plants (*Camellia sinensis*). *J Integr Plant Biol* 62: 984-997.

Wang YS, Yang ZM (2005) Nitric oxide reduces aluminum toxicity by preventing oxidative stress in the roots of *Cassia tora* L. *Plant Cell Physiol* 46: 1915-1923.

Yamamoto Y, Kobayashi Y, Devi SR, Rikiishi S, Matsumoto H (2002) Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiol* 128: 63-72.

Yang JL, Zhu XF, Peng YX, Zheng C, Li GX, Liu Y, Shi YZ, Zheng SJ (2011) Cell wall hemicellulose contributes significantly to aluminum adsorption and root growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 155: 1885-1892.

Zhao XQ, Shen RF (2018) Aluminum-nitrogen interactions in the soil-plant system. *Front Plant Sci* 9:1-15.

Zhang XB, Liu P, Yang YS, Xu GD (2007) Effect of Al in soil on photosynthesis and related morphological and physiological characteristics of two soybean genotypes. *Botanical Studies* 48: 435-444.

CAPÍTULO 1

Alumínio: um elemento essencial para o crescimento e desenvolvimento da espécie de cerrado *Borreria latifolia* (Aubl.) K. Schum

Ana Paula P. Marques · Ivan B. Viana · Danielle S. Brito · João S. Tomaz · Cleberson Ribeiro · Aristéa A. Azevedo

4.1. Resumo

Objetivos Apesar do Al^{3+} ser tóxico para a maioria das plantas, este vem sendo considerado benéfico para algumas espécies de solos ácidos. Neste estudo, buscamos entender a essencialidade do Al e a sua hiperacumulação em *Borreria latifolia* (Aubl.) K. Schum através de avaliações morfofisiológicas e histológicas de indivíduos cultivados na ausência e presença do metal.

Métodos Plantas de *B. latifolia* foram cultivadas em hidroponia por 57 dias em dois tratamentos: ausência de Al (T0) durante todo o tempo; e ausência de Al por 40 dias, acrescentando-se, após esse período, 500 μ M de Al por 17 dias (T0+500). Análises de nutrientes, crescimento e de morfoanatomia, além de malondialdeído, eletrólitos extravasados e de índice SPAD foram realizadas. A histolocalização do metal foi obtida em microscópio de luz e confocal.

Resultados O estresse nutricional e oxidativo em indivíduos T0 levaram à morte dos meristemas, o surgimento de cloroses e necroses foliares e à gelatinização das raízes. Como consequência, plantas T0 perderam biomassa e tiveram o crescimento e o desenvolvimento cessados. Em contrapartida, a suplementação do Al (T0+500) estimulou a atividade meristemática, com formação de novas raízes e brotações adventícias no caule, proporcionando a retomada do crescimento e do desenvolvimento das plantas. Novos sítios de acúmulo do metal, elementos de vaso e coléteres, foram descritos para o Al em *B. latifolia*.

Conclusões Nossos resultados mostram que o Al é essencial ao crescimento e desenvolvimento de *B. latifolia*, pois na sua ausência ocorre necrose apical radicular e caulinar, cessando a atividade meristemática.

Palavras-chave: alumínio essencial, meristemas, secreção de alumínio, hiperacumuladora de Al.

Aluminum: an essential element for the growth and development of the Cerrado species
Borreria latifolia (Aubl.) K. Schum

Ana Paula P. Marques · Ivan B. Viana · Danielle S. Brito · João S. Tomaz · Cleberson Ribeiro
· Aristéa A. Azevedo

4.2. Abstract

Objectives Although Al³⁺ is toxic to most plants, it has been found to be beneficial for some species in acidic soils. In this study, we aimed to understand the essentiality of Al and its hyperaccumulation in *Borreria latifolia* (Aubl.) K. Schum through morphophysiological and histological evaluations of individuals cultivated in the absence and presence of the metal.

Methods *B. latifolia* plants were grown in hydroponics for 57 days in two treatments: absence of Al (T0) throughout the experiment; and absence of Al for 40 days, after which 500 µM of Al was added for 17 days (T0+500). Analyzes of nutrients, growth and morphoanatomy, as well as malondialdehyde, extravasated electrolytes and SPAD index were performed. The histolocalization of the metal was obtained in a light and confocal microscope.

Results Nutritional and oxidative stress in T0 individuals led to the death of meristems, the appearance of leaf chlorosis and necrosis and root gelatinization. As a consequence, T0 plants lost biomass and had their growth and development stopped. On the other hand, Al supplementation (T0+500) stimulated meristematic activity, with the formation of new roots and adventitious shoots in the stem, providing the resumption of plant growth and development. New metal accumulation sites as vessel elements and colleters were described for Al in *B. latifolia*.

Conclusions Our results show that Al is essential for the growth and development of *B. latifolia*, because in its absence there is apical root and stem necrosis, ceasing the meristematic activity.

Keywords: essential aluminum, meristems, aluminum secretion, Al hyperaccumulator.

4.3. Introdução

O alumínio (Al) é um fator limitante à produção de culturas vegetais em solos ácidos (Kochian et al. 2015; Chandra e Keshavkant 2021). Em valor de pH inferior a 5,0, o Al é solubilizado, liberando cátions trivalentes (Al^{3+}) na solução do solo (Bojórquez-Quintal et al. 2017; Wei et al. 2021). A alta toxicidade do Al^{3+} é atribuída, principalmente, às lesões causadas à raiz de plantas sensíveis (Yang et al. 2011). O Al se liga de forma rápida e forte às paredes de células nos ápices das raízes, principalmente, no meristema apical e na zona de alongamento (Doncheva et al. 2005). Essa ligação pode levar ao enrijecimento da parede celular e interferir na atividade iônica da superfície externa da membrana plasmática, modificando o seu potencial elétrico (Ezaki et al. 2013; Kinraide 1991; Li et al. 2019). Com isso, há comprometimento na divisão e no alongamento celular, morte celular e redução do crescimento radicular, comprometendo a absorção de nutrientes e a produção de biomassa total (Yang et al. 2011; Chandra e Keshavkant 2021).

Em contrapartida, plantas resistentes ao Al, como as que habitam o cerrado, podem ser acumuladoras ($\text{Al} \geq 1$ g/kg de matéria seca) do metal em seus órgãos aéreos sem que ocorram danos histológicos e metabólicos (Jansen et al. 2002; Shen et al. 2002; Souza et al. 2015). A parede celular primária é tida como o principal sítio de acúmulo do Al, enquanto a secundária (lignificada) frequentemente é descartada como via de sequestro do metal (Andrade et al. 2011; Bressan et al. 2016; Malta et al. 2016). Todavia, a presença do Al nas paredes de células lignificadas, como elementos de vasos e fibras do xilema maduro, foi detectada em *Acer micranthum* (Aceraceae) e *Eriophorum vaginatum* (Cyperaceae), utilizando-se espectrometria de massa por íons secundários (TOF-SIMS) e microscopia confocal (Saito et al. 2014; Kisiala et al. 2021). Essa divergência na literatura científica revela que os mecanismos de tolerância ao Al são diversos, complexos e não completamente elucidados.

Além disso, foi demonstrado que espécies pertencentes às famílias Vochysiaceae, Rubiaceae e Melastomataceae acumulam em seus tecidos as mesmas quantidades de Al independente de crescerem em solo ácido ou calcário (Andrade et al. 2011; Malta et al. 2016; Nogueira et al. 2019; Olivares et al. 2010; Osaki et al. 1998). Estudos moleculares evidenciaram que as plantas são capazes de adquirir ativamente o Al (Xia et al. 2010; Wang et al. 2017), indicando uma possível dependência do metal por essas espécies. Outra descoberta, refere-se ao fato de cloroplastos e núcleos serem locais de acúmulo do metal em espécies tolerantes (Andrade et al. 2011; Bressan et al. 2016; Malta et al. 2016; Sun et al. 2020). A presença do Al nessas organelas com elevada atividade metabólica, sem que haja danos funcionais e

estruturais, leva à suposição de que esse metal poderia desempenhar um papel no metabolismo de plantas acumuladoras.

Haridasan (2008) constatou que *Qualea grandiflora* (Vochysiaceae) e *Vochysia thyrsoidea* (Vochysiaceae), espécies arbóreas acumuladoras de Al, apresentam crescimento e desenvolvimento reduzidos e exibem cloroses e necroses foliares em solos com baixo teor do metal. A espécie *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae), outra lenhosa acumuladora de Al no cerrado, apresenta estímulo do crescimento da raiz quando exposta ao Al em cultivo hidropônico (Rodrigues et al. 2016). Trabalho posterior de proteoma e metaboloma das raízes de *Q. grandiflora* desvendou o efeito positivo do Al em algumas rotas metabólicas de crescimento e desenvolvimento desse órgão (Cury et al. 2019). Um estudo mais recente concluiu que a carência de Al na solução nutritiva impediu o desenvolvimento normal da espécie *Vochysia tucanorum* (Vochysiaceae), causando alterações morfológicas em raízes e folhas e cessando o crescimento em decorrência das baixas respostas fotossintéticas (Bressan et al. 2021). A essencialidade do Al para o crescimento e o desenvolvimento de plantas de chá (*Camellia sinensis*) foi associada à manutenção da integridade do DNA em células meristemáticas (Sun et al. 2020). Apesar dessas descobertas em *V. tucanorum* e *C. sinensis*, nenhum estudo atestou que o Al fosse essencial para espécies nativas, inclusive herbáceas, do cerrado.

Borreria latifolia (Rubiaceae) é uma espécie herbácea anual nativa do Brasil (Castro 2013; Lorenzi 2008), invasora de pastos e plantações. Cresce preferencialmente em solos ácidos e pobres, como os do Cerrado, onde leva vantagem competitiva por nutrientes e luz (Lorenzi 2008; Moreira e Bragança 2011). Essa planta é caracterizada por hiperacumular o Al ($Al \geq 10$ g/kg de matéria seca de folha) e os sítios de acúmulo do metal já foram identificados em sua folha e caule (Castro 2013; Souza-Fernandes 2019), porém não há relatos da concentração e localização do Al na raiz.

Em *B. latifolia* foram registrados coléteres, com morfoanatomia do tipo padrão, nas estípulas (Lopes-Mattos 2011) que produzem e exsudam uma secreção mucilaginosa ou mucilaginosa e lipofílica (Ribeiro et al. 2017). O acúmulo e a exsudação do Al por outras estruturas secretoras, como tricomas glandulares e cavidades secretoras, foram descritos como um importante mecanismo de tolerância ao metal em *Andropogon virginicus* L. (Poaceae) e *Miconia rubiginosa* (Melastomataceae), respectivamente (Ezaki et al. 2013, Bressan et al. 2016). Essa descoberta nos permitiu questionar se diferentes estruturas secretoras, como os coléteres, poderiam atuar na eliminação do metal em espécies hiperacumuladoras.

Neste trabalho, demonstramos que o Al é imprescindível ao crescimento e ao desenvolvimento de *B. latifolia*, pois na ausência do elemento ocorre a necrose dos meristemas apicais da raiz e do caule, levando a um desequilíbrio nutricional e ao estresse oxidativo, interrompendo o crescimento e acarretando na morte das plantas. Além disso, confirmamos em *B. latifolia* o acúmulo do Al em sítios pouco descritos (cloroplasto e núcleo) ou nunca citados (parede do elemento de vaso e secreção de coléter) para as espécies nativas do cerrado. O presente estudo é um relato inédito da essencialidade do Al para plantas nativas hiperacumuladoras, sendo importante para elucidar as vias de tolerância ao metal em plantas herbáceas que crescem no Cerrado.

4.4. Material e métodos

4.4.1. Material vegetal, condições de cultivo e desenho experimental

Plantas de *B. latifolia* em estágio vegetativo, sem ramificações, altura entre 10 e 15 cm, foram coletadas com o solo, em área de cerrado *sensu stricto* sob latossolo amarelo na Floresta Nacional de Paraopeba, Minas Gerais (MG) - Brasil (19° 20' S e 44° 20' W). Após dez dias de aclimação em casa de vegetação, os indivíduos tiveram suas raízes desinfetadas em hipoclorito de sódio 10% por 10 minutos e foram transferidos para o sistema de cultivo hidropônico.

O cultivo foi realizado em vasos contendo 3 L de solução nutritiva de Clark (1975) ^{1/2} força, pH 4,5, sob constante aeração. As plantas foram submetidas por 57 dias a dois tratamentos: sem Al (T0) por todo o tempo e sem Al por 40 dias, trocando-se, após esse tempo, a concentração da solução para 500 µM de Al, a qual foi mantida por mais 17 dias (T0+500). Inicialmente, plantas T0+500 permaneceriam o mesmo intervalo (40 dias) sem e com o Al, porém o cultivo com o metal foi reduzido para 17 dias, devido ao estágio avançado dos sintomas e a morte de alguns indivíduos em T0, sinalizando que as plantas nesse tratamento não sobreviveriam por mais tempo. O Al foi fornecido na forma de AlCl₃ e as soluções foram renovadas semanalmente.

A unidade amostral compreendeu um indivíduo de *B. latifolia* por vaso de cultivo, havendo cinco repetições em cada tratamento. Os vasos foram arranjados em delineamento inteiramente casualizado (DIC) e todas as análises a seguir foram realizadas ao final do experimento, exceto a sintomatologia que foi acompanhada diariamente.

4.4.2. *Quantificação de Al e nutrientes na matéria seca*

Para a análise química da concentração de Al e de nutrientes, utilizou-se regiões da raiz e da parte aérea produzidas tanto em campo quanto em hidroponia.

As plantas foram separadas em raiz e parte aérea, secas em estufa de ventilação forçada (60 °C até massa constante), pesadas em balança de precisão e reduzidas em moinho de esfera com câmara fechada (Tecnal, R - Te - 350). Amostras de 0,5 g foram digeridas com ácido nítrico e fluorídrico em bloco digestor (adaptado de Paye 2014).

O teor de Al e nutrientes (nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S), cobre (Cu), ferro (Fe), zinco (Zn), manganês (Mn) e boro (B)) foi determinado em espectrômetro de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-AES; Optima 8300 DV, Perkin Elmer, Shelton, CT, EUA). O Al e os macronutrientes foram expressos em g/kg de matéria seca e os micronutrientes em mg/kg de matéria seca.

4.4.3. *Parâmetros de crescimento: WinRhizo e Biomassa seca*

Para avaliar o efeito do Al sobre o sistema radicular foi utilizado um scanner (Image scanner III, imagens DPI 23,6 pixels.mm⁻¹). As imagens das raízes foram capturadas no interior de uma cubeta acrílica (20 x 30 cm) com água e analisadas pelo programa WinRhizo (WinRhizo Pro Régent Instruments, Québec, Canadá). Os parâmetros radiculares determinados foram: número de ramificações, volume total (cm³), volume de raízes entre 0 e 2.0 mm de diâmetro (raízes finas), comprimento total (cm) e comprimento de raízes entre 0 e 2.0 mm de diâmetro (McCormack et al. 2015; Meng-Bem e Qiang 2009).

O peso da biomassa seca (70 °C por 72 horas) de raiz e parte aérea, das plantas em cada tratamento, foi mensurado em balança de precisão.

4.4.4. *Caracterização morfológica*

O surgimento e a progressão das alterações morfológicas, na raiz e parte aérea, foram avaliados diariamente e registrados em anotações. Além disso, registros fotográficos foram realizados semanalmente com câmera Canon (Canon EOS 77D DSLR). Os ápices radiculares de *B. latifolia* foram observados e fotografados em estereomicroscópio com câmera acoplada (Axio Cam ERc 5s1 Zeiss).

4.4.5. *Microscopia de luz: anatomia e histoquímica*

Fragmentos (comprimento de 1cm) de raiz, caule, estípula e folha foram coletados de acordo com a seguinte padronização: ápice e zona de ramificação da raiz; internódio do caule (1° entrenó do ápice para base) em estrutura primária; caule de plantas T0+500 no local onde

havia cessado o crescimento, com formação de necroses, durante a falta de Al e posteriormente retomado com suplementação do metal no meio; ápices caulinares e região mediana de folhas expandidas.

As amostras foram fixadas em solução de FAA 50 (formaldeído 37%, ácido acético e etanol 50%, 1:1: 18) (Johansen 1940), desidratadas em série etanólica ascendente e incluídas em historesina. Secções transversais e longitudinais, com 5 μm (anatomia) e 7 μm (histoquímica) de espessura, foram feitas em micrótomo rotativo automático (modelo RM2255, Leica Microsystems Inc., Deerfield, Illinois, EUA).

Os cortes foram submetidos aos corantes: azul de Toluidina 0,05% (pH 4,7) por 12 minutos para a caracterização anatômica (O'Brien et al. 1964); Chrome Azurol'S por 1 hora para a histolocalização do Al (Kukachka e Miller 1980) e reagente de Schiff (30 minutos) / solução de ácido periódico 0,5% - PAS (9 minutos) para marcação de polissacarídeos (O'Brien e McCully 1981).

As lâminas foram montadas em Permount (Fisher Scientific Permount Mounting Medium), observadas e fotografadas em microscópio Olympus AX70TRF (Olympus Optical, Tóquio, Japão) com câmera digital acoplada (Zeiss Axio Cam HR3, Zeiss, Göttingen, Alemanha).

Estípulas não processadas foram imersas em Solochrome Azurine (Denton e Oughton 1993) e os coléteres foram fotografados em estereomicroscópio Leica MZ 16 com câmera acoplada (modelo Axio Cam MR3) para investigar a exsudação de Al.

4.4.6. *Microscopia Confocal*

O ápice radicular (com 1 cm), internódio caulinar (1° entrenó abaixo do meristema apical) em corte transversal e lâminas foliares (região mediana) expandidas foram usados na microscopia confocal. Os fragmentos foram fixados em paraformaldeído 4% com tampão fosfato 0,1 M e submetidos ao fluoróforo lumogallion 10 μM em tampão acetato 0,1 M (pH 5,2) por 1 h a 50 °C (Kataoka e Nakanishi 2001). A fluorescência dos materiais foi verificada em Microscópio Confocal de Varredura (modelo Zeiss, LSM510 META) com os conjuntos de filtros ELFP 488 nm e 520 nm para excitação e emissão, respectivamente.

4.4.7. *Abundância relativa do Al na parede dos elementos de vasos no xilema*

De forma complementar, a abundância relativa do Al na parede dos elementos de vasos foi analisada para confirmar esse sítio de acúmulo do metal. Amostras, com 1 cm de comprimento, da raiz (região de ramificação), do caule (1° entrenó do ápice para base) e de

folhas expandidas (região mediana com nervura central) foram seccionadas transversalmente, fixadas em FAA 50% (Johansen, 1940) por 48h e desidratadas em etanol. Em seguida, as amostras foram secas ao ponto crítico com CO₂ (CPD 030, BalTec, Balzers, Liechtenstein), fixadas em suportes metálicos e cobertas com carbono em evaporador Quorum (Q 150 T-E). Para a análise foram considerados os três elementos de vaso de maior diâmetro no metaxilema de cada órgão em cada repetição/tratamento. A abundância relativa (%) do alumínio (Al) em relação aos demais elementos (N, Mg, P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu e Zn) foi determinada por espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS) acoplada ao microscópio eletrônico de varredura (1430 VP, LEO, Cambridge, Inglaterra), no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa (MG) - Brasil.

4.4.8. Detecção de morte celular na folha

Em folhas completamente expandidas, discos foliares (1,5 cm de diâmetro) foram retirados, com perfurador metálico, de regiões aparentemente saudáveis de lâminas foliares. Em seguida, foram infiltrados com Azul de Evans 0,1% (sob vácuo por 40 minutos) e lavados três vezes em água destilada para a retirada do excesso de corante. Os discos foram clarificados com etanol 95% a 65 °C. As lâminas foram montadas em gelatina e fotografadas em lupa DV4, Zeiss Stemi (adaptado de Kato et al. 2007).

4.4.9. Teor de aldeído malônico (MDA) e extravasamento de eletrólitos (EE)

O teor de aldeído malônico (MDA) foi determinado em amostras de raiz (primeiros 5 centímetros obtidos a partir do ápice) e de folhas expandidas (4° e 5° nós). Aliquotas de raiz (0,1 g) e folha (0,15 g) liofilizadas foram maceradas com 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% em almofariz com pistilo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g, por 15 minutos a 4 °C. A reação ocorreu em banho-maria (90 °C por 20 minutos) com 750 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% preparado em TCA 20%, sendo paralisada após a imersão em gelo por 15 minutos (Cakmak e Horst 1991). As absorvâncias (Abs) a 532 e 600 nm foram obtidas em espectrofotômetro e a concentração de MDA (nmol g⁻¹) calculada pela equação: $[(Abs\ 532 - Abs\ 600) / 15500] * 1.000.000$.

O extravasamento de eletrólitos (EE) foi determinado pela condutividade elétrica de 4 discos (1 cm de diâmetro) retirado de folhas expandidas (4° nó). Os discos foram incubados em água Milli-Q (15 mL) por 24 horas no escuro à temperatura ambiente. A condutividade inicial

(C1) e final (C2), adquirida após aquecimento em banho-maria (95 °C por 40 minutos), foram aferidas com condutivímetro Lutron CD - 4301. O % EE = $(C1/C2) \times 100$ (Szalai et al. 1996).

4.4.10. Índice Spad

Folhas expandidas e não senescentes foram avaliadas de forma rápida e não destrutiva, quanto a intensidade da cor verde e conseqüentemente, de forma indireta, quanto ao teor de pigmentos fotossintéticos (clorofilas), utilizando-se um clorofilômetro portátil Spad 502 (Soil Plant Analysis Development). A relação positiva e diretamente proporcional entre o valor Spad e teor de clorofila foi demonstrado para diferentes espécies, inclusive de Rubiaceae, de modo a refletir alterações no teor de clorofila sob condições de estresse (Hawkins et al. 2009; Reis et al. 2009). O valor do índice Spad para cada indivíduo foi obtido através da média de cinco medições feitas em folhas de 3° e 4° nós.

4.4.11. Análise estatística

Os dados quantitativos foram testados quanto à normalidade e homocedasticidade pelos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente, ambos a 0,05 de probabilidade. Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) simples ou fatorial por meio do teste F ($p \leq 0,05$). A ANOVA fatorial a dois critérios (presença e ausência de Al na solução) com dois níveis (raiz e parte aérea) foi realizada apenas para a quantificação química do Al e nutrientes. Quando significativos, os caracteres foram submetidos ao teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A correlação entre os teores totais de Al e nutrientes nas plantas foi realizada, obtendo-se o coeficiente de correlação linear de Pearson (r). As correlações foram classificadas de acordo com Mukaka (2012), considerando-se o valor de r : Muito forte ($r > 0,9$ negativo ou positivo); Forte (r entre 0,7 e 0,9 negativo ou positivo); Moderada (r entre 0,5 e 0,7 negativo ou positivo); Fraca (r entre 0,3 e 0,5 negativo ou positivo); Desprezível (r entre 0 e 0,3 negativo ou positivo). As análises foram realizadas no software SigmaPlot versão 11.0.

4.5. Resultados

As maiores concentrações de Al nos tecidos de *B. latifolia* foram observadas na parte aérea das plantas ($p < 0,001$), cerca de 18 vezes no cultivo com Al (T0+500) e 9 vezes no cultivo sem Al (T0), em comparação as raízes desses tratamentos (Tabela 1). O acúmulo de Al nas raízes e parte aérea em T0+500, cerca de 3,5 e 7 vezes maior, respectivamente, ao obtido em sua ausência. Plantas T0 apresentaram concentrações consideráveis do metal apenas na parte aérea ($4,7 \pm 0,2 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$).

Na análise de nutrientes, para ambos os tratamentos, foi observada uma partição na distribuição de nutrientes pelo corpo das plantas de *B. latifolia*, sendo os valores dos elementos, exceto os de Fe e Cu, mais altos na parte aérea (Tabela 1). O Cu e Fe foram, respectivamente, 1,2 e 1,7 vezes maiores nas raízes do que na parte aérea. Os teores de Fe não foram influenciados pelos tratamentos. Todos nutrientes, exceto o P, se elevaram, em pelo menos, 1,2 vezes na parte aérea das plantas com a adição do Al, chegando a quase o dobro do valor para o N, K e Cu. As concentrações de P diferiram apenas nas raízes, sendo 2 vezes maiores, assim como as concentrações de Cu nas raízes, em plantas T0+500. Os demais nutrientes não diferiram entre as raízes de plantas T0 e T0+500.

Houve correlação positiva e forte do teor de Al nos tecidos com as concentrações de N ($r = 0,86$), P ($r = 0,734$), Ca ($r = 0,811$), Mg ($r = 0,846$), S ($r = 0,863$), Zn ($r = 0,844$), Mn ($r = 0,836$) e, muito forte, aos de K ($r = 0,918$) e B ($r = 0,907$). Não houve correlação entre o Al e os micronutrientes Cu e Fe (Fig. 1).

O crescimento da raiz foi estimulado pela adição do Al no meio de cultivo (Fig. 2). O número de ramificações (Fig. 2a), comprimento (Fig. 2b) e volume (Fig. 2c), tanto de raízes finas como totais, foram maiores na presença do Al em comparação a sua ausência (T0). O incremento do sistema radicular em T0+500, derivado da formação e alongamento de novas raízes laterais (Fig. 2a e 3c), refletiu na biomassa total dos indivíduos desse tratamento. Plantas T0+500 apresentaram 2,8 vezes mais biomassa de raiz e 1,7 vezes mais de biomassa de parte aérea em comparação a plantas T0 (Fig. 2d).

Inicialmente, até o 25º dia de cultivo hidropônico, indivíduos T0 tiveram um crescimento substancial de raiz e parte aérea. Todavia, com 30 dias de cultivo hidropônico, iniciou-se o escurecimento dos ápices radiculares em plantas T0 (Fig. 3a - detalhe), estendendo-se rapidamente para zona de alongamento e ramificação. Aos 40 dias, foi observada a alteração na textura e coloração das raízes finas, tornando-se emolientes e amarronzadas (Fig. 3a). Pedacos de raízes foram observados na solução nutritiva, gerando perda de biomassa. No final de 57 dias, a raiz entrou em decomposição, adquirindo cor preta ou castanha avermelhada e consistência gelatinosa (Fig. 3b). A adição do Al (T0+500) no 40º dia de cultivo promoveu a formação de novas raízes laterais delgadas e translúcidas, com ápices visivelmente saudáveis (Fig. 3c, detalhe). O crescimento e desenvolvimento da raiz foi retomado, recuperando a coloração clara e o aspecto saudável (Fig. 3d).

Não foi possível identificar a coifa e distinguir os tecidos meristemáticos nos ápices radiculares de plantas T0, devido a hipertrofia e morte de células, principalmente na região da

protoderme e do meristema apical. Essas células possuíam citoplasma e núcleo pouco densos (Fig. 3e). Na zona de ramificação foi observado o descolamento de células epidérmicas e sinuosidades nas paredes celulares do parênquima cortical (Fig. 3f). Já em plantas T0+500, células da coifa e da borda envoltas por mucilagem e células meristemáticas, isodiamétricas com citoplasma denso e núcleo proeminente, foram evidenciadas nos tecidos dos ápices de raízes emergidas após exposição ao Al (Fig. 3g). Não foram notadas alterações na zona de ramificação de raízes nesse tratamento (Fig. 3h).

A marcação com o fluoróforo lumogallion (Fig. 3i) foi baixa e poucos núcleos chegaram a reagir fracamente com o corante Chrome Azurol'S (Fig. 3j - seta) nas raízes de plantas T0. Em raízes de plantas T0+500, foi emitida forte fluorescência por células da borda (Fig. 3k) e sítios de acúmulo do Al foram identificados nos núcleos e nucléolos, epiderme, parênquima cortical, floema e raios do xilema (Fig. 3l).

Indivíduos coletados no Cerrado (Fig. 4a) e suprimidos de Al (T0) apresentaram, após 30 dias de cultivo, as primeiras alterações morfológicas na parte aérea: cloroses internervais e marginais nas lâminas de folhas jovens (Fig. 4b). Alterações em folhas expandidas surgiram posteriormente com cloroses marginais e basais, sulcos na face adaxial (Fig. 4c - seta) e manchas escuras de aspecto oleoso na face abaxial (Fig. 4d). As cloroses foram progressivamente substituídas por necroses, secando as folhas (Fig. 4e). O meristema apical caulinar, os primórdios foliares e as gemas axilares de plantas T0 morreram (Fig. 4g, 5a, c), cessando o crescimento e desenvolvimento da parte aérea. As necroses avançaram pelo caule no sentido de sua base. Por fim, alguns indivíduos morreram, não completando o ciclo de vida. Fungos cresceram sobre as folhas secas aderidas ao caule das plantas que permaneceram vivas (Fig. 4g, detalhe).

Células em torno da necrose no meristema apical caulinar de plantas T0 passaram a se dividir de forma descontrolada (em diversos planos), sem reorganizar a estrutura de um meristema, originando células de tamanhos e formatos variados (Fig. 5c - detalhe) que não desenvolvem tecidos meristemáticos e morrem. Sítios de acúmulo do Al não foram identificados no meristema (Fig. 5f) de plantas T0.

Cinco dias após receberem 500 μ M de Al, plantas T0+500 retomaram o crescimento e desenvolvimento da parte aérea, gerando novas brotações com folhas e caules aparentemente saudáveis (Fig. 4f). Com o desenvolvimento dos brotos houve a perda da dominância apical nas plantas, que se tornaram mais ramificadas (Fig. 4h). As novas brotações (Fig. 5b) foram originadas a partir de um grupo de células com características de pluripotência (gemas

adventícias), encontradas nos flancos da necrose (Fig. 5d - detalhe). Nos meristemas apicais das brotações não foram observadas alterações anatômicas (Fig. 5e), estando o Al complexado ao núcleo, conteúdo e paredes de células no meristema apical caulinar, nos tecidos meristemáticos e primórdios foliares (Fig. 5g). Ao final de 17 dias de cultivo com Al, indivíduos T0+500 passaram para o estágio reprodutivo, produzindo frutos e sementes viáveis (Fig. 4h, detalhe).

A marcação de morte celular foi evidenciada de forma acentuada (azul escuro) e uniforme na lâmina foliar de plantas submetidas a 0 μ M de Al (Fig. 6a), distinguindo-se da fraca reação (azul claro), limitada a borda do disco, no tratamento com Al (Fig. 6b). Em folhas de plantas T0, houve redução aparente dos espaços intercelulares no parênquima lacunoso e hiperplasia no parênquima paliçádico próximo a necrose (Fig. 6c). No xilema da nervura mediana (Fig. 6d) e do caule (Fig. 6e) foram observados elementos de vasos de menor calibre deformados, com paredes tortuosas e lúmen comprimido (setas) em corte transversal. Divisões celulares em diferentes planos foram observadas na nervura central da folha (Fig. 6d, asteriscos) e no local de origem do câmbio vascular (Fig. 6e, asteriscos) e do felogênio (Fig. 6f, asteriscos) no caule de plantas T0. Células colenquimáticas nas aletas do caule quadrangular de *B. latifolia* hipertrofiaram (Fig. 6g) e um número pequeno de núcleos chegaram a ser levemente corados no caule (Fig. 6h) e nas folhas (Fig. 6i) com Chrome Azurol'S, evidenciando a presença do Al em plantas T0.

Não foram percebidas alterações anatômicas nas folhas e caules de plantas T0+500 (Fig. 6j e l). O Al foi localizado, nos órgãos da parte aérea de T0+500, em núcleos e cloroplastos, epiderme (papilas, estômatos e tricomas), parênquimas (clorofiliano, preenchimento, amilífero e do raio do xilema), colênquima e floema (Fig. 6j – l, setas). Idioblastos arredondados em corte transversal da lâmina foliar de plantas T0+500 fluoresceram em microscopia confocal (Fig. 6m). O Al foi revelado nas paredes dos elementos de vaso apenas nas folhas (Fig. 6j, k) e caules (Fig. 6l - detalhe, n) de plantas T0+500. A análise de raios-X confirmou os resultados obtidos com teste histoquímico e análise confocal e revelou que a abundância relativa de Al nas paredes dos vasos xilemáticos foi, aproximadamente, o dobro na raiz (Fig. 8a) e no caule (Fig. 8b) e o triplo na folha (Fig. 8c) de plantas T0+500 com relação aos órgãos de plantas T0 (Fig. 8).

A natureza polissacarídica das células secretoras de coléteres estipulares do tipo padrão (Fig. 7a e b) foi confirmada com PAS (Fig. 7c). A presença do metal na secreção da superfície do coléter indica a sua liberação para o meio externo. Além disso, tricomas tectores ao redor dessa estrutura secretora reagiram positivamente com o reagente Chrome Azurol'S, indicando

a presença do Al (Fig. 7b). Os coléteres senesceram na ausência do Al, com o colapso inicial das células do eixo (Fig. 7d) e por fim, da paliçada secretora (Fig. 7d, e), e mantiveram a sua estrutura íntegra na presença do metal (Fig. 7f). O Al foi confirmado nas células do eixo, inclusive em idioblastos contendo ráfides, epiderme secretora e secreção dos coléteres apenas de plantas T0+500 (Fig. 7b, f).

O teor de aldeído malônico (MDA) na raiz e na folha de plantas T0+500 diminuiu em 19 e 35,5 % respectivamente, comparado a T0 (Fig.9a), enquanto o percentual de eletrólitos extravasados (Fig. 9b) nas folhas de plantas T0+500 foi reduzido em 78,6 % em relação a T0.

A adição do Al no 40º dia de cultivo elevou os valores do índice Spad, em 24 %, nas folhas de T0+500 em comparação a T0, indicando que há mais pigmentos fotossintetizantes nesse tratamento (Fig. 9c).

4.6. Discussão

Para que um elemento mineral seja considerado essencial, três critérios devem ser atendidos: o crescimento da planta é prejudicado na falta do elemento e o seu ciclo de vida não é completado; os sintomas de deficiência do elemento somente são revertidos com o seu fornecimento; o elemento participa diretamente no metabolismo da planta (Arnon e Stout 1939). Já os elementos benéficos são aqueles que promovem o crescimento e o desenvolvimento normal das plantas, podendo ser essenciais para determinados táxons, como o Na é para algumas halófitas e plantas C4 e CAM, mas a sua ausência no cultivo não é um fator limitante para a maioria das espécies (Pilon-Smits et al. 2009).

Neste trabalho demonstramos que o Al é essencial para o crescimento e desenvolvimento de *B. latifolia*. A primeira evidência é a morte da raiz (Fig. 3a, e), dos meristemas caulinares e de gemas axilares (Fig. 4g, 5a, c) nas plantas carentes de Al (T0). Com a perda da atividade meristemática o crescimento das plantas cessou (Fig. 2) e a sobrevivência foi comprometida (alguns indivíduos morreram), atendendo ao primeiro critério para um elemento ser considerado essencial (Arnon e Stout 1939). Além disso, mesmo estando disponíveis todos os nutrientes necessários ao desenvolvimento das plantas, *B. latifolia* somente produziu novas raízes e brotações saudáveis (Fig. 2 - 5) após a suplementação do Al no meio de cultivo e do seu acúmulo nos tecidos (Tabela 1). Nenhum nutriente presente na solução de Clark foi capaz de substituir funcionalmente o metal, atendendo a mais um critério de essencialidade (Arnon e Stout 1939). Por fim, comprovamos que o Al nuclear promove a retomada do crescimento através da indução de gemas adventícias (Fig. 5d) e que este é crucial

para manter a integridade e a atividade de células meristemáticas (Fig. 3g e 5e, g). Isso atende ao terceiro critério, já que o Al tem efeito direto no metabolismo da planta (Arnon e Stout 1939), embora os aspectos fisiológicos e moleculares dessa função devam ser melhor investigados. Assim, é inevitável concluir que o Al é essencial para *B. latifolia* e não apenas benéfico, como é relatado para outras plantas de cerrado ou acumuladoras do metal adaptadas a solos ácidos (Bressan et al. 2021; Cury et al. 2019; Haridasan 2008; Rodrigues et al. 2016, 2019).

Rodrigues et al. (2016) verificaram que baixas concentrações de Al promoveram o crescimento da raiz de *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae) através do estímulo à divisão de núcleos em células meristemáticas. A essencialidade do Al foi demonstrada para a formação e alongamento de raízes na espécie hiperacumuladora do metal *Camellia sinensis*, cuja função está associada à integridade do DNA em núcleos de células meristemáticas do ápice radicular (Sun et al. 2020). Os autores teorizaram que o Al nuclear possa estar envolvido na estabilização do DNA e regulação da transcrição de genes envolvidos na mitose e diferenciação celular. Assim como em *C. sinensis*, o acúmulo de Al foi evidenciado nos núcleos das células de *B. latifolia*. É verdade que plantas cultivadas sem Al (T0) apresentaram elevadas concentrações do metal na parte aérea (Tabela 1), fruto do seu desenvolvimento inicial em solo do cerrado, e que reações positivas para o Al foram observadas, apesar de bem fracas, nos núcleos dessas plantas, mas foram inexistentes nos meristemas deste tratamento (Fig. 3i, 5f). O acúmulo do Al nos núcleos de células meristemáticas (Fig. 3k, 5g), promovendo a divisão celular e regulando a diferenciação celular (Fig. 5d), ocorreu somente após adição do metal no meio de cultivo. Isso nos permite especular que, em *B. latifolia*, o Al nuclear também possa estar associado a molécula de DNA, induzindo respostas transcricionais ligadas a mitose. Outro forte indício para esta hipótese, consiste no aspecto alterado das células em divisão nas regiões de origem do câmbio vascular e felogênio (Fig. 6e, f) nos caules de plantas T0. Contudo, os mecanismos moleculares subjacentes às respostas de *B. latifolia* ao Al estão muito além da proposta deste estudo, devendo ser alvo de futuras investigações.

O Al também foi confirmado nos cloroplastos das plantas expostas ao metal (Fig. 6j). A presença do Al nessa organela foi descrita para outras espécies de cerrado, como *Rudgea viburnoides* (Malta et al. 2016), *Richeria grandis* (Cuenca et al. 1991), *Qualea grandiflora* e *Callisthene major* (Andrade et al. 2011). No entanto, nenhuma função para o metal nos cloroplastos foi atribuída até o momento. O Al em cloroplastos, propiciando a elevação do valor Spad (Fig. 9c) e, presumivelmente dos pigmentos fotossintéticos, acarretando a produção de novas brotações saudáveis (Fig. 4, 5), apontam para a participação do metal em processos

fisiológicos de crescimento em *B. latifolia*, porém esses aspectos precisam ser melhor investigados.

Os resultados da localização do Al nos tecidos de plantas acumuladoras variam muito entre os estudos e, por muitas vezes, são conflitantes. No entanto, há um consenso que a imobilização do Al nas paredes pectocelulósicas é o principal mecanismo de tolerância em plantas acumuladoras (Bojórquez-Quintal et al. 2017; Muhammad et al. 2019). Em *B. latifolia*, além de paredes celulares primárias, o Al foi observado nas paredes de elementos de vaso após suplementação do metal (Fig. 6k, n, 8). Saito et al. (2014) atribuíram a presença do Al nas paredes dos vasos xilemáticos de *Acer micranthum* (Aceraceae) a ligação com hemiceluloses, mas não descartaram a possibilidade de ligação com a lignina. O Al também foi detectado nos diferentes órgãos das plantas de *Eriophorum vaginatum* (Cyperaceae), coletadas em regiões poluídas pelo metal, em esclereídes, fibras subepidérmicas, elementos do xilema, exoderme e endoderme lignificadas, conferindo alta tolerância a espécie (Kisiala et al. 2021). Em *B. latifolia*, o acúmulo do Al nas paredes dos vasos parece ser necessário para a sua formação e/ou desenvolvimento adequado, isso por que nas plantas T0, que não exibiram acúmulo de Al nos vasos, foram observadas deformações nessas células (Fig. 6d, e). O aumento de lignina nas raízes de *Q. grandiflora* foi estimulada pelo Al, através da regulação positiva de várias enzimas envolvidas na biossíntese e processamento do fenólico, dentre essas o cafeoil chiquimato esterase, expresso em tecido vascular em lignificação (Cury et al. 2019).

Idioblastos contendo drusas, ráfides e mucilagem foram descritos, anteriormente, no mesófilo foliar de *B. latifolia* (Castro 2013; Lopes-Mattos 2011; Zini et al. 2016) e confirmados em nosso trabalho como sítios de acúmulo do metal (Fig. 6m). A imobilização do Al^{3+} com ácido urônico na mucilagem é, frequentemente, citada como um dos mecanismos de desintoxicação do metal (Bojórquez-Quintal et al. 2017; Chandra e Keshavkant 2021; Okamoto e Yano 2017). Em contrapartida, foi mostrado em *Melastoma malabathricum* (Melastomataceae), espécie hiperacumuladora de Al, que a mucilagem desempenha uma função distinta, atuando como facilitadora na aquisição do Al pelas raízes em solos com baixa disponibilidade do elemento (Watanabe et al. 2008 a, b). Ápices radiculares de *B. latifolia* formados após adição do Al na solução nutritiva exibiram síntese de mucilagem (Fig. 3g), o que não foi observado em sua ausência (Fig. 3e), sugerindo que o composto possa atuar, assim como em *M. malabathricum*, no processo de absorção do metal.

A complexação do metal com secreções mucilaginosas também foi observada nos coléteres de *B. latifolia* (Fig. 7) na presença do Al (T0+500), confirmando a participação da

estrutura na eliminação do metal para o meio externo. Pode soar estranho que uma espécie dependente de Al para crescer e se desenvolver o elimine, mas não devemos esquecer que nutrientes, como o Ca, quando em grandes quantidades nas plantas, podem ter suas concentrações reguladas nos tecidos, a exemplo da precipitação de seu excesso na forma de oxalatos nos idioblastos (Franceschi e Nakata 2005). Em outras espécies tolerantes, a exsudação do Al foi relatada em tricomas secretores de *Andropogon virginicus* e cavidades secretoras de *Miconia rubiginosa* (Bressan et al. 2016; Ezaki et al. 2013). Uma investigação mais detalhada se faz necessária para verificar se coléteres, assim como idioblastos, poderiam atuar no controle dos níveis adequados de Al nos tecidos de *B. latifolia*. Além disso, os coléteres possuem a função ecológica de proteção química contra patógenos e herbívoros (Ribeiro et al. 2017). Desta forma, supomos que o Al presente na secreção dessas estruturas possa atuar aumentando a resistência de *B. latifolia* a estresses bióticos, visto que plantas T0 apresentaram infestações fúngicas ao final do experimento (Fig. 4g), o que não foi observado em plantas T0+500. A participação do Al na defesa de espécies hiperacumuladoras do metal contra herbívoros foi mencionada por Pilon-Smits et al. (2009), de forma que nessas plantas o metal reduziria a palatabilidade de seus tecidos e desencorajaria os herbívoros, assim como foi observado em *Festuca arundinacea* (Poaceae).

Para a maioria das plantas, o Al presente em solos ácidos inibe o sistema de transporte de nutrientes (Chandra e Keshavkant 2021; Muhammad et al. 2019; Wei et al. 2021), contudo isso não é verdade para diversas plantas acumuladoras, nas quais a exposição ao metal aumentou a captação de nutrientes (Bojórquez-Quintal et al. 2017; Liu et al. 2020; Muhammad et al. 2019; Watanabe e Osaki 2006). Muitos trabalhos atribuem os efeitos benéficos do Al ao alívio dos sintomas de toxicidade provocada por prótons H^+ ou por outros cátions metálicos, como os de Mn, Zn, Fe (Hajiboland et al. 2013; Bojórquez-Quintal et al. 2017; Muhammad et al. 2019; Zhou et al. 2020; Watanabe e Osaki 2006). Em *B. latifolia*, a retomada do crescimento e desenvolvimento das plantas após adição do Al no cultivo (T0+500) não se deu de forma indireta, como mencionado acima, mas de forma direta, com acúmulo do metal em organelas vitais propiciando a atividade meristemática. Essa constatação para *B. latifolia* é apoiada pela análise nutricional, na qual os teores de Fe não se correlacionaram aos do Al (Fig. 1) e não diferiram entre os tratamentos T0 e T0+500 (Tabela 1), indicando que o Al não limitou a absorção do Fe em uma “presumível” condição de toxicidade desse metal. Em *M. malabathricum*, foi cogitado que o crescimento induzido pelo Al no meio é causado pelo

próprio Al acumulado nas plantas, ao invés da estimulação de captação de P, apesar deste aumentar nos tecidos (Watanabe e Osaki 2001).

Ao contrário de limitar a absorção de nutrientes, a retomada do crescimento gerada pelo Al foi acompanhada do aumento de N, K, Ca, Mg, S, Cu, Zn, Mn e B na parte aérea e de P e Cu na raiz, além da menor peroxidação lipídica (MDA) e eletrólitos extravasados (Fig. 9). Isso refletiu na preservação das membranas celulares, o que foi constatado pela menor marcação de morte celular nas folhas e ausência de alterações estruturais nos órgãos deste tratamento (Fig. 2-6). A peroxidação lipídica da membrana induz distúrbios de suas funções, resultando na diminuição da absorção e translocação de nutrientes (Watanabe et al. 2006), o que provavelmente ocorreu com *B. latifolia* na falta de Al. O destacamento de células periféricas na zona de ramificação em plantas T0 (Fig. 3f) pode estar associada aos níveis mais elevados de MDA na raiz deste tratamento.

Plantas requerem nutrientes para produzir biomassa e crescer, portanto, esse aumento, de forma geral, nos teores nutricionais de *B. latifolia* é consequência do alto metabolismo de plantas T0+500 após adição do Al no meio. Portanto, além da ação direta no metabolismo, o Al proporcionou indiretamente uma condição favorável para que os demais nutrientes pudessem ser absorvidos e acumulados nos tecidos fotossintetizantes, permitindo a retomada do crescimento de *B. latifolia*. O Al pode aumentar a disponibilidade de K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} e Mn^{2+} na solução do solo (Zho et al. 2020) e alguns estudos remetem o efeito benéfico do Al a absorção de P (Cury et al. 2019; Muhammad et al. 2019; Watanabe 2006). De fato, os teores de todos os nutrientes, exceto Fe e Cu, se correlacionaram positivamente com o teor de Al nas plantas de *B. latifolia*, porém observamos as mais fortes correlações entre o Al - K e Al - B (Fig. 1). O K e o B desempenham papéis fundamentais no processo de divisão e crescimento celular nos meristemas apicais das plantas, com K promovendo a pressão de turgor necessária a expansão das células e o B regulando a síntese e a estabilidade de constituintes da parede celular (Alberts et al. 2010; Riaz et al. 2018). O maior requerimento desses elementos foi necessário para a produção de novos brotos e ramificações de raízes em *B. latifolia* após adição do Al.

A adaptação de plantas nativas do cerrado ao Al em seus solos ácidos vem sendo, há muito tempo, pensada como estratégias de resistência, exclusão ou tolerância, que transformam o cátion de Al em formas inativas não tóxicas. Este trabalho, portanto, é o primeiro relato da essencialidade do Al para o crescimento e desenvolvimento de uma espécie de cerrado, a herbácea *Borreria latifolia* (Rubiaceae). O Al nuclear, principalmente nos tecidos

meristemáticos, é necessário para promover a divisão celular e retomar o crescimento e desenvolvimento, porém os mecanismos de regulação molecular por trás dessa função ainda devem ser esclarecidos. O Al ligado às paredes dos vasos foi confirmado e considerado necessário para manter a integridade de sua estrutura. Sugerimos que a secreção do Al por coléteres, até então não registrado para espécies acumuladoras, possa auxiliar na regulação dos níveis do metal nos tecidos, assim como os idioblastos, e que o Al possa atuar na defesa de *B. latifolia* contra estresses bióticos. Os sintomas da deficiência de Al e aspectos da recuperação de *B. latifolia* após suplementação do metal foram descritos e correlacionados aos teores nutricionais e aos indicativos de estresse oxidativo das plantas, contudo ressaltamos que outros aspectos fisiológicos e moleculares de *B. latifolia* devam ser investigado em relação a resposta ao Al.

4.7. Referências

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2010) *Biologia molecular da célula* ARTMED. 5. Ed Porto Alegre.

Andrade LRM, Barros LMG, Echevarria GF, Amaral LIV, Cotta MG, Rossatto DR, Haridasan M, Franco AC (2011) Al-hyperaccumulator Vochysiaceae from the Brazilian Cerrado store aluminum in their chloroplasts without apparent damage. *Environ Exp Bot* 70: 37-42. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.05.013>

Arnon DI, Stout PR (1939) The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper. *Plant Physiol* 14: 371-375. <https://doi.org/10.1104/pp.14.2.371>

Bojórquez-Quintal E, Escalante-Magaña C, Echevarria-Machado I., Martínez-Estévez M (2017) Aluminum, a friend or foe of higher plants in acid soils. *Front Plant Sci* 8: 1767. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01767>

Bressan ACG, Coan AI, Habermann G (2016) X-ray spectra in SEM and staining with chrome azurol S show Al deposits in leaf tissues of Al-accumulating and non-accumulating plants from the cerrado. *Plant Soil* 404: 293-306. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-2841->

Bressan ACG, de Oliveira Carvalho Bittencourt BM, Silva GS, Habermann G (2021) Could the absence of aluminum (Al) impair the development of an Al-accumulating woody species from Brazilian savanna? *Theor Exp Plant Physiol* 33: 281-292. <https://doi.org/10.1007/s40626-021-00216-y>

Cakmak I, Horst WJ (1991) Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol Plant* 83: 463-468. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1991.tb00121.x>

Castro LMR (2013) Anatomia e histolocalização de alumínio em espécies herbáceas e subarbustivas do cerrado. Dissertação, Universidade Federal de Viçosa - UFV, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Chandra J, Keshavkant S (2021) Mechanisms underlying the phytotoxicity and genotoxicity of aluminum and their alleviation strategies: A review. *Chemosphere* 278: 130384 <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130384>

Clark RB (1975) Characterization of phosphatase of intact maize roots. *J Agric Food Chem* 23:458-460. <https://doi.org/10.1021/jf60199a002>

Cuenca G, Herrera R, Mérida T (1991) Distribution of aluminium in accumulator plants by X-ray microanalysis in *Richeria grandis* Vahl leaves from a cloud forest in Venezuela. *Plant Cell Environ* 14: 437–441. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1991.tb00954.x>

Denton J, Oughton DH (1993) The use of an acid solochrome azurine stain to detect and assess the distribution of aluminum in *Sphagnum moss*. *Ambio* 22: 19-21. Disponível via JSTOR. www.jstor.org/stable/4314031 do documento subordinado. Acessado em 12 de abril de 2020.

Doncheva S, Amenos M, Poschenrieder C, Barcelo J (2005) Root cell patterning: A primary target for aluminum toxicity in maize. *J Exp Bot* 56: 1213-1220. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri115>

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. Environ Exp Bot 93: 35-44. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.05.002>

Franceschi VR, Nakata PA (2005) Calcium oxalate in plants: Formation and function. Annu Rev Plant Biol 56:41–71. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144106>

Hajiboland R, Rad SB, Barceló J, Poschenrieder C (2013) Mechanisms of aluminum-induced growth stimulation in tea (*Camellia sinensis*). J Plant Nutr Soil Sci 176: 616-625.

Haridasan M (2008) Nutritional adaptations of native plants of the cerrado biome in acid soils. Braz J Plant Physiol 20: 183-95. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202008000300003>

Hawkins TS, Gardiner ES, Comer GS (2009) Modeling the relationship between extractable chlorophyll and SPAD-502 readings for endangered plant species research. J Nat Conserv 17: 123-27. <https://doi.org/10.1016/j.jnc.2008.12.007>

Jansen S, Broadley MR, Robbrecht E, Smets E (2002) Aluminum hyperaccumulation in Angiosperms: A review of its phylogenetic significance. The Bot Rev 68: 235-269. [https://doi.org/10.1663/0006-8101\(2002\)068\[0235:AHIAAR\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1663/0006-8101(2002)068[0235:AHIAAR]2.0.CO;2)

Johansen DA (1940) Plant Microtechnique. Nature 147: 222. <https://doi.org/10.1038/147222b0>

Kataoka T, Nakanishi TM (2001) Highly Sensitive analytical method for aluminum movement in soybean root through lumogallion staining. J Plant Res 158: 731-736. <https://doi.org/10.1007/BF02524927>

Kato T, Sato N, Hayama S (2007) Activation of holliday junction recognizing protein involved in the chromosomal stability and immortality of cancer cells. Cancer Res 67: 44-53. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-307>

Kinraide TB (1991) Identity of the rhizotoxic aluminum species. Plant Soil 134: 167-178. <https://doi.org/10.1007/BF00010729>

Kisiala A, Bogart SJ, Nguyen HN, Cholewa E (2021) Aluminum localization in tissues of *Eriophorum vaginatum* and its effect on root growth and recovery. *Flora* 278: 151803. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2021.151803>

Kochian LV, Piñeros MA, Liu J, Magalhaes J V (2015) Haridasan M (2008) Plant adaptation to acid soils: The molecular basis for crop aluminum resistance. *Annu Rev Plant Biol* 66: 571 - 598. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-14822>

Kukachka BF, Miller RB (1980) A chemical spot-test for aluminum and its value in wood identification. *IAWA Bull* 1: 104-09. <https://doi.org/10.1163/22941932-90000699>

Li CX, Yan JY, Ren JY, Sun L, Xu C, Li GX, Ding ZJ, Zheng SJ (2019) A WRKY transcription factor confers aluminum tolerance via regulation of cell wall modifying genes. *J Integr Plant Biol*. 8: 1176-192. <https://doi.org/10.1111/jipb.12888>

Lopes-Mattos KLB (2011) Anatomia foliar plicada à taxonomia em Rubiaceae Juss. Tese, Universidade Federal de Viçosa - UFV, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Lorenzi H (2008) Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. *Plantarum* 4° ed. 640p.

Malta PG, Arcanjo-Silva S, Ribeiro C, Campos NV, Azevedo AA (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. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-2926-x>

McCormack ML, Dickie IA, Eissenstat DM et al. (2015) Redefining fine roots improves understanding of below-ground contributions to terrestrial biosphere processes. *New Phytol* 207: 505-518. <https://doi.org/10.1111/nph.13363>

Meng-Ben W, Qiang Z (2009) Issues in using the WinRHIZO system to determine physical characteristics of plant fine roots. *Acta Ecol Sin* 29: 136-38. <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2009.05.007>

Moreira HJC, Bragança HBN (2011) Manual de identificação de plantas infestantes: hortifrúti. FMC Agric Products, Campinas.

Muhammad N, Zvobgo G, G-p Z (2019) A review: The beneficial effects and possible mechanisms of aluminum on plant growth in acidic soil. *J Integr Agr* 18:1518-528. [https://doi.org/10.1016/s2095-3119\(18\)61991-4](https://doi.org/10.1016/s2095-3119(18)61991-4)

Mukaka MM (2012) Statistics Corner: A guide to appropriate use of Correlation coefficient in medical research. *Malawi Med J* 24(3): 69-71. Consultado em 19 de junho de 2021.

Nogueira MA, Bressan ACG, Pinheiro MHO, Habermann G (2019) Aluminum accumulating Vochysiaceae species growing on a calcareous soil in Brazil. *Plant Soil* 437:313-326. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-03978-2>

O'Brien TP, Feder N, McCully ME (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59: 368-373. <https://doi.org/10.1007/BF01248568>

O'Brien TP, McCully ME (1981) The study of plant structure: Principles and selected methods. Termarcarphi PTY. LTD: Melbourne. 5v. 4° ed. 357p. <https://doi.org/10.1111/1365-3040.ep11572627>

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. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2016.12.005>

Olivares E, Colonnello G, Peña E, Rodriguez L (2010) Aluminum accumulation in nineteen Melastomataceae species from three contrasting plant formations in acid soils. *J Plant Nutr Soil Sci* 173: 453-460. <https://doi.org/10.1002/jpln.200900152>

Osaki M, Matsumoto M, Watanabe T, Kawamukai T, Shinano T, Nuyim T, Nilnond C, Tadano T (1998) Strategies for adaptation of plants grown in adverse soils. In Bassam NE, Behl RK, Prochnow B, eds. Sustainable agriculture for food, energy and industry. Lodon, UK: James e James Ltd, 537-546.

Paye HS (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 - UFV, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Pilon-Smits EAH, Quinn CF, Tapken W, Malagoli M, Schiavon M (2009) Physiological functions of beneficial elements. *Curr Opin Plant Biol* 12: 267–274. doi: 10.1016/j.pbi.2009.04.009

Reis AR, Favarin JL, Malavolta E, Junior JL, Moraes MF (2009) Photosynthesis, chlorophylls, and SPAD readings in coffee leaves in relation to nitrogen supply. *Commun Soil Sci Plant Anal* 40: 1512-528. <https://doi.org/10.1080/00103620902820373>

Ribeiro JC, Ferreira MJP, Demarco D (2017) Colleters in Asclepiadoideae (Apocynaceae): Protection of meristems against desiccation and new functions assigned. *Int J Plant Sci* 178: 465–477. <https://doi.org/10.1086/692295>

Riaz M, Yan L, Wu X, Hussein S, Aziz O, Jiang C (2018) Mechanisms of organic acids and boron induced tolerance of aluminum toxicity: A review. *Ecotoxicol Environ Saf* 165:25-35. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.08.087>

Rodrigues AA, Vasconcelos-Filho SC, Rodrigues CL, Sales JF, Vital RG (2016) Influence of aluminum on root growth and of anatomy *Stenocalyx dysentericus* (DC.) O. Berg. *Afr J Biotechnol* 15: 1193-1200. <https://doi.org/10.5897/AJB2016.15383>

Rodrigues AA, Vasconcelos-Filho SC, Müller C et al. (2019) Tolerance of *Eugenia dysenterica* to aluminum: Germination and plant growth. *Plants* 8: 317-331. <https://doi.org/10.3390/plants8090317>

Saito K, Watanabe Y, Matsushita Y, Imai T, Koike T, Sano Y, Funada R, Fukazawa K, Fukushima K (2014) Aluminum localization in the cell walls of the mature xylem of maple tree detected by elemental imaging using time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS). *Holzforsch* 68: 85-92. <https://doi.org/10.1515/hf-2012-0215>

Shen RF, Ma JF, Kyo M, Iwashita T (2002) Compartmentation of aluminum in leaves of an Al-accumulator, *Fagopyrum esculentum* Moench. *Plant* 215: 394-398. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0763-z>

Souza-Fernandes DP (2019) O acúmulo de alumínio na parte aérea é comum em espécies herbáceas do Cerrado? Dissertação, Universidade Federal de Viçosa - UFV, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Souza MC, Bueno PCP, Morellato LPC, Habermann G (2015) Ecological strategies of Al-accumulating and non-accumulating functional groups from the cerrado sensu stricto. *Ann Acad Bras Ciên* 87:813-823. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201520140222>

Sun L, Zhang M, Liu X, Mao Q, Shi C, Kochian LV, Liao H (2020) Aluminum is essential for root growth and development of tea plants (*Camellia sinensis*). *J Integr Plant Biol* 62: 984-997. <https://doi.org/10.1111/jipb.12942>

Szalai G, Janda T, Paldi E, Szigeti Z (1996) Role of light in the development of post-chilling symptoms in maize. *Plant Cell Physiol* 148: 378-383. [https://doi.org/10.1016/S0176-617\(96\)80269-0](https://doi.org/10.1016/S0176-617(96)80269-0)

Wang Y, Li R, Li D, Jia X, Zhou D, Li J, Lyi SM, Hou S, Huang Y, Kochian LV, Liu J (2017) NIP 1;2 is a plasma membranelocalized transporter mediating aluminum uptake, translocation, and tolerance in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 114: 5047-5052. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618557114>

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 Environ* 29: 2124–2132. [doi: 10.1111/j.1365-3040.2006.001586.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.001586.x)

Watanabe T, Misawa S, Hiradate S, Osaki M (2008a) Characterization of root mucilage from *Melastoma malabathricum*, with emphasis on its roles in aluminum accumulation. *New Phytol* 178: 581–589. [doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02397.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02397.x)

Watanabe T, Misawa S, Hiradate S, Osaki M. (2008b) Root mucilage enhances aluminum accumulation in *Melastoma malabathricum*, an aluminum accumulator. *Plant Signal Behav* 3: 603–605. [doi: 10.4161/psb.3.8.6356](https://doi.org/10.4161/psb.3.8.6356)

Watanabe T, Osaki M (2001) Influence of aluminum and phosphorus on growth and xylem sap composition in *Melastoma malabathricum* L. *Plant Soil* 237:63-70. <https://doi.org/10.1023/A:1013395814958>

Wei Y, Han R, Xie Y, Jiang C, Yu Y (2021) Recent advances in understanding mechanisms of plant tolerance and response to aluminum toxicity. *Sustainability* 13:1782 <https://doi.org/10.3390/su13041782>

Xia JX, Yamaji N, Kasai T, Ma JF (2010) Plasma membrane localized transporter for aluminum in rice. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 18381–18385. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004949107>

Yang JL, Zhu X F, Peng YX, Zheng C, Li G X, Liu Y, Shi YZ, Zheng SJ (2011) Cell wall hemicellulose contributes significantly to aluminum adsorption and root growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 155: 1885-892. <https://doi.org/10.1104/pp.111.172221>

Zini AS, Martins S, Toderke ML, Temponi LG (2016) Anatomia foliar de Rubiaceae ocorrentes em fragmento florestal urbano de Mata Atlântica, PR, Brasil. *Hoehnea* 43: 173-82. <https://doi.org/10.1590/2236-8906-59/2015>

Zhou J, Li Z, Zhou T, Zaijun X, Wu L, Luo Y, Christie P (2020) Aluminum toxicity decreases the phytoextraction capability by cadmium/zinc hyperaccumulator *Sedum plumbizincicola* in acid soils. *Sci Total Environ* 711: 134591. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134591>

4.8. Tabelas e figuras

Tabela 1: Teores de macro e micronutrientes na raiz e parte aérea de plantas de *Borreria latifolia* submetidas a ausência de alumínio (T0) e 0+500 (T0 por 40 dias+500 µM de Al por 17 dias) em cultivo hidropônico (pH 4,5), ao final de 57 dias.

Órgão	Tratamento	Al (g/kg)	N (g/kg)	P (g/kg)	K (g/kg)	Ca (g/kg)	Mg (g/kg)	S (g/kg)	Cu (mg/kg)	Fe (mg/kg)	Zn (mg/kg)	Mn (mg/kg)	B (mg/kg)
Raiz	T0	0,5±0,03Bb	27,6±1,9Ab	1,5±0,2Bb	3,3±0,3Ab	9,9 ±0,2Ab	1,1±0,0 3Ab	1,9±0,05Ab	33,0±2,8Ba	963,6±213,8Aa	183,7±38,7Ab	35,1±5,8Ab	14,2±0,7Ab
	T0+500	1,7±0,1Ab	24,1±1,7Ab	3,0±0,3Ab	2,3±0,2Ab	7,5 ±0,3Ab	1,2±0,07Ab	1,7±0,07Ab	64,3±3,4Aa	1012,7±249,6Aa	154,5±12,3Ab	21,9±5,5Ab	17,9±0,5Ab
Parte aérea	T0	4,7±0,21Ba	57,7±6,2Ba	7,6±0,4Aa	22,9±1,8Ba	30,0±1,2Ba	4,9±0,6Ba	12,8±0,9Ba	28,2±2,1Bb	503,4±32,7Ab	275±39,3Ba	146,8±10,1Ba	45,3±4,9Ba
	T0+500	32,1±1,6Aa	106,2±3,3Aa	8,7±0,08Aa	45,2±2,2Aa	36,0±1,5Aa	7,6±0,3Aa	20,7±1,6Aa	51,2±4,6Ab	635,6±44,2Ab	452,6±11,6Aa	212,6±10,2Aa	76,7±1,4Aa

Média ± erro padrão (n = 5). Valores seguidos por letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p < 0,05). Letras maiúsculas se referem a comparação entre os tratamentos dentro de um mesmo órgão, enquanto letras minúsculas se referem a comparação entre os órgãos dentro de um mesmo tratamento.

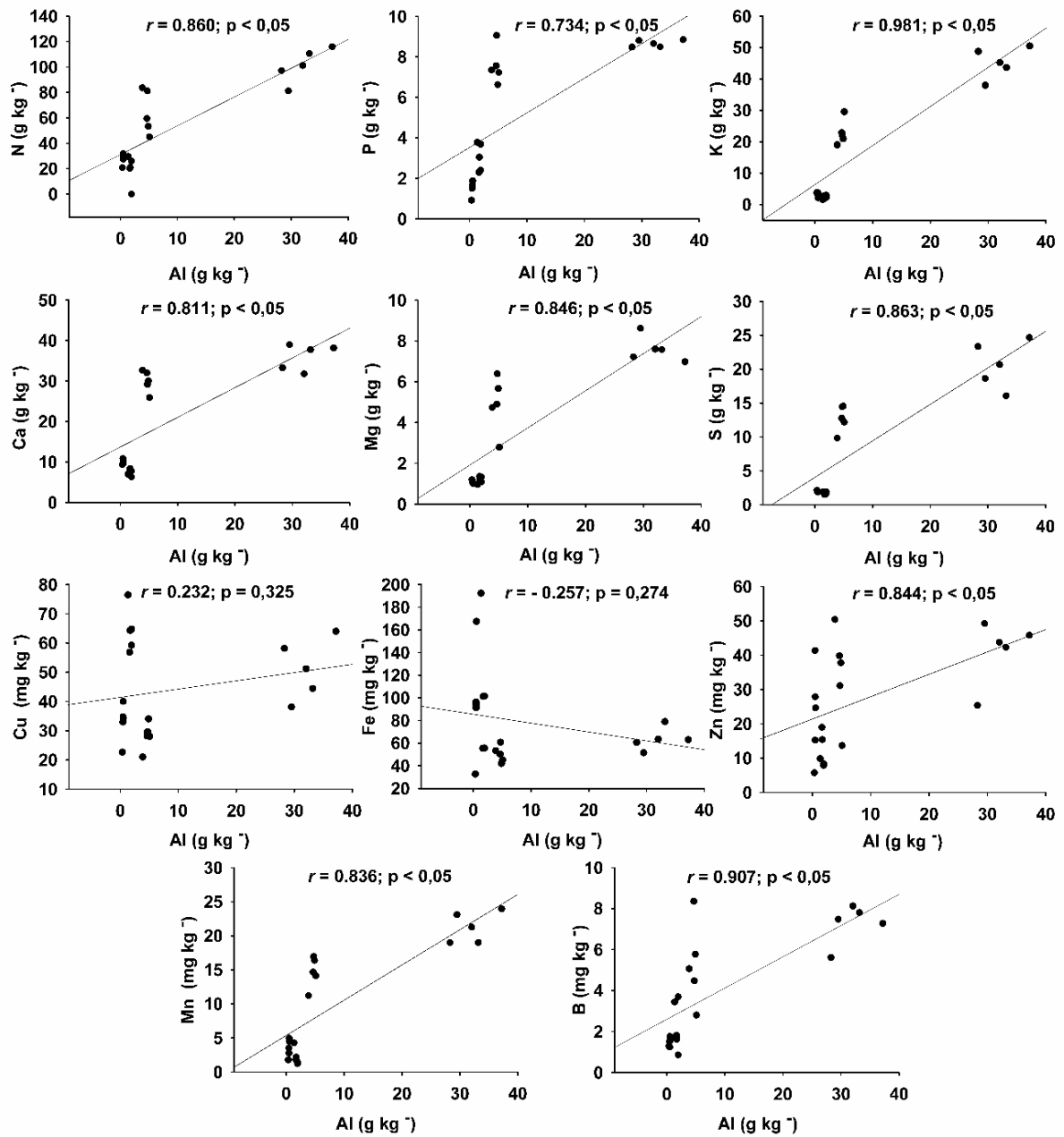


Figura 1: Correlação entre o teor de Al e nutrientes minerais nas plantas de *Borreria latifolia* crescidas em meio ácido (pH 4,5) com 0 (T0) e 0+500 (T0+500) μM de Al na solução nutritiva de Clark. Coeficiente de correlação linear de Pearson (r); p-valor abaixo de 0,05 indica variação, positiva ou negativa, significativa entre os pares de variáveis avaliados pelo teste de Tukey.

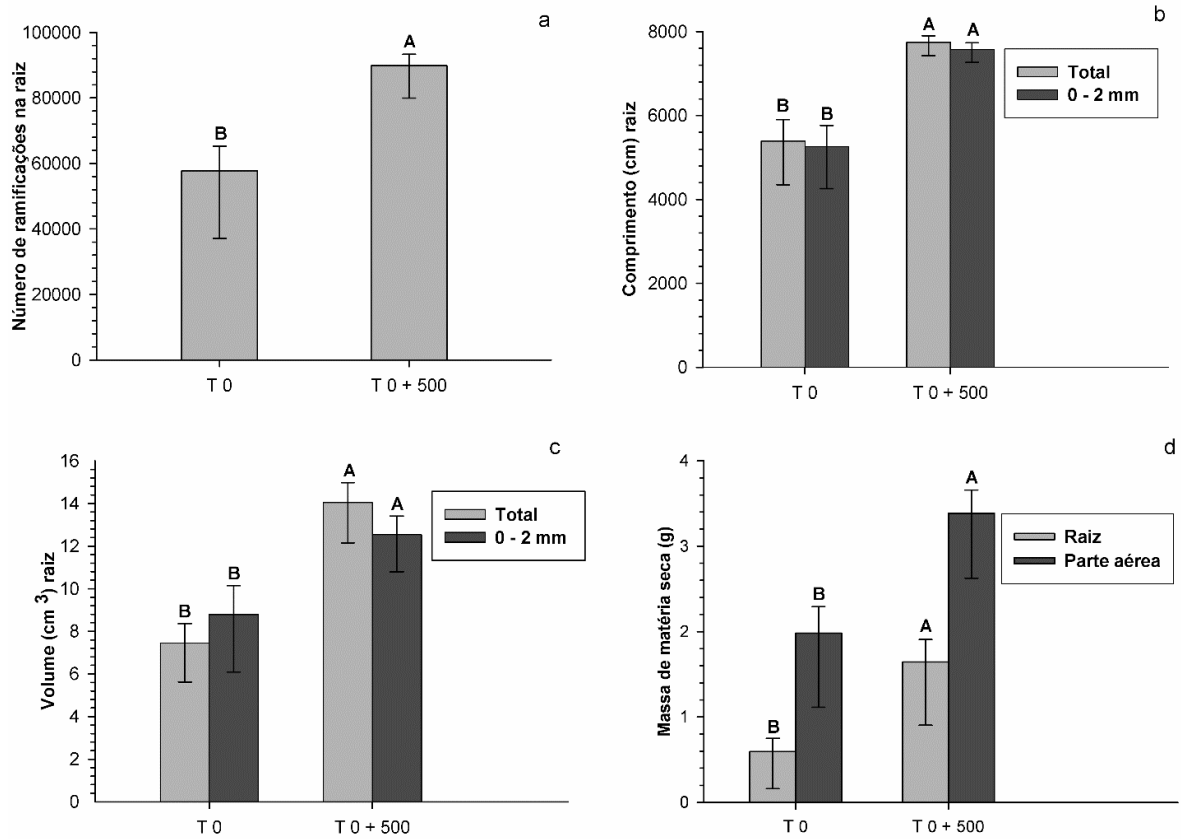


Figura 2: Parâmetros de crescimento em plantas de *Borreria latifolia* expostas a 0 (T0) e 0+500 (T0+500) μM de Al. (a) número de ramificações na raiz; (b) volume total de raiz e de raízes finas (0-2mm); (c) comprimento total de raiz e de raízes finas (0-2mm) e (d) biomassa seca de raiz e parte aérea produzidos após 57 dias em hidroponia. Barras verticais indicam o erro padrão ($n = 5$) e letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

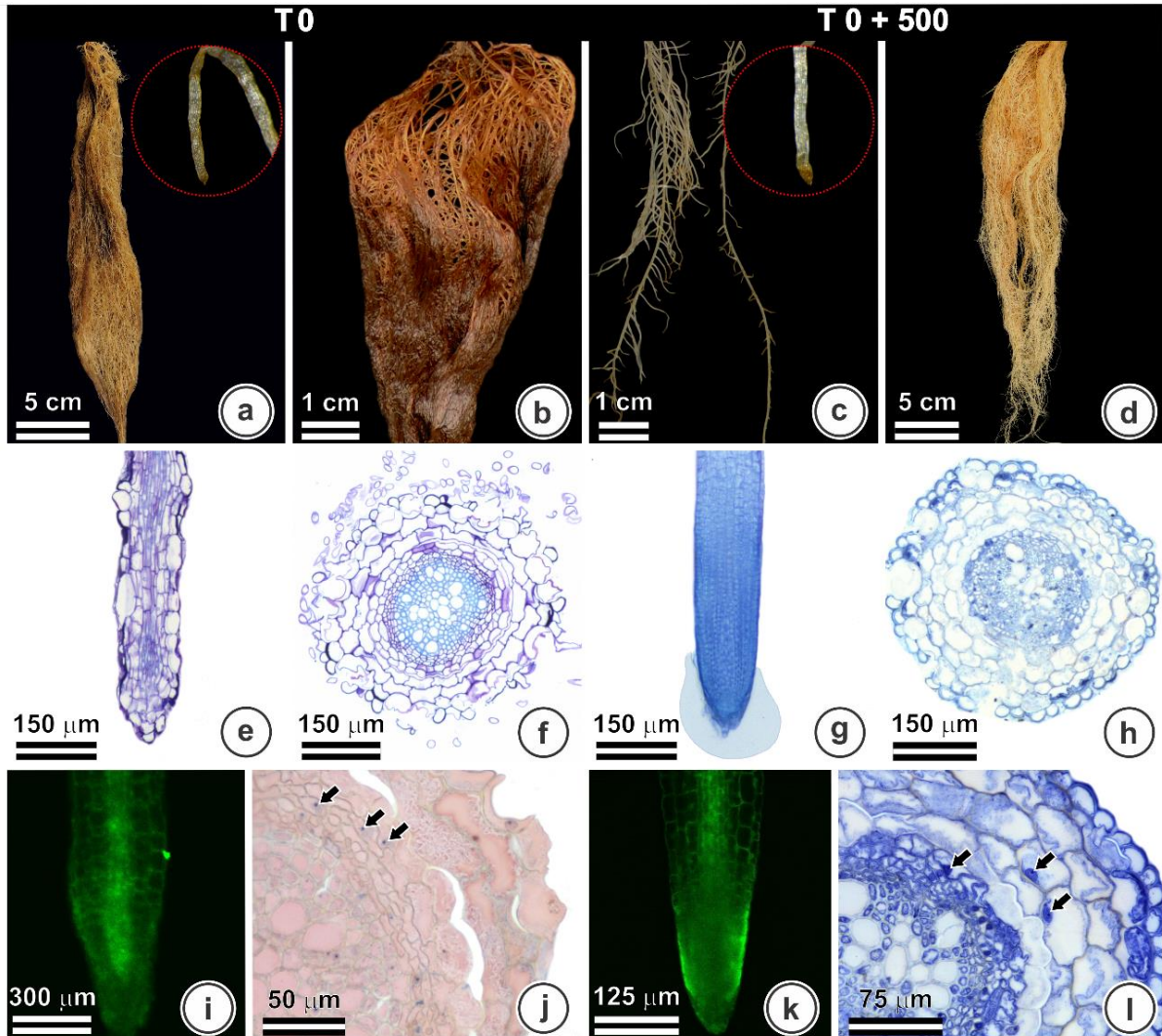


Figura 3: Raízes de plantas de *Borreria latifolia* cultivadas com 0 (a, b, e, f, i, j) e 0 + 500 μM de Al (c, d, g, h, k, i) por 57 dias em hidroponia. Morfologia da raiz (a - d). Anatomia da raiz em corte longitudinal (e, g) e corte transversal (f, h). Histolocalização do Al em ápices radiculares (i, k) com Lumogallion 10 μM (forte fluorescência nas células da borda em k) e na zona de ramificação (j, l) com Chrome Azurol S (reação positiva para Al - cor azul). Setas indicam a presença do metal nos núcleos das células.

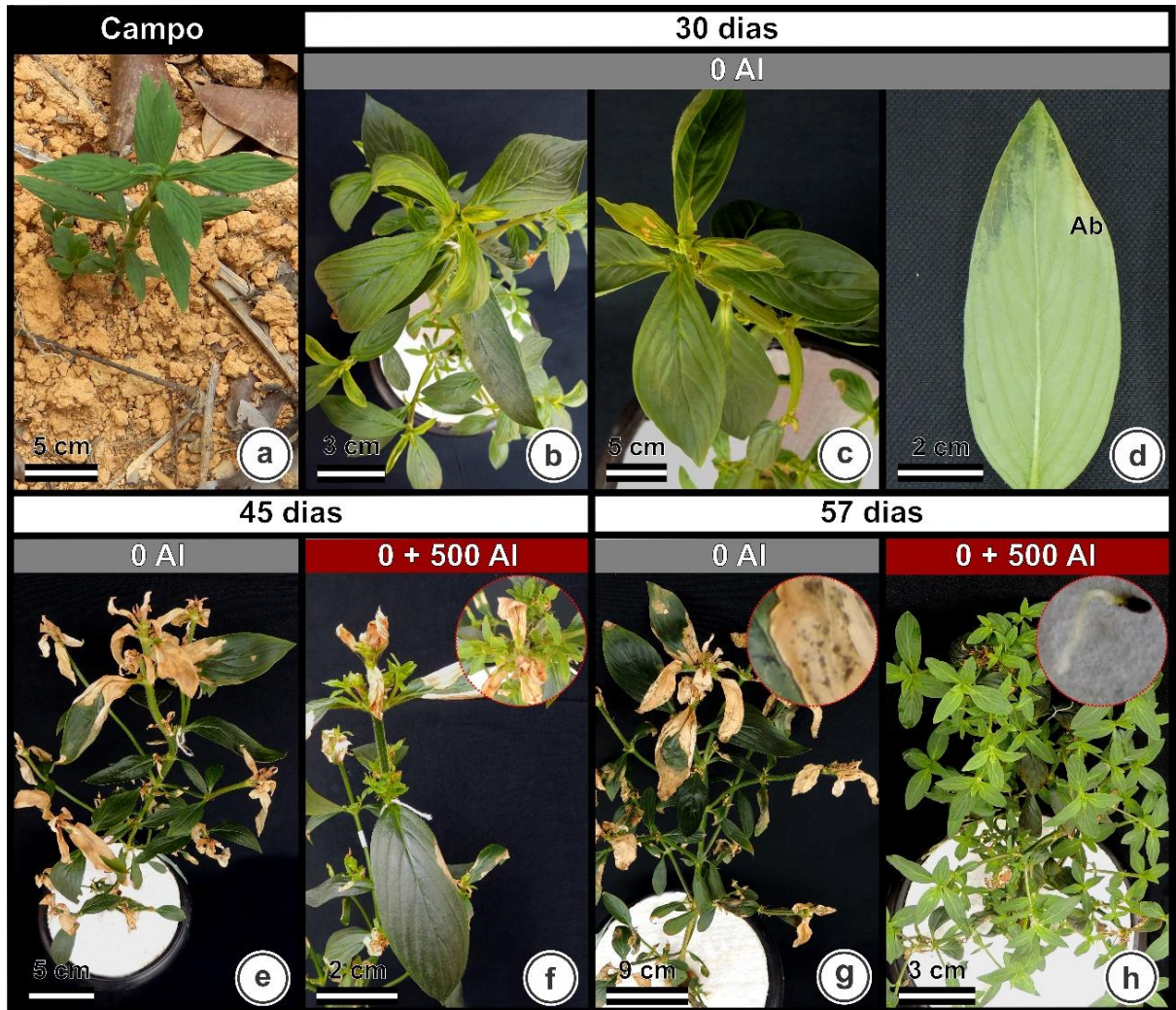


Figura 4: Morfologia da parte aérea de indivíduos de *Borreria latifolia* (a) nos tratamentos com 0 (b, c, d, e, g) e 0 + 500 (f, h) μM de Al em solução nutritiva de Clark (pH 4,5). Início das alterações morfológicas (b). Seta indicando a formação de sulcos (c). Mancha escura de aspecto oleoso (d). Morte de meristemas caulinares (e). Brotações, vistas de cima (detalhe), cinco dias após o acréscimo de Al (f). Plantas T0 (g), com fungos crescendo sobre as necroses (detalhe), e plantas T0+500 (h), produzindo sementes viáveis (detalhe), ao final de 57 dias de experimento em sistema hidropônico. Ab - face abaxial da folha.

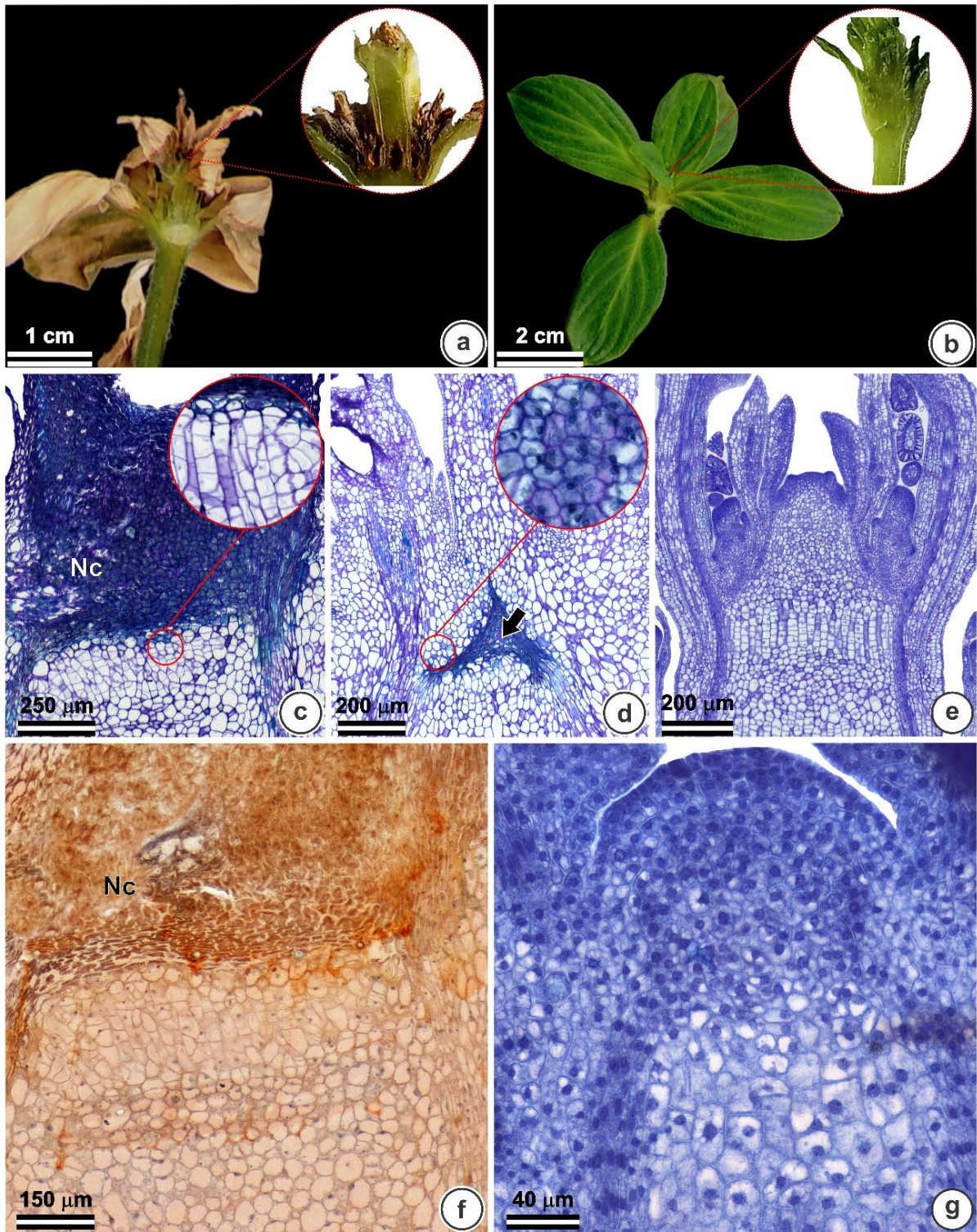


Figura 5: Meristemas caulinares de plantas de *Borreria latifolia* tratadas com 0 (a, c, f) e 0+500 μM de Al (b, d, e, g) ao final de 57 dias de cultivo em solução nutritiva. Detalhe morfológico do ápice caulinar (a, b) seccionado longitudinalmente (canto superior direito). Cortes histológicos longitudinais (c - g). Características das células adjacentes as necroses (em destaque) nos meristemas caulinares (c-e). Seta indicando a necrose residual, oriunda da morte do meristema apical, formada na ausência do Al. Sítios de acúmulo do Al (f, g) identificados pela reação em azul com Chrome Azurol S. Nc - Necrose.

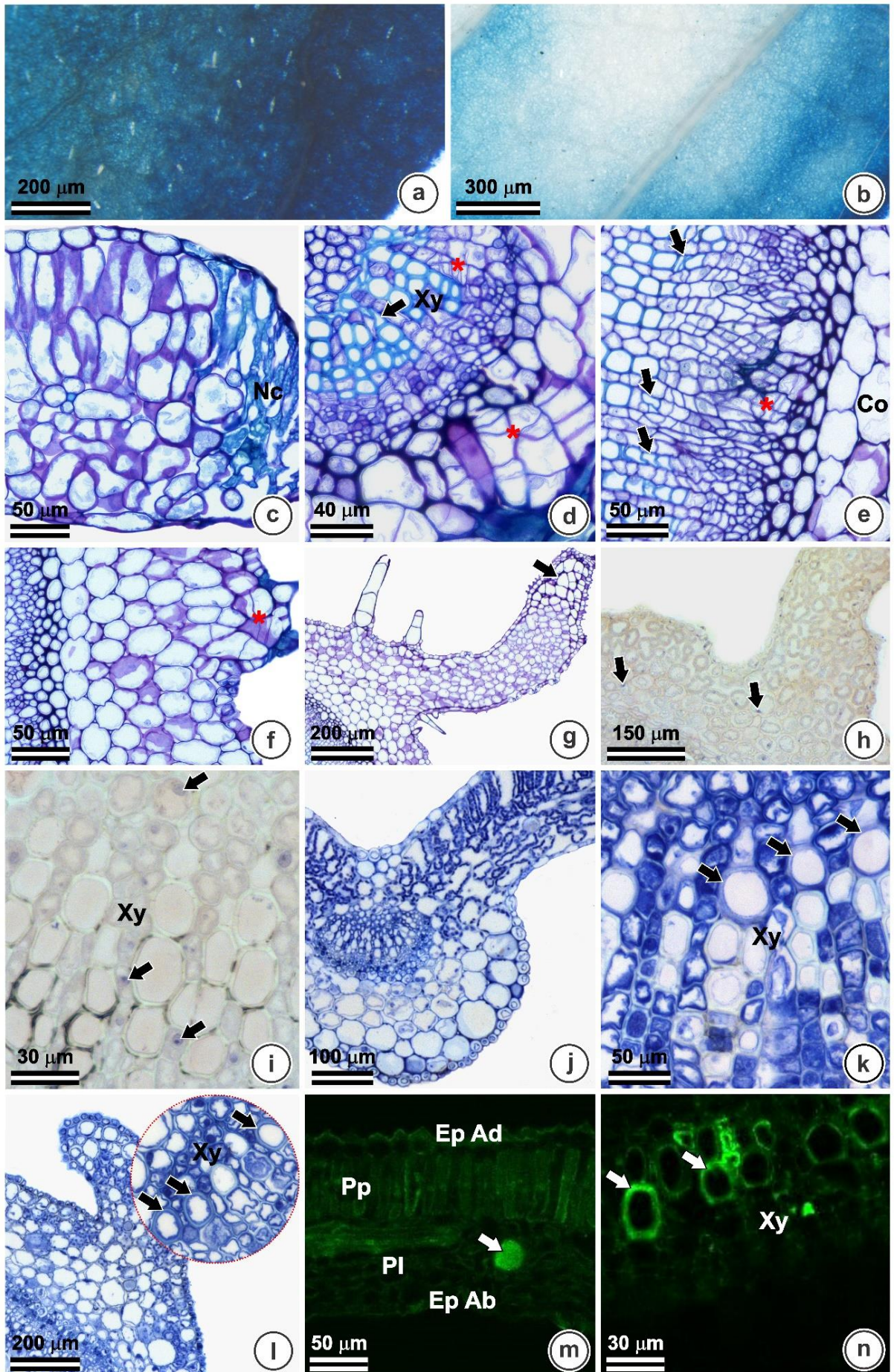


Figura 6: Histoquímica e anatomia da parte aérea de plantas de *Borreria latifolia* submetidas a 0 (a, c - i) e 0 + 500 μM de Al (b, j - n) em meio hidropônico por 57 dias. Detecção de morte celular, reação em azul, nas folhas com Azul de Evans (a, b). Corte transversal da folha (c, d, i, j, k, m) e do caule (e-h, l, n). Setas ressaltando deformações em elementos de vasos (d, e); hipertrofia nas aletas do caule (g); presença de Al em núcleos (i), vasos (k, l, n) e idioblastos (m). Asteriscos em d, e, f indicam alterações mitóticas. Co – Córtex; Nc - necrose; Xy - xilema.

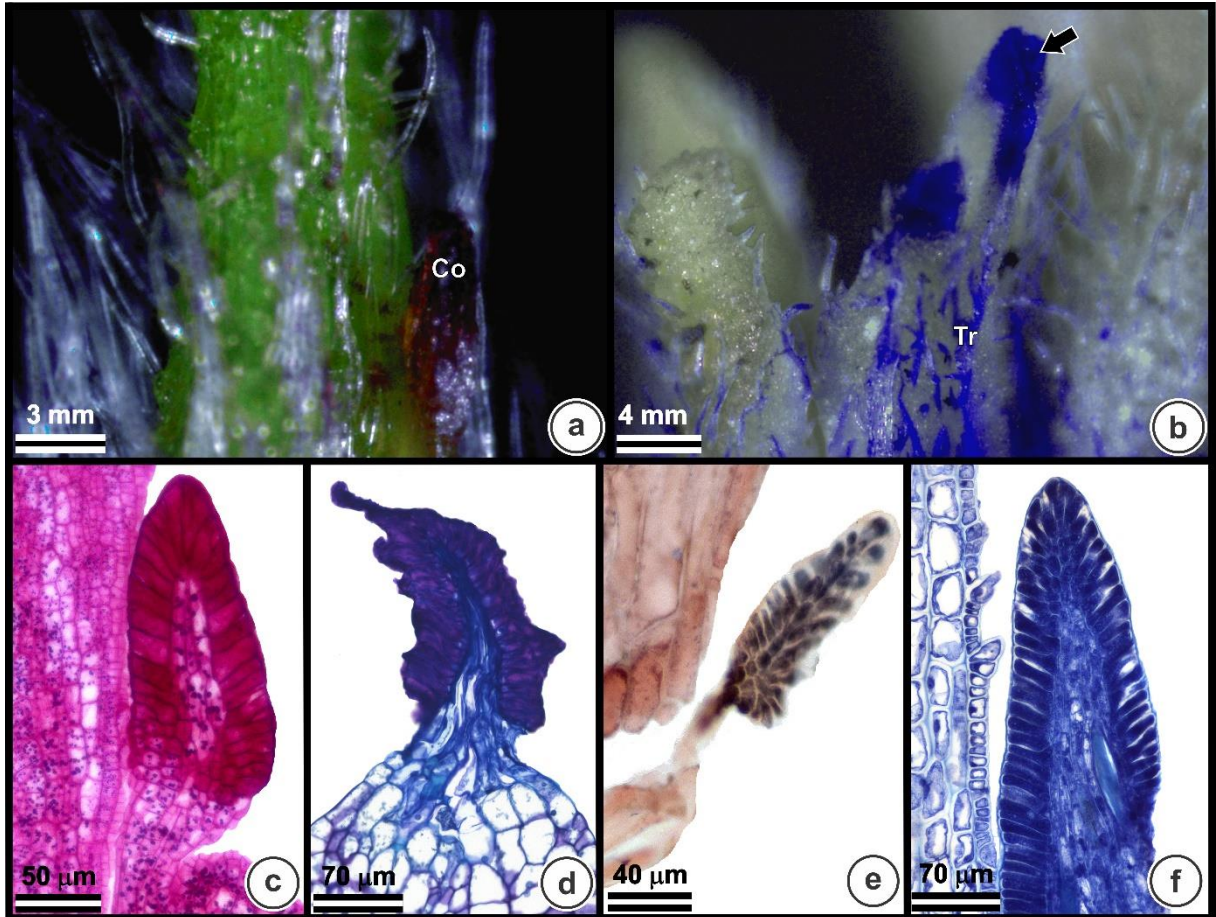


Figura 7: Morfoanatomia e histoquímica para detecção de Al e polissacarídeos em coléteres de *Borreria latifolia* nos tratamentos T0 e T0+500 μM de Al, após 57 dias de cultivo em solução de Clark (pH 4,5). Morfologia (a). Exsudação do Al na secreção (seta) do coléter evidenciada em azul pelo reagente histoquímico Solochrome Azurine (b). Cortes longitudinais (c-f). Intensa cor rosa indicando reação positiva para polissacarídeos na epiderme secretora (c). Alteração anatômica no coléter de plantas T0 (d). Marcação do Al com Chrome Azurol S em T0 (e) e T0+500 (f). Reação em azul mostra a presença do metal na paliçada secretora e células do eixo do coléter. Tr – tricoma.

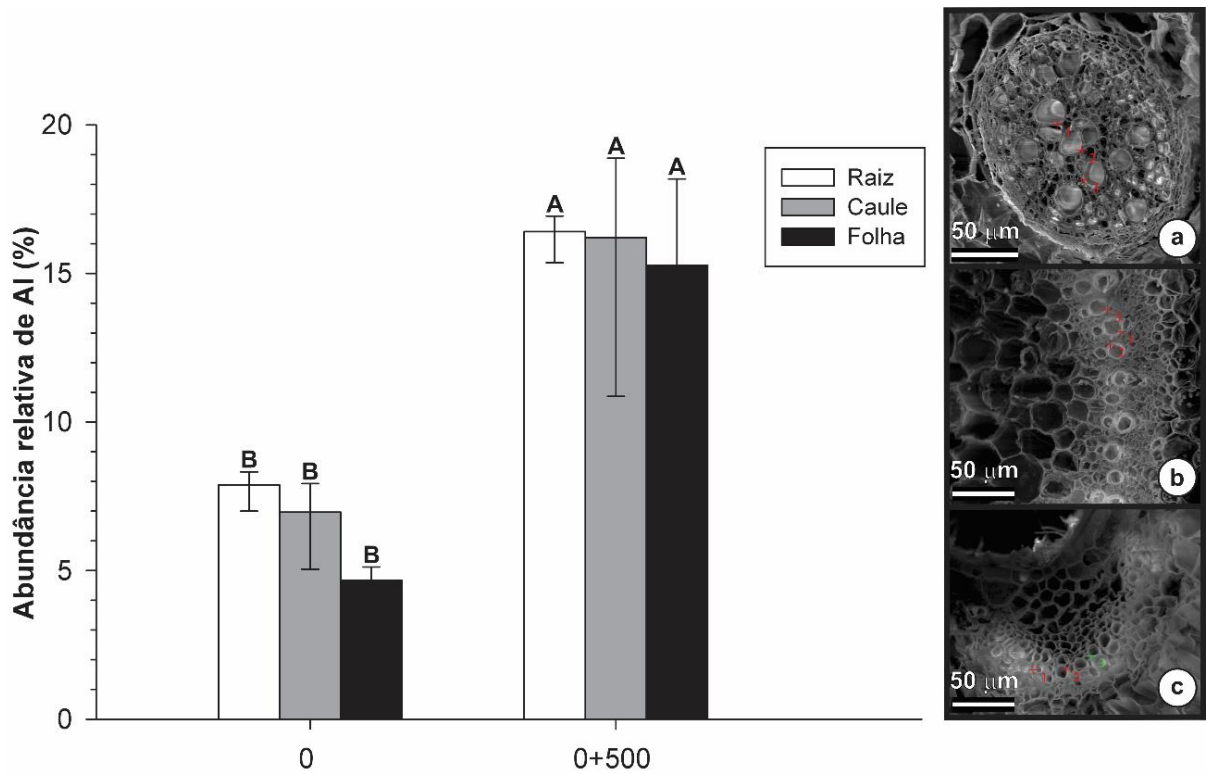


Figura 8: Abundância relativa (%) de Al na parede celular dos elementos de vaso de maior calibre na raiz (a), no caule (b) e na nervura mediana da folha (c) de *Borreria latifolia* com 57 dias de cultivo hidropônico em 0 e 0+500 μM de Al. Barras verticais indicam o erro padrão ($n = 5$) e letras diferentes revelam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

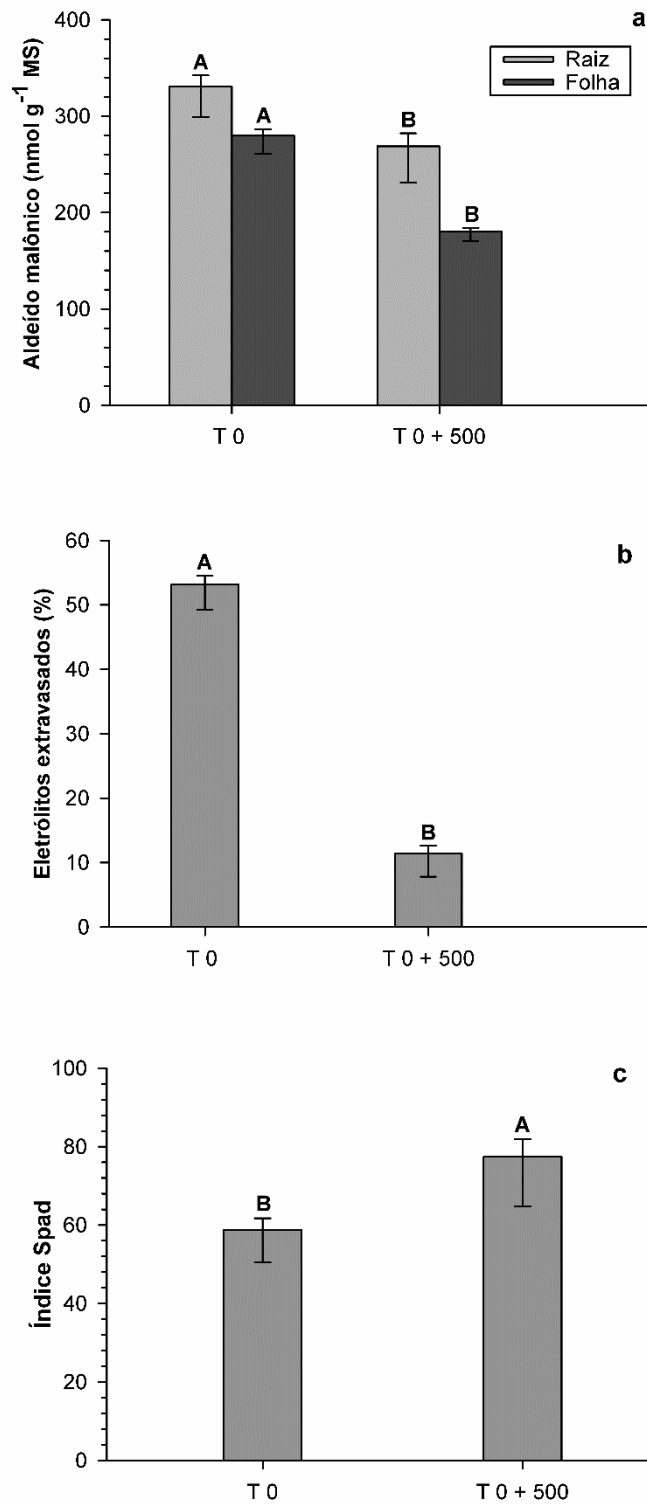


Figura 9: Avaliação de estresse oxidativo e Índice Spad (Soil Plant Analysis and Development) de plantas de *Borreria latifolia* com 57 dias de cultivo hidropônico em 0 e 0+500 µM de Al. (a) Teor de aldeído malônico na raiz e folhas. (b) Percentual de extravasamento de eletrólitos na folha. (c) Índice Spad das folhas. Barras verticais indicam o erro padrão (n = 5) e letras diferentes denotam diferença significativa pelo teste de Tukey (p < 0,05).

CAPÍTULO 2

Impacto do alumínio sobre parâmetros fisiológicos e bioquímicos da espécie de cerrado *Borreria latifolia* (Rubiaceae)

Ana Paula P. Marques · Ivan B. Viana · Danielle S. Brito · João S. Tomaz · Allan de Marcos Lapaz · Cleberson Ribeiro · Aristéa A. Azevedo

5.1. Resumo

Borreria latifolia (Rubiaceae) é uma espécie herbácea hiperacumuladora de alumínio (Al) do cerrado, bioma com solos ácidos e alta saturação do metal. Estudo anterior confirmou o acúmulo do Al nos cloroplastos de *B. latifolia* e demonstrou a essencialidade do elemento para o crescimento e o desenvolvimento dessa espécie. Entretanto, o papel do Al nos cloroplastos e a sua provável participação na fotossíntese, bem como em processos bioquímicos de crescimento em *B. latifolia*, ainda não foram esclarecidos. Hipotetizando que o Al estimula o metabolismo de *B. latifolia*, avaliamos o efeito do metal sobre parâmetros fotossintéticos, teores de clorofilas, fenólicos, açúcares, amido e proteínas, além da abundância relativa de nutrientes nessa espécie. Indivíduos de *B. latifolia* coletados em solo do cerrado foram submetidos a dois tratamentos: 0 μ M de Al por 57 dias (T0) e 0 μ M de Al por 40 dias + 500 μ M de Al por 17 dias subsequentes (T0+500). Após 24 e 48 horas da adição do Al no cultivo, plantas T0+500 apresentaram maiores valores de todos os parâmetros de trocas gasosas, exceto da eficiência do uso da água, permanecendo elevados após 17 dias de exposição ao metal. Resposta semelhante foi observada para a taxa de transporte de elétrons, a eficiência de excitação e o rendimento efetivo do PSII, enquanto o coeficiente não fotoquímico foi superior em plantas T0 nos três tempos. Somente na última avaliação, o CO₂ intracelular se elevou e o rendimento máximo do PSII e o coeficiente fotoquímico reduziram nas plantas T0. Ao final do cultivo, plantas T0+500 apresentaram maiores teores de clorofilas *a* e *b*, de açúcares e de proteínas na raiz. Entretanto, a concentração de amido foi maior na raiz de plantas T0, enquanto a de fenóis não diferiu entre os tratamentos. As maiores abundâncias relativas de Al em todos os órgãos, de K na raiz e de S e Zn na folha foram obtidas no tratamento com Al, enquanto plantas cultivadas sem o metal exibiram maiores percentuais de Zn, Cu e Fe na raiz e de N, Mg e Cu na folha. O Al atua estimulando a fotossíntese e a síntese de metabólitos primários em *B. latifolia*.

Palavras-chave: Al essencial, fotossíntese, hiperacumuladora de Al.

Impact of aluminum on physiological and biochemical parameters of the cerrado species
Borreria latifolia (Rubiaceae)

Ana Paula P. Marques · Ivan B. Viana · Danielle S. Brito · João S. Tomaz · Allan de Marcos Lapaz · Cleberson Ribeiro · Aristéa A. Azevedo

5.2. Abstract

Borreria latifolia (Rubiaceae) is an aluminum (Al) hyperaccumulating herbaceous species from the cerrado, a biome with acid soils and high metal saturation. A previous study confirmed the accumulation of Al in the chloroplasts of *B. latifolia* and demonstrated the essentiality of the element for the growth and development of this species. However, the role of Al in chloroplasts and its participation in photosynthesis, as well as in biochemical growth processes in *B. latifolia*, have not yet been clarified. Hypothesized that Al stimulates the metabolism of *B. latifolia*, we evaluated the metal's effect on photosynthetic parameters, chlorophyll, phenolic, sugar, starch and protein contents, in addition to the relative abundance of nutrients in this species. Individuals of *B. latifolia* collected in cerrado soil were submitted in two treatments: 0 μ M Al for 57 days (T0) and 0 μ M Al for 40 days + 500 μ M Al for 17 subsequent days (T0 + 500). After 24 and 48 hours of Al addition to the culture, T0 + 500 plants showed higher values of all gas exchange parameters, except for water use efficiency, staying high after 17 days of exposure to the metal. Similar behavior was observed for electron transport rate, excitation efficiency and effective PSII yield, while the non-photochemical coefficient was higher in T0 plants in the three times. Only in the last evaluation, intracellular CO₂ increased and the maximum yield of PSII and the photochemical coefficient reduced in T0 plants. At the end of cultivation, T0 + 500 plants presented higher levels of chlorophylls *a* and *b*, sugars and proteins in the root. However, starch concentration was higher in the root of T0 plants, while that of phenols did not differ between treatments. The highest relative abundances of Al in all organs, of K in the root and of S and Zn in the leaf were obtained in the treatment with Al, while plants cultivated without the metal exhibited higher percentages of Zn, Cu and Fe in the root and of N, Mg and Cu in the leaf. Al acts by stimulating photosynthesis and the synthesis of primary metabolites in *B. latifolia*.

Keywords: Essential Al, photosynthesis, Al hyperaccumulator.

5.3. Introdução

O Cerrado, conhecido internacionalmente por ‘savana brasileira’, corresponde ao segundo maior domínio fitogeográfico do Brasil, ocupando uma área de 2 milhões de km², o equivalente a um quarto do território nacional (Coutinho, 1990; Ribeiro e Walter, 1998). A imensa biodiversidade e o grande endemismo de espécies, bem como a alta taxa de degradação, tornam o Cerrado um dos hotspots mundiais para a conservação (Myers et al., 2000; Forzza et al., 2010). A vegetação de cerrado cresce sobre solos ácidos (pH < 5), profundos, altamente lixiviados, pobres em nutrientes (como Ca, N, K, Mg, P) e ricos em alumínio trocável (Al³⁺) (Dezzeo et al., 2004).

O Al³⁺ é a espécie química do metal mais tóxica para as plantas cultivadas (Bustamante et al., 2012; Singh et al., 2017). As injúrias causadas por este elemento em espécies sensíveis iniciam na raiz e se expandem posteriormente na parte aérea (Rao et al., 2016). Os danos morfofisiológicos mais frequentes correspondem a necrose de ápices radiculares, inibição de pelos radiculares e de raízes laterais, ocasionando a menor absorção de nutrientes (como Ca, K, Mg, Fe, N e P) e, conseqüentemente, a redução no crescimento da raiz (Zhao e Shen, 2018; Jaskowiak et al., 2019; Chandra e Keshavkant, 2021). Com isso, o transporte de nutrientes para a parte aérea fica comprometido, o que leva ao surgimento de cloroses e necroses foliares (Zhang et al., 2007; Zhao e Shen, 2018). Outras alterações relatadas nos órgãos aéreos consistem na perda da regulação de abertura e fechamento estomático, transpiração foliar alterada, degradação de clorofilas, baixa fotossíntese líquida e baixo desempenho fotoquímico, promovendo a redução da biomassa de folhas e menor altura de plantas (Nunes-Nesi et al., 2014; Silva et al., 2018; Chandra e Keshavkant, 2021).

Em contraste, algumas plantas de cerrado armazenam em seus tecidos foliares elevadas concentrações do elemento (< 1 g de Al Kg⁻¹ de matéria seca), sem que o mesmo cause prejuízos metabólicos ou danos celulares, sendo referidas como acumuladoras de Al, segundo critério de Chenery (1948). Outras espécies, as hiperacumuladoras, chegam a apresentar concentrações de Al acima de 10 g kg⁻¹ em sua biomassa seca (Jansen et al., 2002; Olivares et al., 2010). O Al é levado da raiz à parte aérea das plantas via xilema, onde o complexo Al³⁺/citrato é conduzido pela corrente evapotranspiratória (Matsumoto et al., 2015; Chandra e Keshavkant, 2021). O acúmulo de Al, conhecido como tolerância interna, é a estratégia de resistência ao metal mais frequente entre as espécies herbáceas do cerrado (Souza-Fernandes, 2019). As principais famílias botânicas acumuladoras de Al são: Melastomataceae, Vochysiaceae, Simplicaceae e Rubiaceae (Haridasan, 1982; Bressan et al., 2016; Malta et al., 2016, Souza-Fernandes, 2019).

Rubiaceae é uma das maiores famílias de angiospermas, com cerca de 650 gêneros e 13.000 espécies descritas (Delprete e Jardim, 2012), abrigando, juntamente com Poaceae e Asteraceae, grande parte das espécies herbáceas mais representativas do Cerrado brasileiro (Paro, 2013). Segundo Bremer e Eriksson (2009), são distinguíveis as subfamílias Cinchonoideae (9 tribos), Ixoroideae (15 tribos) e Rubioideae (18 tribos), com as espécies pertencentes a esta última tipicamente acumuladoras de Al (Jansen et al. 2000, 2002). Dentre essas, destaca-se a espécie *Borreria latifolia* (Aubl.) K. Schum. por hiperacumular o Al em sua parte aérea, cerca de 30 g de Al Kg⁻¹ de matéria seca, quando crescendo em área de cerrado *stricto sensu* (Souza-Fernandes, 2019) ou em cultivo hidropônico com o metal (Capítulo 1).

B. latifolia apresenta as paredes pecto-celulósicas, os núcleos e os cloroplastos como os principais sítios de acúmulo de Al, observados nas folhas e caule (Castro, 2013; Souza-Fernandes, 2019; Capítulo 1). A presença de Al em cloroplastos parece ser comum entre as espécies de cerrado acumuladoras do metal (Souza-Fernandes, 2019) e já foi relatada para *Richeria grandis* (Cuenca et al., 1991), *Rudgea viburnoides* (Malta et al., 2016), *Callisthene major* e *Qualea grandiflora* (Andrade et al., 2011). Efeito estimulante do Al na fotossíntese e na produção de clorofilas, acarretando no maior crescimento das plantas, vêm sendo relatado para espécies de acumuladoras do metal (Bojórquez-Quintal et al., 2017; Cury et al., 2019; Liu et al., 2020; Bressan et al., 2021). Contudo, os aspectos fisiológicos por de trás dessa presença do Al nos cloroplastos em espécies de cerrado ainda precisam ser esclarecidos e nos leva a indagação: Qual é a função do Al no cloroplasto?

Em estudo anterior, foi sugerido que o Al é um elemento essencial para *B. latifolia*, embora o seu papel fisiológico ainda não tenha sido elucidado (Capítulo 1). A essencialidade do Al também foi relatada para as plantas de chá (*Camellia sinensis*), espécie asiática e hiperacumuladora do metal (Sun et al., 2020). Segundo esses autores, *C. sinensis* parece usar o Al para a divisão e diferenciação de células radiculares, promovendo o crescimento da raiz, visto que o metal se mostrou fundamental para manter a integridade do DNA de células meristemáticas. Além disso, o efeito estimulante do Al sobre o crescimento de raiz e parte aérea foi descrito para outras espécies de cerrado acumuladoras do metal, como as arbóreas *Eugenia dysenterica* (Rodrigues et al., 2016), *Vochysia tucanorum* (Bressan et al., 2021), *Vochysia thyrsoidea* (Haridasan, 1988), *Miconia albicans* e *Qualea grandiflora* (Haridasan, 1988, 2008; Cury et al., 2019).

A indução do crescimento ocasionada pelo Al em plantas acumuladoras do metal vem sendo atribuída, principalmente, ao alívio da toxicidade provocada por outros metais, como Mn, Fe e Zn, em conjunto com a facilitação da absorção de elementos essenciais como N, P e K, que

atuam diretamente no processo fotossintético e na relação fonte-dreno (Bojórquez-Quintal et al., 2017; Muhammad et al., 2019; Zhou et al., 2020), e a síntese aumentada de carboidratos, em especial a glicose (Moriyama et al., 2016). Ademais, foi demonstrado que o Al eleva o desempenho fotossintético, o teor de clorofilas e de proteínas (metabólitos primários), além de estimular a exsudação de substâncias orgânicas, como ácidos orgânicos e fenólicos (metabólitos secundários), em plantas nativas e não nativas cultivadas na presença do metal (Nguyen et al., 2003; Maejima et al., 2017; Cury et al., 2019; Liu et al., 2020; Bressan et al., 2021).

Apesar desses importantes trabalhos sobre a ação estimulante do Al em plantas e do relato da essencialidade do elemento para *C. sinensis* e *B. latifolia*, pouco conhecemos sobre o efeito do Al na fisiologia da fotossíntese de espécies acumuladoras, em especial nas nativas de cerrado. Além disso, os mecanismos bioquímicos responsáveis pela retomada do crescimento e do desenvolvimento de *B. latifolia* na presença do Al ainda são desconhecidos.

Desta forma, usamos o cultivo hidropônico para investigar aspectos fisiológicos e bioquímicos de indivíduos de *B. latifolia*, crescendo na ausência e presença do Al, testando a hipótese de que o Al atua estimulando a fotossíntese e o metabolismo desta espécie. A presente pesquisa explorou, pela primeira vez, aspectos fisiológicos e bioquímicos da essencialidade do Al para a espécie herbácea de cerrado *B. latifolia*.

5.4. Métodos

5.4.1. Material vegetal, condições de cultivo e design experimental

Plantas de *B. latifolia* em estágio vegetativo, não ramificadas, medindo entre 10 e 15 cm de altura foram coletadas, durante o verão, em latossolo amarelo do cerrado *stricto sensu* na Floresta Nacional de Paraopeba, Minas Gerais (MG) - Brasil (19° 20' S e 44° 20' W). Os indivíduos tiveram suas raízes lavadas, para retirada do solo, e esterilizadas com hipoclorito de sódio 10% por 10 minutos, sendo transferidos, imediatamente após esse procedimento, para o sistema de cultivo hidropônico. O cultivo se deu, em casa de vegetação com 3 L de solução nutritiva de Clark (1975) ¹/₂ força, pH 4,5, sob constante aeração. As plantas foram expostas aos tratamentos: 0 μM de Al por 57 dias (T0) e 0 μM de Al³⁺ por 40 dias, acrescentando-se, após esse tempo, 500 μM de Al na solução por mais 17 dias (T0+500). Inicialmente, plantas T0+500 permaneceriam o mesmo intervalo (40 dias) sem e com o Al, porém o cultivo com o metal foi reduzido para 17 dias, devido ao estágio avançado dos sintomas de deficiência e a morte de alguns indivíduos em T0, sinalizando que as plantas nesse tratamento não sobreviveriam por mais tempo. Esta concentração única de Al foi usada por não haver quantidade suficiente de indivíduos para serem expostos a doses crescentes do metal, de modo que 500 μM de Al foi selecionado em um teste anterior (dados não publicados) por estimular a retomada do crescimento de *B. latifolia* sem sintomas de toxicidade. O Al foi fornecido na forma de AlCl₃ (pH 4,5) e as soluções renovadas semanalmente. As unidades amostrais foram vasos de cultivo com um indivíduo de *B. latifolia* por vaso (n = 5). O delineamento inteiramente casualizado (DIC) foi empregado e as plantas foram coletadas ao final do experimento para realização das análises.

5.4.2. Trocas gasosas e parâmetros fotoquímicos

Folhas totalmente expandidas foram avaliadas, em ambos tratamentos, quanto as trocas gasosas e fluorescência da clorofila (*Chl a*), 1, 2 e 17 dias após adição do Al na solução de plantas T0+500. A assimilação líquida de CO₂ (*A*; μmol m⁻² s⁻¹), condutância estomática (*gs*; mol m⁻² s⁻¹), taxa de transpiração (*E*; mmol m⁻² s⁻¹), CO₂ intracelular (*Ci*; μmol mol⁻¹) e os parâmetros de fluorescência foram obtidos com analisador portátil de gás a infravermelho [modelo Li-6400XT (LI-COR Biosciences Inc., Nebraska, USA)] equipado com câmara de fluorescência integrada (modelo LI-6400-40, Lincoln, NE, USA). A eficiência do uso da água (*EUA* = *A/E*; μmol mmol⁻¹) e a eficiência instantânea de carboxilação (*EiC* = *A/Ci*; mol⁻¹) foram calculados.

A 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 determinados em folhas aclimatadas ao escuro por 90 minutos. Folhas aclimatadas à luz foram usadas para medir a fluorescência inicial (F'_0) e máxima (F'_m). Cálculos foram feitos, como determinado por Oxborough (2004), para a eficiência de captura de excitação de PSII aberto (F_v'/F'_m), coeficiente de extinção fotoquímico (qP) e não fotoquímico (NPQ), taxa linear de transporte de elétrons (ETR) e rendimento quântico efetivo do PSII (Φ_{PSII}).

Os parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da *Chl a* foram obtidos na mesma folha, entre 9:00h e 11:00h (Feistler e Habermann, 2012), sob condições de irradiância de 1000 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, concentração de CO_2 no orif\u00edcio da pin\u00e7a foliar de 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$, temperatura entre 25 e 28 $^\circ\text{C}$ e umidade relativa de 70 a 77 %.

5.4.3. An\u00e1lise bioqu\u00edmica de metab\u00f3litos

5.4.3.1. Pigmentos fotossint\u00e9ticos

Para a determina\u00e7\u00e3o dos teores de clorofila *a* (*Chla*) e clorofila *b* (*Chlb*), aproximadamente 15 mg de folhas liofilizadas e trituradas em moinho de bola foram homogeneizados com 700 μL de metanol 100% (v/v), na presen\u00e7a de polivinilpolipirrolidona (pvpp). A extra\u00e7\u00e3o se deu em termomixer a 80 $^\circ\text{C}$ por 20 minutos sob constante agita\u00e7\u00e3o (500 rpm). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4 $^\circ\text{C}$ com 14.000 rpm por 10 minutos e 100 μL dos sobrenadantes recolhidos foram dilu\u00eddos em 100 μL de \u00e1gua milli-Q ultrapura. As concentra\u00e7\u00f5es de *Chla* e de *Chlb* foram determinadas em espectrofot\u00f4metro a 653 e 666 nm, sendo o total de clorofilas (*Chl a+b*) e a raz\u00e3o entre a clorofila *a* e a clorofila *b* (*Chla / Chlb*) calculados. Todo o processo de extra\u00e7\u00e3o foi realizado com pouca luz para evitar a degrada\u00e7\u00e3o das clorofilas nas amostras (Lisec et al., 2006).

5.4.3.2. Determina\u00e7\u00e3o dos teores de fen\u00f3licos, a\u00e7\u00facares sol\u00faveis, amido e prote\u00ednas totais

Folhas completamente expandidas (4 $^\circ$ e 5 $^\circ$ n\u00f3s) e amostras de 5 cent\u00edmetros de raiz, obtidas a partir do \u00e1pice, foram coletadas, congeladas rapidamente em nitrog\u00eanio l\u00edquido e armazenadas a -80 $^\circ\text{C}$ em ultra freezer. As amostras foram liofilizadas por 72 horas, trituradas em moinho de bola e pesadas, obtendo-se al\u00edquotas de 15 mg, para an\u00e1lises de metab\u00f3litos. As al\u00edquotas foram extra\u00eddas, com uma mistura de metanol 100% (700 μL), clorof\u00f3rmio (375 μL) e \u00e1gua milli-Q ultrapura (750 μL) gerando duas fases, o sobrenadante, fase l\u00edquida, e o sedimento, fase s\u00f3lida. O sedimento foi lavado por tr\u00eas vezes com a mesma solu\u00e7\u00e3o de extra\u00e7\u00e3o

e ambos, sobrenadante e sedimento, foram armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento das análises (Lisec et al., 2006). O sobrenadante foi utilizado para a quantificação de compostos fenólicos e açúcares solúveis, enquanto o sedimento foi usado para quantificar amido e proteína total (Fernie et al., 2001). Os compostos fenólicos foram determinados pela metodologia de Folin-Ciocalteu de acordo com Sun et al. (2007). Os açúcares (glicose, frutose e sacarose) e o amido foram analisados como descrito por Stitt et al. (1989) e Daloso et al. (2015). As concentrações de proteínas totais foram quantificadas segundo Cross et al. (2006). Todas as medições foram realizadas em um leitor de microplacas VersaMax™ (Molecular Devices®).

5.4.4. *Abundância relativa de Al e de nutrientes nos tecidos*

Foram coletadas amostras de raiz (ápice, zona de alongamento e de ramificação); internódios do caule (1° entrenó do ápice para base em T0 e T0+500 e 3° entrenó do ápice para base em T0+500) e região mediana (lâmina foliar e nervura central) de folhas expandidas em T0 e T0+500 e de folhas em expansão em T0+500. As amostras foram fixadas em FAA 50% (Johansen, 1940) por 48h, desidratadas em série etílica ascendente e secas ao ponto crítico com CO_2 (CPD 030, BalTec, Balzers, Liechtenstein). Os fragmentos foram afixados em suportes metálicos e recobertos com carbono em evaporador Quórum (Q 150 T-E). As amostras de cada região da raiz foram dispostas e avaliadas longitudinalmente, sem a exposição dos tecidos internos desse órgão, enquanto os fragmentos de caules e de folhas foram dispostos e avaliados transversalmente, obtendo-se os valores relativos (em percentual) de cada elemento mineral avaliado em uma área composta por todos os tecidos internos desses órgãos. A abundância relativa (%) do alumínio (Al) e dos elementos: nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S), cobre (Cu), ferro (Fe), zinco (Zn) e manganês (Mn) foi obtida em microscópio eletrônico de varredura (1430 VP, LEO, Cambridge, Inglaterra) acoplado a um sistema de energia dispersiva (sonda de raio-X) no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV. Os valores de abundância relativa dos elementos minerais foram obtidos para cada órgão (raiz, caule e folha) através da média aritmética dos elementos em cada região dos órgãos.

5.4.5. *Análise de dados*

A normalidade e a homogeneidade dos dados foram analisadas pelos testes de Shapiro-Wilk e de Bartlett, respectivamente, ambos a 5 % de probabilidade. Em seguida, os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) por meio do teste F ($p < 0,05$). Quando significativas as características foram submetidas ao teste de Tukey ($p < 0,05$). Como análise complementar, a análise de componente principal (PCA) foi realizada usando os pacotes

‘FactoMineR’, ‘factoextra’ e ‘ggplot2’. A análise estatística dos dados foi realizada no SigmaPlot versão 11.0 e software R (R Development Core Team 2019), com protocolos desenvolvidos no mesmo.

5.5. Resultados

As plantas expostas ao Al (T0+500) apresentaram, após 1, 2 e 17 dias de cultivo com o metal, maior taxa de assimilação de carbono (A), a qual foi acompanhada de uma maior condutância estomática (g_s) e transpiração (E), quando comparadas as plantas T0 (Fig. 1a - c). Embora o Al tenha proporcionado o aumento nos valores de CO_2 intracelular (C_i) no primeiro e segundo dia após exposição ao elemento, não houve diferença significativa no C_i , entre plantas T0 e T0+500, 17 dias após adição do metal no cultivo (Fig. 1d). Não houve variações nos valores de eficiência do uso da água (EUA) entre os tratamentos para nenhum dos tempos de avaliação (Fig. 1e). Já a eficiência instantânea de carboxilação (EiC) em plantas T0+500 foi superior, em todos períodos de avaliação, àquelas crescidas na ausência do elemento (Fig. 1f). No tratamento com Al (T0+500), todos os parâmetros de trocas gasosas mantiveram valores constantes entre as três avaliações, enquanto no tratamento sem Al (T0) a A e a EiC apresentaram uma redução em seus valores no último tempo de medição (Fig. 1a, f).

O desempenho fotoquímico das plantas cultivadas com o Al (T0+500) foi maior do que aquelas cultivadas sem o metal (Fig. 2). No 1° e 2° dia após adição do Al na solução nutritiva foi observado um aumento nos valores da eficiência de excitação do PSII (Fv'/Fm') (Fig. 2b) e da taxa de transporte de elétrons (ETR) (Fig. 2e), seguidos pelo maior rendimento quântico efetivo do PSII (Φ_{PSII}) (Fig. 2f), em plantas T0+500, mantendo-se superiores a T0 até o último tempo de avaliação. Além disso, o Al elevou os valores da eficiência fotoquímica máxima (Fv/Fm) e do coeficiente de extinção fotoquímico (qP) em plantas T0+500, em relação a T0, somente ao final de 17 dias de cultivo com o metal (Fig. 2a, c). Já o maior coeficiente de extinção não fotoquímico (NPQ) foi observado em plantas T0 comparadas a T0+500 nos três tempos avaliados (Fig. 2d). Enquanto no tratamento com Al os parâmetros de fluorescência da clorofila a não variaram entre as mensurações (1, 2 e 17 dias após exposição ao Al), observou-se a queda dos valores de Fv/Fm e qP no tempo final de medição em plantas crescidas na ausência do metal (Fig. 2a, c).

As análises bioquímicas revelaram que a exposição ao Al no cultivo hidropônico, em geral, estimulou o metabolismo de plantas de *B. latifolia* (Fig. 3; Tabela 1), sem promover um incremento de compostos fenólicos (Tabela 1). Em plantas tratadas com Al ocorreu um aumento no teor de clorofilas a e b (Fig. 3a) e de clorofilas totais (Fig. 3b), não havendo diferença

significativa na razão *Chl a / Chl b* (Fig. 3c). A concentração de açúcares solúveis nas folhas foi semelhante para as plantas de ambos os tratamentos, enquanto o teor de glicose, frutose e sacarose foi, aproximadamente, o dobro nas raízes de plantas T0+500 em relação a T0 (Tabela 1). Entretanto, a concentração de amido na raiz de plantas tratadas sem Al foi maior do que nas plantas expostas ao metal, não diferindo estatisticamente para as folhas entre os tratamentos (Tabela 1), apesar de plantas T0 apresentarem 73% mais amido em suas folhas que plantas T0+500. Plantas T0+500 apresentaram um aumento na concentração de proteínas apenas nas folhas, sendo cerca de 1,5 vezes maior que a obtida em plantas crescidas na ausência do Al (Tabela 1). Independente do tratamento, os maiores valores determinados para todos os metabólitos avaliados foram obtidos nas folhas em relação a raiz, exceto os de fenólicos, que não diferiram entre os órgãos (Tabela 1).

A abundância relativa de Al exibiu um aumento considerável na raiz, no caule e na folha de plantas expostas ao metal (T0+500) com relação aquelas não expostas (T0), sendo em torno de duas vezes maior na raiz e no caule e 1,7 vezes a mais na folha (Tabela 2). Plantas crescidas sem Al (T0) apresentaram 2,2 vezes mais proporção relativa do metal na raiz do que no caule, não havendo diferença entre estes órgãos e a folha (Tabela 2). Já no tratamento com Al (T0+500), a proporção relativa de Al na raiz foi cerca de 1,7 vezes maior que no caule e folha deste tratamento (Tabela 2). Além disso, plantas crescidas na presença de Al apresentaram maiores porcentagens relativas de K na raiz e de S e Zn na folha, embora o percentual relativo de Zn na raiz tenha sido maior, assim como os de Cu e Fe, na ausência do metal (Tabela 2). Plantas cultivadas sem Al exibiram maiores porcentagens relativas de N, Mg, Cu na folha do que plantas T0+500. A abundância relativa de todos os elementos analisados não diferiu para o caule de ambos os tratamentos, bem como as proporções relativas de N, Mg e S na raiz, as de P, Ca e Mn na raiz e na folha e as de K e Fe na folha (Tabela 2). Quanto a distribuição dos elementos pelo corpo das plantas, observou-se que a abundância relativa de N, S e Mn, para ambos os tratamentos, não diferiram entre os órgãos, assim como observado para o Cu e Fe no tratamento T0+500 e para o K e Zn nas plantas T0 (Tabela 2). No entanto, a abundância relativa de P, Cu, Fe e Mg, em plantas T0, e a de P e Mg, em plantas T0+500, foi maior na raiz do que na folha e caule (Tabela 2). Já os percentuais relativos de Ca, em ambos os tratamentos, e os de K e Zn, no tratamento com Al (T0+500), foram maiores em órgãos aéreos do que na raiz, sendo os de Ca e K maiores no caule e os de Zn na folha (Tabela 2).

Com as duas primeiras dimensões (Dim) da análise de componente principal (PCA), explicando 66% da variação total dos dados na raiz (Fig. 4) e na folha (Fig. 5), observa-se a

formação de dois grandes grupos. O primeiro é formado, tanto na folha quanto na raiz, pela a abundância relativa de Cu, Zn, Mg, N e Mn, além dos teores de amido, e está associado ao cultivo das plantas sem Al (T0). Além disso, a abundância relativa de Fe na raiz (Fig. 4) e os parâmetros NPQ e EUA, juntamente com os teores de frutose e de sacarose na folha (Fig. 5), também se relacionaram a T0. Por outro lado, a abundância relativa de Al, S, K, Ca, além dos teores de proteínas e glicose, foram agrupados ao tratamento com Al (T0+500) em ambos os órgãos avaliados (Fig. 4 e 5). Os açúcares solúveis, principalmente a sacarose, associaram-se fortemente às raízes de plantas T0+500 (Fig. 4), enquanto os pigmentos fotossintetizantes, em especial a *Cl_a*, e os demais parâmetros de trocas gasosas (principalmente *A*) e de fluorescência da clorofila *a* foram mais relacionados às folhas desse mesmo tratamento. Apesar de mais fraca, a abundância relativa de Fe, P e o conteúdo de fenóis nas folhas foram relacionados às plantas T0+500 (Fig. 5).

5.6. Discussão

Estudos contemplando espécies acumuladoras de Al do cerrado submetidas a diferentes disponibilidades do metal são pouco numerosos (Haridasan, 1988, 2008; Cury et al., 2019; Rodrigues et al., 2019; Bressan et al., 2021), ainda mais em solução nutritiva, provavelmente pela dificuldade de cultivo dessas plantas. Este estudo é o primeiro relato dos mecanismos fisiológicos envolvidos na retomada do crescimento e do desenvolvimento de *B. latifolia* induzida pelo Al em cultivo hidropônico. Nossos resultados sugerem que o Al nos cloroplastos de *B. latifolia*, relatado em trabalhos anteriores (Castro, 2013; Souza-Fernandes, 2019; Capítulo 1), não apenas estimula o processo fotossintético, visto que houve um incremento rápido em quase todos os parâmetros de trocas gasosas (*A*, *g_s*, *E*, *C_i*, *E_iC*), como também é fundamental para mantê-lo em níveis adequados, o que foi evidenciado pela queda, aos 17 dias, dos valores de *A* e de *E_iC* (Fig. 1) no tratamento sem Al. Esses resultados relatados para plantas não expostas ao Al, em conjunto com os valores aumentados do conteúdo interno de CO₂ (*C_i*) no mesmo tempo de avaliação (Fig. 1d), evidenciam efeitos cumulativos de limitações bioquímicas no Ciclo de Calvin-Benson, como possíveis prejuízos gerados à enzima RuBisCo (Taiz e Zeiger, 2013).

Além disso, as baixas taxas de condutância estomática (*g_s*), acompanhados por baixos valores de assimilação de CO₂ (*A*), durante todo o experimento (Fig. 1a-c), na ausência de Al, revelaram uma limitação difusiva a fotossíntese nesse tratamento. Resultados semelhantes foram relatados para a hiperacumuladora de Al *Vochysia tucanorum* (Vochysiaceae), planta lenhosa de cerrado (Bressan et al., 2021). Esses autores sugeriram que as necroses das raízes de

V. tucanorum no cultivo sem Al estariam limitando a absorção de água e, conseqüentemente, o seu transporte para a folha, impondo um baixo estado de hidratação do mesófilo, o que levou ao fechamento estomático com redução da fotossíntese. O mesmo efeito pode estar ocorrendo em *B. latifolia* nesse estudo, ao passo que a necrose da raiz e de folhas foram descritas como sintomas à falta de Al (Capítulo 1), pressupondo um estado de déficit hídrico.

A adição do Al na solução nutritiva parece ter aumentado a energia de excitação para o processo de transporte de elétrons (*ETR*), mantendo mais centros de reação PSII em estado aberto, aumentando a capacidade de absorção da energia luminosa (aumento do Φ PSII) associada a maior síntese de clorofilas, reduzindo, simultaneamente, a susceptibilidade ao dano fotoinibitório em plantas T0+500. Na planta tolerante do cerrado *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae), o crescimento da raiz com 200 μ M de Al foi atribuído ao aumento do rendimento quântico efetivo do PSII em relação as plantas não expostas ao metal (Rodrigues et al., 2019).

As melhores propriedades fotoquímicas observadas no cultivo com Al confirmam que o aparato fotossintético das plantas nesse tratamento se encontrava em melhores condições que as de plantas não expostas ao metal (Figura 2). Por outro lado, observamos que o estresse causado pela falta de Al elevou a susceptibilidade de fotoinibição do PSII na última avaliação, com a diminuição da eficiência fotoquímica máxima (F_v/F_m) de 0,8, com 1 e 2 dias de medição, para 0,77, aos 17 dias, e com a redução do coeficiente de extinção fotoquímico (qP) (Fig. 2a, c). Apesar disso, a dissipação de energia em plantas de *B. latifolia* cultivadas sem Al se deu, preferencialmente, na forma de calor ao invés de fluorescência ou de fotodanos (Fig. 2). O coeficiente de extinção não fotoquímico (NPQ) é intimamente relacionado com o excesso de energia dissipada na forma de calor sob condições de estresse (Muller et al., 2001; Sasi et al., 2018), de modo que os elevados valores de NPQ nas plantas T0 sugerem que estas estavam sob estresse em virtude da falta de Al. Os mais altos valores do NPQ na ausência do Al podem estar relacionados as reduções da eficiência de excitação de PSII aberto (F_v'/F_m') e de qP (Fig. 2) comparado as plantas expostas ao metal. Essa mesma relação foi observada por Bressan et al. (2021) para *V. tucanorum*.

O efeito estimulante do Al na fotossíntese acompanhado pelo o aumento nas concentrações de clorofilas *a* e *b* (Fig. 3), o que refletiu no aumento do *ETR*, Φ PSII, F_v/F_m , F_v'/F_m' e qP , como ocorreu em *B. latifolia*, também foi relatado para espécies acumuladoras do metal do gênero *Camellia* sp. (Mukhopadyay et al., 2012, Hajiboland et al., 2013, Liu et al., 2020). Além disso, o surgimento de cloroses foliares parece ser comum em plantas de cerrado cultivadas sem Al (Haridasan 1988, 2008; Souza et al., 2017; Cury et al., 2019; Bressan et al.,

2021), indicando que a falta de Al no meio leva a degradação e compromete a biossíntese de pigmentos fotossintéticos, conforme observado neste estudo.

A fotossíntese elevada promoveu também o aumento na síntese de outros produtos do metabolismo primário em plantas de *B. latifolia* submetidas ao Al, como os açúcares solúveis na raiz e proteínas nas folhas (Tabela 1). A síntese aumentada de açúcares solúveis e de proteínas solúveis totais, tanto na raiz quanto nas folhas, fruto do estímulo da fotossíntese, foi observado em *Camellia japonica* (Theaceae), planta tolerante ao Al, expostas a diferentes concentrações de Al (500, 1000 e 2000 μM) com relação a 0 μM de Al (Liu et al., 2020). Em *Q. grandiflora*, o melhor aspecto das plantas no cultivo com Al foi associado aos teores de glicose e frutose na raiz, cerca de quatro vezes maiores que no cultivo sem Al, e de pigmentos fotossintéticos nas folhas (Cury et al. 2019). Moriyama et al. (2016), trabalhando com mudas de carvalho (*Quercus serrata*), indicaram a glicose como a principal substância envolvida no crescimento da raiz induzida por Al, através do aumento na atividade do nitrato redutase (NR) e ácido abscísico (ABA) em plantas expostas ao metal. Em nosso estudo todos os três açúcares (glicose, frutose e sacarose) parecem ter a mesma importância no processo de retomada do crescimento e o desenvolvimento de *B. latifolia* promovido pelo Al, visto que os seus teores dobraram no cultivo com o metal em relação ao cultivo sem o metal (Tabela 1), apesar dos maiores valores terem sido observados para a glicose. A sacarose é uma das principais fontes de energia para as células, sendo esse açúcar, juntamente com seus produtos de clivagem (glicose e frutose), moléculas essenciais ao metabolismo e regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas (Smeekens, 2000; León e Sheen, 2003; Gibson, 2005). Em contrapartida, os teores de amido na raiz foram maiores na ausência de Al (T0) do que na sua presença (T0+500), assim como foi descrito para *Q. serrata* em plantas tratadas com Ca e não expostas ao Al (Moriyama et al., 2016). Esse resultado diverge do observado em *E. dysenterica*, na qual o maior acúmulo de amido na raiz ocorreu na presença do Al com estímulo do crescimento do órgão (Rodrigues et al., 2019). Difícil explicar essa alteração provocada pelo Al no metabolismo de carboidratos nas raízes de *B. latifolia*, mas podemos supor que esse maior acúmulo de amido nas raízes de plantas T0, em comparação a T0+500, decorra da inibição do crescimento da raiz nesse tratamento (Capítulo 1), não havendo, assim, o consumo (hidrólise) dessa reserva energética. Portanto, estudos posteriores avaliando a atividade das enzimas amido sintetase e amilase, de forma simultânea aos aspectos avaliados neste trabalho, fazem-se necessários para compreender o processo de acúmulo de amido em raízes de plantas não expostas ao Al. Além disso, o acúmulo de amido observado nas folhas de plantas T0 (73%

maior em relação a T0+500), apesar de estatisticamente não significativo (Tabela 1), pode estar biologicamente associado aos baixos valores de K nas plantas desse tratamento. O K atua ativamente no co-transporte de açúcares, na forma de sacarose, dos tecidos fotossintetizantes (fonte) para os órgãos consumidores (dreno), como a raiz, de modo que a deficiência deste nutriente mineral leva ao acúmulo desses açúcares, na forma de grãos de amido, nos cloroplastos, o que promove a retroinibição da fotossíntese (Taiz e Zeiger, 2013).

Os compostos fenólicos atuam como antioxidantes em plantas sob estresse (Michalak, 2006) e têm sido apontados como importantes na tolerância ao Al de espécies nativas (Malta et al., 2016, Rodrigues et al., 2019) e não nativas (Mukhopadyay et al., 2012) do cerrado, ao promover a “desintoxicação” do elemento (Kochian et al., 2015). Ao contrário do relatado nessas literaturas, a síntese de compostos fenólicos (metabólito secundário) não foi afetada pelos tratamentos em *B. latifolia* (Tabela 1), apesar deste ter sido agrupado na PCA no tratamento com Al (Fig. 4 e 5). Isso reforça que o Al não é tóxico para *B. latifolia*, pelo contrário, os nossos resultados confirmam que o elemento é essencial, como foi sugerido anteriormente (Capítulo 1), ao metabolismo normal dessa espécie.

Embora a análise de abundância relativa (raios - X) não reflita, necessariamente, as concentrações dos nutrientes nos tecidos, esta pode informar os sítios de acúmulo do Al (Malta et al., 2016; Nogueira et al., 2019), indicar o padrão de distribuição dos elementos entre tecidos e órgãos (Malta et al., 2016) e expressar a relação entre os elementos. Essa análise revelou que a raiz é o órgão que apresenta a maior proporção relativa de Al em ambos os tratamentos (Tabela 2), evidenciando esse órgão como um importante sítio de acúmulo do elemento. Percentuais consideráveis de Al, maiores que os de muitos nutrientes (como por exemplo, os de K e de Mg), foram observados nos órgãos de plantas não expostas ao Al (T0), indicando a presença do metal nos tecidos, mesmo sendo usados para a análise de raios - X fragmentos de órgãos formados em hidroponia (sem Al). Isso nos permite inferir que houve uma redistribuição do Al, advindo do crescimento inicial em campo, de partes mais velhas para as mais novas das plantas. Segundo Zeng et al. (2013), a redistribuição do Al na planta pode ocorrer e ela se dá via floema.

A adição do Al na solução de plantas T0+500 promoveu o aumento na abundância relativa de Al, a qual foi acompanhada pelo aumento na abundância relativa de K na raiz, de S e de Zn na folha. A elevação da abundância relativa do K na raiz pode estar associada a melhora do sistema radicular em plantas expostas ao Al, através do aumento na atividade de enzimas (como sintases, quinases, transferases e redutases) envolvidas, principalmente, na conversão de açúcares em energia para o crescimento (Broadley et al., 2012). O incremento na proporção

relativa de S e Zn na folha, provavelmente, reflete a síntese aumentada de proteínas no tratamento com Al, já que estes nutrientes são fundamentais para a ocorrência desse processo, com o S participando da estrutura de aminoácidos e ligações dissulfídicas e o Zn regulando enzimas envolvidas no metabolismo do nitrogênio (Broadley et al., 2012, Taiz e Zeiger, 2013). Em contrapartida, houve a redução da abundância relativa de N, Mg e Cu na folha e de Zn, Cu e Fe na raiz das plantas após exposição ao Al (Tabela 2). O Al modulando as relações (proporções) entre os nutrientes, promovendo um equilíbrio destes nos órgãos de *B. latifolia*, pode ter contribuído, em parte, para as melhores respostas metabólicas nesse tratamento, visto que a toxicidade de outros metais (Cu, Zn, Mg, Fe) poderia estar atuando na ausência do Al (Bojórquez-Quintal et al., 2017; Muhammad et al., 2019). Nossos resultados diferem do descrito para a espécie de cerrado *Rudgea viburnoides* (Rubiaceae) em trabalho de campo, na qual a abundância relativa de nutrientes (Ca, Fe, N, P e S) não teve relação com a abundância relativa do Al nos tecidos (Malta et al., 2016), mostrando que as estratégias das espécies nativas ao Al são diversas e necessitam de mais investigação.

Por último, a análise de componentes principais (PCA) explicitou a relação entre o Al e os todos parâmetros fisiológicos e bioquímicos avaliados neste trabalho (Fig. 4 e 5), corroborando os resultados anteriores e a nossa hipótese de que o metal atua na fotossíntese. Propomos que o Al estimula a fotossíntese através do equilíbrio entre as proporções de nutrientes favorecendo a síntese de açúcares solúveis na raiz, fonte de energia utilizada no processo de retomada do crescimento e desenvolvimento de *B. latifolia*, e de proteínas nas folhas.

5.7. Conclusões

Nossos resultados sustentam a hipótese de que o Al atua na fotossíntese, exercendo um efeito estimulante, e que a retomada do crescimento e desenvolvimento de *Borreria latifolia* na presença do metal se dá, principalmente, com a melhora do aparato fotossintético, constituição e funcionamento, das plantas, proporcionando a síntese aumentada de fotoassimilados e de proteínas na folha e contribuindo para presença adequada de açúcares na raiz. Esse efeito positivo do Al sobre aspectos do metabolismo de *B. latifolia* foi relacionado a mudança na proporção relativa do Al no cultivo com o metal, cujo aumento afetou os percentuais de K (aumento), Fe (redução), Zn (redução) e Cu (redução) na raiz e os de S (aumento), Zn (aumento), N (redução), Mg (redução) e Cu (redução) na folha em relação ao cultivo sem Al. O Al nos cloroplastos, confirmado em trabalho anterior, estimulando a fotossíntese no presente

estudo pode ser assumido como uma adaptação de *B. latifolia* as elevadas concentrações de Al^{3+} presente nos solos ácidos do cerrado.

5.8. 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. *Environ. Exp. Bot.* 70, 37-42.

Araújo, S.A.C., Deminicis, B.B., 2009. Fotoinibição da Fotossíntese. *Ver. Bras. Biociênc.* 07, 463-472.

Bojórquez-Quintal, E., Escalante-Magaña, C., Echevarria-Machado, I., Martínez-Estévez, M., 2017. Aluminum, a friend or foe of higher plants in acid soils. *Front. Plant Sci.* 8, 1767.

Bremer, B., Eriksson, T., 2009. Time tree of Rubiaceae: Phylogeny and dating the family, subfamilies, and tribes. *Int. J. Plant Sci.* 170, 766-793.

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.

Bressan, A.C.G., de Oliveira Carvalho Bittencourt, BM, Silva, G.S., Habermann, G., 2021. Could the absence of aluminum (Al) impair the development of an Al-accumulating woody species from Brazilian savanna? *Theor. Exp. Plant Physiol.* 33, 281-292.

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.

Bustamante, M.M.C., Brito, D.Q., Kozovits, A.R., Luedemann, G., Mello, T.R.B., Pinto, A.S., Munhoz, C.B.R., Takahashi, F.S.C., 2012. Effects of nutrient additions on plant biomass and

diversity of the herbaceous-subshrub layer of a Brazilian savanna (Cerrado). *Plant Ecol.* 213, 795-808.

Castro, L.M.R., 2013. Anatomia e histolocalização de alumínio em espécies herbáceas e subarbustivas do cerrado. Dissertação, Universidade Federal de Viçosa - UFV, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Chandra, J., Keshavkant, S., 2021. Mechanisms underlying the phytotoxicity and genotoxicity of aluminum and their alleviation strategies: A review. *Chemosphere* 278, 130384.

Chenery, E.M., 1948. Aluminum in the plant world: I general survey in dicotyledons. *Kew Bull* 2, 173-183.

Clark, R.B., 1975. Characterization of phosphatase of intact maize roots. *J. Agric. Food Chem.* 23, 458-460.

Coutinho, L.M., 1990. Fire in the ecology of Brazilian Cerrado. In: Goldammer, J.G., (Ed.) *Fire in the Tropical Biota: ecological processes and global challenges*. Ecological Studies. Berlin: Springer-Verlang, 82-105.

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 Physiol.* 142, 1574-1588.

Cuenca, G., Herrera, R., Mérida, T., 1991. Distribution of aluminum in accumulator plants by X-ray microanalysis in *Richeria grandis* Vahl leaves from a cloud forest in Venezuela. *Plant Cell Environ.* 14, 437-441.

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 aluminum 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 CO₂ by both Rubisco and PEPcase while sucrose acts as a substrate during light-induced stomatal opening. *Plant Cell Environ.* 38, 2353-2371.

Delprete, P.G., Jardim, J.G., 2012. Systematics, taxonomy and floristics of Brazilian Rubiaceae: an overview about the current status and challenges. *Rodriguésia* 63, 101-128.

Feistler, A.M., Habermann, G., 2012. Assessing the role of vertical leaves within the photosynthetic function of *Styrax camporum* under drought conditions. *Photosynthetica* 50, 613-622.

Fernie, A.R., Roscher, A., Ratcliffe, R.G., Kruger, N.J., 2001. Fructose 2,6- biphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1- phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta* 212, 250-263.

Forzza, R.C., Leitman, P.M., Costa, A., Carvalho, A.A., Peixoto, A.L., Walter, B.M.T., Bicudo, C. et al., 2010. *Catálogo de plantas e fungos do Brasil*. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico.

Gibson, S.I., 2005. Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 93-102.

Hajiboland, R., Rad, S.B., Barceló, J., Poschenrieder C., 2013. Mechanisms of aluminum-induced growth stimulation in tea (*Camellia sinensis*). *J. Plant Nutrit. Soil Sci.* 176, 616-625.

Haridasan, M., 1982. Aluminum accumulation by some Cerrado native species in central Brazil. *Plant Soil* 65, 265-273.

Haridasan, M., 1988. Performance of *Miconia albicans* (sw.) Triana, an aluminum accumulating species, in acidic and calcareous soils. *Commun. Soil Sci. Plant* 19, 1091-1103.

Haridasan, M., 2008. Nutritional adaptations of native plants of the cerrado biome in acid soils. *Braz. J. Plant Physiol.* 20, 183-195.

Jansen, S., Broadley, M.R., Robbrecht, E., Smets, E., 2002. Aluminum hyperaccumulation in Angiosperms: A review of its phylogenetic significance. *Bot. Rev.* 68, 235-269.

Jansen, S., Dessein, S., Piesschaert, F., Robbrecht, E., Smets, E., 2000. Aluminum Accumulation in leaves of Rubiaceae: Systematic and phylogenetic implications. *Ann. Bot.* 85, 91-101.

Jaskowiak, J., Kwasniewska, J., Milewska-Hendel, A., Kurczynska, E.U., Szurman-Zubrzycka, M., Szarejko, I., 2019. Aluminum alters the histology and pectin cell wall composition of barley roots. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 3039.

Johansen, D.A., 1940. *Plant Microtechnique*. New York: McGraw Hill Book.

Kochian, L.V., Pineros, M.A, Liu, J., Magalhaes, J.V., 2015. Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum resistance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 66, 571-598.

León, P., Sheen, J., 2003. Sugar and hormone connections. *Trends Plant Sci.* 8, 110-116.

Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L., Fernie, A.R., 2006. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols* 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*. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 20, 1799-1809.

Maejima, E., Osaki, M., Wagatsuma, T., Watanabe, T., 2017. Contribution of constitutive characteristics of lipids and phenolics in roots of tree species in Myrtales to aluminum tolerance. *Physiol. Plant* 160,11- 20.

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.

Matsumoto, H., Riechers, D.E., Lygin, A.V., Baluska, F., Sivaguru, M., 2015. Aluminum signaling and potential links with safener-induced detoxification in plants. In: Panda, S.K. e Baluska, F. (eds). Aluminum stress adaptation in plants, Signaling and Communication in Plants 24. Springer International Publishing, Switzerland, 1-35.

Michalak, A., 2006. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. Pol. J. of Environ. Stud. 15, 523-530.

Moriyama, U., Tomioka, R., Kojima, M., Sakakibara, H., Takenaka, C., 2016. Aluminum effect on starch, soluble sugar, and phytohormone in roots of *Quercus serrata* Thunb. seedlings. Trees 30, 405-413.

Muhammad, N., Zvobgo, G., G-p, Z., 2019. A review: The beneficial effects and possible mechanisms of aluminum on plant growth in acidic soil. J. Integr. Agr. 18, 1518-528.

Mukhopadyay, M., Bantawa, P., Das, A., Sarkar, B., Bera, B., Ghosh, P., Mondal, T.K., 2012. Changes of growth, photosynthesis and alteration of leaf antioxidative defense system of tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] seedlings under aluminum stress. Biometals 25, 1141-1154.

Muller, P., Li, X.P., Niyogi, K.K., 2001. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. Plant Physiol. 125,1558-1566.

Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A.B., Kent, J., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature 403, 853-858.

Nguyen, N., Nakabayashi, K., Thompson, J., Fujita, K., 2003. Role of exudation of organic acids and phosphate in aluminum tolerance of four tropical woody species. Tree Physiol. 23, 1041-1050.

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.

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. *Trend Plant Sci.* 19, 399-407.

Olivares, E., Colonnello, G., Peña, E., Rodriguez, L., 2010. Aluminum accumulation in nineteen Melastomataceae species from three contrasting plant formations in acid soils. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 173, 453-460.

Oxborough, K., 2004. Imaging of chlorophyll a fluorescence: theoretical and practical aspects of an emerging technique for the monitoring of photosynthetic performance. *J. Exp. Bot.* 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.

Rao, I.M., Miles, J.W., Beebe, S.E., Horst, W.J., 2016. Root adaptations to soils with low fertility and aluminum toxicity. *Ann. Bot.* 118, 593-605.

Ribeiro, J., Walter, B.M.T., 2008. As principais fitofisionomias do Bioma Cerrado. In: Sano, S.M., Almeida, S.P., Riberio, J.F. (eds) *Cerrado: ecologia e flora*, 1ª ed. Brasília: EMBRAPA-Cerrados, 152-212.

Ribeiro, J.F., Walter, B.M.T., 1998. Fitofisionomias do bioma Cerrado. Pp. 87-167. In: Sano, S.M., Almeida, S.P. *Cerrado, Ambiente e flora*. Planaltina, EMBRAPA CPAC Dezzee, N., Chacón, N., Sano, J.A.E., Picón, G., 2004. Changes in soil properties and vegetation characteristics along a forest-savanna gradient in southern Venezuela. *Forest. Ecol. Manag.* 200, 183-193.

Rodrigues, A.A., Vasconcelos-Filho, S.C., Müller, C., Rodrigues D.A., Sales, J.F., Zuchi, J., Costa, A.C., Rodrigues, C.L., da Silva, A.A., Barbosa, D.P., 2019. Tolerance of *Eugenia dysenterica* to aluminum: Germination and plant growth. *Plants* 8, 317-331.

Rodrigues, A.A., Vasconcelos-Filho, S.C., Rodrigues, C.L., Sales, J.F., Vital, R.G., 2016. Influence of aluminum on root growth and of anatomy *Stenocalyx dysentericus* (DC.) O. Berg. Afr. J. Biotechnol. 15, 1193-1200.

Sasi, S., Venkatesh, J., Daneshi, R.F., Gururani, M.A., 2018. Photosystem II extrinsic proteins and their putative role in abiotic stress tolerance in higher plants. Plants-Basel 7, 100.

Silva, G.S., Gavassi, M., Nogueira, M.A., Habermann, G., 2018. Aluminum prevents stomatal conductance from responding to vapor pressure deficit in *Citrus limonia*. Environ. Exp. Bot. 155, 662-671.

Singh, S., Tripathi, D.K., Singh, S., Sharma, S., Dubey, N.K., Chauhan, D.K., Vaculík, M., 2017. Toxicity of aluminum on various levels of plant cell and organism: a review. Environ. Exp. Bot. 137, 177-193.

Smeekens, S., 2000. Sugar-induced signal transduction. Annu. Rev. Plant Phys. 51, 49-81.

Souza, M.C., Habermann, G., do Amaral, C.L., Rosa, A.L, Pinheiro, M.H.O., Da Costa, F.B., 2017. *Vochysia tucanorum* Mart.: an aluminum-accumulating species evidencing calcifuge behavior. Plant Soil 419,377-389.

Souza-Fernandes, D.P., 2019. O acúmulo de alumínio na parte aérea é comum em espécies herbáceas do Cerrado? Dissertação, Universidade Federal de Viçosa - UFV, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Stitt, M., Lilley, R.M., Gerhardt, R., Heldt, H.W., 1989. Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. Meth. Enzymol. 174, 518-552.

Sun, L., Zhang, M., Liu, X., Mao, Q., Shi, C., Kochian, L.V., Liao, H., 2020. Aluminum is essential for root growth and development of tea plants (*Camellia sinensis*). J. Integr. Plant Biol. 62, 984-997.

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.). J. Food Sci. 72, 98-102.

Taiz, L., Zeiger, E., 2013. Fisiologia vegetal. 5. Ed. Porto Alegre: ARTMED.

Zeng, Q.L., Chen, R.F., Zhao, X.Q., Shen, R.F., Noguchi, A., Shinmachi, F., Hasegawa, I., 2013. Aluminum could be transported via phloem in *Camellia oleifera* Abel. Tree Physiol. 33, 96-105.

Zhang, X.B., Liu, P., Yang, Y.S., Xu, G.D., 2007. Effect of Al in soil on photosynthesis and related morphological and physiological characteristics of two soybean genotypes. Bot. Stud. 48, 435-444.

Zhao, X.Q., Shen, R.F., 2018. Aluminum-Nitrogen interactions in the soil-plant system. Front. Plant Sci. 9, 1-15.

Zhou, J., Li, Z., Zhou, T., Zaijun, X., Wu, L., Luo, Y., Christie, P., 2020. Aluminum toxicity decreases the phytoextraction capability by cadmium/zinc hyperaccumulator *Sedum plumbizincicola* in acid soils. Sci. Total Environ. 711, 134591.

5.9. Tabelas e figuras

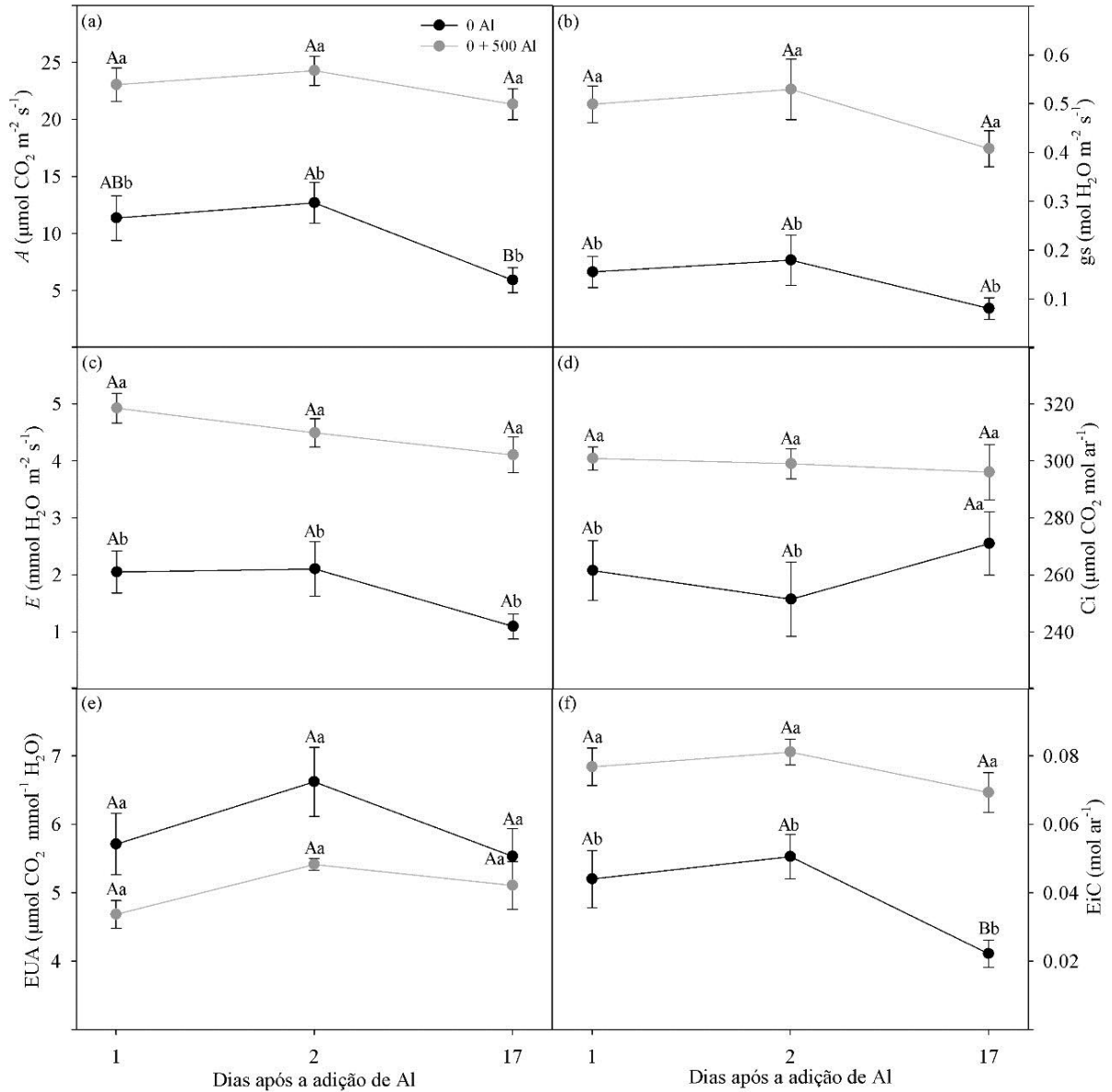


Figura 1: Parâmetros de trocas gasosas em plantas de *Borreria latifolia* cultivadas por 57 dias, em hidroponia, sem Al (0 μM) e com adição de Al (0 + 500 μM) após 40 dias sem Al. Análises realizadas em 1, 2 e 17 dias após adição de Al no cultivo. Taxa líquida de assimilação de carbono (A), condutância estomática (g_s), transpiração (E), carbono interno (C_i), eficiência do uso da água (EUA) e a eficiência instantânea de carboxilação (EiC). Média \pm erro padrão ($n = 5$). Letras minúsculas comparam os tratamentos dentro de um mesmo tempo de avaliação, enquanto letras maiúsculas comparam os tempos de avaliação dentro de um mesmo tratamento de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

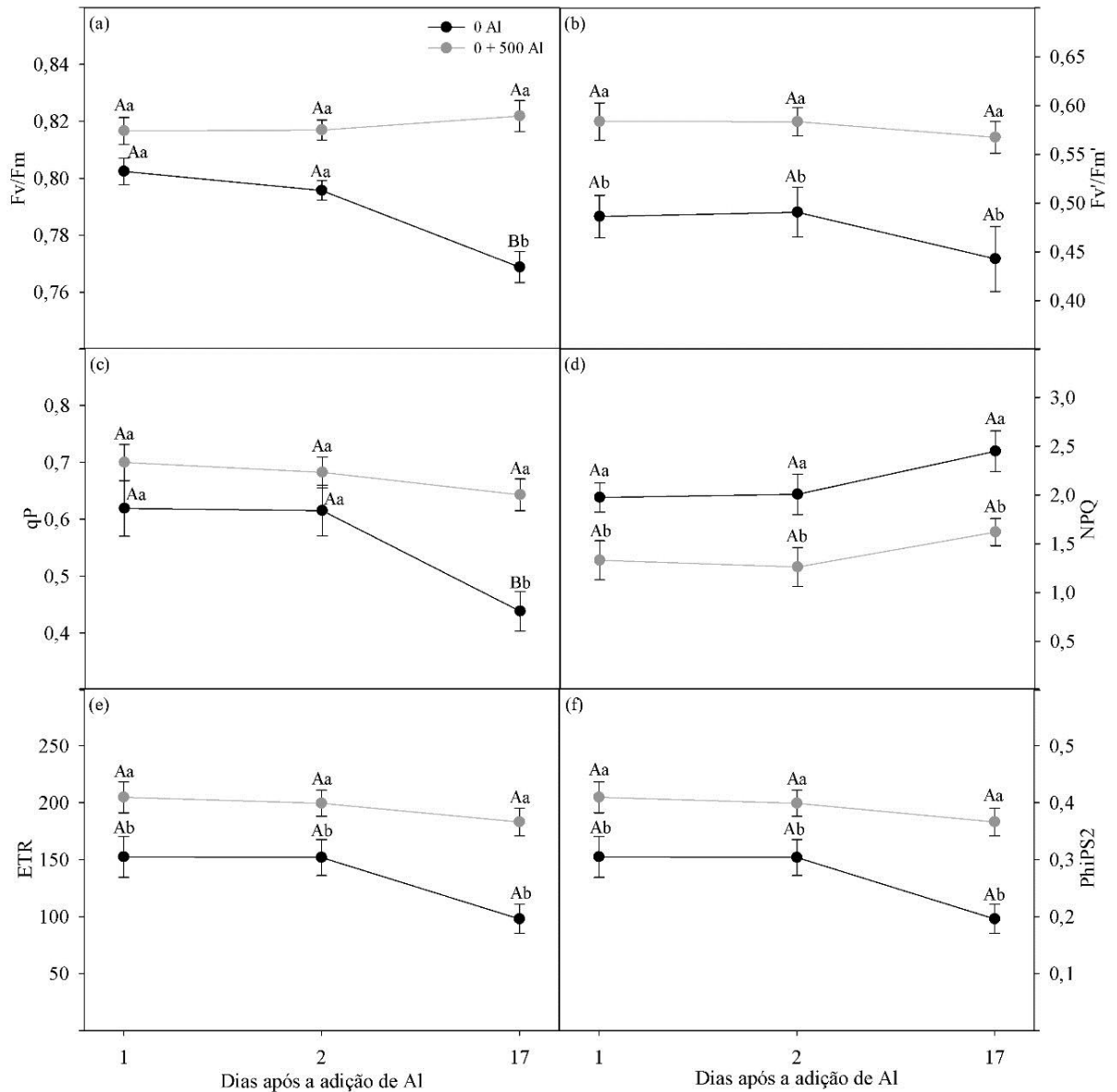


Figura 2: Parâmetros de fluorescência da clorofila *a* em *Borreria latifolia* cultivada por 57 dias, em hidroponia, sem Al (T0) e com adição de 500 μ M de Al após 40 dias sem Al (T0 + 500). Avaliações realizadas em 1 dia, 2 dias e 17 dias após adição de Al à solução. Fv/Fm - Eficiência fotoquímica máxima do PSII, Fv'/Fm' - eficiência de captura de excitação do PSII, qp - coeficiente fotoquímico, NPQ - coeficiente não fotoquímico, ETR - taxa linear de transporte de elétrons e PhiPS2 (Φ PSII) - rendimento quântico efetivo do PSII. Médias \pm erro padrão (n = 5). Letras minúsculas comparam os tratamentos no tempo de avaliação, enquanto letras maiúsculas comparam os tempos avaliados dentro de um tratamento de acordo com o teste de Tukey (p \leq 0,05).

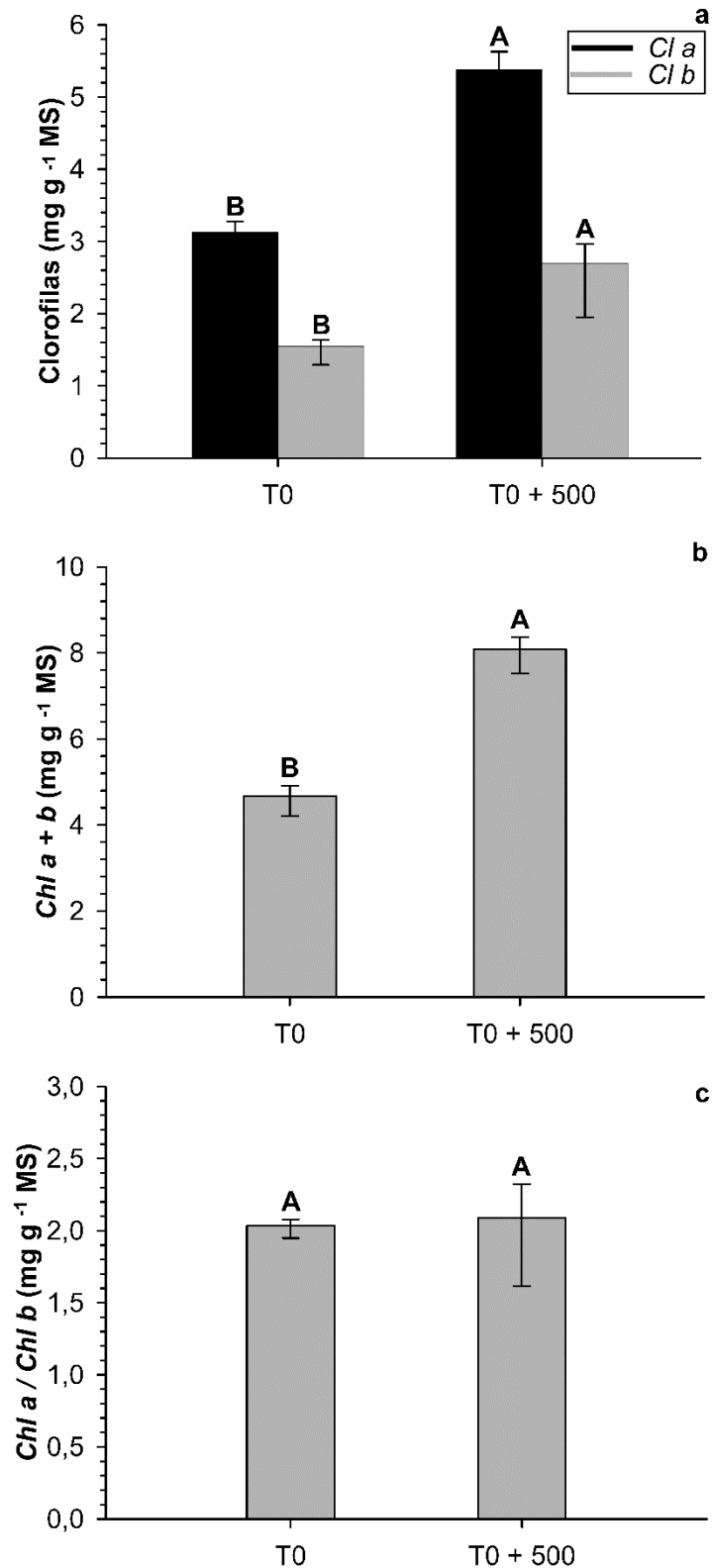


Figura 3: Teores de clorofila *a* e *b* em plantas de *Borreria latifolia* cultivadas por 57 dias, em hidroponia, sem Al (T0) e com adição de 500 μ M de Al após 40 dias sem Al (T0 + 500). A) teor de clorofila *a* e *b* (Chl). B) teor de clorofila total (Chl *a* + *b*). C) razão de clorofila *a* e *b* (Chl *a* / Chl *b*). Cada coluna representa a média \pm erro padrão ($n = 5$) e as letras indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 1: Concentrações de compostos fenólicos solúveis totais, açúcares solúveis (glicose, frutose e sacarose), amido e proteínas totais na raiz e na folha de *Borreria latifolia* cultivada por 57 dias, em hidroponia, sem Al (0) e com adição de Al 500 μ M de Al após 40 dias na ausência de Al (0+500 Al). Análise realizada 17 dias após adição de Al à solução.

Metabólitos	Tratamentos			
	Raiz		Folha	
	0 Al	0 + 500 Al	0 Al	0 +500 Al
Fenólicos (mg g⁻¹ MS)	8,9 aA \pm 2,21	10,8 aA \pm 2,50	11,1 aA \pm 2,20	15,4 aA \pm 3,18
Glicose (mmol kg⁻¹ MS)	41,0 bB \pm 2,26	84,2 aB \pm 1,29	175,5 aA \pm 37,36	180,7 aA \pm 19,33
Frutose (mmol kg⁻¹ MS)	35,9 bB \pm 0,49	68,7 aB \pm 1,86	326,6 aA \pm 43,55	246,3 aA \pm 0,96
Sacarose (mmol kg⁻¹ MS)	24,5 bB \pm 3,61	52,1 aB \pm 4,05	103,2 aA \pm 4,28	99,8 aA \pm 2,77
Amido (mmol kg⁻¹ MS)	39,2 aB \pm 4,19	20,0 bB \pm 4,92	897,9 aA \pm 122,93	519,0 aA \pm 131,86
Proteína (mg g⁻¹ MS)	6,1 aB \pm 0,83	6,8 aB \pm 0,44	14,3 bA \pm 0,70	20,6 aA \pm 0,97

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

Tabela 2: Abundância relativa (%) de Al e de outros elementos (N, P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe, Zn, Mn) na raiz, no caule e na folha de plantas de *Borreria latifolia* sem Al (T0) e com adição de 500 μM de Al após 40 dias na ausência de Al (0+500), detectada por microscopia eletrônica de varredura com sonda de raios-X (SEM-EDS) acoplada. Análise realizada ao final do experimento (57 dias).

Órgão	Tratamento	Al (%)	N (%)	P (%)	K (%)	Ca (%)	Mg (%)	S (%)	Cu (%)	Fe (%)	Zn (%)	Mn (%)
Raiz	0	6,1 aA \pm 0,62	34,1 aA \pm 2,66	10,5 aA \pm 1,35	1,3 bA \pm 0,24	18,3 aB \pm 0,50	3,9 aA \pm 0,42	12,5 aA \pm 1,17	5,6 aA \pm 0,74	5,3 aA \pm 1,24	2,3 aA \pm 0,57	0,26 aA \pm 0,02
	0+500	11,7 bA \pm 0,87	27,8 aA \pm 1,51	12,2 aA \pm 1,16	2,2 aA \pm 0,16	22,1 aC \pm 1,82	3,5 aA \pm 0,32	16,4 aA \pm 2,03	0,7 bA \pm 0,07	2,3 bA \pm 0,34	0,9 bAB \pm 0,06	0,26 aA \pm 0,02
Caule	0	2,8 aB \pm 0,89	28,2 aA \pm 7,88	3,2 aB \pm 0,99	0,6 aA \pm 0,22	35,1 aA \pm 5,48	1,9 aB \pm 0,57	24,3 aA \pm 5,81	1,5 aC \pm 0,66	0,8 aB \pm 0,27	1,4 aA \pm 0,43	0,20 aA \pm 0,04
	0+500	5,4 bB \pm 0,68	27,4 aA \pm 1,97	4,9 aB \pm 0,74	1,3 aB \pm 0,22	37,3 aA \pm 2,07	1,9 aB \pm 0,24	19,2 aA \pm 2,23	0,8 aA \pm 0,10	1,1 aA \pm 0,20	0,5 aB \pm 0,06	0,20 aA \pm 0,02
Folha	0	4,6 aAB \pm 0,81	39,6 aA \pm 1,21	4,9 aB \pm 0,43	1,1 aA \pm 0,12	26,9 aAB \pm 2,29	3,3 aAB \pm 0,21	12,7 bA \pm 1,83	3,3 aB \pm 0,13	0,9 aB \pm 0,13	0,3 bA \pm 0,1	0,2 aA \pm 0,06
	0+500	8,1 bB \pm 0,96	26,1 bA \pm 1,1	6,7 aB \pm 0,88	1,5 aAB \pm 0,26	30,3 aB \pm 1,66	2,0 bB \pm 0,26	21,5 aA \pm 1,9	1,3 bA \pm 0,37	1,3 aA \pm 0,35	1,2 aA \pm 0,3	0,2 aA \pm 0,04

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

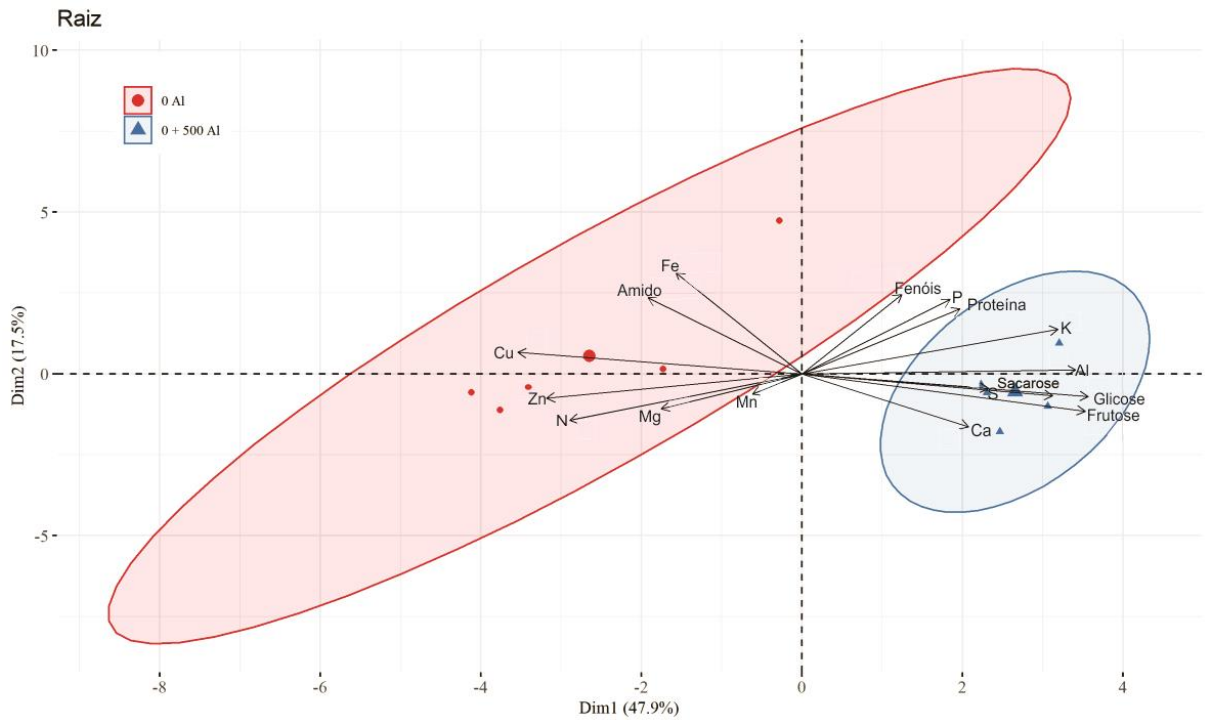


Figura 4: Análise de componentes principais (PCA) na raiz de plantas de *Borreria latifolia* cultivadas, em meio hidropônico por 57 dias, sem (T0) e com 500 μM de Al após 17 dias sem Al(T0+500). Os teores de fenóis, de açúcares, de amido e de proteínas, bem como a abundância relativa de Al e de nutrientes na raiz foram usados como variáveis nessa análise.

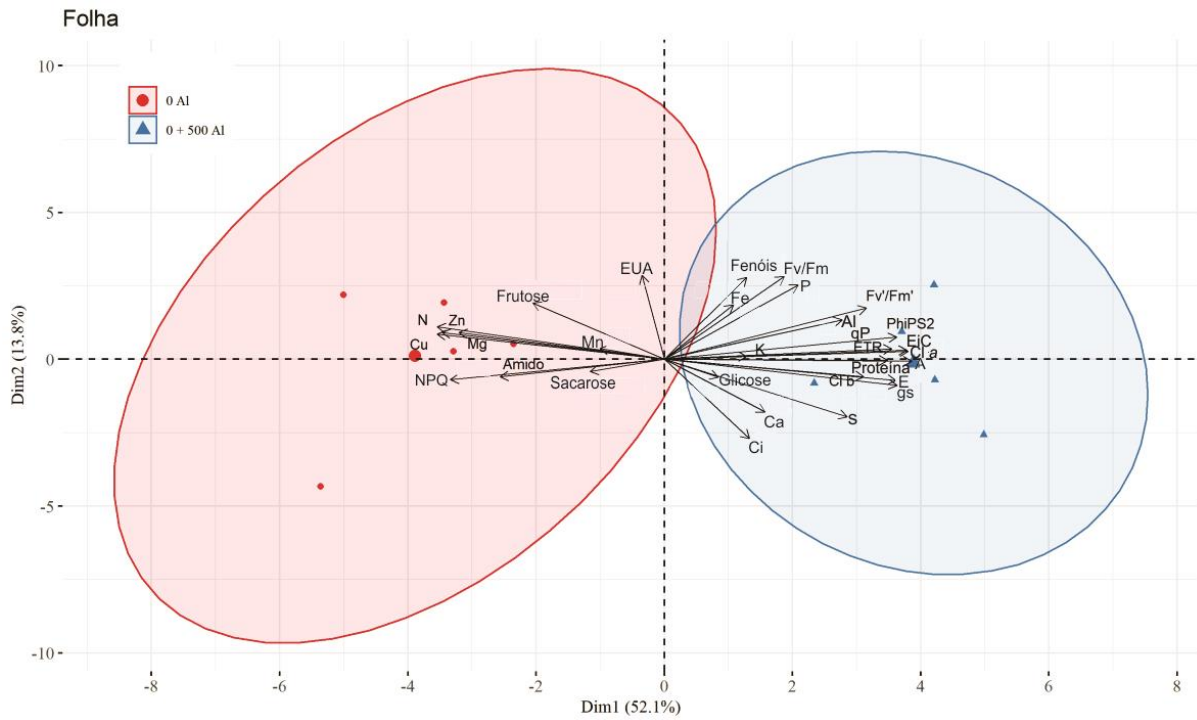


Figura 5: Análise de componentes principais (PCA) na folha de plantas de *Borreria latifolia* expostas a 0 μM e 0 + 500 μM de Al em solução nutritiva por 57 dias, usando os resultados de trocas gasosas e de fluorescência, os valores de clorofilas, fenóis, açúcares, amido e proteínas, além da abundância relativa de Al e nutrientes como variáveis.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O cultivo hidropônico permitiu um melhor entendimento das respostas de *B. latifolia* ao Al, entretanto sugerimos a realização de experimentos que testem diferentes concentrações do metal nesse meio (preferencialmente inferiores a empregada neste estudo), a fim de estabelecer a mais adequada ao crescimento desta espécie. Associado a isso, faz-se necessário a inclusão do tratamento: presença do Al do início ao fim do experimento para verificar aspectos morfoanatômicos e fisiológicos com intuito de corroborar a proposta da essencialidade do metal para *B. latifolia*. Ademais, coletas pontuais ao longo do experimento, como por exemplo, antes da aplicação das dosagens de Al e imediatamente após, principalmente para as análises nutricionais e estruturais (microscopia de luz, de varredura e de transmissão, utilizando-se um fixador de maior preservação, como a solução de Karnovsky), são fundamentais para a melhor compreensão da relação Al - nutrientes e da formação de gemas adventícias no processo de retomada do crescimento e do desenvolvimento. A realização de análises de regulação gênica, moleculares do DNA e do núcleo em células meristemáticas serão de extrema importância para certificar a função do Al em *B. latifolia*. Sugerimos também que protocolos que possibilitem o cultivo das plantas de *B. latifolia* em laboratório sejam desenvolvidos, a fim de obter uma matriz de plantas mais homogêneas para os próximos experimentos.