

IVANILSON LUCENA DA SILVA

**CONTRIBUIÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E
BIOQUÍMICAS NA RESISTÊNCIA AO ALUMÍNIO, EM DUAS ESPÉCIES DO
CERRADO**

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*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S586c
2019

Silva, Ivanilson Lucena da, 1990-
Contribuição das características estruturais e bioquímicas na
resistência ao alumínio, em duas espécies do cerrado / Ivanilson
Lucena da Silva. – Viçosa, MG, 2019.
x, 39 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Aristéa Alves Azevedo.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 31-36.

1. Plantas dos cerrados. 2. Epiderme. 3. Parede celular.
4. Fenóis. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Biologia Vegetal. Programa de Pós-Graduação em Botânica.
II. Título.

CDD 22. ed. 581.748

IVANILSON LUCENA DA SILVA

**CONTRIBUIÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E
BIOQUÍMICAS NA RESISTÊNCIA AO ALUMÍNIO, EM DUAS ESPÉCIES DO
CERRADO**

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

APROVADA: 21 de Março de 2019

Cleberon Ribeiro
(Co-orientador)

Evaristo Mauro de Castro

Kacilda Naomi Kuki

Luzimar Campos da Silva

Aristéa Alves Azevedo
(Orientadora)

Dedico essa Tese a minha mãe, Lourdes, e ao meu irmão, Adriano.

“... O tempo vai na frente, nem espera
E eu já nem sou quem eu era
Nem deu pra notar
Meu balão vai voar...”
(Siba)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por esse bem tão precioso que é a vida e por ter conseguido finalizar mais essa etapa em minha carreira acadêmica.

À minha família e, em especial, à minha mãe (Lourdes) e a meu irmão (Adriano), por terem me conduzido, mesmo antes de entender o motivo, para esse caminho que me fez ser quem sou.

Ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal de Viçosa, ao CNPq e à Capes pela oportunidade e suporte financeiro para realizar esse trabalho.

À professora Aristéia, não só pela orientação deste trabalho, mas pela pessoa, pelos ensinamentos e pelo exemplo de profissional que é; com quem tive o privilégio de conviver durante esses seis anos de pós-graduação.

Ao professor Cleberson e à Dra. Kacilda por todas as contribuições e ideias para a realização deste trabalho.

Aos funcionários da FLONA de Paraopeba, pelo suporte e boa vontade sempre que precisávamos ir à campo fazer coleta do material.

Ao professor Fábio da Matta e Wagner Araújo por ceder espaço em seus laboratórios para que parte das análises deste trabalho fossem realizadas.

Ao Toninho Cordeiro, pela disposição em sempre separar alguns litros de nitrogênio líquido para que pudesse fazer a coleta e o processamento do material.

Aos professores e funcionários do Departamento de Biologia Vegetal da UFV, em especial aos da Botânica, com quem aprendi e convivi durante esses seis anos.

Aos funcionários do Núcleo de Microscopia e Microanálises da UFV, pelo auxílio com as análises do material em microscopia eletrônica de varredura, em especial ao Gilmar, o qual agradeço também pelos bons papos, boas músicas e boas piadas que sempre trocamos, principalmente na velha Paraopeba.

À Aurora e a Rosana por ajudar sempre que necessário, com a parte de laboratório, e também pelos bons papos de cafezinho.

Ao Alvinho e a Luzimar, por sempre me receber de portas abertas em casa e com quem dividi bons momentos durante minha estadia em Viçosa.

Ao grupo do seletão (Ana Lu, Ana Paula, Cristiele, Luana, O Jovem, Guidoal, Katiuscia) pelos momentos de descontração que tornaram Viçosa “mais leve”.

À minha amiga Brenda, por toda a ajuda que me deu nesse trabalho (tanto em campo quanto em laboratório) e pelos momentos de descontração que tivemos durante nossa convivência dentro e fora da UFV.

Ao Gustavo, Pedrão e Fernando colombia, a velha guarda da terça concreta; sempre que nos encontrarmos tenho certeza que a proza vai ser daquele jeito.

À minha amiga Luana, pelo companheirismo e alegria que sempre teve e, mais ainda, por estar do meu lado na minha indigesta hospedagem de cinco dias no Hospital São Sebastião.

Ao Jovem, por toda a cumplicidade nesses anos de convivência e por todos aqueles cafezinhos lá na BBT, o qual iremos repetir futuramente com conversas muito mais leves.

Aos irmãos mais novos de república, Michel e Caian, pelos bons momentos de descontração que tivemos.

Aos irmãos mais velhos de república, Colombia e Mucuri, que apesar da ausência física, estão o mesmo papel de embrulhar prego; agradeço a oportunidade de ter convivido com vocês.

À Guidoal, essa fuleragem que tá aí já há uns seis anos enchendo o saco; mas tinha mesmo que ter sangue pernambucano nas veias pra termos tido essa cumplicidade que vai ser levada pra vida; esse é “10ano”.

A turma do Bar do Tony, especialmente Tony e Luzia, onde tive a oportunidade de conhecer um pouco mais de Viçosa pela lente dos nativos; voltarei para comer a feijoada da sexta-feira.

Às amigas Regiane e Michele, por todos os churrascos e forró que compartilhamos desde aquela primeira semana do fazendeiro.

A turma da padaria unida: Jacão, João Paulo, Cida, Marlene, Geraldão e os colegas que lá conheci: João Dentista, João Bosco, Mauro Pintor, o Doutor e tantos outros pelos papos descontraídos.

À Maria, por todas as conversas, apoio e carinho nesses anos de convivência.

Aos amigos de UFV: Laris, Dani, Tiago, Flau, Formigão e tantos outros que tive a oportunidade de conhecer nessa instituição.

Aos velhos amigos do Recife: Tonho, Cabilera, Quino, Inácio, Maga, Cuia, Bequinho, André vovô, Luiz Carlos, Leli, Ivaldo, Marco, Diogo Régis que, mesmo distante, fizeram-se presente nesses anos.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS.....	4
Área de estudo e material vegetal	4
Anatomia e histoquímica.....	4
Determinação dos fenóis totais	6
Mapeamento e abundância de Al em tecidos foliares	6
Quantificação do Al e nutrientes na parte aérea	7
Extração de metabólitos	7
Determinação de aminoácidos totais.....	7
Determinação de proteína.....	8
Extração e determinação de pigmentos fotossintetizantes	8
Análises estatísticas.....	8
RESULTADOS	9
Mapeamento, abundância relativa e quantificação de Al e nutrientes em tecidos foliares	9
Anatomia, histoquímica e micromorfometria foliar	10
Aminoácidos totais e proteínas	12
Pigmentos fotossintetizantes.....	13
DISCUSSÃO	13
REFERÊNCIAS	31
ANEXOS.....	37
CONSIDERAÇÕES FINAIS	39

RESUMO

SILVA, Ivanilson Lucena da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2019. **Contribuição das características estruturais e bioquímicas na resistência ao alumínio, em duas espécies do cerrado.** Orientadora: Aristéa Alves Azevedo.

A despeito da presença de alumínio (Al) nos solos, as plantas do cerrado apresentam estratégias mitigadoras dos efeitos nocivos deste metal que é tóxico para a maioria das plantas. Boa parte das informações sobre as espécies do cerrado se referem a plantas que acumulam grande concentração de Al na parte aérea as quais estão distribuídas especialmente nas famílias Rubiaceae, Vochysiaceae e Melastomataceae. Este estudo objetivou avaliar as características estruturais e bioquímicas envolvidas na resistência ao Al em espécie acumuladora de Al *Symplocos nitens* (Symplocaceae) e compará-las com as de *Pera glabrata* (Peraceae) espécie não acumuladora de Al. Para tanto, plantas foram coletadas em uma área do cerrado *sensu strictu*, sob Latossolo Amarelo, na Floresta Nacional (FLONA) de Paraopeba. Foram realizadas análises anatômicas, nutricionais e bioquímicas de folhas de primeiro, terceiro e quinto nós de ambas as espécies. Apesar de algumas semelhanças qualitativas, como mesófilo dorsiventral, folhas hipostomáticas e presença de idioblastos contendo drusas na lâmina foliar, as folhas de *P. glabrata* e *S. nitens* diferem em parâmetros quantitativos, especialmente em folhas de terceiro e quinto nós. A diferença mais marcante foi a espessura da parede periclinal externa das células epidérmicas, que chega a ser até duas vezes mais espessa em folhas de *S. nitens* que em *P. glabrata*. Por outro lado, a espessura da cutícula propriamente dita e parênquima paliçádico é maior em folhas de *P. glabrata*. O Al se concentra principalmente nas células epidérmicas e do colênquima em folhas de *S. nitens*, ocorrendo maior concentração desse elemento nas folhas do quinto nó, com elevados teores relativos do metal nas células epidérmicas. Em *P. glabrata* o baixo teor de Al não foi alterado entre as folhas dos diferentes estádios de desenvolvimento. Apesar de não acumular Al, *P. glabrata* translocou pequena quantidade do metal para suas folhas e, pelo mapeamento com EDS, foi possível observar uma sobreposição com o Si, indicando um possível papel desse elemento na detoxificação do Al que é translocado para a parte aérea dessa planta. Os compostos fenólicos apresentam distribuição mais homogênea entre os tecidos foliares de *P. glabrata* e mais concentrada na epiderme em *S. nitens*. O teor desses compostos só variou nas folhas jovens de *P. glabrata*, onde foi maior, sugerindo um papel anti-herbivoria importante nessa espécie. Em folhas jovens de *S. nitens* não foi verificada essa diferença e, nessa espécie, sugerimos que os compostos fenólicos presente nas células

epidérmicas pode também atuar na resistência, agindo como um agente quelante do metal. O padrão de acúmulo dos macronutrientes é similar entre as espécies, a exceção do N, cuja concentração é muito maior em folhas jovens de *P. glabrata*, e o Ca com maior concentração em folhas jovens de *S. nitens*. Dada a grande quantidade desse elemento em folhas jovens de *S. nitens*, sugerimos que o Ca também pode estar envolvido na detoxificação do Al nessa espécie. A concentração de aminoácidos foi maior em folhas de primeiro nó de ambas as espécies, embora a concentração de proteínas não tenha variado entre as folhas de *S. nitens*. Em relação aos pigmentos fotossintetizantes, folhas de *P. glabrata* investem em carotenoides enquanto as de *S. nitens* em clorofila *b*, indicando diferentes formas de proteção do aparato fotossintético contra o excesso de radiação luminosa. Nossos resultados corroboram o que tem sido verificado em outros estudos e mostram que as maiores concentrações de Al em *S. nitens* são encontradas em folhas mais velhas. Acreditamos que esse padrão de distribuição esteja intimamente relacionado com a espessura da parede celular das células epidérmicas de *S. nitens*, em especial das camadas cuticulares, que aumenta consideravelmente a medida que a folha envelhece e atua como sítio preferencial de acúmulo do metal. Confirmamos o caráter não acumulador de *P. glabrata* e, uma vez que a concentração de Al não variou entre as folhas, sugerimos que essa espécie utiliza um eficiente mecanismo de exclusão de Al em suas raízes, que precisa ser melhor compreendido.

ABSTRACT

SILVA, Ivanilson Lucena da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2019. **Contribution of the structural and biochemical characteristics in the resistance to aluminum in two species of the cerrado.** Advisor: Aristéa Alves Azevedo.

Despite the presence of aluminum (Al) in soils, cerrado plants present strategies that mitigate the harmful effects of the metal that is toxic to most plants. Much of the information on cerrado species refers to plants that accumulate high concentration of Al in the aerial part, which are distributed especially in the families Rubiaceae, Vochysiaceae and Melastomataceae. This study aimed to evaluate the structural and biochemical characteristics involved in resistance to Al in accumulating species of *Al Symplocos nitens* (Symplocaceae) and to compare them with those of *Pera glabrata* (Peraceae) non Al accumulating species. For that, plants were collected in an area of the cerrado sensu strictu under Yellow Latosol in the National Forest of Paraopeba. Anatomical, nutritional and biochemical analyzes of first, third and fifth nodes of both species were performed. In spite of some qualitative similarities, such as dorsiventral mesophyll, hypostomatic leaves and presence of druid-containing idioblasts on the leaf blade, *P. glabrata* and *S. nitens* leaves differ in quantitative parameters, especially in third and fifth node leaves. The most striking difference was the thickness of the external periclinal wall of the epidermal cells, which is up to twice as thick in leaves of *S. nitens* as in *P. glabrata*. On the other hand, the thickness of the cuticle and palisade parenchyma is greater in leaves of *P. glabrata*. Al is mainly concentrated in the epidermal cells and the colenchyma in leaves of *S. nitens*, occurring higher concentration of this element in the leaves of the fifth node, with high relative contents of the metal in the epidermal cells. In *P. glabrata* the low Al content was not altered between the leaves of the different stages of development. In spite of not accumulating Al, *P. glabrata* translocated small amount of the metal to its leaves and, through the mapping with EDS, it was possible to observe an overlap with the Si, indicating a possible role of this element in the detoxification of the Al that is translocated to the aerial part of this plant. The phenolic compounds present a more homogeneous distribution between *P. glabrata* leaf tissues and more concentrated in the epidermis in *S. nitens*. The content of these compounds varied only in young leaves of *P. glabrata*, where it was higher, suggesting an important anti-herbivory role in this species. In young leaves of *S. nitens* this difference was not verified and in this species we suggest that the phenolic compounds present in the epidermal cells may also act on the resistance acting as a chelating agent of the metal. The pattern of macronutrient

accumulation is similar among species, with the exception of N, whose concentration is much higher in young leaves of *P. glabrata*, and Ca with higher concentration in young leaves of *S. nitens*. Given the large amount of this element in young leaves of *S. nitens*, we suggest that Ca may also be involved in the detoxification of Al in this species. The concentration of amino acids was higher in first node leaves of both species, although the concentration of proteins did not vary among the leaves of *S. nitens*. In relation to the photosynthetic pigments, leaves of *P. glabrata* invest in carotenoids whereas those of *S. nitens* in chlorophyll *b*, indicating different forms of protection of the photosynthetic apparatus, counts the excess of light radiation. Our results corroborate with what has been verified in other studies, and show that the highest concentrations of Al in *S. nitens* are found in older leaves. We believe that this pattern of distribution is closely related to the thickness of the cell wall of epidermal cells of *S. nitens*, especially the cuticular layers, which increases considerably as the leaf ages and acts as the preferred site of accumulation of the metal. We confirmed the non-accumulating character of *P. glabrata* and, since the concentration of Al did not vary between leaves, we suggest that this species uses an efficient mechanism of Al exclusion in its roots, which needs to be better understood.

INTRODUÇÃO

O cerrado é o segundo maior domínio do Brasil, com uma área aproximada de 2 milhões de km², ocupando principalmente a região central do país (Ratter et al. 1997). Sua flora é composta por espécies herbáceas, arbustivas e arbóreas que juntas formam um mosaico vegetacional característico desse ambiente (Coutinho 1978). Dentre os vários fatores que determinam a distribuição dessas espécies está o solo, com peculiaridades físico-químicas limitantes ao desenvolvimento de diversas plantas (Ribeiro e Walter 2008). Uma das principais características edáficas do cerrado é a baixa saturação de bases e a elevada saturação de alumínio (Al) (Dias 1996, Lopes e Cox 1977).

A disponibilidade de formas tóxicas do alumínio (Al) em solos ácidos restringe o crescimento de diversas espécies sensíveis (Vitorello et al. 2005). Algumas plantas, no entanto, recorrem a estratégias que mitigam esse dano, sendo por isso consideradas resistentes ao metal. Essas estratégias envolvem a exclusão, onde a absorção de Al pelas raízes é reduzida, e a tolerância interna, na qual o Al é absorvido e compartimentalizado nas células em formas metabolicamente inativas (Kochian et al. 2015). Ezaki et al. (2013) verificaram uma combinação desses mecanismos em uma espécie de Poaceae, evidenciando que esses mecanismos não são mutuamente excludentes e ocorrendo em conjunto podem aumentar a capacidade das plantas em resistir aos efeitos tóxicos do Al.

Esforços vem sendo feitos na tentativa de melhor esclarecer as respostas das plantas ao Al (Poschenrieder et al. 2015). Não obstante, as plantas nativas do cerrado carecem de estudos que buscam entender as características morfofisiológicas envolvidas na resistência ao Al. As informações existentes sobre as adaptações das plantas nativas do cerrado aos elevados teores de Al no solo se referem, principalmente, às espécies acumuladoras deste metal (Haridasan 1982, Andrade et al. 2011, Bressan et al. 2016, Malta et al 2016). Essas plantas são assim classificadas por apresentarem mais de 1000 mg.kg⁻¹ de Al na parte aérea, conforme critério proposto por Chenery (1948). Entre as famílias botânicas que apresentam representantes com a capacidade de acumular esse elemento na parte aérea estão: Rubiaceae, Vochysiaceae, Melastomataceae, Myrtaceae e Loganiaceae (Cuenca et al. 1991, Jansen et al. 2002). Levantamentos fitossociológicos realizados no cerrado têm demonstrado que tanto as espécies acumuladoras quanto as não acumuladoras de Al compartilham das mesmas condições edáficas, muitas vezes competindo fortemente pelos recursos disponíveis (Andrade et al. 2002).

A Floresta Nacional (FLONA) de Paraopeba é uma área de cerrado com cerca de 200 hectares, distando 103 km de Belo Horizonte. Há alguns anos, essa área vem despertando o interesse de pesquisadores de diversas áreas, notavelmente os botânicos, que buscam entender um pouco mais da ecologia, anatomia e fisiologia das plantas ocorrentes na região (Nascimento 2011, Tolentino 2011, Miranda-Guevara 2015, Santana 2017). Já se sabe, por exemplo, que as diferentes formações vegetais do cerrado da FLONA estão relacionadas com classes de solos distintas (Neri 2007). As formações de cerradão (mesotrófico e distrófico) estão associadas com o Latossolo Vermelho, o cerrado *s.s* denso está associado com Latossolo Vermelho-Amarelo e o cerrado *s.s* está associado com Latossolo Amarelo e Cambissolo.

No cerrado *s.s* sobre Latossolo Amarelo, Neri (2007) registrou a ocorrência de diferentes espécies, algumas das quais reconhecidamente acumuladoras de Al, como *Miconia albicans* e *Salvertia convallariodora*. Além dessas, *Pera glabrata* se destaca entre aquelas espécies de maior abundância e, até o momento, não há registros do acúmulo de Al nos órgãos vegetativos dessa planta. Um teste realizado em campo com um marcador específico para Al indicou o caráter não acumulador de *P. glabrata*. Por outro lado, *Symplocos nitens*, que também ocorre na área de cerrado *s.s* sobre Latossolo Amarelo, foi caracterizada como espécie acumuladora de Al por Carvalho-Júnior (2012). De fato, a família Symplocaceae é constituída por espécies acumuladoras do metal. Em um estudo recente, Schmitt (2016) destacou a capacidade das espécies do gênero *Symplocos* em estocar grandes quantidades de Al em diferentes órgãos vegetativos, o que desperta a curiosidade em entender os mecanismos envolvidos na resistência dessas plantas ao metal.

O principal foco dos trabalhos desenvolvidos com espécies acumuladoras têm sido a histolocalização do Al nos diferentes órgãos. O elemento se liga preferencialmente às paredes pecto-celulósicas em tecidos como epiderme, colênquima, parênquima e floema (Haridasan 1982, Andrade et al. 2011, Malta et al. 2016) sem que isso interfira no metabolismo dessas plantas. Porém, pouca atenção tem sido dada as diferenças estruturais entre as espécies como espessura de parede celular, número de camadas de tecidos entre outras, que podem permitir uma maior ou menor superfície de contato ao Al. Também são escassas informações que dizem respeito a relação entre a idade da folha e a concentração de metal acumulado pela planta. Uma vez que o Al segue a rota de transpiração (Shen e Ma 2001), é de se esperar que folhas mais velhas apresentem maiores concentrações, dada a maior atividade fisiológica e tecidos totalmente diferenciados.

Determinar os sítios de acúmulo do Al nos diferentes tecidos das plantas é extremamente útil, uma vez que a partir da sua localização é possível inferir sobre as estratégias de resistência ao metal utilizadas por essas plantas. No entanto, é preciso atentar para as limitações e diferenças que podem surgir quando utilizadas as diferentes técnicas para esse fim. O uso de corantes para marcar o Al nos tecidos é bastante utilizado, mas diferentes corantes costumam detectar sítios diversos, sem contar que o modo de processamento do material vegetal também pode interferir no resultado final (Carvalho-Júnior 2012). A utilização de outras técnicas para detecção de Al em plantas de cerrado, como a microenergia dispersiva por raio X (EDS) vem se mostrando uma eficiente ferramenta complementar aos tradicionais testes histoquímicos (Bressan et al. 2016, Malta et al. 2016)

Embora o acúmulo de Al na parte aérea seja um fato para algumas espécies de cerrado, essa não é a única estratégia utilizada por essas plantas, visto que um grande número de espécies não acumula o metal e a variedade de respostas que as espécies cultivadas apresentam quando expostas ao Al. Em muitas espécies, a quelação do Al com ácidos orgânicos, bem como um eficiente aparato de defesa antioxidante são bons indicativos de resistência ao Al (Barceló e Poschenrieder 2002, Kochian et al. 2015). Embora não sendo tão eficiente quanto os ácidos orgânicos na quelação do Al, os compostos fenólicos desempenham um papel importante tanto no meio extra quanto intracelular em várias espécies. Malta et al. (2016) demonstraram a sobreposição de compostos fenólicos com sítios de acúmulo do Al em *R. viburnoides*, sugerindo um papel importante desse metabólito na detoxificação do metal.

A manutenção do *status* nutricional das plantas de Cerrado parece ser uma característica adicional de resistência, visto que em espécies nativas o Al não altera a absorção de elementos como Ca, Mg, K, N (Haridasan 2008). Contrariando o que se verifica em espécies cultivadas, algumas nativas parecem depender do Al para se desenvolver. Em um estudo realizado com *Miconia albicans* (Melastomataceae), Haridasan (1988) verificou que em solos calcários a espécie apresentava sintomas de deficiência nutricional e redução de crescimento, que logo eram revertidos quando da transferência para solos ácidos, o que sugere um papel essencial do Al no metabolismo dessa planta. Dessa forma, é necessário entender melhor a relação nutricional das espécies de cerrado com diferentes estratégias de resistência ao Al.

O fato de que nas espécies não acumuladoras de Al não ocorre a translocação de quantidades significativas do metal para a parte aérea, sugere que essas plantas devem

possuir mecanismos que diminuem ou impedem a absorção do elemento pelas raízes. Porém, esses mecanismos devem ser melhores investigados nessas plantas. A liberação de ácidos orgânicos pelas raízes tem sido observada em um grande número de espécies (Zheng et al. 1998, Morita et al. 2011) e, por isso, é considerada um dos principais mecanismos de exclusão ao Al. No entanto, alguns estudos destacam a ação dos compostos fenólicos (Poschenrieder et al. 2008) e do aumento na produção de mucilagem como mecanismo de exclusão.

Objetivando lançar luz sobre as estratégias adaptativas de *Symplocos nitens* às condições de Al no solo do cerrado, este estudo propõe comparar as características estruturais e bioquímicas desta espécie com as de *Pera glabrata*, que não acumula Al em seus tecidos. Para isso, procuramos responder as seguintes questões: i – existe uma relação positiva entre a idade da folha e a concentração de Al acumulada?; ii – existem diferenças estruturais entre as folhas de *P. glabrata* e *S. nitens* que proporcionam o maior acúmulo do Al? iii – O teor de compostos fenólicos está associado à quantidade de Al acumulado?

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo e material vegetal

Este estudo foi realizado na Floresta Nacional de Paraopeba (FLONA-Paraopeba), localizada na cidade de Paraopeba-MG (19°20'S, 44°20'W). A FLONA abrange uma área de 200 hectares, com clima Aw de verões chuvosos e invernos secos (Köppen 1948). O índice pluviométrico médio anual é de 1327 mm e a temperatura média é de 21°C (IBGE 2007). A seleção das espécies *Pera glabrata* e *Symplocos nitens* se deu com base em levantamento fitossociológico realizado na área de estudo por Neri (2007). A coleta do material vegetal ocorreu na área de Cerrado *sensu strictu* sob Latossolo Amarelo. Foram marcados 10 indivíduos de cada espécie, distribuídos aleatoriamente dentro de uma parcela de 20x100 metros. As plantas analisadas foram padronizadas quanto ao vigor e altura, sendo coletadas aquelas com aproximadamente três metros de altura. Folhas do primeiro, terceiro e quinto nós foram coletadas em nitrogênio líquido para análises posteriores.

Anatomia e histoquímica

As amostras da região mediana das folhas foram fixadas em FAA 50 (Johansen 1940), desidratadas em série etílica até etanol 70% (Kraus & Arduin 1997) e estocadas para posterior análises. O material foi incluído em glicol metacrilato (Leica Historesin) e submetido à microtomia para a obtenção de secções transversais (7 μ m), em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA). Em seguida, uma parte dos cortes histológicos foi corada com azul de toluidina 0.05% em 0.1 M tampão fosfato pH 6.8 (O'Brien et al., 1964), para caracterização anatômica do órgão e micromorfometria foliar, enquanto a outra parte foi destinada ao teste histoquímico para detecção do Al nos tecidos. Para isso, os cortes foram submetidos ao reagente específico Chrome Azurol'S (Kukachka & Miller 1980) por 60 minutos e, posteriormente, lavados por cinco minutos em água destilada e montados entre lâmina e lamínula utilizando Permount.

Para identificar o conteúdo das paredes celulares em diferentes tecidos, foram utilizados os reagentes Vermelho de Rutênio e Fluoroglucina, que coram compostos pecto-celulósicos e lignina, respectivamente, seguindo protocolo proposto por Johansen (1940). Também foi realizado um teste para detecção de cutina com Sudan III, seguindo metodologia de Pearse (1972). Para realização desses testes, foram feitos cortes a mão livre do material fixado, os quais foram transferidos para um vidro de relógio contendo a solução do reagente. Após 15 minutos, os cortes foram lavados em etanol 70% e montados entre lâmina e lamínula com gelatina.

A fim de investigar uma possível complexação de compostos fenólicos com o Al, foram realizados testes histoquímicos para detecção desses metabólitos. Para isso, amostras de folhas foram coletadas e fixadas em solução de formalina 4% com sulfato ferroso 10% por 72 horas. O controle do teste consistiu de amostras previamente coletadas em metanol P.A. por 72 horas (para a extração dos compostos fenólicos). Posteriormente essas amostras foram transferidas para a solução de formalina, por igual período. Após lavagem em água destilada, o material foi desidratado em série etílica até 70%, onde foram estocadas para posterior análises (Johansen 1940). Os cortes histológicos foram feitos a mão livre, com auxílio de uma lâmina de aço e montados entre lâmina e lamínula com gelatina.

Todas as imagens foram capturadas com auxílio de câmera digital (AxionCamHRcZeiss) acoplada a fotomicroscópio (modelo AX-70 TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão), pertencentes ao Laboratório de Anatomia Vegetal da UFV.

Análise micromorfométrica

Na análise micromorfométrica foi mensurada a espessura da cutícula propriamente dita e da camada cuticular, das faces adaxial e abaxial, espessura das células epidérmicas, do parênquima paliçádico e esponjoso e espessura total da lâmina foliar. Foram utilizadas cinco folhas de cada estágio de desenvolvimento para cada indivíduo, totalizando 30 folhas ao todo. Para cada folha, confeccionou-se uma lâmina com cinco cortes, dos quais foi obtido uma imagem por corte. Em cada imagem, foram realizadas cinco medições por parâmetro avaliado. Essas medições foram feitas com auxílio do software Image-Pro® Plus (version 4.1, Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, USA).

Determinação dos fenóis totais

Amostras de folhas foram coletadas em nitrogênio líquido e, posteriormente, 0,2 g foram maceradas, também em nitrogênio líquido, e homogeneizada em 2 ml de metanol 80%. O extrato metanólico foi avaliado por meio de espectroscopia na região do visível, utilizando o método Folin-Ciocalteu proposto por Singleton et al. (1999). O extrato foi centrifugado a 12.900 $\times$ g a 4°C por 15 minutos. O preparo das reações se deu pela adição de alíquotas do sobrenadante a metanol 80% e Folin-Ciocalteu 10%. Carbonato de sódio foi adicionado após 10 minutos e as amostras, então, foram incubadas a 45°C por 45 minutos. Nova centrifugação foi feita a 12.900 $\times$ g a 4°C por 3 minutos, seguida por leitura em espectrômetro a uma absorvância de 765 nm. O teor de fenóis totais foi determinado pela interpolação da absorvância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido tânico, na faixa de 0 a 50 μl^{-1} , com resultados expressos em mg de ácido tânico por g de massa seca.

Mapeamento e abundância de Al em tecidos foliares

Fragmentos da porção mediana das folhas foram fixados em Karnovsky por 48 horas (Karnovsky 1965). Em seguida, o material foi desidratado em série etílica, seco com CO₂ em equipamento de ponto crítico (Baltec, modelo CPD 030, Liechtenstein), afixado em *stubs* com fita dupla face e cobertos com carbono utilizando um evaporador (Quorum Q150 T). A distribuição e a abundância relativa (%) de Al, P, Ca, K, Mg, Si, Mn e Fe foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (1430 VP, LEO, Cambridge, Inglaterra) com sonda de raios-X acoplada (IXRF systems X-EDS, 15715, Brookford Drive, Houston, TX, 77059), pertencente ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV (NMM/UFV).

Quantificação do Al e nutrientes na parte aérea

Para determinar a concentração de alumínio e nutrientes nas folhas das plantas em estudo, seguiu-se metodologia adaptada de Tedesco et al. (1995). As folhas coletadas foram secas em estufa com ventilação forçada a 60°C até obtenção de peso constante e, posteriormente, trituradas em moinho de facas. Os teores de alumínio (Al), fósforo (P), cálcio (Ca), potássio (K), magnésio (Mg) e ferro (Fe) foram determinados pela digestão de 0,2 g de material vegetal em solução nitroperclórica (3:1) (overnight em ácido nítrico - HNO₃ 70% e posteriormente em ácido perclórico - HClO₄ 70%) e a concentração de N em digestão sulfúrica. Os teores de Al e nutrientes foram obtidos por meio espectrômetro de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES, Optima 7300 DV PerkinElmer, Inc. Shelton, CT, USA).

Extração de metabólitos

Aproximadamente 50 mg do material vegetal coletado em nitrogênio líquido foram macerados, também em nitrogênio líquido e, em seguida, adicionou-se 250 µL de etanol 98%. Após essa etapa, o material foi homogeneizado, incubado e submetido a agitação por 20 minutos a 80°C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 21.000 ×g a 4°C e o sobrenadante transferido para tubos devidamente identificados para a determinação de aminoácidos. O precipitado foi submetido a duas novas extrações em etanol 80% e 50%, respectivamente (Gibon et al. 2004, Nunes-Nesi et al. 2005, 2007). O precipitado foi utilizado para a quantificação de proteína total insolúvel.

Determinação de aminoácidos totais

Os teores de aminoácidos totais foram determinados seguindo protocolo proposto por Gibon et al. (2004). O extrato etanólico foi adicionado a tampão citrato 1 M pH 5,2 com ácido ascórbico 0,2%, etanol 70% e solução de ninhidrina 1% (p/v em etanol 70%) em microplaca. Em seguida, a microplaca foi envolvida em fita de alumínio resistente a alta temperatura e incubada por 20 minutos a 95°C. Então, foi realizada uma centrifugação por 10 segundos a 16.000 ×g e as amostras foram transferidas para nova microplaca, onde foi realizada a leitura das absorbâncias a 570 nm em leitor de microplacas (Multiskan GO, ThermoScientific, Waltham, EUA). Uma curva padrão de leucina na faixa de 0 a

0,25 mM foi preparada e utilizada para o cálculo do conteúdo total de aminoácidos nas amostras, o qual foi expresso por grama de massa fresca.

Determinação de proteína

O conteúdo de proteína foi determinado a partir do protocolo descrito por Gibon et al. (2004), em que o precipitado, correspondente a fração insolúvel em etanol e água, foi solubilizado em NaOH 0,1 M e, após ressuspensão, as amostras foram incubadas por 1 hora a 95°C sob agitação a 800 ×g. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 21.000 ×g por 5 minutos e, em seguida, o sobrenadante foi coletado e diluído em NaOH 0,1M.

O reagente de Bradford (Bradford 1976) foi utilizado para a quantificação, adicionando-se à amostra diluída e a absorbância foi lida a 595 nm em leitor de microplacas (Multiskan GO, ThermoScientific, Waltham, EUA). Uma curva padrão na faixa de 0 a 2,4 µg de albumina de soro bovino (BSA) foi preparada e utilizada para o cálculo do conteúdo de proteína nas amostras, o qual foi expresso por grama de massa fresca da amostra.

Extração e determinação de pigmentos fotossintetizantes

Para determinar os teores de clorofila *a*, *b* e carotenoides seguiu-se protocolo adaptado de Lichtenthaler (1987). Cerca de 40 mg do material vegetal foram homogeneizado em acetona 80% e CaCO₃ e mantidos em gelo no escuro durante 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 15.000 ×g a 4°C e o sobrenadante transferidos para tubos devidamente identificados, no qual foi adicionado 1 ml de acetona 80%. Após 30 minutos, foi feita nova centrifugação e as leituras das absorbâncias foram realizadas nos comprimentos de onda de 663, 646 e 470 nm para clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides, respectivamente.

Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância two-way (ANOVA), com esquema fatorial 2x3 (duas espécies e três estádios de desenvolvimento foliar) com 5 repetições, usando o software R. Médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

RESULTADOS

Mapeamento, abundância relativa e quantificação de Al e nutrientes em tecidos foliares

Conforme se observa na tabela 1, as concentrações de N e P reduziram significativamente da folha de primeiro nó para as folhas de terceiro e quinto nós em *P. glabrata*. Essa redução foi mais acentuada para o N, com queda de 41% da folha de primeiro nó para a folha de terceiro e 54% da folha de primeiro nó para a folha de quinto. A concentração K reduziu apenas em folhas de quinto nó e as concentrações de Ca, Mg e Fe aumentaram da folha de primeiro para quinto nó. O aumento do Ca foi de aproximadamente 66% do primeiro para o terceiro nó e de 81% do primeiro para quinto nó.

Em *S. nitens*, as concentrações de P e K diminuíram da folha de primeiro para a folha de terceiro nó, enquanto a concentração de Mg aumentou apenas na folha de terceiro nó. As concentrações de N e Fe permaneceram constantes nos três estádios de desenvolvimento. Por sua vez, houve um aumento considerável das concentrações de Ca e Al, sendo neste último de cerca 52% da folha de primeiro para a folha de terceiro nó e de 64 % da folha de primeiro para a folha de quinto nó.

Quando comparada as duas espécies, *P. glabrata* apresentou as maiores concentrações de N nas folhas de primeiro e terceiro nó, P nas folhas de primeiro nó e Mg nas folhas de quinto nó. Já *S. nitens*, apresentou as maiores concentrações de K e Ca nas folhas de primeiro nó e Mg nas folhas de terceiro nó. A concentração de Al em folhas de *S. nitens* aumentou significativamente, sendo até três vezes maior em folhas de quinto nó se comparada as de primeiro. Em *P. glabrata* a concentração do Al não variou entre os diferentes estádios de desenvolvimento foliar, e é extremamente baixa se comparada com as concentrações encontradas em folhas de *S. nitens*.

Na figura 1 é possível observar a distribuição do Al em folhas de *P. glabrata*. A coloração verde mais intensa indica a presença do metal, e pode ser vista em alguns pontos da epiderme, principalmente nas folhas de terceiro nó (Fig. 1 B2). Sobrepondo os pontos de acúmulo de Al, foi verificado a presença do Si, indicado pela cor azul (Fig. 1 B3). Os outros elementos avaliados apresentaram uma distribuição mais uniforme nas diferentes folhas analisadas (dados não mostrados).

Em *S. nitens*, o Al tende a se distribuir de forma mais uniforme nas folhas de primeiro nó (Fig. 2 A2) e, à medida em que a folha envelhece, o elemento tende a se concentrar em ambas as superfícies epidérmicas (Fig. 2 B2, C2). A coloração amarelada

indica a presença do Ca, que se sobrepõe aos sítios de acúmulo do Al, principalmente nas folhas de terceiro e quinto nós (Fig. 2 B3, C3). Os demais elementos também apresentaram uma distribuição homogênea entre os tecidos.

A tabela 2 mostra a abundância relativa de Al nos diferentes tecidos foliares em *P. glabrata* e *S. nitens*. A proporção de Al tende a aumentar na epiderme adaxial, floema e colênquima da folha de primeiro para a folha de quinto nó em *P. glabrata*. Em *S. nitens*, esse padrão foi observado no parênquima paliçádico, parênquima, floema e colênquima, mas apenas da folha de primeiro para a folha de terceiro.

Anatomia, histoquímica e micromorfometria foliar

As folhas de primeiro nó de *P. glabrata* apresentam os tecidos ainda em diferenciação, já indicando uma estrutura dorsiventral (Fig. 3 C), diferente do verificado em *S. nitens* onde as células do mesofilo encontram-se isodiamétricas (Fig. 3 C). A epiderme é unisseriada e suas células apresentam aspecto colunar. Em *P. glabrata*, é possível observar escamas na face abaxial da epiderme (Fig. 3 C). As células epidérmicas da face adaxial em *S. nitens* são maiores que em *P. glabrata*, apesar de a espessura da cutícula propriamente dita e da parede periclinal externa não variar significativamente entre as espécies (Tab. 3). Por sua vez, não houve variação na altura das células, tampouco da espessura da cutícula na face abaxial da epiderme (Tab. 3).

O mesofilo das folhas de primeiro nó de *P. glabrata* apresenta uma camada de parênquima paliçádico e cerca cinco camadas de células isodiamétricas com poucos espaços intercelulares (Fig. 3 C), que se diferenciarão em mais uma camada de parênquima paliçádico e parênquima esponjoso. Em *S. nitens* não é possível distinguir as células do parênquima paliçádico e esponjoso (Fig. 3 F). Nas folhas do 3º e 5º nós, de um modo geral, não houve variação na espessura dos parênquimas paliçádico e esponjoso das duas espécies (Tab. 3), embora o parênquima paliçádico em *P. glabrata* ocupe uma área do mesofilo 10% maior que em *S. nitens*. A espessura total da lâmina foliar também não variou entre as espécies (Tab. 3). Tanto em *P. glabrata* quanto em *S. nitens*, a nervura mediana apresenta células dos tecidos de condução e sustentação pouco diferenciadas, embora já seja possível distinguir os elementos de vaso do xilema primário (Fig. 3 C, F).

As folhas de terceiro e quinto nós de ambas as espécies já apresentam tecidos totalmente diferenciados e não foram observadas variações estruturais entre esses dois estádios de desenvolvimento. Em *P. glabrata*, a epiderme da face adaxial e abaxial é unisseriada. Na face adaxial, é possível observar algumas células achatadas sobrepostas

a uma célula globosa, que armazena conteúdo mucilaginoso (Fig. 3 E). Em *S. nitens*, a epiderme também apresenta uma única camada de células. A espessura da parede periclinal externa das células epidérmicas em *S. nitens* foi o dobro da encontrada em *P. glabrata*, tanto na face adaxial quanto abaxial (Tab. 3). A figura 4 (I3) evidencia a reação positiva com o reagente Vermelho de Rutênio (coloração avermelhada) confirmando a presença de pectina nessas paredes. Por outro lado, a espessura da cutícula foi maior nas folhas de terceiro nó de *P. glabrata* que nas de *S. nitens*, embora em folhas de 5 nó esse parâmetro não tenha variado (Tab. 3). A reação alaranjada observada na parede periclinal externa *P. glabrata* e *S. nitens* (Fig. 4 B-C, E-F) indica a presença de cutina, que reage positivamente com o Sudan III. Tanto *P. glabrata* quanto *S. nitens* apresentam estômatos apenas na face abaxial da epiderme e, em *S. nitens*, também podem ser observados tricomas tectores, especialmente na região da nervura mediana (Fig. 3 H3).

Ambas as espécies apresentam mesofilo dorsiventral e, em *P. glabrata*, os parênquimas paliçádico e esponjoso apresentam de duas a três camadas e de sete a dez camadas de células, respectivamente (Fig. 3 E). *Symplocos nitens* apresenta uma camada de parênquima paliçádico com células colunares características e uma segunda camada, onde as células colunares se alternam com células lobadas (Fig. 3 G1). O parênquima esponjoso é formado por várias camadas de células. Em folhas de terceiro nó, embora a espessura do parênquima paliçádico não varie entre as espécies, o parênquima esponjoso é menos espesso em *P. glabrata* que em *S. nitens*, onde ocupa cerca de 80% do mesofilo (Tab. 3). Apesar da variação na espessura desses tecidos em folhas de terceiro nó, as folhas de quinto nó de ambas as espécies não apresentaram diferenças significativas nesses parâmetros (Tab. 3). Tanto *P. glabrata* quanto *S. nitens*, apresentam uma grande quantidade de idioblastos contendo drusas (oxalato de cálcio), tanto na região do mesofilo quanto da nervura mediana.

A nervura mediana de *P. glabrata* é formada por um feixe colateral em arco aberto e um feixe adaxial. Na região central é possível observar células mucilaginosas (Fig. 3 E). Uma faixa cambial é observada entre os elementos de xilema e floema (Fig. 3 D2). Ao redor do feixe, encontra-se camadas de fibras gelatinosas, evidenciadas pela coloração avermelhada com o reagente Fluoroglucina (Fig. 4 C2). *Symplocos nitens* apresenta um feixe colateral semicircular ocupando a região mediana da folha. Assim como ocorre em *P. glabrata*, em *S. nitens* também se observa uma faixa cambial (Fig. 3 H2) e fibras gelatinosas envolvendo a região do feixe (Fig. 4 I1). Algumas camadas de colênquima angular são encontradas tanto na parte adaxial quanto abaxial da nervura (Fig. 4 I2).

Não houve reação positiva com o Chrome Azurol'S em nenhum dos tecidos foliares de *P. glabrata* (Fig. 4 C1). Porém, em *S. nitens*, o teste para a detecção do Al evidenciou a presença deste metal em diferentes tecidos, desde as folhas de primeiro até as folhas de quinto nó. Nas folhas de primeiro nó o Al ocorre principalmente na parede das células epidérmicas (Fig. 4 G). Nas folhas de terceiro e quinto nós, observa-se uma coloração mais intensa do reagente na epiderme e no colênquima e menos intensa nas células do clorênquima (Fig. 4 H-I). Não foi verificada a reação positiva em células de paredes lignificadas, como as dos elementos de vaso do xilema e as fibras (Fig 4 H).

A presença de compostos fenólicos nos tecidos foliares de *P. glabrata* e *S. nitens* foi evidenciada pelo teste histoquímico realizado neste estudo, onde a coloração enegrecida do conteúdo celular indica a presença deste metabólito. Em *P. glabrata*, é possível observar que independente do nó avaliado, a distribuição desses compostos se dá de maneira homogênea por toda a lâmina foliar (Fig. 5 A, C, E). Já em *S. nitens*, essa distribuição homogênea é observada especialmente nas folhas de primeiro de nó (Fig. 6 A) pois tanto nas folhas de terceiro quanto nas de quinto nó, a localização dos compostos fenólicos se dá preferencialmente nas células epidérmicas (Fig. 6 C, E). Além disso, em algumas células se verifica que os fenólicos não foram totalmente extraídos pelo metanol (Fig 6 B, D, F).

O teor de compostos fenólicos solúveis totais (FST) em folhas de primeiro nó de *P. glabrata* foi significativamente maior que nas folhas de terceiro e quinto nó, que apresentam concentrações similares entre si (Fig. 7). Em *S. nitens*, o teor de FST não varia, independente do nó avaliado. Apesar de o teor de FST nas folhas de primeiro nó em *P. glabrata* ser quase que o dobro do encontrado nas folhas de primeiro nó de *S. nitens*, nas folhas de terceiro e quinto nós o teor desse metabólito é bastante próximo entre as duas espécies estudadas.

Aminoácidos totais e proteínas

O teor de aminoácidos totais apresentou uma tendência similar nas duas espécies estudadas (Fig 8). Em ambas, as folhas de primeiro nó apresentam teores significativamente maiores quando comparadas com as folhas de terceiro e quinto nós. Entre as folhas do mesmo nó, não há diferenças significativas nos teores de aminoácidos em *P. glabrata* e *S. nitens*.

Com relação ao teor de proteínas solúveis, as folhas de terceiro nó de *P. glabrata* apresentam os maiores teores, seguidas pelas folhas do primeiro e quinto nó. Em *S. nitens*

não há variação no teor de proteínas entre as folhas dos diferentes nós. Quando comparadas entre si, as folhas de *P. glabrata* apresentam um teor de proteínas significativamente maior que as folhas de *S. nitens*.

Pigmentos fotossintetizantes

As folhas de primeiro nó de *P. glabrata* apresentam um teor de clorofila *a*, *b* e carotenoides maiores que as folhas de terceiro e quinto nó. Por outro lado, a razão clorofila *a/b* foi maior nas folhas do quinto nó (Fig. 9). Em *S. nitens*, os teores de clorofila *a* são maiores em folhas de terceiro nó e os teores de clorofila *b* são maiores em folhas de terceiro e quinto nós (Fig. 9). A razão clorofila *a/b* é maior em folhas de primeiro nó e não varia entre as folhas de terceiro e quinto nós. O teor de carotenoides nessa espécie permaneceu constante, independentemente do nó avaliado.

De um modo geral, o teor de clorofila *a*, *b* e carotenoides é maior em folhas de primeiro nó de *P. glabrata* se comparado a *S. nitens*. No entanto, o teor de clorofila *b* nas folhas de terceiro e quinto nós é maior em *S. nitens* que em *P. glabrata*. O teor de carotenoides em folhas de terceiro e quinto nós não variou entre as espécies estudadas.

DISCUSSÃO

Pera glabrata e *Symplocos nitens* são duas espécies que ocorrem no cerrado e que compartilham o mesmo tipo de solo ácido, porém com estratégias distintas de resistência ao Al. Enquanto a primeira transloca pequenas quantidades desse elemento para suas folhas, indicando apresentar um eficiente mecanismo de exclusão, *S. nitens* hiperacumula o Al na parte aérea, sendo uma espécie tolerante aos efeitos nocivos do metal.

Variações na concentração de nutrientes entre *P. glabrata* e *S. nitens* foram encontradas nas folhas de primeiro nó. Mas apesar dos diferentes mecanismos de resistência utilizados, as folhas de terceiro e quinto nós de ambas as espécies apresentam, de um modo geral, um perfil nutricional bastante similar entre si. Os valores médios das concentrações de nutrientes nas folhas de *P. glabrata* e *S. nitens* se aproximam daqueles que têm sido encontrados em outras espécies do cerrado (Sousa et al. 2017; Malta et al. 2016).

O padrão de acúmulo dos macronutrientes nas folhas das espécies estudadas também apresentou um comportamento semelhante. Com exceção do N, que permaneceu constante em *S. nitens*, as concentrações de P e K diminuíram à medida que a folha envelheceu. Por outro lado, os teores de Ca e Mg aumentaram, embora para o Mg as

folhas de primeiro e quinto nós de *S. nitens* apresentem teores similares. Elementos como N, P, K, Mg apresentam uma elevada mobilidade no floema e, não raro, são remobilizados para as folhas mais novas a medida em que as folhas velhas entram no processo de senescência (White 2012). Embora as folhas de quinto nó de ambas as espécies não apresentem sinais aparentes de senescência, esse é um processo bastante complexo e uma série de eventos, incluindo a remobilização de nutrientes, acontecem antes que os sinais visíveis de senescência sejam identificados (White 2012).

Tanto o N quanto o P são elementos chave no metabolismo vegetal pois são constituintes de proteínas, enzimas e ácidos nucleicos (Maathuis 2009). Nas folhas de primeiro nó de *P. glabrata*, os teores de N e P são cerca de duas vezes maiores que os observados nas folhas de primeiro nó de *S. nitens*. Em solos pobres, como é o caso do cerrado, as folhas mais maduras costumam ser fonte de nutrientes, como o N, para o desenvolvimento das folhas mais jovens (Malagoli et al. 2005) e a eficiência de remobilização é extremamente variável entre as espécies (Maillard et al. 2015). O fato de as concentrações de N e P serem maiores nas folhas de primeiro nó em *P. glabrata* indica que essa espécie apresenta uma alta eficiência de mobilização desses nutrientes quando comparada com *S. nitens*. Como a concentração de N não variou nas folhas de *S. nitens*, é provável que nessa espécie as folhas não desempenhem um papel de fonte de N. Além disso, dada a grande diferença na concentração desses elementos é de se esperar que *S. nitens* tenha uma exigência nutricional menor que *P. glabrata* no início do desenvolvimento foliar, o que justifica a baixa mobilidade desses nutrientes para as folhas de primeiro nó.

Tem sido relatado que o Ca e o Mg amenizam os efeitos provocados pelo Al em plantas (Lambers et al. 2008), sugerindo que a deficiência desses nutrientes está relacionada com a toxidez do metal. O mecanismo exato pelo qual esses elementos atenuam os efeitos do Al não é bem compreendido. No entanto, Ca e Mg podem reduzir a saturação de Al no apoplasto bem como deslocar superficialmente o Al da membrana das células das raízes, reduzindo os sítios de ligação do metal (Grauer e Horst 1992, Kinraide 1998). Em *S. nitens*, o Ca parece ser fundamental para na capacidade de acumular grandes concentrações de Al na parte aérea. Estudos anteriores com espécies do gênero *Symplocos* já haviam relatado uma correlação positiva entre os íons de Ca e Al não só nas folhas, mas em outros órgãos vegetativos (Schmitt et al. 2016), indicando que para espécies do gênero o Al não interfere na absorção do Ca.

O Ca é um nutriente de baixa mobilidade (White 2012), sendo assim é de se esperar que sua concentração seja maior em folhas mais velhas como verificado em *P. glabrata* e *S. nitens*. Contudo, quando comparadas as folhas de primeiro nó das duas espécies, *S. nitens* apresenta cerca de quatro vezes mais Ca que *P. glabrata*. Essa alta quantidade de Ca em folhas jovens de *S. nitens* coincide com as concentrações também elevadas de Al. Maejima et al. (2014) associaram a capacidade de acúmulo de Al em *Symplocos chinensis* ao elevado conteúdo de oxalato nas folhas. Dada a elevada quantidade de cristais de oxalato de Ca em espécies do gênero *Symplocos*, o oxalato pode atuar como ligante tanto para Ca quanto para Al (Schmitt et al. 2016).

A relação positiva de *S. nitens* com o Ca é inversa ao que ocorre em outras espécies acumuladoras de Al ocorrentes no cerrado. *Vochysia tucanorum*, por exemplo, é uma espécie acumuladora ocorrente no cerrado e que, de acordo com (Souza et al. 2017) apresenta comportamento calcífugo. Quando em solos calcários, essa espécie impede translocação de Ca e Mg para a parte aérea, a despeito da maior disponibilidade desses nutrientes no meio. Esses dados evidenciam que apesar da grande quantidade de Al na parte aérea, as plantas acumuladoras do cerrado apresentam comportamentos distintos no que se refere a utilização de nutrientes, possibilitando o compartilhamento do mesmo ambiente sem sobreposição de nichos específicos.

As maiores concentrações do Al em folhas mais velhas, como observado em *S. nitens*, é comum em um grande número de espécies (Carr et al. 2003, Souza et al. 2015, Schmitt et al. 2016). O fato de o Al seguir a via transpiratória, associado com a baixa taxa de mobilidade do elemento, explica os altos valores de Al em folhas mais velhas (Shen e Ma 2001). Além disso, Brunner e Sperisen (2013) sugeriram que o aumento na concentração de Al nas folhas maduras se deve a competição com outros elementos por sítios de ligação nos tecidos. Em *S. nitens*, além desses aspectos funcionais associados com a translocação do Al para as folhas, nós sugerimos que o investimento em uma parede celular mais espessa nas células epidérmicas com a cutícula propriamente dita menos espessa que a camada cuticular, onde predominam as substâncias pécticas, contribui para um maior acúmulo do Al, uma vez que aparece rica em substâncias pécticas e hemiceluloses aumentaria os números de sítios de ligação do metal.

As folhas de *P. glabrata* e *S. nitens* são dorsiventrals, hipoestomáticas e possuem grandes quantidades de idioblastos contendo drusas apresentando variações quantitativas entre seus tecidos, especialmente na epiderme. O teste histoquímico utilizado para a marcação do Al foi negativo em todos os tecidos das folhas dos diferentes nós de *P.*

glabrata. Este resultado era esperado pois a quantificação do Al nas folhas mostrou o caráter não acumulador dessa espécie e o reagente não detecta pequenas quantidades deste metal. Por outro lado, *S. nitens* apresentou sítios de localização, especialmente em células da epiderme e do colênquima, de acordo com o relatado na literatura de que as paredes pecto-celulósicas constituem sítios preferenciais do acúmulo de Al. A medida em que a folha envelhece, maior quantidade de Al é acumulada em seus tecidos.

O Al interage com grupos carboxílicos carregados negativamente presentes nos componentes pécticos das paredes primárias (Horst et al. 2010). Isso explica o fato de não haver complexação do Al em tecidos com células lignificadas em *S. nitens*, como as fibras e elementos de vaso do xilema. O teste realizado com o reagente Vermelho de Rutênio evidenciou a natureza péctica das paredes das células epidérmicas e do colênquima em ambas as espécies, embora a reação tenha sido mais intensa naquelas de *S. nitens*. A parede celular é uma estrutura extremamente complexa, constituída por fibras de celulose embebidas em uma matriz amorfa de polissacarídeos e glicoproteínas (York et al. 1986). A quantidade desses constituintes varia entre diferentes espécies, o que pode justificar a diferença de coloração observada na parede das células de *P. glabrata* e *S. nitens*.

O mapeamento dos tecidos realizado com microenergia dispersiva de raio-X em *S. nitens* ratificou o que havia sido encontrado no teste histoquímico: a epiderme foi o principal sítio de ligação do Al nas folhas, apresentando valores elevados de concentração relativa do Al nesse tecido. A epiderme é um importante sítio de localização do Al, sendo verificada a complexação do metal nesse tecido em diversas espécies (Cuenca et al. 1991, Andrade et al. 2011, Malta et al. 2016, Bressan et al. 2016). De certa forma, a presença do Al na epiderme pode ser considerada uma estratégia eficiente, uma vez que se trata de uma região menos ativa metabolicamente. Em *S. nitens*, verificamos um aumento considerável na espessura da parede celular da epiderme nas folhas de terceiro e quinto nós, quando comparadas com as de primeiro nó e com as folhas de *P. glabrata*. A concentração de Al em *S. nitens* também está associada com o estágio de desenvolvimento foliar, sendo maior naquelas folhas de quinto nó.

Apesar de os dados de quantificação e histoquímica permitirem classificar *P. glabrata* como uma espécie excludora de Al, ocorre translocação do Al até a parte aérea e foi possível identificar alguns sítios de sobreposição entre Al e Si na epiderme, principalmente das folhas de terceiro e quinto nós, utilizando a técnica de EDS. Como se sabe, o Si tem sido elencado como um elemento eficiente na detoxificação do Al em plantas (Barceló et al. 1993, Dornerles et al. 2016). Nesse sentido, o pouco Al que é

translocado para as folhas de *P. glabrata* pode ser neutralizado pela ação do Si, conforme indicam os dados de concentração relativas desses elementos nesse estudo (tabela suplementar). Ademais, esse resultado deixa claro a importância da utilização de mais de uma técnica de localização para entender os mecanismos de resistência das plantas ao Al e que mais de um mecanismo deve atuar na resistência das plantas a este metal (referência).

A. Os compostos fenólicos, cuja presença nos tecidos foliares de *P. glabrata* e *S. nitens* foi evidenciada pelo teste histoquímico realizado neste estudo, são uns dos mais versáteis produtos do metabolismo das plantas, desempenhando inúmeras funções protetivas entre as espécies e é um traço comum em muitas plantas do cerrado (Caramori et al. 2004, Bieras e Sajo 2009, Takao et al 2015). Tendo em vista que esses compostos são menos custosos para as plantas que metabolitos mais complexos, são comumente utilizados como defesas químicas contra herbívoros (Gulmon and Mooney, 1986).

. Estudos tem, também, destacado o papel dos compostos fenólicos no aumento da resistência de plantas a diferentes tipos de estresses incluindo o Al (Torlá et al. 2005, Ma 2007), especialmente no que se refere a atividade antioxidante. Estes compostos juntamente com agentes antioxidantes enzimáticos, protegem as membranas celulares de diferentes espécies reativas de oxigênio (Apel e Hirt 2004, Michalak 2006). Metais pesados, como Pb, Cu e As são potencialmente geradores dessas formas de oxigênio, uma vez que interferem em rotas metabólicas importantes (Flora et al. 2009). Embora não seja considerado um metal pesado, o Al está frequentemente associado com o estresse oxidativo em inúmeras espécies sensíveis (Sharma e Dubey 2007, Pereira et al. 2010, Nogueiro et al. 2015). Nesse contexto, uma vez que a epiderme se configura como o principal sítio de acúmulo do Al em folhas de *S. nitens* e sabendo que concentrações mínimas do metal podem causar alterações metabólicas que culminam com a formação de espécies reativas de oxigênio, sugerimos que um eventual estresse oxidativo provocado pelo Al pode ser mitigado pela presença dos compostos fenólicos nesse tecido, como observado. Além disso, Barcélo et al (2002) sugerem que compostos fenólicos podem formar complexos estáveis com o Al, neutralizando os potenciais danos provocados por este metal nas células.

O teor de proteínas total foi maior nas folhas de *P. glabrata* que em folhas de *S. nitens*. Esta última, não apresentou variação no teor de proteínas entre as folhas dos diferentes nós, a despeito de a concentração de aminoácidos ser maior nas folhas de primeiro nó. A maior concentração de aminoácidos em folhas de primeiro nó, em *P.*

glabrata, é acompanhada pela redução na concentração de proteínas em folhas de quinto nó. Esse resultado é esperado, já que no processo de senescência foliar, moléculas como as proteínas são degradadas e seus aminoácidos são reutilizados para a síntese de outros compostos proteicos em folhas mais jovens (Liu et al. 2008). Em *S. nitens* isso não aconteceu, o que indica uma diferença no processo de metabolismo proteico nessa espécie que merece ser melhor compreendido. De fato, as concentrações médias de nitrogênio não variaram entre as folhas dos diferentes nós de *S. nitens*, sugerindo uma baixa mobilidade desse elemento e uma menor necessidade nutricional se comparada a *P. glabrata*.

Os teores de clorofila *a* foram maiores nas folhas de primeiro nó de *P. glabrata* quando comparadas com as de quinto, e similares as de segundo nó. Em *S. nitens*, os maiores teores de clorofila *a* foram encontradas nas folhas de terceiro nó. Em virtude do processo natural de senescência das folhas, é comum haver reaproveitamento de diversas moléculas e nutrientes das folhas jovens para as folhas velhas (Millard 1996, Cherbuy et al. 2001). De fato, os cloroplastos são uma das principais fontes de nitrogênio nas plantas, dado a grande quantidade de proteínas nessa organela (Schiltz et al. 2001, Liu et al. 2008).

Em algumas espécies sensíveis, é comum haver uma redução no conteúdo de pigmentos fotossintetizantes quando expostas ao Al (Peixoto et al. 2002). O Al interfere na absorção de magnésio (Foy et al. 1978), que é um componente chave na estrutura da molécula de clorofila, o que poderia justificar reduções nos teores desse pigmento. A concentração similar de Mg encontrado nas folhas de *P. glabrata* e *S. nitens*, inclusive maiores nas folhas de terceiro nó desta última, indica que o Al não interfere na absorção desse elemento nas espécies estudadas.

Os teores de clorofila *b* e carotenoides em folhas dos diferentes nós de *P. glabrata* e *S. nitens* apontam para um comportamento distinto em relação a fotoproteção do aparato fotossintético. Enquanto em *P. glabrata* ocorre uma diminuição no teor de clorofila *b* das folhas de primeiro para as folhas de quinto nó, em *S. nitens* foi verificada uma tendência inversa. Isso é refletido na razão clorofila *a/b* que foi maior para as folhas de terceiro e quinto nós de *P. glabrata* em comparação com *S. nitens*. Uma maior razão clorofila *a/b* está associada com uma diminuição no complexo de captação de luz (complexo antena), onde predominam moléculas de clorofila *b*. Como resultado, há uma redução na capacidade de absorção luminosa pelo fotossistema II e diminuição do estresse provocado pela intensidade luminosa (Krause et al. 1999). Estratégias de fotoproteção nessas

espécies são importantes, visto que a intensidade luminosa em áreas de cerrado s.s. é elevada e poderia comprometer o aparato fotossintético.

As folhas de primeiro nó de *P. glabrata* apresentam uma quantidade de carotenoides maior que as folhas de primeiro nó de *S. nitens*, o que pode ser uma estratégia eficiente para evitar o estresse luminoso nessa espécie. Os carotenoides estão intimamente relacionados com a proteção do aparato fotossintético contra o excesso de radiação (Demming-Adams e Adams 1992). Nesse sentido, além de ser um importante pigmento acessório, também atuam como agentes antioxidantes, tendo em vista que danos ao fotossistema pode levar a formação de espécies reativas de oxigênio (Young 1991). *Symplocos nitens*, por sua vez, evita o estresse provocado pela intensidade luminosa reduzindo os componentes do complexo antena nas folhas jovens.

Nossos resultados corroboram com o que tem sido verificado em outros estudos, e mostram que as maiores concentrações de Al em *S. nitens* são encontradas em folhas mais velhas. Acreditamos que esse padrão de distribuição esteja intimamente relacionado com as características da parede celular epidérmica nessa espécie. Além de mais espessa, essa parede apresenta natureza química diferenciada de *P. glabrata*, conforme evidenciado pelo histoquímico com Vermelho de Rutênio (coloração vermelha para pectina) e Sudan III (coloração alaranjada para cutina). Em *P. glabrata* a parede externa é predominantemente cutinizada enquanto em *S. nitens* a parte cutinizada periférica é estreita, ocorrendo a presença de uma espessa camada de pectina mais interna, o que contribui para o acúmulo localizado de Al nessa região. Confirmamos o caráter não acumulador de *P. glabrata* e, uma vez que a concentração de Al não variou entre as folhas, sugerimos que essa espécie utiliza um eficiente mecanismo de exclusão de Al em suas raízes. As folhas de primeiro nó de *P. glabrata* apresentam as maiores concentrações de fenóis totais, sendo essa uma eficiente estratégia antiherbivoria. Por sua vez, em *S. nitens*, a concentração de fenóis não variou entre as folhas e, dada a sua localização preferencial em células epidérmicas, é possível que esses compostos estejam associados com a elevada quantidade de Al acumulada nesse tecido.

Tabela 1. Teor de nutrientes e alumínio (g/kg^{-1} de matéria seca) em folhas de *Pera glabrata* e *Symplocos nintens* em diferentes estádios de desenvolvimento

Espécie	Folha	N	P	K	Ca	Mg	Fe	Al
<i>P. glabrata</i>	1° nó	24.79±2.9 Aa*	1.41±0.11 Aa	8.53±0.47 Ba	1.96±0.19 Bc	1.3±0.08 Ab	0.013±0.01 Ab	0.03±0.02 Ba
	3° nó	14.5±0.87 Ab	0.57±0.03 Ab	8.4±1.13 Aa	7.28±0.48 Ab	1.68±0.27 Bb	0.024±0.01 Aab	0.02±0.01 Ba
	5° nó	11.28±1.18 Ac	0.39±0.04 Ab	4.92±0.5 Ab	10.69±1.9 Aa	2.53±0.09 Aa	0.067±0.05 Aa	0.052± 0.01 Ba
<i>S.nitens</i>	1° nó	11.37±1.35 Ba	0.58±0.22 Ba	11.9±3.29 Aa	7.05±1.03 Ab	1.73±0.35 Ab	0.038±0.01 Aa	4.27±1.27 Ac
	3° nó	11.34±0.8 Ba	0.47±0.04 Aab	10.6±1.41 Aab	7.68±0.34 Aab	2.32±0.30 Aa	0.024± 0.003 Aa	8.86±0.88 Ab
	5° nó	8.68±0.99 Aa	0.33±0.02 Ab	7.48±1.35 Ab	9.47±1.26 Aa	1.27±0.24 Bb	0.06±0.01 Aa	12.01±1.02 Aa

*Média ± desvio padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%. Letras maiúsculas comparam as folhas entre as espécies e as letras minúsculas comparam os diferentes nós na mesma espécie. N: Nitrogênio; P: Fósforo; K: Potássio; Ca: Cálcio; Mg: Magnésio; Fe: Ferro; Al: Al.

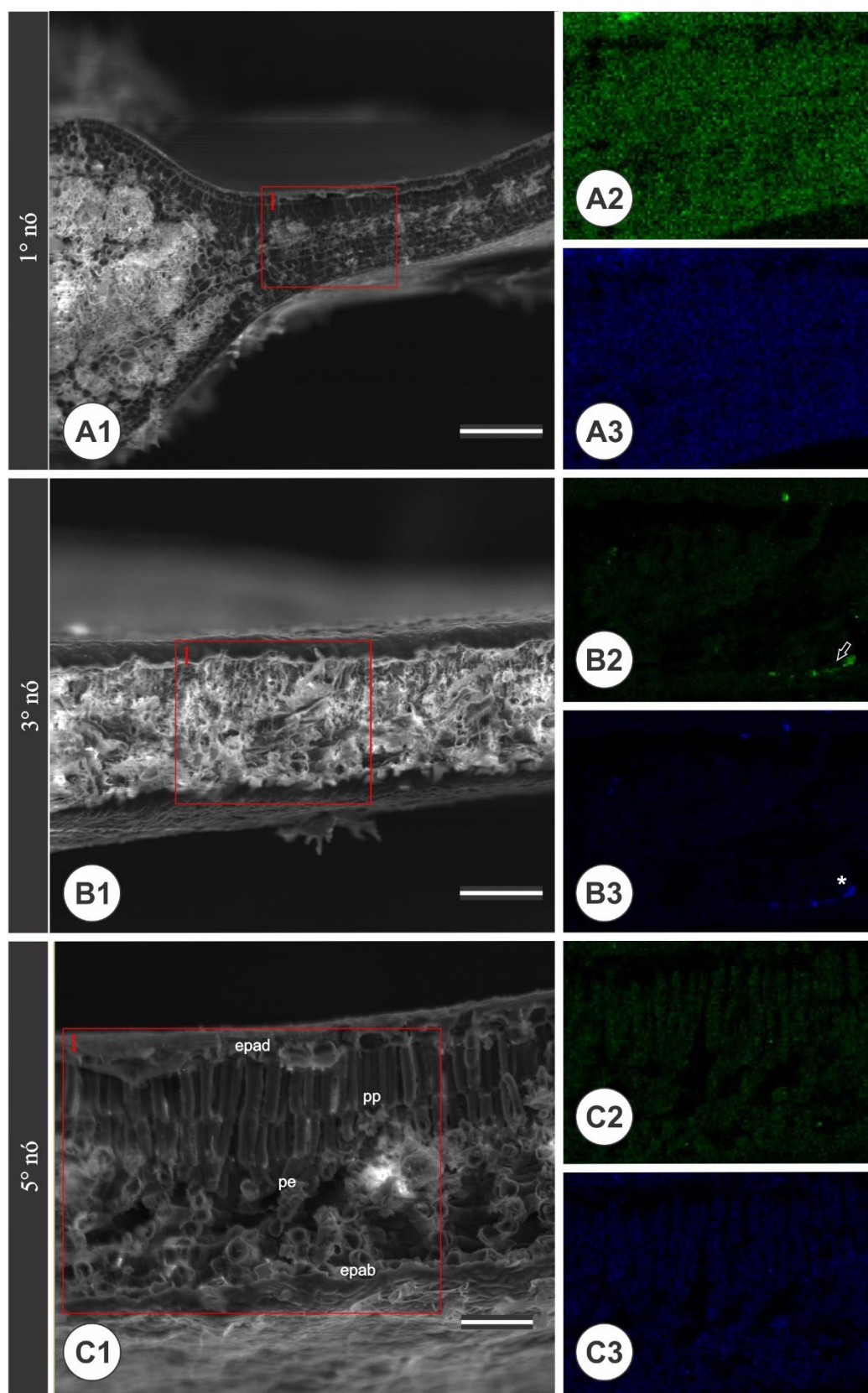


Figura 1. Mapeamento do alumínio (A2, B2, C2) e silício (A3, B3, C3) em folhas de *Pera glabrata* por meio de microscopia eletrônica de varredura com espectroscopia por dispersão de energia de Raios X (MEV/EDS). A coloração verde mais intensa indica a presença do alumínio e a azul indica a presença do silício. Detalhe da presença do Al (seta) e silício (asterisco). Barras: A1-B1 100 μ m (aumento 400x), C1 50 μ m (aumento 700x).

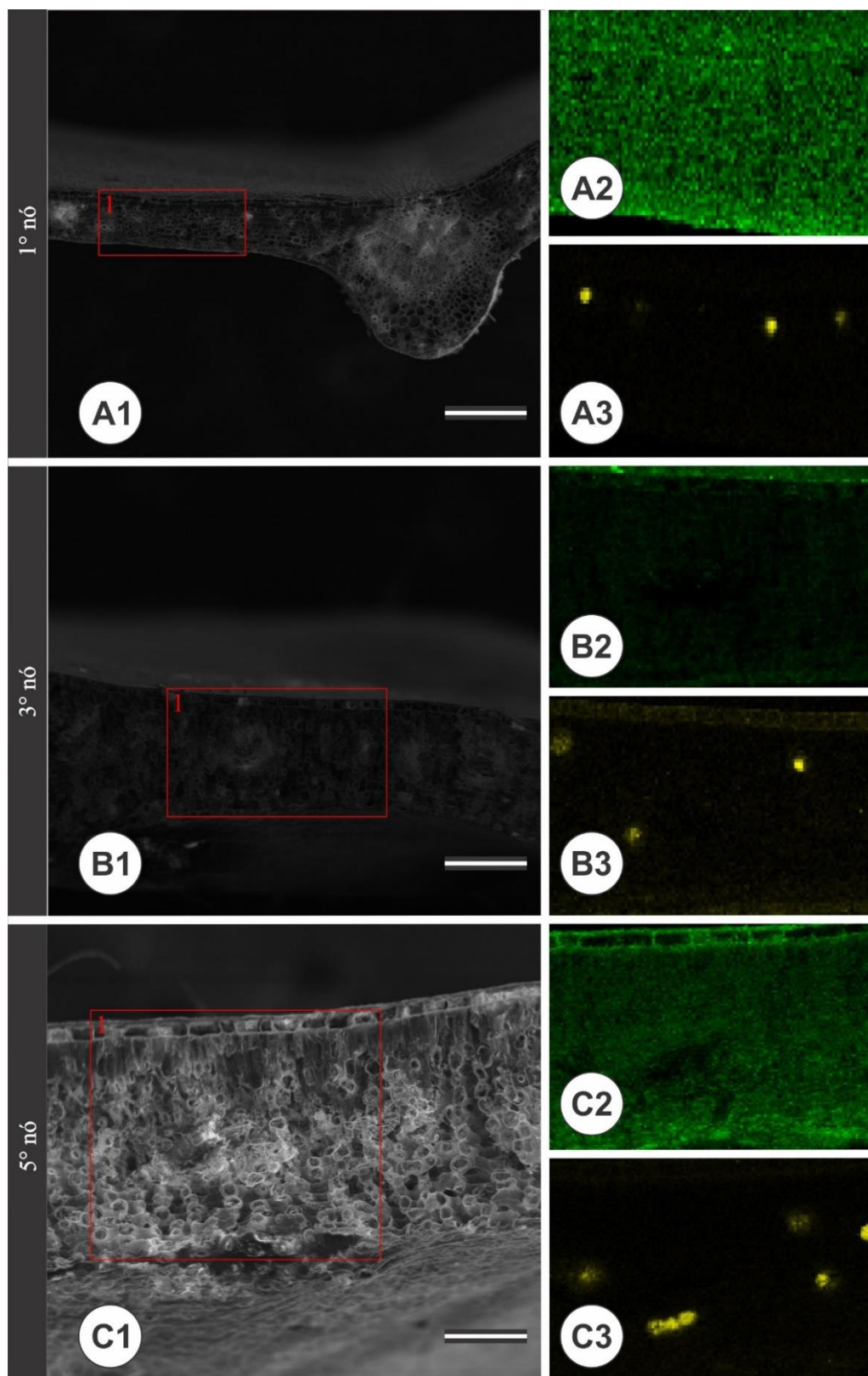


Figura 2. Mapeamento do alumínio (A2, B2, C2) e cálcio (A3, B3, C3) em folhas de *Symplocos nitens* por meio de microscopia eletrônica de varredura com espectroscopia por dispersão de energia de Raios X (MEV/EDS). A coloração verde mais intensa indica a presença do alumínio e a amarela indica a presença do cálcio. Barras: A1, B1 200 µm (aumento 200x), C1 100 µm (aumento 400x).

Tabela 2. Abundância relativa (%) de alumínio, determinada por microscopia eletrônica de varredura com espectroscopia por dispersão de energia de Raios X (MEV/EDS) , em folhas de *Pera glabrata* e *Symplocos nitens*

Espécie	Tecido	1° nó	3° nó	5° nó
<i>P. glabrata</i>	Epad	7.03±3.75 Bb*	16.56±1.11 Aa	15.30±3.24 Aa
	Epab	12.33±2.23 Aab	9.40±0.67 Ab	14.27±6.02 Aa
	PP	7.34±1.14 Ab	10.16±1.01 Ab	5.12±3.26 Ab
	PE	5.44±2.04 Ab	8.25±1.70 Ab	11.46±1.31 Aa
	Xi	16.0±1.81 Aa	4.45±4.12 Bb	14.9±2.86 Aa
	Flo	1.90±0.57 Bc	8.20±0.77 Ab	3.67±1.58 Bb
	Col	3.21±0.14 Bb	9.62±2.41 Ab	3.44±1.24 Bb
<i>S. nitens</i>	Epad	26.19±5.50 Aa	31.23±5.87 Aa	22.62±2.58 Aa
	Epab	22.93±4.64 Aa	26.93±2.47 Aa	19.24±3.03 Aa
	PP	12.16±3.01 Bbc	27.82±5.07 Aa	18.17±2.05 Ba
	PE	12.48±2.44 Bbc	35.18±3.68 Aa	13.28±1.92 Bb
	Xi	11.09±2.37 Ac	8.99±6.34 Ac	9.56±4.60 Ab
	Flo	8.04±3.55 Bc	20.16±0.31 Ab	11.73±3.54 Bb
	Col	9.21±2.90Bc	20.19±1.79 Ab	10.49±4.44 Bb

*Média ± desvio padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%. Letras maiúsculas comparam diferentes nós na mesma espécie e as letras minúsculas comparam os diferentes tecidos no mesmo nó. Epad: Epiderme da face adaxial; Epab: Epiderme da face abaxial; PP: Parênquima paliçádico; PE: Parênquima esponjoso; Xi: Xilema; Flo: Floema; Col: Colênquima.

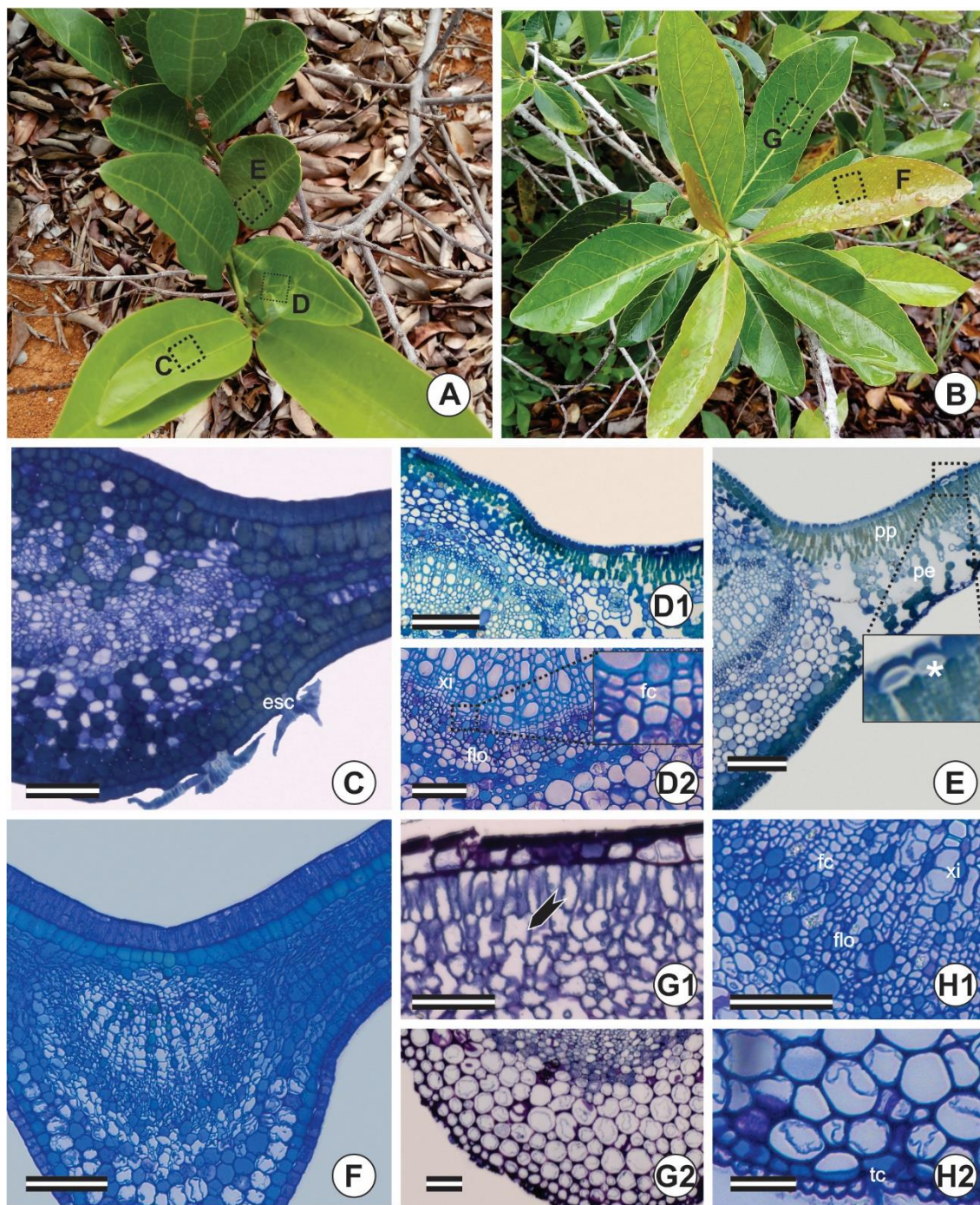


Figura 3. Aspecto geral das folhas (*Pera glabrata* - A e *Symplocos nitens* - B) e anatomia foliar de (*Pera glabrata* C-E e *Symplocos nitens* F-H3) em diferentes estádios de desenvolvimento: C e F folhas de primeiro nó; D1-D2 e G1-G2 folhas de terceiro nó; E e H1-H3 folhas de quinto nó. Cortes transversais corados com Azul de Toluidina (C-H3). esc (escama); fc (faixa cambial); pp (parênquima paliçádico); pe (parênquima esponjoso); xi (xilema); flo (floema); asterisco (célula epidérmica mucilaginosa); seta (célula lobada). Barras: D1, E, 200 μ m; C, D2, F, G1-G2, H1 100 μ m; H2 50 μ m.

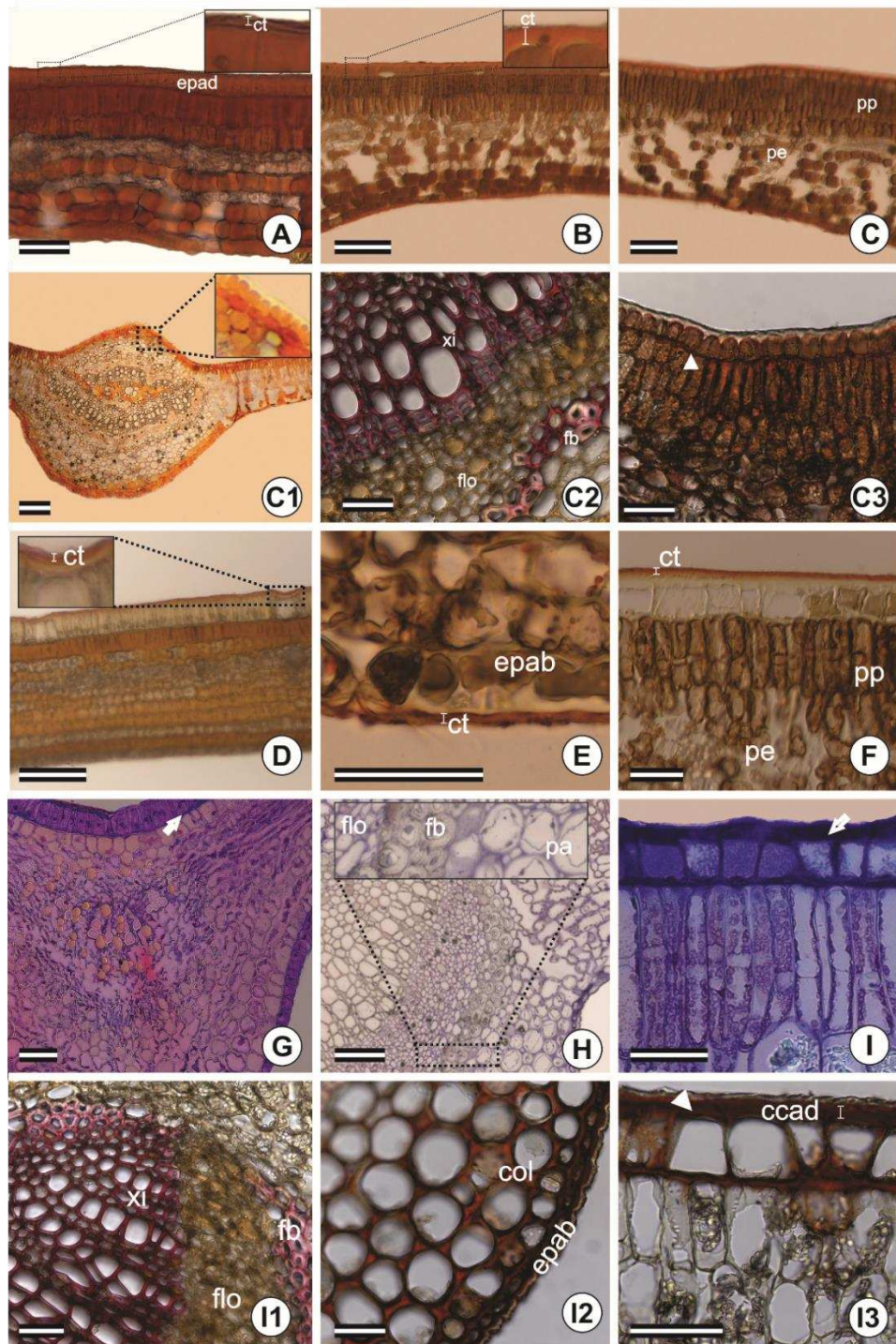


Figura 4. Anatomia foliar de *Pera glabrata* (A-C3) e *Symplocos nitens* (D-I3) em diferentes estádios de desenvolvimento: A, D e G folhas de primeiro nó; B, E e H folhas de terceiro nó; C-C3 e I-I3 folhas de quinto nó. Cortes transversais corados com Sudan III para detecção de cutina (A-C e D-F), Chrome Azurol'S para detecção de alumínio (C1 e G-I), Fluoroglucina (C2 e I1) e Vermelho de Rutênio para detecção de pectina (C3 e I2-I3). ct (cutícula); epad (epiderme da face adaxial); epab (epiderme da face abaxial); ccad (camada cuticular da epiderme da face adaxial); pp (parênquima paliádico); pe (parênquima esponjoso); xi (xilema); flo (floema); fb (fibras), col (colênquima); cabeça de seta (reação positiva com Vermelho de Rutênio); seta (reação positiva com Chrome Azurol'S); Barras: C1 200 µm; B, C, D, F, H, I 100 µm; A, C2-C3, E, G, I1-I3 50 µm.

Tabela 3. Micromorfometria foliar (espessura em μm) de *Pera glabrata* e *Symplocos nitens* em diferentes estádios de desenvolvimento

Espécie	Folha	Cut. ad	Cut. ab	CC ad	CC ab	Ep ad	Ep ab	PP	PE	Lam. foliar
<i>P. glabrata</i>	1° nó	1.39 $\pm$ 0.3Ab*	1.84 $\pm$ 0.22Ab	3.3 $\pm$ 0.73Ab	2.54 $\pm$ 0.29Ab	17.56 $\pm$ 3.09Ba	12.49 $\pm$ 1.28Aa	48.1 $\pm$ 5.72Ab	80.4 $\pm$ 11.08Ab	174.66 $\pm$ 11.08 Ab
	3° nó	6.04 $\pm$ 1.02Aa	4.39 $\pm$ 1.77Aa	7.14 $\pm$ 1.49Ba	5.47 $\pm$ 2.17Ba	18.04 $\pm$ 5.57Ba	12.53 $\pm$ 1.18Aa	85.16 $\pm$ 14.3Aa	201.73 $\pm$ 20.6 Ba	327.4 $\pm$ 16.9 Ba
	5° nó	6.55 $\pm$ 1Aa	3.70 $\pm$ 1.33Aab	7.69 $\pm$ 1.32Ba	4.93 $\pm$ 1.61Ba	16.59 $\pm$ 2.03Aa	12.84 $\pm$ 1.44Aa	105.59 $\pm$ 7.17Aa	191.3 $\pm$ 37.6 Aa	334.73 $\pm$ 27.8 Aa
<i>S. nitens</i>	1° nó	1.34 $\pm$ 0.63Ab	1.09 $\pm$ 0.33Aa	4.38 $\pm$ 2.3Ab	3.2 $\pm$ 0.88Ab	33.6 $\pm$ 1.65Aa	14.78 $\pm$ 2.68Aa	34.53 $\pm$ 7.61Ac	92.6 $\pm$ 19.2 Ab	179.6 $\pm$ 30.06 Ab
	3° nó	3.29 $\pm$ 0.66Bab	1.99 $\pm$ 0.89Ba	14.31 $\pm$ 3.29Aa	9.59 $\pm$ 3.35Aa	27.9 $\pm$ 5.7Aab	11.83 $\pm$ 2.56Aa	75.8 $\pm$ 4.24Ab	255.87 $\pm$ 20.5 Aa	402.5 $\pm$ 24.3 Aa
	5° nó	4.71 $\pm$ 1.74Aa	3.05 $\pm$ 1.12Aa	17.5 $\pm$ 3.81Aa	10.98 $\pm$ 3.03Aa	22.51 $\pm$ 2.47Ab	13.13 $\pm$ 1.74Aa	105.59 $\pm$ 19.16Aa	213.7 $\pm$ 30.7 Aa	386.02 $\pm$ 55.3 Aa

* Média $\pm$ desvio padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%. Letras maiúsculas comparam as folhas entre as espécies e as letras minúsculas comparam os diferentes nós na mesma espécie. Cut. ad: Cutícula propriamente dita da face adaxial; Cut. ab: Cutícula propriamente dita da face abaxial; CC ad: Camada cuticular da epiderme da face adaxial; CC ab: Camada cuticular da epiderme da face abaxial; Ep ad: epiderme da face adaxial; Epab: epiderme da face abaxial; PP: Parênquima paliçádico; PE: Parênquima esponjoso; Lam. foliar: Lâmina foliar.

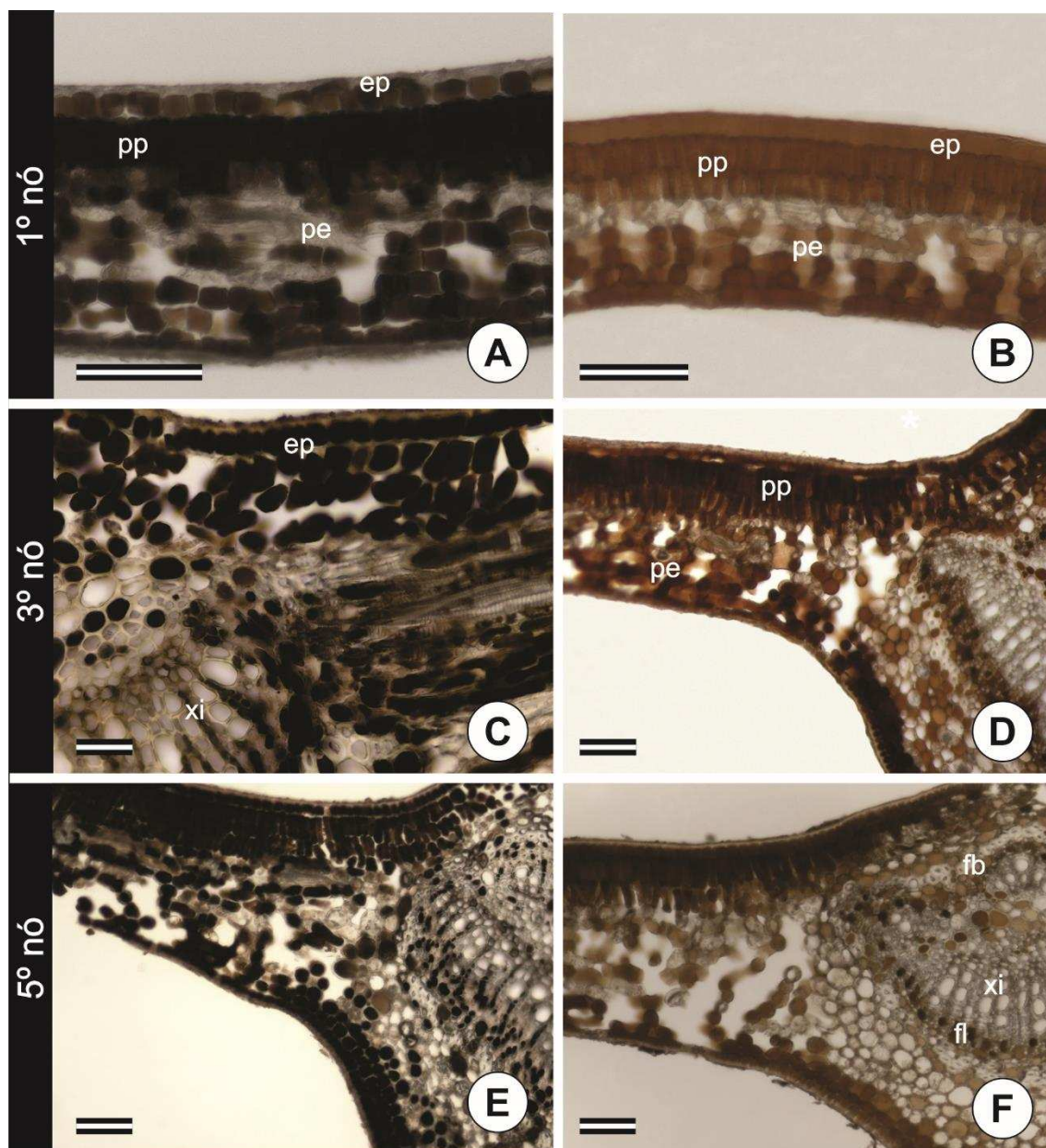


Figura 5. Teste histoquímico para detecção de compostos fenólicos em folhas de *Pera glabrata* em diferentes estádios de desenvolvimento. Cortes transversais de folhas coletadas em formalina em sulfato ferroso (A, C, E) e em metanol-controle (B, D, F). A coloração enegrecida do conteúdo celular indica a presença do metabólito (A, C, E). ep (epiderme); pe (parênquima esponjoso); pp (parênquima paliádico); xi (xilema); fl (floema); fb (fibras) Barras: A, B, D-F 100 μ m, C 50 μ m.

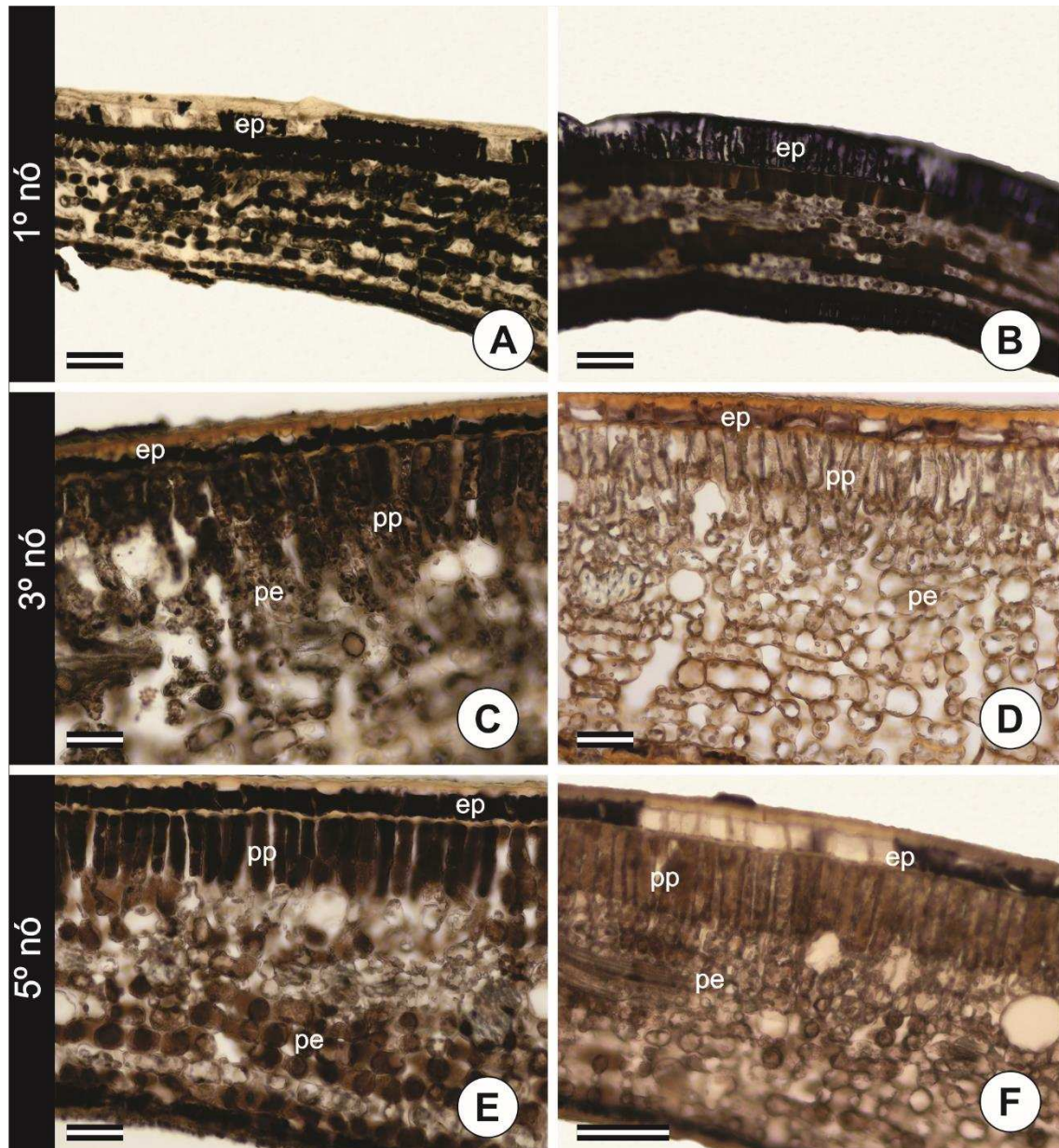


Figura 6. Teste histoquímico para detecção de compostos fenólicos em folhas de *Symplocos nitens* em diferentes estádios de desenvolvimento. Cortes transversais de folhas coletadas em formalina em sulfato ferroso (A, C, E) e em metanol-controle (B, D, F). A coloração enegrecida do conteúdo celular indica a presença do metabólito (A, C, E). ep (epiderme); pe (parênquima esponjoso); pp (parênquima paliçádico); Barras: A-B 100 µm, C-F 50 µm.

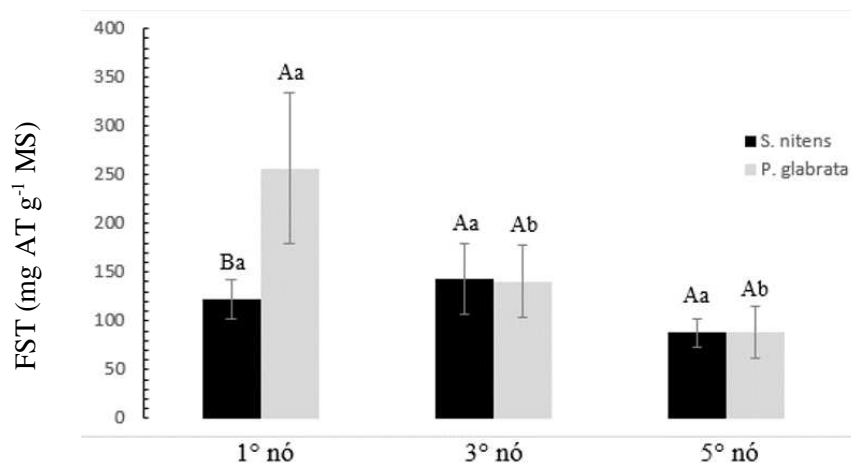


Figura 7. Teor de fenóis totais em folhas de primeiro, terceiro e quinto nós de *Pera glabrata* e *Symplocos nitens*. Letras maiúsculas comparam espécies e letras minúsculas comparam os nós. Barras verticais representam o desvio padrão.

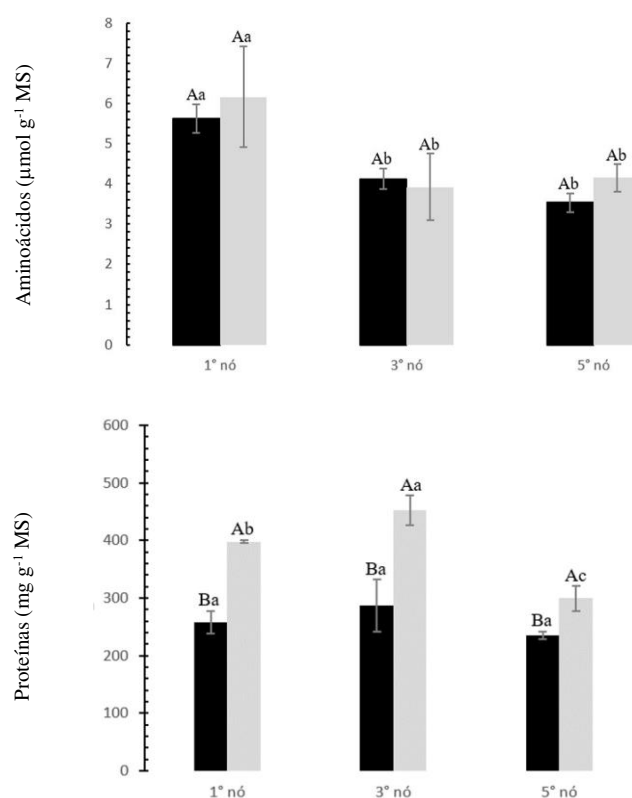


Figura 8. Conteúdo de aminoácidos e proteínas solúveis em folhas de primeiro, terceiro e quinto nós de *Pera glabrata* e *Symplocos nitens*. Letras maiúsculas comparam espécies e letras minúsculas comparam os nós. Barras verticais representam o desvio padrão.

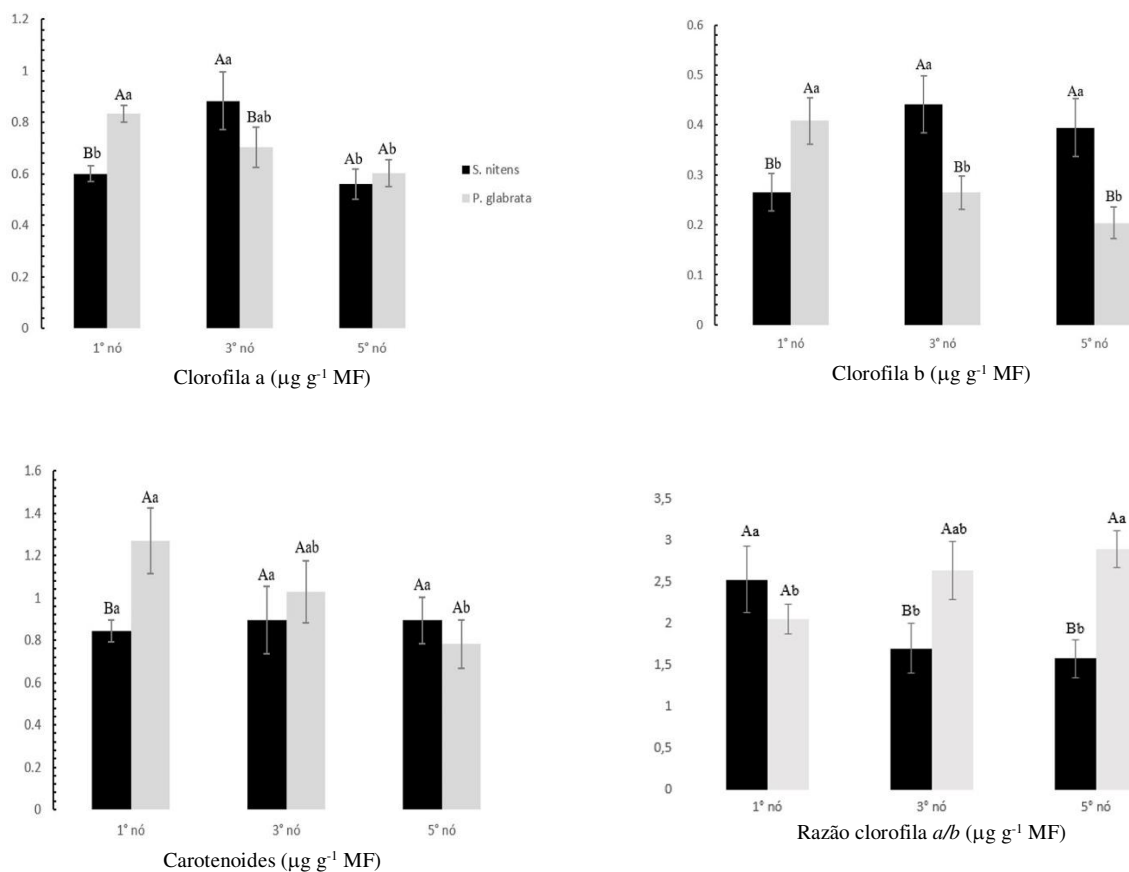


Figura 9. Conteúdo de clorofila *a*, *b*, carotenoides e razão clorofila *a/b* em folhas de primeiro, terceiro e quinto nós de *P. glabrata* e *S. nitens*. Letras maiúsculas comparam espécies e letras minúsculas comparam os nós. Barras verticais representam o desvio padrão.

REFERÊNCIAS

- Andrade LAZ, Felfili JM, Violatti L (2002) Fitossociologia de uma área de cerrado denso na RECOR-IBGE, Brasília-DF. **Acta Botanica Brasilica**, 16(2): 225-240.
- 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. **Environmental Experimental Botany**, 70: 37-42.
- Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, 55: 373-399.
- Barceló J, P. Guevara P, Poschenrieder C (1993) Silicon amelioration of aluminium toxicity in teosinte (*Zea mays* L. ssp. mexicana). **Plant and Soil**, 154:249-255.
- Barceló J, Poschenrieder C (2002) Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. **Environmental and Experimental Botany**, 48:75-92.
- Bieras AC, Sajo MG (2009) Leaf structure of the cerrado (Brazilian savanna) woody plants. **Trees**, 23:451-471.
- Bressan ACG, Coan AI, Habermann G (2016) X ray spectra in SEM and staining withchrome azurol S show Al deposits in leaf tissues of Al - accumulating and nonaccumulating plants from the cerrado. **Plant and Soil**, 404: 293-306.
- Brunner, I. and Sperisen, C. (2013) Aluminum Exclusion and Aluminum Tolerance in Woody Plants. **Frontiers in the Plant Science**, 4, p. 172.
- Caramori SS, Lima CS, Fernandes KF (2004) Biochemical Characterization of Selected Plant Species from Brazilian Savannas. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 47(2): 253-259.
- Carr HP, Lombi E, Küpper H, McGrath SP, Wong MH (2003) Accumulation and distribution of aluminium and other elements in tea (*Camellia sinensis*) leaves. **Agronomie**, 23:705-710.
- Carvalho-Júnior WGO (2012) **Avaliação de técnicas de histolocalização do alumínio em folhas de espécies de cerrado**. Viçosa, Dissertação: Universidade Federal de Viçosa.
- Chenery EM (1948) Aluminum in the plant world. Part I. General survey in dicotyledons. **Kew Bulletin**, 2: 173-183.
- Cherbuy B, Joffre R, Gillon D, Rambal S (2001) Internal remobilization of carbohydrates, lipids, nitrogen and phosphorus in the Mediterranean evergreen oak *Quercus ilex*. **Tree Physiology**, 21:9-17.
- Coutinho LM (1978) O conceito de cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, 1:17-23.

- 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 and Environment**, 14: 437-441.
- Demmig-Adams B, Adams (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 43:599-626.
- Dias BFS (1996) **Alternativa de desenvolvimento dos cerrados: Manejo e conservação dos recursos naturais renováveis**. Fundação Pró-Natura, Brasília.
- Dorneles AOS, Pereira AS, Rossato LV, Possebom G, Sasso VM et al (2016) Silicon reduces aluminum content in tissues and ameliorates its toxic effects on potato plant growth. **Ciência Rural**, 46(3): 506-512.
- Ezaki B, Jayaram K, Higashi A, Takahashi K (2013) A combination of five mechanisms confers a high tolerance for aluminum to a wild species of Poaceae, *Andropogon virginicus* L. **Environmental and Experimental Botany**, 93: 35-44.
- Flora SJS (2009) Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2:191-206.
- Foy C.D., Chaney, R.L. & White, M.C. (1978). The physiology of metal toxicity in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, 29:511-66.
- Gibon Y, Blaessing OE, Hannemann J, Carillo P, Hoehne M, Hendriks JHM, Palacios N, Cross J, Selbig J, Stitt M (2004) A robot-based platform to measure multiple enzyme activities in Arabidopsis using a set of cycling assays: Comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. **Plant Cell**, 16: 3304-3325
- Grauer UE, Horst WJ (1992) Modeling Cation Amelioration of Aluminum Phytotoxicity. **Soil Science Society of America Journal**, 56(1): 166-172.
- Gulmon SL, Mooney HA (1986) Costs of defence and their effects on plant productivity. In: Givnish, T.J. (Ed.) **On the Economy of Plant Form and Function**. Cambridge University Press, Cambridge, 681-698.
- Haridasan M (1982) Aluminium accumulation by some cerrado native species of central Brazil. **Plant and Soil**, 65: 265-273.
- Haridasan M (1988) Performance of *Miconia albicans* (Sw.) Triana, an aluminium accumulating species in acidic and calcareous soils. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, 19:1091-1103.
- Haridasan M (2008) Nutrição mineral de plantas nativas do cerrado. **Revista Brasileira de Fisiologia**, 12:54-64.

- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA –IBGE (2007) Mapas de climas. Disponível em: <http://mapas.ibge.gov.br/clima/viewer.htm>. Acesso em 24 jan 2019.
- Jansen S, Broadley MR, Robbrecht E, Smets E (2002) Aluminum hyperaccumulation in Angiosperms: a review of its phylogenetic significance. **Botanical Review**, 68: 235-269.
- Johansen DA (1940) **Plant microtechnique**. New York: McGraw Hill Book, 523 p.
- Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, 27:137-138.
- Kochian LV, Piñeros MA, Liu J, Magalhães JV (2015) Plant adaptation to acid soils: The molecular basis for crop aluminum resistance. **Annual Review of Plant Biology**, 66: 23-28.
- Köppen W (1948) **Climatologia: con un estudio de los climas de la tierra**. Fondo de Cultura Econômica. México. 479p.
- Kraus JE, Arduin M (1997) **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR, 198 p.
- Krause GH, Schmude C, Garden H, Koroleva OU, Winter K (1999) Effects of solar ultraviolet radiation on the potential efficiency of photosystem II in leaves of tropical plants. **Plant Physiology**, 121:1349-1358.
- Kukachka BF, Miller RB (1980) A chemical spot-test for aluminum and its value in wood identification. **IAWA Bulletin**, 1(3): 104-109.
- Lambers, H, Chapin, FS & Thijs, L.P(2008) **Plant physiological ecology**, Springer Science+Business Media, LLC.
- Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, 148: 350–382.
- Liu J, Wu YH, Yang JJ, Liu YD, Shen FF (2008) Protein degradation and nitrogen remobilization during leaf senescence. **Journal of Plant Biology**, 51:11-19.
- Lopes AS, Cox FR (1977) Cerrado vegetation in brazil: na edaphic gradiente. **Agronomical Journal**, 69:828-831.
- Ma JF (2007) Syndrome of Aluminum Toxicity and Diversity of Aluminum Resistance in Higher Plants. **International Review of Cytology**, 264: 225-252.
- Maathuis F (2009) Physiological functions of mineral nutrientes. **Current Opinion in Plant Biology**, 12:250-258.
- Maejima E, Hiradate S, Jansen S, Osaki M, Watanabe T (2014) Comparative analysis of aluminum accumulation in leaves of three angiosperm species. **Botany**, 92:327-331.

- Malagoli P, Laine P, Rossato L, Ourry A (2005) Dynamics of nitrogen uptake and mobilization in field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus*) from stem extension to harvest: I. Global N flows between vegetative and reproductive tissues in relation to leaf fall and their residual N. **Annals of Botany**, 95:853-861.
- Malta PG, Silva AS, 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 chloroplasts. **Plant and Soil**, 408: 369-384.
- Michalak A (2006) Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress. **Polish Journal of Environmental Studies**, 15:523-530.
- Millard P (1996) Ecophysiology of the internal cycling of nitrogen for tree growth. **Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde**, 159:1-10.
- Miranda-Guevara AJ (2015) **Relações entre os grupos funcionais de leguminosas e de acumuladoras de alumínio no Cerrado**. Viçosa, Dissertação: Universidade Federal de Viçosa.
- Morita A, Yanagisawa O, Maeda S, Takatsu S, Ikka T (2011) Tea plant (*Camellia sinensis* L.) roots secrete oxalic acid and caffeine into medium containing aluminium. **Soil Science and Plant Nutrition**, 57: 796-802.
- Nascimento MS (2011) **Ecologia funcional e padrões de alocação de alumínio e nutrientes em plantas lenhosas do Cerrado**. Viçosa, Dissertação: Universidade Federal de Viçosa.
- Neri A (2007) **Gradiente Pedológico-Vegetacional de Cerrado em Paraopeba, MG**. Viçosa, Tese: Universidade Federal de Viçosa.
- Nogueiro RC, Monteiro FA, Gratão PL, Borgo L, Azevedo RA (2015) Tropical soils with high aluminum concentrations cause oxidative stress in two tomato genotypes. **Environmental Monitoring and Assessment**, 187(3):73.
- Nunes-Nesi A, Carrari F, Gibon Y, Sulpice R, Lytovchenko A, Fisahn J, Graham J, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ, Fernie AR (2007) Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. **The Plant Journal**, 50: 1093-1106.
- Nunes-Nesi A, Carrari F, Lytovchenko A, Smith AM, Loureiro ME, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ, Fernie AR (2005) Enhanced photosynthetic performance and growth as a consequence of decreasing mitochondrial malate dehydrogenase activity in transgenic tomato plants. **Plant Physiology**, 137: 611-622.
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **Protoplasma**, 59(2):368-373.

- Peixoto PH, Da Matta FM, Cambraia J (2002) Responses of the photosynthetic apparatus to aluminum stress in two sorghum cultivars. **Journal of Plant Nutrition**, 25:821-832.
- Pereira LB, Mazzanti CM, Gonçalves JF, Cargnelutti D et al. (2010) Aluminum-induced oxidative stress in cucumber. **Plant Physiol and Biochemistry**, 48(8):683-9.
- Poschenrieder C, Gunsé B, Corrales I, Barceló J (2008) A glance into aluminum toxicity and resistance in plants. **Science of the Total Environment**, 400: 356-368.
- Poschenrieder C, Tolrà R, Hajiboland R, Arroyave C, Barceló J (2015) Mechanisms of hyper-resistance and hyper-tolerance to aluminum in plants. In: **Aluminum stress adaptation in plants**. Springer International Publishing, p 81-98.
- Ratter JA, Ribeiro JF, Bridgewater S (1997) The brazilian cerrado vegetation and threats its biodiversity. **Annals of Botany**, 80:223-230.
- Ribeiro JF, Walter BMT (2008) As principais fitofisionomias do Bioma Cerrado. In **Cerrado: ecologia e flora** (SM Sano, SP Almeida, JF Ribeiro, eds.). Embrapa Cerrados, Planaltina. p.151 -212.
- Santana BVS (2017) **Acúmulo de alumínio em cloroplastos: implicações ultraestruturais e fisiológicas**. Viçosa, Dissertação: Universidade Federal de Viçosa.
- Schiltz S, Gallardo K, Huart M, Negroni L, Sommerer N, Burstin J (2001) Proteome Reference Maps of Vegetative Tissues in Pea. An Investigation of Nitrogen Mobilization from Leaves during Seed Filling. **Plant Physiology**, 135: 2241-2260.
- Schmitt M, Boras S, Tjoa A, Watanabe T, Jansen S (2016) Aluminium Accumulation and Intra-Tree Distribution Patterns in Three Arbor aluminosa (*Symplocos*) Species from Central Sulawesi. **PLOS ONE**, 11(2): 1-18.
- Sharma P, Dubey RS (2007) Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum. **Plant Cell Reports**, 26(11): 2027-38.
- Shen R. & Ma J.F. (2001). Distribution and mobility of aluminium in an Al-accumulating plant, *Fagopyrum esculentum* Moench. **Journal of experimental botany**, 52(361):1683-1687.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, 299, 152-178.
- Souza MC, Bueno PCP, Morellato LPC, Habermann G (2015) Ecological strategies of Al-accumulating and non-accumulating functional groups from the Cerrado sensu Stricto. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, 87(2):813-823.

- Souza MC, Habermann G, Amaral CL, Rosa AL, Pinheiro MHO, Costa FB (2017) *Vochysia tucanorum* Mart.: an aluminum-accumulating species evidencing calcifuge behavior. **Plant and Soil**, 419:377–389.
- Takaoa LK, Imatomib M, Gualtieria SJC (2015) Antioxidant activity and phenolic content of leaf infusions of Myrtaceae species from Cerrado (Brazilian Savanna) **Brazilian Journal of Biology**, 75(4): 948-952.
- Tedesco MJ, Gianello C, Bissani CA, Bohnen H, Volkweiss SJ (1995) **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2ª edição. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 174p.
- Tolentino GS (2011) **Composição e partição de nicho em gradientes de solo e luz no Cerrado**. Viçosa, Dissertação: Universidade Federal de Viçosa.
- Vitorello VA, Capaldi FR, Stefanuto VA (2005) Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. **Brazilian Journal Plant Physiology**, 17: 129-143.
- White P (2012) Long-distance transport in the xylem and phloem, in: **Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants**, 3rd Edn., ed P. Marschner (Berlin: Elsevier), 49-70.
- York W S, Darvill AG, Mcneil M, Stevenson TT, Albersheim P (1988) Isolation and Characterization of Plant Cell Walls and Cell Wall Components. **Methods for Plant Molecular Biology**, 3-40.
- Young AJ (1991) The photoprotective role of carotenoids in higher plants. **Physiologia Plantarum**, 83(4):702-708.
- Zheng S.J.; Ma J.F.; Matsumoto H. (1998). Continuous secretion of organic acids is related to aluminium resistance during relatively long-term exposure to aluminium stress. **Physiologia Plantarum**, 103(2): 209-214.

ANEXOS

Tabela suplementar com as concentrações relativas (%) dos nutrientes, determinada por a sonda de raio-X acoplada a, microscópio eletrônico de varredura em folhas de *Pera glabrata*.

FOLHA	TECIDO	P	K	Ca	Mg	Al	Si	Fe
1° nó	Epad	6.04± 2.12 Aab*	3.47±0.19 Ab	51.07±8.20 Ab	11.63±1.86 Aa	7.03±3.75 Bb	6.58±2.54 Bb	3.47±0.46 Ba
	Epab	11.16± 3.96 Aa	2.81±0.33 Ab	46.31±7.37 Ab	8.46± 2.82 Aa	12.33±2.23 Aab	14.35±1.87 Aa	2.92±0.78 Ba
	PP	10.80±2.37 Ba	7.44±1.33 Aa	32.41±6.61 Bb	7.92±2.14 Aa	7.34±1.14 Ab	7.07±1.09 Ab	3.14±1.02 Aa
	PE	12.63± 2.27 Aa	11.91±2.11 Aa	41.17±8.06 Bb	10.01±5.19 Aa	5.44±2.04 Ab	5.12±0.37 Ab	5.38±0.73 Aa
	Xi	12.89±3.96 Aa	7.60±2.59 Aa	17.29±0.61 Bc	15.90±1.55 Aa	16±1.81 Aa	15.72±3.22 Aa	2.49±1.64 Ba
	Flo	3.49±1.26 Bb	0.91±0.78 Ac	86.40±6.23 Aa	3.47±1.02 Ab	1.90±0.57 Bc	0.45±0.36 Ac	1.21±0.29 Ba
	Col	3.01±2.05 Bb	5.40±1.10 Ab	60.32±8.07 Bab	12.28±1.16 Aa	3.21±0.14 Bb	1.39±0.40 Ab	2.44±0.42 Ba
3° nó	Epad	1.84±0.96 Ad	1.72±1.28 Aa	23.37±2.23 Bc	6.33±1.75 Ab	16.56±1.11 Aa	2.69±0.15 Cb	46.56±3.88 Aa
	Epab	15.62±0.29 Ab	1.68± 0.65 Aa	31.21±8.52 Ab	9.86±1.89 Aab	9.40±0.67 Ab	8.61±1.74 Aa	39.52±12.27 Aa
	PP	17.61±0.84 Ab	1.13±0.36 Aa	22.46±2.55 Cc	16.58±4.20 Aa	10.16±1.01 Ab	8.92±0.20 Aa	13.21±5.2 Ac
	PE	17.47±4.11 Ab	1.54±0.72 Ba	26.36±4.24 Cc	12.16±2.73 Aab	8.25±1.70 Ab	7.37±3.19 Aa	9.52± 2.74 Ac
	Xi	8.94±0.1 Ac	1.68±0.1 Ba	39.14±4.95 Aab	9.86±1.89 Aab	4.45±4.12 Bb	0.47±0.40 Bc	26.93± 6.94 Ab
	Flo	27.37±0.42 Aa	1.76±0.28 Aa	30.41±5.08 Ab	9.55±2.90 Aab	8.20±0.77 Ab	0.70±0.08 Ac	26.40±4.93 Ab
	Col	9.76±1.71 Ac	1.82±0.59 Ba	44.88±3.42 Ba	15.02±5.52 Aab	9.62±2.41 Ab	6.70±2.73 Aa	25.18±5.81 Ab
5° nó	Epad	9.49±1.35 Aa	5.02±2.37 Aa	17.95±9.05 Bd	4.13±2.32 Ab	15.30±3.24 Aa	23.13±5.06 Aa	6.93±2.61 Ba
	Epab	8.29±3.13 Aa	1.93±0.89 Ab	39.34±14.59 Ac	1.54±0.36 Ab	14.27±6.02 Aa	13.09±4.25 Ab	4.34±1 Ba
	PP	7.9±2.35 Ba	4.78± 1.78 Aa	55.16±12.20 Abc	11.30±1.86 Aab	5.12±3.26 Ab	3.62±0.53 Ac	8.95±0.82 Aa
	PE	4.67± 1.84 Ba	1.83±0.23 Bb	61.40±9.19 Ab	13.73±4.63 Aa	11.46±1.31 Aa	8.09±1.75 Ab	4.53±0.77 Aa
	Xi	8.21±1.51 Aa	6.42±1.64 Aa	35.43±2.34 Ac	9.44±2.61 A ab	14.9±2.86 Aa	9.58±0.29 Ab	5.05±1.70 Ba
	Flo	6.09±1.79 Ba	1.27± 0.53 Ab	85.37±10.84 Aa	7.01±2.15 Aab	3.67±1.58 Bb	6.13±2.86 Ab	2.63±0.83 Ba
	Col	1.27± 0.10 Bb	0.47±0.21 Bb	81.86±7.13 Aa	4.06±1.55 Bb	3.44±1.24 Bb	3.75±2.04 Ac	2.76±0.22 Ba

*Média ± desvio padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%. Letras maiúsculas comparam diferentes nós na mesma espécie e as letras minúsculas comparam os diferentes tecidos no mesmo nó. Epad: Epiderme da face adaxial; Epab: Epiderme da face abaxial; PP: Parênquima paliádico; PE: Parênquima esponjoso; Xi: Xilema; Flo: Floema; Col: Colênquima.

Tabela suplementar com as concentrações relativas (%) dos nutrientes, determinada por microscopia de varredura acoplado a sonda de raio-X, em folhas de *Symplocos nitens*.

FOLHA	TECIDO	P	K	Ca	Mg	Al	Si	Fe
1° nó	Epad	19.23±8.13 Aab*	1.01±0.68 B	47.29±12.72 Aab	2.77±1.06 Ba	26.19±5.50 Aa	2.56±0.84 Ba	9.25±4.91 Aa
	Epab	25.04±8.40 Aa	0.92±0.85 Ba	35.90±11.33 Bb	2.37±0.64 Ba	22.93±4.64 Aa	2.55±0.33 Aa	6.96±5.30 Aa
	PP	14.40±3.60 Aab	0.82±0.61 Ba	52.01±4.56 Aa	4.12±0.79 Ba	12.16±3.01 Bbc	2.27±0.95 Ba	9.78±5.94 Aa
	PE	11.40±2.64 Ab	2.85±0.90 Ba	52.34±1.82 Ba	2.91±0.67 Ba	12.48±2.44 Bbc	2.47±0.99 Aa	10.84±4.73 Aa
	Xi	16.65±4.76 Aab	2.06±0.93 Ba	58.50±4.62 Aa	2.44±0.93 Aa	11.09±2.37 Ac	4.32±2.70 Aa	7.89±5.21 Aa
	Flo	13.46±2.99 Aab	1.47±0.95 Ba	65.48±6.85 Aa	3.25±0.61 Ba	8.04±3.55 Bc	1.80±0.60 Aa	5.42±2.72 Aa
	Col	9.91±3.69 Ab	1.33±0.64 Ba	57.57±6.59 Ba	3.19±0.87 Ba	9.21±2.90 Bc	4.13±1.10 Aa	5.64±2.29 Aa
3° nó	Epad	8.61±2.54 Aa	6.25±0.27 Ab	19.60±2.43 Bb	10.40±0.81 Ab	31.23±5.87 Aa	4.18±0.99 ABb	10.30±2.06 Aa
	Epab	9.58±2.88 Ba	5.14±1.59 Ab	30.87±5.21 Bba	14.04±1.06 Aa	26.93±2.47 Aa	2.17±0.61 Ab	3.84±1.31 Aa
	PP	13.63±3.56 Aa	6.81±1.47 Ab	9.34±0.59 Bc	9.42±0.47 Ab	27.82±5.07 Aa	8.82±2.08 Aa	9.82±0.74 Aa
	PE	11.01±3.02 Aa	10.14±1 Aa	24.30±1.57 Cb	9±0.28 Abc	35.18±3.68 Aa	3.47±0.38 Ab	9.82±1.75 Aa
	Xi	14.06±5.29 Aa	5.68±1.65 Ab	25.04±5.25 Bb	4.25±1.98 Ac	8.99±6.34 Ac	5.25±1.25 Aab	9.19±3.52 Aa
	Flo	7.68±3.55 Aa	6.57±1.15 Ab	46.49±1.99 Aa	7.82±2.18 Ab	20.16±0.31 Ab	1.83±0.86 Ab	2.85±0.99 Aa
	Col	6.14±2.20 Aa	9.92±0.46 Aa	42.23±2.91 Ba	7.33±2.13 Abc	20.19±1.79 Ab	4.12±0.59 Ab	5.28±2.24 Aa
5° nó	Epad	4.53±0.56 Ba	0.66±0.22 Bb	61.88±2.33 Ab	1.19±0.43 Ba	22.62±2.58 Aa	7.32±0.76 Aa	9.60±1.34 Aa
	Epab	3.37±1.37 Ba	0.58±0.27 Bb	66.91±4.60 Ab	2.74±0.71 Ba	19.24±3.03 Aa	4.63±1.76 Aab	5.29±0.76 Aa
	PP	8.03±2.46 Aa	1.93±0.75 Bb	53.58±7.84 Ab	3.04±1.05 Ba	18.17±2.05 Ba	4.59±0.88 Bab	10.50±3.87 Aa
	PE	7.80±3.75 Aa	0.77±0.31 Bb	62.78±4.75 Ab	3.01±0.80 Ba	13.28±1.92 Bb	2.79±0.57 Ab	8.68±0.83 Aa
	Xi	9.59±1.38 Aa	4.12±0.38 Aa	29.88±14.79 Bc	4.04±0.09 Aa	9.56±4.60 Ab	5.26±2.82 Aab	9.08±1.95 Aa
	Flo	10.35±1.85 Aa	0.96±0.42 Bb	50.90±7.50 Ab	4.03±0.96 Ba	11.73±3.54 Bb	2.73±1.49 Ab	9.24±3.78 Aa
	Col	3.08±1.07 Aa	0.47±0.36 Bb	84.09±3.60 Aa	2.19±1.56 Ba	10.49±4.44 Bb	1.92±0.41 Ab	6.36±2.83 Aa

*Média ± desvio padrão. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%. Letras maiúsculas comparam diferentes nós na mesma espécie e as letras minúsculas comparam os diferentes tecidos no mesmo nó. Epad: Epiderme da face adaxial; Epab: Epiderme da face abaxial; PP: Parênquima paliçádico; PE: Parênquima esponjoso; Xi: Xilema; Flo: Floema; Col: Colênquima.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Symplocos nitens e *Pera glabrata* apresentam estratégias distintas de resistência ao Al. Enquanto a primeira acumula grandes concentrações do metal em seus tecidos, *P. glabrata* mostra um eficiente mecanismo de exclusão. Em *S. nitens*, a capacidade de acumular Al está associada com características estruturais das folhas e, nesse sentido, destacamos o papel da epiderme como principal sítio de acúmulo desse metal. Como ocorre em outras espécies, as folhas mais velhas de *S. nitens* acumularam maiores quantidades de Al o que evidencia que aspectos do desenvolvimento foliar estão intimamente associados com a capacidade de acumular Al. Além disso, nós destacamos o papel dos compostos fenólicos na capacidade de essa planta acumular Al.

Apesar de *P. glabrata* não acumular Al em quantidades suficientes para ser classificada como uma espécie acumuladora, os dados de quantificação indicam que há a translocação desse metal para as folhas. Através do mapeamento com EDS foi possível registrar a presença do metal em alguns pontos da lâmina foliar, em especial nas folhas de terceiro e quinto nós, sobrepostos com o silício. Sugerimos uma possível neutralização do Al pelo silício na parte aérea dessa planta, que precisa ser melhor compreendido. A detecção do Al pela técnica de EDS também deixa claro a importância da utilização de mais de uma técnica para localizar o Al nos tecidos vegetais.

Concentrações de N e P nas folhas jovens de *P. glabrata* indicam que essa espécie possui uma maior exigência nutricional nos estádios iniciais de desenvolvimento foliar se comparada a *S. nitens*. Uma vez que em *S. nitens* a concentração de Ca em folhas de primeiro nó é similar àquela encontrada em folhas de terceiro e quinto nós, é um indício de que esse elemento tem um papel importante na detoxificação do Al nessas plantas.

Este estudo trás à tona uma questão não explorada em outros trabalhos com plantas do cerrado, que é a relação entre a idade foliar e a capacidade de acumular Al por parte das espécies acumuladoras. Dada a possível diferença na constituição de parede dessas espécies, é importante investigar melhor a constituição dessa estrutura que, juntamente com a sua espessura, está associada com a estratégia de acúmulo em *S. nitens*. Além disso, se faz necessário entender o papel ecológico do Al para essas plantas esclarecendo, por exemplo, o papel deste elemento como estratégia anti herbivoria.