

BRENDA VILA NOVA SANTANA

**ACÚMULO DE ALUMÍNIO EM CLOROPLASTOS: IMPLICAÇÕES
ULTRAESTRUTURAIS E FISIOLÓGICAS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

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

T

S232a
2017

Santana, Brenda Vila Nova, 1992-

Acúmulo de alumínio em cloroplastos : implicações
ultraestruturais e fisiológicas / Brenda Vila Nova Santana. –
Viçosa, MG, 2017.

ix, 35f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Aristéa Alves Azevedo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Plantas - Efeito do alumínio. 2. Plantas do cerrados. 3.
Rudgea viburnoides. 4. *Alibertia edulis*. 5. Cerrados.
6. Fotossíntese. 7. Plantas - Metabolismo. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa
de Pós-graduação em Botânica. II. Título.

CDD 22 ed. 580

BRENDA VILA NOVA SANTANA

ACÚMULO DE ALUMÍNIO EM CLOROPLASTOS: IMPLICAÇÕES
ULTRAESTRUTURAIS E FISIOLÓGICAS

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

APROVADA: 22 de fevereiro de 2017.



Kacilda Naomi Kuki



Cleberson Ribeiro



Aristeia Alves Azevedo

(Orientadora)

**Aos meus pais, Emerson e Nádia, e aos meus irmãos,
Cinthia e Vinni, por serem meu apoio e norte.**

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal de Viçosa, ao Programa de Pós-Graduação em Botânica e ao CNPq, por terem permitido o desenvolvimento desse trabalho, pela oportunidade e suporte financeiro. Obrigada à minha orientadora Aristeia, que se dispôs a compartilhar comigo seus conhecimentos, que teve paciência, criticou, ensinou e acreditou que ia dar certo um projeto novo nas mãos de alguém que era nova. Ao meu co-orientador Adriano, por me ajudar no processamento dos dados, pelas ideias e críticas. Obrigada à Luzimar, que na graduação me preparou para que eu pudesse executar meu mestrado com menos dificuldade e que me pôs nas mãos de alguém tão competente como a Talita. Portanto, obrigada, Tchuca, por todos os seus preciosíssimos ensinamentos, por toda a sua organização, empenho e elogios; muita admiração por você. Por sinal, Grupo do Ferro, o que seria de mim sem vocês? Lala, obrigada por todas as conversas, desabafos, risadas e suspiros europeus; Cris, por todo carinho, confiança e ajuda quando solicitei; e Gui, só Freud nos explica! Obrigada pelo conforto de nossas conversas. Grupo do Alumínio (Samara, Ivanilson, Tiago, Ana Paula, Ivan, Dani Grijó), obrigada pelo auxílio em coletas, pelo convívio e discussões. Agradeço em especial à Samara, pela enorme contribuição e vontade de ensinar, ao Ivanilson, por se dispor todas as vezes em que o procurei e por ter subido em todas as *Salvertia* da FLONA de Paraopeba, e à Dani Grijó, que com toda a sua sagacidade colaborou muito com a minha saga infinita na microscopia eletrônica. Agradeço ao Ângelo, sempre gentil e disposto a resolver os problemas que surgem. A Aurora, Patrícia e todos os anatomistas do quarto andar, pelo cafezinho, pelos biscoitos (valeu, Kati!) e por gerarem uma energia gostosa no laboratório de modo a tornar mais fácil o trabalho diário. Ao Gilmar e todos os funcionários do Núcleo de Microscopia (NMM), pela paciência e ajuda. A Valeria e ao Tanaka, por todas as dicas de microscopia. Ao Sergio Aloquio, pelos socorros. A Aline, Rinamara, Fran, Vitor, Jorge, Franklin e todo o pessoal da UCP que me ajudaram a desenvolver parte de minha pesquisa ali. Ao Gabriel e ao Toninho, pelo sorriso em cada ajuda. À minha família, por me proporcionar o equilíbrio que preciso para lidar com “o mundo lá fora”. A Hugo, pela compreensão, aconchego, motivação e ajuda; muito bom ter você por perto. Aos meus queridos biólogos que “lavaram roupa” comigo mesmo a distância, me fazendo rir e sentir saudade dos bons tempos da graduação.

Em especial, obrigada a Tais, amiga, parceira, confidente, psicóloga; muito obrigada pelas conversas regadas a vinho! Obrigada também ao Joel, amigo do axé, da energia radiante, e à Dani Guedes, por tornar tudo positivo! Aos amigos distantes que ainda assim se fizeram presentes. E também aos presentes que me proporcionaram terças concretas e boas conversas por essa Viçosa. Obrigada a cada um que de algum jeito contribuiu pra essa conquista!

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	4
2.1 Área de estudo e material vegetal.....	4
2.2 Determinação da concentração de Al e nutrientes	4
2.3 Estudo anatômico	5
Microscopia de luz	5
Microscopia eletrônica de transmissão com sonda de raios-X acoplada (MET-EDS).....	6
2.4 Avaliação da atividade fotossintética	6
2.5 Metabolismo primário e secundário	7
Análises bioquímicas	7
Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa.....	8
2.6 Análise estatística	8
3. RESULTADOS.....	8
3.1 Análise do teor de Al e de nutrientes	8
3.2 Estudo anatômico	10
3.3 Avaliação da atividade fotossintética	15
3.4 Metabolismo primário e secundário	17
4. DISCUSSÃO	20
5. CONCLUSÕES	28
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

RESUMO

SANTANA, Brenda Vila Nova, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Acúmulo de alumínio em cloroplastos: implicações ultraestruturais e fisiológicas.** Orientadora: Aristéa Alves Azevedo. Coorientador: Adriano Nunes Nesi.

O alumínio (Al) é um metal tóxico para a maioria das espécies cultivadas e se liga primariamente a tecidos, estruturas e organelas não fotossintetizantes, o que evita, por consequência, o contato do metal com os cloroplastos. Entretanto, em *Rudgea viburnoides*, espécie nativa de Cerrado hiperacumuladora de Al, o metal foi detectado nos cloroplastos sem que efeitos nocivos fossem verificados. Por isso, neste trabalho, dados estruturais, fisiológicos e metabólicos de *R. viburnoides* foram comparados com os de *Alibertia edulis*, espécie nativa de Cerrado não acumuladora de Al, visando avaliar os possíveis efeitos do acúmulo de Al nos cloroplastos. Em área de Cerrado *strictu sensu* da Floresta Nacional (FLONA) de Paraopeba – MG, folhas de primeiro e terceiro nó de ambas as espécies foram selecionadas para quantificação de nutrientes, histolocalização do Al, análise estrutural e química sob microscopia eletrônica de transmissão, avaliação de parâmetros fotossintéticos e de fluorescência, além da análise do metabolismo primário e secundário. A concentração de Al nas folhas de *A. edulis* foi próxima de 1 g Al kg^{-1} de matéria seca (MS), enquanto em *R. viburnoides*, folhas de primeiro nó acumularam 10 g Al kg^{-1} MS e as de terceiro, 16 g Al kg^{-1} MS. Apesar do elevado acúmulo de Al, as espécies estudadas não apresentaram limitação na absorção de nutrientes e houve relação entre a maior concentração de Ca, Mg e Fe e a maior concentração de Al em folhas de terceiro nó de *R. viburnoides*. A histolocalização do Al confirmou a presença do metal em folhas de *R. viburnoides* inclusive no interior dos cloroplastos, enquanto em *A. edulis* o resultado do teste foi negativo. Cloroplastos saudáveis com a presença de plastoglóbulos foram observados em folhas de ambas as espécies e, naquelas de terceiro nó de *R. viburnoides*, o maior número de plastoglóbulos foi associado ao sequestro de Al no seu interior. Apesar de *A*, *g_s* e *E* terem sido maiores em folhas de primeiro nó de *R. viburnoides*, folhas do terceiro nó apresentaram médias equivalentes às de folhas de terceiro nó de *A. edulis*. Com isso, junto aos dados de fluorescência, não foi constatada limitação fotoquímica na fotossíntese em nenhuma das espécies. *A. edulis* apresentou concentrações maiores de amido, aminoácidos e

proteínas em relação a *R. viburnoides*, sugerindo que, na segunda espécie, estes compostos foram degradados e os esqueletos de carbono foram desviados do metabolismo primário para a produção de compostos fenólicos, como flavonoides e fenilpropanoides, os quais agem como antioxidantes e são capazes de quelar o Al. A elevada concentração de Al nas folhas de *R. viburnoides* e a presença do metal nos cloroplastos não gerou comprometimento estrutural e/ou fisiológico da organela, devido aos ajustes metabólicos que a espécie apresentou. O processo de destoxificação de Al foi constituído pelo maior teor de Ca, Mg e Fe nas folhas, pelo maior número de plastoglóbulos e pelo investimento em vias de biossíntese de compostos fenólicos em *R. viburnoides*.

ABSTRACT

SANTANA, Brenda Vila Nova, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2017. **Aluminum accumulation in chloroplasts: ultrastructural and physiological implications.** Adviser: Aristéa Alves Azevedo. Co-adviser: Adriano Nunes Nesi.

Aluminum (Al) is a toxic metal to most cultured species and binds primarily to non-photosynthetic tissues, structures and organelles, thereby avoiding metal contact with chloroplasts. However, in leaves of *Rudgea viburnoides*, a Cerrado native species, Al hyperaccumulator, the metal was detected in the chloroplasts without no harmful effects. Therefore, in this work, structural, physiological and metabolic data of *R. viburnoides* were compared with those of *Alibertia edulis*, a Cerrado native species, Al non-accumulator, to evaluate the possible effects of Al accumulation in chloroplasts. In the Cerrado *strictu sensu* area at the Floresta Nacional (FLONA) de Paraopeba - MG, first and third node leaves of both species were selected for nutrient quantification, Al histolocalization, structural and chemical analysis under transmission electron microscopy, photosynthetic and fluorescence parameters, as well as the analysis of primary and secondary metabolism. The Al concentration in the leaves of *A. edulis* was close to 1g Al kg⁻¹ of dry matter (DM), whereas in *R. viburnoides*, first node leaves accumulated 10g Al kg⁻¹ DM and those of third, 16g Al kg⁻¹ DM. In spite of the high Al accumulation, the studied species did not present limitation on nutrient uptake and there was a relation between the highest Ca, Mg and Fe concentration and the highest Al concentration in third node leaves of *R. viburnoides*. The Al histolocalization confirmed the presence of the metal in leaves of *R. viburnoides* including inside the chloroplasts, whereas in *A. edulis* the test result was negative. Healthy chloroplasts with the presence of plastoglobuli were observed in leaves of both species and, in those of third node of *R. viburnoides*, the greater number of plastoglobuli was associated to the Al sequestration in its interior. Although *A*, *gs* and *E* were larger in first node leaves of *R. viburnoides*, third node leaves presented mean equivalent to that of third node leaves of *A. edulis*. Thus, together with the fluorescence data, no photochemical limitation was observed in photosynthesis in any of the species. *A. edulis* showed higher concentrations of starch, amino acids and proteins than *R. viburnoides*, suggesting that, in the second species, these compounds were degraded and the carbon skeletons were diverted

from the primary metabolism to the production of phenolic compounds such as flavonoids and phenylpropanoids, which act as antioxidants and are able to chelate Al. The high Al concentration in the leaves of *R. viburnoides* and the presence of the metal in the chloroplasts did not generate structural and/or physiological involvement of the organelle due to the metabolic adjustments presented. The Al detoxification process consisted of the higher Ca, Mg and Fe content in the leaves, the higher number of plastoglobuli and the investment in biosynthesis pathways of phenolic compounds in *R. viburnoides*.

1. INTRODUÇÃO

Grande parte das espécies vegetais, principalmente aquelas de interesse econômico, é sensível aos efeitos tóxicos do alumínio (Al) (Brunner & Sperisen, 2013). A toxicidade do metal é o maior fator limitante da produtividade agrícola em solos ácidos ($\text{pH} < 5,5$), os quais ocorrem em uma vasta extensão de terras aráveis do mundo ($\sim 40\%$) e onde o metal está disponível na forma fitotóxica Al^{3+} (von Uexküll & Mutert, 1995; Hede et al., 2001; Kochian et al., 2004). No Cerrado, segundo maior bioma do Brasil, o Al não é tóxico para as espécies vegetais nativas (Haridasan, 2008a), as quais crescem naturalmente em condições ácidas e álicas devido a mecanismos, de exclusão (evitação do Al) ou de tolerância (penetração do Al no simplasto e destoxificação no interior da célula), que conferem resistência às plantas (Haridasan, 1982; Haridasan, 2008; Brunner & Sperisen, 2013).

Uma vez que houve a absorção de Al, os sítios primários de ligação do metal nos órgãos vegetais são tecidos, estruturas e organelas não ativas fotossinteticamente, como a epiderme, a parede celular e o vacúolo, respectivamente (Watanabe & Osaki, 2002; Brunner & Sperisen, 2013). Entretanto, em *Qualea grandiflora* (Vochysiaceae), *Callisthene major* (Vochysiaceae) (Andrade et al., 2011) e *Rudgea viburnoides* (Rubiaceae) (Malta et al., 2016), três espécies nativas de Cerrado tolerantes ao Al, a presença do metal foi detectada também em cloroplastos, organela responsável pela síntese de matéria orgânica e diretamente relacionada à produtividade vegetal (Solymosi & Bertrand, 2011). A ocorrência de Al no interior da organela fotossintetizante havia sido documentada apenas em *Richeria grandis* por Cuenca et al. (1991).

Cuenca et al. (1991) relataram danos às células do parênquima paliçádico de *R. grandis*, entretanto, as espécies nativas de Cerrado não apresentaram sinais aparentes de destruição do tecido mesmo com concentrações acima de 10g Al kg^{-1} de matéria seca foliar (Andrade et al., 2011; Malta et al., 2016). Essas informações são oriundas de análises feitas apenas em microscopia de luz, pouco conclusiva acerca da estrutura cloroplastídica e, portanto, trabalhos com microscopia eletrônica de transmissão (MET) são recomendados a fim de verificar se o sistema de membranas dos cloroplastos está sendo danificado em função da presença de Al ou se, como

esperado, não há prejuízos à estrutura da organela mesmo quando há acúmulo do metal no seu interior. Quando há a entrada de Al no simplasto, estudos em microscopia eletrônica de transmissão revelaram injúrias estruturais nos cloroplastos de folhas de espécies cultivadas, mesmo na ausência do metal na organela (Konarska, 2009; Li et al., 2010; Ali et al., 2015).

Alterações estruturais em complexos de membrana se devem à interação eletrostática entre as cargas positivas do Al^{3+} e as negativas das proteínas e podem gerar alteração funcional de componentes do aparato fotossintético (Hasni et al., 2015), ocasionando redução na taxa de assimilação de carbono, no teor de pigmentos e na atividade do fotossistema II (PSII), avaliada pela razão Fv/Fm (Pereira et al., 2000; Konrad et al., 2005). Em contrapartida, valores da taxa fotossintética de *Q. grandiflora* foram três vezes maiores em plântulas cultivadas sob 150 μM Al do que em plântulas do tratamento controle (0 μM Al) (Andrade et al., 2013, dados não publicados). A organela não tem um papel de armazenamento e/ou de sítio de destoxificação de Al (Andrade et al., 2011), mas uma relação positiva entre o Al e a fisiologia fotossintética de plantas de Cerrado foi sugerida a partir de dados preliminares obtidos por Andrade et al. (2013, dados não publicados). O conhecimento sobre os efeitos do Al na funcionalidade do aparato fotossintético ainda é escasso e mais estudos são necessários, em condições naturais e controladas (Izaguirre-Mayoral & Sinclair, 2005).

O estímulo gerado pelo Al sobre o processo de fixação de carbono em *Q. grandiflora* foi associado ao aumento na atividade de enzimas antioxidantes, sugerindo que a ação do metal nos cloroplastos está conectada à degradação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Andrade et al., 2013). Outros mecanismos de destoxificação são induzidos na presença do metal, como a síntese de ácidos orgânicos (citrato, malato e oxalato), compostos fenólicos, fosfatos inorgânicos, sulfatos e compostos tiolados (Ma et al., 1997; Michalak, 2006; Bhoomika et al., 2014), capazes de se ligar ao Al e conferir resistência à planta. A identificação de centenas de metabólitos e a avaliação de componentes-chave em vias metabólicas em resposta a estresses abióticos é comumente feita pela técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (GC-MS) (Obata & Fernie, 2012), a mais utilizada dentre as análises metabolômicas atualmente.

A ocorrência de alterações estruturais e metabólicos na parte aérea não é necessariamente um efeito direto da toxidez do Al. Injúrias causadas ao sistema radicular são capazes de comprometer a absorção de nutrientes e levar, em última instância, à redução da biomassa vegetal (Vitorello et al., 2005). Embora algumas espécies de Cerrado, resistentes ao Al, sejam capazes de translocar altos teores do metal para suas folhas sem que haja interferência na absorção de outros cátions (Haridasan 1982; Haridasan 2008b; Malta et al. 2016), em geral, a absorção de fósforo, potássio, cálcio e magnésio é reduzida em resposta ao Al (Vitorello et al., 2005; Nunes-Nesi et al., 2014), evidenciando a importância de avaliação do perfil nutricional dos organismos vegetais em estudos com Al.

As espécies de Cerrado hiperacumuladoras de Al, classificadas como aquelas que acumulam mais que 1g Al kg^{-1} de matéria seca foliar, são representadas principalmente pelas famílias Vochysiaceae, Melastomataceae e Rubiaceae (Haridasan, 1982; Jansen et al., 2002), sendo a Rubiaceae detentora do maior número de espécies hiperacumuladoras e a capacidade de tolerar Al, um caráter quimiotaxonômico da subfamília Rubioideae (Jansen et al., 2000). Na Floresta Nacional (FLONA) de Paraopeba, localizada em Minas Gerais, espécies resistentes ao Al da família Rubiaceae podem ser encontradas em ampla distribuição, como *Alibertia edulis* e *R. viburnoides* (Neri, 2007), selecionadas para o presente estudo por serem, respectivamente, uma espécie não acumuladora de Al (Silva 2015) e uma hiperacumuladora, com localização de Al em diversos compartimentos celulares, inclusive nos cloroplastos (Malta et al., 2016).

Diante (i) da localização inusitada de Al no interior de cloroplastos de espécies nativas de Cerrado, (ii) da escassez de informação acerca das implicações desse fato e (iii) da possível relação positiva entre o Al e o processo fotossintético, este trabalho objetivou avaliar a estrutura e a funcionalidade de cloroplastos de *R. viburnoides*, bem como as respostas metabólicas que lhe conferem resistência quando há a presença de Al nos cloroplastos, comparando os dados obtidos com os de *A. edulis*, uma espécie não acumuladora da mesma família botânica, utilizada como referência. Espera-se que a estrutura e a atividade do aparato fotossintético de *R. viburnoides* não estejam sendo prejudicadas pela presença de Al nos cloroplastos e

que haja elevado investimento em vias de biossíntese de compostos capazes de quelar o Al por parte de *R. viburnoides*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de estudo e material vegetal

O estudo foi realizado no início da estação seca (abril) do ano de 2016 em área de Cerrado *stricto sensu* sobre Cambissolo da Floresta Nacional (FLONA) de Paraopeba, localizada nas coordenadas geográficas 19°20'S e 44°20'W. O solo da área em estudo apresenta elevado teor de Al^{3+} , com valores em torno de 1,94 $\text{cmol}_c/\text{dm}^3$, e pH em torno de 4,81 (Neri et al., 2012).

Sete árvores de *Alibertia edulis* (Rich.) A. Rich. ex DC. e de *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth., com altura superior a dois metros, foram selecionados para as coletas do presente estudo. Para todas as análises, foram coletadas folhas do primeiro e do terceiro nó de cada um dos indivíduos (Fig. 1), tendo como princípio a ideia de que folhas mais velhas acumulam mais Al que folhas jovens devido ao maior tempo de transpiração e consequente maior translocação do metal para seus tecidos (Shen & Ma, 2001; Carr et al., 2003). Foram utilizadas as identificações Ae1 e Ae3 para folhas de primeiro e terceiro nó de *A. edulis* e Rv1 e Rv3 para folhas de primeiro e terceiro nó de *R. viburnoides*.

2.2 Determinação da concentração de Al e nutrientes

Para a determinação da concentração de Al e demais nutrientes, folhas de ambas as espécies foram coletadas em campo e secas em estufa a 70°C até que o peso seco constante fosse atingindo. O material foi triturado em moinho de facas e peneiradas em dimensão menor que 1 mm. Para determinação das concentrações de Al, cálcio (Ca), magnésio (Mg), ferro (Fe), fósforo (P) e enxofre (S) os extratos foram obtidos a partir de digestão em solução nitroperclórica (Malavolta et al., 1989). Os teores de Al, Ca, Mg e Fe foram determinados por absorção atômica e o de P e S, por determinação colorimétrica. O teor de nitrogênio (N) foi determinado pelo

método Kjeldahl, por meio de digestão feita com ácido sulfúrico (Bataglia et al., 1983).

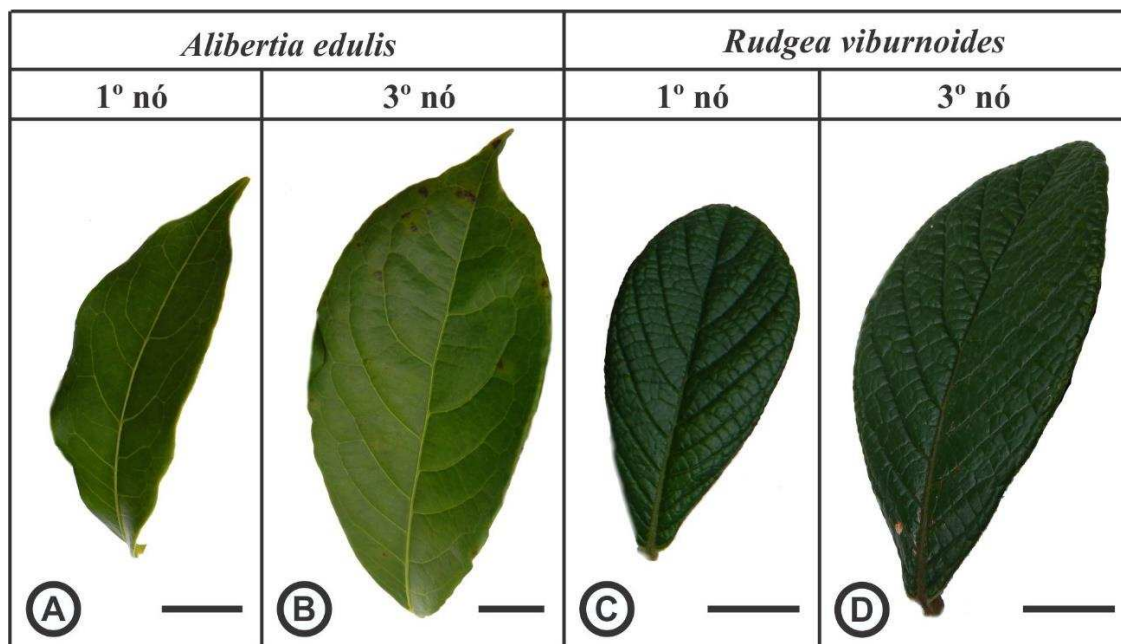


Figura 1. Morfologia das folhas de primeiro e terceiro nós de *Alibertia edulis* e *Rudgea viburnoides* coletadas em área de Cerrado *stricto sensu* ocorrente sobre solo com elevado teor de Al^{3+} . Barra: 2 cm.

2.3 Estudo anatômico

Microscopia de luz

Amostras da região mediana das folhas de ambas as espécies foram fixadas em FAA50 (Johansen, 1940), desidratadas em série etílica, incluídas em glicolmetacrilato (Historesin, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha) e seccionadas transversalmente a 6 μ m de espessura em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA). Para caracterização, os cortes foram submetidos ao reagente Azul de Toluidina durante 15 minutos, enquanto para a histolocalização do Al, utilizou-se o reagente Chrome Azurol S 0,5% (Kukachka & Miller, 1980) por 60 minutos. Após lavagem em água destilada e secagem, os cortes foram montados em Permount entre lâmina e lamínula. As observações e a documentação fotográfica foram realizadas em fotomicroscópio (modelo AX70 TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) com câmera digital acoplada (Zeiss AxioCam HR3, Zeiss, Göttingen, Alemanha). Foi realizado

um controle em paralelo ao teste histoquímico, no qual as secções não foram submetidas ao reagente Chrome Azurol S 0,5%.

Microscopia eletrônica de transmissão com sonda de raios-X acoplada (MET-EDS)

Para o estudo da estrutura dos cloroplastos e para a identificação de possíveis sítios de acúmulo de Al, amostras da região mediana das folhas de *A. edulis* e *R. viburnoides* foram coletadas e fixadas em solução de glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (4%), em tampão cacodilato 0,1M (pH 7,2) (Karnovsky, 1965), lavadas no mesmo tampão, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% por uma hora, lavadas em água destilada e contrastadas em bloco com acetato de uranila 0,5%. Posteriormente, as amostras foram submetidas à desidratação com acetona e incluídas em resina Spurr (Spurr, 1969). Após a inclusão, cortes ultrafinos foram feitos com navalha de diamante em ultramicrotomo (RMC Products, Power Tome-X, AZ, USA) e afixados em grids de cobre para que fossem, então, contrastados com acetato de uranila 5% e citrato de chumbo 0,4%. Foram selecionadas três áreas para análise: tilacóide, amido e plastoglóbulo (quando presente), em microscopia eletrônica de transmissão com sonda de raios-X acoplada (MET-EDS, modelo Tecnai G2-20, SuperTwin FEI) pertencente ao Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

2.4 Avaliação da atividade fotossintética

Com o auxílio do medidor portátil LI-6400 (IRGA, LI-COR Biosciences Inc., Nebraska, USA), foram determinadas a taxa de assimilação líquida de CO₂ (A , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), a condutância estomática (g_s , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), a concentração interna de CO₂ (C_i) e a transpiração (E , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A indução da fotossíntese foi realizada sob radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, densidade de fluxo de fótons de 330 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura da câmara foliar estável a 25°C. Foram realizadas dez leituras no intervalo de 1 minuto em cada folha. As reações da fase fotoquímica, ocorrentes nos tilacóides, foram avaliadas indiretamente pelo padrão de emissão de fluorescência de *A. edulis* e *R. viburnoides*. As medidas de variáveis da fluorescência foram feitas com o auxílio de um fluorímetro de luz modulada MINI-

PAM (Walz, Germany). Após a adaptação ao escuro por 30 minutos com auxílio de pinças, foram determinadas a fluorescência inicial (F_0) e a fluorescência máxima (F_m), a partir das quais foi calculada a eficiência quântica máxima do fotossistema II, por meio da fórmula: F_v/F_m , onde $F_v = F_m - F_0$ (Pereira et al., 2000). Em folhas adaptadas à luz, foram obtidos valores de fluorescência antes do pulso de saturação (F_s) e de fluorescência máxima (F_m'), a partir dos quais foi calculado o coeficiente de extinção não fotoquímico [$NPQ = (F_m - F_m')^{-1}$] e taxa de transporte aparente de elétrons { $ETR = [(F_m' - F_s)/F_m'] * 0,5 * 1000 * 0,84$ }, cujos fatores 0,5, 1200 e 0,84 significam fração de excitação distribuída para o FSII, fluxo de fótons fotossinteticamente ativos para indução da fotossíntese e fração de luz absorvida, respectivamente, conforme descrito por Konrad et al. (2005). Estas avaliações foram realizadas no período da manhã, entre 07h30min e 10h00min, em folhas de primeiro e terceiro nó de *A. edulis* e *R. viburnoides*.

2.5 Metabolismo primário e secundário

Análises bioquímicas

Folhas de *A. edulis* e *R. viburnoides* foram coletadas em nitrogênio líquido ao meio dia e os componentes do metabolismo primário foram extraídos em etanol, conforme descrito por Gibon et al. (2004) e Nunes-Nesi et al. (2005 e 2007). A fração solúvel foi utilizada para determinação de clorofila *a*, clorofila *b* e aminoácidos, enquanto o material insolúvel precipitado foi utilizado para quantificação de amido e proteína total. A determinação do conteúdo de clorofila foi feita de acordo com o protocolo descrito por Porra et al. (1989), em leitor de microplaca a 645 e 665 nm para clorofila *b* e *a*, respectivamente. A quantificação de amido foi feita segundo a metodologia proposta por Fernie et al. (2001), a 340 nm, enquanto aminoácidos e proteínas foram analisados segundo metodologia descrita por Cross et al. (2006) com leituras feitas a 570 e 595 nm, respectivamente. Uma curva padrão com leucina foi realizada para quantificação de aminoácido e uma com albumina do soro bovino (BSA) para a quantificação de proteínas.

Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

Para identificação detalhada dos metabólitos e avaliação de componentes-chave em vias metabólicas em resposta ao Al, folhas de *A. edulis* e *R. viburnoides* foram coletadas em nitrogênio líquido ao meio dia e os metabólitos foram extraídos, conforme metodologia descrita por Lisec et al. (2006). Após a secagem das amostras em concentrador a vácuo sem aquecimento, foi feita a derivatização, com adição do reagente de metoxiaminação e de N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA) às amostras. Alíquotas foram transferidas para *vial* de injeção e analisadas em sistema de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS). Os metabólitos foram identificados por comparação com bibliotecas de massa espectrais de compostos derivados de trimetilsilício (TMS) obtido do Instituto Max Planck de Fisiologia Molecular Vegetal (<http://csbdb.mpimp-golm.mpg.de/csbdb>) e os espectros de massa foram avaliados usando o software TargetSearch (Cuadros-Inostroza et al., 2009). A área dos picos cromatográficos de cada metabólito foi normalizada baseada no peso fresco e mediana dos dados da amostra. As proporções relativas dos metabólitos foram comparadas às médias das folhas de primeiro nó de *A. edulis*.

2.6 Análise estatística

Após a normalização dos dados, as médias foram comparadas pelo teste t de Student, a 5% de probabilidade, aos seguintes pares: i) folhas de primeiro e terceiro nó de *A. edulis*, ii) folhas de primeiro e terceiro nó de *R. viburnoides*, iii) folhas de primeiro nó de *A. edulis* e *R. viburnoides*, e iv) folhas de terceiro nó de *A. edulis* e *R. viburnoides*. Foram utilizadas sete repetições.

3. RESULTADOS

3.1 Análise do teor de Al e de nutrientes

Dados de perfil nutricional constam na Tabela 1. Diferenças significativas foram observadas principalmente entre folhas de *R. viburnoides*, na qual maiores teores de N, P, K e Cu foram registrados em folhas de primeiro nó, enquanto Ca, Fe e

Tabela 1. Concentração de macronutrientes, micronutrientes e alumínio na matéria seca foliar de *Alibertia edulis* e *Rudgea viburnoides*

	<i>Alibertia edulis</i>			<i>Rudgea viburnoides</i>		
	1º nó	3º nó	Σ	1º nó	3º nó	Σ
Macronutrientes (dag/kg)						
N	1.63±0.16 aA	1.48±0.23 aA	3.11±0.08 A	1.52±0.09 aA	1.21±0.08 bA	2.73±0.16 A
P	0.07±0.01 aA	0.07±0.01 aA	0.14±0.00 A	0.06±0.00 aB	0.04±0.00 bB	0.10±0.01 A
K	1.32±0.19 aA	1.20±0.16 aA	2.52±0.06 A	1.28±0.24 aA	0.70±0.11 bB	1.98±0.29 A
Ca	0.71±0.10 aA	0.73±0.10 aB	1.44±0.01 A	0.81±0.18 bA	1.24±0.23 aA	2.05±0.22 A
Mg	0.30±0.03 aB	0.27±0.04 aB	0.57±0.02 A	0.49±0.06 aA	0.39±0.10 aA	0.88±0.05 A
S	0.18±0.01 aA	0.12±0.02 bA	0.30±0.03 A	0.11±0.02 aB	0.09±0.01 aB	0.20±0.01 A
Micronutrientes (mg/kg)						
Cu	4.49±0.58 aA	3.91±0.47 aB	8.40±0.29 A	5.25±0.47 aA	4.56±0.41 bA	9.81±0.34 A
Fe	80.1±17.73 aA	69.19±7.79 aB	149.29±5.45 B	90.99±15.19 bA	329.62±138.66 aA	420.61±119.32 A
Zn	26.31±4.75 aA	20.92±2.88 aA	47.23±2.69 A	19.47±2.83 aB	18.69±2.57 aA	38.16±0.39 A
Mn	301.13±58.48 aA	348.73±49.43 aA	649.86±23.80 A	83.71±18.51 aB	116.84±26.31 aB	200.55±16.56 B
Alumínio (g/kg)						
Al	0.92±0.20 aB	1.16±0.39 aB	2.08±0.12 B	10.28±1.87 bA	16.04±2.26 aA	26.33±2.88 A

N: Nitrogênio, P: Fósforo, K: Potássio, Ca: Cálcio, Mg: Magnésio, S: Enxofre, Cu: Cobre, Fe: Ferro, Zn: Zinco, Mn: Manganês, Al: Alumínio

Em uma mesma linha, médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste t de Student a 5% de probabilidade. Letras minúsculas comparam folhas de primeiro e terceiro nó dentro de uma mesma espécie e letras maiúsculas, folhas de mesmo nó em espécies diferentes

Al se apresentaram em maior concentração nas folhas de terceiro nó. Mg, S e os micronutrientes Zn e Mn não diferiram estatisticamente em *R. viburnoides*. Os valores de quantificação dos elementos em *A. edulis* não diferiram significativamente entre folhas coletadas a partir do primeiro e do terceiro nó, com exceção para os valores de enxofre, maiores nas folhas de primeiro nó. Ao comparar as duas espécies, foi observado maior teor de P, S e Mn em folhas de primeiro e terceiro nó de *A. edulis*, enquanto folhas de *R. viburnoides* apresentaram maior teor de Mg e Al. Os teores de Al detectados no órgão foliar de *A. edulis*, foram, em média, 0,92 e 1,16 g kg⁻¹ em folhas de primeiro e terceiro nó, respectivamente, e em *R. viburnoides*, 10,28 e 16,04 g kg⁻¹.

3.2 Estudo anatômico

As imagens de anatomia foliar permitiram definir folhas de primeiro e terceiro nó de ambas as espécies como maduras, uma vez que todos os seus tecidos encontraram-se diferenciados independentemente do nó amostrado (Fig. 2). As folhas de ambas as espécies são dorsiventrais, hipoestomáticas e a epiderme pode conter 1 ou 2 estratos. Em folhas de primeiro nó de *R. viburnoides*, em geral, a epiderme apresentava apenas um estrato (Fig. 2G e 2H) e cavidades secretoras foram observadas no mesofilo de *A. edulis*.

O teste histoquímico com o uso do reagente Chrome Azurol S 0,5% evidenciou a presença de alumínio em todos os tecidos foliares de *R. viburnoides* (exceto nas paredes lignificadas do xilema e das fibras) (Fig. 2H e 2L) e seu resultado foi negativo em folhas de *A. edulis* (Fig. 2B e 2E). A reação positiva, indicada pela formação de uma coloração azulada, confirmou a presença de Al no interior de cloroplastos de *R. viburnoides* (Fig 2H e 2L), os quais foram avaliados então sob a microscopia eletrônica de transmissão com sonda de raios-X acoplada. Os cloroplastos de ambas as espécies apresentaram formato regular, mais arredondados em *A. edulis* e alongados em *R. viburnoides*, tilacóides ordenados, abundância de grãos de amido, sendo estes mais pronunciados em folhas de *A. edulis* (Fig 3A-C). Em folhas de terceiro nó de *R. viburnoides* foram observados, por vezes, espaços entre as membranas do tilacóide e alta incidência de plastoglóbulos (Fig. 3E e 3F).

Em *A. edulis*, também em folhas de terceiro nó, plastoglôbulos foram verificados com frequência no interior da organela (Fig. 3B e 3C).

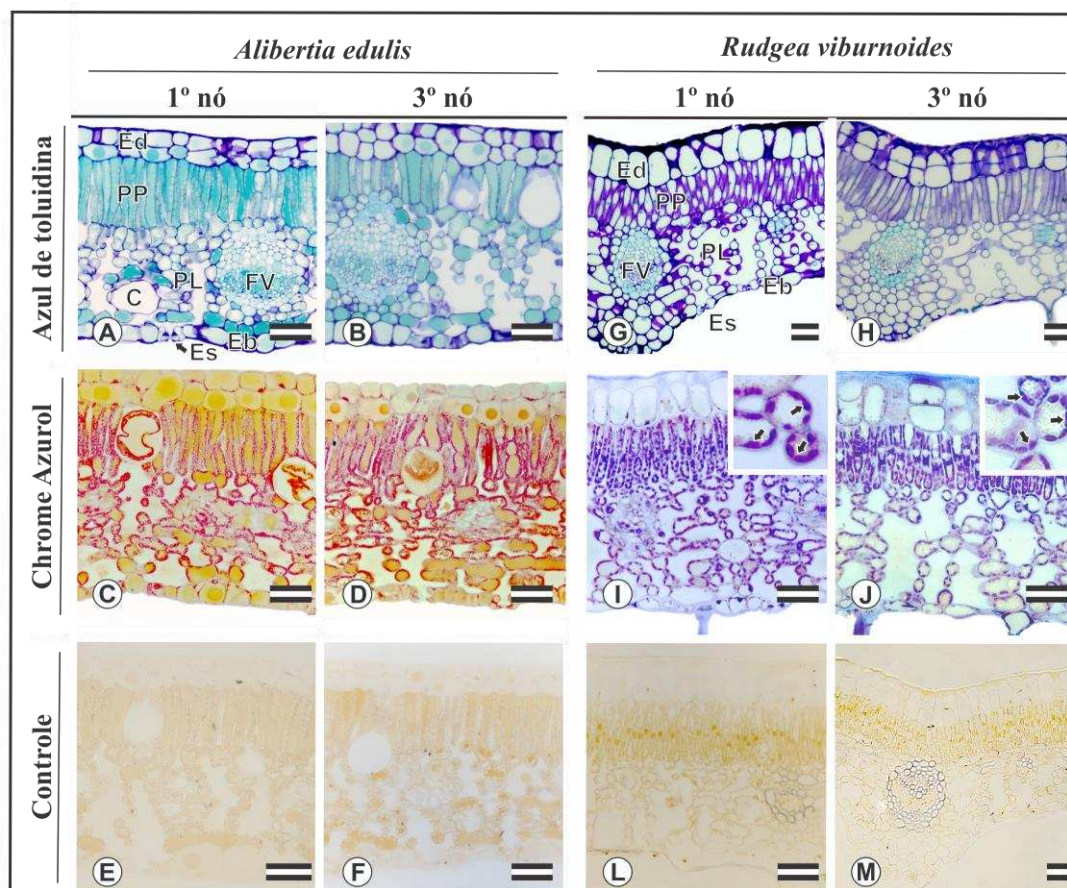


Figura 2. Folhas de primeiro (A, C, E, G, I, L) e terceiro nó (B, D, F, H, J, M) de *Alibertia edulis* (A-F) e *Rudgea viburnoides* (G-M). Cortes transversais corados com azul de toluidina (A, B, G, H) e o reagente histoquímico para detecção de Al, Chrome Azurol S (C, D, I, J). A cor azulada em I e J indica reação positiva ao reagente. E, F, L, M: Controle do teste histoquímico realizado em paralelo. C: Cavidade secretora; Eb: Epiderme abaxial; Ed: Epiderme adaxial; Es: Estômato; FV: Feixe vascular; PL: Parênquima lacunoso; PP: Parênquima paliádico; Setas nos detalhes em I e J: presença de Al nos cloroplastos. Barra: 50 μ m.

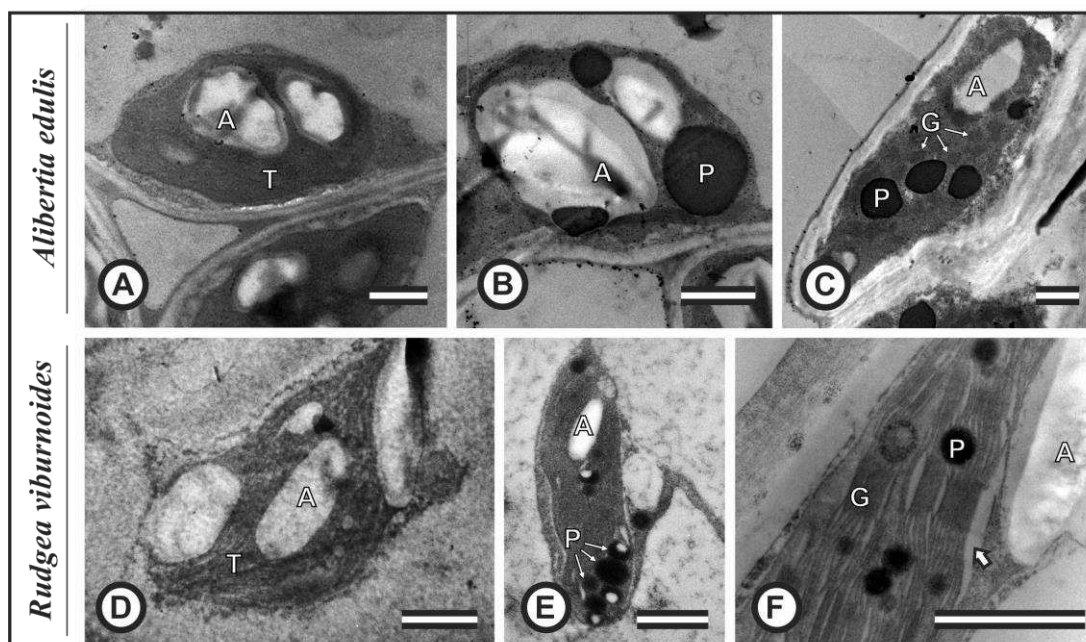


Figura 3. Cloroplastos de *Alibertia edulis* (A-C) e *Rudgea viburnoides* (D-F) em microscopia eletrônica de transmissão, evidenciando a presença de plastoglóbulos em folhas de terceiro nó de ambas as espécies (B, C, E, F) e o espaço intermembrana em folhas de terceiro nó de *R. viburnoides* (F). A e D: Cloroplastos de folhas de primeiro nó. B, C, E e F: Cloroplastos de folhas de terceiro nó. Seta: espaço intermembrana, A: Amido, G: *Granum*, P: Plastoglóbulo, T: Tilacóide.

A identificação de elementos minerais por meio da emissão de raios-X em MET foi comprometida por falha técnica: o ósmio, utilizado durante o processo fundamental de contrastação de membranas, apresentou elétrons da camada Mz com energia de raio-X coincidente com a dos elétrons da camada Ka do Al, fato esse que impossibilitou afirmar qual o elemento responsável pela formação de picos no espectro quando a energia de raio X era correspondente a 1,48 keV (Fig. 4 e 5). Apenas em folhas de terceiro nó de *R. viburnoides*, o espectro de raios-X evidenciou a presença de Al nos grãos de amido ao mesmo tempo em que não identificou raios-X oriundos do elemento ósmio (Fig. 5). A quantidade dos elementos em geral se mostrou abaixo do limite de detecção do equipamento, sendo detectados em evidência apenas o carbono (C), o oxigênio (O) e os elementos utilizados para processamento do material: ósmio (Os), chumbo (Pb), urânio (U), cobre (Cu) e silício (Si).

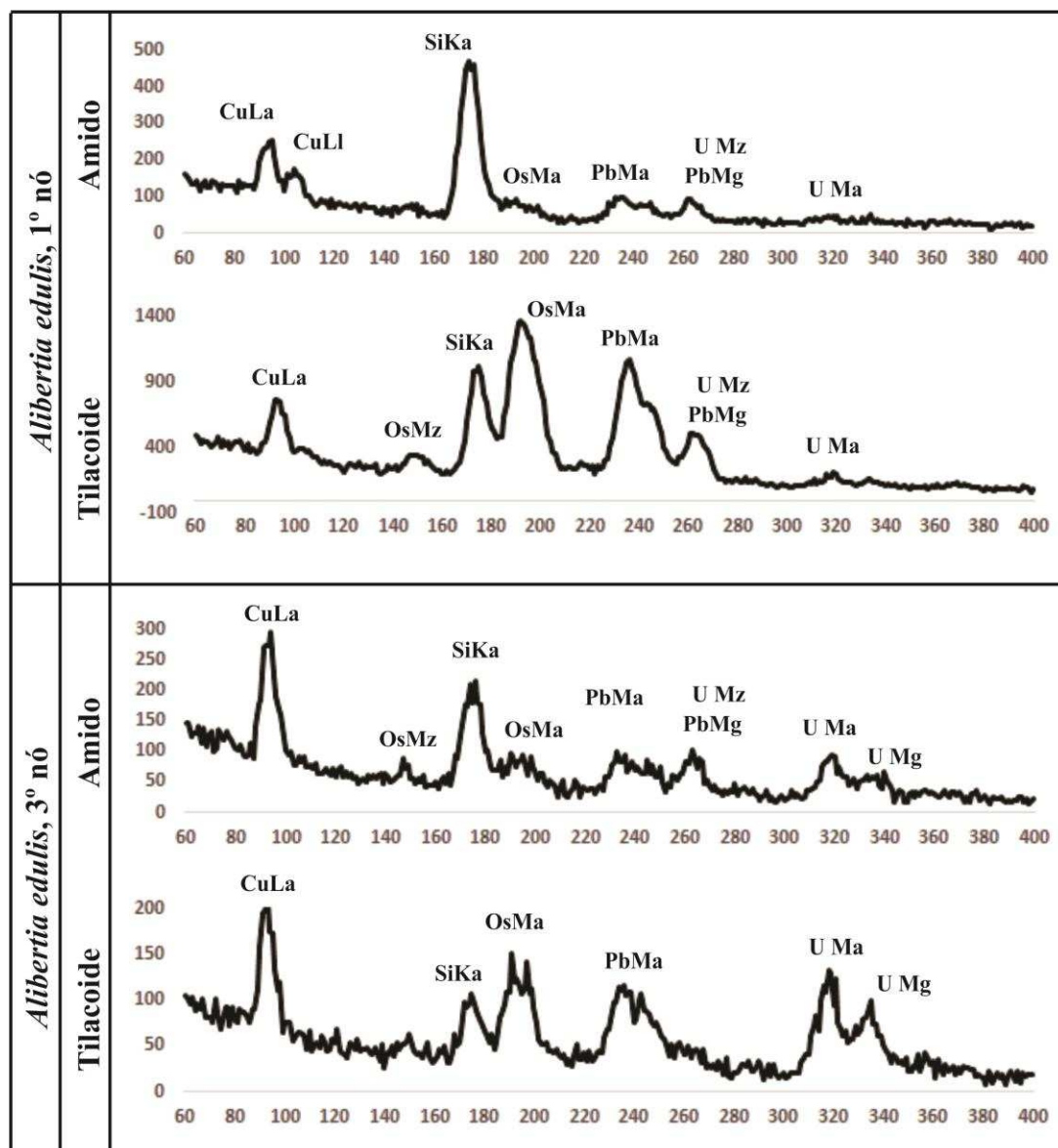


Figura 4. Caracterização elemental de cloroplastos de folhas de primeiro e terceiro nó de *Alibertia edulis*, determinada através da técnica de MET-EDS. As concentrações relativas são expressas em contagem por segundo (cps) e as energias de raio-X em keV. Cu: Cobre; Os: Ósmio; Pb: Chumbo; Si: Silício; U: Urânio. Ka, La, Ll, Ma, Mg, Mz: camadas de distribuição dos elétrons.

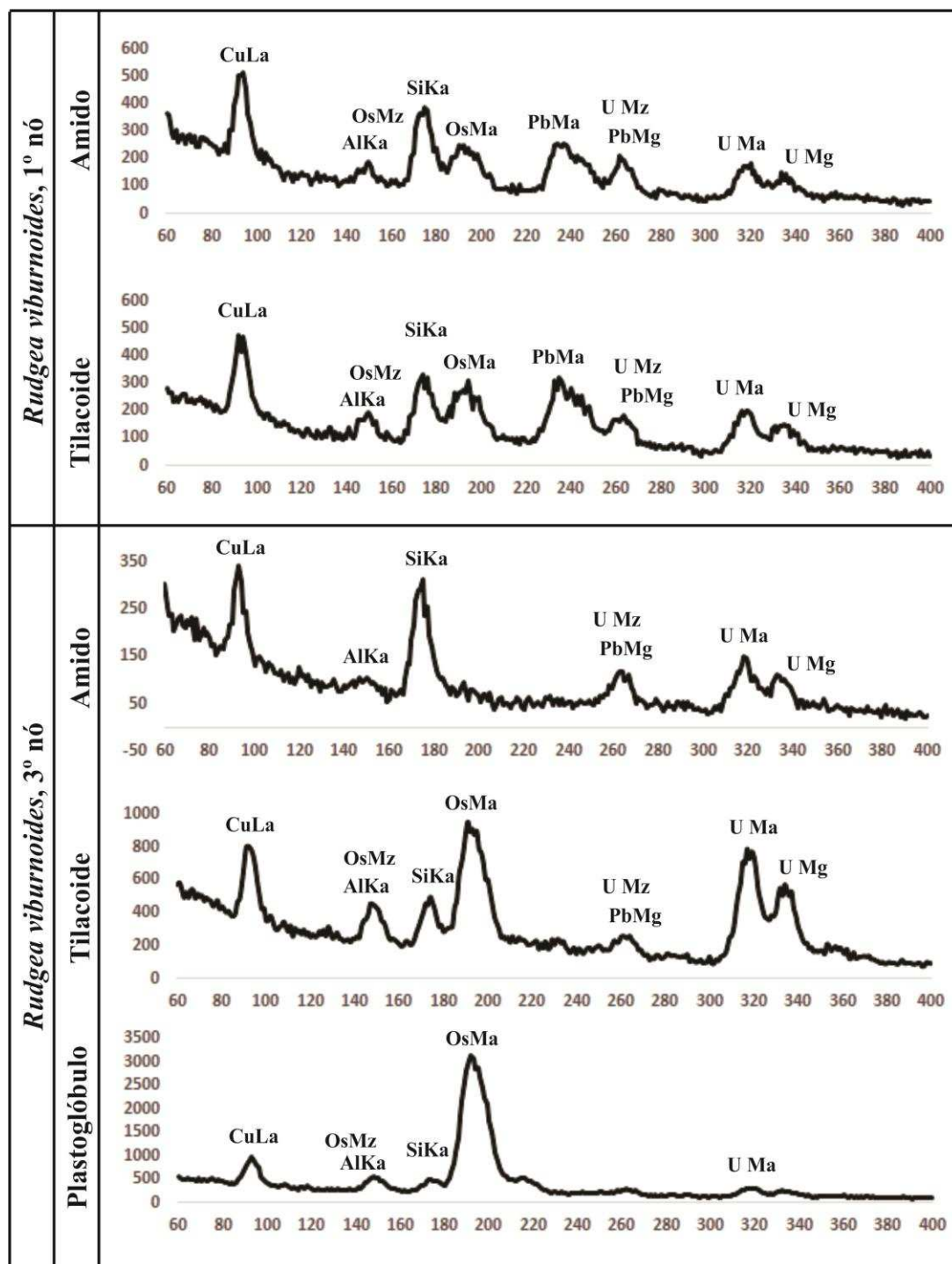


Figura 5. Caracterização elemental de cloroplastos de folhas de primeiro e terceiro nó de *Rudgea viburnoides*, determinada através da técnica de MET-EDS. No amido de folhas de terceiro nó de *R. viburnoides* é evidenciada a presença de Al sem que haja detecção de Os. As concentrações relativas são expressas em contagem por segundo (cps) e as energias de raio-X em keV. Al: Alumínio; Cu: Cobre; Os: Ósmio; Pb: Chumbo; Si: Silício; U: Urânio. Ka, La, Ll, Ma, Mg, Mz: camadas de distribuição dos elétrons.

3.3 Avaliação da atividade fotossintética

Folhas de primeiro e terceiro nó de *A. edulis*, espécie não acumuladora de Al, não apresentaram diferença significativa entre os dados de fotossíntese analisados, ao passo que, em *R. viburnoides*, espécie acumuladora, folhas de primeiro nó apresentaram maior taxa de assimilação líquida de carbono (A), maior condutância estomática (g_s) e maior relação A/C_i , quando comparadas às folhas de terceiro nó (Fig. 6). Os valores de concentração de carbono interno (C_i), transpiração (E), rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_m), *quenching* não fotoquímico (NPQ) e taxa de transporte de elétrons (ETR) não diferiram entre espécies e nem entre folhas de diferentes nós (Fig. 6). Os valores de F_v/F_m foram registrados acima de 0,75 independentemente da espécie e do nó coletado. Entre espécies, é interessante ressaltar que as taxas de assimilação de carbono não diferiram entre folhas de terceiro nó de *A. edulis* e *R. viburnoides*, enquanto o contrário foi observado para suas folhas de primeiro nó, sendo a maior média atribuída àquelas de *R. viburnoides*.

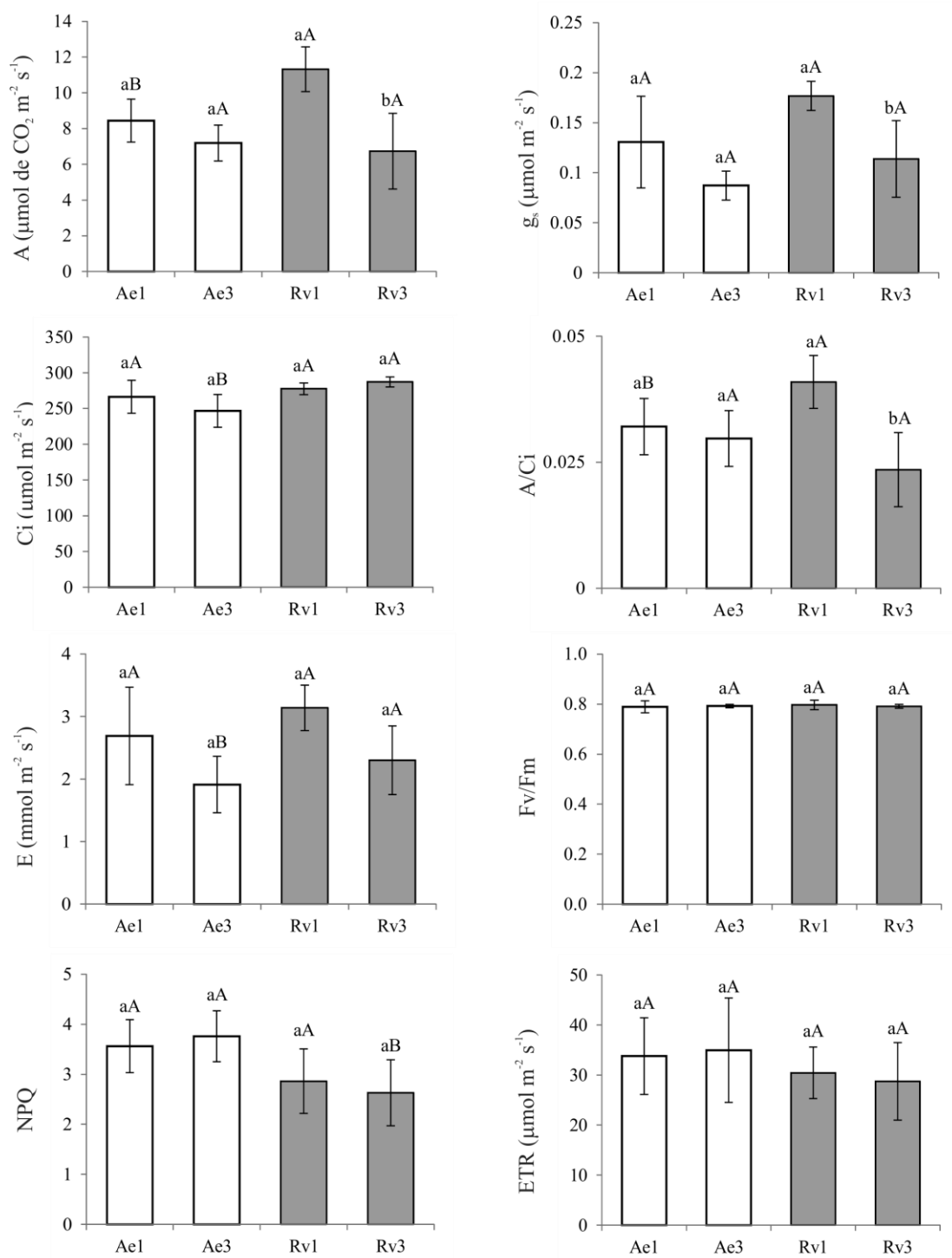


Figura 6. Parâmetros fotossintéticos avaliados em folhas de primeiro e terceiro nó de *Alibertia edulis* (Ae1 e Ae3) e *Rudgea viburnoides* (Rv1 e Rv3). A: taxa de assimilação líquida de CO_2 ; g_s :condutância estomática; Ci: concentração interna de CO_2 ; E: transpiração; Fv/Fm: rendimento quântico máximo da atividade do fotossistema II; ETR: taxa de transporte de elétrons; NPQ: *quenching* não-fotoquímico. Barra: desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste t de Student a 5% de probabilidade. Letras minúsculas comparam folhas de primeiro e terceiro nó dentro de uma mesma espécie e letras maiúsculas, folhas de mesmo nó em espécies diferentes.

3.4 Metabolismo primário e secundário

Os resultados obtidos para quantificação de amido, aminoácidos, clorofilas e proteína total não diferiram entre os diferentes nós de uma mesma espécie (Fig. 7). Os valores de clorofila *a*, clorofila *b* e clorofila total foram maiores em *R. viburnoides*, ao passo que maior teor de amido, aminoácido e proteína foi verificado em *A. edulis* (Fig. 7). A razão entre clorofila *a/b* não diferiu entre espécies e nem entre nós, portanto, não houve alteração nas suas proporções mesmo com a variação no teor de Al acumulado. Verificou-se também que ácidos orgânicos e aminoácidos, não tiveram seus níveis alterados entre as folhas de primeiro e terceiro nó de *A. edulis* ou de *R. viburnoides*. Em *A. edulis*, o perfil metabólico de folhas de primeiro nó foi bastante semelhante ao de terceiro nó, enquanto em *R. viburnoides*, alterações foram observadas principalmente no teor de açúcares e em compostos do metabolismo secundário. Os açúcares 1-cestose, galactinol, glucarato, sorbose e talose foram mais abundantes em folhas de primeiro nó de *R. viburnoides*, enquanto folhas de terceiro nó apresentaram aumento relativo de gluconato-6-fosfato, alose e salicina. Quanto aos metabólitos secundários, flavonona, chiquimato, miricetina e taxifolin apresentaram-se em maior teor nas folhas de primeiro nó, e apenas o 4-coumarato esteve em maior proporção nas folhas de terceiro nó de *R. viburnoides*. Em relação ao comportamento das duas espécies, *R. viburnoides* apresentou maior proporção de aminoácidos, açúcares e compostos do metabolismo secundário, sendo as diferenças atribuídas principalmente à comparação entre folhas de primeiro nó de *A. edulis* e *R. viburnoides*. As concentrações relativas de ácidos orgânicos não diferiram entre espécies.

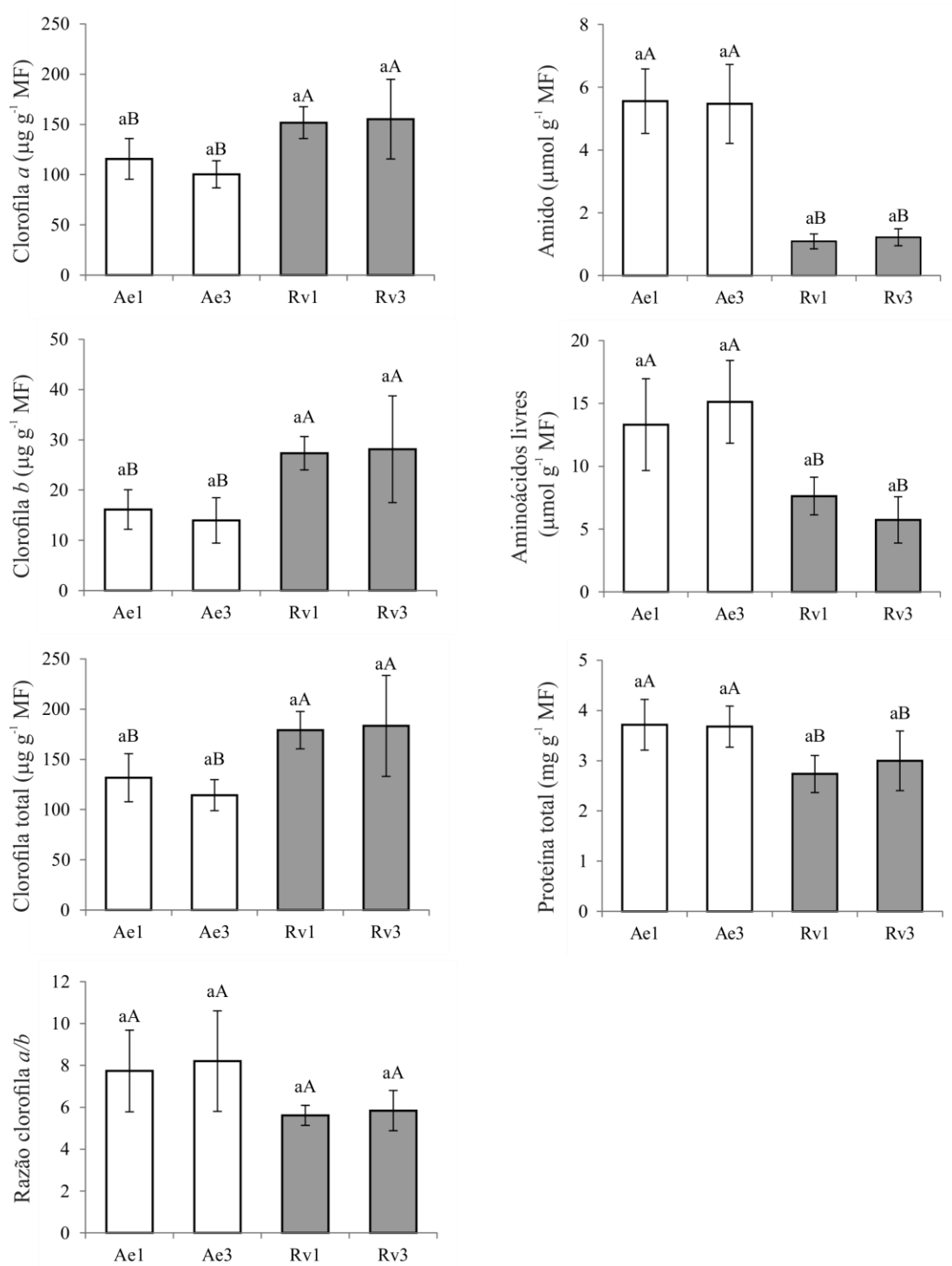


Figura 7. Concentração de pigmentos cloroplastídicos, amido, proteína total e aminoácidos livres em folhas de primeiro e terceiro nó de *Alibertia edulis* (Ae1 e Ae3) e *Rudgea viburnoides* (Rv1 e Rv3). Barra: desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste t de Student a 5% de probabilidade. Letras minúsculas comparam folhas de primeiro e terceiro nó dentro de uma mesma espécie e letras maiúsculas, folhas de mesmo nó em espécies diferentes.

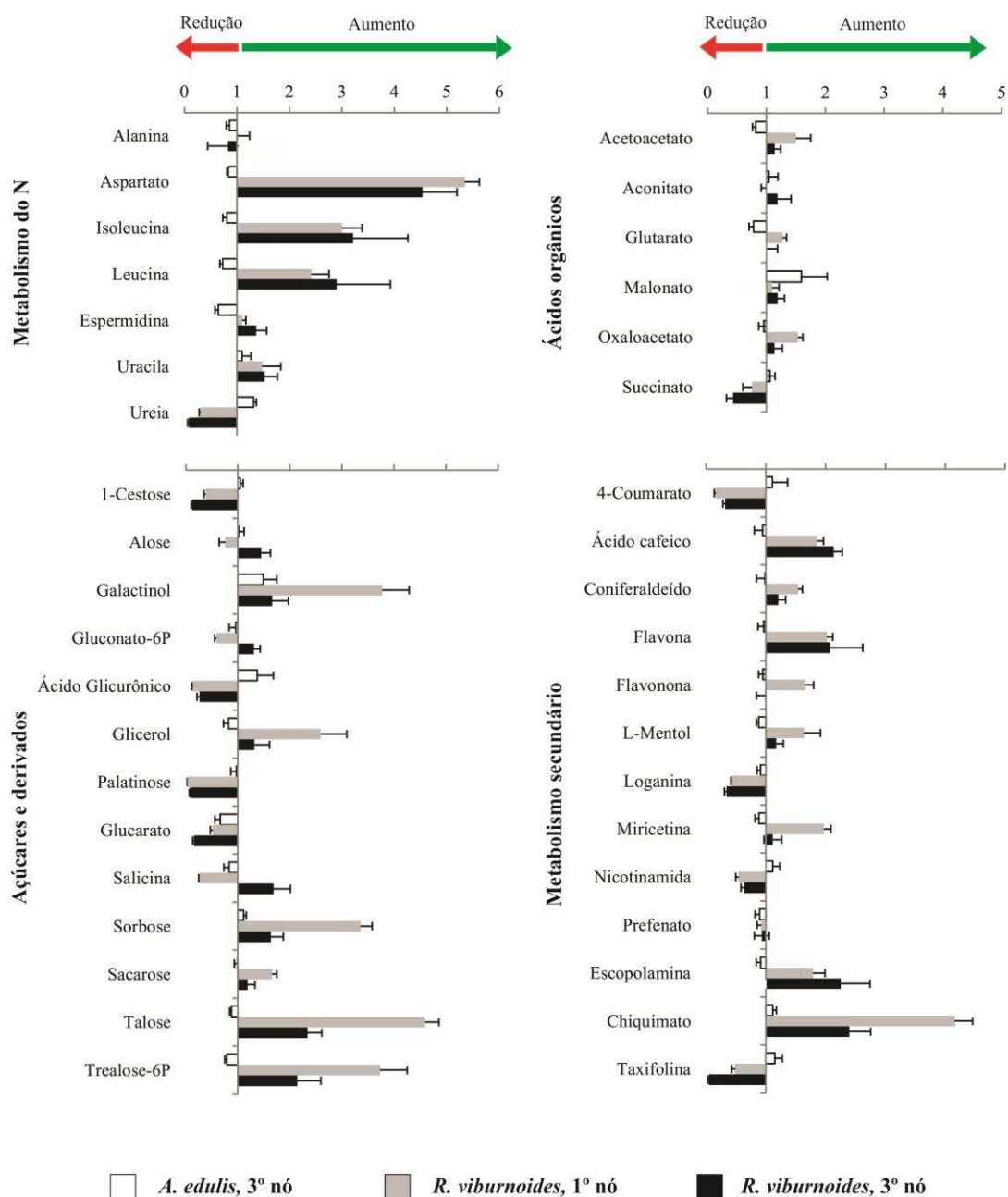


Figura 8. Alterações relativas no conteúdo dos metabólitos de folhas de terceiro nó de *Alibertia edulis* e de primeiro e terceiro nó de *Rudgea viburnoides*. Médias de folhas de primeiro nó de *A. edulis*, às quais foi atribuído o valor 1, foram utilizadas para normalização das demais. Barras do lado direito da linha central indicam aumento relativo do conteúdo de metabólitos em relação a folhas de primeiro nó de *A. edulis* e barras do lado esquerdo da mesma linha, redução relativa. Barra: erro padrão.

4. DISCUSSÃO

A quantificação de Al na matéria seca foliar determinou que ambas as espécies de Cerrado em estudo são, por definição, espécies tolerantes ao Al, uma vez que o metal penetrou o simplasto de suas células e foi translocado para a parte aérea (Brunner & Sperisen, 2013). Embora *A. edulis* seja descrita como uma espécie não acumuladora, com grande parte do Al concentrado na parede celular dos tecidos radiculares (Silva, 2015), suas folhas acumularam teores acima de 1g Al kg^{-1} matéria seca foliar (Chenery, 1948) sem que ocorresse o comprometimento do metabolismo vegetal. O perfil nutricional de *A. edulis* apresentou valores compatíveis àqueles obtidos por Silva (2015) e evidenciou níveis satisfatórios dos nutrientes se comparados aos valores ótimos atribuídos a plantas lenhosas cultivadas em Cerrado (Oliveira, 2004). A capacidade de absorção de elementos essenciais para o crescimento vegetal costuma ser comprometida por altas concentrações de Al (Akaya & Takenaka, 2001; Mihailovic et al., 2008; Ribeiro et al., 2013). Entretanto, em plantas adaptadas a solos ácidos, o Al parece não interferir negativamente na absorção de nutrientes (Haridasan, 2008a; Haridasan, 2008b; Souza et al., 2015; Malta et al., 2016), como foi observado para *A. edulis* e *R. viburnoides*.

Apesar da presença de Al nas folhas de *A. edulis*, as análises histoquímicas e MET-EDS não identificaram sítios de acúmulo do metal, enquanto em *R. viburnoides* sua presença foi confirmada inclusive no interior de cloroplastos, corroborando os resultados de Malta et al. (2016). As concentrações de Al foram significativamente maiores em *R. viburnoides* em relação a *A. edulis*, o que justifica os resultados positivos obtidos pelas análises de detecção do metal, e significativamente diferente entre suas folhas, sendo maiores naquelas de terceiro nó. Esse padrão de maior concentração de Al em folhas mais velhas foi observado também em *Fagopyrum esculentum* (Shen & Ma, 2001), em *Camellia sinensis* (Carr et al., 2003) e em acumuladoras nativas de Cerrado (Souza et al., 2015). O transporte de Al no corpo da planta é direcionado pelo fluxo transpiratório, por isso, a idade da folha é um dos fatores que influencia a distribuição do Al na parte aérea da planta (Shen & Ma, 2001). Folhas mais velhas transpiraram por mais tempo e, portanto, acumularam maior teor do metal em seus tecidos. Associado a isso, o Al apresenta baixa mobilidade depois de acumulado e seu redirecionamento para folhas jovens a partir de folhas velhas não ocorreu em *F. esculentum* (Shen & Ma, 2001).

Os perfis nutricionais de *A. edulis* e *R. viburnoides* evidenciaram que, em valores absolutos, a espécie não acumuladora apresentou maior concentração de macronutrientes do que a espécie acumuladora, com exceção para o Ca ($Ae < Rv1 < Rv3$) e o Mg ($Ae < Rv$). Souza et al. (2015) relacionaram o maior acúmulo de macronutrientes em plantas não acumuladoras à elevada área foliar específica das espécies, entretanto, este parâmetro não foi avaliado no presente estudo. O Ca e o Mg podem agir como atenuadores dos efeitos de toxidez do Al em dicotiledôneas e em monocotiledôneas, respectivamente (Lambers et al., 2008). A disponibilidade de maior concentração de Ca^{2+} comprovadamente atenua a toxicidade do Al^{3+} em diversas espécies (Bose et al., 2015) e em *Triticum aestivum*, a resistência ao Al foi correlacionada positivamente com o aumento no teor tanto de Ca quanto de Mg no interior da célula, onde estes elementos possivelmente promoveram a estabilidade de diversos processos associados ao desenvolvimento de um aparato fotossintético funcionalmente completo (Moustaka et al., 2016). Nas raízes, o Al pode inibir a absorção de Ca^{2+} e competir com o Mg^{2+} por transportadores na membrana plasmática (Bose et al., 2015), entretanto, ainda que tenha ocorrido algum desses eventos, *A. edulis* e *R. viburnoides* não apresentaram comprometimento na absorção dos nutrientes, tendo em vista as concentrações de Ca e Mg em suas folhas comparáveis a de outras espécies (Oliveira, 2004).

Em relação aos micronutrientes, *A. edulis* apresentou elevados teores de Mn (até três vezes maiores) enquanto *R. viburnoides* apresentou maior concentração de Fe em folhas de terceiro nó ($Ae < Rv1 < Rv3$). Assim como o Al, a disponibilidade do Mn na forma fitotóxica Mn^{2+} aumenta em solos com pH menor que 5,5. Assim, a toxidez de Al e Mn pode ocorrer simultaneamente nesses ambientes, embora a tolerância vegetal a ambos possa não coincidir (Foy et al., 1978). Em estudos com plantas cultivadas tolerantes ao Al, foi observado que o tratamento conjunto de Al e Mn gerou menos sintomas de toxidez às plantas do que quando o tratamento contava apenas com um dos elementos (Wang et al., 2015, Muhammad et al., 2016). A disponibilidade de Al reduziu o acúmulo de Mn na parte aérea vegetal possivelmente devido à competição entre o Al^{3+} e o Mn^{2+} por sítios de ligação na membrana plasmática ou por efeito indireto da toxidez do Al ao sistema radicular, reduzindo assim a absorção de Mn^{2+} (Muhammad et al., 2016). Como *R. viburnoides* não apresentou comprometimento da absorção dos nutrientes, o primeiro mecanismo

explica melhor os menores teores de Mn em suas folhas. Já em *A. edulis*, as concentrações do mineral nos tecidos foliares foram potencialmente tóxicas, tendo em vista que de 160 a 1000 mg kg⁻¹ de Mn causaram efeitos negativos em plantas cultivadas (Foy et al., 1978). Entretanto, não foram observados sintomas de toxidez nessa espécie, o que indica que *A. edulis* é tolerante tanto ao Al quanto ao Mn. Quanto ao Fe, este elemento já foi correlacionado positivamente ao Al em raízes de plantas de Cerrado e a sua mobilização em *Scabiosa columbaria* foi associada às respostas positivas apresentadas pela espécie em presença de Al (Hartwig et al. 2007; Nascimento 2011). Sugere-se que, assim como a maior disponibilidade de Ca ameniza sintomas de toxidez gerados pelo Al, o Fe em maior proporção colabore com a manutenção do aparato fotossintético, uma vez que faz parte de citocromos e proteínas fundamentais na cadeia transportadora de elétrons.

Os valores de fluorescência (Fv/Fm), de coeficiente de extinção não fotoquímico (NPQ) e de taxa de transporte aparente de elétrons (ETR) evidenciaram que não há limitação fotoquímica no processo fotossintético em nenhuma das espécies em estudo, independentemente do teor de Al acumulado. A relação Fv/Fm tem sido amplamente utilizada na literatura como uma estimativa da eficiência quântica máxima da atividade fotoquímica do PSII (Baker & Rosenqvist, 2004) em resposta a estresses bióticos e abióticos e o declínio em seus valores sugere a inibição da atividade fotoquímica em decorrência de danos estruturais nos tilacóides (Konrad et al., 2005). No presente trabalho, os valores de Fv/Fm estiveram sempre acima de 0,7 e não diferiram entre as espécies ou entre as folhas de diferentes nós, indicando sanidade dos tilacóides. Esses resultados diferem do que é observado em plantas cultivadas tratadas com Al, como sorgo (Peixoto et al., 2002), *Citrus* (Pereira et al., 2000) e café (Konrad et al., 2005), para as quais é relatada a redução de Fv/Fm, associada à redução da taxa de assimilação líquida de CO₂, da condutância estomática, da taxa de transpiração e do teor de clorofilas (Ohki, 1986; Guo, 2012; Ribeiro et al., 2013; Hasni et al., 2015; Anjum et al., 2016). Comparando folhas de terceiro nó de *R. viburnoides* com as de primeiro nó, foi possível observar alguns desses sintomas, como menor taxa de assimilação de carbono associada à queda nos valores de condutância estomática, entretanto, a fotossíntese nessas folhas não foi limitada por questões fotoquímicas, como a redução na concentração de pigmentos (Fig. 7), a menor disponibilidade de CO₂ e/ou a menor eficiência de conversão

fotoquímica do PSII (Fig. 6), mas provavelmente por limitações bioquímicas (Obata & Fernie, 2012; Peixoto et al., 2002). A relação A/Ci evidenciou que folhas de primeiro nó de *R. viburnoides* são mais eficientes no processo de carboxilação do que as de terceiro nó, onde parte do carbono interno pode estar sendo dedicado à respiração. Apesar dos menores valores, a taxa de assimilação de carbono de folhas de terceiro nó de *R. viburnoides*, assim como a sua condutância estomática, não diferiu estatisticamente do valor observado para a espécie não acumuladora. Além disso, os dados obtidos estão dentro da faixa que é descrita para plantas C₃ nativas de Cerrado em campo (4-16 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e 40-700 $\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, respectivamente) (Palhares et al., 2010) e não foi observada insuficiência na produção de amido, aminoácidos e proteínas em relação àsquelas de primeiro nó, com menor teor de Al acumulado. Diante disso, é possível afirmar que a presença de Al nos cloroplastos de *R. viburnoides* não gerou qualquer evidência de limitação da fotossíntese, resultado que é corroborado pelos dados do perfil de metabólitos.

A menor concentração de amido em folhas de *R. viburnoides* pode estar associada a dois processos: a menor produção ou o maior consumo do polissacarídeo. A presença de Al no interior dos grãos de amido, onde, provavelmente, o metal está ligado ao oxigênio dos grupos hidroxila da α -D-glicose (Ciesielski & Tomasik, 2004), pode ser um dos fatores que está prejudicando a formação do polissacarídeo. Enquanto os ânions tendem a permanecer na superfície do grão de amido, cátions são capazes de penetrar e se acumular principalmente em regiões amorfas do grânulo, onde o arranjo de sua estrutura é menos ordenado e compacto (Denardin & Silva, 2009; Szymońska et al., 2015). Com isso, surgem questões, como: O Al participa do processo de formação do amido? Ou ele apenas adentra por canais posteriormente? A ligação do Al à estrutura glicosídica do grânulo está comprometendo a sua formação? Ou sua menor concentração está relacionada a um maior consumo por parte de *R. viburnoides*? Os dados de quantificação de amido, juntamente com outros metabólitos, sugerem que, independentemente da concentração de Al nas folhas de *R. viburnoides*, a produção de compostos do metabolismo primário não foi alterada, confirmando a tolerância dessas plantas ao metal. Entretanto, mais estudos devem ser feitos sobre a influência do Al na produção de amido.

Por outro lado, o mecanismo de destoxificação de Al foi associado a uma elevada demanda energética em *Plantago almogravensis* (Grevnstuk et al., 2015), o

que pode acelerar a degradação de fontes de carboidrato e, portanto, justificar os menores teores de amido na espécie hiperacumuladora de Al, *R. viburnoides*. A menor concentração de amido foi acompanhada pela menor concentração de aminoácidos e proteínas, o que sugere a degradação desses compostos de modo a fornecer esqueletos de C e N para a produção de metabólitos secundários (Rolland et al., 2006; Akula & Ravishankar, 2011; Campos et al., 2016). O maior investimento no metabolismo secundário constitui um mecanismo de resistência à toxidez do Al, uma vez que seus compostos agem como antioxidantes e antirradicais, e são capazes de se complexar com metais potencialmente tóxicos no interior da célula, como o Al (Michalak, 2006; Bartwal et al., 2013; Nakabayashi & Saito, 2015). A tolerância das plantas a estresses abióticos, gerados pela seca, salinidade e alta concentração de metais, por exemplo, é elevada pela indução das vias de biossíntese de vários metabólitos secundários, como os flavonoides e fenilpropanoides (Dixon & Paiva, 1995; Bartwal et al., 2013; Nakabayashi & Saito, 2015). Esses compostos são derivados da via do chiquimato, onde o ácido cinâmico é formado a partir da fenilalanina e convertido a *p*-coumarato. O menor teor de *p*-coumarato em folhas de *R. viburnoides* em relação às folhas de *A. edulis* ($Rv1 < Rv3 < Ae$) está associado a maior produção de seus derivados, como ácido cafeico, coniferaldeído, flavona, flavonona e miricetina, intermediários das vias de biossíntese de flavonoides e fenilpropanoides. Os elevados conteúdos relativos de chiquimato em folhas de *R. viburnoides* ($Ae < Rv3 < Rv1$) garantem o investimento da espécie nas vias de biossíntese de compostos fenólicos como um mecanismo de destoxificação de Al.

Os elevados teores relativos de leucina, isoleucina e aspartato em folhas de *R. viburnoides* corroboraram os resultados encontrados em resposta a demais estresses abióticos (Obata & Fernie, 2012; Grevenstuk et al., 2015). Joshi et al. (2010) sugerem que aminoácidos de cadeia ramificada, como a leucina e a isoleucina, agem como osmólitos compatíveis em diversos tecidos vegetais sob condições de estresse por seca. Além disso, foram relatadas diversas proteínas com capacidade de se ligar ao Al e, dentre elas, os polipeptídios compostos por unidades de aspartato promoveram maior tolerância da planta ao metal, o que dá sentido às concentrações relativas elevadas dos aminoácidos na espécie hiperacumuladora de Al (Matsumoto, 2000). Do mesmo modo, a elevação na concentração de açúcares solúveis, conforme observado para *R. viburnoides*, pode promover tolerância a estresses abióticos por

meio da modulação do *status* metabólico através de vias sensíveis a açúcares (Rosa et al., 2009). Em *Oryza sativa*, foi relatado aumento na concentração de açúcares solúveis em resposta a tratamentos com Al (Moreno-Alvarado et al. 2017) e, em *Arabidopsis*, maiores teores relativos de galactinol e rafinose protegeram a planta contra o estresse oxidativo (Nishizawa et al., 2008). Açúcares alcoólicos, como galactinol e glicerol, podem agir como osmoprotetores, regulando o balanço osmótico e fornecendo energia à planta (Yancey, 2005), de modo a favorecer a resistência de *R. vibernoides* ao Al. A salicina, glicosídeo do álcool salicílico, faz parte de precursores da biossíntese do ácido salicílico, altamente relacionado à tolerância ao estresse por salinidade, frio e seca (Tsai et al., 2006; Miura & Tada, 2014).

A quelação do metal por ácidos orgânicos é um mecanismo de resistência ao Al consolidado (Brunner & Sperisen, 2013; Nunes-Nesi et al., 2014) e era esperado que maiores teores fossem registrados em *R. vibernoides*, entretanto, os conteúdos relativos desses metabólitos foram semelhantes aos de *A. edulis*. Possivelmente, os teores de ácidos orgânicos em *A. edulis* também foram elevados em resposta à alta concentração de Mn acumulado em suas folhas, o que não permitiu constatar maiores concentrações de ácidos orgânicos em *R. vibernoides*. Espécies hiperacumuladoras de Mn apresentam alta concentração de oxalato, succinato, malato e malonato (You et al., 2014), sendo este último com maior aumento relativo em folhas de terceiro nó de *A. edulis*. Na escassez de informações sobre os ácidos orgânicos, pode-se afirmar que a produção de açúcares solúveis e de metabólitos secundários representa um ajuste metabólico que permite a *R. vibernoides* tolerar o Al.

As variações observadas nas concentrações relativas de metabólitos em folhas de *R. vibernoides* foram mais acentuadas naquelas de primeiro nó, as quais apresentaram concentração de Al em torno de 10 g kg⁻¹ MS. Cerca de 16 g Al kg⁻¹ MS foram acumulados nas de terceiro nó, o que é compatível com as médias descritas por Malta et al. (2016) para indivíduos da mesma espécie ocorrendo sobre solos com diferentes teores do metal. Esse resultado sugere que a saturação dos tecidos e organelas foliares seja atingida, nessa espécie, em concentrações próximas a 15 g Al kg⁻¹ MS e que, portanto, o teor do metal em folhas de primeiro nó ainda não é estável. Esta crescente concentração de Al indica que a dinâmica de entrada e

destoxificação do metal no interior das células de folhas de primeiro nó de *R. viburnoides* é intensa, justificando sua maior taxa fotossintética e maior investimento na produção de metabólitos relacionados à tolerância ao estresse.

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão confirmaram a ideia de sanidade dos cloroplastos, com tilacóides organizados em *grana* inclusive em folhas de terceiro nó da espécie hiperacumuladora de Al. Foi constatado o aparecimento do espaço intermembrana em folhas de terceiro nó de *R. viburnoides* e o aumento no número de plastoglóbulos em folhas de terceiro nó de *A. edulis* e *R. viburnoides*. Para confirmar se os possíveis sintomas descritos tem sua origem relacionada ao Al, é necessária a realização de estudos com níveis graduais de disponibilidade de Al, todavia, é interessante notar que, mesmo em presença de Al nos cloroplastos de *R. viburnoides*, os tilacóides se apresentaram organizados e funcionais, conforme comprovado pelos dados fotossintéticos.

Plastoglóbulos são comuns em folhas (pré)senescentes (Lichtenthaler, 2013), entretanto, no presente estudo, o Al foi detectado nos cloroplastos de folhas maduras sem indícios de tal processo, o que contrapõe a ideia de Cuenca et al. (1991) de que o metal é transportado para a organela como resultado do processo de senescência das folhas. A maior presença desses plastoglóbulos em folhas de terceiro nó de *R. viburnoides* e *A. edulis* pode ser justificada, então, pelo processo natural de maturação das folhas, as quais, quanto mais velhas, tendem a acumular maior número deles no interior de seus cloroplastos (Lichtenthaler, 2013). Por outro lado, plastoglóbulos armazenam subprodutos da degradação de tilacóides e contêm carotenóides, plastoquinonas e tocoferol no seu interior, substâncias que atuam na proteção dos componentes fotossintéticos contra radicais livres (Austin et al., 2007; Lichtenthaler, 2013). Considerando que os cloroplastos são envoltos por uma dupla membrana, são repletos de tilacóides e que o Al tem a capacidade de se ligar à bicamada lipídica (Wagatsuma et al., 2015), é possível que a maior formação de plastoglóbulos possa ser um mecanismo de resistência adotado por *R. viburnoides* de modo a evitar possíveis efeitos de toxidez do Al, isolando o metal no seu interior e combatendo o processo oxidativo. Uma outra linha de raciocínio considera três fatores: (i) que, ao invés de se ligar à membrana, o Al está livre no estroma, (ii) que o Al se solubiliza a formas tóxicas somente quando os valores de pH são menores que

5.5 e (iii) que o pH do estroma do interior do cloroplasto está em torno de 7,2 - 7,8 (Bose et al., 2015). Valores de pH acima de 5,5, como o dos cloroplastos, desfavorecem a conversão de Al a formas tóxicas e mantém a sua reatividade muito baixa (Fageria et al., 1988; Lambers et al., 2008), sugerindo, portanto, que o armazenamento de Al no interior de cloroplastos possa ser o próprio mecanismo de resistência quando mecanismos primários, como a ligação do metal à parede celular, já estiverem saturados. Nesse caso, a presença de substâncias protetoras nos plastoglôbulos continua como parte do processo de destoxificação.

Em termos gerais, pode-se dizer que a análise de EDS não foi conclusiva para o presente trabalho. Falhas durante o processamento do material foram cruciais e, por isso, algumas sugestões podem ser feitas. Primeiro, embora a contrastação de membranas feita usualmente com tetróxido de ósmio seja um passo essencial para a visualização de cloroplastos, em análise de energia dispersiva de raios-X, o Os e o Al emitem picos em uma mesma intensidade de energia (1,49 e 1,48 keV, respectivamente), o que impede a identificação da presença real do Al. Por isso, sugere-se a substituição do tetróxido de ósmio por permanganato de potássio, utilizado por Cuenca et al. (1991), os quais consideraram o pico de Al gerado pela técnica como autêntico. Segundo, a detecção dos demais elementos foi prejudicada pelo limite de detecção do equipamento utilizado. Quanto a isso, cortes mais espessos podem ser feitos, a fim de aumentar a concentração dos elementos em todos os pontos da amostra (Minocha et al., 2001) e garantir as suas identificações. Por fim, dada a dificuldade de processamento das folhas coriáceas de espécies de Cerrado, a realização do isolamento de cloroplastos e processamento dessa suspensão para análise em MET-EDS constitui uma nova alternativa. Com relação aos estudos realizados em campo, é importante considerar que as análises fisiológicas sofrem grande interferência de diversos fatores ambientais, como luz, umidade e temperatura, os quais atribuem maior variação aos dados. Portanto, sugere-se que o n amostral seja maior em estudos futuros ou, ainda, que seja conduzido um experimento em condições controladas para confirmar as possíveis interferências do Al sobre o metabolismo das espécies.

5. CONCLUSÕES

A. edulis e *R. viburnoides* não apresentaram comprometimento da absorção de nutrientes nem tampouco da funcionalidade do aparato fotossintético mesmo com elevado acúmulo de Al (até 1 g kg^{-1} e 16 g kg^{-1} , respectivamente) em suas folhas. A presença de Al nos cloroplastos de *R. viburnoides* não gerou prejuízos à estrutura da organela ou às funções metabólicas e a tolerância ao Al nesta espécie foi associada (i) às maiores concentrações de cálcio, magnésio e ferro em suas folhas, (ii) à presença de plastoglóbulos em maior número no interior dos cloroplastos, (iii) à degradação de grãos de amido, aminoácidos e proteínas como fonte de esqueletos de C e N para o investimento em vias de biossíntese de metabólitos secundários e, portanto, (iv) à maior produção de flavonoides e fenilpropanoides, capazes de destoxificar o Al e combater o estresse oxidativo possivelmente gerado. Outros estudos, a serem realizados preferencialmente em condições controladas, merecem ser feitos a fim de esclarecer a relação do Al com a formação dos grãos de amido, determinar a localização do metal no interior da organela com maior confiança e validar os presentes resultados de fisiologia sem que haja variação dos dados por interferência de fatores ambientais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akaya, M., Takenaka, C., 2001. Effects of aluminum stress on photosynthesis of *Quercus glauca* Thumb. **Plant Soil** 237, 137–146.
- Akula, R., Ravishankar, G.A., 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signal. Behav.** 6, 1720–1731.
- Ali, B., Qian, P., Sun, R., Farooq, M.A., Gill, R.A., Wang, J., Azam, M., Zhou, W., 2015. Hydrogen sulfide alleviates the aluminum-induced changes in *Brassica napus* as revealed by physiochemical and ultrastructural study of plant. **Environ. Sci. Pollut. Res.** 22, 3068–3081.
- Andrade, L.R.M., Barros, L.M.G., Echevarria, G.F., Velho do Amaral, L.I., Cotta, M.G., Rossatto, D.R., Haridasan, M., Franco, A.C., 2011. Al-hyperaccumulator Vochysiaceae from the Brazilian Cerrado store aluminum in their chloroplasts without apparent damage. **Environ. Exp. Bot.** 70, 37–42.
- Andrade, L.R.M., Andrade, S.R.M., Deuner, S., Rossatto, D.R., Rodrigues, G., Somavilla, N., Barros, L.M.G., 2013. Photosynthetic rates and activation of antioxidant system related to presence of al in chloroplasts of an aluminium hyperaccumulator native plant of the brazilian cerrado. Conferência.
- Anjum, S.A., Ashraf, U., Khan, I., Tanveer, M., Saleem, M.F., Wang, L., 2016. Aluminum and chromium toxicity in maize: implications for agronomic attributes, net photosynthesis, physio-biochemical oscillations, and metal accumulation in different plant parts. **Water Air Soil Pollut.** 227, 326.
- Austin, J.R., Frost, E., Vidi, P., Kessler, F., Staehelin, L.A., 2007. Plastoglobules are lipoprotein subcompartments of the chloroplast that are permanently coupled to thylakoid membranes and contain biosynthetic enzymes. **The Plant Cell** 18, 1693–1703.
- Baker, N.R., Rosenqvist, E., 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: An examination of future possibilities. **J. Exp. Bot.** 55, 1607–1621.
- Bartwal, A., Mall, R., Lohani, P., Guru, S.K., Arora, S., 2013. Role of secondary metabolites and brassinosteroids in plant defense against environmental stresses. **J. Plant Growth Regul.** 32, 216–232.
- Bataglia, O.C., Furlani, A.M.C., Teixeira, J.P.F., Furlani, P.R., Gallo, J.R., 1983. **Métodos de análise química de plantas**. Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas.
- Bhoomika, K., Pyngrope, S., Dubey, R.S., 2014. Effect of aluminum on protein oxidation, nonprotein thiols and protease activity in seedlings of rice cultivars differing in aluminum tolerance. **J. Plant Physiol.** 171, 497–508.
- Bose, J., Babourina, O., Ma, Y., Meixue, Z., Shabala, S., Rengel, Z., 2015. Specificity of ion uptake and homeostasis maintenance during acid and aluminium

stresses. In: Panda, S.K., František, B. (eds.), **Aluminum stress adaptation in plants**. Springer International Publishing, pp. 229–252.

Brunner, I., Sperisen, C., 2013. Aluminum exclusion and aluminum tolerance in woody plants. **Front. Plant Sci.** 4, 172.

Campos, N. V., Araújo, T.O., Arcanjo-Silva, S., Freitas-Silva, L., Azevedo, A.A., Nunes-Nesi, A., 2016. Arsenic hyperaccumulation induces metabolic reprogramming in *Pityrogramma calomelanos* to reduce oxidative stress. **Physiol. Plant.** 157, 135–146.

Carr, H.P., Lombi, E., Küpper, H., McGrath, S.P., Wong, M.H., 2003. Accumulation and distribution of aluminium and other elements in tea (*Camellia sinensis*) leaves. **Agronomie** 23, 705–710.

Chenery, E.M., 1948. Aluminium in the plant world. **Kew Bull.** 3, 173–183.

Ciesielski, W., Tomasik, P., 2004. Complexes of amylose and amylopectins with multivalent metal salts. **J. Inorg. Biochem.** 98, 2039–2051.

Cross, J.M., Korff, M. Von, Altmann, T., Bartzetko, L., Sulpice, R., Gibon, Y., Palacios, N., Stitt, M., 2006. Variation of enzyme activities and metabolite levels in 24 *Arabidopsis* accessions growing in carbon-limited conditions. **Plant Physiol.** 142, 1574–1588.

Cuadros-Inostroza et al., 2009. TargetSearch - a Bioconductor package for the efficient preprocessing of GC-MS metabolite profiling data. **BMC Bioinformatics** 10, 428.

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

Denardin, C.C., Silva, L.P. Da, 2009. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural** 39, 945–954.

Dixon, R.A., Paiva, N.L., 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell Online** 7, 1085–1097.

Fageria, N.K., Ballgar, V.C., Wright, R.J., 1988. Aluminum toxicity in crop plants. **J. Plant Nutr.** 11, 303–319.

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

Foy, C.D., Chaney, R.L., White, M.C., 1978. The physiology of metal toxicity in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol.** 29, 511–66.

Gibon, Y., Blaesing, O.E., Hannemann, J., Carillo, P., Ho, M., 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.

Grevenstuck, T., Moing, A., Maucourt, M., Deborde, C., Romano, A., 2015. Aluminium stress disrupts metabolic performance of *Plantago almogravensis* plantlets transiently. **BioMetals** 28, 997–1007.

Guo, T.R., 2012. Photosynthesis and antioxidant capacity in barley seedlings under the combined toxicity of cadmium and aluminum. **Adv. Mater. Res.** 610–613, 467–471.

Haridasan, M., 1982. Aluminium accumulation by some cerrado native species of central Brazil. **Plant Soil** 65, 265–273.

Haridasan, M., 2008a. Alumínio é um elemento tóxico para as plantas nativas do cerrado?, *In*: Prado, C., Casali, C., (eds.), **Fisiologia Vegetal: Práticas em relações hídricas, fotossíntese e nutrição mineral**. Manole, Barueri, pp. 1–10.

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

Hartwig, I., Oliveira, A.C. De, Irajá, F., Carvalho, F. De, Bertan, I., Antônio, J., André, D., Schmidt, M., Valério, I.P., Maia, L.C., Andrei, D., Fonseca, R., Estima, C., 2007. Mecanismos associados à tolerância ao alumínio em plantas. **Semin. Ciências Agrárias** 28, 219–228.

Hasni, I., Yaakoubi, H., Hamdani, S., Tajmir-Riahi, H.-A., Carpentier, R., 2015. Mechanism of interaction of Al^{3+} with the proteins composition of Photosystem II. **PLoS One** 10, 1–23.

Hede, A.R., Skovmand, B., Lopez-Cesati, J., 2001. Acid Soils and Aluminum Toxicity. *In*: Reynolds, M.P., Ortiz-Monasterio, J. I. , McNab, A., (eds.), **Application of Physiology in Wheat Breeding**. Mexico: D.F.: CIMMYT, pp. 172–182.

Izaguirre-Mayoral, M.L., Sinclair, T.R., 2005. Soybean genotypic difference in growth, nutrient accumulation and ultrastructure in response to manganese and iron supply in solution culture. **Ann. Bot.** 96, 149–158.

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

Jansen, S., Dessein, S., Piesschaert, F., Robbrecht, E., Smets, E., 2000. Aluminium accumulation in leaves of Rubiaceae: systematic and phylogenetic implications. **Annals of Botany Company** 85, 91–101.

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

Joshi, V., Joung, J.G., Fei, Z., Jander, G., 2010. Interdependence of threonine, methionine and isoleucine metabolism in plants: accumulation and transcriptional regulation under abiotic stress. **Amino Acids** 39, 933–947.

- Karnovsky, M.J., 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **J. Cell Biol.** 27, 137–138.
- Kochian, L. V., Hoekenga, O.A., Piñeros, M.A., 2004. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annu. Rev. Plant Biol.** 55, 459–493.
- Konarska, A., 2009. Effects of aluminum on growth and structure of red pepper (*Capsicum annuum* L.) leaves. **Acta Physiol. Plant.** 32, 145–151.
- Konrad, M.L.F., Silva, J.A.B., Furlani, P.R., Machado, E.C., 2005. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila em seis cultivares de cafeeiro sob estresse de alumínio. **Bragantia** 64, 339–347.
- Kukachka, B.F., Miller, R.B., 1980. A chemical spot-test for aluminum and its value in wood identification. **IAWA J.** 1, 104–109.
- Lambers, H., Chapin, F.S., Thijs, L.P., 2008. **Plant physiological ecology**. 2^a ed. Springer Science+Business Media, LLC.
- Li, C., Xu, H., Xu, J., Chun, X., Ni, D., 2010. Effects of aluminium on ultrastructure and antioxidant activity in leaves of tea plant. **Acta Physiol. Plant.** 33, 973–978.
- Lichtenthaler, H.K., 2013. Plastoglobuli, thylakoids, chloroplast structure and development of plastids. In: Biswal, B., Krupinska, K., Biswal, U.C. (eds.), **Plastid development in leaves during growth and senescence, advances in photosynthesis and respiration**. Springer Science+Business Media Dordrecht, pp. 337–361.
- Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L., Fernie, A.R., 2006. Gas chromatography mass spectrometry–based metabolite profiling in plants. **Nat. Protoc.** 1, 387–396.
- Ma, J.F., Hiradate, S., Nomoto, K., Iwashita, T., Matsumoto, H., 1997. Internal detoxification mechanism of Al in *Hydrangea*. Identification of Al form in the leaves. **Plant Physiol.** 113, 1033–1039.
- Malavolta, E., Vitti, G.C., Oliveira, S.A., 1989. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Potafos, Piracicaba, SP.
- Malta, P.G., Arcanjo-Silva, S., Ribeiro, C., Campos, N.V., Azevedo, A.A., 2016. *Rudgea viburnoides* (Rubiaceae) overcomes the low soil fertility of the Brazilian Cerrado and hyperaccumulates aluminum in cell walls and chloroplasts. **Plant Soil** 408, 369–384.
- Matsumoto, H., 2000. Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. **International Review of Cytology** 200, 1–46.
- Michalak, A., 2006. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. **Plant Cell** 15, 523–530.

- Mihailovic, N., Drazic, G., Vucinic, Z., 2008. Effects of aluminium on photosynthetic performance in Al-sensitive and Al-tolerant maize inbred lines. **Photosynthetica** 46, 476–480.
- Minocha, R., Mcquattie, C., Fagerberg, W., Long, S., Woon, E., 2001. Effects of aluminum in red spruce (*Picea rubens*) cell cultures: Cell growth and viability, mitochondrial activity, ultrastructure and potential sites of intracellular aluminum accumulation. **Physiol. Plant.** 113, 486–498.
- Miura, K., Tada, Y., 2014. Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. **Front. Plant Sci.** 5, 4.
- Moreno-Alvarado, M., García-Morales, S., Trejo-Téllez, L.I., Valente, J., Gómez-Merino, F.C., 2017. Aluminum enhances growth and sugar concentration, alters macronutrient status and regulates the expression of NAC transcription factors in rice. **Front. Plant Sci.** 8, 73.
- Moustaka, J., Ouzounidou, G., Bayçu, G., Moustakas, M., 2016. Aluminum resistance in wheat involves maintenance of leaf Ca^{2+} and Mg^{2+} content, decreased lipid peroxidation and Al accumulation, and low photosystem II excitation pressure. **BioMetals** 29, 611–623.
- Muhammad, N., Cai, S., Shah, J.M., Zhang, G., 2016. The combined treatment of Mn and Al alleviates the toxicity of Al or Mn stress alone in barley. **Acta Physiol. Plant.** 38, 1–7.
- Nakabayashi, R., Saito, K., 2015. Integrated metabolomics for abiotic stress responses in plants. **Curr. Opin. Plant Biol.** 24, 10–16.
- Nascimento, M.S. 2011. Ecologia funcional e padrões de alocação de alumínio e nutrientes em plantas lenhosas do Cerrado. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG.
- Neri, A.V., 2007. Gradiente pedológico-vegetacional de cerrado em Paraopeba, MG 125. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG.
- Neri, A. V., Schaefer, C.E.G.R., Silva, A.F., Souza, A.L., Ferreira-Junior, W.G., Meira-Neto, J.A.A., 2012. The influence of soils on the floristic composition and community structure of an area of brazilian Cerrado vegetation. **Edinburgh J. Bot.** 69, 1–27.
- Nishizawa, a., Yabuta, Y., Shigeoka, S., 2008. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. **Plant Physiol.** 147, 1251–1263.
- Nunes-Nesi, A., Carrari, F., Lytovchenko, A., Smith, A.M.O., Loureiro, M.E., Ratcliffe, R.G., Sweetlove, L.J., Fernie, A.R., 2005. Enhanced photosynthetic performance and growth as a consequence of decreasing mitochondrial malate dehydrogenase activity in transgenic tomato plants. **Plant Physiol.** 137, 611–22.
- Nunes-Nesi, A., Carrari, F., Gibon, Y., Sulpice, R., Lytovchenko, A., Fisahn, J., Graham, J., Ratcliffe, R.G., Sweetlove, L.J., Fernie, A.R., 2007. Deficiency of

mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. **Plant J.** 50, 1093–1106.

Nunes-Nesi, A., Brito, D.S., Inostroza-Blancheteau, C., Fernie, A.R., Araújo, W.L., 2014. The complex role of mitochondrial metabolism in plant aluminum resistance. **Trends Plant Sci.** 19, 399–407.

Obata, T., Fernie, A.R., 2012. The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. **Cell. Mol. Life Sci.** 69, 3225–3243.

Ohki, K., 1986. Photosynthesis, chlorophyll, and transpiration responses in aluminum stressed wheat and sorghum. **Crop Sci.** 26, 572–575.

Oliveira, S.A., 2004. Análise Foliar, in: Sousa, D.M.G., Lobato, G., (eds.), **Cerrado: correção do solo e adubação**. Brasília, DF, pp. 245–256.

Palhares, D., Franco, C., Zaidan, L.P., 2010. Respostas fotossintéticas de plantas do cerrado nas estações seca e chuvosa. **Rev. Bras. Biociências** 8, 213–220.

Peixoto, H.P., Da Matta, F.M., Da Matta, J.C., 2002. Responses of the photosynthetic apparatus to aluminum stress in two sorghum cultivars. **J. Plant Nutr.** 25, 821–832.

Pereira, W.E., de Siqueira, D.L., Martínez, C.A., Puiatti, M., 2000. Gas exchange and chlorophyll fluorescence in four citrus rootstocks under aluminium stress. **J. Plant Physiol.** 157, 513–520.

Porra, R.J., Thompson, W.A., Kriedemann, P.E., 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. **Biochim. Biophys. Acta** 975, 384–394.

Ribeiro, M.A.Q., Almeida, A.-A.F. de, Mielke, M.S., Gomes, F.P., Pires, M.V., Baligar, V.C., 2013. Aluminum effects on growth, photosynthesis, and mineral nutrition of cacao genotypes. **J. Plant Nutr.** 36, 1161–1179.

Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., Sheen, J., 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. **Annu. Rev. Plant Biol.** 57, 675–709.

Rosa, M., Prado, C., Podazza, G., Interdonato, R., González, J.A., Hilal, M., Prado, F.E., 2009. Soluble sugars. **Plant Signal. Behav.** 4, 388–393.

Shen, R., Ma, J.F., 2001. Distribution and mobility of aluminium in an Al-accumulating plant, *Fagopyrum esculentum* Moench. **J. Exp. Bot.** 52, 1683–1687.

Silva, IL. 2015. Efeitos morfofisiológicos do alumínio em duas espécies vegetais, não acumuladoras de Al, ocorrentes no Cerrado. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG.

Solymosi, K., Bertrand, M., 2011. Soil metals, chloroplasts, and secure crop production: a review. **Agron. Sustain. Dev.** 32, 245–272.

- Souza, M.C., Bueno, P.C.P., Morellato, L.P.C., Habermann, G., 2015. Ecological strategies of Al-accumulating and non-accumulating functional groups from the Cerrado *sensu stricto*. **An. Acad. Bras. Cienc.** 87, 813–823.
- Spurr, A.R., 1969. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. **J. Ultrastruct. Res.** 26, 1–2.
- Szymońska, J., Molenda, M., Wieczorek, J., 2015. Study of quantitative interactions of potato and corn starch granules with ions in diluted solutions of heavy metal salts. **Carbohydr. Polym.** 134, 102–109.
- Tsai, C.J., Harding, S.A., Tschaplinski, T.J., Lindroth, R.L., Yuan, Y., 2006. Genome-wide analysis of the structural genes regulating defense phenylpropanoid metabolism in *Populus*. **New Phytol.** 172, 47–62.
- Vitorello, V.A., Capaldi, F.R., Stefanuto, V.A., 2005. Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. **Brazilian J. Plant Physiol.** 17, 129–143.
- von Uexküll, H.R., Mutert, E., 1995. Global Extent, Development and Economic-Impact of Acid Soils. **Plant and Soil**, 171, pp.1–15.
- Wagatsuma, T., Maejima, E., Watanabe, T., Khan, M.S.H., Ishikawa, S., 2015. Significant role of the plasma membrane lipid bilayers in aluminum tolerance of plants, in: Panda, S.K., Baluska, F. (eds.), **Aluminum stress adaptation in plants**. Springer International Publishing, pp. 99–124.
- Wang, W., Zhao, X.Q., Hu, Z.M., Shao, J.F., Che, J., Chen, R.F., Dong, X.Y., Shen, R.F., 2015. Aluminium alleviates manganese toxicity to rice by decreasing root symplastic Mn uptake and reducing availability to shoots of Mn stored in roots. **Ann. Bot.** 116, 237–246.
- Watanabe, T., Osaki, M., 2002. Mechanisms of adaptation to high aluminum condition in native plant species growing in acid soils: a review. **Commun. Soil Sci. Plant Anal.** 33, 1247–1260.
- Yancey, P.H., 2005. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. **J. Exp. Biol.** 208, 2819–2830.
- You, X., Yang, L.T., Lu, Y. Bin, Li, H., Zhang, S.Q., Chen, L.S., 2014. Proteomic changes of *Citrus* roots in response to long-term manganese toxicity. **Trees - Struct. Funct.** 28, 1383–1399.