

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS, METABÓLICOS E ANATÔMICOS ASSOCIADOS À  
TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM SOLANUM LYCOCARPUM**

David de Oliveira Medeiros  
*Magister Scientiae*

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2024**

**DAVID DE OLIVEIRA MEDEIROS**

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS, METABÓLICOS E ANATÔMICOS ASSOCIADOS À  
TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM SOLANUM LYCOCARPUM**

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

Orientador: Wagner Luiz Araujo

Coorientador: Agustin Zsogon

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2024**

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

T

M488a  
2024

Medeiros, David de Oliveira, 1999-  
Aspectos fisiológicos, metabólicos e anatômicos associados  
à tolerância ao alumínio em *Solanum lycocarpum* / David de  
Oliveira Medeiros. – Viçosa, MG, 2024.  
1 dissertação eletrônica (45 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Wagner Luiz Araújo.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Biologia Vegetal, 2024.  
Referências bibliográficas: f. 39-45.  
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.783>  
Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Solanum lycocarpum* - Fisiologia. 2. *Solanum  
lycocarpum* - Efeito do alumínio. 3. Solos ácidos. 4. Alumínio -  
Testes de toxicidade. I. Araújo, Wagner Luiz, 1980-.  
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia  
Vegetal. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal.  
III. Título.

CDD 22. ed. 583.952

DAVID DE OLIVEIRA MEDEIROS

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS, METABÓLICOS E ANATÔMICOS ASSOCIADOS À  
TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM SOLANUM LYCOCARPUM**

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

APROVADA: 30 de agosto de 2024.

Assentimento:

---

David de Oliveira Medeiros  
Autor

---

Wagner Luiz Araujo  
Orientador

Essa dissertação foi assinada digitalmente pelo autor em 28/11/2024 às 15:22:52 e pelo orientador em 28/11/2024 às 15:57:24. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **56YS.3GL3.BBCI** e clique no botão 'Validar documento'.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, em especial aos meus pais, Rosivania e Laudier, e ao meu irmão Danilo. Sou profundamente grato por todo amparo e incentivo que sempre recebi. Obrigado também por me ensinarem princípios que fundamentam minha persona até os dias atuais e me fazem acreditar no meu potencial.

Ao meu orientador Prof. Wagner L. Araújo, por todo o conhecimento e orientações proporcionadas ao longo dessa trajetória.

Ao meu coorientador Prof. Agustin Zsögön, pelos momentos em que gentilmente pôde contribuir para a concretização da pesquisa.

Ao meu companheiro Jean pelo apoio, encorajamento e risadas no dia a dia, foram fundamentais ao longo dessa jornada.

À minha companheira felina Zoe, sua presença ao meu lado durante esse trajeto foi uma fonte inesgotável de afeto.

Aos amigos da Unidade de Crescimento de Plantas (UCP) por todos os momentos em que puderam disponibilizar seu tempo para contribuir com a realização da minha pesquisa e com meu crescimento profissional, assim como proporcionar momentos de descontração no dia a dia. Agradeço, especialmente, à Dra. Marcelle Ferreira Silva, que desde sempre foi extremamente solícita em responder minhas dúvidas, seu auxílio foi fundamental no planejamento e execução dessa pesquisa.

Aos meus amigos de longa data, que apesar de toda a distância que há entre nós, nunca se tornaram ausentes em minha vida, me apoiando incondicionalmente e acreditando em meus sonhos.

Aos professores do Departamento de Biologia Vegetal (DBV) que auxiliaram na minha trajetória acadêmica e puderam contribuir para meu crescimento e amadurecimento profissional.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro.

Por fim, a todos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

MEDEIROS, David de Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2024. **Aspectos fisiológicos, metabólicos e anatômicos associados à tolerância ao alumínio em *Solanum lycocarpum***. Orientador: Wagner Luiz Araujo. Coorientador: Agustin Zsogon.

O constante aumento da população resulta em um crescimento na demanda mundial de alimentos exigindo, portanto, maior produtividade agrícola. Não obstante, a expansão na utilização de terras para cultivo agrícola apresenta limitações em razão das propriedades do solo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, onde solos ácidos ( $\text{pH} < 5,0$ ) são predominantes, resultando na redução de áreas potencialmente aráveis. O alumínio (Al), elemento metálico mais abundante na crosta terrestre, é um dos principais problemas em solos ácidos ao adquirir configurações tóxicas para as plantas, em especial na forma de  $\text{Al}^{3+}$ , resultando em rizotoxicidade e afetando o crescimento e desenvolvimento. Neste estudo, buscou-se elucidar os mecanismos envolvidos na tolerância ao Al observados em *Solanum lycocarpum*, espécie distribuída em regiões de Cerrado e Mata Atlântica no Brasil e encontrada em solos pobres, com elevada acidez e saturados por Al. Os resultados obtidos demonstraram que a adição de Al no meio de crescimento não promoveu inibição do crescimento, considerando a similaridade fenotípica entre os tratamentos. Além disso, parâmetros biométricos, fotossintéticos e fotoquímicos não foram também reduzidos após a exposição ao Al, sugerindo a presença de mecanismos de tolerância em *S. lycocarpum*. Em relação às características anatômicas, nenhuma alteração foi observada em folhas de plantas expostas ao Al, embora o ápice radicular apresentou certo grau de desorganização na região da coifa. Mediante avaliações histoquímicas foi possível identificar que o acúmulo de Al nas raízes ocorreu parcialmente na região do núcleo de células meristemáticas. Foi verificado, ainda, um acúmulo de açúcares solúveis, bem como prolina, nas raízes de plantas submetidas ao estresse por Al, evidenciando que o reajuste do metabolismo primário é um importante mecanismo para maior tolerância ao Al. Foi verificada também uma redução na concentração de malato e fumarato em folhas na presença do Al, o que sugere um aumento na complexação do Al para compartimentalização em estruturas foliares como vacúolos e tricomas. Tomados em conjunto, os resultados aqui obtidos fornecem indícios de que *S. lycocarpum* apresenta elevada tolerância ao Al, possivelmente devido à combinação de mecanismos de exclusão e tolerância interna, sendo uma excelente espécie modelo para o processo de domesticação de

*novo.*

Palavras-chave: solos ácidos; rizotoxicidade; domesticação *de novo*

## ABSTRACT

MEDEIROS, David de Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2024. **Physiological, metabolic and anatomical aspects associated with aluminum tolerance in *Solanum lycocarpum***. Adviser: Wagner Luiz Araujo. Co-adviser: Agustin Zsogon.

The constant increase in population has led to a growing global demand for food, requiring higher agricultural productivity. However, the expansion of land use for agricultural cultivation is constrained by soil properties, specially in tropical and subtropical regions where acidic soils ( $\text{pH} < 5.0$ ) are predominant, therefore resulting in a reduction of potentially arable areas around the world. Aluminum (Al) is the most abundant metallic element in the Earth's crust and it is a major issue in acidic soils where it can form toxic compounds for plants, particularly as  $\text{Al}^{3+}$ , which leads to rhizotoxicity and affect growth and development. This study aimed to elucidate the mechanisms underlying Al tolerance observed in *Solanum lycocarpum*, a species distributed across the Cerrado and Atlantic Forest regions of Brazil and commonly found in poor, highly acidic, and Al-saturated soils. The results indicated that the addition of Al did not inhibit *S. lycocarpum* growth, as evidenced by the phenotypic similarity between treated and control plants. Additionally, biometric, photosynthetic, and photochemical parameters were not adversely affected by Al, suggesting the presence of robust tolerance mechanisms in *S. lycocarpum*. Regarding anatomical characteristics, no significant changes were observed in the leaves of plants exposed to Al, although the root apex exhibited some degree of disorganization in the root cap region. Interestingly, histochemical studies revealed that Al present in the roots accumulated, at least partially, in the nuclei of meristematic cells. A greater accumulation of soluble sugars and proline was also observed in the roots of plants subjected to Al stress, suggesting that adjustment of primary metabolism is an important mechanism for enhanced tolerance. In terms of organic acid levels, a reduction in malate and fumarate concentrations was observed in the leaves in the presence of Al, which may be attributed to increased Al complexation for compartmentalization in structures such as vacuoles and trichomes. Collectively, our findings suggest that *S. lycocarpum* exhibits significant Al tolerance, possibly due to a combination of exclusion mechanisms and internal tolerance strategies, making it an excellent model species for the *de novo* domestication.

Keywords: acidic soils; rhizotoxicity; *de novo* domestication

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1.** Crescimento e desenvolvimento de plantas de *Solanum lycocarpum* em sistema de cultura de areia. Dias após tratamento (DAT) divididos em 0 (início do experimento) e 20 (fim do período de estresse). Inicialmente, todas as plantas foram cultivadas em areia e umedecidas com solução de Clark (*full-strength*) na ausência do Al (0 DAT). Após isso, foram divididas em um grupo controle (-Al) e com Al (+Al). Após 20 dias de tratamento, novas imagens foram registradas. **(A)** Vista frontal das plantas, evidenciando influência do Al na altura. **(B)** Vista superior das plantas, evidenciando o desenvolvimento das folhas. **(C)** Sistema radicular de plantas controle (-Al) e tratadas com Al (+Al) após 20 DAT. .... 18

**Figura 2.** Efeitos do Al em parâmetros biométricos em indivíduos de *Solanum lycocarpum* após exposição de 20 dias. **(A)** Altura de parte aérea; **(B)** Comprimento de raiz; **(C)** Massa fresca de parte aérea; **(D)** Massa fresca de raiz; **(E)** Massa seca de parte aérea; **(F)** Massa seca de raiz. Os valores representam médias  $\pm$  erro padrão (n=5). Asteriscos (\*) indicam diferença significativa do tratamento (+Al) em relação ao controle (-Al) conforme determinado pelo Teste *T* ( $P < 0,05$ ). .... 19

**Figura 3.** Efeitos do Al no crescimento e desenvolvimento de raízes em indivíduos de *Solanum lycocarpum* após exposição de 20 dias. **(A)** Comprimento total; **(B)** Diâmetro; **(C)** Área projetada; **(D)** Área de superfície; **(E)** Volume. Os valores representam médias  $\pm$  erro padrão (n=5). Asteriscos (\*) indicam diferença significativa do tratamento (+Al) em relação ao controle (-Al) conforme determinado pelo Teste *T* ( $P < 0,05$ ). .... 21

**Figura 4.** Efeitos do Al em parâmetros de trocas gasosas em indivíduos de *Solanum lycocarpum* avaliados 10 e 18 dias após tratamento (DAT). **(A)** Fotossíntese líquida ( $A_N$ ); **(B)** Condutância estomática ( $g_s$ ). **(C)** Concentração intercelular de carbono ( $C_i$ ). **(D)** Taxa transpiracional ( $E$ ). **(E)** Respiração no escuro. Os valores representam médias  $\pm$  erro padrão (n=10). Letras maiúsculas comparam o mesmo tratamento em diferentes DAT, enquanto minúsculas comparam diferentes tratamentos em um mesmo DAT. Letras diferentes indicam diferença significativa conforme Análise de Variância de Duas Vias ( $P < 0,03$ ). .... 23

**Figura 5.** Efeitos do Al em parâmetros fotoquímicos em indivíduos de *Solanum lycocarpum* avaliados 10 e 18 dias após tratamento (DAT). **(A)** Taxa de transporte de elétrons (ETR); **(B)** Eficiência fotoquímica máxima do PSII ( $F_vF_m$ ). **(C)** Coeficiente de extinção não-fotoquímico (NPQ). **(D)** Rendimento quântico do PSII (YII). **(E)** Coeficiente de extinção fotoquímico ( $qL$ ). Os valores representam médias  $\pm$  erro padrão (n=10). Letras maiúsculas comparam o mesmo tratamento em diferentes DAT, enquanto minúsculas comparam diferentes tratamentos em um mesmo DAT. Letras diferentes indicam diferença significativa conforme Análise de Variância de Duas Vias ( $P < 0,03$ ). .... 25

**Figura 6.** Variação dos níveis de pigmentos fotossintéticos em folhas de *Solanum lycocarpum* após exposição de 20 dias ao Al. **(A)** Clorofila *a*; **(B)** Clorofila *b*; **(C)** Carotenoides. Os valores

representam médias  $\pm$  erro padrão (n=5). Asteriscos (\*) indicam diferença significativa do tratamento (+Al) em relação ao controle (-Al) conforme determinado pelo Teste *T* ( $P < 0,05$ ).  
 .....26

**Figura 7.** Alterações nos níveis de metabólitos, em folha e raiz, associados ao metabolismo do nitrogênio em indivíduos de *Solanum lycocarpum* após exposição de 20 dias ao Al. **(A)** Proteínas; **(B)** Aminoácidos; **(C)** Prolina. Os valores representam médias  $\pm$  erro padrão (n=5). Asteriscos (\*) indicam diferença significativa do tratamento (+Al) em relação ao controle (-Al) conforme determinado pelo Teste *T* ( $P < 0,05$ ). .....27

**Figura 8.** Alterações nos níveis de metabólitos, em folha e raiz, associados ao metabolismo do carbono em indivíduos de *Solanum lycocarpum* após exposição de 20 dias ao Al. **(A)** Glicose; **(B)** Frutose; **(C)** Sacarose; **(D)** Amido. Os valores representam médias  $\pm$  erro padrão (n=5). Asteriscos (\*) indicam diferença significativa do tratamento (+Al) em relação ao controle (-Al) conforme determinado pelo Teste *T* ( $P < 0,05$ ). .....28

**Figura 9.** Alterações nos de níveis ácidos orgânicos, em folha e raiz, de *Solanum lycocarpum* após exposição de 20 dias ao Al. **(A)** Malato; **(B)** Fumarato. Os valores representam médias  $\pm$  erro padrão (n=5). Asteriscos (\*) indicam diferença significativa do tratamento (+Al) em relação ao controle (-Al) conforme determinado pelo Teste *T* ( $P < 0,05$ ). .....29

**Figura 10.** Estrutura foliar e radicular de *Solanum lycocarpum*. Cortes transversais em folhas e longitudinais em raízes – microscopia de luz com azul de toluidina. **(A)** Região mediana de folha (-Al). Epiderme unisseriada e mesófilo dorsiventral. **(B)** Raiz do controle (-Al). Secção longitudinal do ápice radicular. **(C)** Região mediana de folha (+Al). Epiderme unisseriada e mesófilo dorsiventral. **(D)** Raiz exposta ao al (+Al). Secção longitudinal do ápice radicular com foco na coifa. pp = parênquima paliádico; pl = parênquima lacunoso; ep = epiderme; ce = câmara estomática. ....31

**Figura 11.** Teste histoquímico com *Chrome Azurol S* para localização do Al no ápice radicular de *Solanum lycocarpum*. A cor azul indica resultado positivo para presença do Al. **(A)** Secção longitudinal do ápice radicular de plantas controle (-Al). **(B)** Secção longitudinal do ápice radicular de plantas expostas ao Al (+Al). ....32

## SUMÁRIO

|                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                                                                       | 10 |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS .....                                                                                             | 14 |
| 2.1 Material vegetal e condições experimentais .....                                                                     | 14 |
| 2.2 Parâmetros biométricos.....                                                                                          | 14 |
| 2.3 Análise morfológica de raízes .....                                                                                  | 14 |
| 2.4 Parâmetros de fluorescência e trocas gasosas .....                                                                   | 15 |
| 2.5 Anatomia e histolocalização do Al pelo método <i>Chrome Azurol</i> .....                                             | 15 |
| 2.6 Análises metabólicas .....                                                                                           | 16 |
| 2.7 Análises estatísticas.....                                                                                           | 16 |
| 3. RESULTADOS.....                                                                                                       | 17 |
| 3.1 Exposição ao Al não leva a alterações fenotípicas e na partição de biomassa em <i>S. lycocarpum</i> .....            | 17 |
| 3.2 Caracterização morfológica de raízes sob estresse por Al .....                                                       | 20 |
| 3.3 Trocas gasosas e parâmetros fotoquímicos não são comprometidos em <i>S. lycocarpum</i> mediante presença do Al ..... | 22 |
| 3.4 Estresse por Al promove alterações metabólicas em folhas e raízes de <i>S. lycocarpum</i> ..                         | 26 |
| 3.5 Análises anatômicas .....                                                                                            | 30 |
| 3.6 Histolocalização do Al .....                                                                                         | 32 |
| 4. DISCUSSÃO .....                                                                                                       | 33 |
| 5. CONCLUSÕES .....                                                                                                      | 38 |
| REFERÊNCIAS .....                                                                                                        | 39 |

## 1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, incontestáveis esforços têm sido aplicados para proporcionar melhorias na produtividade e qualidade das colheitas, permitindo alcançar a segurança alimentar a nível global. Estima-se que estresses abióticos sejam responsáveis por causar perdas de até 70% no rendimento das culturas em escala mundial (Kumar, 2020), sendo o baixo pH do solo ( $\text{pH} < 5,5$ ) uma das principais limitações agrícolas, capaz de reduzir em até 25% toda a produtividade agrícola mundial (Wood; Sebastian; Scherr, 2000).

Os solos ácidos constituem, aproximadamente, 30% de toda a área do planeta e 50% das terras potencialmente aráveis (Sade *et al.*, 2016). No Brasil, 58% de todo o território é ocupado por solos ácidos distribuídos majoritariamente entre latossolos e argissolos, ambos apresentando baixa fertilidade natural, pH ácido e alta saturação por alumínio (Al) (Santos *et al.*, 2011). Em regiões tropicais e subtropicais, a ocorrência de solos ácidos é um processo natural (Gupta; Gaurav; Kumar, 2013); já em zonas temperadas, é resultado das chuvas ácidas em regiões industriais (Vitorello; Capaldi; Stefanuto, 2005). Com efeito, o processo de acidificação é intensificado pelo uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados, desequilíbrio do ciclo de nutrientes do solo, acúmulo de matéria orgânica e utilização de energia fóssil que resulta na liberação dióxido de azoto ( $\text{NO}_2$ ) e dióxido de enxofre ( $\text{SO}_2$ ) para a atmosfera, aumentando a ocorrência de chuvas ácidas (Sade *et al.*, 2016; Bojórquez-Quintal *et al.*, 2017).

Usualmente presente em solos ácidos, o Al é o elemento metálico mais abundante na crosta terrestre (Singh *et al.*, 2017), ocorrendo naturalmente na forma de aluminossilicatos que são estáveis e não interagem com processos biológicos e organismos vivos (Gupta; Gaurav; Kumar, 2013). Em condições de elevada acidez, o Al presente no solo torna-se solúvel nas formas de hidróxido de alumínio [ $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$ ] e na forma catiônica trivalente ( $\text{Al}^{3+}$ ) (Delhaize; Ryan, 1995). Em suas formas solúveis, especialmente  $\text{Al}^{3+}$ , o Al fica disponível na solução do solo, apresentando elevada rizotoxicidade para as plantas sendo capaz de inibir, principalmente, o crescimento e o funcionamento das raízes (Kochian *et al.*, 2015).

O alvo primário do  $\text{Al}^{3+}$  nas raízes é a região do ápice radicular, causando danos severos ao meristema apical, restringindo a proliferação das células e, consequentemente, o alongamento das raízes (Doncheva, 2005). Em condições de elevada concentração de  $\text{Al}^{3+}$ , o principal sítio de acúmulo é a parede celular, acumulando cerca de 90% em função de rápidas e fortes ligações formadas entre o  $\text{Al}^{3+}$  e a pectina presente na parede celular (Horst *et al.*, 2010). Cumpre mencionar também que  $\text{Al}^{3+}$  pode interagir eletrostaticamente com regiões eletronegativas devido ao grupamento carboxílico presente na pectina ou via adsorção nos

polímeros de hemicelulose; tal interação promove mudanças nas propriedades mecânicas da parede celular, aumentando o nível de rigidez e inibindo o afrouxamento da parede celular na zona de alongação radicular (Kochian *et al.*, 2015; Hajiboland *et al.*, 2023).

O  $\text{Al}^{3+}$  pode também interagir com as estruturas do núcleo celular, comprometendo sua composição e a estrutura da cromatina, afetando negativamente a replicação do DNA devido ao aumento da rigidez da dupla hélice (Gupta; Gaurav; Kumar, 2013; Minocha *et al.*, 1992). Nessas condições, os danos causados ao DNA desencadeiam a ativação de mecanismos de reparo mediados pelos fatores de transcrição ATR (ATM AND RAD3-RELATED), ALT2 (ALUMINUM TOLERANCE 2) e SOG1 (SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE 1), que promovem interrupção no ciclo celular, inibindo o crescimento das raízes (Zhang *et al.*, 2018). Danos em estruturas celulares também podem ocorrer em função do estresse oxidativo decorrente do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) induzida pelo Al, elevando a atividade de enzimas responsáveis pela peroxidação e comprometendo, em última instância, a integridade de componentes da célula (Yin *et al.*, 2010).

Condições de estresse por  $\text{Al}^{3+}$  promovem também o desenvolvimento gradual de alterações no *status* hídrico das plantas, levando a situações de déficit hídrico. Isso ocorre devido a alterações na expressão de genes da família PIP, responsáveis pela formação das aquaporinas, afetando a condutividade hidráulica das raízes (Cavalheiro *et al.*, 2019). Uma regulação positiva do gene que codifica a enzima NCED (9-CIS-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE), essencial para a biossíntese de ácido abscísico (ABA), também é observada em condições de estresse por  $\text{Al}^{3+}$ , resultando no aumento de ABA em folhas e raízes (Gavassi *et al.*, 2021). O agravamento do déficit hídrico ocasiona uma redução na aquisição dos nutrientes, levando também a uma situação de deficiência nutricional (Tao *et al.*, 2018).

Como organismos sésseis, as plantas são vulneráveis a múltiplas condições de estresse, sendo incapazes de evadir de uma região diante de adversidades, o que resultou, durante o processo de evolução, no desenvolvimento de mecanismos de defesa que permitissem a resistência e reprodução mesmo em condições desfavoráveis (Rahman *et al.*, 2024). Para mitigar e tolerar os efeitos tóxicos causados pelo  $\text{Al}^{3+}$ , as plantas exibem mecanismos de exclusão e de tolerância (Kochian *et al.*, 2002). Os mecanismos de exclusão envolvem a exsudação de ácidos orgânicos (AO) como malato, citrato e oxalato que se ligam ao Al, formando complexos não-tóxicos na rizosfera (Nunes-Nesi *et al.*, 2014). Os principais transportadores envolvidos na exsudação de AO em condições de estresse por Al são os canais ALMT (ALUMINIUM-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER) e o carreador MATE (MULTIDRUG AND TOXIC COMPOUND EXTRUSION) (Kochian *et al.*, 2015). Para os

mecanismos de tolerância, há o influxo de  $\text{Al}^{3+}$ , através da membrana plasmática nas células das raízes para o citosol, via transportadores NRAT (NODULIN 26-LIKE INTRINSIC PROTEIN-RELATED ALUMINUM TRANSPORTER) e NIPs (NODULIN 26-LIKE INTRINSIC PROTEIN), onde o  $\text{Al}^{3+}$  é rapidamente quelado pela ação de AO e, em algumas espécies, por compostos fenólicos; registre-se, ainda, que os complexos formados são prontamente sequestrados para a região do vacúolo através dos transportadores do tipo ALS1-ABC ou VALT1 (PLASMA MEMBRANE AND VACUOLAR ALUMINUM TRANSPORTERS) (Kochian *et al.*, 2015; Kochian *et al.*, 2002; Gupta; Gaurav; Kumar, 2013). Cumpre mencionar também que o aumento da tolerância ao Al não é alcançado com a utilização de apenas um mecanismo atuando de forma isolada, mas principalmente devido a combinação de diferentes estratégias, assim como o aumento da atividade de enzimas contra peroxidação, conteúdo de polifenóis, síntese de óxido nítrico (NO) e o acúmulo do Al em estrutura foliares para posterior excreção (Ezaki *et al.*, 2013).

Embora a toxicidade causada pelo Al seja relatada como uma das principais problemáticas para as plantas cultivadas em solos ácido, esse íon pode também oferecer efeitos benéficos para espécies nativas e adaptadas aos solos com baixo pH e alto teor de Al (Bojórquez-Quintal *et al.*, 2017). Espécies classificadas como hiperacumuladoras são insensíveis a altas concentrações e longa exposição ao Al, não apresentando efeitos tóxicos decorrentes do contato com o Al, sendo divididas em dois tipos: (i) hiperacumuladoras obrigatórias – crescem apenas em solos metalíferos, sendo incapazes de sobreviver sem determinado metal e (ii) hiperacumuladoras facultativas – podem crescer e se desenvolver adequadamente na presença ou ausência de metais no solo (Pollard; Reeves; Baker, 2014). Para essas espécies, o Al é um íon fundamental durante o crescimento e desenvolvimento e sua presença no solo é capaz de estimular o comprimento total das raízes e aumentar a biomassa das raízes, folhas e caule (Ofoe *et al.*, 2022; Bressan *et al.*, 2021). Em *Camellia sinensis* (chá-da-Índia), a ausência do Al durante o seu crescimento resultou na inibição da formação de novas raízes, comprometimento da atividade do meristema apical radicular e da integridade do DNA (Sun *et al.*, 2020).

Espécies vegetais que não foram sujeitas ao processo de seleção artificial, denominadas selvagens, usualmente apresentam maior eficiência em lidar com estresse por Al e outros estresses abióticos em comparação com espécies domesticadas que, apesar de apresentarem maior produtividade, são mais sensíveis às flutuações nas condições ambientais (Zhang *et al.*, 2022). Com efeito, o processo de domesticação resultou em um enfraquecimento da interação entre os componentes circadianos, metabólicos e do desenvolvimento, reduzindo, assim, a

resiliência das culturas em função de aumentos na produtividade (Siqueira *et al.*, 2023). Deste modo, espécies não-domesticadas apresentam, usualmente, maior resiliência em múltiplas condições de estresse, fazendo com que sejam ótimas candidatas no processo de domesticação *de novo*. Esse processo busca aliar a tolerância observada em plantas selvagens em condições de estresse com modificações genéticas relacionadas aos principais genes de produtividade, resultando em plantas que conciliam alta tolerância com elevada produtividade (Gasparini *et al.*, 2021).

Caraterizada como um dos maiores grupos vegetais, a família Solanaceae conta com 3000 espécies distribuídas em 80 gêneros com ocorrência em todo mundo; Solanum, o principal gênero da família, engloba ervas anuais, arbustos e árvores de florestas tropicais (Raj *et al.*, 2022). Apresentando uma ampla distribuição em regiões tropicais, subtropicais e zonas temperadas, a ocorrência do gênero Solanum na região da América do Sul integra cerca de 50% de todas as espécies do mundo, com cerca de 1595 espécies nativas e 16 espécies introduzidas, sendo sua maioria cultivada em solos com elevada acidez, o que culmina, em larga escala, em reduções da produtividade total (He; Li; He, 2019; Palchetti; Cantero; Barboza, 2020). *Solanum lycocarpum* A. St. Hill, popularmente conhecida como Lobeira ou Fruta-do-Lobo, é uma espécie arbustiva a arbórea, atingindo altura máxima de 5 metros, apresentando folhas coriáceas e cobertas por tricomas, flores hermafroditas com frutos bacoides do tipo solanídios, e é distribuída amplamente no Brasil em áreas de Cerrado e Mata Atlântica, ocorrendo em solos pobres, extremamente ácidos ( $\text{pH} < 5$ ) e com altos teores de Al (Carvalho, 2010; Stehmann *et al.*, 2015).

Considerando o intensivo avanço no processo de acidificação dos solos e o constante aumento da demanda populacional, a exploração de novas formas que permitam o cultivo de plantas, mesmo em solos pouco aráveis, é indispensável. Registre-se, ainda, a necessidade em melhor compreender os mecanismos que permitem o crescimento de determinadas espécies em solos ácidos e com alta saturação de Al. Tais informações podem culminar em novos *insights* para o processo de domesticação *de novo*. Neste contexto, o presente trabalho buscou elucidar os possíveis mecanismos fisiológicos, anatômicos e metabólicos responsáveis por possibilitar o crescimento e o desenvolvimento de *S. lycocarpum* em solos ácidos e saturados por Al, ampliando as bases de estudo sobre a interação desse metal com espécies selvagens, gerando novas perspectivas sobre o cultivo de Solanaceas não-domesticadas em solos ácidos.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal e condições experimentais

Sementes de *Solanum lycocarpum*, selecionadas quanto ao tamanho, forma e ausência de danos no tegumento, foram sujeitas a escarificação mecânica na região do hilo com utilização de lixa *P100*, uma vez que apresentam uma baixa taxa de germinação na ausência de tratamentos pré-germinativos que auxiliem na ruptura do tegumento (Pinto *et al.*, 2007). Em seguida, as sementes foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 1% por 10 minutos e, prontamente, lavadas em água deionizada.

Para condução do experimento, foi utilizado sistema de cultura de areia em vasos com volume de 2 L, sendo umedecido com solução nutritiva de Clark (*full-strength*) e pH ajustado para 4,2 (Clark, 1975). Foram colocadas 4 sementes em cada vaso e, após germinação e formação do segundo par de folhas, realizou-se o desbaste de três plantas, deixando apenas uma por vaso, onde cada vaso correspondeu a uma repetição biológica. Para a execução do experimento, os vasos com areia foram levados até sua capacidade de campo (umidade 100%). A massa dos vasos foi monitorada diariamente, permitindo acompanhamento da taxa de evaporação e reposição da solução, mantendo a umidade da areia em ~80%. Após o desbaste a solução nutritiva passou a ser suplementada com 600  $\mu\text{M}$  de Al (+Al) e 0  $\mu\text{M}$  de Al (-Al) com pH ajustado para 4,2. A aplicação de Al foi realizada por um total de 20 dias, sendo as plantas cultivadas em casa de vegetação.

### 2.2 Parâmetros biométricos

A altura da parte aérea e o comprimento do sistema radicular foram obtidos após finalização do período de estresse por Al. Para isso, o material vegetal foi digitalizado e avaliado com a utilização do *software* ImageJ® (Boito *et al.*, 2013). Após isso, as plantas foram limpas com o uso de água deionizada e separadas em parte aérea (folhas e caule) e sistema radicular, possibilitando obtenção da massa fresca. Posteriormente, o material vegetal foi colocado em sacos de papel e submetidos a secagem em estufa de circulação de ar forçado a 70 °C até obtenção de massa constante para determinação de massa seca.

### 2.3 Análise morfológica de raízes

Para avaliação da morfologia do sistema radicular, utilizou-se o *software* WinRhizo Pro 2013c (Regente Instruments Inc.), acoplado a um scanner profissional Epson (Expression 10000 XL, Epson America, Inc.), equipado com uma unidade de luz adicional (TPU). As raízes

foram dispostas em cuba acrílica 30 x 40 cm para análise para obtenção das imagens. Os seguintes parâmetros foram obtidos: comprimento total das raízes (cm); diâmetro (mm); área projetada (cm<sup>2</sup>); área de superfície (cm<sup>2</sup>) e volume (cm<sup>3</sup>) (Li *et al.*, 2020).

## 2.4 Parâmetros de fluorescência e trocas gasosas

Os parâmetros de trocas gasosas foram determinados com a utilização da quarta folha completamente expandida após a exposição ao estresse com Al. Para tanto, foi utilizado um analisador de gás infravermelho portátil de fluxo aberto (Li 6400XT, Li-Cor, Inc., Lincoln, NE, EUA) para determinação da assimilação líquida de CO<sub>2</sub> ( $A_N$ ), concentração intercelular de CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ), taxa transpiracional ( $E$ ) e condutância estomática ( $g_s$ ). As medições foram realizadas após um período de 1 hora com iluminação nas folhas, utilizando 90% de luz vermelha e 10% de luz azul e 425 ppm como concentração de CO<sub>2</sub>. Para determinação da respiração no escuro ( $R_e$ ), foi utilizado o mesmo equipamento citado anteriormente, alterando apenas o período de análise, com leituras realizadas 2 horas após exposição a ambiente escuro.

Para parâmetros de fluorescência, foram utilizadas medidas obtidas na presença e na ausência de luz, permitindo o cálculo da taxa de transporte de elétrons (ETR), eficiência fotoquímica máxima do PSII ( $F_vF_m$ ), rendimento quântico do PSII (YII), coeficiente de extinção não-fotoquímico (NPQ) e coeficiente de extinção fotoquímico (qL) (Baker, 2008; Murchie; Lawson, 2013).

## 2.5 Anatomia e histolocalização do Al pelo método *Chrome Azurol*

Para identificação do padrão anatômico e de acúmulo do Al, foram coletadas amostras da região mediana de folhas completamente expandidas e a região do ápice de raízes, o material foi rapidamente fixado em FAA50 (Johansen, 1940), desidratado em série etanólica e, por fim, incluídas em metacrilato (Historesin, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha). Em seguida, os blocos foram seccionados em micrótomo rotativo (modelo RM2265, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA), resultando em secções com espessura de 4 a 8 µm. As secções destinadas para caracterização anatômica foram submetidas à coloração com Azul de Toluidina 1% durante 5 minutos (O'Brien *et al.*, 1964). Para histolocalização do Al, o material foi submetido à coloração com reagente *Chrome Azurol S* 0.5% durante uma hora, sendo a cor azul considerada como resultado positivo para presença do Al nos tecidos (Andrade *et al.*, 2011).

## 2.6 Análises metabólicas

Amostras de folhas e raízes foram coletadas ao final do período de exposição ao Al (11h20), sendo imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C até as análises subsequentes. O material foi liofilizado e submetido ao processo de maceração em moinho de bolas. Para avaliação do perfil metabólico foi utilizado  $\pm 10$  mg de material liofilizado, sendo submetido ao processo de extração com o uso de metanol 100% (P. A.). Os pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides) foram determinados conforme descrito anteriormente por Welburn (1994), o teor de amido, glicose, frutose e sacarose foram determinados de acordo com o método de Fernie *et al.*, (2001), ao passo que os aminoácidos livres foram quantificados conforme Yemm e Coking (1955) e as proteínas solúveis totais de acordo com Bradford (1976). Para determinação do teor total dos ácidos orgânicos malato e fumarato, utilizou-se a metodologia descrita por Nunes-Nesi *et al.*, (2007).

## 2.7 Análises estatísticas

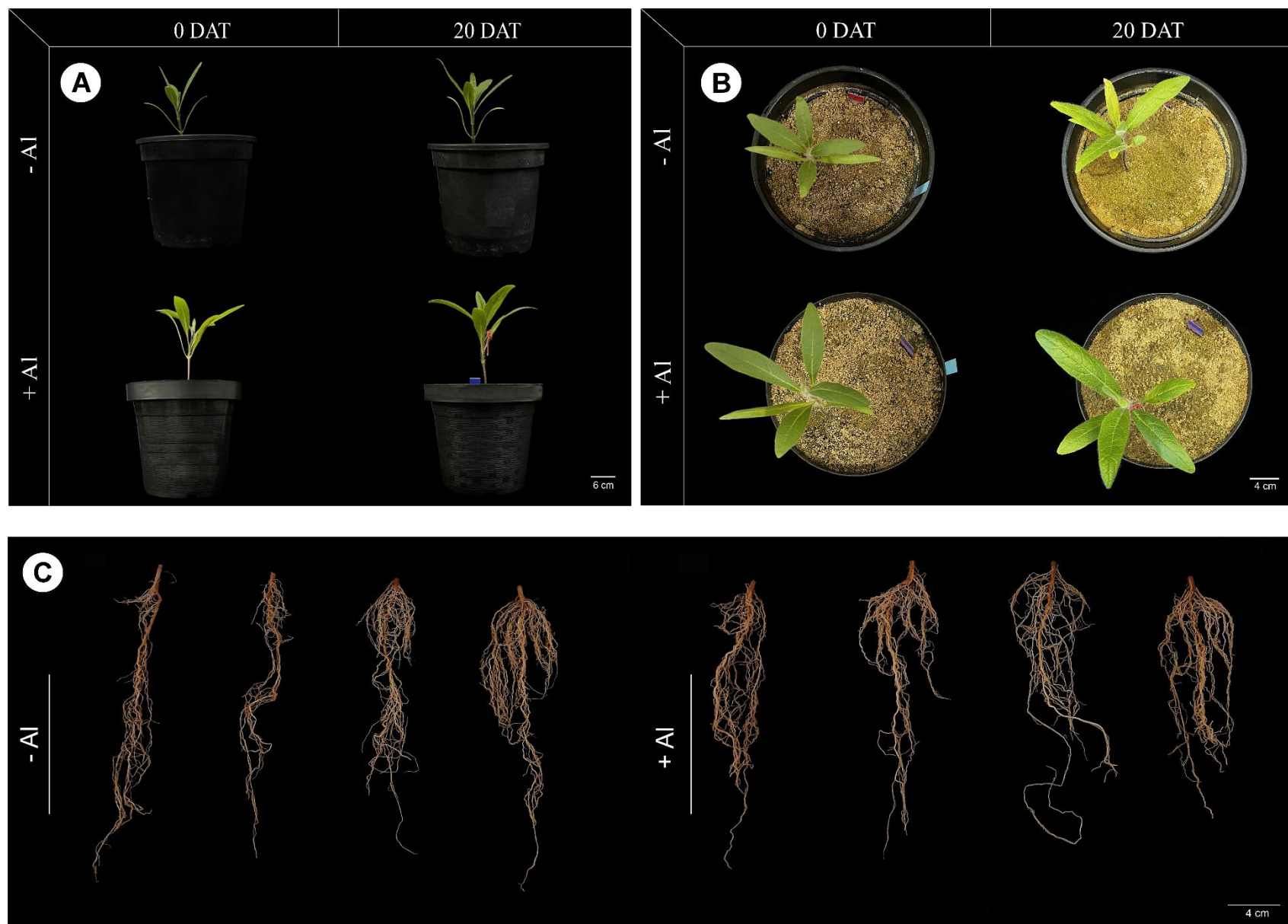
O experimento foi conduzido através de um sistema de delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 10 repetições por tratamento. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade *Shapiro-Wilk* ( $P \geq 0,05$ ) e ao teste de homogeneidade de *Levene* ( $P \geq 0,05$ ). Atendendo aos critérios de normalidade e homogeneidade, as médias foram comparadas pelo Teste *T* de *Student* ( $P \leq 0,05$ ). Quando necessário, utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste de *Tukey* com 5% de probabilidade. Todas as análises foram realizadas com a utilização do *software* estatístico *R*.

### 3. RESULTADOS

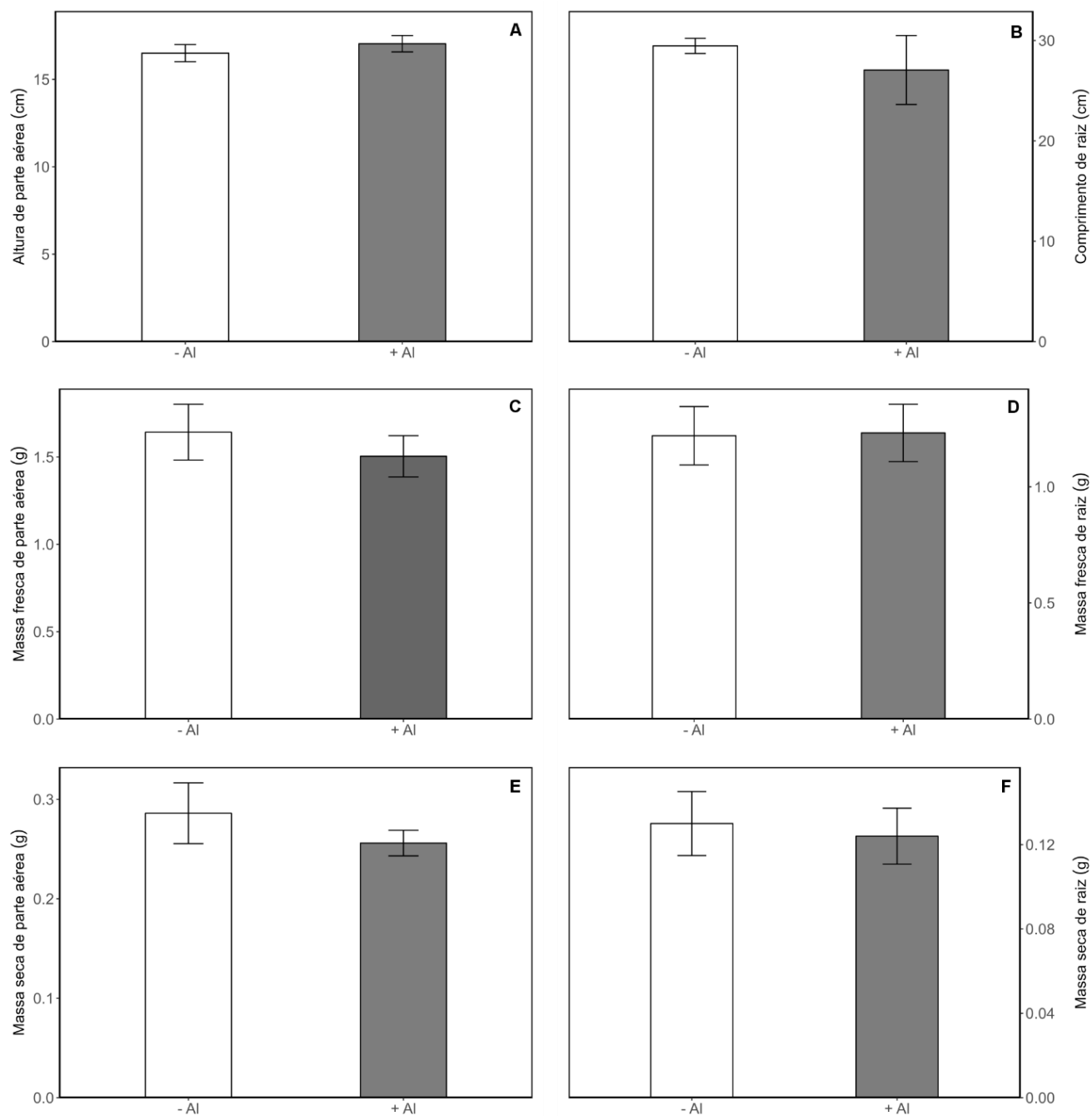
#### 3.1 Exposição ao Al não leva a alterações fenotípicas e na partição de biomassa em *S. lycocarpum*

Concluído o período de 20 dias de estresse, observou-se que as plantas de *S. lycocarpum* cultivadas com Al não apresentaram alterações fenotípicas em relação ao tratamento controle (Fig. 1A-B). Foi possível observar que não houve o comprometimento da integridade das raízes de *S. lycocarpum*, sendo fenotipicamente semelhantes ao controle, ainda que com desenvolvimento mais acentuado das raízes secundárias.

A adição de Al no meio não resultou em alterações significativas tanto em altura de parte aérea quanto no comprimento do sistema radicular (Fig. 2A-B). Não houve alterações significativas para a massa fresca e seca da parte aérea entre os tratamentos (Fig. 2C-E), sendo observado padrão semelhante em relação a biomassa do sistema radicular (Fig. 2D-F), indicando que a presença do Al não promoveu alterações significativas na partição de biomassa. Embora alterações significativas na partição de biomassa não tenham sido verificadas, é possível observar que as plantas do tratamento controle (-Al) apresentaram um maior investimento em biomassa na parte aérea, ao passo que plantas expostas ao Al apresentam mais redirecionamento de biomassa para suas raízes, o que pode explicar o crescimento diferencial das raízes secundárias.



**Figura 1.** Crescimento e desenvolvimento de plantas de *Solanum lycocarpum* em sistema de cultura de areia. Dias após tratamento (DAT) divididos em 0 (início do experimento) e 20 (fim do período de estresse). Inicialmente, todas as plantas foram cultivadas em areia e umedecidas com solução de Clark (*full-strength*) na ausência do Al (0 DAT). Após isso, foram divididas em um grupo controle (-Al) e com Al (+Al). Após 20 dias de tratamento, novas imagens foram registradas. **(A)** Vista frontal das plantas, evidenciando influência do Al na altura. **(B)** Vista superior das plantas, evidenciando o desenvolvimento das folhas. **(C)** Sistema radicular de plantas controle (-Al) e tratadas com Al (+Al) após 20 DAT.

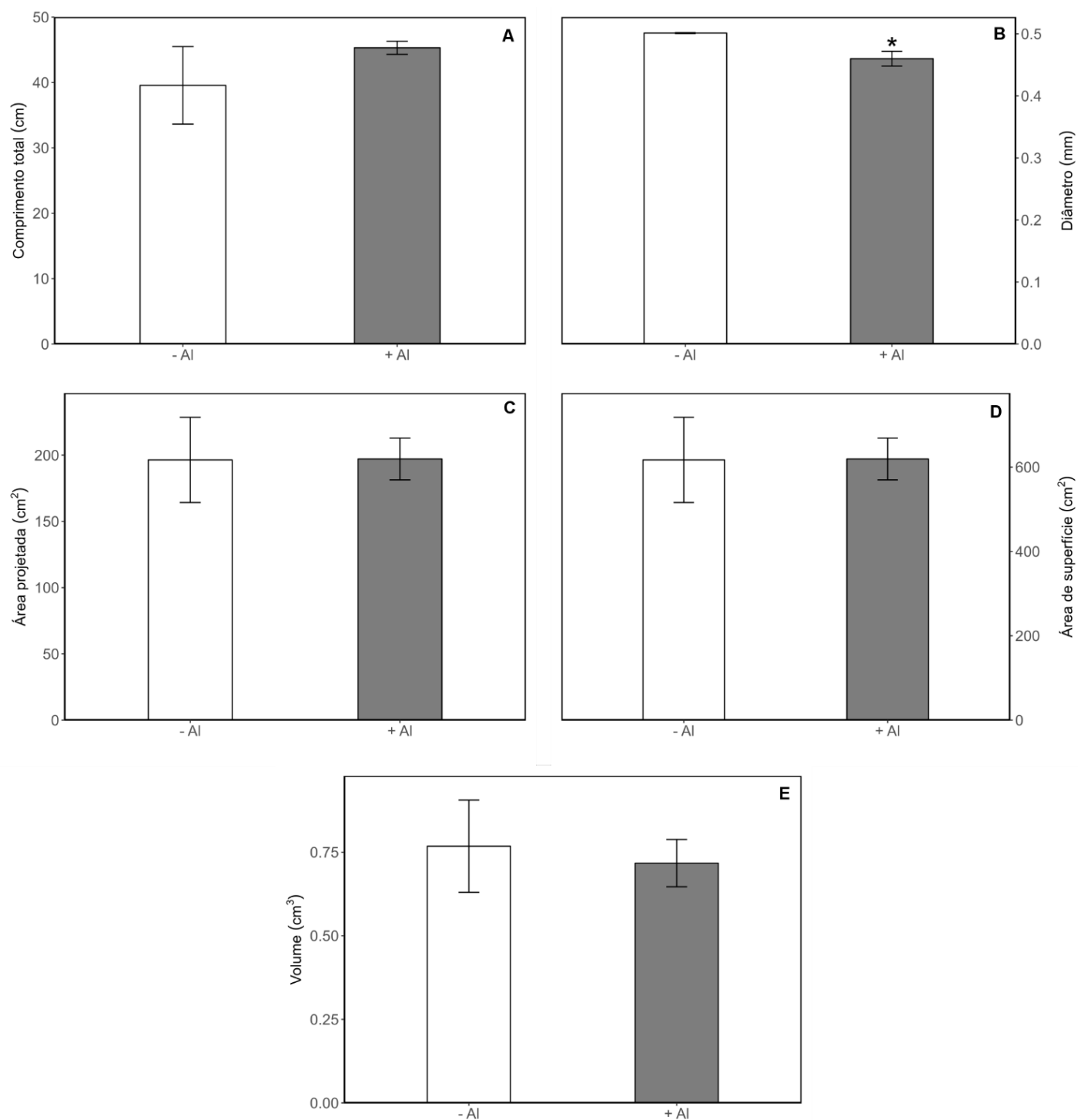


**Figura 2.** Efeitos do Al em parâmetros biométricos em indivíduos de *Solanum lycocarpum* após exposição de 20 dias. **(A)** Altura de parte aérea; **(B)** Comprimento de raiz; **(C)** Massa fresca de parte aérea; **(D)** Massa fresca de raiz; **(E)** Massa seca de parte aérea; **(F)** Massa seca de raiz. Os valores representam médias  $\pm$  erro padrão (n=5). Asteriscos (\*) indicam diferença significativa do tratamento (+Al) em relação ao controle (-Al) conforme determinado pelo Teste *T* ( $P < 0,05$ ).

### 3.2 Caracterização morfológica de raízes sob estresse por Al

Considerando que as raízes são os principais órgãos afetados pela toxicidade por Al, análises morfológicas mais detalhadas foram realizadas para melhor visualização dos efeitos desse metal no crescimento e desenvolvimento radicular. Embora o comprimento de raiz (Fig. 2B) não leve em consideração a extensão total das raízes secundárias, foi observado um valor médio maior para o controle (-Al). Todavia, a avaliação de toda a extensão do sistema radicular, incluindo suas raízes secundárias, demonstrou que, apesar de não haver diferença significativa entre os tratamentos, plantas que cresceram com Al apresentaram um maior comprimento total de sistema radicular (Fig. 3A) devido ao aumento de raízes secundárias, o que também pode ser observado ao término do período de estresse (Fig. 1C).

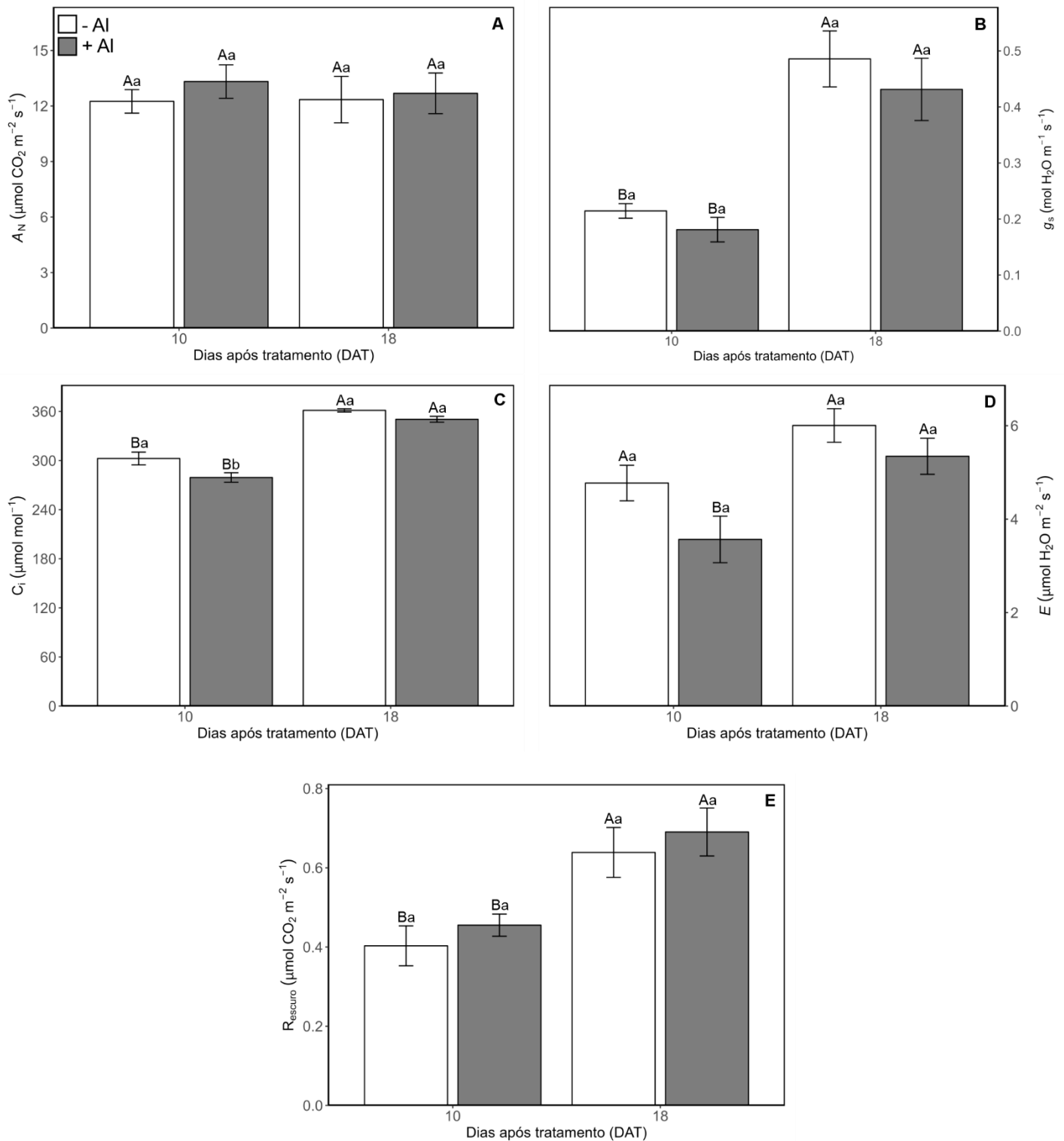
A adição de Al no meio não comprometeu a morfologia das raízes de *S. lycocarpum*, visto que não houve alterações significativas para as variáveis de comprimento total, área projetada, área de superfície e volume (Fig. 3). Contudo, o diâmetro das raízes desenvolvidas na presença do Al apresentou uma redução em comparação ao controle (Fig. 3B), o que pode ser atribuído, parcialmente, ao aumento na quantidade e extensão das raízes secundárias.



**Figura 3.** Efeitos do Al no crescimento e desenvolvimento de raízes em indivíduos de *Solanum lycocarpum* após exposição de 20 dias. **(A)** Comprimento total; **(B)** Diâmetro; **(C)** Área projetada; **(D)** Área de superfície; **(E)** Volume. Os valores representam médias  $\pm$  erro padrão (n=5). Asteriscos (\*) indicam diferença significativa do tratamento (+Al) em relação ao controle (-Al) conforme determinado pelo Teste *T* ( $P < 0,05$ ).

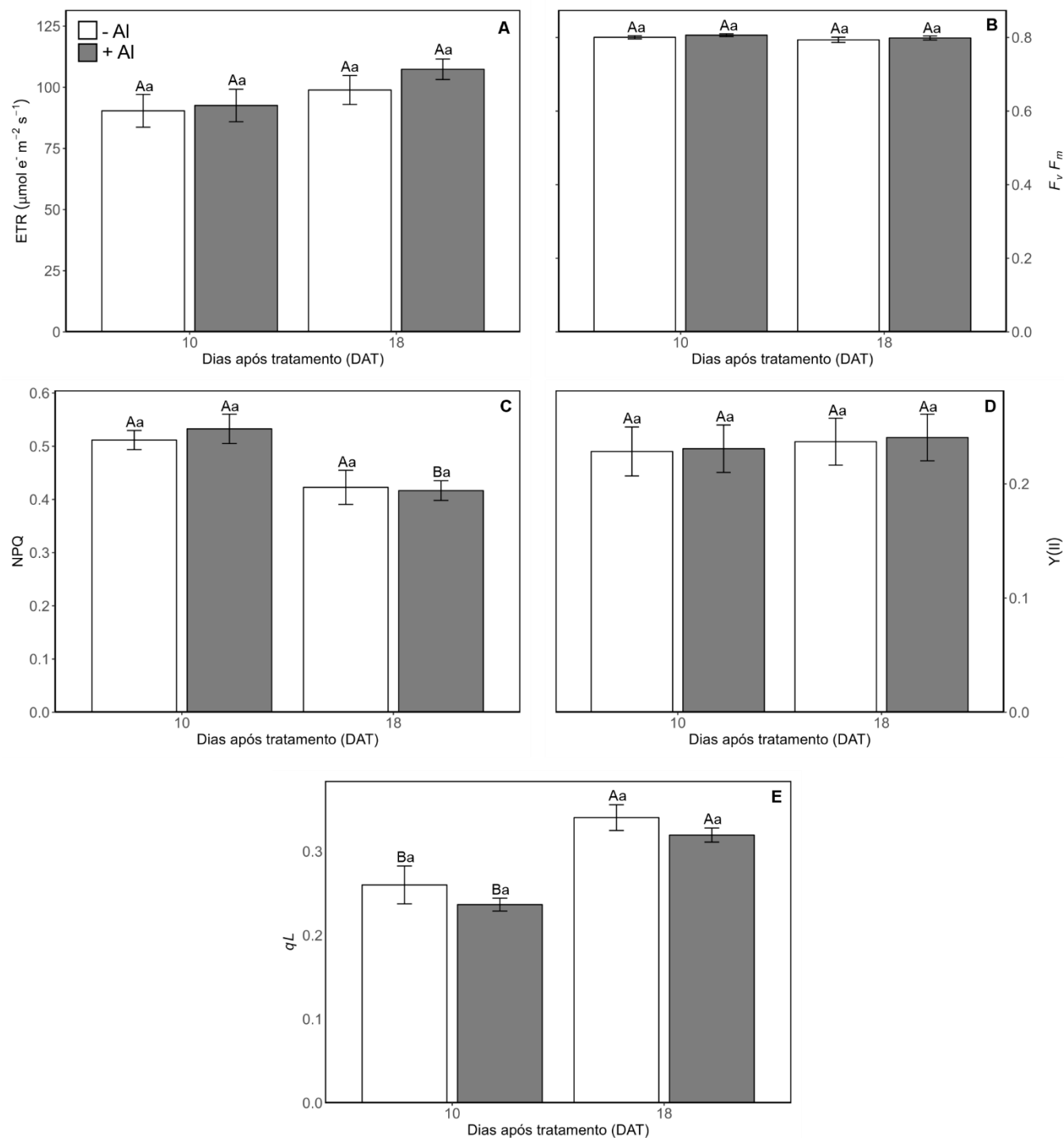
### 3.3 Trocas gasosas e parâmetros fotoquímicos não são comprometidos em *S. lycocarpum* mediante presença do Al

Foram realizadas análises de trocas gasosas e parâmetros fotoquímicos em dois momentos distintos, sendo 10 e 18 dias após tratamento (DAT), possibilitando observar como, ao longo do tempo, o Al poderia influenciar o metabolismo fotossintético em plantas de *S. lycocarpum* (Fig. 4). A taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> ( $A_n$ ), condutância estomática ( $g_s$ ) e taxa transpiracional ( $E$ ) não foram afetados pela presença de Al (Fig. 4). Tal fato demonstra que não houve o comprometimento do desempenho fotossintético das folhas formadas e expandidas durante o período de estresse por Al. Por outro lado, observa-se que a concentração intercelular de CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ) foi menor em plantas tratadas com Al quando comparadas com o controle no 10 DAT (Fig. 4C), fato que não foi novamente observado na segunda análise realizada com 18 DAT. Nesse sentido, essa alteração observada em primeiro momento pode ser justificada, parcialmente, por uma menor  $g_s$  e maior  $A_n$  exibido por plantas +Al. Apesar de não haver diferenças significativas na respiração no escuro ( $R_{\text{escuro}}$ ) entre as plantas tratadas com Al e o controle, observa-se que, para ambos os DAT avaliados, há uma maior  $R_{\text{escuro}}$  em plantas com Al (Fig. 4E).



**Figura 4.** Efeitos do AI em parâmetros de trocas gasosas em indivíduos de *Solanum lycocarpum* avaliados 10 e 18 dias após tratamento (DAT). **(A)** Fotossíntese líquida ( $A_N$ ); **(B)** Condutância estomática ( $g_s$ ). **(C)** Concentração intercelular de carbono ( $C_i$ ). **(D)** Taxa transpiracional ( $E$ ). **(E)** Respiração no escuro. Os valores representam médias  $\pm$  erro padrão ( $n=10$ ). Letras maiúsculas comparam o mesmo tratamento em diferentes DAT, enquanto minúsculas comparam diferentes tratamentos em um mesmo DAT. Letras diferentes indicam diferença significativa conforme Análise de Variância de Duas Vias ( $P < 0,03$ ).

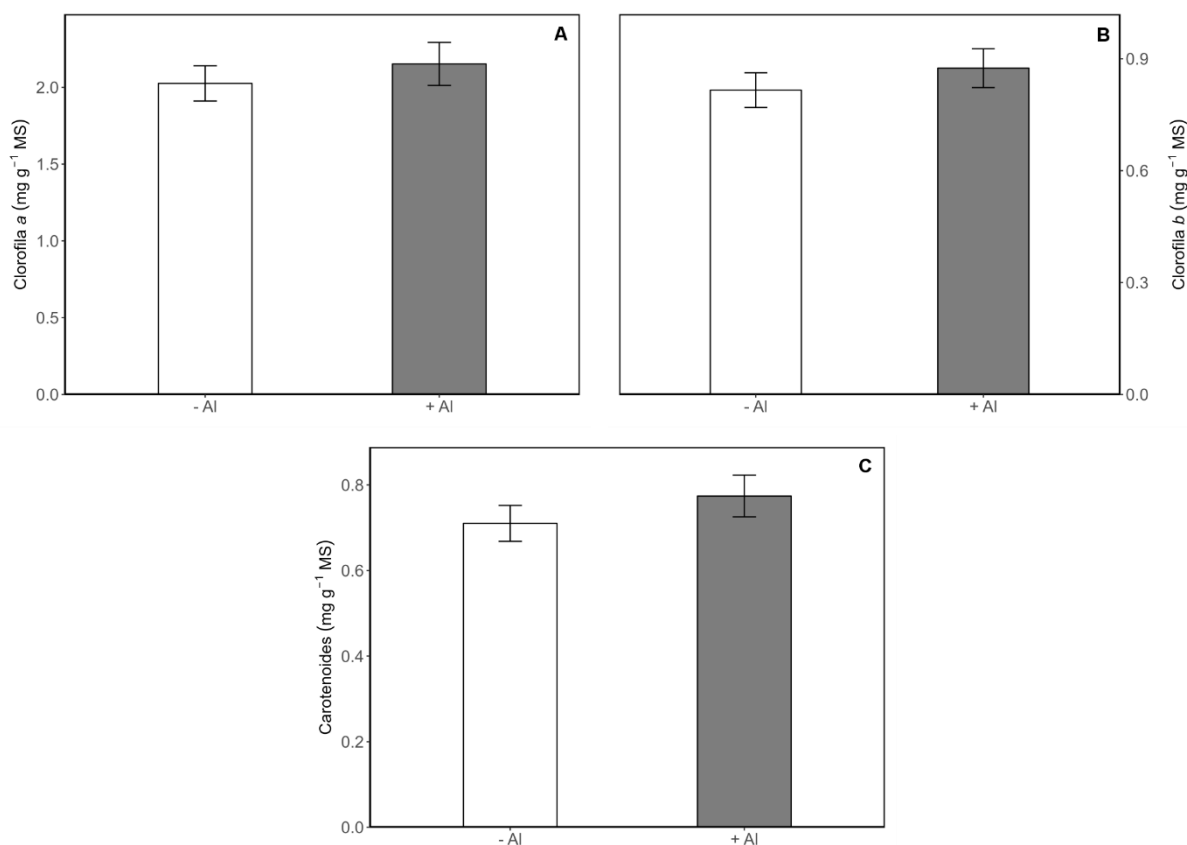
Para os parâmetros fotoquímicos avaliados em 10 e 18 DAT, não foram observadas diferenças significativas para a taxa de transporte de elétrons (ETR) (Fig. 5A), eficiência quântica máxima do PSII ( $F_vF_m$ ) (Fig. 5B), coeficiente de extinção não-fotoquímica (NPQ) (Fig. 5C), rendimento quântico do PSII (YII) (Fig. 5D) e coeficiente de extinção fotoquímica ( $qL$ ) (Fig. 5E) em plantas com Al em comparação com plantas controle (Fig. 5), o que evidencia a ausência da interferência do Al em dinâmicas energéticas, fotoquímicas e não-fotoquímicas, ligadas ao consumo e dissipação de energia.



**Figura 5.** Efeitos do Al em parâmetros fotoquímicos em indivíduos de *Solanum lycocarpum* avaliados 10 e 18 dias após tratamento (DAT). **(A)** Taxa de transporte de elétrons (ETR); **(B)** Eficiência fotoquímica máxima do PSII ( $F_v F_m$ ). **(C)** Coeficiente de extinção não-fotoquímico (NPQ). **(D)** Rendimento quântico do PSII ( $Y(II)$ ). **(E)** Coeficiente de extinção fotoquímico ( $qL$ ). Os valores representam médias  $\pm$  erro padrão (n=10). Letras maiúsculas comparam o mesmo tratamento em diferentes DAT, enquanto minúsculas comparam diferentes tratamentos em um mesmo DAT. Letras diferentes indicam diferença significativa conforme Análise de Variância de Duas Vias ( $P < 0,03$ ).

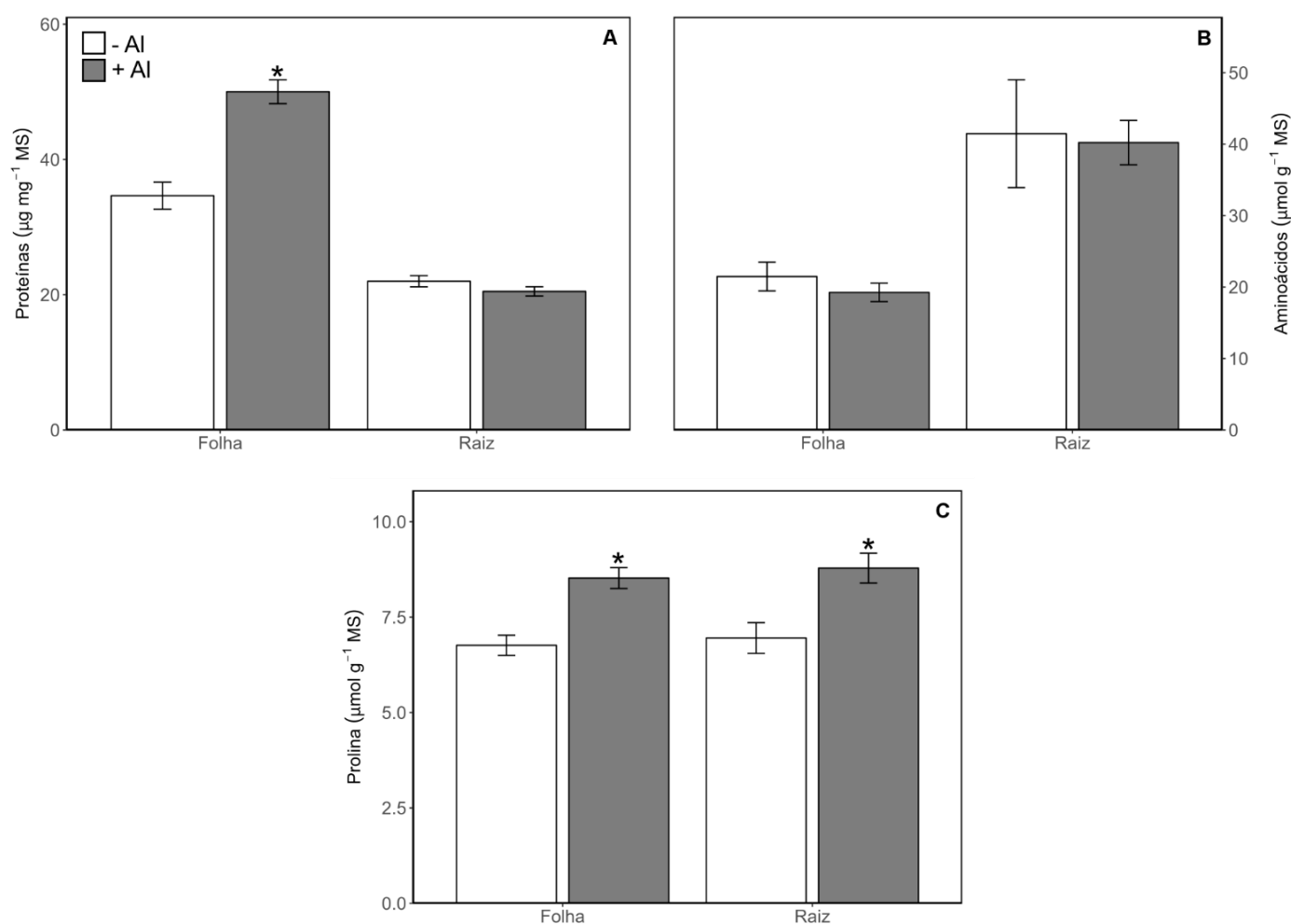
### 3.4 Estresse por Al promove alterações metabólicas em folhas e raízes de *S. lycocarpum*

Com o intuito de elucidar a influência do Al no metabolismo de *S. lycocarpum*, análises foram conduzidas utilizando folhas e raízes para determinação do conteúdo de metabólitos. Não se observaram diferenças significativas na concentração de clorofila *a* e *b*, bem como de carotenoides, em plantas tratadas com Al em relação ao controle (Fig. 6).



**Figura 6.** Variação dos níveis de pigmentos fotossintéticos em folhas de *Solanum lycocarpum* após exposição de 20 dias ao Al. **(A)** Clorofila *a*; **(B)** Clorofila *b*; **(C)** Carotenoides. Os valores representam médias  $\pm$  erro padrão ( $n=5$ ). Asteriscos (\*) indicam diferença significativa do tratamento (+Al) em relação ao controle (-Al) conforme determinado pelo Teste *T* ( $P < 0,05$ ).

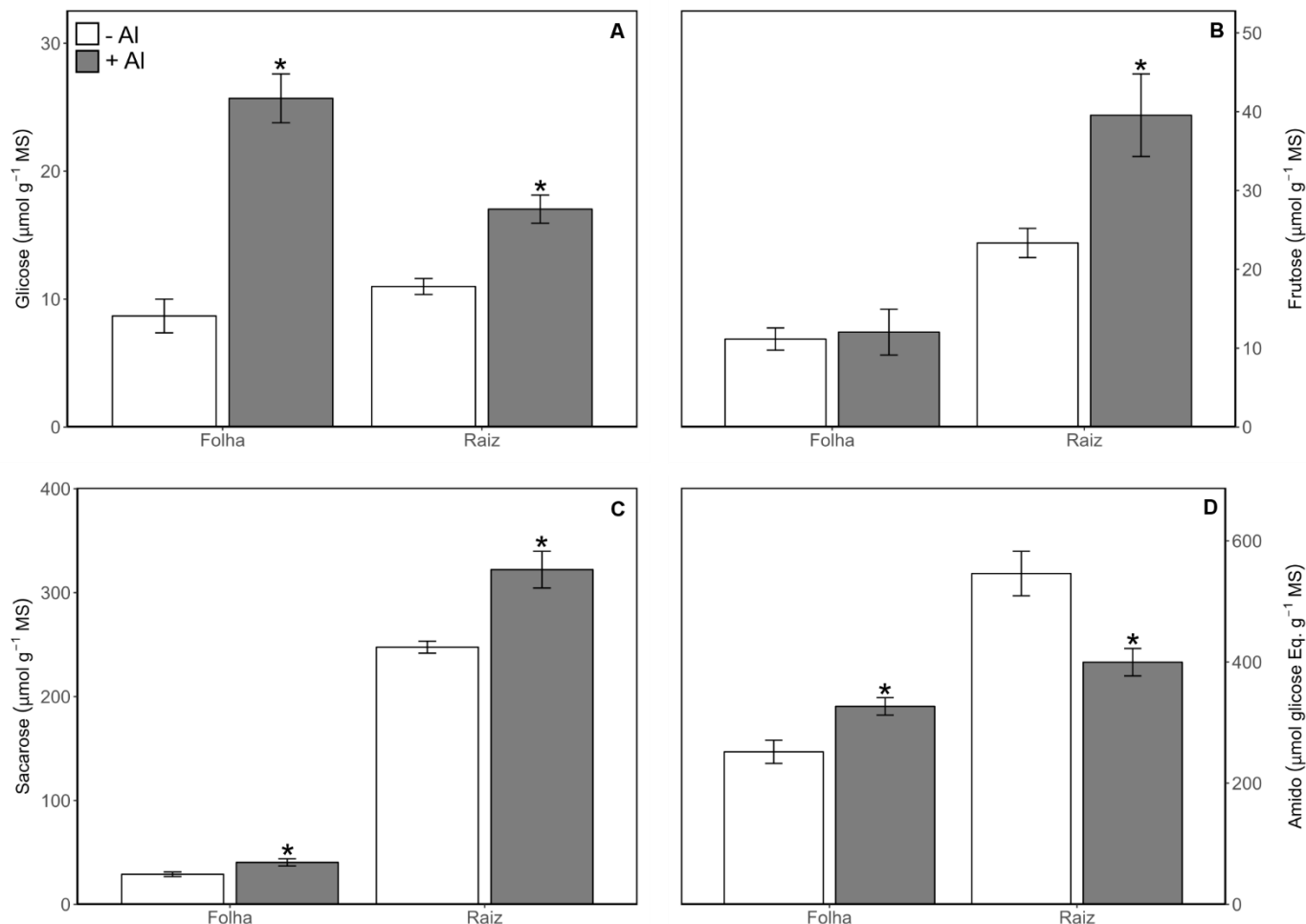
Foi observado um aumento significativo da quantidade de proteínas em folhas +Al quando comparadas com o tratamento controle, ao passo em que não foi registrado comportamento semelhante para raízes, não apresentando nenhuma diferença entre os tratamentos (Fig. 7A). De modo similar, nenhuma alteração significativa foi constatada para os níveis de aminoácidos presentes em folhas e raízes (Fig. 7B). Com efeito, prolina, importante aminoácido com papel na osmoproteção, exibiu um aumento significativo tanto em folhas quanto em raízes em plantas +Al quando comparadas com o controle (Fig. 7C), evidenciando um possível papel deste aminoácido em condições de estresse por Al em *S. lycocarpum*.



**Figura 7.** Alterações nos níveis de metabólitos, em folha e raiz, associados ao metabolismo do nitrogênio em indivíduos de *Solanum lycocarpum* após exposição de 20 dias ao Al. **(A)** Proteínas; **(B)** Aminoácidos; **(C)** Prolina. Os valores representam médias  $\pm$  erro padrão ( $n=5$ ). Asteriscos (\*) indicam diferença significativa do tratamento (+Al) em relação ao controle (-Al) conforme determinado pelo Teste *T* ( $P < 0,05$ ).

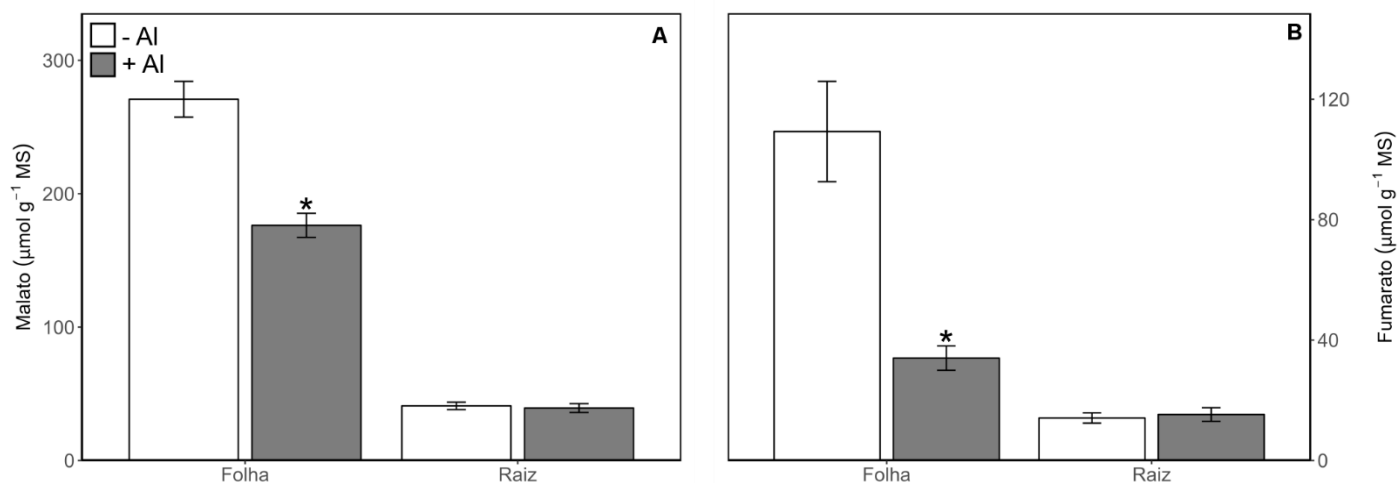
Em plantas submetidas ao tratamento com Al, houve um aumento significativo na concentração de glicose, tanto em folhas quanto em raízes, sendo esse acúmulo mais evidente nas folhas, com um aumento de  $\sim 250\%$  em comparação com as folhas -Al (Fig. 8A). Para os níveis de frutose, não foi observado nenhuma alteração significativa nas folhas, mas houve um aumento da sua concentração nas raízes de plantas tratadas com Al (Fig. 8B). Já para os níveis de sacarose, verificou-se uma maior quantidade tanto em folhas quanto em raízes de plantas tratadas com Al, sendo esse aumento mais evidente nas raízes (Fig. 8C). Diferença significativa foi observada para o acúmulo de amido em folhas e raízes, sendo sua concentração maior em

folhas de plantas +Al. Por outro lado, os níveis de amido nas raízes de plantas +Al foram menores em comparação ao controle (Fig. 8D).



**Figura 8.** Alterações nos níveis de metabólitos, em folha e raiz, associados ao metabolismo do carbono em indivíduos de *Solanum lycocarpum* após exposição de 20 dias ao Al. (A) Glicose; (B) Frutose; (C) Sacarose; (D) Amido. Os valores representam médias  $\pm$  erro padrão (n=5). Asteriscos (\*) indicam diferença significativa do tratamento (+Al) em relação ao controle (-Al) conforme determinado pelo Teste *T* ( $P < 0,05$ ).

Os níveis dos ácidos orgânicos malato e fumarato apresentaram padrão semelhante de distribuição e concentração em folhas e raízes. Para ambos compostos, observou-se uma redução significativa em sua quantidade em folhas de plantas +Al quando comparadas com o controle, ao passo que nenhuma variação significativa foi verificada em raízes, com valores semelhantes entre os tratamentos (Fig. 9A-B).

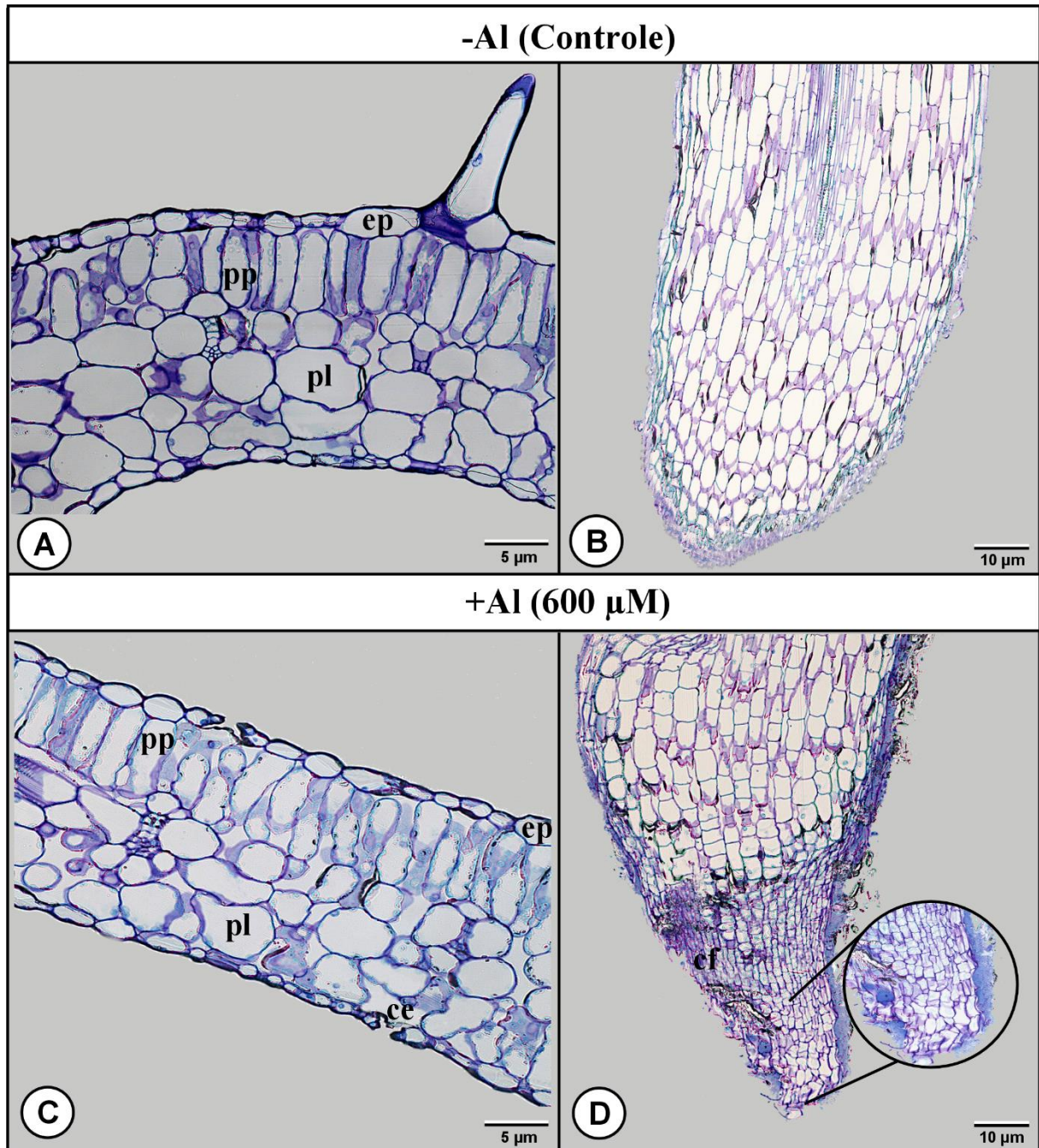


**Figura 9.** Alterações nos de níveis ácidos orgânicos, em folha e raiz, de *Solanum lycocarpum* após exposição de 20 dias ao Al. **(A)** Malato; **(B)** Fumarato. Os valores representam médias  $\pm$  erro padrão (n=5). Asteriscos (\*) indicam diferença significativa do tratamento (+Al) em relação ao controle (-Al) conforme determinado pelo Teste *T* ( $P < 0,05$ ).

### 3.5 Análises anatômicas

Quando comparada a anatomia foliar de plantas +Al e -Al, não há nenhuma alteração na organização estrutural das células. Tanto em presença quanto na ausência de Al, foram observadas folhas com epiderme unisseriada, com células tabulares e dispostas de maneira regular (Fig. 10). As folhas apresentam, também, estômatos na face abaxial e adaxial, caracterizando-se como anfiestomáticas (Fig. 10A-C). Ambas as faces contam com diferentes tipos de tricomas, destacando-se, predominantemente, tricomas tectores (Fig. 10A), sendo a densidade e a localização dos tricomas bastante variável de uma folha para a outra, ainda que em uma mesma planta. O mesófilo é do tipo dorsiventral, sendo o parênquima paliádico formado por uma camada de células mais estreitas e alongadas, ao passo que o parênquima lacunoso é composto por camadas de células poliédricas compactadas (Fig. 10A-C). Nenhuma alteração foi observada entre folhas dos tratamentos (+Al e -Al), sugerindo pouca ou nenhuma interferência do Al na organização celular das folhas de *S. lycocarpum*.

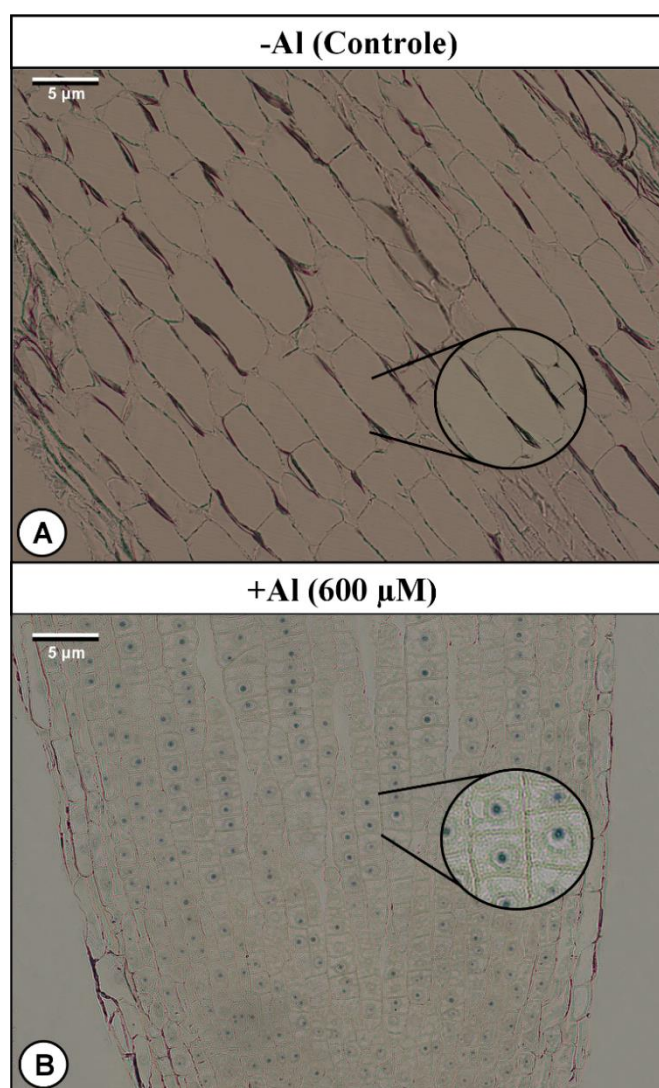
Em relação ao desenvolvimento das raízes, padrão semelhante foi observado na epiderme das plantas -Al e +Al, possuindo uma camada células de formato isodiamétrico (Fig. 10B-D). Logo abaixo, é possível observar as células parenquimáticas que formam o córtex, composto por diversas camadas com células de formatos variados, sendo majoritariamente grandes e levemente arredondas. Na extremidade da raiz é possível observar o meristema apical e a coifa, sendo notável que houve um processo de descamação e desorganização celular no ápice de plantas +Al, padrão comum em raízes expostas ao estresse por Al (Fig. 10D). Quando avaliado o ápice radicular de plantas -Al (Fig. 10B), nota-se que não houve o mesmo comprometimento organizacional das células observado em raízes +Al, confirmando a influência do Al durante o crescimento das raízes em presença do Al.



**Figura 10.** Estrutura foliar e radicular de *Solanum lycocarpum*. Cortes transversais em folhas e longitudinais em raízes – microscopia de luz com azul de toluidina. **(A)** Região mediana de folha (-Al). Epiderme unisseriada e mesófilo dorsiventral. **(B)** Raiz do controle (-Al). Secção longitudinal do ápice radicular. **(C)** Região mediana de folha (+Al). Epiderme unisseriada e mesófilo dorsiventral. **(D)** Raiz exposta ao al (+Al). Secção longitudinal do ápice radicular com foco na coifa. pp = parênquima paliçádico; pl = parênquima lacunoso; ep = epiderme; ce = câmara estomática.

### 3.6 Histolocalização do Al

A utilização de *Chrome Azurol S* possibilitou a identificação de sítios de acúmulo de Al nas raízes de plantas +Al, sendo a formação da cor azul indicativo positivo para reação (Fig. 11). Cabe mencionar que maior acúmulo de Al foi observado em células meristemáticas das raízes (Fig. 11B) e que os dados sugerem a presença do Al na região do núcleo ou nucléolo das células. No entanto, a realização de técnicas mais específicas de identificação é necessária para confirmação mais precisa da localização do Al. Quando comparamos com raízes de plantas -Al (Fig. 11A), é possível observar que não houve nenhuma reação positiva após adição do *Chrome Azurol S*. Neste contexto, é plausível sugerir que o Al aplicado ao longo do período de estresse foi absorvido pelas raízes, o que resultou, em partes, em um acúmulo deste metal na região do núcleo e, possivelmente, em outras regiões intracelulares das raízes.



**Figura 11.** Teste histoquímico com *Chrome Azurol S* para localização do Al no ápice radicular de *Solanum lycocarpum*. A cor azul indica resultado positivo para presença do Al. **(A)** Secção longitudinal do ápice radicular de plantas controle (-Al). **(B)** Secção longitudinal do ápice radicular de plantas expostas ao Al (+Al).

#### 4. DISCUSSÃO

O principal sintoma da toxicidade por Al em plantas é a rápida inibição do crescimento radicular (Zhang *et al.*, 2019), o que ocorre devido à alta afinidade do Al com os grupamentos carboxílicos presentes na pectina da parede celular, resultando em alterações mecânicas que comprometem sua estrutura e função, causando uma menor extensibilidade (Hajiboland *et al.*, 2022; Singh *et al.*, 2017), culminando em raízes menores por redução da capacidade de alongamento. No entanto, os resultados obtidos no presente estudo evidenciaram que o Al não influenciou negativamente no crescimento e morfologia das raízes de *S. lycocarpum* (Fig. 3). Cumpre mencionar também que, a ausência do Al, não foi também um fator decisivo para o desenvolvimento do sistema radicular, diferentemente de espécies como *Camellia sinensis* e *Qualea grandiflora* que, na ausência do Al, apresentam raízes pouco desenvolvidas e necróticas (Sun *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2023). Assim, é possível assumir que *S. lycocarpum* apresenta alta tolerância ao Al, em virtude de a presença deste metal não causar reduções ou o comprometimento no crescimento e desenvolvimento, especialmente do sistema radicular, ao passo que espécies sensíveis exibem reduções consideráveis frente a exposição ao Al.

Apesar de não ter inibido o crescimento das raízes, a adição do Al no meio resultou em uma alteração na estrutura do ápice radicular (Figura 10-D). Essa modificação ocorre devido a interação do Al com a parede celular resultar em uma expansão desigual das células, causando um estresse mecânico e modificando toda a organização e estrutura dos tecidos radiculares (Čiamporová, 2002). Padrão semelhante também é observado em plantas de milho (Souza *et al.*, 2016) e soja (Silva *et al.*, 2020) que, após exposição ao Al, apresentam alterações estruturais no ápice radicular. É importante ressaltar que o desenvolvimento de raízes saudáveis, mesmo na presença do Al, pode ser considerado um indicativo para presença de mecanismos de exclusão ou detoxificação, resultando em aumento da tolerância (Kochian *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2019; Singh *et al.*, 2017).

Também não foram registradas reduções na biomassa de parte aérea ou sistema radicular, efeitos comuns em espécies sensíveis ao Al devido o comprometimento da capacidade fotossintética, causando uma menor assimilação de CO<sub>2</sub> (Ofoe *et al.*, 2023). De modo similar, não houveram impactos nos parâmetros de trocas gasosas e fotoquímicos entre plantas +Al e - Al. Resultados semelhantes foram obtidos por Cárcamo *et al.* (2019), ao observarem que a adição de 200 µM de Al<sup>3+</sup> não promoveu alterações nas trocas gasosas de diferentes cultivares de *Vaccinium corymbosum* L. Com efeito, para espécies como *Citrus limonia*, o estresse por Al resulta em um aumento da expressão da enzima NCED, elevando os níveis de ABA em folhas

e raízes, levando a reduções em  $g_s$  e  $A_N$  que, em última instância, levam ao comprometimento do *status* hídrico da planta devido a menor taxa transpiracional (Gavassi *et al.*, 2021).

Em *Qualea grandiflora*, planta que semelhantemente a *S. lycocarpum*, é típica do Cerrado brasileiro, a ausência do Al durante seu desenvolvimento resulta em menor eficiência de carboxilação da RuBisCo (RIBULOSE-1,5-BISFOSFATO CARBOXILASE OXIGENASSE), evidenciando o caráter benéfico deste elemento para a espécie (Silva *et al.*, 2023). Apesar do Al não resultar em redução da taxa fotossintética ( $A_n$ ) no presente estudo, verificou-se também que sua presença não promoveu um aumento na taxa fotossintética das plantas. Neste sentido, a não-interferência do Al em aspectos de crescimento e desenvolvimento, bem como no desempenho fotossintético das plantas, pode ser um indicativo de resistência, dado que a utilização de mecanismos de exclusão ou tolerância permitem o isolamento de possíveis efeitos tóxicos provenientes do Al que venham a comprometer a homeostase (Singh *et al.*, 2017; Kochian *et al.*, 2015; Horst *et al.*, 2010).

Embora os resultados evidenciem que não houve diferença no crescimento e desenvolvimento, assim como nas trocas gasosas, entre plantas +Al e -Al, mudanças substanciais foram observadas no metabolismo de folhas e raízes durante o período de estresse. A reprogramação do metabolismo é um mecanismo já reconhecido de resposta ao estresse por Al em diferentes espécies de plantas e microrganismos (Nunes-nesi *et al.*, 2014; Auger *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2009). O aumento dos níveis de proteínas e prolina em folhas +Al pode ser um indicativo de possível translocação do Al das raízes para a parte aérea, um mecanismo de tolerância anteriormente observado em plantas típicas do Cerrado (Bressan *et al.*, 2016; Malta *et al.*, 2016). Em *Solanum lycopersicum* var. *esculentum* o uso de proteínas de baixo peso molecular para complexação do Al é um dos principais mecanismos internos de defesa (Nogueirol *et al.*, 2015). Durante o estresse por metais pesados, assim como outros fatores abióticos, o acúmulo de prolina em folhas e raízes é esperado em virtude da sua função osmoprotetora que garante estabilidade para o funcionamento do maquinário proteico (Sharmila; Pardha Saradhi, 2002). Assim, ao passo em que o Al é realocado para as folhas, mecanismos de detoxificação são ativados para promover sua quelação ou complexação (Nunes-nesi *et al.*, 2014).

Os níveis de açúcares solúveis também foram maiores em raízes e folhas de plantas +Al (Fig. 8A-B-C). Tal acúmulo parece ser resultado da tentativa de redução do potencial osmótico das raízes, permitindo continuidade na absorção de água mesmo em condições estressantes causadas pela ligação do Al na parede celular (Giannakoula *et al.*, 2010). Além disso, o aumento no fluxo de açúcares para as raízes parece reduzir os sintomas de toxicidade do Al, uma vez que

auxiliam no alongamento celular e na síntese de ATP, permitindo a manutenção do crescimento (Moriyama *et al.*, 2016; Pereira-Lima *et al.*, 2023). Além do aumento de açúcares solúveis nas folhas, foi também observado uma maior concentração de amido em plantas +Al (Fig. 8D). Cabe mencionar que esse acúmulo de carboidratos em folhas é observado tanto em genótipos sensíveis (Giannakoula *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2012) quanto tolerantes ao Al (Pinto *et al.*, 2021; Siqueira *et al.*, 2020). Essa resposta está associada, aparentemente, a uma tentativa de regular o potencial osmótico e aumentar a sinalização celular durante o estresse por Al, ativando vias relacionadas ao aumento da expressão de genes de tolerância (Kocjan, Kwasniewska, Szurman-Zubrzycka, 2024; Moreno-Avarado *et al.*, 2017). Trabalhos futuros devem verificar o padrão de expressão de genes reconhecidamente envolvidos na tolerância ao Al em *S. lycocarpum*.

Os AOs apresentam-se como um dos principais metabólicos responsáveis pelo aumento da tolerância ao Al em plantas, ao formarem complexos não-tóxicos com o Al (Kochian *et al.*, 2015; Ofoe *et al.*, 2023). O conteúdo de AOs foi consideravelmente reduzido em folhas de plantas +Al (Fig. 9), enquanto em raízes nenhuma alteração foi observada. Em plantas tolerantes, a quelação do Al por AOs nas folhas é um dos principais mecanismos internos de detoxificação, o que resulta na redução da concentração de  $Al^{3+}$  livre nas células (Siecińska, Nosalewicz, 2017). Além disso, esse mecanismo permite a formação de complexos Al-AOs, possibilitando o transporte e a compartimentalização desses quelados insolúveis em vacúolos e outras estruturas (Xu *et al.*, 2017; Castro *et al.*, 2022). Quando presente na célula de forma livre, o Al aumenta a produção de EROs, resultando na peroxidação de componentes celulares e ativação de vias de sinalização de morte celular programada (Huang *et al.*, 2014; Yamamoto, 2019). Assim, é razoável assumir que a redução dos níveis de AOs nas folhas de *S. lycocarpum* possa ser indicativo de um mecanismo interno de detoxificação, onde a formação de complexos Al-AOs diminui o  $Al^{3+}$  livre na célula, prevenindo efeitos tóxicos, tal como danos oxidativos. A baixa variação no conteúdo de AOs nas raízes também foi observada em milho (*Zea mays* L.) em condições de estresse por Al (Chaffai *et al.*, 2009), o que foi atribuído à atuação ou preferência por outros mecanismos de tolerância, especialmente a translocação para a parte aérea para que o Al seja quelado ou compartimentalizado (Ezaki *et al.*, 2013).

Os dados de histolocalização com *Chrome Azurol S* indicaram acúmulo de Al no interior das células meristemáticas da raiz (Fig. 11-B). A presença do Al na região do núcleo também é relatada para espécies como *Arabidopsis thaliana* (Sjogren *et al.*, 2015), *Camellia sinensis* (Sun *et al.*, 2020) e *Allium cepa* (Qin *et al.*, 2010). Entretanto, não há evidências conclusivas no presente estudo que possam indicar o substrato ao qual o Al se liga na região do núcleo. De

acordo com Sjogren *et al.* (2015), em *Arabidopsis* o Al liga-se fortemente em regiões fosfodiéster do DNA, causando alterações na expressão dos genes *ALTT2* e *SOG1*, resultando na interrupção do crescimento das raízes. Considerando que plantas +Al não exibiram interrupção no crescimento radicular, é plausível sugerir que o substrato para o Al seja outro que não o DNA. Assim, mais estudos são ainda necessários para melhor compreensão acerca da distribuição interna do Al, especialmente no núcleo das células meristemáticas, em *S. lycocarpum*.

O Al intracelular pode ser encontrado em diferentes regiões além do núcleo, sendo o vacúolo um dos principais locais devido aos eventos de complexação e sequestro do Al como forma de promover detoxificação e inibir a toxicidade desse metal (Chauhan *et al.*, 2021; Bojórquez-Quintal *et al.*, 2017). Essa forma de tolerância interna é bem descrita em arroz e trigo (Yokosho *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2022) que acumulam Al quase que exclusivamente no vacúolo. O sequestro do Al no vacúolo é essencial para prevenção do acúmulo na região do citosol, o que resultaria em uma condição de toxicidade para a célula (Huang *et al.*, 2012). Nesse sentido, pode-se inferir que um dos principais mecanismos de detoxificação nas raízes de *S. lycocarpum* possa ser a compartimentalização do Al no vacúolo, evitando interação desse metal com componentes estruturais e funcionais da célula.

Um dos principais mecanismos de tolerância se dá pela exsudação de AOs para complexação do Al presente na rizosfera (Kochian *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2017). Os principais AOs exsudados em resposta ao Al são o malato e o citrato (Rahman *et al.*, 2024; Piñeros *et al.*, 2002; Nunes-Nesi *et al.*, 2014), mas também há relatos para exsudação de oxalato em tomateiro (*S. lycopersicum*) e fumarato em melaleuca (*Melaleuca cajuputi*) (JianLi *et al.*, 2011; Noguchi *et al.*, 2015). Além de bem caracterizado em plantas sensíveis e tolerantes, o aumento da exsudação de AOs em resposta ao Al é uma resposta típica em diversos membros da família Solanaceae (He *et al.*, 2019) sendo, possivelmente, um dos principais mecanismos também presentes em *S. lycocarpum*. De acordo com Ezaki *et al.* (2013), a tolerância ao Al presente em *Andropogon virginicus*, uma espécie selvagem de Poaceae, é adquirida mediante diferentes mecanismos de exclusão e de tolerância. Neste contexto, considerando a forte interação entre componentes metabólicos, circadianos e do desenvolvimento presente em espécies selvagens (Siqueira *et al.*, 2023), é possível sugerir que a elevada tolerância ao Al observada em *S. lycocarpum* não ocorra exclusivamente pela reprogramação no metabolismo mas, assim como em *A. virginicus*, dá-se pela atuação paralela de mecanismos de exclusão e tolerância interna, resultando no aumento da tolerância.

Dessa forma, a presença de mecanismos de exclusão e tolerância já relatados em outras espécies, assim como os ajustes metabólicos observados em *S. lycocarpum* em resposta ao estresse por Al, são formas distintas, mas não excludentes, de mitigar os efeitos tóxicos do Al. Todavia, pesquisas futuras são ainda necessárias para melhorar a compreensão desses mecanismos, particularmente para elucidar o papel dos AOs durante o estresse por Al.

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados aqui obtidos demonstram que a presença do Al não resulta em prejuízos durante o crescimento e desenvolvimento de *S. lycocarpum*, evidenciando a sua tolerância ao Al. A manutenção da capacidade fotossintética, bem como de parâmetros biométricos em presença de Al, sugere que às mudanças metabólicas observadas para os níveis de proteínas, carboidratos e ácidos orgânicos são essenciais para uma reprogramação metabólica permitindo, ainda que em condições de estresse, o adequado funcionamento da maquinaria celular e o crescimento das folhas e raízes. Assim como previamente observado em outras plantas tolerantes ao Al, é possível sugerir que não apenas mudanças no metabolismo mas que outros mecanismos de exclusão e de tolerância interna atuem simultaneamente para inibir os efeitos tóxicos do Al em *S. lycocarpum*. Não obstante, ainda é necessária uma melhor compreensão acerca desses mecanismos, assim como da distribuição do Al intracelular nas raízes, questão essa a ser investigada em pesquisas futuras.

Por ser uma espécie selvagem, a elevada tolerância ao Al observada em *S. lycocarpum* pode ser atribuída à sincronia entre os seus componentes circadianos, metabólicos e de desenvolvimento, resultando em uma espécie com excelente capacidade para lidar com situações adversas de estresse. Isso posto, *S. lycocarpum* apresenta-se como uma ótima espécie para o processo de domesticação *de novo*, além de também apresentar relevância como banco de informações genéticas na compreensão da tolerância ao Al. Todavia, pesquisas adicionais são ainda necessárias, especialmente de base molecular, para buscar a elucidação dos mecanismos de tolerância ao Al presente em *S. lycocarpum*, permitindo estabelecer uma direção mais precisa durante o processo melhoramento e, possivelmente, domesticação.

## REFERÊNCIAS

- Andrade, L. R. M., Barros, L. M. G., Echievarria, G. F., Amaral, L. I. V., Cotta, M. G., Rosseto, D. R., Haridasan, M., Franco, A. C. Alhyperaccumulator Vochysiaceae from the Brazilian Cerrado store aluminum in their chloroplasts without apparent damage. **Environmental and Experimental Botany**. 70:37-42, 2011.
- Auger, C., Han, S., Appanna, V. P., Thomas, S. C., Ulibarri, G., Appanna, V. D. Metabolic reengineering invoked by microbial systems to decontaminate aluminum: implications for bioremediation technologies. **Biotechnology Advances**. 31:266-273, 2013.
- Baker, N. R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. **Annual Review of Plant Biology**. 59:89-113, 2008.
- Boito, G. T., Crenna, A. G., Giuggia, J. A., Giovanini, D., Oddino, C., Gerardo, U. A. Desarrollo y validación de una escala para evaluación de daño por orugas defoliadoras en soja [*Glycine max* L.], para el sur de la provincia de Córdoba. **Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias**. 45:91-104, 2013.
- Bojórquez-Quintal, E., Escalante-Magaña, C., Echevarría-Machado, I., Martínez-Estévez, M. Aluminum, a friend or foe of higher plants in acid soils. **Frontiers in Plant Science**. 8:1767, 2017.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. 72:248-254, 1976.
- Bressan, A. C. G., Bittencourt, B. M. O. C., Silva, G. S., Habermann, G. Could the absence of aluminum (Al) impair the development of an Al-accumulating woody species from Brazilian savanna?. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**. 33:281-292, 2021.
- Bressan, A. C. G., Coan, A. I., Habermann, G. X-ray spectra in SEM and staining with chrome azurol S show Al deposits in leaf tissues of Al-accumulating and non-accumulating plants from the cerrado. **Plant and Soil**. 404:293-306, 2016.
- Cárcamo, M. P., Reyes-Díaz, M., Rengel, Z., Alberdi, M., Omena-Garcia, R. P., Nunes-Nesi, A., Inostroza-Blancheteau, C. Aluminum stress differentially affects physiological performance and metabolic compounds in cultivars of highbush blueberry. **Scientific Reports**. 9:11275, 2019.
- Carvalho, P. E. R. Espécies Arbóreas Brasileiras: Lobeira (*Solanum lycocarpum*). **EMBRAPA**. 4:341-347, 2010.
- Castro, L. M. R., Vinson, C. C., Gordo, S. M. C., Williams, T. C. R., Cury, N. F., Souza, M. C., Pereira, L. A. R. Molecular and physiological aspects of plant responses to aluminum: what do we know about Cerrado plants?. **Brazilian Journal of Botany**. 45:545-562, 2022.
- Cavalheiro, M. F., Gavassi, M. A., Silva, G. S., Nogueira, M. A., Silva, C. M. S., Domingues, D. S., Habermann, G. Low root PIP1-1 and PIP2 aquaporins expression could be related to reduced hydration in 'Rangpur' lime plants exposed to aluminium. **Functional Plant Biology**. 47:112-121, 2019.
- Chaffai, R., Marzouk, B. The role of organic acids in the short-and long-term aluminum tolerance in maize seedlings (*Zea mays* L.). **Acta Physiologiae Plantarum**. 31:805-814, 2009.

- Chauhan, D. K., Yadav, V., Vaculík, M., Gassmann, W., Pike, S., Arif, N., Singh, V. P., Deshmukh, R., Sahi, S., Tripathi, D. K. Aluminum toxicity and aluminum stress-induced physiological tolerance responses in higher plants. **Critical Reviews in Biotechnology**. 41:715-730, 2021.
- Čiamporová, M. Morphological and structural responses of plant roots to aluminium at organ, tissue, and cellular levels. **Biologia Plantarum**. 45:161-171, 2002.
- Clark, R. B. Characterization of phosphatase of intact maize roots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 23:458-460, 1975.
- Delhaize, E., Ryan P. R. Aluminum Toxicity and Tolerance in Plants. **Plant Physiology**. 107: 307–315, 1995.
- Doncheva, S., Amenós, M., Poschenrieder, C., Barceló, J. Root cell patterning: a primary target for aluminium toxicity in maize. **Journal of Experimental Botany**. 56:1213-1220, 2005.
- Ezaki, B., Gardner, R. C., Ezaki, Y., Matsumoto, H. Expression of aluminum-induced genes in transgenic Arabidopsis plants can ameliorate aluminum stress and/or oxidative stress. **Plant Physiology**. 122:657-666, 2000.
- Ezaki, B., Jayaram, K., Higashi, A., Takahashi, K. 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, 2013.
- Fernie, A. R., Roscher, A., Ratcliffe, R. G., Kruger, N. J. Fructose 2, 6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. **Planta**. 212:250-263, 2001.
- Gasparini, K., Moreira, J. R., Peres, L. E. P., Zsögön, A. De novo domestication of wild species to create crops with increased resilience and nutritional value. **Current Opinion in Plant Biology**. 60:102006, 2021.
- Gavassi, M. A., Silva, G. S., Silva, C. M. S., Thompson, A., Macleod, K., Oliveira, P. M. R., Cavaleiro, M. F., Domingues, D. S., Habermann, G. NCED expression is related to increased ABA biosynthesis and stomatal closure under aluminum stress. **Environmental and Experimental Botany**. 185:104404, 2021.
- Giannakoula, A., Moustakas, M., Syros, T., Yupsanis, T. Aluminum stress induces up-regulation of an efficient antioxidant system in the Al-tolerant maize line but not in the Al-sensitive line. **Environmental and Experimental Botany**. 67:487-494, 2010.
- Gupta, N., Gaurav, S. S., Kumar, A. Molecular basis of aluminium toxicity in plants: a review. **American Journal of Plant Sciences**. 4:21-37, 2013.
- Hajiboland, R., Panda, C. K., Lastochkina, O., Gavassi, M. A., Habermann, G., Pereira, J. F. Aluminum toxicity in plants: Present and future. **Journal of Plant Growth Regulation**. 42:3967-3999, 2023.
- He, H., Li, Y., He, L. F. Aluminum toxicity and tolerance in Solanaceae plants. **South African Journal of Botany**. 123:23-29, 2019.
- Horst, W. J., Wang, Y., Eticha, D. The role of the root apoplast in aluminium-induced inhibition of root elongation and in aluminium resistance of plants: a review. **Annals of Botany**. 106:185-197, 2010.

- Huang, C. F., Yamaji, N., Chen, Z., Ma, J. F. A tonoplast-localized half-size ABC transporter is required for internal detoxification of aluminum in rice. **The Plant Journal**. 69:57-867, 2012.
- Huang, W., Yang, X., Yao, S., LwinOo, T., He, H., Wang, A., Li, C., He, L. Reactive oxygen species burst induced by aluminum stress triggers mitochondria-dependent programmed cell death in peanut root tip cells. **Plant Physiology and Biochemistry**. 82:76-84, 2014.
- JianLi, Y., XiaoFang, Z., YouXiang, P., Cheng, Z., Feng, M., Shaojian, Z. Aluminum regulates oxalate secretion and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity independently in tomato roots. **Planta**. 234:281-291, 2011.
- Johansen, D. A. **Plant Microtechnique**. New York: Mc-Graw-Hillbook Company. p. 523, 1940.
- Kochian, L. V., Piñeros, M. A., Liu, J., Magalhaes, J. V. Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum resistance. **Annual Review of Plant Biology**. 66:571-598, 2015.
- Kochian, L., Pence, N. S., Letham, D. L. D., Pineros, M. A., Magalhaes, J. V., Hoekenga, O. A., Garvin, D. F. Mechanisms of metal resistance in plants: aluminum and heavy metals. **Plant and Soil**. 247:109-119, 2002.
- Kocjan, A., Kwasniewska, J., Szurman-Zubrzycka, M. Understanding plant tolerance to aluminum: exploring mechanisms and perspectives. **Plant and Soil**. pp. 1-25, 2024.
- Kong, X., Sun, L., Zhou, Y., Zhang, M., Liu, Y., Pan, J., Li, D. ZmMKK4 regulates osmotic stress through reactive oxygen species scavenging in transgenic tobacco. **Plant Cell Reports**. 30:2097-2104, 2011.
- Kumar, S. Abiotic stresses and their effects on plant growth, yield and nutritional quality of agricultural produce. **International Journal of Food Science and Agriculture**. 4:367-378, 2020.
- Li, Q., Wang, M., Fu, Q., Li, T., Liu, D., Hou, R., Li, H., Cui, S., Ji, Y. Short-term influence of biochar on soil temperature, liquid moisture content and soybean growth in a seasonal frozen soil area. **Journal of Environmental Management**. 266:110609, 2020.
- Malta, P. G., Arcanjo-Silva, S., Ribeiro, C., Campos, N. V., Azevedo, A. A. *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, 2016.
- Minocha, R., Minocha, S. C., Long, S. L., Shortle, W. C. Effects of aluminum on DNA synthesis, cellular polyamines, polyamine biosynthetic enzymes and inorganic ions in cell suspension cultures of a woody plant, *Catharanthus roseus*. **Physiologia Plantarum**. 85:417-424, 1992.
- Moreno-Alvarado, M., García-Morales, S., Trejo-Téllez, L. I., Hidalgo-Contreras, J. V., Gómez-Merino, F. C. Aluminum enhances growth and sugar concentration, alters macronutrient status and regulates the expression of NAC transcription factors in rice. **Frontiers in Plant Science**. 8:73, 2017.
- Moriyama, U., Tomioka, R., Kojima, M., Sakakibara, H., Takenaka, C. Aluminum effect on starch, soluble sugar, and phytohormone in roots of *Quercus serrata* Thunb. seedlings. **Trees**. 30:405-413, 2016

- Murchie, E. H., Lawson, T. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. **Journal of Experimental Botany**. 64: 3983-3998, 2013.
- Noguchi, A., Houman, Y., Shinmachi, F., Chen, R. F., Zhao, X. Q., Shen, R. F., Hasegawa, I. Exudation of fumarate from roots contributes to high aluminum resistance in *Melaleuca cajuputi*. **Plant Root**. 9:15-23, 2015.
- Nogueirol, R. C., Monteiro, F. A., Gratão, P. L., Borgo, L., Azevedo, R. A. Tropical soils with high aluminum concentrations cause oxidative stress in two tomato genotypes. **Environmental Monitoring and Assessment**. 187:1-16, 2015.
- Nunes-Nesi, A., Brito, D. S., Inostroza-Blancheteau, C., Fernie, A. R., Araújo, W. L. The complex role of mitochondrial metabolism in plant aluminum resistance. **Trends in Plant Science**. 19:399-407, 2014.
- Nunes-Nesi, A., Carrari, F., Gibon, Y., Sulpice, R., Lytovchenko, A., Fisahn, J., Graham, J., Ratcliffe, R. G., Sweetlove, L. J., Fernie, A. R. Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. **The Plant Journal**. 50:1093-1106, 2007.
- O'Brien, T. P., Feder, N., McCully, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**. 59:368-373, 1964.
- Ofoe, R., Gunupuru, L. R., Wang-Pruski, G., Fofana, B., Thomas, R. H., Abbey, L. Seed priming with pyroligneous acid mitigates aluminum stress, and promotes tomato seed germination and seedling growth. **Plant Stress**. 4:100083, 2022.
- Ofoe, R., Thomas, R. H., Asiedu, S. K., Wang-Pruski, G., Fofana, B., Abbey, L. Aluminum in plant: Benefits, toxicity and tolerance mechanisms. **Frontiers in Plant Science**. 13:1085998, 2023.
- Palchetti, M. V., Cantero, J. J., Barboza, G. E. Solanaceae diversity in South America and its distribution in Argentina. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. 92:e20190017, 2020.
- Pereira-Lima, I. A., Batista-Silva, W., Siqueira, J. A., Silva, M. F., Medeiros, D. B., Cavalcanti, J. H., Gonçalves, J. F. C., Ribeiro, D. M., Fernie, A. R., Nunes-Nesi, A., Araújo, W. L. Differential Aluminum tolerance in *Arabidopsis thaliana* ecotypes is seemingly related to metabolite changes. **Environmental and Experimental Botany**. 214:105472, 2023.
- Piñeros, M. A., Magalhaes, J. V., Alves, V. M. C., Kochian, L. V. The physiology and biophysics of an aluminum tolerance mechanism based on root citrate exudation in maize. **Plant Physiology**. 29:1194-1206, 2002.
- Pinto, L. V. A., Silva, E. A. A., Davide, A. C., Jesus, V. A. M., Toorop, P. E., Hilhorst, H. W. M. Mechanism and control of *Solanum lycocarpum* seed germination. **Annals of Botany**. 100:1175-1187, 2007.
- Pinto, V. B., Almeida, V. C., Pereira-Lima, I. A., Vale, E. M., Araújo, W. L., Silveira, V., Viana, J. M. S. Deciphering the major metabolic pathways associated with aluminum tolerance in popcorn roots using label-free quantitative proteomics. **Planta**. 254:1-14, 2021.
- Pollard, A. J., Reeves, R. D., Baker, A. J. M. Facultative hyperaccumulation of heavy metals and metalloids. **Plant Science**. 217:8-17, 2014.

Qin, R., Jiao, Y., Zhang, S., Jiang, W., Liu, D. Effects of aluminum on nucleoli in root tip cells and selected physiological and biochemical characters in *Allium cepa* var. agrogarum L. **BMC Plant Biology**. 10:1-11, 2010.

R Core Team (2024). A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**. Vienna, Austria. URL: <https://www.Rproject.org/>.

Rahman, S. U., Han, J. C., Ahmad, M., Ashraf, M. N., Khaliq, M. A., Yousaf, M., Wang, Y., Yasin, G., Nawaz, M. F., Khan, K. A., Du, Z. Aluminum phytotoxicity in acidic environments: a comprehensive review of plant tolerance and adaptation strategies. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 269:115791, 2024.

Raj, S. P., Solomon, P. R., Thangaraj, B. Solanaceae. **Biodiesel from Flowering Plants**. pp 543-549, 2022.

Sade, H., Meriga, B., Surapu, V., Gadi, J., Sunita, M. S. L., Suravajhala, P., *et al.* Toxicity and tolerance of aluminium in plants: tailoring plants to suit to acid soils. **BioMetals**. 29:187–210, 2016.

Santos, H. G., Carvalho Junior, W., Dart, R. O., Aglio, M. L. D., Souza, J. S., Pares, J. G., Fontana, A., Martins, A. L. S., Oliveira, A. P. O novo mapa de solos do Brasil: legenda atualizada. **EMBRAPA**. pp 1-67, 2011.

Shaff, J. E., Schultz, B. A., Craft, E. J., Clarck, R. T., Kochian, L. V. GEOCHEM-EZ: a chemical speciation program with greater power and flexibility. **Plant and Soil**. 330:207-214, 2010.

Sharmila, P., Saradhi, P. P. Proline accumulation in heavy metal stressed plants: an adaptive strategy. In: Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants. **Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants**. pp. 179-199, 2002.

Siecińska, J., Nosalewicz, A. Aluminium toxicity to plants as influenced by the properties of the root growth environment affected by other co-stressors: a review. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**. 243:1-26, 2017.

Silva, C. O., Brito, D. S., Silva, A. A., Rosa, V. R., Santos, M. F. S., Souza, G. A., Azevedo, A. A., Dal-Bianco, M., Oliveira, J. A., Ribeiro, C. Differential accumulation of aluminum in root tips of soybean seedlings. **Brazilian Journal of Botany**. 43:99-107, 2020.

Silva, G. S., Rodrigues, J. S., Carvalho, B. M. D. O., Gavassi, M. A., Bressan, A. C. G., Habermann, G. Absence of aluminium compromises root integrity, reduces leaf hydration and Rubisco performance in *Qualea grandiflora*, an Al-accumulating species. **Plant Biology**. 25:740-749, 2023.

Silva, S., Pinto, G., Dias, M. C., Correia, C. M., Moutinho-Pereira, J., Pinto-Carnide, O., Santos, C. Aluminium long-term stress differently affects photosynthesis in rye genotypes. **Plant Physiology and Biochemistry**. 54:105-112, 2012.

Singh, R., Lemire, J., Mailloux, R. J., Chénier, D., Hamel, R., Appanna, V. D. An ATP and oxalate generating variant tricarboxylic acid cycle counters aluminum toxicity in *Pseudomonas fluorescens*. **PLoS One**. 4:e7344, 2009.

- Singh, S., Kumar, D., Singh, S., Sharma, S., Kishore, N., Kumar, D., Vaculík, M. Toxicity of aluminium on various levels of plant cells and organism: A review. **Environmental and Experimental Botany**. 137:177–193, 2017.
- Siqueira, J. A., Barros, J. A. S., Dal-Bianco, M., Martins, S. C. V., Magalhães, P. C., Ribeiro, D. M., DaMatta, F. M., Araújo, W. L., Ribeiro, C. Metabolic and physiological adjustments of maize leaves in response to aluminum stress. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**. 32:133-145, 2020.
- Siqueira, J. A., Batista-Silva, W., Zsögön, A., Fernie, A. R., Araújo, W. L., Nunes-Nesi, A. Plant domestication: setting biological clocks. **Trends in Plant Science**. 28:597-608, 2023.
- Sjogren, C. A., Bolaris, S. C., Larsen, P. B. Aluminum-dependent terminal differentiation of the Arabidopsis root tip is mediated through an ATR-, ALT2-, and SOG1-regulated transcriptional response. **The Plant Cell**. 27:2501-2515, 2015.
- Souza, L. T., Cambraia, J., Ribeiro, C., Oliveira, J. A., Silva, L. C. Effects of aluminum on the elongation and external morphology of root tips in two maize genotypes. **Bragantia**. 75:19-25, 2016.
- Stehmann, J. R., Mentz, L. A., Agra, M. F., Vignoli-Silva, M., Giacomini, L., Rodrigues, I. M. C. Solanaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. 2015.
- Sun, L., Zhang, M., Liu, X., Mao, Q., Shi, C., Kochiang, L. V., Liao, H. Aluminium is essential for root growth and development of tea plants (*Camellia sinensis*). **Journal of Integrative Plant Biology**. 62:984-997, 2020.
- Tao, Y., Niu, Y., Wang, Y., Chen, T., Naveed, S. A., Zhang, J., Xu, J., Li, Z. Genome-wide association mapping of aluminum toxicity tolerance and fine mapping of a candidate gene for Nrat1 in rice. **PLoS One**. 13:e0198589, 2018.
- Vitorello, V. A., Capaldi, F. R., Stefanuto, V. A. Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. 17:129-143, 2005.
- Wang, Y., Yang, S., Li, C., Hu, T., Hou, S., Bai, Q., Ji, X., Xu, F., Guo, C., Huang, M., Cai, Y., Liu, J. The plasma membrane-localized OsNIP1; 2 mediates internal aluminum detoxification in rice. **Frontiers in Plant Science**. 13:970270, 2022.
- Wellburn, A. R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**. 144:307-313, 1994.
- Wood, S., Sebastian, K., Scherr, S. J. Pilot analysis of global ecosystems: agroecosystems. **World Resources Institute**. pp 1-82, 2000.
- Xu, Q., Wang, Y., Ding, Z., Fan, K., Ma, D., Zhang, Y., Yin, Q. Aluminum induced physiological and proteomic responses in tea (*Camellia sinensis*) roots and leaves. **Plant Physiology and Biochemistry**. 115:141-151, 2017.
- Yamamoto, Y. Aluminum toxicity in plant cells: Mechanisms of cell death and inhibition of cell elongation. **Soil Science and Plant Nutrition**. 65:41-55, 2019.
- Yemm, E. W., Cocking, E. C., Ricketts, R. E. The determination of amino-acids with ninhydrin. **Analyst**. 80:209-214, 1955.

Yin, L., Mano, J., Wang, S., Tsuji, W., Tanaka, K. The involvement of lipid peroxide-derived aldehydes in aluminum toxicity of tobacco roots. **Plant Physiology**. 152:1406-1417, 2010.

Yokosho, K., Yamaji, N., Mitani-Ueno, N., Shen, R. F., Ma, J. F. An aluminum-inducible IREG gene is required for internal detoxification of aluminum in buckwheat. **Plant and Cell Physiology**. 57:1169-1178, 2016.

Zhang, F., Yan, X., Han, X., Tang, R., Chu, M., Yang, Y., Yang, Y. H., Zhao, F., Fu, A., Luan, S., Lan, W. A defective vacuolar proton pump enhances aluminum tolerance by reducing vacuole sequestration of organic acids. **Plant Physiology**. 181:743-761, 2019.

Zhang, H., Zhu, J., Gong, Z., Zhu, J. K. Abiotic stress responses in plants. **Nature Reviews Genetics**. 23:104-119, 2022.

Zhang, Y., Guo, J., Chen, M., Li, L., Wang, L., Huang, C. F. The cell cycle checkpoint regulator ATR is required for internal aluminum toxicity-mediated root growth inhibition in Arabidopsis. **Frontiers in Plant Science**. 9:118, 2018.