

Universidade de Brasília

Programa de Pós-Graduação em Botânica

Perfil metabólico e aspectos ultraestruturais de plantas de *Qualea grandiflora* Mart.  
(Vochysiaceae) crescidas na presença e ausência de alumínio

**JESSICA REGINA MELO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em  
Botânica da Universidade de Brasília como parte dos requisitos  
para obtenção do título de Mestre

Brasília-DF

**2016**



Universidade de Brasília

Programa de Pós-Graduação em Botânica

Perfil metabólico e aspectos ultraestruturais de plantas de *Qualea grandiflora* Mart.  
(Vochysiaceae) crescidas na presença e ausência de alumínio

**JESSICA REGINA MELO**

**ORIENTADOR: DR. LUIZ ALFREDO RODRIGUES PEREIRA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em  
Botânica da Universidade de Brasília como parte dos requisitos  
para obtenção do título de Mestre

Brasília-DF

**2016**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida.

Ao meu orientador Luiz Alfredo Rodrigues Pereira, pela oportunidade, pelo respeito e caráter e por todo o ensinamento transmitido.

À minha mãe, Helena, ao meu pai, Reginaldo pelo exemplo de vida, pelo amor incondicional, por acreditar em mim e pela preocupação em todos os momentos. Mesmo estando longe sempre tiveram presentes em todas as minhas conquistas. Obrigada por tudo!

À minha irmã querida, Jenifer, pelo carinho, amor e motivação em todas as etapas da vida.

Ao meu namorado, Lucas, por ser uma parte essencial na minha vida, pela confiança e por acreditar no meu potencial.

A todos os familiares de Brasília, pelo acolhimento e amparo em todos os momentos e principalmente os finais de semana, em especial a todas as tias e primas.

As minhas amigas e colegas mais que especiais pra mim, Renata, Michelle, Daris, Débora, Jessika e Natália, pelo imenso apoio, torcida e companheirismo. Obrigada por todos os momentos compartilhados, pelo cafezinho e almoço na copa, pelos ricos seminários semanais e pelas discussões e ideias sobre o projeto.

A todos os professores do PPG, por serem doadores de conhecimento e experiência. Em especial, a professora Cris, pela ajuda nas análises de pigmentos fotossintetizantes e ao professor Thomas, pela disponibilidade e colaboração nas análises metabolômicas.

Ao técnico Fábio Nakamura, pelas sábias ideias e conversas diárias. À técnica do laboratório de Microscopia Eletrônica, Ingrid, pelas inúmeras orientações na preparação das amostras. Em especial à Misleia, pela disposição e imensa ajuda no ultramicrotomo. Às alunas do Lab, Márcia, Brígda e Yasmin pelo auxílio no laboratório e uso de equipamentos.

Aos colegas do Departamento de Botânica da UnB, pelo convívio e ensinamentos.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

## SUMÁRIO

Tabela de Conteúdo	
LISTA DE FIGURAS E TABELAS .....	5
LISTA DE ABREVIACÕES .....	7
Perfil metabólico e aspectos ultraestruturais de plantas de <i>Qualea grandiflora</i> Mart. (Vochysiaceae) crescidas na presença e ausência de alumínio .....	9
Metabolic profile and ultrastructural aspects of <i>Qualea grandiflora</i> Mart. (Vochysiaceae) plants grown with and without aluminum.....	10
Abstract .....	10
INTRODUÇÃO GERAL .....	11
1. Alumínio no Cerrado.....	11
2. Efeitos do Al nas plantas .....	11
3. Plantas resistentes, tolerantes e acumuladoras de Al.....	13
4. <i>Qualea grandiflora</i> Mart.....	15
5. Referências Bibliográficas .....	17
OBJETIVO GERAL .....	23
Objetivos específicos.....	23
CAPÍTULO I – Avaliação da resposta fisiológica e aspectos ultraestruturais de plantas de <i>Qualea grandiflora</i> Mart. crescidas na presença e ausência de alumínio .....	24
1. INTRODUÇÃO .....	25
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	29
3. RESULTADOS.....	33
4. DISCUSSÃO.....	41
5. CONCLUSÕES.....	50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	51
CAPÍTULO II: Efeitos da presença e ausência de Al no metabolismo de <i>Qualea grandiflora</i> Mart.....	62
1. INTRODUÇÃO .....	63
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	69
3. RESULTADOS.....	70
4. DISCUSSÃO.....	73
5. CONCLUSÕES.....	78
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	79
CONCLUSÃO GERAL .....	92

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

### Introdução

**Figura 1.** *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae). A- Vista geral da árvore adulta; B- Detalhes dos ramos; C- Flor; D- Fruto fechado; E- Fruto aberto. Fonte: Adaptado de Silva (2012)..... 11

### Capítulo 1

**Figura 1.** Plântulas de *Qualea grandiflora* aos 90 dias de cultivo com  $1/5$  MS sem (esquerda) e com adição de Al (direita).....33

**Figura 2.** Aspecto geral das plantas de *Q. grandiflora* crescidas na presença de Al (planta superior) e na ausência do metal (planta inferior) após 90 dias de cultivo com solução  $1/5$  MS.....34

**Figura 3.** Conteúdo de pigmentos fotossintéticos de plantas de *Q. grandiflora* do tratamento controle (colunas brancas) e do tratamento com Al (colunas pretas). Barras seguidas de letras diferentes apresentam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).....35

**Figura 4.** Concentração foliar de Ca, Mg, P, Fe e Al no tratamento controle (barra branca) e tratamento alumínio (barra preta) em *Q. grandiflora*. Barras representam o desvio padrão. Diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....

**Figura 5.** Espectroscopia por energia dispersiva (EDS) em folhas de *Qualea grandiflora* Mart. A. Secção transversal da nervura principal da folha de *Q. grandiflora*. B. Micrografia eletrônica de varredura da região da nervura principal de *Q. grandiflora*. Pontos 1 e 2 correspondem à região do xilema e floema da nervura principal de folhas de plantas de *Q. grandiflora*, respectivamente C-F. Gráficos obtidos após análise via “*Noran System Six*” (NSS), sob aceleração de 15 kV. Picos correspondem aos valores de Al, Ca, Mg, Fe e P quantificados via EDS. C. Xilema da planta controle D. Floema controle E. Xilema da planta tratada com Al F. Floema do tratamento Al. Eab: epiderme abaxial, Ead: epiderme adaxial, Pa: parênquima, Fl: floema, Xi: xilema. Escala: A-B: Barra de escala: 100  $\mu$ m. Notar que existe pouca diferença nos picos dos elementos entre os tratamentos.....39

**Figura 6.** Micrografia eletrônica de transmissão mostrando a ultraestrutura dos cloroplastos da lâmina foliar de plantas de *Qualea grandiflora* Mart. crescidas na presença e ausência de Al. (A) Cloroplastos com plastoglobulos (setas) de folhas de plantas crescidas sem Al de regiões cloróticas. (B) Micrografia mostrando cloroplastos de região verde da lâmina foliar de plantas não suplementadas com Al. (C) Cloroplastos de folhas de plantas crescidas na suplementação de Al. Note que os cloroplastos não estavam deformados e possuíam tilacóides e grana bem organizados. (D) Cloroplastos de folhas de plantas crescidas com Al. Note a presença de pequenos grãos de amido (cabeça de seta). Barra de escala: 0,5  $\mu$ m. ....41

## Capítulo 2

**Figura 1.** Perfil metabólico de amostras de folhas de *Q. grandiflora* crescidas na presença e ausência (controle) de Al. Os compostos marcados com estrela são significativamente diferentes entre si ( $p < 0,1$ ).....64

## TABELAS

### Capítulo 1

Tabela 1. Comprimento médio do caule e raiz principal de plantas de *Qualea grandiflora* crescidas com e sem suplementação de Al aos 90 dias de cultivo . .....34

### Capítulo 2

Tabela 1. Alterações das concentrações dos metabólitos identificados em folhas de plantas de *Q. grandiflora* do tratamento controle (CT) e alumínio (AL)..... **Erro! Indicador não definido.**71

## LISTA DE ABREVIACÕES

AA- ácido ascórbico

Al - alumínio

[Al (H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>]<sup>3+</sup> ou Al<sup>3+</sup> - alumínio trivalente

AlPO<sub>4</sub> - fosfato de Al

AMIDIS- *Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System*

B- boro

BOD- *Biochemical Oxygen Demand*

Ca- cálcio

Cd- cádmio

CPA- comprimento da parte aérea

CRP- comprimento da raiz principal

CS- citrato sintase

CT- controle

Cu - cobre

DHA- ácido dehidroascórbico

DMF- N, N-dimetilformamida

EDS- *energy dispersive Spectrometer*

FAL- Fazenda Água Limpa

Fe- ferro

F- flúor

GC- cromatografia gasosa

GC-MS- cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IVI- índice de valor de importância

K- potássio

NaClO- hipoclorito de sódio

Mg- magnésio

Mn- manganês

MDH- malato desidrogenase  
MEV- Microscopia Eletrônica de Varredura  
MET- Microscopia Eletrônica de Transmissão  
MS- Murashigue & Skoog (1962)  
MSTFA- N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida  
N- nitrogênio  
NaCl- cloreto de sódio  
NSS- *Noran System Six*  
O<sub>2</sub>- oxigênio  
O<sub>2</sub><sup>-</sup>- superóxido  
OsO<sub>4</sub>- tetróxido de ósmio  
OH- radicais de hidroxila  
P- fósforo  
Pb- chumbo  
PAL- fenilalanina amônia liase  
PEPC- carboxilase fosfoenolpiruvato  
POP- peroxidase  
ROS- *reactive oxygen species*  
RuBP- ribulose- 1,5- biphosphate  
S- enxofre  
Si- silício  
TSA- ciclo do ácido tricarbóxico  
Zn- zinco



## **Perfil metabólico e aspectos ultraestruturais de plantas de *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae) crescidas na presença e ausência de alumínio**

**Resumo:** O alumínio trivalente ( $\text{Al}^{+3}$ ) é altamente tóxico e é o principal fator de estresse para plantas sensíveis em solos ácidos. Contudo, muitas espécies são bem adaptadas a condições de solos ácidos e a elevadas concentrações de Al. Os mecanismos de adaptação das plantas podem ser divididos em: a) resistência: exclusão do Al a partir de células do sistema radicular e, b) tolerância: entrada e sequestro do Al para os órgãos vegetais. Algumas espécies nativas do Cerrado, além de serem acumuladoras de Al, têm baixo desempenho na ausência desse metal. O objetivo deste trabalho foi estudar as alterações fisiológicas e metabólicas em *Qualea grandiflora* Mart. crescidas na presença e ausência de  $\text{Al}^{+3}$ , assim como analisar os efeitos ultraestruturais nos cloroplastos das plantas. Plantas de *Q. grandiflora* foram tratadas com e sem Al por 90 dias, de forma que o Al foi fornecido sob forma de  $\text{AlCl}_3$  (200  $\mu\text{M}$ ) em solução nutritiva 1/5 MS. Foram avaliados parâmetros de comprimento, teores de pigmentos fotossintetizantes e teores de Al, Ca, Mg, Fe e P em ambos os tratamentos. Também foi feita a comparação da ultraestrutura dos cloroplastos da lâmina foliar e a investigação do perfil metabólico foliar no tratamento com e sem Al. Plantas suplementadas com Al apresentaram maior crescimento das raízes (32,5%) e parte aérea (16,8%), bem como maiores níveis de clorofila (*a* e *b*) e carotenoides (24,73 8,27 e 6,20  $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) comparados ao tratamento sem Al (controle). Além disso, o teor foliar de Ca, Mg e P não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos. Porém, a concentração de Al e Fe foram menores nas plantas suplementadas com o metal comparado ao controle. Nas análises ultraestruturais observou-se que a ausência do metal durante o desenvolvimento das plantas levou a desintegração progressiva dos cloroplastos. O perfil metabólico revelou maiores concentrações de ácidos orgânicos (citrato e oxalato) nas plantas controle, indicando que a tolerância ao acúmulo de Al em *Q. grandiflora* está relacionada com a participação desses ácidos na quelação ao metal. Os resultados deste estudo também demonstraram que o Al tem um papel importante no metabolismo dessa espécie acumuladora nativa do Cerrado.

Palavras chave: plantas acumuladoras, Vochysiaceae, cloroplastos, ácidos orgânicos

## **Metabolic profile and ultrastructural aspects of *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae) plants grown with and without aluminum**

**Abstract:** The trivalent aluminum ( $\text{Al}^{+3}$ ) is highly toxic and a major stress to sensitive plants in acid soils. However, many species are well adapted to conditions of acid soils and high Al concentrations. Plant Al-adaptation mechanisms are classified as following: a) resistance: it is an Al exclusion mechanism in which the root system prevents the entrance of the metal into the plant, and; b) tolerance: the Al is uptaken by the plant and its toxic effects are internally neutralized. Moreover, some native species from Cerrado, besides accumulating Al, resent its absence. Therefore, the objective of this work was to study the physiological and metabolic changes in *Qualea grandiflora* Mart. grown in the presence and absence of Al, as well as analyze the ultrastructural effects of Al absence on chloroplasts of *Q. grandiflora* plants. For that, the parameters assessed were: root and shoot lengths, photosynthetic pigments and Al, Ca, Mg, Fe, P contents in plants from both treatments. Also, it was conducted a comparison of the chloroplast ultrastructure from *Q. grandiflora* leaves and determined the metabolic profiles of leaves from plants grown with and without Al. Al-supplemented plants showed longer roots (32.5%) and shoots (16.8%), as well as higher contents of chlorophylls (*a e b*) and carotenoid (24.73, 8.27 and 6.20  $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) compared with the control. In addition, the leaf content of Ca, Mg, P did not show significant differences between treatments. However, the concentration of Al and Fe were lower in plants supplied with metal compared with no Al treated plants. The ultrastructural analysis revealed that Al absence during plant development led to progressive disintegration of chloroplasts. The metabolic profile showed higher concentrations of organic acids (citrate and oxalate) in the control plants, indicating that tolerance to Al accumulation in *Q. grandiflora* is related to the involvement of these acids in Al-chelation. The results of this study also demonstrated that Al plays an important role in *Q. grandiflora* metabolism.

**Keywords:** Al-accumulating, Vochysiaceae, chloroplasts, organic acids

## INTRODUÇÃO GERAL

### 1. Alumínio no Cerrado

O Cerrado é caracterizado por apresentar solos ácidos com baixos teores de nutrientes, como fósforo (P), e elevados teores de ferro (Fe) e alumínio (Al). A acidez dos solos desse bioma está relacionada à pobreza do material de sua formação, assim como a processos de sua gênese, os quais favorecem a lixiviação de elementos básicos como potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) entre outros (Oliveira *et al.*, 2005).

O Al é o terceiro elemento mais abundante na litosfera, compondo cerca de 8% da crosta terrestre (Jansen *et al.*, 2002). Além disso, o Al pode ser encontrado no solo em várias formas, contudo, em solos ácidos este metal está predominantemente como  $[Al(H_2O)_6]^{3+}$ , ou simplesmente  $Al^{3+}$ . Nessa configuração química o  $Al^{3+}$ , mesmo que em quantidades muito baixas, é tóxico para boa parte das espécies vegetais, principalmente para plantas cultivadas. Adicionalmente, o  $Al^{3+}$  está presente em cerca de 40% dos solos aráveis em todo o mundo (Zhang *et al.*, 2007), o que o torna um problema agrônômico de âmbito global para a produção agrícola.

Goodland (1971) foi um dos primeiros pesquisadores a relacionar o Al com a estrutura morfológica da vegetação do Cerrado. Esse autor propôs que o escleromorfismo exibido por muitas espécies nativas era, em boa parte, relacionado ao oligotrofismo (endurecimento da planta resultante da escassez de nutrientes nos solos). Além disso, Goodland (1971) também associou as características morfoanatômicas das plantas do Cerrado a uma presumida “toxicidade” dos solos do Cerrado devido ao Al. Hoje, sabe-se que muitas espécies nativas estão adaptadas às condições de acidez e fertilidade dos solos do Cerrado, visto que muitas acumulam Al em grandes quantidades nos seus tecidos, como por exemplo: *Palicourea rigida* H.B.K. (Rubiaceae), *Vochysia thyrsoidea* Pohl (Vochysiaceae), *Miconia albicans* (Sw.) Triana (Melastomataceae) e a espécie alvo desse estudo, *Qualea grandiflora* Mart. (Haridasan, 1988; Haridasan 2008).

### 2. Efeitos do Al nas plantas

Para muitas plantas de interesse agrônômico a presença do Al induz o aparecimento de sinais de toxidez. Entretanto, muitos dos mecanismos de resposta à toxidez inerente a esse metal

têm sido observados em várias espécies de plantas. Assim, mecanismos de resistência/tolerância ao  $\text{Al}^{3+}$  foram detectados nas plantas tendo como primeiro sítio de ação, o ápice radicular (Kochian, 1995). Em plantas sensíveis, o contato do sistema radicular com o Al afeta o alongamento das células e, a longo prazo, a divisão celular é consideravelmente inibida, sendo ocasionalmente paralisada, tornando as raízes mais curtas e grossas (Foy *et al.*, 1978; Kochian, 1995). Assim, a diminuição do crescimento das raízes em virtude da presença de Al foi observada em várias plantas como *Vigna radiata* (Panda *et al.*, 2003), cevada (*Hordeum vulgare* L.) (Patra & Panda, 1998) e em sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench.) (Cambraia *et al.*, 1991).

A exposição ao  $\text{Al}^{3+}$  no sistema radicular de plantas sensíveis prejudica vários processos, como por exemplo, a absorção e aproveitamento de água e nutrientes minerais do solo (Foy *et al.*, 1978). Grande parte dos nutrientes minerais como K, Ca, Mg, P, nitrogênio (N), enxofre (S) e boro (B) ficam menos disponíveis em solos com pH ácido e outros minerais como Fe, cobre (Cu), manganês (Mn) e zinco (Zn) mostram comportamento inverso, ou seja, ficam mais disponíveis (Silva & Souza, 2008). Nessas condições, a presença de  $\text{Al}^{3+}$  afeta diretamente a absorção de P pela raiz devido à precipitação deste elemento na forma de fosfato de Al ( $\text{AlPO}_4$ ) (Clarkson, 1966). Como consequência, ocorre uma diminuição da disponibilidade de P para os processos metabólicos nos quais esse mineral está envolvido como síntese proteica e de ácidos nucleicos. Além disso, outro elemento cuja absorção também é afetada pela presença de  $\text{Al}^{3+}$  é o Ca. A absorção de Ca é prejudicada em função da competição catiônica com o  $\text{Al}^{3+}$ , o que resulta em uma diminuição na capacidade de extensibilidade da parede celular, afetando diretamente o processo de alongamento das células (Kochian *et al.*, 2004).

Os danos causados pelo  $\text{Al}^{3+}$  em raízes são rapidamente perceptíveis após a exposição da planta a este cátion, os quais também são acompanhados por efeitos secundários que aparecem mais tardiamente (Barceló & Poschenrieder, 2002; Yamamoto *et al.*, 2003). Assim, imediatamente após o contato com  $\text{Al}^{3+}$ , é possível constatar a inibição do alongamento da raiz principal e uma restrição ao desenvolvimento de raízes laterais levando a um sistema radicular curto e atrofiado (Clarkson, 1965; Munns, 1965). Subsequentemente, aparecem os efeitos mais tardios do  $\text{Al}^{3+}$ , os quais são frequentemente associados a mecanismos de respostas a estresses, como por exemplo, o estresse oxidativo (Kochian *et al.*, 2002).

Os efeitos mais tardios do  $\text{Al}^{3+}$  têm sido frequentemente associados a mecanismos de respostas a estresses, como por exemplo, o estresse oxidativo (Kochian *et al.*, 2002). De acordo com Prisco & Filho (2010), esse estresse origina do desequilíbrio entre a produção de espécies

reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*, ROS) e as reações que visam a eliminação desses compostos altamente prejudiciais. O processo metabólico em resposta às ROS é frequentemente observado em plantas expostas ao Al, como observado em *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Minocha *et al.*, 1992). Assim, a superprodução de espécies reativas do oxigênio precisa ser neutralizada, pois esse processo resulta na oxidação de importantes biomoléculas, como lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos e pigmentos fotossintetizantes (Minocha *et al.*, 1992; Mittler, 2002; Boscolo *et al.*, 2003). A neutralização das ROS envolve várias enzimas e na presença de  $Al^{3+}$ , as plantas elevam a atividade do sistema antioxidante, e aumenta a síntese de enzimas como a superóxido dismutase envolvida na neutralização de superóxidos (Richards *et al.*, 1998; Bauborina *et al.*, 2006). Respostas metabólicas como esta foram observadas em *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Richards *et al.*, 1998), em *Oryza sativa* L. (Sharma & Dubey, 2007) e em *Triticum aestivum* L. (Bauborina *et al.*, 2006) quando expostos ao Al.

### **3. Plantas resistentes, tolerantes e acumuladoras de Al**

Segundo Kochian *et al.* (2004), nas plantas existem dois tipos de mecanismos que visam neutralizar os efeitos tóxicos do Al: 1) Resistência: quando se refere à capacidade das plantas de excluírem ou não permitir a entrada do Al via sistema radicular, e; 2) Tolerância: quando as plantas permitem a entrada e acumulam esse metal em diversos órgãos vegetais.

Plantas resistentes são capazes de exsudar ácidos orgânicos na rizosfera visando impedir a entrada do Al em células e tecidos. Desta forma, os ácidos orgânicos citrato, oxalato e malato são comumente exsudados e formam complexos estáveis com o  $Al^{3+}$  que imobiliza esse metal na rizosfera e impede a sua entrada na planta (Ma *et al.*, 2001). Genótipos resistentes ao Al que excretam malato têm sido identificados em trigo (*T. aestivum* L.) (Delhaize *et al.*, 1993). Outras plantas têm cultivares que exsudam citrato como feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) (Miyasaka *et al.*, 1991) e o milho (*Zea mays* L.) (Pellet *et al.*, 1995), contudo o trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum* Moench) exsuda oxalato em resposta ao Al (Ma *et al.*, 1997<sup>a</sup>).

Em plantas tolerantes, os ácidos orgânicos também são a base do mecanismo que permite a essas plantas suportarem a presença do Al. Em geral, o mecanismo de desintoxicação observado nessas plantas é resultante da quelação do Al no citosol, e subsequente armazenamento do Al neutralizado em compartimentos celulares como vacúolo, cloroplasto e parede celular (Ma *et al.*, 2001; Kochian *et al.*, 2005; Andrade *et al.*, 2011). Como exemplo, em folhas de trigo, o Al é complexado com o oxalato (Ma *et al.*, 1997<sup>a</sup>) e em *Hydrangea*

*macrophylla* é complexado com o citrato (Ma *et al.*, 1997<sup>b</sup>). Adicionalmente, a associação com ácidos orgânicos é a provável forma de translocação do Al na planta. Em *Melastoma malabathricum* L., estudos indicam que o transporte de Al ocorre no xilema, provavelmente na forma de complexos de Al-citrato (Lee & Foy, 1986; Watanabe & Osaki, 2002). Por outro lado, a forma na qual o Al é acumulado nos vacúolos de células foliares dessa planta se dá pela formação de complexos com oxalatos (Lee & Foy, 1986; Watanabe & Osaki, 2002). Como visto, o aumento na concentração de ácidos orgânicos propicia a formação de complexos Al-ácidos orgânicos que impedem os efeitos tóxicos do Al<sup>3+</sup> em plantas tolerantes.

De acordo com Barceló & Poschenrieder (2002) já foram identificadas mais de 100 espécies de plantas capazes de acumular grandes quantidades de Al internamente sem demonstrar sinais de toxicidade. Essas plantas são denominadas hiperacumuladoras, pois apresentam em seus tecidos teores de Al acima de 1 g de Al.Kg<sup>-1</sup> de matéria seca. No Cerrado, representantes desse grupo de plantas são prioritariamente arbóreas e podem acumular de 4 a 14 g de Al.Kg<sup>-1</sup> de matéria seca (Chenery, 1948). Com frequência essas plantas pertencem a famílias como Melastomataceae, Rubiaceae e Vochysiaceae (Haridasan, 1982). Adicionalmente, todas as espécies de *Vochysia*, *Qualea* e *Callisthene* (Vochysiaceae), *Palicourea* (Rubiaceae) e *Miconia* (Melastomataceae) são enquadradas como hiperacumuladoras, pois armazenam grandes quantidades em seus órgãos, como folhas e sementes (Haridasan, 2005; Haridasan, 2008).

Estudos têm mostrado que o Al pode ter efeitos benéficos em algumas espécies vegetais (Pilon-Smits *et al.*, 2009; Silva, 2012). Como exemplo, *Camellia sinensis* acumula mais de 10.000 ppm de Al em suas folhas, e na presença deste metal ocorre um aumento considerável na formação de novas raízes e no desenvolvimento da parte aérea das plantas (Ghanati *et al.*, 2005; Jansen *et al.*, 2002). Adicionalmente, o Al induziu uma maior absorção de nutrientes como N, P e K em *Miconia malabathricum*, *Hydrangea macrophylla*, e *Fagopyrum esculentum* (Osaki *et al.*, 1997). Em espécies nativas do Cerrado, o acúmulo de elevadas quantidades desse metal não afeta a absorção e o transporte interno de Ca, Mg e K (Haridasan *et al.*, 1987; Haridasan, 1982).

Para algumas espécies do Cerrado, o Al é um elemento químico importante para o crescimento e desenvolvimento, como em *Miconia albicans*, *Vochysia thyrsoidea* e *Qualea grandiflora* (Haridasan, 1988; Machado, 1985; Silva, 2012). Plântulas dessas espécies quando crescidas na presença de Al apresentaram um melhor desenvolvimento tanto da parte aérea quanto radicular. Diferentemente, plântulas que não receberam suplementação de Al mostraram

sinais de senescência como clorose e necrose foliar (Haridasan, 1988; Machado, 1985; Silva 2012).

#### 4. *Qualea grandiflora* Mart.

A espécie *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae), conhecida popularmente como pau-terra, pau-do-campo e pau-terra-do-cerrado, ocorre nos Cerrados da Amazônia, São Paulo, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul, tanto em solos distróficos como mesotróficos (Lorenzi, 2008; Haridasan & Araújo, 1988). A Figura 1 (A-E) mostra um espécime de *Q. grandiflora*, uma planta arbórea decídua, heliófita, pioneira, ocorrendo tanto em formações primárias como secundárias (Lorenzi, 2008), sendo comumente encontrada no Cerrado do Distrito Federal (Ratter, 1991).

Ao estudar a fitossociologia de uma área de Cerrado denso no Distrito Federal, Andrade *et al.* (2002) concluíram que *Q. grandiflora* está entre as dez espécies nativas mais importantes da região. Araújo (1984) confirmou a relevância do pau-terra destacando que a espécie está entre as oito mais importantes na composição florística de cerradão distrófico do Distrito Federal.

Espécies de Vochysiaceae são importantes acumuladoras de Al e amplamente representadas na composição florística do Cerrado (Haridasan & Araújo, 1988). Como exemplo, *Q. grandiflora* é uma planta hiper-acumuladora de Al presente no Cerrado *sensu stricto*. Estudos indicam que esta espécie pode acumular de 3,91 a 5,16 g de Al.Kg<sup>-1</sup> de matéria seca, principalmente nas partes aéreas (Haridasan, 1982; Andrade *et al.*, 2007). As sementes de *Q. grandiflora* também acumulam altos teores de Al nos seus tecidos de reserva, principalmente nos cotilédones (Haridasan, 1982, 1987; Silva, 2012).



**Figura 1.** *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae). A- Vista geral da árvore adulta; B- Detalhes dos ramos; C- Flor; D- Fruto fechado; E- Fruto aberto. Fonte: Adaptado de Silva (2012).



## 5. Referências Bibliográficas

- ANDRADE, L.R.M. de; BARROS, L.M.G.; ECHEVARRIA, G.F.; AMARAL, L.I.V., COTTA, M.G., ROSSATTO, D.R.; HARIDASAN, M. & FRANCO, A.C. 2011. Al-hyperaccumulator Vochysiaceae from the Brazilian Cerrado store aluminum in their chloroplasts without apparent damage. *Environmental and Experimental Botany*. 70: 37-42.
- ANDRADE, L.R.M. DE; BECQUER, T.; FRANCO, A. C.; HARIDASAN, M. & MARTINS E.S. Efeito das condições edáficas na disponibilidade e acumulação de alumínio e de nutrientes em plantas nativas do Cerrado. *In XI Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal*, Gramado – Rio Grande do Sul, Brasil, 2007.
- ANDRADE, L.A.Z.; FELFILI, J.M. & VIOLATTI, L. 2002. Fitossociologia de uma área de Cerrado denso na RECOR-IBGE, Brasília-DF. *Acta Botanica Brasilica*. 16: 225-240.
- ARAÚJO, G.M. Comparação do estado nutricional de dois cerradões em solo distrófico e mesotrófico no Planalto Central do Brasil. Dissertação de Mestrado, Brasília, DF, Universidade de Brasília, 1984.
- BAUBORINA, O.; OZTURK, L.; CAKMAK, I. & RENGEL, Z. 2006. Reactive oxygen species production in wheat roots is not linked with changes in H<sup>+</sup> fluxes during acidic and aluminium stresses. *Plant Signaling & Behavior*. 1: 71-76.
- BARCELÓ, J. & POSCHENRIEDER, C. 2002. Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. *Environmental and Experimental Botany*. 48: 75-92.
- BOSCOLO, P.R.S.; MENOSSI, M. & JORGE, R. A. 2003. Aluminum-induced oxidative stress in maize. *Phytochemistry*. 62: 181-189.
- CAMBRAIA, J.; DA SILVA, M. A.; CANO, M. A. O. & SANT'ANNA, R. 1991. Método simples para avaliação de cultivares de sorgo quanto a tolerância ao alumínio. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. 3: 87-95.
- CHENERY, E.M. 1948. Aluminium in the plant world. Part.I. *Kew bulletin*. 2: 173-183.

- CLARKSON, D.T. 1965. The effect of aluminium and some trivalent metal cations on cell division in the root apices of *Allium cepa*. *Annals of Botany*. 29: 309–315.
- CLARKSON, D.T.; 1966. Effect of aluminum on the uptake and metabolism of phosphorus by barley seedlings. *Plant Physiology*. 41: 165-172.
- DELHAIZE, E.; RYAN, P.R. & RANDALL, P. J. 1993. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). II. Aluminum stimulated excretion of malic acid from root apices. *Plant Physiology*. 103: 695-702.
- FOY, C.D.; CHANEY, R.L. & WHITE, M.C. 1978. The physiology of metal toxicity in plants. *Annual Review of Plant Physiology*, Bethesda. 29: 511-56.
- GHANATI, F.; MORITA, A. & YOKOTA, H. 2005. Effects of aluminium on the growth of tea plant and activation of antioxidant system. *Plant Soil*, 276: 133-141.
- GOODLAND, R. Oligotrofismo e alumínio no Cerrado. P.44-60 in III Simpósio sobre o Cerrado. Ed da Universidade de São Paulo e Ed. Edgard Blücher. 239 p. 1971.
- HARIDASAN, M. 2008. Nutritional adaptations of native plants of the Cerrado biome in acid soils. *Review: Brazilian Journal of Plant Physiology*. 20: 183-195.
- HARIDASAN, M. 2005. Nutrição mineral das plantas nativas do Cerrado. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. 12: 54-64.
- HARIDASAN, M. 1988. Performance of *Miconia albicans* (Sw.) Triana, an aluminium-accumulating species in acidic and calcareous soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 19: 1091-1103
- HARIDASAN, M. 1987. Distribution and mineral nutrition of aluminium-accumulating species in different plant communities of the cerrado region of Central Brazil. In: San José JJ, Montes R (eds), *La capacidade bioproductiva de sabanas*. pp.309-348. Instituto Venezolano de Investigaciones Cientificas, Caracas.
- HARIDASAN, M. 1982. Aluminium accumulation by some Cerrado native species of central Brazil. *Plant and Soil*. 65: 265-273.

- HARIDASAN, M. & ARAÚJO, G. M. 1988. Aluminium-accumulating species in two forest communities in the Cerrado region of central Brazil. *Forest Ecology and Management*. 24: 15-26.
- HARIDASAN, M.; HILL, P.G. & RUSSELL, D. 1987. Semiquantitative estimates of Al and other cations in the leaf tissues of some Al-accumulating species using electron probe microanalysis. *Plant and Soil*. 104: 99-102.
- JANSEN, S.; BROADLEY, M.; ROBBRECHT, E. & SMETS, E. 2002. Aluminium hyperaccumulation in angiosperms: a review of its phylogenetic significance. *Botanical Review*. 68: 235-269.
- KOCHIAN, L.V. 1995. Cellular mechanism of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 48: 237-260.
- KOCHIAN, L.V.; PINEROS, M.A. & HOEKENGA, O.A. 2005. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. *Plant and soil*. 274: 175-195.
- KOCHIAN, L.V.; HOEKENGA, O.A. & PINEROS, M.A. 2004. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annual Review of Plant Biology*. 55: 459-497.
- KOCHIAN, L.V.; PENCE, N.S.; LETHAM, D.L.D.; PINEROS, M.A.; MAGALHAES, J.V.; HOEKENGA, O.A. & GARVIN, D.F. 2002. Mechanisms of metal resistance in plants: aluminum and heavy metals. *Plant and Soil*. 247: 109-119.
- LEE, E. H. & FOY, C. D. 1986. Aluminum tolerances of two snapbean cultivars related to organic acid content evaluated by high-performance liquid chromatography. *Journal of Plant Nutrition*. 9: 1481-1498.
- LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 5 .ed. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2008. 384 p.
- MA, J.F.; RYAN, P.R. & DELHAIZE, E. 2001. Aluminum tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends in Plant Science, Oxford*. 6: 273- 278.

- MA, J.F.; ZHENG, S.J. & MATSUMOTO, H. 1997<sup>a</sup>. Detoxifying aluminum with buckwheat. *Nature*. 390: 569-570.
- MA, J. F., HIRADATE, S., NOMOTO, K., IWASHITA, T. & MATSUMOTO, H., 1997<sup>b</sup>. Internal detoxification mechanism of Al in *Hydrangea*: identification of Al form in the leaves. *Plant Physiology*. 113: 1033-1039.
- MACHADO, J.W.B. Acumulação de alumínio em *Vochysia thyrsoidea* Pohl. Dissertação (Mestrado). Brasília, 1985. 104p. Universidade de Brasília.
- MINOCHA, R.; MINOCHA, S.C.; STEPHANIE, L.L. & SHORTLE, W.C. 1992. Effects of aluminum on DNA synthesis, cellular polyamines, polyamine biosynthetic enzymes and inorganic ions in cell suspension cultures of a woody plant. *Catharauthus roseus*. *Journal of Plant Physiology*. 85: 417-424.
- MITTLER, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Plant Science*. 7: 405-410.
- MIYASAKA, S. C.; BUTA, J. G.; HOWELL, R. K. & FOY, C. D. 1991. Mechanism of aluminum tolerance in snapbean, root exudation of citric acid. *Plant Physiology*. 96: 737-743.
- MUNNS, D.N. 1965. Soil acidity and growth of legume. II. Reaction of aluminium and phosphate in solution and effects of aluminium, phosphate, calcium, and pH on *Medicago sativa* L. and *Trifolium subterraneum* L. in solution culture. *The Australian Journal of Agricultural Research*. 16: 743-755.
- OLIVEIRA, I.P. DE; COSTA, K.A.P.; SANTOS, K.J.G. & MOREIRA, F.B. 2005. Considerações sobre a acidez dos solos de Cerrado. *Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos*. 1: 12 p.
- OSAKI, M.; WATANABE, T.; TADANO, T. 1997. Beneficial effect of aluminum on growth of plants adapted to low pH soils. *Soil Science and Plant Nutrition*. 43: 551- 563.

- PANDA, S. K.; SINGHA, L. B. & KHAN, M. H. 2003. Does aluminium phytotoxicity induce oxidative stress in greengram (*Vigna radiata*)? *Bulgarian Journal of Plant Physiology*. 29: 77-86.
- PATRA, J. & PANDA, B. B. 1998. A comparison of biochemical responses to oxidative and metal stress in seedlings of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Environmental Pollution*. 101: 99-105.
- PELLET, D. M.; GRUNES, D. L. & KOCHIAN, L. V. 1995. Organic acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). *Planta*. 796: 788-795.
- PILON-SMITS, E.A.H.; QUINN, C.F.; TAPKEN, W.; MALAGOLI, M. & SCHIAVON, M. 2009. Physiological functions of beneficial elements. *Current Opinion in Plant Biology*, 12: 267-274.
- PRISCO, J.T. & FILHO, E.G. Fisiologia e bioquímica do estresse salino em plantas. Manejo de salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados. Fortaleza, 2010.
- RATTER, J.A. Guia para a vegetação da Fazenda Água Limpa (Brasília, DF). Ed. Universidade de Brasília, Brasília, DF. 1991.
- RICHARDS, K. D.; SCHOTT, E. J.; SHARMA, Y. K.; DAVIS, K. R. & GARDNER, R. C. 1998. Aluminum induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*. 116: 409-418.
- SHARMA, P. & DUBEY, R.S. 2007. Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum. *Plant Cell Reports*. 26: 2027-2038.
- SILVA, R.C.C. Aspectos fisiológicos, fotoquímicos e proteômicos de *Qualea grandiflora* Mart. em resposta ao alumínio. Dissertação de mestrado. Brasília, DF, Universidade de Brasília. 2012.
- SILVA, C.R. & SOUZA, Z.M. Eficiência do uso de nutrientes em solos ácidos: manejo de nutrientes e uso de plantas. p. 38. 2008. Disponível em: <http://www.agr.feis.unesp.br/acido.htm>. Acesso às 10:45 do dia 30/05/2014.

- YAMAMOTO, Y.; KOBAYASHI, Y.; DEVI, S. R.; RIKIISHI, S. & MATSUMOTO, H. 2003. Oxidative stress triggered by aluminum in plant roots. *Plant and Soil*. 255: 239-243.
- WATANABE, T. & OSAKI, M. 2002. Mechanisms of adaptation to high aluminum condition in native plant species growing in acid soils: a review. *Communications in Soil Science and Journal Plant Analysis*. 33: 1247-1260.
- ZHANG, X.B.; LIU, P.; YANG, Y.S. & XU, GEN-DI. 2007. Effect of Al in soil on photosynthesis and related morphological and physiological characteristics of two soybean genotypes. *Botanical Studies*. 48: 435-444.

## **OBJETIVO GERAL**

O principal objetivo desse trabalho foi estudar alterações fisiológicas e metabólicas em plantas de *Qualea grandiflora* Mart. crescidas na presença e ausência de  $Al^{+3}$ , assim como efeitos ultraestruturais em cloroplastos da lâmina foliar dos dois tratamentos.

### **Objetivos específicos**

- Investigar e comparar as respostas fisiológicas do crescimento de plantas de *Q. grandiflora* expostas a presença e ausência do Al em solução nutritiva;
- Determinar o teor de pigmentos fotossintetizantes nas plântulas submetidas aos diferentes tratamentos;
- Quantificar a concentração foliar de Al, Fe, Ca, Mg e P em plantas crescidas na presença e ausência de Al, e ainda o Al presente nas sementes da espécie;
- Comparar a ultraestrutura dos cloroplastos da lâmina foliar nas plantas de ambos os tratamentos;
- Investigar o perfil metabólico da folha de *Q. grandiflora* crescidas na presença e ausência de Al.

**CAPÍTULO I – Avaliação da resposta fisiológica e aspectos ultraestruturais de plantas de *Qualea grandiflora* Mart. crescidas na presença e ausência de alumínio**



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. O alumínio em plantas

O Al é o metal mais abundante da crosta terrestre e a forma como ocorre no solo é dependente do pH, em solos ácidos a forma predominante é o íon trivalente  $Al^{+3}$  (Jansen *et al.*, 2002). De acordo com Kochian (1995), essa espécie de  $Al^{+3}$  é considerada a mais fitotóxica para espécies de plantas sensíveis ao metal. Essa fitotoxicidade é um dos principais fatores que afetam a produtividade agrícola em solos ácidos de todo o mundo (Foy *et al.*, 1978).

Goodland (1971) propôs que a estrutura anatômica das plantas do Cerrado reflete adaptações ao meio ambiente e chamou de escleromorfismo devido a sua direta correlação com as condições edáficas do bioma como o alto teor de Al e a baixa fertilidade desses solos. Este autor considerou que as plantas nativas refletiam a toxicidade do Al e deficiências nutricionais inerentes ao seu ambiente. Trabalhos posteriores verificaram que espécies de Melastomataceae, Rubiaceae e Vochysiaceae podem acumular elevados teores de Al independente da fertilidade do solo (Haridasan & Araújo, 1988; Barceló & Poschenrieder, 2002).

Entretanto, muitas espécies ressentem a presença de Al nos solos. A redução do crescimento radicular em plantas sensíveis é apontada como o primeiro reflexo do estresse ao Al e conseqüentemente resulta em deficiências nutricionais, além de déficit hídrico e facilita o ataque de patógenos (Foy *et al.*, 1978; Kinraide & Parker, 1990). Adicionalmente, o contato com esse metal provoca uma diminuição da permeabilidade da membrana plasmática (Ahn *et al.*, 2001) e também a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Kochian *et al.*, 2002).

O Al é considerado um elemento importante para várias plantas nativas do Cerrado, sendo que algumas espécies necessitam desse metal para crescerem e desenvolverem normalmente, como é o caso de *M. albicans* e *V. thyrsoidea* (Machado, 1985; Haridasan, 1988). Além disso, plântulas dessas espécies apresentam sinais de senescência em solos calcários como clorose e necrose foliar. Contudo, quando transplantadas para solos ácidos recuperaram o seu crescimento normal (Machado, 1985; Haridasan, 1988).

Vários parâmetros morfológicos têm sido utilizados para avaliar o efeito do  $Al^{+3}$  em plantas (Benin *et al.*, 2004; Bertan *et al.*, 2006). Os parâmetros comumente usados para analisar o desenvolvimento das plantas são: comprimento da parte aérea e radicular, biomassa das plantas,

assim como teores de pigmentos fotossintetizantes (Fageria *et al.*, 1988; Silva, 2012). Plântulas de *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae) crescidas em solução nutritiva contendo Al apresentaram crescimento da parte aérea e radicular, biomassa e teores de clorofila maiores comparados às plântulas crescidas na ausência do metal (Silva, 2012).

Adicionalmente, o excesso ou deficiência de Al nos tecidos foliares de algumas espécies pode provocar vários distúrbios, entre eles estão alterações na estrutura e o funcionamento de muitas organelas celulares (Konarska, 2010). De acordo com Solymosi & Bertrand (2012), entre todas as organelas, os cloroplastos aparecem como estruturas chave, visto que são produtores da matéria orgânica através da fotossíntese. Com isso, o estresse causado pelo excesso ou deficiência de Al nas plantas pode provocar alterações na ultraestrutura dos cloroplastos, assim como ocorre em algumas espécies submetidas a outros tipos de estresses (Choudhury & Panda, 2005; Chen *et al.*, 2008).

## 1.2. Alumínio e nutrientes nas plantas

A quantificação do Al e outros nutrientes em tecidos vegetais é importante para compreender se presença ou ausência de Al interfere na absorção e distribuição de importantes elementos, como o Ca, Mg, Fe e P. De acordo com Haridasan (1982), em plantas nativas do Cerrado, o acúmulo de elevadas quantidades de Al não afeta a absorção e o transporte interno de Ca, Mg e K (Haridasan *et al.*, 1987). É importante salientar que esses elementos desempenham funções cruciais no metabolismo vegetal.

O Ca é um componente da parede celular e tem papel central na regulação de muitos processos celulares em plantas, incluindo a manutenção da estrutura da membrana celular, mitose, citocinese, sinalização celular e ainda, como cofator de enzimas (Huang *et al.*, 1996; Raven *et al.*, 2007). Na deficiência de Ca, observa-se deformação das folhas, principalmente na redução do seu tamanho/quantidade, resultando em grande redução da área foliar, assim como clorose e necrose do limbo (Malavolta *et al.*, 1976; Rodrigues, 1982). Em plantas sensíveis ao Al, a presença do metal reduz a absorção de Ca, como ocorre em mudas de goiabeira (*Psidium guajava*) (Salvador *et al.*, 2000). Contudo, de acordo com Haridasan (1982), em plantas nativas do Cerrado, o acúmulo de elevadas quantidades de Al não afeta a absorção e o transporte interno desse nutriente.

O Mg absorvido pelas plantas participa como átomo central da molécula de clorofila, fazendo parte de sua estrutura química e sendo fundamental nos processos de fotossíntese. Além disso, é um ativador de várias enzimas relacionadas à síntese de carboidratos e de ácidos nucléicos (Raven *et al.*, 2007; Mengel e Kirkby, 2001). A deficiência de Mg nas plantas causa inicialmente uma clorose marginal nas folhas mais velhas, que progride em direção à área internerval, sendo que as áreas amarelas podem tornar-se posteriormente necrosadas (Silva *et al.*, 1994). Freitas *et al.* (2006) relataram em alguns genótipos de arroz, submetidos ao estresse por  $Al^{+3}$ , houve uma redução significativa na absorção de Mg, além de Ca e K. No entanto, segundo Foy (1974), o excesso de Al em plantas sensíveis interfere nas reações enzimáticas e na absorção, transporte e uso de nutrientes.

O Fe é um micronutriente que está relacionado a diversas atividades metabólicas, participando como grupo prostético de enzimas (catalase, peroxidase, nitrogenase e ferredoxina), além de ser indispensável nos processos de respiração e fotossíntese (biossíntese de clorofila) (Raven *et al.*, 2007). Como cerca de 80% do Fe das folhas está localizada nos cloroplastos, a deficiência deste micronutriente causa clorose das folhas jovens, pela diminuição da quantidade de cloroplasto e do teor de clorofila (Kirkby & Römheld, 2007). Adicionalmente, a absorção de Fe pode ser afetada sob condições de estresse. Assim, os níveis de Fe em folhas e raízes de berinjela (*S. melogena*) decresceram em plantas sob estresse salino (Bosco *et al.*, 2009). Semelhantemente, o estresse ao Al ( $25 \text{ mg.L}^{-1}$ ) também resultou na diminuição significativa dos teores de Fe em folhas de goiabeira (Salvador *et al.*, 2000).

O P também é considerado essencial uma vez que satisfazem os dois critérios da essencialidade, diretamente por participar de compostos e reações vitais para as plantas, e indireto porque na sua ausência a planta não completa seu ciclo de vida, não podendo ser substituído por outros (Almeida Júnior *et al.*, 2009). Esse nutriente participa de várias reações metabólicas fundamentais nas plantas, como transferência de energia, síntese de ácidos nucléicos, respiração, síntese e estabilidade das membranas, ativação e desativação de enzimas e, reações redox (Vance *et al.* 2003). De acordo com Marschner (2002), a deficiência de P proporciona uma redução na parte aérea das plantas através da limitação do número e expansão das folhas, ramificação da parte aérea, redução da taxa de assimilação de carbono e senescência prematura das folhas.

Em relação ao P, a presença do Al parece estar intimamente associada com o seu uso e eficiência em plantas tolerantes ao metal. Alguns estudos têm sido realizados para investigar as

interações Al e P em plantas (Liao *et al.*, 2006). Zheng *et al.* (2005) verificaram que o teor de P do ápice radicular em trigo mourisco foi significativamente correlacionado com a imobilização e desintoxicação de Al, indicando que pode haver uma significativa interação Al-P nas raízes. Foy *et al.* (1978) também concluíram que as diferenças na tolerância ao Al poderiam ser explicadas por diferentes interações Al-P em plantas de trigo e cevada. Andrew & Van Der Berg (1973) constataram que o Al aumentou a concentração de P na parte aérea de espécies de leguminosas tolerantes ao Al.

### 1.3. Microscopia e análise estrutural de tecidos e células vegetais

A microscopia tem evoluído no sentido de dar informações tanto ultraestruturais como analíticas das amostras estudadas. Basicamente existem a Microscopia de Luz ou Óptica e a Microscopia Eletrônica que se diferem quanto ao tipo de radiação utilizada e na maneira como ela é refratada (Galleti, 2003). A Microscopia Eletrônica pode ser subdividida em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).

O aspecto essencial do microscópio eletrônico de varredura é que um feixe de elétrons extremamente estreito é usado para varrer a superfície da amostra e assim a imagem é construída. O MEV tem grande profundidade de foco e são possíveis ampliações de até 300.000 x (Grimstone, 1980). Acoplado ao microscópio, o sistema de EDS (*Energy Dispersive Spectrometer*) possibilita a determinação da composição qualitativa e semiquantitativa das amostras, a partir da emissão de raios X. Além da identificação dos elementos, o equipamento permite o mapeamento da distribuição dos elementos químicos, gerando mapas composicionais dos elementos desejados (Duarte *et al.*, 2003). O EDS tem sido usado na detecção de metais em diferentes tipos de amostras, inclusive tecidos vegetais. Através da microanálise de raio-x foi visto que os principais locais de acúmulo de Al em *M. albicans*, *M. rubiginosa*, *Q. grandiflora* e *Q. parviflora* são paredes celulares de tecidos não lignificados (Bressan, 2014).

No microscópio eletrônico de transmissão um feixe de elétrons atravessa a amostra sofrendo diversos tipos de espalhamento, que dependem densidade do material (Rosa, 2008). Em função disso, a coloração ou o contraste das amostras são feitas com metais pesados, que ao desviar os elétrons, permitem a formação da imagem na tela. As substâncias comumente utilizadas para o contraste das amostras são chumbo, ouro, tungstênio e tetróxido de ósmio. A

MET, em função de seu alto poder de resolução, permite uma análise detalhada da ultraestrutura celular em estudos de morfologia celular visando determinar aspectos estruturais das organelas celulares (Galleti, 2003).

Estudos têm mostrado que o Al pode provocar alterações ultraestruturais em protoplastos e mitocôndrias do mesofilo foliar de *Arabidopsis* que foram atribuídas à produção de ROS e morte celular programada (Li & Xing, 2011). Os efeitos desse metal em raízes de cevada (*H. vulgare*) causaram alterações ultraestruturais em células da epiderme e da coifa, como por exemplo, o aumento do número de vesículas e irregularidade da superfície do protoplasto (Ikeda & Tadano, 1993). A análise de folhas de *Camellia sinensis* tratadas com Al mostrou que a integridade ultraestrutural das células foi mantida com concentrações de Al de 0 a 0,32 mM, porém houve um significativo dano da membrana plasmática com concentrações de 0,53 mM (Li *et al.*, 2011). Portanto, é possível detectar alterações na ultraestrutura celular, assim como de organelas em função de estímulos ou estresses recebidos pelas plantas.

Este estudo teve como objetivo avaliar a importância do Al no crescimento inicial de *Q. grandiflora* através da análise dos parâmetros morfológicos e fisiológicos. Além disso, detectar a presença do Al e elementos como Ca, Fe, Mg e P na nervura principal da folha através do EDS-MEV e quantificá-los nas folhas através de espectrometria de absorção atômica. E ainda, analisar os aspectos ultraestruturais de cloroplastos por meio do microscópio eletrônico de transmissão de plantas crescidas na ausência e presença de Al.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Coleta e germinação das sementes de *Q. grandiflora*

Sementes de *Q. grandiflora* Mart. (Vochysiaceae) foram coletadas em áreas de Cerrado *sensu stricto* na Reserva Ecológica da Fazenda Água Limpa – UnB (FAL), na Reserva Ecológica do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) e Fazenda Dois Irmãos (Água Fria de Goiás-GO). As sementes foram desinfestadas utilizando álcool 70% (1 min) e hipoclorito de sódio (NaClO) 2% (cloro ativo) por 30 min e lavadas em água bidestilada. Em seguida foram separadas e germinadas em papel germitest por 20 dias. As sementes foram mantidas em câmara de germinação BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) a 25 °C, 70% de umidade e fotoperíodo de 18 h.

## 2.2. Crescimento das plântulas

Após a germinação, plântulas com radícula de 2-3 cm foram transferidas para recipientes de 500 mL de vermiculita Agrofloc<sup>®</sup> contendo solução nutritiva  $1/5$  MS (Murashige & Skoog, 1962) em dois tratamentos, com e sem Al. O Al foi fornecido com a adição de 200  $\mu$ M de  $AlCl_3$  na solução nutritiva. O pH da solução nutritiva foi mantido entre 4,5 e 5,0 para evitar a precipitação com Al, durante o período experimental de 90 dias. As soluções nutritivas foram repostas duas vezes por semana. As plântulas foram colocadas em sala de crescimento a 25 °C, 70% de umidade relativa e fotoperíodo de 18 h. As plantas de ambos os tratamentos foram submetidas a diferentes métodos de análises.

## 2.3. Parâmetros morfológicos e fisiológicos

### *2.3.1. Análise de comprimento e estado visual das plantas*

Após 90 dias de crescimento, as plantas foram retiradas dos recipientes plásticos e lavadas com água corrente até a completa retirada do substrato nas raízes. As medições do comprimento da raiz principal (CRP) e o comprimento da parte aérea (CPA) (haste principal acima do cotilédono – germinação epígea) foram realizadas com o auxílio de régua milimetrada automática (paquímetro). Foi utilizado um total de dez plantas de cada tratamento (com e sem Al).

### *2.3.2. Concentração de pigmentos fotossintéticos*

Com o auxílio de um furador foliar, foram retirados seis discos de 0,5 cm de diâmetro do limbo foliar correspondentes as três plântulas de cada tratamento, e colocados em um tubo de microcentrífuga âmbar (ependorffs) contendo 2 ml de DMF (N, N-dimetilformamida -  $HCON(CH_3)_2$ ). Os tubos foram envolvidos por papel alumínio e armazenados por 48 h a 4°C. Ao término do tempo, foi feita a leitura da absorbância dos extratos no comprimento de onda luminosa de 663,8 nm, 646,8 nm e 480 nm, utilizando o espectrofotômetro Genesys 2 da Thermo

Spectronic. Com esses valores de absorvância, foram calculadas as concentrações das clorofilas *a* e *b*, clorofila total (*a+b*) e carotenóides, proposto por Wellburn (1994).

### 2.3.3. *Concentração de Al, Ca, Mg, Fe e P em folhas e Al em sementes de Q. grandiflora*

O preparo das amostras do limbo foliar e sementes de *Q. grandiflora* consistiram da secagem em estufa de circulação forçada durante 72 h a 65° C. Em seguida, as amostras foram pesadas em balança de precisão e trituradas em moinho de bola. Esta moagem é feita para homogeneização da amostra.

A digestão foi feita em solução nítrico-perclórica para determinação dos teores de P, Ca, Mg, Fe e Al. Primeiramente, pesou-se 0,5 g do material moído. Em seguida, adicionou-se 10 mL da mistura de ácido nítrico + ácido perclórico (4:1 v/v). Então, foi levado em chapa quente pré-aquecida a 80° C e subiu-se a temperatura gradativamente até atingir 200° C e, posteriormente, completou-se o volume para 25 mL com água deionizada (Sarruge & Haag, 1974). Para a determinação de P, utilizou-se o método do ácido ascórbico por colorimetria, a 725 nm (Braga & Defelipo, 1974). Para os demais nutrientes, foi feita a determinação da emissão de luz no espectrômetro de absorção atômica. A análise foi realizada no Departamento de solos da Universidade Federal de Viçosa.

### 2.3.4. *Análises estatísticas*

Todas as médias entre os tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, considerando diferenças significativas com um nível de probabilidade  $p < 0,05$ .

## 2.4. Detecção subcelular de Al e análise ultraestrutural dos cloroplastos

Realizou-se a análise da detecção do Al e outros elementos (Ca, Mg, Fe e P) na nervura principal da folha de *Q. grandiflora* através da microscopia eletrônica de varredura - EDS. Adicionalmente, foi feita a comparação ultraestrutural dos cloroplastos de plantas crescidas na presença e ausência do Al por meio da microscopia eletrônica de transmissão.

### 2.4.1. *Microscopia eletrônica de varredura (MEV)*

Segmentos da nervura principal da folha de *Q. grandiflora* com 90 dias de ambos os tratamentos (com e sem Al) foram fixados em solução Karnovsky 0,05 M em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7.3 overnight a 4 °C. Posteriormente, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,05 M por 10 min. Subsequentemente, os tecidos foliares foram pós-fixados em tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) a 1%, no escuro durante 30 min. Em seguida, foi realizada a desidratação numa série graduada de acetona (30%, 50%, 70%, 90%) e então transferidas para acetona (100%), duas vezes durante 15 min cada. A secagem ao ponto crítico foi realizada no aparelho CPD 030. Após, as amostras foram colocadas em suportes de cobre (*stubs*) com o auxílio de fita adesiva dupla face. Subsequentemente, as amostras foram metalizadas com carbono e observadas no microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM 7001F).

A análise dos elementos (Al, Ca, Mg, Fe e P) no tecido foliar por meio de espectroscopia por energia dispersiva (*energy dispersive spectroscopy*, EDS) foi realizada no programa “*Noran System Six*” (NSS), sob aceleração de voltagem de 15 kV. A EDS teve como objetivo analisar qualitativamente os principais constituintes do tecido foliar de *Q. grandiflora*. Para padronização, a análise foi obtida de três indivíduos de ambos os tratamentos (com e sem Al) com a marcação de pontos no xilema e floema da nervura principal.

#### 2.4.2. *Microscopia eletrônica de transmissão (MET)*

Amostras da lâmina foliar de *Q. grandiflora* com três representantes de cada tratamento foram fixadas em solução Karnovsky 0,05 M durante 24 h. Em seguida, as amostras lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,05M e então pós-fixadas em ferricianeto de potássio e tetróxido de ósmio 2% (1+1), no escuro por 30 min. Subsequentemente as amostras foram contrastadas em acetato de uranila aquoso (0,5%) no escuro, em overnight. Em seguida, se procedeu a desidratação das amostras em série graduada de acetona (30%, 50%, 70%, 90%, 100%) por 15 min cada etapa. As amostras foram infiltradas e embebidas em resina SPURR por cerca de 8h em cada etapa (Souza *et al.*, 1989). Secções ultrafinas (60 nm) foram cortadas com um ultramicrótomo e montadas em grades de níquel para visualização no microscópio eletrônico de transmissão (Jeol JEM 1011) a uma tensão de aceleração de 60 KV.



### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Análise dos parâmetros morfológicos e fisiológicos

##### 3.1.1. *Análise de crescimento da parte aérea e raiz das plantas de *Q. grandiflora* crescidas com e sem suplementação de Al*

A Figura 1 mostra as plantas de *Q. grandiflora* crescidas em soluções nutritivas com e sem adição de Al por um período de 90 dias. É importante salientar que visualmente houve uma nítida diferença entre plantas crescidas na ausência e presença de Al. O tratamento controle (sem Al) se caracterizou por exibir sinais de clorose nas folhas e também uma menor expansão da lâmina foliar (Figura 1). Diferentemente do controle, as plantas suplementadas com Al se mostraram com folhas verdes sem sinais de clorose e maior expansão da lâmina foliar (Figura 1).



**Figura 1.** Plântulas de *Qualea grandiflora* aos 90 dias de cultivo com  $\frac{1}{5}$  MS sem (esquerda) e com adição de Al (direita).

Os resultados morfológicos mostraram diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 2). Após 90 dias de crescimento o comprimento da parte aérea das plantas crescidas na presença do Al foi em média 16,8% maior que o respectivo controle (Tabela. 1). O tamanho médio do caule das plantas controle foi de 68,15 mm, enquanto que as plantas crescidas com o Al os caules alcançaram 79,61 mm de média. Com respeito às raízes, foi verificada uma

tendência similar ao observado no caule, onde plantas crescidas com Al apresentaram um comprimento médio maior. Assim, raízes de plantas tratadas com Al o comprimento médio foi 32,5% maior que aquelas das plantas do controle (Tabela 1), média de 165,97 mm e 220,03 mm para raízes do tratamento controle e com Al, respectivamente (Tabela 1).

**Tabela 1.** Comprimento médio do caule e raiz principal de plantas de *Qualea grandiflora* crescidas com e sem suplementação de Al aos 90 dias de cultivo.

Comprimento (mm)	Controle	Alumínio
Caule*	68,15 ± 12,29	79,61 ± 9,23
Raiz principal*	165,97 ± 40,59	220,03 ± 56,55

\* Significativamente diferente  $p < 0,05$ .

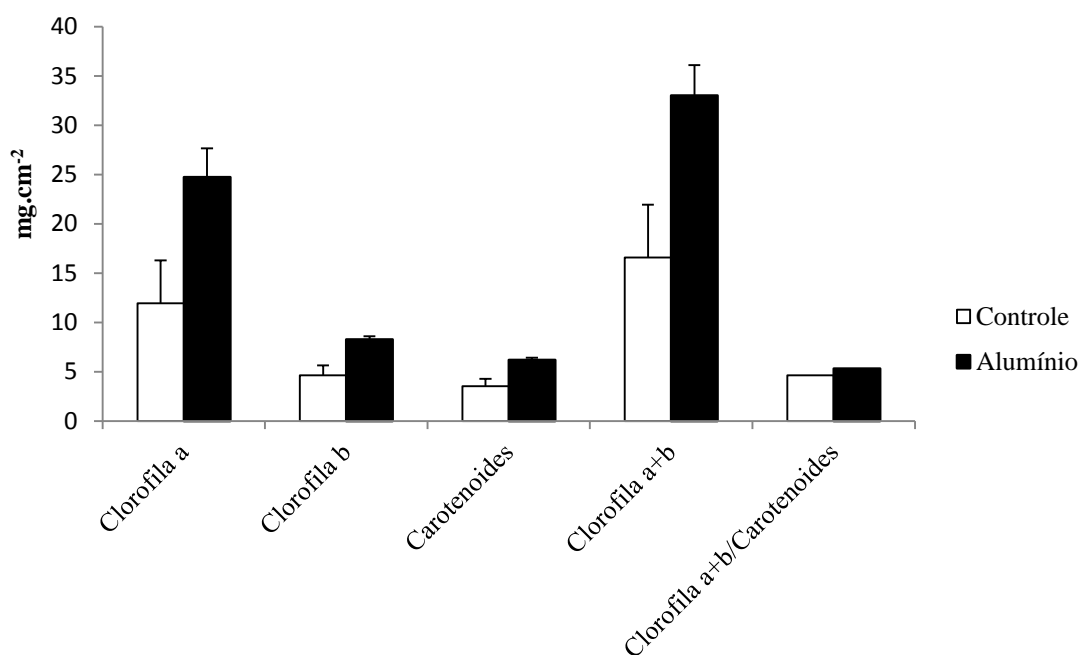


**Figura 2.** Aspecto geral das plantas de *Q. grandiflora* crescidas na presença de Al (planta superior) e na ausência do metal (planta inferior) após 90 dias de cultivo com solução  $\frac{1}{5}$  MS.

### 3.1.2. Quantificação de pigmentos fotossintéticos

Semelhantemente ao verificado com o comprimento das plantas de *Q. grandiflora*, a quantificação dos pigmentos fotossintetizantes mostrou diferenças significativas entre os

tratamentos. Plantas crescidas com Al tiveram a seguinte quantidade de pigmentos: clorofila *a*: 24,73 mg.cm<sup>-2</sup> ( $\pm 2,91$ ); clorofila *b*: 8,27 mg.cm<sup>-2</sup> ( $\pm 0,32$ ); e carotenoides 6,20 mg.cm<sup>-2</sup> ( $\pm 0,22$ ) (Figura 3). Plantas de *Q. grandiflora* crescidas sem Al mostraram valores menores no conteúdo dos pigmentos fotossintéticos, cujos valores foram de 11,95 mg.cm<sup>-2</sup> ( $\pm 4,34$ ), 4,64 mg.cm<sup>-2</sup> ( $\pm 1,0$ ), e 3,52 mg.cm<sup>-2</sup> ( $\pm 0,77$ ) para clorofila *a*, *b* e carotenoides, respectivamente (Figura 3). Além disso, os teores de clorofilas totais (*a* + *b*) também foram significativamente maiores no tratamento com o Al (33,00 mg.cm<sup>-2</sup>  $\pm 3,07$ ) que no controle (16,59 mg.cm<sup>-2</sup>  $\pm 5,33$ ) (Figura 3). Contudo, a razão entre clorofilas totais e carotenoides não apresentou variação significativa entre os tratamentos, e os respectivos valores foram de 5,32 ( $\pm 0,39$ ) para plantas crescidas com Al e 4,65 ( $\pm 0,43$ ) para plantas controle (Figura 3).

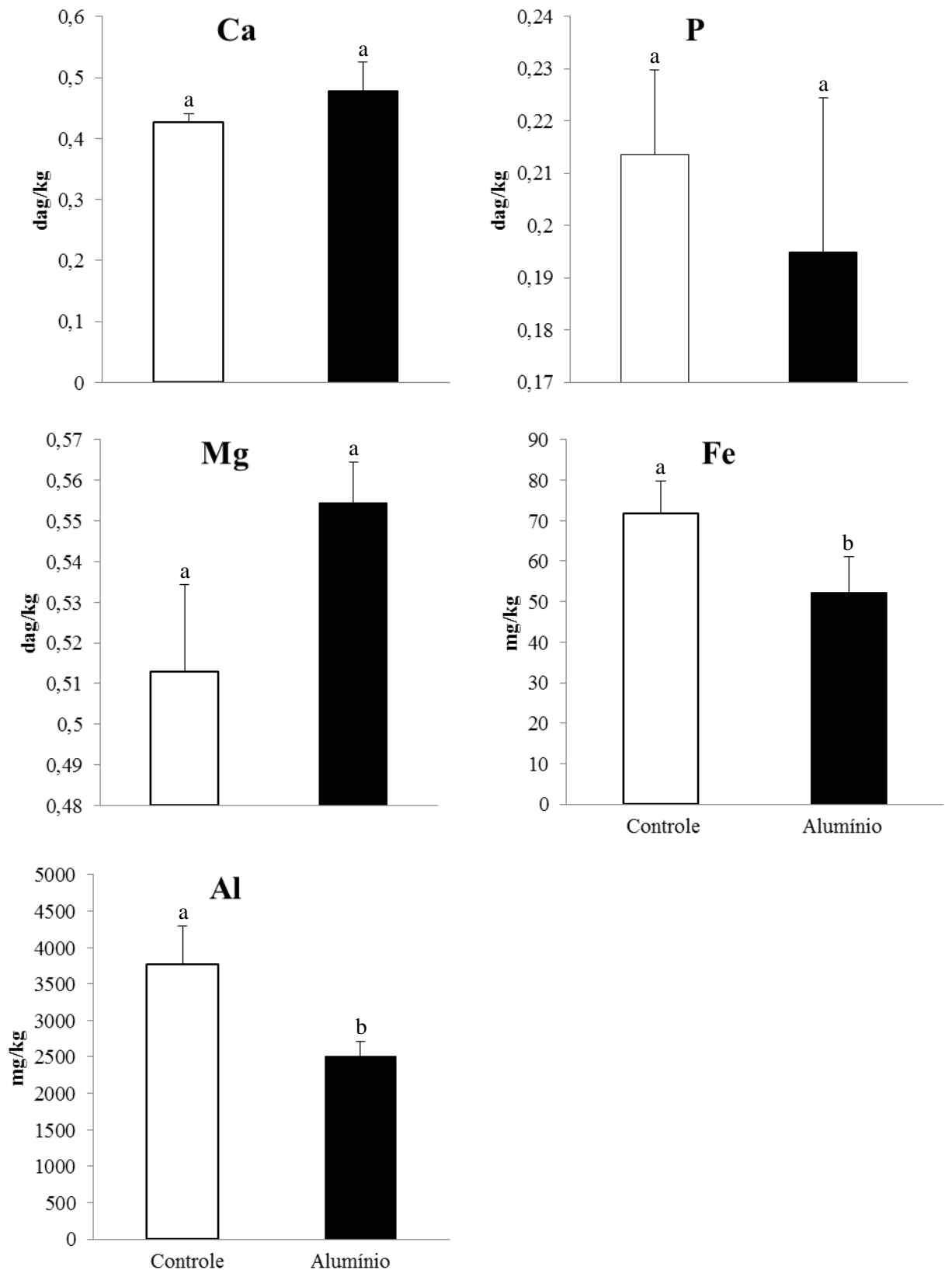


**Figura 3.** Conteúdo de pigmentos fotossintéticos de plantas de *Q. grandiflora* do tratamento controle (colunas brancas) e do tratamento com Al (colunas pretas). Barras seguidas de letras diferentes apresentam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). Barras de erro representam o desvio padrão.

### 3.1.3. Quantificação de Al, Ca, Mg, Fe e P em *Q. grandiflora*

Os resultados em *Q. grandiflora* mostraram que não houve diferenças significativas na concentração foliar de P, Ca e Mg entre o tratamento controle e Al (Figura 4). As

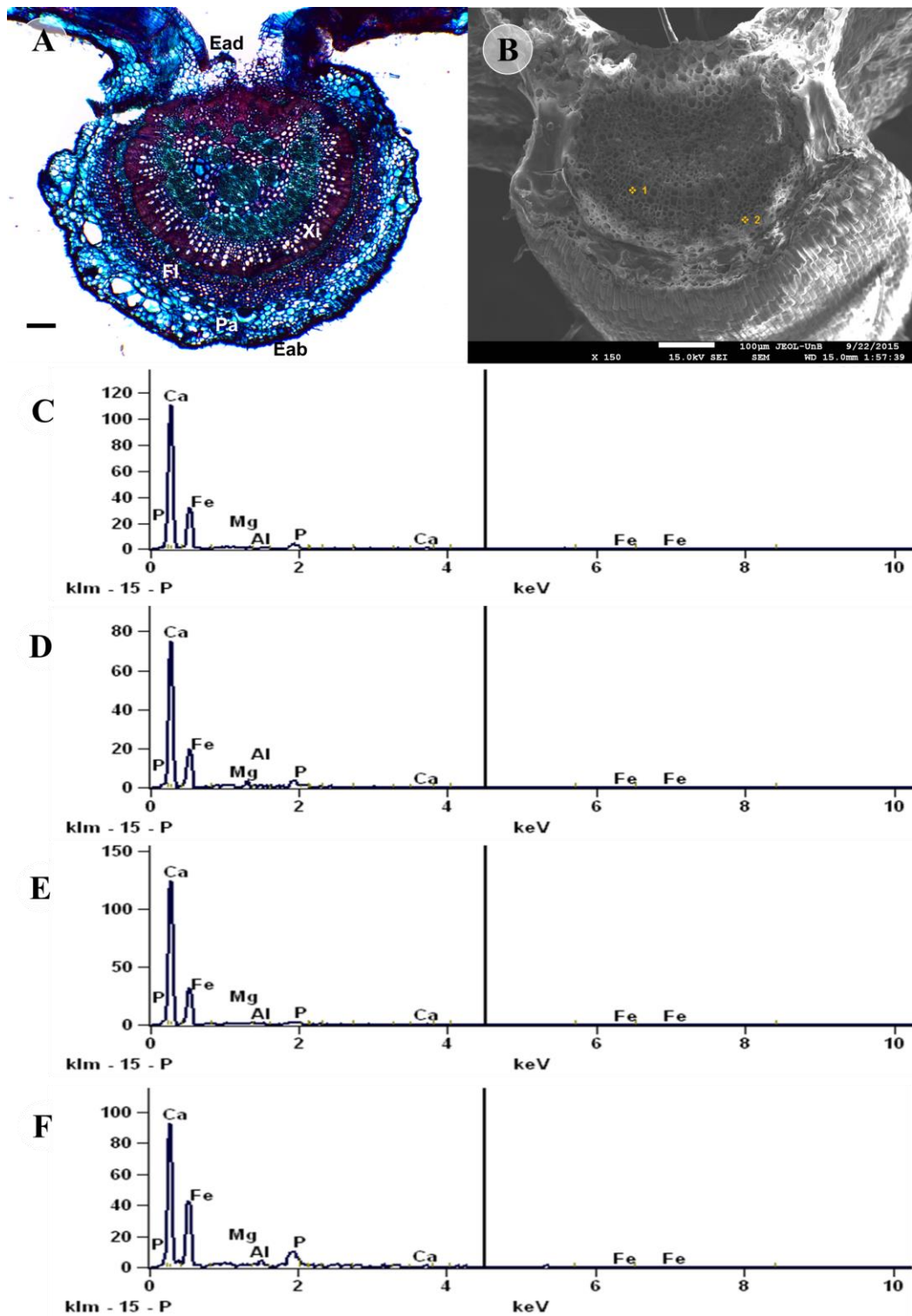
concentrações foram estimadas em 0,21 (dag/kg) de P, 0,42 (dag/kg) de Ca e 0,51 (dag/kg) de Mg nas plantas controle e 0,19 (dag/kg) de P, 0,47 (dag/kg) de Ca e 0,55 (dag/kg) de Mg nas plantas submetidas ao tratamento Al. No entanto, as concentrações foliares de Al e Fe foram superiores nas plantas controle comparado às plantas suplementadas com Al. As concentrações no limbo foliar foram estimadas em 3772,58 (mg/kg) de Al e 71,81 (mg/kg) de Fe em plantas controle e 2505,78 (mg/kg) de Al e 52,25 (mg/kg) de Fe em plantas com o Al (Figura 4). Adicionalmente, a média da concentração de Al presente nas sementes de *Q. grandiflora* foi de 6475,73 (mg/kg).



**Figura 4.** Concentração foliar de Ca, Mg, P, Fe e Al no tratamento controle (barra branca) e tratamento alumínio (barra preta) em *Q. grandiflora*. Barras representam o desvio padrão. Diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 3.2. Detecção de Al, Ca, Fe, Mg e P nas folhas de *Q. grandiflora*

A espectroscopia por energia dispersiva (EDS) revelou a presença de Al, Ca, Fe, Mg e P tanto em folhas de plantas de *Q. grandiflora* crescidas na presença de Al quanto em plantas crescidas na ausência do metal (Figura 5). A análise desses elementos foi realizada no xilema e floema da nervura principal das folhas. É importante salientar que esses elementos estão presentes nas paredes das células que compõem as regiões analisadas. No entanto, a EDS se mostrou adequada para uma análise qualitativa, já que as amostras dos dois tratamentos apresentaram grande variação em uma mesma região analisada. Com isso, os espectros do xilema e floema revelaram que a presença dos elementos Al, Ca, Fe, Mg e P nas plantas tratadas com e sem Al (Figura 5 C-F).



**Figura 5.** Espectroscopia por energia dispersiva (EDS) em folhas de *Qualea grandiflora* Mart. A. Secção transversal da nervura principal da folha de *Q. grandiflora*. B. Micrografia eletrônica de varredura da região da nervura principal de *Q. grandiflora*. Pontos 1 e 2 correspondem à região do xilema e floema da nervura principal de folhas de plantas de *Q. grandiflora*, respectivamente C-F. Gráficos obtidos após análise via “Noran System Six” (NSS), sob aceleração de 15 kV. Picos correspondem aos valores de Al, Ca, Mg, Fe e P quantificados via EDS. C. Xilema da planta controle D. Floema controle E. Xilema da planta tratada com Al F. Floema do tratamento Al. Eab: epiderme abaxial, Ead: epiderme adaxial, Pa: parênquima, Fl: floema, Xi: xilema. Escala: A-B: Barra de escala: 100  $\mu$ m.

### 3.3. Ultraestrutura dos cloroplastos de plantas de *Q. grandiflora* crescidas com e sem adição de Al

Plantas de *Q. grandiflora* que não receberam Al tinham sinais cloróticos. Devido a isso, é importante analisar a ultraestrutura dos cloroplastos tanto do controle quanto daquelas suplementadas com Al. Adicionalmente, os cloroplastos de folhas das plantas não tratadas com Al foram analisados tanto nas regiões nitidamente cloróticas quanto em regiões ainda verdes.

Assim, folhas de plantas de *Q. grandiflora* do tratamento controle apresentaram cloroplastos com deformações, tanto nas células da lâmina foliar de regiões cloróticas quanto nas regiões verdes (Figura 6 A-B). Na região da lâmina foliar completamente clorótica foi verificado que os cloroplastos estavam dilatados de forma predominantemente arredondada e em alguns casos com envelope rompido (Figura 6 A). Além disso, esses plastídios possuíam tilacóides com disposição levemente difusa mostrando uma tendência de perda da posição naturalmente paralela dessas estruturas. Adicionalmente, a maioria dos tilacóides apresentou grande dilatação do espaço intratilacoidal e levando a uma desorganização dos grana. Não se observou a presença de grãos de amido, contudo apresentaram abundantes plastoglóbulos no interior dos cloroplastos.

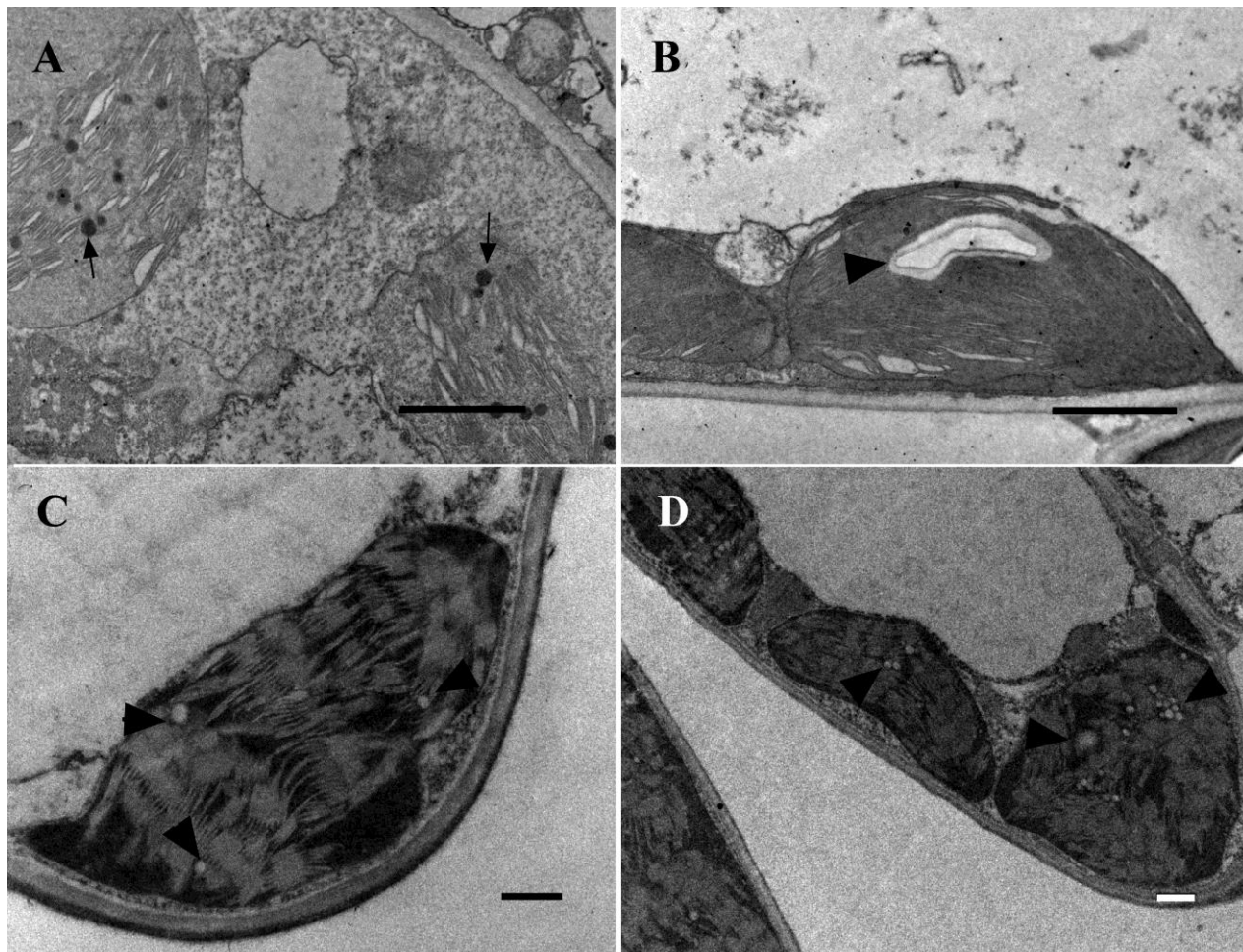
Além das anormalidades verificadas nos cloroplastos das folhas de plantas crescidas sem Al, pode-se perceber que de forma geral as células dessas folhas apresentavam outras anormalidades estruturais, como: vacúolos frequentemente rompidos, mitocôndrias deformadas, vesículas citoplasmáticas e vacuolares, entre outras. Essas características mostram que a célula como um todo estava em colapso (Figura 6 A).

Já na região da lâmina foliar não cloróticas, os cloroplastos eram volumosos, cuja forma variava de amebóide a arredondado (Figura 6 B). Embora os cloroplastos dessas regiões verdes fossem mais estruturalmente organizados que das regiões cloróticas, era possível observar que já havia anormalidades estruturais nestas organelas. Assim, os tilacóides apresentavam uma leve dilatação intratilacoidal e os grana se encontravam desorganizados. Os cloroplastos dessa região da folha possuíam grãos de amido e plastoglóbulos foram observados no interior desses plastídios.

Com respeito a ultraestrutura dessas organelas em plantas crescidas na presença de Al, os cloroplastos não apresentaram alterações estruturais (Figura 6 C). Os cloroplastos de folhas do tratamento com Al tinham formato fusiforme distribuídos no citoplasma periférico, com tilacóides em empilhamento normal e grana bem desenvolvidos. Além disso, foi constatada a



presença de pequenos grãos de amido e raros plastoglóbulos no interior destes cloroplastos (Figura 6 C-D).



**Figura 6.** Micrografia eletrônica de transmissão mostrando a ultraestrutura dos cloroplastos da lâmina foliar de plantas de *Qualea grandiflora* Mart. crescidas na presença e ausência de Al. (A) Cloroplastos com plastoglóbulos (setas) de folhas de plantas crescidas sem Al de regiões cloróticas. (B) Micrografia mostrando cloroplastos de região verde da lâmina foliar de plantas não suplementadas com Al. (C) Cloroplastos de folhas de plantas crescidas na suplementação de Al. Note que os cloroplastos não estavam deformados e possuíam tilacóides e grana bem organizados. (D) Cloroplastos de folhas de plantas crescidas com Al. Note a presença de pequenos grãos de amido (cabeça de seta). Barra de escala: 0,5  $\mu$ m.

#### 4. DISCUSSÃO

##### 4.1. Crescimento e desenvolvimento de plantas de *Q. grandiflora* na presença e ausência de Al

Alguns trabalhos analisaram a influência do Al no crescimento e desenvolvimento de *Q. grandiflora* (Araújo, 1984; Silva, 2012). No presente estudo, o foco foi colocado no tamanho do caule, raiz principal e conteúdo dos pigmentos fotossintetizantes. Além disso, todos os resultados até aqui mostraram que plantas crescidas com suplementação de Al respondem melhor que aquelas que não receberam este metal na solução nutritiva. Assim, plantas de *Q. grandiflora* crescidas na presença do Al apresentaram folhas verdes e viçosas e também caules e raízes principais bem desenvolvidos. É importante salientar que tanto o caule quanto a raiz principal das plantas crescidas com o metal foram significativamente maiores que aqueles do controle. Esses resultados sugerem que o Al tenha um valor nutricional para o crescimento e desenvolvimento dessa espécie acumuladora nativa do Cerrado.

Os efeitos benéficos do Al foram relatados no desenvolvimento de *M. albicans* e *V. thyrsoidea* (Machado, 1985; Haridasan, 1982; 1988). Nessas espécies nativas o Al estimulou o crescimento, além de favorecer a absorção de alguns nutrientes como Ca e Mg (Haridasan, 2008). Uma resposta semelhante ao Al foi descrita em *Melastoma malabathricum*, uma espécie hiperacumuladora presente em florestas tropicais na Ásia (Watanabe *et al.*, 1998). Em algumas plantas cultivadas também tem sido relatado o benefício do Al em baixas concentrações, como em trigo (Delhaize *et al.*, 1993), feijão (Zeffa *et al.*, 2011) e arroz (Zhao & Shen, 2013). De acordo com Hai *et al.* (1989), concentrações ideais de Al solubilizado pode ter um efeito estimulante no crescimento de muitas espécies cultivadas.

Como mencionado, o Al também induziu maior crescimento de *Q. grandiflora*. Aos 90 dias de cultivo tanto caules como raízes de plantas tratadas com Al foram respectivamente 16,8% e 32,5% maiores que aqueles do controle. Verifica-se que raízes (165,97 mm controle; 220,03 mm c/ Al) tiveram uma taxa de crescimento maior que caules (68,15mm controle; 79,61 mm c/ Al). O estímulo do Al ao crescimento radicular tem sido observado em várias espécies como em *M. malabathricum*, *H. macrophylla*, e *F. esculentum* (Osaki *et al.*, 1997). Adicionalmente, algumas espécies acumuladoras como *V. thyrsoidea* e *M. albicans* não crescem sem adição do Al em soluções nutritivas (Machado, 1985; Haridasan, 1988).

Matsumoto *et al.* (1976) mostraram que o acúmulo de Al em folhas de *C. sinensis* é um processo lento e pode não ter um papel fisiológico positivo no crescimento inicial da parte aérea. Além disso, os autores relataram que o aumento do crescimento da parte aérea pode depender em grande parte da função positiva do Al<sup>3+</sup> nas raízes (Matsumoto *et al.*, 1976). Os resultados obtidos com *Q. grandiflora* crescidas na ausência do Al são consistentes com o que foi

verificado em *C. sinensis* onde a redução do crescimento da parte aérea esteve relacionada com danos ocorridos nas raízes devido à falta do Al na solução nutritiva durante o seu crescimento. Além disso, os resultados obtidos comprovam que o Al não foi tóxico para *Q. grandiflora*, ao contrário, este elemento parece desempenhar uma importante função no crescimento e desenvolvimento dessa espécie.

#### 4.2. Efeito da presença e ausência de Al no conteúdo de pigmentos fotossintéticos em *Q. grandiflora*

A capacidade de adaptação das plantas a elevados teores de Al é uma característica genética que envolve mudanças estruturais e fisiológicas que habilitam essas plantas ao uso efetivo da radiação solar disponível na presença deste metal (Larcher, 2000). Os resultados referentes aos teores de pigmentos fotossintéticos em *Q. grandiflora* indicam que essa planta pode estar não somente adaptada para essas condições, mas requer este metal para o funcionamento de seu metabolismo. Como mostrado, os teores de pigmentos fotossintéticos foram significativamente mais elevados em plantas de *Q. grandiflora* tratadas com Al. Assim, o maior crescimento dessas plantas pode estar relacionado com a sua maior capacidade de produzir fotoassimilados. É fato que o crescimento e o desenvolvimento das plantas se relacionam à sua eficiência fotossintética, e que por sua vez está associada com, entre outros fatores, os teores de clorofila nas folhas (Almeida *et al.*, 2004). Teores de clorofila e carotenoides têm sido utilizados para estimar o potencial fotossintético das folhas, pois plantas com alto teor de clorofila são capazes de atingir taxas fotossintéticas mais altas, por terem um elevado potencial de captação de “quanta” por unidade de tempo (Porra *et al.*, 1989; Chappelle & Kim, 1992).

Outrossim, os teores de pigmentos foliares podem ser utilizados como parâmetros indicativos sobre a capacidade das plantas responderem ao Al (Rana & Aery, 1999). Em plantas sensíveis, a presença deste metal reduziu o teor total de clorofila como em *Citrus grandis* (L.) e *Sorghum bicolor* (L.) Moench (Ohki, 1985; Jiang *et al.*, 2008). Este tipo de resposta foi oposta àquela observada em *Q. grandiflora*, onde o nível de todos os pigmentos foi maior em plantas tratadas com Al, inclusive os teores de clorofila *a* e *b*. Semelhantemente, foi constatado que a presença de Al (300 µM) em *C. sinensis*, uma planta acumuladora do metal, aumentou a quantidade de clorofila em folhas jovens quando comparadas com plantas controle (Hajiboland *et al.*, 2013<sup>a</sup>).

A menor quantidade de clorofila e carotenoides nas plantas controle é consistente com os sinais de clorose presente no limbo foliar dessas plantas. Consequentemente, esse fato pode levar a uma redução da taxa fotossintética dessas plantas, resultando numa diminuição do seu crescimento e desenvolvimento (Grime, 1965; Kozlowski *et al.*, 1991). Em espécies sensíveis ao Al ocorre o oposto ao observado em plantas controle de *Q. grandiflora*. A exposição ao metal em plantas sensíveis resulta na redução das taxas fotossintéticas, assim como em danos aos cloroplastos (Chen *et al.*, 2005; Moustakas *et al.*, 1996; Konarska, 2010). Adicionalmente, em espinafre (*Spinacia oleracea*), a presença do Al no tecido foliar causa lesões nas membranas dos cloroplastos (Hampp & Schnabl, 1975). O mesmo resultado foi observado em tilacóides dos cloroplastos em folhas de trigo (Moustakas *et al.*, 1995). Dessa forma, além da redução dos teores de pigmentos fotossintéticos nas plantas controle de *Q. grandiflora*, a ausência do Al na solução nutritiva também pode estar associada às alterações ultraestruturais nos cloroplastos.

#### 4.3. Al e outros nutrientes em folha de *Q. grandiflora*

A análise de Al, Ca, Fe, Mg e P, via EDS, foi realizada com intuito de determinar a presença destes elementos na folha de *Q. grandiflora* de ambos os tratamentos. Essa análise mostrou que esses minerais foram incorporados nas paredes celulares das células do xilema e floema da nervura principal.

A quantificação da concentração de nutrientes minerais nas folhas de *Q. grandiflora* permitiu determinar se a presença ou ausência de Al interfere na absorção e distribuição de importantes elementos como Ca, Fe, Mg e P. Os efeitos do Al sobre a absorção de nutrientes pelas raízes, e as relações entre concentrações de alumínio e de nutrientes nas folhas, são variáveis entre as plantas, devido às diferenças nos mecanismos fisiológicos fundamentais à absorção de íons (Masunaga *et al.*, 1998; White, 2001).

Em plantas sensíveis ao Al, a limitação do crescimento pela toxicidade do Al pode estar relacionada a efeitos antagônicos do Al sobre a absorção de outros nutrientes (Marschner, 2002). O Al pode afetar negativamente a absorção, transporte e utilização de vários nutrientes em plantas sensíveis (Foy *et al.*, 1978). Por exemplo, ocorreu a diminuição da concentração de Ca em mudas de goiabeira (*Psidium guajava*) (Salvador *et al.*, 2000) e café (*Coffea arabica* L.) (Braccini *et al.*, 1998). Alguns genótipos de arroz, submetidos ao Al<sup>3+</sup> em sistemas hidropônicos,

também apresentaram uma redução na absorção de Ca, Mg e K (Freitas *et al.*, 2006). Adicionalmente, em diversas espécies de plantas, a presença de Al prejudicou a absorção de minerais como P, K, Ca, Fe, Mg, Zn, Cu e Na independentemente das condições de crescimento (Osaki *et al.*, 1998; 2003). Além disso, esses autores sugerem que uma espécie acumuladora de Al também tem capacidade limitada de acumulação de nutrientes minerais em suas folhas. Portanto, as espécies acumuladoras de Al podem ter desenvolvido mecanismos mais eficientes no uso desses nutrientes essenciais para o seu crescimento, embora ainda não foi oferecida uma explicação clara para essa hipótese.

No presente estudo, as concentrações foliares de Ca, Mg e P em *Q. grandiflora* não apresentaram diferenças significativas entre as plantas crescidas na presença e ausência de Al. Plantas acumuladoras de Al pertencentes à Rubiaceae também não apresentaram correlação significativa entre as concentrações foliares de Al e alguns elementos, como o Ca (Jansen *et al.*, 2003). Outros estudos mostraram que em algumas espécies acumuladoras de Al, a concentração de metal nas folhas correlaciona-se positivamente com o teor de outros elementos (Haridasan, 1982, 1987; Metali *et al.*, 2014). As concentrações foliares de Al e Ca, Mg e K são positivamente correlacionados em plantas acumuladoras nativas do Cerrado (Haridasan, 1982, 1987), enquanto que as concentrações foliares de Al e Ca, Mg, P, S e Si são positivamente correlacionados em acumuladoras na floresta tropical da Indonésia (Masunaga *et al.*, 1998). Metali *et al.* (2014) mostraram que a concentração foliar de Al foi positivamente associada com as concentrações de Ca e Mg foliares em árvores acumuladoras de Al.

Os resultados das concentrações foliares de Ca, Mg e P em *Q. grandiflora* corrobora com Haridasan (1982), que afirma que em espécies acumuladoras nativas do Cerrado, a absorção e a translocação de Al não afetam a absorção e o metabolismo de nutrientes como P, Ca, Mg e K (Medeiros & Haridasan, 1985).

Como observado, as plantas de *Q. grandiflora* suplementadas com Al apresentaram concentrações foliares de Fe significativamente menores comparado às plantas controle. Apesar do menor teor de Fe, não foram observados sintomas de deficiência de Fe em plantas suplementadas com o Al, como clorose internerval e crescimento reduzido (Morrissey & Guerinot, 2009).

Resultados semelhantes ao de *Q. grandiflora* foram observados em plantas de chá (Hajiboland *et al.*, 2013<sup>b</sup>). Esses autores mostraram que em plantas de *C. sinensis* expostas ao Al, menor concentração de Fe foi absorvida pelas raízes e quase três vezes menor concentração

de Fe acumulou nas folhas comparadas as plantas controle. No entanto, nessas plantas a principal forma de Al translocado via seiva do xilema é o complexo Al-citrato (Morita *et al.*, 2004). O citrato é também um importante ligante para o Fe em plantas (Curie *et al.*, 2009). Hajiboland *et al.* (2013<sup>b</sup>) concluíram que a concorrência entre Fe e Al para o citrato como um ligante no carregamento xilema e transporte de longa distância poderia ser responsável pelo menor acúmulo de Fe em folhas de plantas de chá expostos ao Al em comparação as plantas controle.

Também em *M. malabathricum*, a presença do Al mostrou uma relação antagonista com outros nutrientes, como o Fe (Osaki *et al.*, 2003). Adicionalmente, Watanabe *et al.* (2006) relatam que *M. malabathricum* desenvolveu mecanismos de tolerância interna ao Al e utiliza Al para reduzir a toxicidade ao Fe. Portanto, o Al é essencial para *M. malabathricum* quando cresce em solos sulfato ácido. Estudos têm mostrado uma grande variação nas espécies em relação à concentração de Fe e Al em plantas acumuladoras. Por exemplo, altas concentrações de Fe em relação ao Al foram verificadas em samambaias da Venezuela acumuladoras de Al (Olivares *et al.*, 2009). Contudo, nenhuma correlação foi encontrada entre Al e Fe em três espécies de *Symplocos*, acumuladoras de Al (Schmitt *et al.*, 2016).

Sugere-se que em plantas de *Q. grandiflora* suplementadas com o Al, a presença do metal interfere na absorção e transporte de Fe para as partes aéreas. Porém, mais estudos são necessários a fim de investigar a relação da concentração foliar de Fe e o Al nessa espécie nativa do Cerrado.

#### 4.3.1. Concentração de Al em folhas e sementes de *Q. grandiflora*

Haridasan (1982) relatou que várias espécies nativas do Cerrado acumulam altas concentrações de Al em suas folhas, dentre elas a *Q. grandiflora*. A análise comparativa entre plantas suplementadas com o metal e plantas controle mostrou que a concentração foliar de Al foi menor em plantas do tratamento Al. Como observado, os valores foram estimados em 2505 (mg/kg) e 3772 (mg/kg).

Os resultados morfológicos demonstraram ainda que plantas submetidas ao Al apresentaram melhor desenvolvimento e crescimento da raiz principal e caule. Silva (2012) também mostrou que na presença do Al, a biomassa foi significativamente maior em plântulas de *Q. grandiflora*. Portanto, sugere-se que as plantas suplementadas com Al apresentaram menor

concentração foliar do metal devido a maior redistribuição do Al nas células, isto é menor teor do metal por unidade de massa, visto que essas plantas possuem maior biomassa e consecutivamente maior área tanto da parte radicular quanto aérea.

É fato que o Al está redistribuído em todos os órgãos da planta. No entanto, de acordo com Hutchinson (1943), o Al acumula preferencialmente no sistema radicular das plantas, sendo que menor quantidade é translocado para a parte aérea, como ocorre em *Fagopyrum esculentum* (Shen & Ma, 2001). Xu *et al.* (2016) também mostraram que em uma variedade de *C. sinensis* submetidas ao Al (0,8 e 1,6 mM), a concentração do metal (mg/kg) nas raízes foi significativamente maior comparada à concentração no tecido foliar. Adicionalmente, Tolrà *et al.* (2005) relataram maior acúmulo de Al em raízes (1170 µg/g) comparado à parte aérea (275 µg/g) em plantas de *Rumex acetosa*.

Outrossim, os dados morfológicos mostraram que as raízes de *Q. grandiflora* tiveram a taxa de crescimento maior que caules. Contudo, sugere-se que grande parte do acúmulo do Al suplementado nas plantas esteja presente nas raízes, tanto por ser o primeiro contato com o metal quanto devido o maior desenvolvimento desse órgão. Porém, mais estudos são necessários a fim de investigar a concentração radicular de Al nessa espécie.

Os resultados mostraram que as sementes de *Q. grandiflora* apresentaram altos teores de Al, estimado em 6475 (mg/kg). Haridasan (1987) também encontrou altas concentrações do metal nas sementes de outras espécies acumuladoras do Cerrado, incluindo *Q. parviflora* (4800 mg/kg) e *M. albicans* (6900 mg/kg). A detecção do Al nas plantas de *Q. grandiflora* crescidas sem a suplementação do metal pode ser explicada pela translocação e redistribuição desse elemento para a parte aérea, em decorrência do alto teor nas reservas da semente. Da mesma forma, Machado (1985) verificou que o Al presente nas extremidades das raízes de *V. thyrsoidea* crescidas na ausência de Al é transportado a partir das reservas das sementes.

#### 4.4. Ultraestrutura dos cloroplastos da lâmina foliar de *Q. grandiflora*

Estudos têm mostrado alterações na ultraestrutura de cloroplastos em função de vários tipos de estresses, como por exemplo, em condições de deficiência de minerais essenciais (Hall *et al.*, 1972; Izaguirre-Mayoral & Sinclair, 2005; Chen *et al.*, 2008). A deficiência de nutrientes em *Zea mays* (Hall *et al.*, 1972), *Glycine max* (Izaguirre-Mayoral & Sinclair, 2005) e *Oriza*

*sativa* (Chen *et al.*, 2008) resultou na ruptura da membrana do envelope do plastídio, dilatação do espaço intratilacoidal e aumento do número de plastoglóbulos (Solymosi & Bertrand, 2012). Além disso, plantas de arroz submetidas a estresse salino apresentaram cloroplastos arredondados e redução da integridade da membrana externa e das membranas dos tilacóides (Flowers *et al.*, 1985; Borges *et al.*, 2004). Também, condições de estresse hídrico em plantas de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) afetou profundamente a estrutura dos tilacóides dos cloroplastos (Vieira da Silva *et al.*, 1974).

Como descrito, a integridade dos cloroplastos das folhas de *Q. grandiflora* foi comprometida drasticamente pela ausência de Al na solução nutritiva. Essas anormalidades foram observadas tanto em cloroplastos da lâmina foliar sem sinais de clorose quanto naqueles de regiões com clorose avançada.

A presença de Al em tecidos foliares de plantas sensíveis provoca vários distúrbios, entre eles estão alterações na estrutura e o funcionamento de muitas organelas celulares (Konarska, 2010). Entre todas as organelas, os cloroplastos aparecem como estruturas chave devido à síntese de matéria orgânica e produção de biomassa (Solymosi & Bertrand, 2012). Com isso, a deficiência ou o excesso de Al nas plantas pode provocar alterações na ultraestrutura dos cloroplastos e pode estar associada com danos metabólicos e moleculares (Solymosi & Bertrand, 2012). No entanto, pouca atenção tem sido dada aos efeitos do Al nessas organelas devido à baixa mobilidade deste metal para a parte aérea da planta (Moustakas *et al.*, 1996; Konarska, 2010; Li & Xing, 2011).

É importante dizer que as alterações na estrutura dos cloroplastos de *Q. grandiflora*, em decorrência da falta de Al durante o seu crescimento, encontra eco em outras espécies submetidas a outros tipos de estresses. Assim, plantas de milho (Thoiron *et al.*, 1997) apresentaram cloroplastos com tilacóides desorganizados, com dilatações do espaço intratilacoidal e ausência de grana devido a deficiência de Fe. Semelhantes, as mesmas características em arroz foram relacionadas à deficiência de Zn (Chen *et al.*, 2008) e em soja (Izaguirre-Mayoral & Sinclair, 2005) e espinafre (Possingham *et al.*, 1964) relacionadas a deficiência de Mn. Essas anormalidades presentes em cloroplastos foram relacionadas ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que causam graves danos oxidativos nas células (Choudhury & Panda, 2005).

Adicionalmente, em *Q. grandiflora* foi observada maior frequência de plastoglóbulos nos cloroplastos de plantas controle. Os plastoglóbulos são partículas lipoproteicas localizadas nos cloroplastos. O incremento desses componentes nos cloroplastos está relacionado com o aumento do estresse oxidativo no aparato fotossintético, em função da atuação de compostos



como carotenoides, plastoquinonas e tocoferol (vitamina E) (Austin *et al.*, 2006). Esses compostos atuam na proteção do aparato fotossintético contra a ação dos radicais livres (Austin *et al.*, 2006). O estresse causado pela deficiência de minerais essenciais ocasiona o aumento de plastoglobulos em trigo (Hall *et al.*, 1972), soja (Weiland *et al.*, 1975) e arroz (Chen *et al.*, 2008). Assim, a presença desses glóbulos lipoproteicos em plantas controle de *Q. grandiflora* sugere que essas plantas estão sob deficiência nutricional. Adicionalmente, esse fato pode indicar que esses cloroplastos respondem à falta da suplementação do Al de forma similar que outras plantas respondem a estresses relacionados a deficiências de minerais essenciais.

Com relação ao acúmulo de grãos de amido em *Q. grandiflora*, verificou-se que estes compostos somente foram observados em cloroplastos de regiões foliares verdes de folhas do tratamento controle e naqueles de plantas tratadas com Al. Este fato pode estar associado com a integridade do aparelho fotossintético das folhas. É sabido que o conteúdo de pigmentos fotossintéticos foi significativamente menor em folhas de *Q. grandiflora* não tratadas com Al. Em adição, os cloroplastos de regiões totalmente cloróticas e mesmo aqueles de regiões não cloróticas apresentaram anormalidades quando comparados com os de plantas suplementadas com Al. Pode-se então inferir que a ausência de suplementação com Al durante o desenvolvimento das plantas foi prejudicial para o processo de fotossíntese nessa espécie.

O acúmulo de amido em cloroplasto é considerado um evento temporário, visto que a função primária dessas organelas não é acumular reserva. Este tipo de amido é chamado de “amido primário” e é resultante direto da atividade fotossintética do cloroplasto, sendo degradado durante a noite e levado a diferentes órgãos e usado como fonte de energia para o crescimento (Sparla *et al.*, 2006). Assim, a presença de grãos de amido e a integridade do aparelho fotossintético em plantas de *Q. grandiflora* suplementadas com Al são consistentes com o maior conteúdo de pigmentos fotossintetizantes e consecutivamente com o melhor crescimento e desenvolvimento dessas plantas.

Os resultados da análise ultraestrutural corroboram com Andrade *et al.* (2011), onde relataram que a presença do Al nos cloroplastos de *Q. grandiflora* não apresentaram sinais de toxicidade para essas organelas. Além disso, o presente estudo mostrou que a ausência do metal durante o desenvolvimento das plantas resultou na desintegração progressiva dos cloroplastos, o que pode indicar um prejuízo no processo de fotossíntese dessas plantas. Contudo, é fato que durante o desenvolvimento, o Al é essencial para a manutenção da atividade fotossintética e é um elemento indispensável para o crescimento de plantas dessa espécie hiperacumuladora.

## 5. CONCLUSÕES

- O crescimento de *Q. grandiflora* foi menor e significativamente afetado nas plantas não tratadas com Al;
- A ausência da suplementação de Al durante o desenvolvimento das plantas reduziu significativamente os teores de pigmentos fotossintéticos;
- A concentração foliar de Ca, Mg e P não apresentou diferença significativa entre os tratamentos. No entanto, a concentração do Fe nas plantas suplementadas com Al foi menor em relação às plantas controle;
- O alto teor de Al nas sementes indica que a mobilização deste metal pode ocorrer durante a germinação;
- O teor foliar de Al foi menor nas plantas suplementadas com o metal em comparação com as plantas controle. Sugere-se que essa menor concentração seja devido a maior área ocupada pelo metal, já que as plantas tratadas apresentaram um melhor desenvolvimento e maior comprimento da raiz principal e caule;
- As micrografias de transmissão revelaram a desintegração progressiva dos cloroplastos das plantas controle (com e sem clorose), o que indica prejuízo do processo de fotossíntese nessas plantas;
- Os resultados mostraram que o Al é um elemento importante para o funcionamento do aparato fotossintético e consecutivamente para o crescimento e desenvolvimento das plantas de *Q. grandiflora*.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHN, S.J.; SIVAGURU, M.; OSAWA, H.; CHUNG, G.P. & MATSUMOTO, H. 2001. Aluminum inhibits the H<sup>+</sup>-ATPase activity by permanently altering the plasma membrane surface potentials in squash roots. *Journal of Plant Physiology*, 126: 1381-1390.
- ALMEIDA, L.P. de, ALVARENGA, A.A. de; CASTRO, E.M. de; ZANELA, S.M. & VIEIRA, C.V. 2004. Crescimento inicial de plantas de *Cryptocaria aschersoniana* Mez. submetidas a níveis de radiação solar. *Revista Ciência Rural*, 34: 83- 88.
- ALMEIDA JÚNIOR, A.B.; OLIVEIRA, F.A. DE; MEDEIROS, J.F. DE; OLIVEIRA, M.K.T. & LINHARES, P.C.F. 2009. Efeito de doses de fósforo no desenvolvimento inicial da mamoneira. *Revista Caatinga*, 22: 217-221.
- ANDRADE, L.R.M. de; BARROS, L.M.G.; ECHEVARRIA, G.F.; AMARAL, L.I.V., COTTA, M.G., ROSSATTO, D.R.; HARIDASAN, M. & FRANCO, A.C. 2011. Al-hyperaccumulator Vochysiaceae from the Brazilian Cerrado store aluminum in their chloroplasts without apparent damage. *Environmental and Experimental Botany*. 70: 37-42.
- ANDREW, C.S. & VAN DER BERG, P.J. 1973. The influence of aluminum on phosphate sorption by whole plants and excised roots of some pasture legumes. *Plant and Soil*, 24: 351-349.
- ARAÚJO, G. M. 1984. Comparação do estado nutricional de dois Cerradões em solos distróficos e mesotrófico no Planalto central do Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília. 130p.
- AUSTIN, J.R.; FROST, E.; VIDY, P.A.; KESSLER, F. & STAEHELIN, L.A. 2006. Plastoglobules are lipoprotein subcompartments of the chloroplast that are permanently coupled to thylakoid membranes and contains biosynthetic enzymes. *The Plant Cell*, 18: 1693-1703.
- BARCELÓ, J. & POSCHENRIEDER, C. 2002. Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. *Environmental and Experimental Botany*. 48: 75-92.

- BENIN, G.; CARVALHO, F.I.F. de; OLIVEIRA, A.C; SILVA, J.A.G. da; LORENCETTI, C.; MAIA, M.B.; MARCHIORO, V.S.; FREITAS, F. & HARTWIG, I. 2004. Uma proposta de seleção para caracteres quantitativos e qualitativos em aveia. *Ciência Rural*, 34: 701-706.
- BERTAN, I.; CARVALHO, F. I. F. de; OLIVEIRA, A.C. SILVA, J.A.G. da; BENIN, G.; VIEIRA, E.A.; SILVA, G.O. da; HARTWIG, I.; VALÉRIO, I.P. & FINATTO, T. 2006. Dissimilaridade genética entre genótipos de trigo avaliados em cultivo hidropônico sob estresse por alumínio. *Bragantia*, 65: 55-63.
- BORGES, R.; MIGUEL, E.C.; DIAS, J.M.R.; CUNHA, M.; BRESSAN-SMITH, R.E.; OLIVEIRA, J.G. & SOUZA FILHO, G.A. 2004. Ultrastructural, physiological and biochemical analyses of chlorate toxicity on rice seedlings. *Plant Science*, 166: 1057-1062.
- BOSCO, M. R. O.; OLIVEIRA, A. B. O.; HERNANDEZ, F. F. F. & LACERDA, C. F. 2009. Influência do estresse salino na composição mineral da berinjela. *Revista Ciência Agronômica*, 40: 157-164.
- BRACCINI, M.C.L.; MARTINEZ, H.E.P.; PEREIRA, P.R.G.; SAMPAIO, N.F. & PEREIRA, A.A. 1998. Tolerância de genótipos de cafeeiro ao alumínio em solução nutritiva. II. Teores de P, Ca e Al e eficiência ao P e Ca. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 22: 443-450.
- BRAGA, J.M. & DEFELIPO, B.V. 1974. Determinação espectrofotométrica do fósforo em extrato de solo e plantas. *Revista Ceres*, 21: 73-85.
- BRESSAN, A.C.G. Espectros de raios-x em MEV indicam associação entre Al e Si em plantas acumuladoras de Al do Cerrado. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2014.
- CHAPPELLE, E.W. & KIM, M.S. 1992. Ratio analysis of reflectance spectra (RARS): an algorithm for a remote estimation of the concentrations of chlorophyll A, chlorophyll B, and carotenoids in soybean leaves. *Remote Sensing of Environment*, 39: 239-247.
- CHEN, L.S.; QI, Y.P.; LIU, X.H. 2005. Effects of aluminum on light energy utilization and photoprotective systems in citrus leaves. *Annals of Botany*, 96: 35-41.

- CHEN, W.; YANG, X.; HE, Z.; FENG, Y. & HU, F. 2008. Differential changes in photosynthetic capacity, 77 K chlorophyll fluorescence and chloroplast ultrastructure between Zn-efficient and Zn-inefficient rice genotypes (*Oryza sativa*) under low zinc stress. *Physiologia Plantarum*, 132: 89–101.
- CHOUDHURY, S. & PANDA, S.K. 2005. Toxic effects, oxidative stress and ultrastructural changes in moss *Taxithelium nepalense* (Schwaegr.) Broth. under chromium and lead phytotoxicity. *Water, Air, Soil Pollution* 167: 73-90.
- CURIE, C.; CASSIN, G.; COUCH, D.; DIVOL, F.; HIGUCHI, K.; LE JEAN, M.; MISSON, J.; SCHIKORA, A.; CZERNIC, P. & MARI, S. 2009. Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Annals of Botany*, 103: 1-11.
- DELHAIZE, E.; RYAN, P.R. & RANDALL, P.J. 1993. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum*) L. II. Aluminum stimulated excretion of malic acid from root apices. *Journal Plant Physiology*, 103: 695–702.
- DUARTE, L.C.; JUCHEM, P.L; PULZ, G.M.; DE BRUM, T.M.M.; CHODUR, N.; LICCARDO, A.; FISCHER, A.C. & ACAUAN, R.B. 2003. Aplicações de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Sistema de Energia Dispersiva (EDS) no Estudo de Gemas: exemplos brasileiros. *Pesquisas em Geociências*, 30: 3-15.
- FAGERIA, N. K.; WRIGHT, R. J. & BALIGAR, V. C. 1988. Rice cultivar response to aluminium in nutrient solution. *Journal Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 9: 1133-1142.
- FLOWERS, T.J.; DUQUE, E.; HAJIBAGHERI, M.A.; MCGONIGLE, T.P. & YEO, A.R. 1985. The effect of salinity on leaf ultrastructure and net photosynthesis of two varieties of rice: Further evidence for a cellular component of salt-resistance. *New Phytologist*, 100: 37-43.
- FREITAS, F.A.; KOPP, M.M.; SOUSA, R.O.; ZIMMER, P.D.; CARVALHO, F.I.F.; OLIVEIRA, A.C. 2006. Absorção de P, Mg, Ca e K e tolerância de genótipos de arroz submetidos a estresse por alumínio em sistemas hidropônicos. *Ciência Rural*, 36: 72-79.
- FOY, C. D. Effects of aluminum on plant growth. In: CARSON, E.W. (Ed.). *The plant root and its environment*. Charlottesville: Univ. of Virginia, 1974. p. 601-642.

- FOY, C.D.; CHANEY, R.L. & WHITE, M.C. 1978. The physiology of metal toxicity in plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 29: 511-56.
- GALLETI, S. R. 2003. Introdução à Microscopia Eletrônica. *Biológico*, São Paulo. 65: 33-35.
- GRIME, J.P. 1965. Shade tolerance in flowering plants. *Nature*, 208: 161-163.
- GRIMSTONE, A.V. O microscópio Eletrônico em Biologia. São Paulo: EPU- Da Universidade de São Paulo, 1980. 70 p.
- GOODLAND, R. Oligotrofismo e alumínio no Cerrado. P.44-60 in III Simpósio sobre o Cerrado. Ed da Universidade de São Paulo e Ed. Edgard Blücher. 239 p. 1971.
- HALL, J.D.; BARR, R.; AL-ABBAS, A.H.; CRANE, F.L. 1972. The ultrastructure of chloroplasts in mineral-deficient maize leaves. *Plant Physiology*, 50:404–409.
- HAJIBOLAND, R.; RAD, S.B; BARCELÓ, J & POSCHENRIEDER, C. 2013<sup>a</sup>. Mechanisms of aluminum-induced growth stimulation in tea (*Camellia sinensis*). *J. Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 176: 616–625.
- HAJIBOLAND, R.; BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. & TOLRÀ, R. 2013<sup>b</sup>. Amelioration of iron toxicity: A mechanism for aluminum-induced growth stimulation in tea plants. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 128: 183–187.
- HAMPP, H. & SCHNABL, H. 1975. Effect of aluminum ions on <sup>14</sup>C<sub>2</sub>-fixation and membrane system of isolated spinach chloroplast. *Z. Pflanzenphysiologie*, 76: 300-306.
- HARIDASAN, M. 2008. Nutritional adaptations of native plants of the Cerrado biome in acid soils. Review: *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 20: 183-195.
- HARIDASAN, M. 1988. Performance of *Miconia albicans* (Sw.) Triana, an aluminium-accumulating species in acidic and calcareous soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 19: 1091-1103.

- HARIDASAN, M. 1987. Distribution and mineral nutrition of aluminium-accumulating species in different plant communities of the cerrado region of Central Brazil. In: San José JJ, Montes R (eds), *La capacidad bioproductiva de sabanas*. pp.309-348. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas.
- HARIDASAN, M. 1982. Aluminium accumulation by some Cerrado native species of central Brazil. *Plant and Soil*, 65: 265-273.
- HARIDASAN, M. & ARAÚJO, G. M. 1988. Aluminium-accumulating species in two forest communities in the Cerrado region of central Brazil. *Forest Ecology and Management*, 24: 15-26.
- HARIDASAN, M.; HILL, P.G. & RUSSELL, D. 1987. Semiquantitative estimates of Al and other cations in the leaf tissues of some Al-accumulating species using electron probe microanalysis. *Plant and Soil*, 104: 99-102.
- HUANG, J.W.; PELLET, D.M.; PAPERNIK, L.A. & KOCHIAN, L.V. 1996. Aluminum interactions with voltage-dependent calcium transport in plasma membrane vesicles isolated from roots of aluminum-sensitive and resistant wheat cultivars. *Plant Physiology*, 110: 561-569.
- HUTCHINSON, G.E. 1943. The biogeochemistry of aluminium and of certain related elements. *Quarterly Review of Biology*, 18: 1-29.
- IKEDA, H. & TADANO, T. 1993. Ultrastructural changes of the root tip cells in barley induced by a comparatively low concentration of aluminum. *Soil Science and Plant Nutrition*, 39: 109-117.
- 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. *Annals of Botany*, 96:149–158.
- JANSEN, S.; BROADLEY, M.; ROBBRECHT, E. & SMETS, E. 2002. Aluminium hyperaccumulation in angiosperms: a review of its phylogenetic significance. *Botanical Review*, 68: 235-269.

- JANSEN, S.; WATANABE, T.; DESSEIN, S.; SMETS, E. & ROBBRECHT, E. 2003. A comparative study of metal levels of some Al-accumulating Rubiaceae. *Annals of Botany*, 91: 657–663.
- JIANG, H.; CHEN, L.; ZHENG, J.; HAN, S.; TANG, N & SMITH, R. 2008. Aluminum-induced effects on Photosystem II photochemistry in *Citrus* leaves assessed by the chlorophyll a fluorescence transient. *Tree Physiology*, 28: 1863-1871.
- KINRAIDE, T.B. & PARKER, D.R. 1990. Apparent phytotoxicity of mononuclear hydroxy aluminium to four dicotyledonous species. *Physiologia Plantarum*, 79: 283–288.
- KIRKBY, E. A. & RÖMHELD, V. 2007. Micronutrientes na fisiologia de plantas: Funções, absorção e mobilidade. International Plant Nutrition Institute. Informações agronômicas N° 118.
- KOCHIAN, L.V. 1995. Cellular mechanism of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48: 237-260.
- KOCHIAN, L.V.; PENCE, N.S.; LETHAM, D.L.D.; PINEROS, M.A.; MAGALHAES, J.V.; HOEKENGA, O.A. & GARVIN, D.F. 2002. Mechanisms of metal resistance in plants: aluminum and heavy metals. *Plant and Soil*, 247: 109-119.
- KONARSKA, A. 2010. Effects of aluminum on growth and structure of red pepper (*Capsicum annuum* L.) leaves. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32:145–151.
- KOZLOWSKI, T. T.; KRAMER, P. J. & PALLARDY, S. G. 1991. The physiological ecology of woody plants. San Diego: Academic Press. 657 p.
- LARCHER, W. *Ecofisiologia vegetal*. São Carlos: RIMA, 2000. 531 p.
- LI, C.; XU, H.; XU, J.; CHUN, X. & NI, D. 2011. Effects of aluminium on ultrastructure and antioxidant activity in leaves of tea plant. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33:973–978.
- LI, Z. & XING, D. 2011. Mechanistic study of mitochondria-dependent programmed cell death induced by aluminium phytotoxicity using fluorescence techniques. *Journal of Experimental Botany*, 62: 331–343.



- LIAO, H.; WAN, H.; SHAFF, J.; WANG, X.; YAN, X.; KOCHIAN, L. 2006. Phosphorus and aluminum interactions in soybean in relation to aluminum tolerance. Exudation of specific organic acids from different regions of the intact root system. *Plant Physiology*, 141: 674-684.
- MACHADO, J.W.B. Acumulação de alumínio em *Vochysia thyrsoidea* Pohl. Dissertação (Mestrado). Brasília, 1985. 104p. Universidade de Brasília.
- MALAVOLTA, E.; CHAVES, L.; TONIN, G.S. & SOUZA, A.F. 1976. Deficiências de macronutrientes na soja (*Glycine max* L. Merrill, var. IAC-2). *Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"*, 33: 471-477.
- MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants, San Diego. Academic Press, 2002. 889p.
- MASUNAGA, T.; KUBOTA, D.; HOTTA, M. & WAKATSUKI, T. 1998. Mineral composition of leaves and bark in aluminium accumulators in a tropical rain forest in Indonesia. *Soil Science and Plant Nutrition*, 44: 347-358.
- MATSUMOTO, H.; HIRASAWA, E.; MORIMURA, S. & TAKAHASHI, E. 1976. Localization of aluminium in tea leaves. *Journal Plant & Cell Physiology*, 17: 627-631.
- MEDEIROS, R.A. & HARIDASAN, M. 1985. Seasonal variations in the foliar concentrations of nutrients in some aluminum accumulating and non-accumulating species of the Cerrado region of central Brazil. *Plant and Soil*, 88: 433-436.
- MENGEL, K. & KIRKBY, E.A. Principles of plant nutrition. 5ed. Dordrechth: Kluwer Academic Publishers, 2001. 849p.
- METALI, F.; SALIM, K.A.; TENNAKOON, K. & BURSLEM, D.F.R.P. 2014. Controls on foliar nutrient and aluminium concentrations in a tropical tree flora: phylogeny, soil chemistry and interactions among elements. *New Phytologist*, 205: 280-292.
- MORITA, A.; HORIE, H.; FUJII, Y.; TAKATSU, S.; WATANAB, N.; YAGI, A.; YOKOTA, H. 2004. Chemical forms of aluminum in xylem sap of tea plants (*Camellia sinensis* L.). *Phytochemistry*, 65: 2775-2780.

- MORRISSEY, J. & GUERINOT, M.L. 2009. Iron uptake and transport in plants: the good, the bad, and the ionome. *Chemical Reviews*, 109: 4553–4567.
- MOUSTAKAS, M.; OUZOUNIDOU, G. & LANNOYE, R. 1995. Aluminum effects on photosynthesis and elemental uptake in an aluminum-tolerant and non-tolerant wheat cultivars. *Journal of Plant Nutrition*, 18: 669-683.
- MOUSTAKAS, M.; OUZOUNIDOU, G.; ELEFThERIOU, E.P. & LANNOYE, R. 1996. Indirect effects of aluminium stress on the function of the photosynthetic apparatus. *Plant Physiology and Biochemistry*, 34: 553–560.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Journal Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- OHKI, K. 1985. Photosynthesis, chlorophyll, and transpiration responses in aluminum stressed wheat and sorghum. *Crop Science*, 26: 572-575.
- OLIVARES, E.; PENA, E.; MARCANO, E.; MOSTACERO, J.; AGUIAR, G.; BENITEZ, M. & RENGIFO, E. 2009. Aluminum accumulation and its relationship with mineral plant nutrients in 12 pteridophytes from Venezuela. *Environmental and Experimental Botany*, 65: 132–141.
- OSAKI, M.; WATANABE, T. & TADANO, T. 1997. Beneficial effect of aluminum on growth of plants adapted to low pH soils. *Soil Science and Plant Nutrition*, 43: 551-563.
- OSAKI, M.; WATANABE, T.; ISHIZAWA, T.; NILNOND, C.; NUYIM, T.; SITTIBUSH, C. & TADANO, T. 1998. Nutritional characteristics in leaves of native plants grown in acid sulfate, peat, sandy podzolic, and saline soils distributed in peninsular Thailand. *Plant and Soil*, 201: 175-182.
- OSAKI, M.; WATANABE, T.; ISHIZAWA, T.; NILNOND, C.; NUYIM, T.; SHINANO, T.; URAYAMA, M. & TUAH, S.J. 2003. Nutritional characteristics of the leaves of native plants growing in adverse soils of humid tropical Lowlands. *Plant Foods for Human Nutrition*, 58: 93–115.

- PORRA, R.J.; THOMPSON, W.A. & KRIDEMANN, 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. *Biochimica et Biophysica Acta*, 975: 384-394.
- POSSINGHAM, J.V.; VESK, M. & MERCER, F.V. 1964. The fine structure of leaf cells of manganese-deficient spinach. *Journal of Ultrastructure Research*, 11: 68–83.
- RANA, D. K. & AERY, N. C. 1999. Effect of aluminium stress on the biochemical constituents during early seedling growth of mustard. *Bionature*, 19: 47-50.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F. & EICHHORN, S.E. *Biologia Vegetal*. 7ed. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2007.
- RODRIGUES, S.D. Análise de crescimento de plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) submetidas à carências nutricionais. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Prof. Júlio de Mesquita Filho, 1982.
- ROSA, A.T. Caracterização por microscopia eletrônica de transmissão e microanálise com raios-x de filmes dielétricos crescidos termicamente sobre carbeto de silício. Trabalho de Conclusão de Curso. Porto Alegre, 2008.
- SALVADOR, J. O.; MOREIRA, A.; MALAVOLTA, E. & CABRAL, C. P. 2000. Influência do alumínio no crescimento e na acumulação de nutrientes em mudas de goiabeira. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 24:787-796.
- SARRUGE, J.R. & HAAG, H.P. Análise química de plantas. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 56p. 1974.
- SCHMIDKE, I. & STEPHAN, U.W. 1995. Transport of metal micronutrients in the phloem of castor bean (*Ricinus communis*) seedlings. *Physiologia Plantarum*, 95: 147-153.
- SCHMITT, M.; BORAS, S.; TJOA, A.; WATANABE, T. & JANSEN, S. 2016. Aluminium accumulation and intra-tree distribution patterns in three *Arbor aluminosa* (*Symplocos*) species from Central Sulawesi. *PLoS ONE*, 11: 1-18.

- SHEN, R. & J.F. MA. 2001. Distribution and mobility of aluminium in an Al-accumulating plant, *Fagopyrum esculentum* Moench. *Journal of Experimental Botany*, 52: 1683-1687.
- SPARLA, F.; COSTA A.; SCHIAVO F. L.; PUPILLO P. & TROSTREDOX P. 2006. Regulation of a novel plastid-targeted  $\beta$ -amylase of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 141: 840-850.
- SILVA, R.C.C. Aspectos fisiológicos, fitoquímicos e proteômicos de *Qualea grandiflora* Mart. em resposta ao alumínio. Dissertação (Mestrado). Brasília, 2012. 152p. Universidade de Brasília.
- SILVA, J. B. C.; GIORDANO, L. de B.; BOITEUX, L.; LOPES, C. A.; FRANÇA, F. H.; SANTOS, J. R. M.; FURUMOTO, O.; FONTES, R. R.; MAROUELLI, W. A.; NASCIMENTO, W. M.; SILVA, W. L. C. & PEREIRA, W. Cultivo do tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) para industrialização. Brasília, DF: Embrapa-CNPQ, 1994. 36 p. (Embrapa-CNPQ. Instruções Técnicas, 12).
- SOLYMOSI, K. & BERTRAND, M. 2012. Soil metals, chloroplasts, and secure crop production: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 32: 245-272.
- SOUZA, W.; HADDAD, A.; SESSO, A.; SILVEIRA, M.; ORTRUD, M.B.; MACHADO R.D. & SOUTO-PADRÓNT. Manual sobre técnicas básicas de microscopia eletrônica. Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica. 1: 105p. 1989.
- HAI, T.V.; NGA, T.T. & LAUDELOUT, H. 1989. Effect of aluminium on the mineral nutrition of rice. *Plant and Soil*, 114: 173–185.
- THOIRON, S.; PASCAL, N. & BRIAT, J-F. 1997. Impact of iron deficiency and iron re-supply during the early stages of vegetative development in maize (*Zea mays* L). *Plant, Cell & Environment*, 20: 1051–1060.
- TOLRÀ, R.P.; POSCHENRIEDER, C.; LUPPI, B & BARCELO, J. 2005. Aluminium-induced changes in the profiles of both organic acids and phenolic substances underlie Al tolerance in *Rumex acetosa* L. *Environmental and Experimental Botany*, 54: 231–238.

- VANCE C.P.; UHDE-STONE, C. & ALLAN, D.L. 2003. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist*, 157: 423-447.
- VIEIRA DA SILVA, J.; NAYLOR, A.W. & KRAMER, P. 1974. Some ultrastructural and enzymatic effects of water stress in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71: 3243-3247.
- XU, Q.; WANG, Y.; DING, Z.; SONG, L. LI, Y.; MA, D.; WANG, Y.; SHEN, J.; JIA, S.; SUN, H. & ZHANG, H. Aluminum induced metabolic responses in two tea cultivars. 2016. *Plant Physiology and Biochemistry*, 101: 162-172.
- WATANABE, T.; JANSEN, S. & OSAKI, M. 2006. Al-Fe interactions and growth enhancement in *Melastoma malabathricum* and *Miscanthus sinensis* dominating acid sulphate soils. *Plant, Cell and Environment*, 29: 2124-2132.
- WATANABE, T., OSAKI, M., YOSHIHARA, T. & TADANO, T. 1998. Distribution and chemical speciation of aluminum in the Al accumulator plant, *Melastoma malabathricum* L. *Plant Soil*, 201: 165-173.
- WELLBURN, A.R. 1994. 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.
- WEILAND, R.T.; NOBLE, R.D. & CRANG, R.E. 1975. Photosynthetic and chloroplast ultrastructural consequences of manganese deficiency in soybean. *American Journal of Botany*, 62:501-508.
- WHITE, P.J. 2001. The pathways of calcium movement to the xylem. *Plant and Soil*, 248: 257-268.
- ZEFFA, D.M.; FILHO, R.S.; MODA-CIRINO, V. & PAVAN, M.A. 2011. Variabilidade genética para tolerância à toxidez de alumínio em cultivares e linhagens promissoras de feijão. *UNOPAR Científica Ciências Exatas e Tecnológicas*, 10: 21-28.
- ZHAO, X.Q. & SHEN, R.F. 2013. Interactive regulation of nitrogen and aluminum in rice. *Plant Signaling & Behavior*, 8: 69-77.

**CAPÍTULO II: Efeitos da presença e ausência de Al no metabolismo de *Qualea grandiflora* Mart.**

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. O alumínio nas plantas

O alumínio é o terceiro elemento mineral mais abundante no solo (Jansen *et al.*, 2002). Em solos ácidos ( $\text{pH} < 5,5$ ), o Al solubilizado se torna disponível para as plantas sob a forma de  $\text{Al}^{3+}$ , sendo que esta é considerada a espécie mais fitotóxica e danosa para espécies vegetais sensíveis ao metal (Kochian, 1995; Kochian *et al.*, 2004). Cerca de 40% das terras potencialmente agriculturáveis de todo o mundo são ácidas, o que é limitante da produtividade agrícola mundial (Zhang *et al.*, 2007).

O  $\text{Al}^{3+}$ , em plantas sensíveis, inibe o crescimento radicular e resulta na alteração da arquitetura e interrompe o alongamento da raiz (Clarkson, 1965; Munns, 1965). Consequentemente, esses efeitos diminuem grandemente a absorção e o aproveitamento de água pelo sistema radicular, induzindo o aparecimento de deficiências de nutrientes minerais (Foy *et al.*, 1978). Além disso, o Al induz a produção de espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species* - ROS) devido ao estresse. Estes ROS são neutralizados por um sistema enzimático antioxidante, pois estes compostos podem causar sérios danos a importantes biomoléculas, como lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos e pigmentos fotossintetizantes (Minocha *et al.*, 1992; Mittler, 2002; Boscolo *et al.*, 2003).

Algumas espécies de plantas desenvolveram mecanismos de resistência ou tolerância ao metal (Barceló & Poschenrieder, 2002; Kochian *et al.*, 2004). Nas espécies resistentes, o Al pode se ligar na parede celular através da substituição de  $\text{Ca}^{2+}$ , e secreções nas raízes aumentam o pH da rizosfera, ou ocorre a exsudação de compostos quelantes que formam complexos estáveis com o Al (Ma *et al.*, 2001). Dentre estes compostos, os principais são os ácidos orgânicos citrato, malato e oxalato liberados pelas plantas em resposta ao  $\text{Al}^{3+}$  (Brunner & Sperisen, 2013). Outras substâncias liberadas pelas raízes para quelar o Al na rizosfera incluem polipeptídios, compostos fenólicos, hidroxamatos cíclicos e mucilagem (Jones & Ryan, 2003; Poschenrieder *et al.*, 2008).

Vários estudos demonstram que o  $\text{Al}^{3+}$  intracelular também forma complexos com os ácidos orgânicos nas plantas tolerantes. No mecanismo de tolerância ocorre a quelação do metal com ácidos orgânicos no citosol das células radiculares e o subsequente armazenamento em compartimentos celulares como vacúolo, cloroplasto e parede celular (Ma *et al.*, 2001; Kochian

*et al.*, 2005; Andrade *et al.*, 2011). Além dos ácidos orgânicos, há outros compostos que formam complexos, por exemplo, as substâncias fenólicas que se ligam ao  $Al^{3+}$  no citosol. Um aumento de compostos fenólicos na raiz foi observado em uma série de plantas lenhosas após a exposição ao  $Al^{3+}$ , incluindo *C. sinensis*, *Cryptomeria japonica*, *Eucalyptus viminalis*, *Gleditsia triacanthos*, *Picea abies*, *Pinus densiflora*, *Pinus thunbergii*, *Populustremuloides*, *Robiniapseudoacacia*, e *Rhus succedanea* (Ofei-Manu *et al.*, 2001). Nagata *et al.* (1992) descreveram em folhas de *C. sinensis* a presença de complexos de Al-catequina.

## 1.2. Plantas acumuladoras de Al

As espécies classificadas como acumuladoras são aquelas que apresentam concentrações foliares de Al acima de  $1 \text{ g.Kg}^{-1}$  de matéria seca (Chenery, 1948). Assim, muitas plantas nativas do Cerrado estão adaptadas ao Al e não ressentem a presença desse metal no solo. As famílias mais características dentre as acumuladoras são Melastomataceae, Rubiaceae e Vochysiaceae (Chenery, 1948; Haridasan, 1982). Além disso, todas as espécies de *Qualea* são enquadradas como acumuladoras, pois armazenam grandes quantidades em seus órgãos, como folhas e sementes (Haridasan, 2005). Até 2002 haviam sido identificadas mais de 100 espécies de plantas capazes de acumular grandes quantidades de Al sem demonstrar sinais de toxicidade (Barceló & Poschenrieder, 2002).

Em fitofisionomias do Cerrado, algumas espécies acumuladoras de Al constituem uma grande porcentagem de indivíduos pertencentes à comunidade arbórea, provavelmente devido a vantagens competitivas em condições de solos ácidos. Por exemplo, apenas 5 das 38 espécies em um Cerrado *sensu stricto* no Distrito Federal são acumuladoras de Al, porém foram responsáveis por cerca de 30% do índice de valor de importância (IVI) na comunidade (Haridasan, 1987; 2008). Adicionalmente, *Qualea grandiflora* Mart. está entre as dez espécies mais relevantes de uma área de Cerrado denso no Distrito Federal (Andrade *et al.*, 2002).

Algumas espécies de Cerrado têm baixo desempenho na ausência de Al, como por exemplo, *M. albicans* e *V. thyrsoidea*. Estas espécies apresentam clorose, necrose foliar e desenvolvimento anormal quando crescidas em substrato com elevada quantidade de calcário (Machado, 1985; Haridasan, 1988). Além disso, quando transplantadas para solos ácidos essas plantas recuperaram o seu crescimento normal. Em *Q. grandiflora*, Silva (2012) verificou que plântulas crescidas na ausência do metal também apresentaram menores crescimento, biomassa e teores de pigmentos fotossintéticos quando comparadas às plântulas crescidas na presença do Al.



A complexação do Al com substâncias orgânicas é um dos processos característicos dos mecanismos de detoxificação interna do metal pelas espécies acumuladoras (Lee & Foy, 1986; Ma *et al.*, 2001; Watanabe & Osaki, 2002). Como exemplo, o acúmulo de Al nos vacúolos de células foliares de *M. malabathricum* se dá pela formação de complexos Al-oxalato (Lee & Foy, 1986; Watanabe & Osaki, 2002), assim como em folhas de trigo (Ma *et al.*, 1997<sup>a</sup>). O complexo Al-citrato ocorre em folhas de *Hydrangea macrophylla*, uma acumuladora que cresce em regiões temperadas (Ma *et al.*, 1997<sup>b</sup>). Além disso, pode ocorrer a quelação do Al por ligantes inorgânicos em plantas acumuladoras, como no caso de Al-Si presente na parte aérea de *Faremea marginata* (Britez *et al.*, 2002) e também nas folhas de várias espécies arbóreas de uma floresta tropical na Indonésia (Masunaga *et al.*, 1998). Em folhas de chá, as catequinas (polifenóis) são os principais ligantes do Al e são a base da alta tolerância dessa espécie a este metal (Nagata *et al.*, 1992). Adicionalmente, em plantas que acumulam outros metais a complexação pode ocorrer com a histidina, como no caso de *Thlaspi caerulescens* que forma o complexo Cd-histidina (Kupper *et al.*, 2004). Em *Alyssum sp* a histidina livre também atua como quelante do níquel (Kramer *et al.*, 1996).

A compartimentalização do Al pode ocorrer em diferentes sítios celulares como nos vacúolos, cloroplastos e parede celular (Ma *et al.*, 2001; Kochian *et al.*, 2005; Andrade *et al.*, 2011). Em plantas de chá (*C. sinensis*), o Al é encontrado na parede celular das células epidérmicas, o que é considerado como um mecanismo responsável pela detoxificação, visto que essas células não participam da fotossíntese (Tolrà *et al.*, 2011). Adicionalmente, em *Q. grandiflora* e *Callisthene major*, o Al não só é transportado para as células do mesófilo, mas se encontra nos cloroplastos, sem danos aparentes para essas organelas (Andrade *et al.*, 2011). Contudo, o papel do Al nos cloroplastos é uma questão-chave na compreensão da hiperacumulação em Vochysiaceae. Além disso, muito pouco se sabe sobre a possível interação de Al com a fisiologia da fotossíntese.

### 1.3. Metabolismo vegetal

O metabolismo é definido como a soma das reações anabólicas e catabólicas das estruturas celulares, ou seja, o total de modificações das moléculas orgânicas nas células vivas, sendo tais modificações catalisadas por enzimas (Nelson & Cox, 2014). Os metabólitos desempenham um papel muito importante na conexão das diferentes vias metabólicas que operam dentro da célula e podem ser divididos em primário e secundário (Villas-Bôas &

Gombert, 2006). Os metabólitos vegetais primários estão envolvidos nas vias metabólicas que são indispensáveis à vida celular, entre eles estão os carboidratos, proteínas, lipídeos, aminoácidos, ácidos orgânicos e ácidos nucleicos (Hall, 2006). Os metabólitos secundários estão relacionados a respostas a fatores externos, como defesa contra herbivoria e patógenos, sendo representados pelos alcaloides, terpenos, flavonoides, glicosídeos e taninos (Dunn & Ellis, 2005; Hall, 2006).

O metabolismo das plantas pode ser afetado por vários tipos de estresses bióticos e abióticos que desencadeiam em mudanças bioquímicas, celulares e fisiológicas (Benitez, 2012). Em resposta a estresses ambientais, as plantas produzem ativamente as ROS que são capazes de oxidar vários componentes celulares e pode conduzir à destruição oxidativa da célula (Asada & Takahashi, 1987; Dat *et al.*, 2000). Existem muitas fontes potenciais de ROS nas plantas, algumas são reações envolvidas no metabolismo normal, tais como a fotossíntese e a respiração (Mittler, 2002).

A fotossíntese é um processo vital para o crescimento e sobrevivência das plantas durante o seu ciclo de crescimento. Cerca de 40% da massa seca da planta consiste em carbono, fixado na fotossíntese (Lambers *et al.*, 2008). A fotossíntese, juntamente com o crescimento celular, encontra-se entre os processos primários a serem afetadas sob condições de estresse, como ocorre em plantas submetidas à seca (Chaves, 1991) e à salinidade (Munns *et al.*, 2006). Adicionalmente, o estresse hídrico em plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) inibiu a fotossíntese nas folhas, pela diminuição da ATP-sintase e ATP (Tezara *et al.*, 1999).

De acordo com Foyer & Noctor (2003), a fotossíntese é uma importante fonte de oxidantes celulares. A quantidade dessas ROS, como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nos cloroplastos pode aumentar por várias ordens de magnitude durante o estresse em plantas (Queval *et al.*, 2008). O equilíbrio entre a produção de ROS e o sistema antioxidante nos cloroplastos é importante para a manutenção das taxas fotossintéticas (Foyer & Shigeoka, 2011). Além de enzimas antioxidantes, alguns metabólitos como o ascorbato (ASA) e glutathiona reduzida (GSH) são antioxidantes abundantes nas plantas que se acumulam a concentrações milimolares nos cloroplastos (Foyer & Halliwell, 1976; Foyer & Shigeoka, 2011).

A produção de ROS sob condições de estresses ambientais resultam de rotas, como a fotorespiração, tanto a partir do aparato fotossintético como da respiração mitocondrial (Mittler, 2002). No entanto, assim como os cloroplastos, as mitocôndrias também contêm mecanismos de eliminação desses ROS (Mittler, 2002). Além disso, alguns estudos têm relacionado as vias

bioquímicas de respiração com a adaptação ou estresse de plantas a determinadas condições ambientais. Como exemplo, o estresse a metais pesados em *Amaranthus retroflexus* L. reduziu a taxa de glicólise e o conteúdo de piruvato, sendo acompanhado por um aumento da via da pentose fosfato oxidativa e respiração residual (Rakhmankulova *et al.*, 2003).

### 1.3.1. Ácidos orgânicos

Em várias espécies de plantas, ácidos orgânicos desempenham um papel crucial na desintoxicação do  $Al^{3+}$ , seja por complexação com Al no citoplasma, ou na interface raiz/solo. A composição dos vários tipos ácidos orgânicos em determinada planta pode variar de acordo com a espécie, idade da planta e tipo de tecido (López-Bucio *et al.*, 2000). De forma geral, a síntese dos ácidos orgânicos ocorre nas mitocôndrias através do ciclo de Krebs (ciclo dos ácidos tricarboxílicos), também no citosol da célula e, em menor quantidade no glioxissomo como parte do ciclo do glioxilato (Ma *et al.*, 2001).

O malato, citrato e oxalato são ácidos orgânicos comumente encontrados nos tecidos vegetais e desempenham várias funções metabólicas. O citrato e malato estão presentes em todas as células vegetais e compõem o ciclo respiratório mitocondrial (Jones & Ryan, 2003). Além disso, o malato desempenha um papel importante na fotossíntese e na manutenção do pH interno e equilíbrio iônico (Lance & Rustin, 1984). O oxalato é um constituinte celular comum envolvido na regulação de  $Ca^{2+}$ , balanço iônico e na desintoxicação de metais (Rahman & Kawamura, 2011). Como visto anteriormente, esses três ácidos orgânicos tem forte capacidade de quelação com cátions polivalentes e formam complexos estáveis com o Al na seguinte ordem de força: citrato > oxalato > malato (Jones & Ryan, 2003). De acordo com Hartwig *et al.* (2007) devido à estabilidade do citrato em formar quelatos com o  $Al^{3+}$  é o ácido orgânico mais comumente exsudado entre as espécies na presença do Al.

Esses ácidos orgânicos são sintetizados por diferentes enzimas. A forma básica da síntese de citrato é resultante da condensação do oxaloacetato com a acetil-CoA, catalisada por citrato sintase (CS). A metabolização de citrato em células vegetais pode ser realizada por vários caminhos, sendo que a via básica de conversão de citrato é sua oxidação via as reações do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) (Popova & Carvalho, 1998).

Já o malato é sintetizado através da ação conjunta de carboxilase fosfoenolpiruvato (PEPC), que catalisa a conversão de fosfoenolpiruvato a oxaloacetato, e malato desidrogenase

(MDH), que provoca a redução do oxaloacetato para formar malato (Vance, 1997). De acordo com Casati *et al.* (1999) as enzimas envolvidas no metabolismo do malato são a malato desidrogenase, a malato sintase, a fumarase e a enzima málica. Quanto à síntese do oxalato, existem quatro vias propostas: 1) a partir de fosfoglicolato gerado na reação ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) com o O<sub>2</sub>; 2) a partir de glioxilato produzido na reação de isocitrato liase; 3) a partir de oxaloacetato via oxaloacetato liase e; 4) a partir de ácido ascórbico por oxidação (Raven *et al.*, 1982). A biossíntese do oxalato pode ocorrer em peroxissomos ou no citoplasma (Libert & Franceschi, 1987).

#### 1.4. Metabolômica

O termo "metabolômica" é definido como uma análise abrangente e quantitativa de todas as pequenas moléculas em um sistema biológico (Fiehn, 2001). O reino vegetal pode conter entre 200.000 e 1.000.000 metabólitos, enquanto que para uma única espécie, o número pode se aproximar de alguns milhares (a estimativa para *Arabidopsis* é de cerca de 5.000) (Davies *et al.*, 2010; Saito & Matsuda, 2010). Devido à grande variedade de moléculas com diferentes estruturas e propriedades químicas, não há até o momento nenhuma técnica única para identificar e quantificar todos eles (Obata & Fernie, 2012). Várias técnicas que incluem cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS), a cromatografia líquida (CL)-MS, eletroforese capilar (CE)-MS e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR) são comumente utilizadas em pesquisa do metaboloma de plantas.

A GC-MS tem sido a técnica mais utilizada para a investigação do metaboloma de plantas, especialmente por facilitar a identificação e quantificação dos metabólitos envolvidos nas vias centrais do metabolismo primário, tais como os açúcares, açúcares alcóolicos, aminoácidos, ácidos orgânicos e poliaminas (Schauer & Fernie, 2006; Sun *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2015<sup>a</sup>). O método possibilita a identificação rápida e confiável dos metabólitos e, além disso, fornece uma alta sensibilidade do material (Schauer *et al.*, 2005).

As respostas fisiológicas de plantas a estímulos ambientais envolvem alterações e/ou acumulação de metabólitos, levando a uma resposta fisiológica particular ou fenótipo (Verslues *et al.*, 2006). Estudos têm utilizado as análises metabolômicas em plantas em resposta a várias condições de estresses. Como exemplo, em *Arabidopsis* sob estresse hídrico (Urano *et al.*, 2009), em arroz submetidas a estresse salino (Zuther *et al.*, 2007), em folhas de tomate sob a deficiência

de N (Urbanczyk-Wochniak & Fernie, 2005) e os efeitos de Cu, Fe e Mn em *Brassica rapa*, uma acumuladora de metal (Jahangir *et al.*, 2008).

Este estudo teve como objetivo investigar e comparar o perfil metabólico da lâmina foliar de plantas de *Q. grandiflora* crescidas na presença e na ausência de Al por meio da GC-MS.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Material vegetal

Sementes de *Q. grandiflora* foram coletadas em áreas de Cerrado *sensu stricto* na Reserva Ecológica da Fazenda Água Limpa – UnB (FAL), na Reserva Ecológica do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) e Fazenda Dois Irmãos (Água Fria de Goiás-GO). As sementes foram germinadas e cultivadas em solução na presença e ausência de Al durante 90 dias. O Al foi fornecido pela adição de 200 µM de AlCl<sub>3</sub> na solução nutritiva <sup>1</sup>/<sub>5</sub> MS (Murashige & Skoog, 1962) e o pH foi mantido entre 4,5 e 5,0. As plântulas cresceram em sacos plásticos (500 mL) contendo vermiculita esterilizada Agrofloc<sup>®</sup> e as soluções nutritivas foram repostas duas vezes por semana.

Folhas de cinco plantas de *Q. grandiflora* relativas a cada tratamento foram extraídas aos 90 dias de crescimento em N<sub>2</sub> líquido e separadas para análises dos metabólitos (armazenadas no -80° C).

### 2.2. Determinação do perfil metabólico de folhas de *Q. grandiflora* crescidas na presença e ausência de Al

As folhas das plantas foram liofilizadas e maceradas em cadinho até a obtenção de um fino pó, e então transferidas para tubos eppendorfs de 2 mL. A extração e derivatização das amostras seguiu o protocolo de Lisec *et al.* (2006), com modificações. A extração foi feita a partir de 10 mg da biomassa seca e adicionou-se à solução de extração, contendo 1.400 µL de metanol PA (Sigma-Aldrich) e 60 µL de solução ribitol (Sigma-Aldrich) à 0,2 mg.mL<sup>-1</sup> em água ultra pura para cada amostra, equivalentemente. Então, a mistura foi incubada em um termoagitador a 1000 rpm a 70 °C por 10 min. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 10.000 g

por 10 min e o sobrenadante foi transferido para um microtubo de vidro. Ao sobrenadante foram adicionados 375  $\mu\text{L}$  de clorofórmio e 750  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q a 4 °C e agitada por 10 s. A solução foi novamente centrifugada a 2.200 g por 10 min para a separação das fases. Em seguida, foram retirados da porção superior da solução alíquotas de 150  $\mu\text{L}$  e transferidas para microtubos de plástico. Essas amostras foram secas em *speed-vac* a 25 °C por 2 h e armazenadas a -80 °C até a sua derivatização.

Antes da derivatização, as amostras foram colocadas no *speed-vac* a 30 °C por 30 min para a remoção de toda a água presente. Posteriormente, foi adicionado 40  $\mu\text{L}$  de cloridrato de metoxiamina (Sigma-Aldrich) à 20  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  em piridina PA nos microtubos e agitadas por 2 h à 37 °C em placa aquecedora com agitador a 900 rpm. Logo após o tempo de incubação, 70  $\mu\text{L}$  de N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA) (Sigma-Aldrich) foi adicionado e incubado à 37 °C por 30 min em placa aquecedora com agitador a 900 rpm. Dessa solução, 100  $\mu\text{L}$  foram transferidos para os *inserts* (tubos de microvolume de vidro).

Os compostos metabólicos foram detectados em cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massas (GC/MS). Parâmetros cromatográficos: a análise foi realizada com coluna capilar 30 m HP-5. A temperatura do programa começou com 70 °C por 5 min, seguido de um aumento de 5 °C $\cdot\text{min}^{-1}$  até a temperatura de 330 °C e mantido nessa temperatura por 10 min. Os parâmetros de análise dos compostos das amostras foi proposto por Lisec *et al.* (2006).

Os cromatogramas gerados foram alinhados com auxílio do programa MetAlign. Então, os cromatogramas foram exportados para o software AMIDIS (*Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System*), fornecido pelo Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST, EUA). Neste software foi realizada a identificação dos metabólitos, com base na comparação do índice de retenção e massa dos cromatogramas, das amostras com as bibliotecas internas. A variação no perfil metabólico foi analisada por meio da comparação das médias através do teste t a 5% e 10% de significância.

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Perfil metabólico**

O perfil metabólico de plantas de *Q. grandiflora* crescidas na ausência e presença de Al foi investigado com o propósito de determinar a influência deste metal no metabolismo dessa

espécie. A Tabela 1 apresenta os metabólitos identificados nas folhas de ambos os tratamentos, entre os quais estão ácidos orgânicos (8), ácido inorgânico (1), aminoácidos (2), açúcares alcoólicos (4) e açúcares redutores (4).

Quanto aos ácidos orgânicos, dentre os oito identificados, cinco foram significativamente diferentes entre os tratamentos, a saber; ácido oxálico, ácido cítrico, ácido quínico, ácido chiquímico e ácido dehidroascórbico dímero. Com exceção dos ácidos oxálico e cítrico, as quantidades relativas dos demais foram maiores nas amostras das plantas crescidas com Al (Tabela 1). As maiores diferenças foram observadas nos ácidos chiquímico e dehidroascórbico dímero, onde as abundâncias relativas foram em torno de duas vezes maior no tratamento com Al, e no ácido oxálico na qual a abundância foi duas vezes maior no tratamento controle (Tabela 1).

Dentre os dois aminoácidos identificados, o ácido piroglutâmico apresentou diferença significativa entre os tratamentos. A abundância desse aminoácido foi em torno de quatro vezes maior nas plantas do tratamento controle. Ainda, entre os quatro açúcares alcóolicos, o sorbitol também apresentou um aumento significativo nas plantas tratadas sem Al (Tabela 1).

A Figura 1 apresenta o mapa do perfil metabólico em folhas de *Q. grandiflora*. As rotas metabólicas relacionam os compostos detectados nos dois tratamentos. As quantificações no perfil metabólico mostram alguns compostos marcados cujas diferenças foram significativas entre os tratamentos (Figura 1).

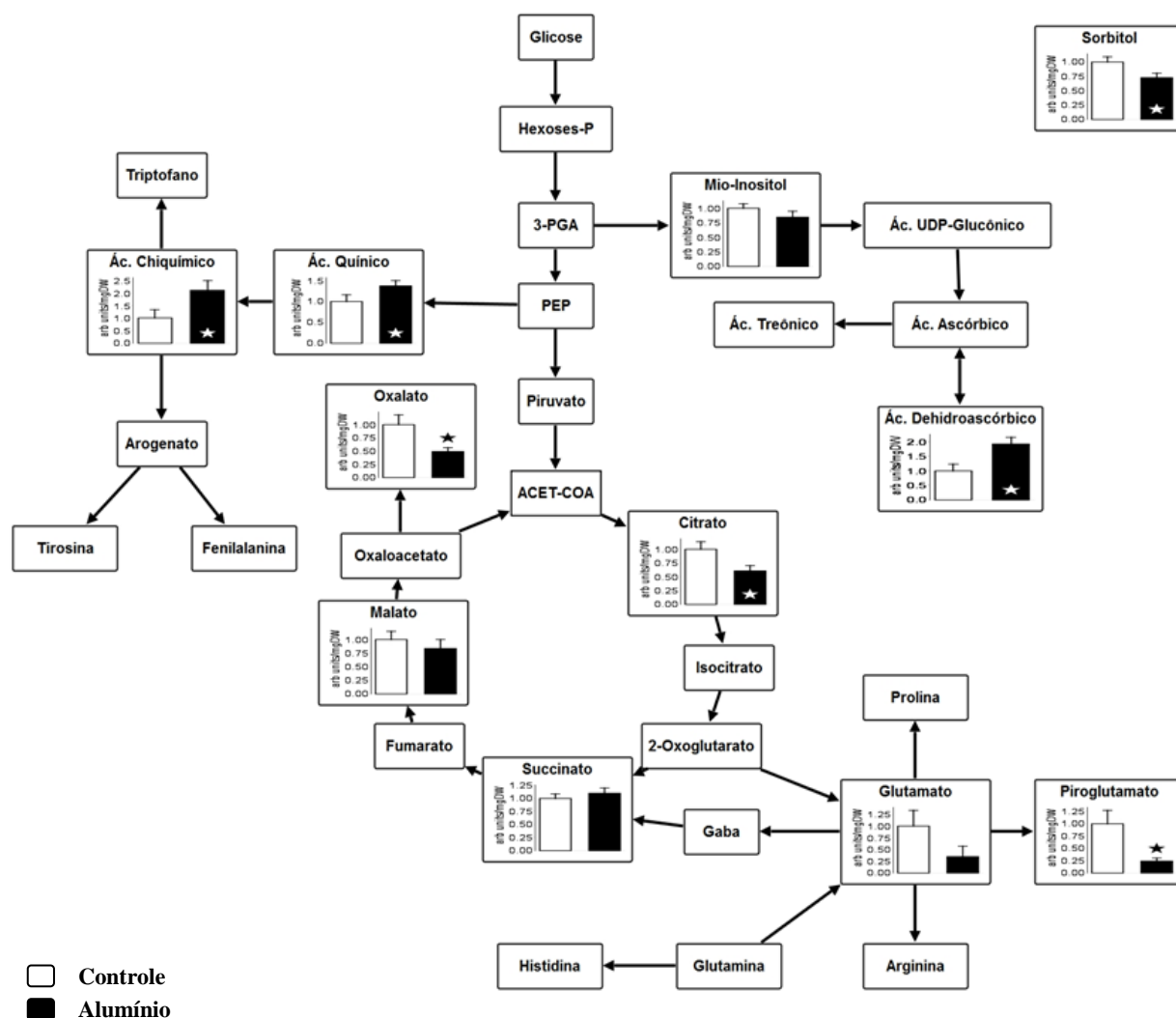
Os ácidos orgânicos citrato e malato são intermediários na rota do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), sendo que seu precursor é o Acetil-CoA e o oxaloacetato, respectivamente (Figura 1). O ácido quínico é o precursor do ácido chiquímico e é formado pela condensação do fosfoenolpiruvato (PEP) e eritrose-4-fosfato. A rota do ácido chiquímico sintetiza triptofano, tirosina e fenilalanina (Figura 1). O aminoácido piroglutamato é sintetizado a partir do glutamato que é resultante do 2-oxoglutarato do TCA. O ácido ascórbico é sintetizado através de uma sequência de precursores de hexose que envolve principalmente a D-glucose e sua oxidação forma o ácido dehidroascórbico (Figura 1).

**Tabela 1.** Alterações das concentrações dos metabólitos identificados em folhas de plantas de *Q. grandiflora* do tratamento controle (CT) e alumínio (AL).

<b>Metabólitos</b>	<b>Massa/Carga</b>	<b>Tempo de retenção (<math>\mu</math>min)</b>	<b>Folds (AL/CT)</b>
<b>Ácidos orgânicos</b>			
Ácido oxálico	147	12473	-0,49*
Ácido quínico	345	31121	1,37**
Ácido succínico	247	17751	1,09
Ácido málico	233	22541	-0,84
Ácido cítrico	273	30127	-0,6**
Ácido gálico	281	32772	1,18
Ácido chiquímico	204	29880	2,12**
Ácido dehidroascórbico dímero	173	30655	1,91*
<b>Ácido inorgânico</b>			
Ácido fosfórico	299	16763	-0,6
<b>Aminoácidos</b>			
Ácido glutâmico	246	25601	-0,34
Ácido piroglutâmico	156	23164	-0,24*
<b>Açúcares alcoolicos</b>			
Viburnitol	217	31329	1,36
Galactinol	204	49624	-0,82
Sorbitol	319	32548	-0,71*
Mio-inositol	217	35501	-0,85
<b>Açúcares</b>			
Galactose	319	32272	-0,94
Frutose	217	31419	1,11
Glicose	319	31930	-0,97
Sacarose	361	44767	-0,93

As alterações (*fold changes*) foram calculadas usando a formula  $\log_2$  (AL/CT). \* Representam metabólitos significativamente diferentes considerando  $p < 0,05$  e \*\* representam metabólitos significativamente diferentes considerando  $p < 0,1$ .





**Figura 1.** Perfil metabólico de amostras de folhas de *Q. grandiflora* crescidas na presença e ausência (controle) de Al. Os compostos marcados com estrela são significativamente diferentes entre si ( $p < 0,05$  e  $p < 0,1$ ).

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1. Influência do Al sobre o conteúdo de ácidos orgânicos em *Q. grandiflora*

Como mostrado, ocorreram variações significativas no conteúdo de ácidos orgânicos em plantas de *Q. grandiflora*. Estudos têm mostrado que as espécies acumuladoras de Al neutralizam o  $Al^{3+}$  pela formação de complexos com ácidos orgânicos ou outros compostos quelantes (Ma *et al.*, 2001; Singh & Chauhan, 2011). Wang *et al.* (2015<sup>b</sup>) relataram que em duas espécies de *Fagopyrum*, o Al presente nas raízes e folhas foi encontrado na forma do complexo

Al-oxalato (1:3). Porém, poucos estudos deram atenção às alterações na concentração de ácidos orgânicos nos tecidos foliares em plantas acumuladoras de Al (Xu *et al.*, 2016).

No presente estudo, a suplementação de Al em *Q. grandiflora* induziu a um decréscimo significativo na concentração de citrato e oxalato nas folhas, quando comparado ao tratamento controle. Além disso, é importante ressaltar que houve uma redução no teor de Al nas folhas dessas plantas tratadas com o metal em comparação com o controle. É fato que se houver menor concentração de Al, há uma menor necessidade de quelação do metal, o que resulta na diminuição de citrato e oxalato no tecido foliar das plantas. Outrossim, os resultados indicaram que o oposto ocorre nas plantas controle, a maior concentração de Al presente nas folhas induziu o aumento no teor desses ácidos orgânicos nessas plantas.

Em geral, esses dados são consistentes com o que já foi verificado em outras espécies, nas quais as concentrações desses ácidos orgânicos nas folhas se mantiveram ou aumentaram em resposta ao Al. Ma *et al.* (1998) relataram que o conteúdo de oxalato não foi alterado nas folhas de plantas tratadas com Al em trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum* Moench. Cv Jianxi), variedade altamente resistente ao Al. Também, Miyagi *et al.* (2013) mostraram que sob influência do Al<sup>3+</sup>, três espécies de *Rumex* apresentaram um aumento no teor de oxalato em suas folhas. Em outra planta, *Plantago algarbiensis* Samp., o Al induziu um aumento significativo na quantidade de ácido málico na parte aérea (Martins *et al.*, 2013). Gonçalves *et al.* (2005) relataram que os ácidos orgânicos, especialmente o ácido málico, desempenham um papel importante em cultivares de *Sorghum bicolor*, tolerantes a níveis elevados de Al.

Os resultados em *Q. grandiflora* sugerem que a tolerância ao acúmulo de Al nas folhas está relacionada com a quelação ou a presença de ácidos orgânicos, em especial o citrato e oxalato. Além disso, sugere-se que a concentração desses ácidos orgânicos seja proporcional à concentração de Al no tecido foliar tanto em plantas do tratamento Al como nas plantas controle.

O ácido chiquímico e quínico, encontrados em maiores quantidades nas plantas crescidas com o Al, fazem parte da via metabólica do ácido chiquímico (Figura 1). Nas plantas, essa rota metabólica é precursora de vários compostos aromáticos, como os aminoácidos fenilalanina, tirosina, triptofano e alcaloides derivados da quinoleína, e processa-se no citosol da célula vegetal (Nelson & Cox, 2014). Essa rota também está envolvida na biossíntese da maioria dos compostos fenólicos vegetais (Taiz & Zeiger, 2009). Dentre os representantes fenólicos, destacam-se os ácidos fenólicos, isoflavonoides, taninos, flavonoides, xantonas e cumarinas (Macedo *et al.*, 2007).

O acúmulo de compostos fenólicos é comum em espécies do Cerrado e tem um papel importante na resistência das plantas contra as adversidades bióticas e abióticas (Bussotti *et al.*, 1998; Somavilla & Graciano-Ribeiro, 2011). Quimicamente, o gênero *Qualea* se caracteriza pela presença de ácidos fenólicos, terpenóides, flavonoides e taninos (Brito, 1986).

Acredita-se que a concentração de Al em folhas de espécies de Vochysiaceae pode influenciar o comportamento herbívoro. De acordo com Nascimento (1989) e Nascimento *et al.* (1990) a percentagem média de área foliar predada em *Vochysia divergens* Pohl e *V. rufa* Mart. (Vochysiaceae) foi de 2,2% a 4,6% em uma área de Cerrado perto de Cuiabá. Assim, o teor de compostos fenólicos nas folhas é uma característica que faz com que as folhas sejam menos palatáveis, diminuindo a herbivoria como observado em espécies lenhosas do Cerrado (Sakita, 2013). Essa hipótese tem encontrado suporte em *Festuca arundinacea*, onde a aplicação de Al se mostrou eficaz na redução da predação por herbívoros na planta (Potter *et al.*, 1996).

Adicionalmente, a biossíntese de lignina também tem origem a partir da fenilalanina através da via do ácido chiquímico (Stumpf & Conn, 1981). Hasegawa *et al.* (1960) demonstraram a conversão do ácido chiquímico em lignina. Além disso, este ácido está amplamente distribuído nas folhas e caules de muitas plantas lenhosas (Hasegawa *et al.*, 1957; Higuchi, 1959). Peixoto *et al.* (2007) constataram que o aumento dos teores de lignina, assim como a de outros compostos fenólicos, nos ápices radiculares de sorgo foram consideradas indicadoras à tolerância ao Al<sup>3+</sup>. No entanto, em *C. sinensis*, uma hiperacumuladora de Al, o crescimento dessas plantas na presença de Al resultou na redução do teor de lignina (Ghanati *et al.*, 2005).

Os compostos fenólicos geralmente estão associados ao mecanismo de adaptação e resistência da planta ao meio ambiente (Sasaki *et al.*, 1996; Rocha *et al.*, 2011). Velozo (1988) encontraram uma elevada quantidade de fenóis em folhas de *Q. grandiflora*, variando 8-14%. Isto indica que o aumento do ácido chiquímico em folhas de *Q. grandiflora* tratadas com Al esteja relacionado com o aumento da biossíntese de fenóis, e dessa forma pode estar associado ao mecanismo de adaptação ao acúmulo do metal nos tecidos da planta.

#### 4.2. Outros metabólitos em resposta ao tratamento com e sem Al<sup>3+</sup>

Outros ligantes orgânicos, encontrados em plantas acumuladoras, são capazes de quelar o Al no citoplasma e, em seguida, compartimentá-lo em organelas como o vacúolo (Kochian, 1995; Ramgareeb *et al.*, 2004). Em cultivares de plantas de chá (*C. sinensis*), o ácido fosfórico desempenha um papel importante no mecanismo de Al-tolerância (Xu *et al.*, 2016). Nessa espécie foi observado que o ácido teve um aumento significativo nas folhas de duas cultivares crescidas com Al. Além disso, Sun *et al.* (2009) consideraram que o mecanismo de tolerância e acúmulo de Al em plantas de *C. sinensis* estava relacionado à presença de complexos de Al-fosfato e Al-oxalato nas folhas.

Adicionalmente, em *Q. grandiflora*, comparado com o tratamento controle, o teor de piroglutamato foi significativamente menor nas folhas das plantas suplementadas com Al (Tabela 1 e Figura 1). O aminoácido piroglutamato é um componente na via do metabolismo da glutatona e resulta do glutamato (Anderson & Roberts, 1998). Alguns estudos têm observado a acumulação de aminoácidos após diferentes tratamentos de estresses, como glutamina e prolina em *Hordeum vulgare* L. sob estresse salino (Kaplan *et al.*, 2004; Widodo *et al.*, 2009). Lea *et al.* (2007) relatam o aumento dos níveis de asparagina sob condições de estresses, como por exemplo em resposta à presença metais, deficiências minerais e ataque de patógenos. Sob estresse salino, o ácido piroglutâmico acumula nas folhas de *Thellungiella halophila* (Oh *et al.*, 2007). Também, em *A. thaliana*, a exposição ao Cd resultou em um aumento significativo deste composto (Sun *et al.*, 2010). No entanto, folhas de *Q. grandiflora* submetidas ao Al apresentaram níveis mais baixos de ácido piroglutâmico que aquelas das plantas controle. Com isso, pode-se sugerir que o aumento da síntese desse ácido nas folhas do tratamento controle pode ser decorrente do estresse resultante da ausência de Al durante o desenvolvimento dessas plantas.

Outro composto que foi identificado em menor quantidade nas folhas de *Q. grandiflora* suplementadas com Al foi o sorbitol. Os açúcares alcoólicos são considerados compostos de reserva formados durante o processo fotossintético e transportados pelo floema (Loescher *et al.*, 1995). Esses compostos possuem a capacidade de eliminação das ROS, fornecendo proteção à oxidação devido ao excesso de radicais de hidroxila (OH) e superóxido ( $O_2^-$ ) (Keunen *et al.*, 2013; Stoyanova *et al.*, 2011). Em maçã (*Malus domestica* Borkh. cv. Jonathan) sob condições de estresse hídrico, houve o acúmulo de sorbitol nas folhas (Wang *et al.*, 1995). Já em folhas de aipo (*Apium graveolens* L. var dulce [Mill.] Pers.) ocorreu o aumento de outro açúcar alcoólico, o manitol, como resultado do estresse salino (Stoop & Pharr, 1994). De acordo com Bohnert & Jensen (1996), muitas plantas acumulam determinados solutos em resposta a estresses ambientais, sendo os açúcares alcoólicos os mais comuns. Dessa forma, a maior abundância de

sorbitol nas plantas controle de *Q. grandiflora* pode estar funcionando como antioxidante causado pela falta do Al na solução nutritiva durante o desenvolvimento dessas plantas.

Semelhante correlação pode ser feita em relação à maior abundância de ácido dehidroascórbico (DHA), nas folhas de plantas suplementadas com Al (Figura 1). O ácido dehidroascórbico resulta da oxidação reversível do ácido ascórbico, sendo que essa reversão atua como um sistema oxido-redutor (Nelson & Cox, 2014; Welch *et al.*, 1995). O ácido ascórbico (AA), além de ser um metabólito essencial para o desenvolvimento e crescimento de plantas, também atua como um antioxidante contra os estresses abióticos e bióticos (Smirnoff, 2000; Noctor, 2006). A produção não-enzimática de antioxidantes em células vegetais, como o AA, é crucial para minimizar o estresse oxidativo induzido por ROS em plantas expostas a estresses (Ma *et al.*, 2012; Mostofa *et al.*, 2015).

De acordo com Fecht-Christoffers *et al.* (2003), a elevada razão AA/DHA previne danos oxidativos em plantas. Em plantas de arroz tratadas com Ni, a diminuição da proporção AA/DHA foi atribuída à diminuição da capacidade antioxidante (Maheshwari & Dubey, 2009). Ribeiro *et al.* (2012) relataram que o aumento da proporção AA/DHA e a concomitante redução nos níveis de DHA ocorreu em paralelo com a acumulação de Al nas raízes, indicando o envolvimento do AA no mecanismo de tolerância de dois cultivares de arroz ao excesso de Al.

A redução do teor de DHA em plantas controle de *Q. grandiflora* pode estar associado com as alterações nos estados redox e a maior teor do antioxidante AA, o que sugere um dano oxidativo nessas plantas induzido pela falta de Al suplementado na solução nutritiva. O oposto pode ocorrer em plantas crescidas na presença do metal, o aumento do DHA e concomitantemente uma redução no teor de AA, devido à inexistência de estresse oxidativo. É importante ressaltar que não é possível quantificar o AA por meio de GC-MS devido a sua elevada instabilidade. Por isso, mais estudos são necessários para avaliar a proporção AA/DHA em plantas de *Q. grandiflora* submetidas à presença e ausência do Al.

## 5. CONCLUSÕES

- A análise por cromatografia gasosa permitiu a visualização de alterações metabólicas em *Q. grandiflora* crescidas na presença e ausência de Al;
- O maior teor de alguns metabólitos, como o ácido piroglutâmico e sorbitol, em plantas controle comparado ao tratamento Al, pode estar relacionado ao estresse oxidativo que essas plantas se encontram devido à falta de Al na solução nutritiva durante o seu crescimento. Além disso, o estresse dessas plantas pode estar associado com a redução do ácido dehidroascórbico (DHA) e consecutivamente com o maior teor do antioxidante ácido ascórbico (AA) nessas plantas comparado as plantas com Al;
- As plantas suplementadas com Al apresentaram maiores concentrações foliares de ácido chiquímico e quínico em relação ao controle. Sugere-se que o maior teor desses ácidos esteja relacionado com o aumento da biossíntese de compostos fenólicos nessas plantas;
- A redução da biossíntese de ácido cítrico e oxálico em plantas do tratamento Al é consistente com a menor concentração foliar de Al nessas plantas comparado ao controle. Com isso, sugere-se que o teor desses ácidos orgânicos é proporcional à concentração de Al nas folhas das plantas suplementadas com o metal e das plantas controle. Logo, pode se sugerir que a tolerância ao acúmulo de Al em plantas de *Q. grandiflora* está relacionada com a participação dos ácidos orgânicos, principalmente ácido cítrico e oxálico, na quelação ao metal.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, M. & ROBERTS, J. 1998. *Arabidopsis*, Annual Plant Reviews, Volume 1, Sheffield Academic Press, UK.
- ANDRADE, L.A.Z.; FELFILI, J.M. & VIOLATTI, L. 2002. Fitosociologia de uma área de Cerrado denso na RECOR-IBGE, Brasília-DF. *Acta Botanica Brasilica*, 16: 225-240.
- ANDRADE, L.R.M. de; BARROS, L.M.G.; ECHEVARRIA, G.F.; AMARAL, L.I.V., COTTA, M.G., ROSSATTO, D.R.; HARIDASAN, M. & FRANCO, A.C. 2011. Al-hyperaccumulator Vochysiaceae from the Brazilian Cerrado store aluminum in their chloroplasts without apparent damage. *Environmental and Experimental Botany*, 70: 37-42.
- ASADA, K. AND TAKAHASHI, M. 1987. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In *Photoinhibition* (Kyle, D.J. *et al.*, eds), pp. 227–287, Elsevier.
- BARCELÓ, J. & POSCHENRIEDER, C. 2002. Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. *Environmental and Experimental Botany*, 48: 75-92.
- BENITEZ, L.C. 2012. Fisiologia do estresse salino em arroz: caracterização da resposta bioquímica e molecular. Tese de doutorado, Universidade Federal de Pelotas.
- BOHNERT, H.J. & JENSEN, R.G. 1996. Strategies for engineering waterstress tolerance in plants. *Trends in Biotechnology*, 14: 89-97.
- BOSCOLO, P.R.S.; MENOSSI, M. & JORGE, R. A. 2003. Aluminum-induced oxidative stress in maize. *Phytochemistry*, 62: 181-189.
- BRITTEZ, R.M.; WATANABE, T.; JANSEN, S.; REISSMANN, C.B. & OSAKI, M. 2002. The relationship between aluminium and silicon accumulation in leaves of *Fareamea marginata* (Rubiaceae). *New Phytologist*, 156: 437–444.
- BRITO, N.R.S. 1986. Perfil químico de famílias de Angiospermas. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.

- BRUNNER, I. & SPERISEN, C. 2013. Aluminum exclusion and aluminum tolerance in woody plants. *Plant Science*, 4: 1-12.
- BUSSOTI, F., GRAVANO, E., GROSSONI, P. & TANI, C. 1998. Occurrence of tannins in leaves of beech trees (*Fagus sylvatica*) along an ecological gradient, detected by histochemical and ultrastructural analyses. *New Phytologist*, 138: 469-479.
- CASATI, P.; DRINCOVICH, M.F.; EDWARDS, G.E. & ANDREO, C.S. 1999. Malate metabolism by NADP-malic enzyme in plant defense. *Photosynthesis Research*, 61: 99-105.
- CHAVES, M.M. 1991. Effects of water deficits on carbon assimilation. *Journal of Experimental Botany*, 42: 1–16.
- CHENERY, E.M. 1948. Aluminium in the plant world. Part.I. *Kew Bulletin*. 2: 173-183.
- CLARKSON, D.T. 1965. The effect of aluminium and some trivalent metal cations on cell division in the root apices of *Allium cepa*. *Annals of Botany*, 29: 309–315.
- DAT, J.; VANDENABEELE, S.; VRANOVÁ, E.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. & VAN BREUSEGEM, F. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57: 779-795.
- DAVIES, H.V.; SHEPHERD, L.V.; STEWART, D.; FRANK, T.; ROHLIG, R.M. & ENGEL, K.H. 2010. Metabolome variability in crop plant species—when, where, how much and so what? *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 58: S54–S61.
- DUNN, W.B. & ELLIS, D.I. 2005. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *Trends in Analytical Chemistry*, 24: 285-294.
- FECHT-CHRISTOFFERS, M.M.; MAIER, P. & HORST, W.J. 2003. Apoplastic peroxidase and ascorbate are involved in manganese toxicity and tolerance of *Vigna unguiculata*. *Physiologia Plantarum*, 117: 237–244.



- FIEHN, O. 2001. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comparative and Functional Genomics*, 2: 155–168.
- FOY, C.D.; CHANEY, R.L. & WHITE, M.C. 1978. The physiology of metal toxicity in plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 29: 511-56.
- FOYER, C.H. & SHIGEOKA, S. 2011. Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant Physiology*, 155: 93–100.
- FOYER, C.H. & NOCTOR, G. 2003. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum*, 119: 355–364.
- FOYER, C.H. & HALLIWELL, B. 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 133: 21–25.
- GHANATI, F.; MORITA, A.; YOKOTA, H. 2005. Deposition of suberin in roots of soybean induced by excess boron. *Plant Science*, 168: 397-405.
- GONÇALVES, J.F. DE C.; CAMBRAIA, J.; MOSQUIM, P.R. & ARAÚJO, E.F. 2005. Aluminum effect on organic production and accumulation in sorghum. *Journal of Plant Nutrition*, 28: 507-520.
- HALL, R.D. 2006. Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. *New Phytologist*, 169: 453-468.
- HARIDASAN, M. 2008. Nutritional adaptations of native plants of the Cerrado biome in acid soils. Review: *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 20: 183-195.
- HARIDASAN, M. 2005. Nutrição mineral das plantas nativas do Cerrado. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 12: 54-64.
- HARIDASAN, M. 1988. Performance of *Miconia albicans* (Sw.) Triana, an aluminium-accumulating species in acidic and calcareous soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 19: 1091-1103.

- HARIDASAN, M. 1987. Distribution and mineral nutrition of aluminium-accumulating species in different plant communities of the cerrado region of Central Brazil. In: San José JJ, Montes R (eds), La capacidade bioproductiva de sabanas. pp.309-348. Instituto Venezolano de Investigaciones Cientificas, Caracas.
- HARIDASAN, M. 1982. Aluminium accumulation by some Cerrado native species of central Brazil. *Plant and Soil*, 65: 265-273.
- HARTWIG, I.; OLIVEIRA, A.C.; CARVALHO, F.I.F.; BERTAN, I.; SILVA, J.A.G.; SCHMIDT, D.A.M.; VALÉRIO, I.P; MAIA, L.C.; FONSECA, D.A.R. & REIS, C.E.S. 2007. Mecanismos associados à tolerância ao alumínio em plantas. *Ciências Agrárias*, Londrina, 28: 219-228.
- HASEGAWA, M.; HIGUCHI, T. & ISHIKAWA, H. 1960. Formation of lignin in tissue culture of *Pinus strobus*. *Plant & Cell Physiology*, 1: 173-182.
- HASEGAWA, M.; NAKAGAWA, T.; YOSHIDA, S. 1957: Occurrence of shikimic acid in plant tissues II. *Journal of the Japanese Forestry Society*, 39: 159-163.
- HIGUCHI, T. 1959. Studies on the biosynthesis of lignin. *In*: Kratzl, K.; Billek, G. (eds): *Biochemistry of Wood*. New York : Pergamon Press, 161-188.
- JAHANGIR, M.; ABDEL-FARID, I.B.; CHOI, Y.H. & VERPOORTE, R. 2008. Metal ion-inducing metabolite accumulation in *Brassica rapa*. *Journal of Plant Physiology*, 165:1429–1437.
- JANSEN, S.; BROADLEY, M.; ROBBRECHT, E. & SMETS, E. 2002. Aluminium hyperaccumulation in angiosperms: a review of its phylogenetic significance. *Botanical Review*, 68: 235-269.
- JONES, D.L. & RYAN, P.R. 2003. "Aluminum toxicity," *in* *Encyclopedia of Applied Plant Science*, eds B. Thomas, D. Murphy, and B. G. Murray (London: Elsevier Academic Press), 656-664.

- KAPLAN, F.; KOPKA, J.; HASKELL, D.W.; ZHAO, W.; SCHILLER, K.C.; GATZKE, N.; SUNG, D.Y. & GUY, C.L. 2004. Exploring the temperature stress metabolome of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 136: 4159–4168.
- KEUNEN, E.; PESHEV, D.; VANGRONSVELD, J.; ENDE, W.V.D & CUYPERS, A. 2013. Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept. *Plant, Cell and Environment*, 36: 1242 -1255.
- KOCHIAN, L.V. 1995. Cellular mechanism of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48: 237-260.
- KOCHIAN, L.V.; PINEROS, M.A. & HOEKENGA, O.A. 2005. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. *Plant and Soil*, 274: 175-195.
- KOCHIAN, L.V.; HOEKENGA, O.A. & PINEROS, M.A. 2004. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 459-497.
- KRAMER, U.; COTTERHOWELLS, J.D.; CHARNOCK, J.M.; BAKER, A.J.M. & SMITH, J.A.C. 1996. Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature*, 379: 635–638.
- KUPPER, H.; MIJOVILOVICH, A.; MEYER-KLAUCKE, W.; KRONECK, P.M. 2004. Tissue and age-dependent differences in the complexation of cadmium and zinc in the cadmium/zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (Ganges ecotype) revealed by x-ray absorption spectroscopy. *Plant Physiology*, 134: 748-757.
- LAMBERS, H.; CHAPIN, F.S. & PONS, L. *Plant Physiological Ecology*. Springer New York, 2008. 604 p.
- LANCE, C. & RUSTIN, P. 1984. The central role of malate in plant metabolism. *Physiologie Vegetale*, 22: 625-641.
- LEA, P.J.; SODEK, L.; PARRY, M.A.J.; SHEWRY, R. & HALFORD, N.G. 2007. Asparagine in plants. *Annals of Applied Biology*, 150: 1–26.

- LEE, E. H. & FOY, C. D. 1986. Aluminum tolerances of two snapbean cultivars related to organic acid content evaluated by high-performance liquid chromatography. *Journal of Plant Nutrition*, 9: 1481-1498.
- LIBERT, B. & FRANCESCHI, V.R. 1987. Oxalate in crop plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35: 926-938.
- LISEC, J.; SCHAUER, N.; KOPKA, J.; WILLMITZER, L. & FERNIE, A.R. 2006. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols*, 1: 387-396.
- LOESCHER, W.H.; EVERARD, J.D.; CANTINI, C. & GRUMET, R. Sugar alcohol metabolism in source leaves. *In: MADORE, M.A.; LUCAS, W.J. (Ed.). 1995. Carbon partitioning and source-sink interactions in plants: current topics in plant physiology. Rockville: American Society of Plant Physiologists Series, 13: 170-179.*
- LÓPEZ-BUCIO, J.; NIETO-JACOBO, M. F.; RAMÍREZ-RODRÍGUEZ, V. & HERRERA-ESTRELLA, L. 2000. Organic acid metabolism in plants: from adaptative physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. *Plant Science*, 160: 1-13.
- MA, J.F.; HIRADATE, S. & MATSUMOTO, H. 1998. High Aluminum Resistance in Buckwheat. II. Oxalic Acid Detoxifies Aluminum Internally. *Plant Physiology*, 117: 753-759.
- MA, J.F.; RYAN, P.R. & DELHAIZE, E. 2001. Aluminum tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends in Plant Science, Oxford*. 6: 273- 278.
- MA, B.; GAO, L.; ZHANG, H.; CUI, J.; SHEN, Z. 2012. Aluminum-induced oxidative stress and changes in antioxidant defenses in the roots of rice varieties differing in Al tolerance. *Plant Cell Reports*, 31: 687-696.
- MA, J.F.; ZHENG, S.J. & MATSUMOTO, H. 1997<sup>a</sup>. Detoxifying aluminum with buckwheat. *Nature*, 390: 569-570.
- MA, J. F., HIRADATE, S., NOMOTO, K., IWASHITA, T. & MATSUMOTO, H., 1997<sup>b</sup>. Internal detoxification mechanism of Al in *Hydrangea*: identification of Al form in the leaves. *Plant Physiology*, 113: 1033-1039.

- MACEDO, F.M. DE; MARTINS, G.T.; MENDES, C.S.O.; SILVA, C.M.; RODRIGUES, C.G. & OLIVEIRA, D.A. 2007. Determinação de compostos fenólicos totais em barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart) Coville]. *Revista Brasileira de Biociências*, 5: 1164-1165.
- MACHADO, J.W.B. Acumulação de alumínio em *Vochysia thyrsoidea* Pohl. Dissertação (Mestrado). Brasília, 1985. 104p. Universidade de Brasília.
- MAHESHWARI, R. & DUBEY, R.S. 2009. Nickel induced oxidative stress and the role of antioxidant defense in rice seedlings. *Plant Growth Regulation*, 59: 37-49.
- MARTINS, N.; GONÇALVES, S.; ANDRADE, P.B.; VALENTÃO, P. & ROMANO, A. 2013. Changes on organic acid secretion and accumulation in *Plantago almogravensis* Franco and *Plantago algarbiensis* Samp. under aluminum stress. *Plant Science*, 198: 1-6.
- MASUNAGA, T.; KUBOTA, D.; HOTTA, M. & WAKATSUKI, T. 1998. Mineral composition of leaves and bark in aluminum accumulators in a tropical rain forest in Indonesia. *Soil Science and Plant Nutrition*, 44: 347 –358.
- MINOCHA, R.; MINOCHA, S.C.; STEPHANIE, L.L. & SHORTLE, W.C. 1992. Effects of aluminum on DNA synthesis, cellular polyamines, polyamine biosynthetic enzymes and inorganic ions in cell suspension cultures of a woody plant. *Catharauthus roseus*. *Journal of Plant Physiology*. 85: 417-424.
- MITTLER, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Plant Science*, 7: 405-410.
- MIYAGI, A.; UCHIMIYA, M.; KAWAI-YAMADA, M. & UCHIMIYA, H. 2013. Impact of aluminum stress on oxalate and other metabolites in *Rumex obtusifolius*. *Weed Research*, 53: 30–41.
- MOSTOFA, M.G.; HOSSAIN, M.A.; FUJITA, M. & TRAN, L.P. 2015. Physiological and biochemical mechanisms associated with trehalose-induced copper-stress tolerance in rice. *Scientific Reports*, 5: 11433.

- MUNNS, D.N. 1965. Soil acidity and growth of legume. II. Reaction of aluminium and phosphate in solution and effects of aluminium, phosphate, calcium, and pH on *Medicago sativa* L. and *Trifolium subterraneum* L. in solution culture. Australian Journal of Agricultural Research, 16: 743–755.
- MUNNS, R; JAMES, R.A. & LAUCHLI, A. 2006. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. Journal of Experimental Botany, 57: 1025-1043.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15: 473-497.
- NAGATA, T.; HAYATSU, M. & KOSUGE, N. 1992. Identification of aluminium forms in tea leaves by <sup>27</sup>Al NMR. Phytochemistry, 31: 1215–1218.
- NASCIMENTO, M.T. 1989. Herbivoria foliar em *Vochysia divergens* Pohl. Brasil Florestal, 68: 51-54.
- NASCIMENTO, M.T., VILLELA, D.M. & LACERDA, L.D. 1990. Foliar growth, longevity and herbivory in two “cerrado” species near Cuiabá, MT, Brazil. Revista Brasileira de Botânica, 13: 27-32.
- NELSON, D.L. & COX, M.M. Princípios de bioquímica de Lehninger. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1298 p.
- NOCTOR, G. 2006. Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. Plant, Cell & Environment, 29: 409-25.
- OBATA, T. & FERNIE, A.R. 2012. The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. Cellular and Molecular Life Sciences, 69: 3225–3243.
- OFEI-MANU, P.; WAGATSUMA, T.; ISHIKAWA, S. & TWARAYA, K. 2001. The plasma membrane strength of the root-tip cells and root phenolic-compounds are correlated with Al tolerance in several common woody plants. Soil Science and Plant Nutrition, 47: 359–375.

- OH, D.H.; GONG, Q.; ULANOV, A.; ZHANG, Q.; LI, Y.; MA, W.; YUN, D.J.; BRESSAN, R.A. & BOHNERT, H.J. 2007. Sodium stress in the halophyte *Thellungiella halophila* and transcriptional changes in a thsos1-RNA interference line. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49: 1484–1496.
- PEIXOTO, P.H.P.; PIMENTA, D.S. & CAMBRAIA, J. 2007. Alterações morfológicas e acúmulo de compostos fenólicos em plantas de sorgo sob estresse de alumínio. *Bragantia*, 66: 17-25.
- POSCHENRIEDER, C., GUNSÉ, B., CORRALES, I. & BARCELÓ, J. 2008. A glance into aluminum toxicity and resistance in plants. *Science of the Total Environment*, 400: 356–368.
- POPOVA, T.N. & CARVALHO, M.A.A.P. 1998. Citrate and isocitrate in plant metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1364: 307-325.
- POTTER, D.A.; POWELL, A.J.; SPICER, P.G. & WILLIAMS, D.W. 1996. Cultural practices affect root feeding white grubs (Coleoptera: Scarabaeidae) in turfgrass. *Journal of Economic Entomology*, 89: 156-164.
- QUEVAL, G.; HAGER, J.; GAKIERE, B. & NOCTOR, G. 2008. Why are literature data for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> contents so variable? A discussion of potential difficulties in the quantitative assay of leaf extracts. *Journal of Experimental Botany*, 59: 135–146.
- RAHMAN, M.M. & KAWAMURA, O. 2011. Oxalate accumulation in forage plants: some agronomic, climatic and genetic aspects. *Asian - Australasian Journal of Animal Sciences*, 24: 439-448.
- RAMGAREEB, S.; COOKE, J.A. & WATT, M.P. 2004. Responses of meristematic callus cells of two *Cynodon dactylon* genotypes to aluminium. *Journal of Plant Physiology*, 161: 1245-1258.
- RAVEN, J. A.; GRIFFITHS, H. GLIDEWELL, S. M. & PRESTON, T. 1982. The mechanism of oxalate biosynthesis in higher plants: investigations with the stable isotopes <sup>18</sup>O and <sup>13</sup>C. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 216: 87-101.

- RAKHMANKULOVA, Z.F.; FEDYAEV, V.V.; PODASHEVKA, O.A. & USMANOV, I.Y. 2003. Alternative respiration pathways and secondary metabolism in plants with different adaptive strategies under mineral deficiency. *Russian Journal of Plant Physiology*, 50: 206–212.
- RIBEIRO, C.; CAMBRAIA, J.; PEIXOTO, P.H.P & JÚNIOR, E.M. 2012. Antioxidant system response induced by aluminum in two rice cultivars. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 24: 107-116.
- ROCHA, W.S.; LOPES, R.M.; DA SILVA, D.B.; VIEIRA, R.F.; DA SILVA, J.P. & AGOSTINI-COSTA, T.S. 2011. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do Cerrado. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33: 1215-1221.
- SAITO, K. & MATSUDA, F. 2010. Metabolomics for functional genomics, systems biology, and biotechnology. *Annual Review of Plant Biology*, 61: 463–489.
- SASAKI, M.; YAMAMOTO, Y. & MATSUMOTO, H. 1996. Lignin deposition induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum*) roots. *Physiologia Plantarum*, 96: 193-198.
- SAKITA, H.Y. 2013. Anatomia foliar de espécies lenhosas do cerrado sentido restrito do Brasil Central. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas). Faculdade de Ciências e Letras, UNESP.
- SCHAUER, N. & FERNIE, A.R. 2006. Plant metabolomics: towards biological function and mechanism. *Trends in Plant Science*, 11: 508–516.
- SCHAUER, N. STEINHAUSER, D.; STRELKOV, S.; SCHOMBURG, D.; ALLISON, G.; MORITZ, T.; LUNDGREN, K.; ROESSNER-TUNALI, T.; FORBES, M.G.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A.R. & KOPKA, J. 2005. GC–MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. *FEBS Letters*, 579: 1332-1337.
- SILVA, R.C.C. Aspectos fisiológicos, fitoquímicos e proteômicos de *Qualea grandiflora* Mart. em resposta ao alumínio. Dissertação (Mestrado). Brasília, 2012. Universidade de Brasília.
- SINGH, D. & CHAUHAN, S.K. 2011. Organic acids of crop plants in aluminium detoxification. *Current Science*, 100: 1509-1515.



- SMIRNOFF, N. 2000. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-facetted molecule. *Current Opinion in Plant Biology*, 3: 229-235.
- SOMAVILLA, N.S. & GRACIANO-RIBEIRO, D. 2011. Análise comparativa da anatomia foliar de Melastomataceae em ambiente de vereda e cerrado sensu stricto. *Acta Botanica Brasilica*, 25: 764-775.
- STOYANOVA, S.; GEUNS, J.; HIDEG, E. & VAN DEN ENDE, W. 2011. The food additives inulin and stevioside counteract oxidative stress. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 62, 207–214.
- STOOP, J.M.H. & PHARR, D.M. 1994. Mannitol metabolism in celery stressed by excess macronutrients. *Plant Physiology*, 106: 503–511.
- STUMPF, P.K. & CONN, E.E. *The biochemistry of plants*. v. 7. Academic Press, 1981. 798p.
- SUN, X.; ZHANG, J.; ZHANG, H.; NI, Y.; ZHANG, Q.; CHEN, J. & GUAN, Y. 2010. The responses of *Arabidopsis thaliana* to cadmium exposure explored via metabolite profiling. *Chemosphere*, 78: 840–845.
- SUN, T.; LIU, P.; ZHENG, R.; XIE, Z. & LUO, H. 2009. Forms and accumulation of aluminum in tea plant (*Camellia sinensis*). *Acta Agronomica Sinica*, 35: 1909-1915.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. *Plant Physiology*. Porto Alegre, Artmed. 2009. 848 p.
- TEZARA, W.; MITCHELL, V.J.; DRISCOLL, S.D. & LAWLOR, D.W. 1999. Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature*, 401: 914-917.
- TOLRÀ, R.; VOGEL-MIKUS, K.; HAJIBOLAND, R.; KUMP, P.; PONGRAC, P.; KAULICH, B.; GIANONCELLI, A.; BABIN, V.; BARCELO, J.; REGVAR, M. & POSCHENRIEDER, C. 2011. Localization of aluminium in tea (*Camellia sinensis*) leaves using low energy X-ray fluorescence spectro-microscopy, *Journal of Plant Research*, 124: 165–172.

- URBANCZYK-WOCHNIAK, E. & FERNIE, A.R. 2005. Metabolic profiling reveals altered nitrogen nutrient regimes have diverse effects on the metabolism of hydroponically-grown tomato (*Solanum lycopersicum*) plants. *Journal of Experimental Botany*, 56:309–321.
- URANO, K.; MARUYAMA, K.; OGATA, Y.; MORISHITA, Y.; TAKEDA, M.; SAKURAI, N.; SUZUKI, H.; SAITO, K.; SHIBATA, D.; KOBAYASHI, M.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; & SHINOZAKI, K. 2009. Characterization of the ABA-regulated global responses to dehydration in *Arabidopsis* by metabolomics. *Plant Journal*, 57:1065–1078.
- VANCE, C.P. The molecular biology of N metabolism. In D.T. Dennis, D.H. Turpin, D.D. Lefebvre, D.B. Layzell, eds, *Plant Metabolism*, Ed 2. Longman Scientific, London. 449-477. 1997.
- VELOZO, E.S. 1988. Variabilidade de algumas classes de metabólicos secundários em folhas coletadas em três regiões do estado de São Paulo. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- VERSLUES, P.E.; AGARWAL, M.; KATIYAR-AGARWAL, S.; ZHU, J. & ZHU, J.-K. 2006. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant Journal*, 45: 523–539.
- VILLAS-BÔAS, S.G. & GOMBERT, A.K. 2006. Análise do metaboloma. *Biociência*, 36: 58-69.
- WANG, Z.; QUEBEDEAUX, B. & STUTTE, G.W. 1995. Osmotic adjustment: effect of water stress on carbohydrates in leaves, stems and roots of apple. *Australian Journal of Plant Physiology*, 22: 747-754.
- WANG, Y.; XU, L. SHEN, H.; WANG, J. LIU, W.; ZHU, X.; WANG, R.; SUN, X. & LIU, L. 2015<sup>a</sup>. Metabolomic analysis with GC-MS to reveal potential metabolites and biological pathways involved in Pb & Cd stress response of radish roots. *Scientific Reports*, 5: 1-13.
- WANG, H.; CHEN, R.F.; IWASHITA, T.; SHEN, R.F & MA, J.F. 2015<sup>b</sup>. Physiological characterization of aluminum tolerance and accumulation in tartary and wild buckwheat. *New Phytologist*, 205: 273-279.

- WATANABE, T. & OSAKI, M. 2002. Mechanisms of adaptation to high aluminum condition in native plant species growing in acid soils: a review. *Communications in Soil Science and Journal Plant Analysis*, 33: 1247-1260.
- WELCH, W.; WANG, Y.; CROSSMAN JUNIOR, A.; PARK, J.B.; KIRK, K.L. & LEVINE, M. 1995. Accumulation of vitamin C (ascorbate) and its oxidized metabolite dehydroascorbic acid occurs by separate mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 84-92.
- WIDODO P.J.H.; NEWBIGIN, E.; TESTER, M.; BACIC, A. & ROESSNER, U. 2009. Metabolic responses to salt stress of barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars, Sahara and Clipper, which differ in salinity tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 60: 4089–4103.
- XU, Q.; WANG, Y.; DING, Z.; SONG, L.; LI, Y.; MA, D.; WANG, Y.; SHEN, J.; JIA, S.; SUN, H. & ZHANG, H. 2016. Aluminum induced metabolic responses in two tea cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry*, 101: 162-172.
- ZHANG, X.B.; LIU, P.; YANG, Y.S. & XU, GEN-DI. 2007. Effect of Al in soil on photosynthesis and related morphological and physiological characteristics of two soybean genotypes. *Botanical Studies*, 48: 435-444.
- ZUTHER, E.; KOEHL, K. & KOPKA, J. 2007. Comparative metabolome analysis of the salt response in breeding cultivars of rice. In: Jenks MA, Hasegawa PM, Jain SM (eds) *Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerant crops*. Springer, Berlin, pp 285–315.

## CONCLUSÃO GERAL

Os resultados em *Q. grandiflora* mostraram que o Al é um elemento importante para o desenvolvimento e crescimento das plantas. A ausência da suplementação com metal nas plantas controle provocou sintomas de deficiência como clorose e redução do crescimento. Além disso, as plantas do tratamento Al apresentaram maiores concentrações de pigmentos fotossintéticos, o que pode estar relacionado à maior capacidade de produzir fotoassimilados e, além disso, ao melhor desenvolvimento dessas plantas.

A análise quantitativa da concentração foliar de Al mostrou que as plantas tratadas com o metal apresentaram menor teor comparado ao controle. Isto sugere que o Al suplementado está diluído em uma maior área nos tecidos da planta inteira, ou seja, menor quantidade de Al por unidade de massa. Como mostrado, as plantas tratadas com Al apresentaram maior crescimento e desenvolvimento comparado ao controle. Ainda, sugere-se que o sistema radicular das plantas do tratamento Al seja responsável por maior parte do acúmulo do Al suplementado na solução nutritiva. Contudo, mais estudos são necessários a fim de investigar a concentração radicular de Al em *Q. grandiflora*. Em adição, o Al detectado nas plantas controle indicou que o elevado teor do metal presente nas sementes da espécie foi redistribuído entre os diversos órgãos da planta. Em relação à quantificação dos outros elementos, os resultados mostraram que a absorção e transporte de Ca, Mg e P não foram afetadas com a ausência de Al na solução nutritiva das plantas. No entanto, o Al interfere na absorção e transporte de Fe para as partes aéreas de *Q. grandiflora*.

Ainda, a ausência do Al durante o desenvolvimento das plantas afetou a integridade dos cloroplastos, no qual ocorreu a desintegração progressiva desses plastídios nas plantas controle (lâmina foliar com e sem clorose). Isto sugere que a falta do metal na suplementação das plantas resulta em prejuízo no processo fotossintético, indicando que o Al é importante para a manutenção da atividade fotossintética.

O perfil metabólico das plantas de *Q. grandiflora* tratadas com Al mostrou uma redução na biossíntese dos ácidos orgânicos oxalato e citrato comparado ao controle. Como mencionado anteriormente, as plantas do tratamento Al também apresentaram uma menor concentração do metal. Isto sugere que o Al está sendo quelado por esses ácidos orgânicos e ainda, a concentração do oxalato e citrato é proporcional à concentração de Al presente nas folhas. Contudo, a tolerância ao acúmulo de Al em *Q. grandiflora* pode estar relacionada com a

participação do oxalato e citrato na quelação ao metal. Adicionalmente, o aumento dos metabólitos ácido piroglutâmico e sorbitol em plantas controle pode estar associado ao estresse oxidativo que essas plantas se encontram devido à ausência de Al na solução nutritiva durante o crescimento dessas plantas.

Os resultados obtidos abrem perspectivas para trabalhos futuros a fim de confirmar a participação dos ácidos orgânicos no mecanismo de quelação do Al nos tecidos de plantas acumuladoras nativas do Cerrado, já que ainda não há relatos da investigação desse mecanismo. A espectroscopia de  $^{27}\text{Al}$ -NMR detecta as formas de Al presente nas células, podendo verificar a complexação do metal com os ácidos orgânicos, o que é de grande importante para comprovar esse mecanismo de tolerância dessas plantas.