

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – IB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA – PPGBOT**



**PERFIL METABÓLICO DE *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. (VOCHYSIACEAE)
EM RESPOSTA À PRESENÇA DE ALUMÍNIO COM ANÁLISES
HISTOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS**

DARISLENE DE SOUSA ERICEIRA MOREIRA

Brasília/DF

2016

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – IB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA – PPGBOT**



**PERFIL METABÓLICO DE *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. (VOCHYSIACEAE)
EM RESPOSTA À PRESENÇA DE ALUMÍNIO COM ANÁLISES
HISTOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS**

DARISLENE DE SOUSA ERICEIRA MOREIRA

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

A explicação das tuas palavras ilumina e dá discernimento aos inexperientes (Salmos 119:130)

A qual Ele derramou sobre nós com toda a sabedoria e entendimento. (Efésios 1:8)

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me feito imagem e semelhança Dele e me proporcionado a consciência de quem sou, o que tenho e o que posso. Permitindo-me reinar em vida dia após dia. Obrigada Pai porque essa consciência não me fez desistir em meio às circunstâncias. HAHHAH!!!

Ao meu orientador Luiz Alfredo por me aceitar como sua aluna de mestrado. Obrigada por sua paciência, compreensão e acima de tudo pelo seu exemplo de caráter.

Ao nosso querido Mendes, o que seriam de nossas coletas sem você? Coletar com você foi uma das experiências mais botânicas que já tive. Obrigada pela disposição, pelo seu conhecimento e amor no que faz.

Aos professores Eneida, Michelle, Simoni, Sarah e Silvia que além de aceitarem gentilmente o convite para participarem da banca, direta ou indiretamente deram suas contribuições na construção desse trabalho. Em especial ao prof^o Thomas que me auxiliou nos procedimentos e análises dos metabólitos com tanta paciência e dedicação.

Aos funcionários do laboratório de botânica Jéssika e Fábio pelo carinho e presteza em tudo que precisei. Vocês são excelentes!

À secretária da botânica Sarah pela dedicação no seu trabalho e por sua ajudinha em momentos de precisei.

Às colegas de grupo Débora, Michelle, Natália, Renata, Jéssica e Jéssika (técnica) pelo apoio, amizade, discussões, ensinamentos e por toda ajuda prestada. Vocês são muito mais do que colegas. Obrigada a cada uma pela amizade, oração e pelos momentos de diálogos.

Aos estagiários João Pedro, Pedro Gomes, Mariana e em especial Flaviani que de alguma forma participaram desse trabalho.

Aos colegas de outros laboratórios Thiago, Betty e Patrícia que se dispuseram a me auxiliar em programas, técnicas e discussões.

Às lindas babás Simone, Leninha, Layza e Marilza pelo cuidado, carinho e amor que tiveram com meu filho enquanto eu terminava esse manuscrito. Acho que só eu tive esse privilégio de ter quatro babás para um único bebê, rsrs.

Às amigas Bia Diniz e Vanda que compreenderam meu distanciamento e não deixaram nossa amizade esfriar sempre torcendo por mim.

Ao meu pastor Uelson e seus familiares Bia e Wellington. Obrigada a cada um pela amizade, compreensão de minhas ausências e pelas palavras que fizeram toda diferença na minha caminhada. Vocês não poderiam ser menos que um Sucesso!!

À minha família Verbo da Vida de Águas Lindas pela amizade e compreensão.

Aos meus pais Dária e Nivaldo (in memorian) que me ensinaram o caminho bom. Em especial minha mãe que me auxiliou durante essa caminhada e sempre torceu por mim.

Aos meus irmãos Wanney, Júnior Francisco juntamente com suas esposas Fabrícia, Luseli e Silvana pelo companheirismo de cada um e pelos momentos de auxílio com meus filhos.

Aos meus primos, em especial ao Felipe pela disposição, auxílio no inglês e montagem das pranchas e a Viviane pela ajuda prestada em vários momentos.

As minhas cunhadas Kelly e Linda pela ajuda com meus filhos em momentos de aperto e por compreenderem minhas ausências.

Aos meus tios Osvaldo e Vivi que sempre acreditaram e torceram pelo meu sucesso.

À minha Vó Francisca pela sua dedicação em toda minha vida estudantil, sua preocupação com meu trabalho mesmo não entendendo de que se trata e seu auxílio em todo tempo.

À minha sogra D^a Cida por compreender minha ausência, torcer por mim e cuidar de meus filhos com tanto amor e à meu sogro Paulo pelo apoio em vários momentos.

Aos meus sobrinhos (Thiago, Luna, Isaac, Jhuan Pedro, Jhuan Guilherme e Yan), em especial a Thawanny por se importar com meu trabalho e me ouvir com tanta atenção. Grata também por sua ajuda em histoquímica.

Aos meus tesouros e filhos Sarah Robert e Álef Robert por terem vivido momentos de ausência da mamãe mesmo estando tão perto. Sei que no futuro vocês compreenderão. Mamãe ama muito vocês!!!

Ao meu esposo, companheiro e melhor amigo Robert. Obrigada por estar sempre ao meu lado em todo e qualquer momento e por viver comigo os meus sonhos. Pela compreensão das ausências e pela ajuda em tudo. TE AMO!!!

A todos os familiares e amigos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho e torceram por mim.

A todos, meu sincero reconhecimento

SUMÁRIO

1. METABOLIC PROFILE <i>QUALEA DICHOTOMA</i> (MART.) WARM. (VOCHYSIACEAE) IN RESPONSE TO THE PRESENCE OF ALUMINUM WITH PHYSIOLOGICAL AND HISTOCHEMICAL ANALYZES.....	2
1.1. ABSTRACT	2
2.1. RESUMO	4
3. INTRODUÇÃO GERAL	6
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
4.1. ALUMÍNIO NO SOLO.....	9
4.2. EFEITOS DO AL NAS PLANTAS.....	10
4.3. MECANISMOS DE TOLERÂNCIA AO AL.....	12
4.4. EFEITOS DO AL EM PLANTAS DO CERRADO ACUMULADORAS DE AL.....	14
4.5. <i>QUALEA DICHOTOMA</i> (MART.) WARM. (VOCHYSIACEAE)	16
6. OBJETIVO GERAL	19
6.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
1. ANÁLISE DA RESPOSTA FISIOLÓGICA DE <i>QUALEA DICHOTOMA</i> (MART.) WARM. VOCHYSIACEAE NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE ALUMÍNIO.....	33
1.1. ABSTRACT	33
2.1. RESUMO.....	34
3. INTRODUÇÃO	35
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1. <i>Germinação.....</i>	<i>38</i>
4.2. <i>Desenvolvimento das plantas</i>	<i>39</i>
4.3. <i>Quantificação de pigmentos fotossintéticos.....</i>	<i>39</i>
4.4. <i>Análise estatística</i>	<i>40</i>
5. RESULTADOS	40
5.1. <i>Germinação e cultivo das plantas: Preparação para os experimentos</i>	<i>40</i>
5.2. <i>Descrição morfológicas e análise de crescimento das plantas <i>Qualea dichotoma</i> crescidas na presença e ausência de alumínio</i>	<i>41</i>
5.3. <i>Pigmentos fotossintéticos</i>	<i>46</i>
6. DISCUSSÃO	47
6.1. <i>Desenvolvimentos das plantas.....</i>	<i>47</i>
6.2. <i>Análise de pigmentos fotossintéticos.....</i>	<i>49</i>
7. CONCLUSÕES	51
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
1. HISTOCHEMISTRY ANALYSIS WITH HEMATOXYLIN IN PLANT <i>QUALEA DICHOTOMA</i> (MART.) WARM. (VOCHYSIACEAE) IN RESPONSE TO THE PRESENCE OF ALUMINUM.....	61
1.1. ABSTRACT	61
2.1. RESUMO	62

3. INTRODUÇÃO	63
3.1. <i>Detecção da presença de Al em órgãos vegetais</i>	63
3.2. <i>Testes histoquímicos na detecção de Al e plantas acumuladoras</i>	64
4. MATERIAL E MÉTODOS	66
4.1. <i>Material vegetal para testes histoquímicos</i>	66
4.2. <i>Detecção de Al em lâmina foliar, caule e raiz</i>	66
5. RESULTADOS	66
5.1. <i>Diferenças morfoanatômicas para lâmina foliar, caule e raiz de Q. dichotoma em resposta ao Al</i>	66
5.2. <i>Eficiência do reagente hematoxilina na detecção de Al em tecidos de folha, caule e raiz de Qualea dichotoma (Mart.) Warm.</i>	67
6. DISCUSSÃO	73
6.1. <i>Análise anatômica</i>	73
6.2. <i>Localização do Al em Q. dichotoma evidenciado pelo corante hematoxilina</i>	73
7. CONCLUSÕES	76
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
1. ANALYSIS OF METABOLIC PROFILE <i>QUALEA DICHOTOMA</i> (MART.) WARM. (VOCHYSIACEAE) BY GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETER (GC-MS) IN RESPONSE TO THE PRESENCE OR ABSENCE OF AL.	82
1.1. ABSTRACT	82
2.1. RESUMO	83
3. INTRODUÇÃO	84
3.1. <i>O efeito do Al nas plantas</i>	84
3.2. <i>A metabolômica no estudo de estresses de plantas</i>	85
3.3. <i>Perfil metabólico de plantas submetidas a estresses ambientais</i>	86
4. MATERIAL E MÉTODOS	88
4.1. <i>Extração de metabólitos</i>	88
4.2. <i>Derivatização e espectrometria de massa</i>	89
4.3. <i>Análise dos espectros obtidos pelo GC-MS e construção do mapa metabólico</i>	90
5. RESULTADOS	90
5.1. <i>Perfil metabólico por GC-MS</i>	90
5.2. <i>Mapas metabólicos</i>	95
6. DISCUSSÃO	98
6.1. <i>Metabolismo dos ácidos orgânicos em resposta ao Al</i>	98
6.2. <i>Metabolismo de Açúcares não redutores: sacarose</i>	101
6.3. <i>Metabolismo de açúcares redutores</i>	102
6.4. <i>Metabolismo de açúcares alcoólicos: mio-inositol</i>	102
6.5. <i>Metabolismo dos aminoácidos</i>	104
7. CONCLUSÕES	106
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Plantas de *Qualea grandiflora* aos 120 dias de crescimento. **A**- planta sem adição de Al apresentando folhas com sinais de clorose. **B** - Planta com adição de Al apresentando folhas vistosas. **C** - Raiz da planta sem adição de Al (esquerda) e com adição de Al (direita). Fonte: Silva (2012) **16**

Figura 2. Fotos de *Q. dichotoma* (Mart.) Warm. adulta no campo. **A**- Vista geral da planta adulta. **B** – Detalhe do tronco. **C** – Vista detalhada das folhas. **D** – Vista do fruto deiscente já aberto sem sementes. Fotos cedidas por Natália Pires (2016) **18**

CAPÍTULO I

Figura 1. **A** - Vista geral de sementes de *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. aos 20 dias de germinação em gerbox e papel germitest. **B** – Sementes de *Q. dichotoma* germinadas mostrando o sistema radicular (3 - 4 cm) com 20 dias de germinação. **C** – Plantas de *Q. dichotoma* em sacos plásticos com vermiculita após 15 dias de cultivo. À esquerda com Al e à direita sem Al **41**

Figura 2. Plantas de *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. cultivadas em meio $1/5$ MS com e sem a adição de Al (150 μ M) por 30, 60 e 120 dias. **A** – Plantas *Q. dichotoma* cultivadas por 30 dias sem Al (à direita) e com Al (à esquerda). **B**- Plantas de *Q. dichotoma* crescidas por 60 dias sem Al (à direita) e com Al (à esquerda). **C** - Plantas de *Q. dichotoma* cultivadas por 120 dias sem Al (controle -abaixo) e com Al (acima) **44**

Figura 3: Aspectos morfológicos das folhas e raízes de *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. cultivadas na presença e ausência de Al aos 120 dias de cultivo. **A** – Folhas de plantas *Q. dichotoma* aos 120 dias, cultivadas sem Al (à direita) e com Al (à esquerda). **B** - Raízes de plantas de *Q. dichotoma* cultivadas por 120 dias na presença de Al. **C** –

Raízes de plantas de *Q. dichotoma* cultivadas por 120 dias sem Al 45

Figura 4. Comprimento médio de plantas de *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. cultivadas com e sem Al. **A-** Comprimento médio da parte aérea de plantas de *Q. dichotoma* aos 30, 60 e 120 dias de cultivo. **B-** Comprimento médio radicular de plantas de *Q. dichotoma* aos 30, 60 e 120 dias de cultivo. As médias seguidas por (*) são significativamente diferentes pelo teste t ($P \leq 0,05$) 46

Figura 5. Teores médios dos pigmentos fotossintéticos clorofila *a*, clorofila *b*, carotenoides e clorofila *a+b* de plantas de *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. cultivadas por 60 dias com e sem Al (150 μ M). Os asteriscos (*) representam diferença significativa pelo teste t ($P \geq 0,05$) 47

CAPÍTULO II

Figura 1. Teste histoquímico com hematoxilina em lâmina foliar de *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. aos 60 dias de cultivo com e sem Al. **A-** Aspecto geral das folhas dos tratamentos. À esquerda folha de planta crescida com Al. À direita folha de planta crescida sem Al. **B-** Secção transversal da nervura principal da folha de *Q. dichotoma* cultivada sem Al sem reação com hematoxilina. **C-** Secção transversal da nervura de *Q. dichotoma* cultivada com Al não corada com hematoxilina. **D-F-** Secção transversal da folha de *Q. dichotoma* corada com hematoxilina cultivadas sem a presença de Al. **D-** Nervura principal. **E-** Detalhe do feixe vascular da nervura principal. **F-** Região parenquimática da nervura principal. **G-I-** Cortes transversais da folha de *Q. dichotoma* corada com hematoxilina cultivadas na presença de Al. **G-** Nervura principal de folha corada com hematoxilina. **H-** Feixe vascular da nervura principal. **I-** Parênquima da Nervura principal na face abaxial. Eab: epiderme abaxial, Ead: Epiderme adaxial, cv: câmbio vascular, Pa: parênquima, Fl: floema, Xi: xilema. Barras de Escalas: B-C: 200 μ m; D-H: 100 μ m; F-I: 25 μ m. Seta indica a reação positiva no xilema..... 70

Figura 2. Teste histoquímico para detecção de Al em caule de *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. com 60 dias de cultivo na presença e ausência de Al. **A-C-** Secções transversais do caule de *Q. dichotoma* sem uso de corante. **D-F-** Cortes transversais do caule de *Q. dichotoma* cultivada sem Al corado com hematoxilina. **G-I-** Caule de *Q.*

dichotoma em secção transversal cultivada com Al corado com hematoxilina. Perceba a diferença na intensidade de coloração entre amostras dos dois tratamentos. Ct: córtex, Ep: epiderme, Fbf: fibras do floema, Flb: fibras libriformes, Fl: floema, Me: medula, Xi: xilema. Escalas: A, B, D, E, I – 200 µm; C, F, G, H – 100 µm 71

Figura 3. Secções transversais de raízes de *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. aos 60 dias de cultivo na presença e ausência de Al coradas com hematoxilina. **A-B-** Raízes de *Q. dichotoma* sem uso de corante. **C-D.** Raízes de *Q. dichotoma* cultivada sem Al e coradas com hematoxilina. **E-F-** Raízes de *Q. dichotoma* cultivadas com Al e coradas com hematoxilina. Ct: córtex, En: endoderme; Ep: epiderme, Fl: floema secundário, Pe: periderme, Xi: xilema secundário. Barras de Escalas: A, C, F – 100 µm; E – 200 µm 72

CAPÍTULO III

Figura 1: Perfil metabólico comparativo em folha de *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. cultivada por 60 dias com e sem Al. O asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos ($P \leq 0,05$) 96

Figura 2: Perfil metabólico comparativo em raiz de *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. cultivada por 60 dias com e sem Al. O asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos ($P \leq 0,05$) 97

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Detecção de Al por análise histoquímica com hematoxilina na raiz, caule e lâmina foliar de plantas de *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. aos 60 dias de cultivo na presença e ausência de Al (150 µM) **69**

CAPÍTULO III

Tabela 1- Relação de metabólitos encontrados em folha de *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. aos 60 dias de cultivo, crescidas com e sem alumínio **93**

Tabela 2- Relação de metabólitos identificados em raiz de *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. aos 60 dias de cultivo, crescidas com e sem alumínio **94**

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

5-OP: 5-oxoprolina

AIA: Ácido-3-indol-acético

Al: Alumínio

Al³⁺: Alumínio trivalente

AMDIS: Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System

B.O.D: Câmara de crescimento

Ca: Cálcio

Cd: Cádmio

DAP: Diâmetro à altura do peito

DMF: N, N-dimetilformamida

Fe: Ferro

GC-MS: Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IVI: Índice de valor de importância

K: Potássio

Mg: Magnésio

Mn: Manganês

Mo: Molibdênio

MSTFA: N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide

N: Nitrogênio

NaClO : hipoclorito de sódio

NIST: National Institute of Standards and Technology

O: Oxigênio

P: Fósforo

Pb: Chumbo

ROS: Espécies reativas de oxigênio

Si: Silício

TCA: Ácido tricarboxílico

VANTED: Visualisation and Analysis of Networks Containing Experimental Data

**PERFIL METABÓLICO DE *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm.
(VOCHYSIACEAE) EM RESPOSTA À PRESENÇA DE ALUMÍNIO COM
ANÁLISES HISTOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS**

1. Metabolic profile *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. (Vochysiaceae) in response to the presence of aluminum with physiological and histochemical analyzes.

1.1. Abstract

The aluminium (Al), in acid soils, becomes quite toxic to many plants and limits crop production worldwide. However some species of the Cerrado do not resent the presence Al, on the contrary, they benefit from it and may accumulate this metal in large quantities in their tissues. This event is not well understood and only few works depict biochemical and molecular aspects of this phenomenon. Thus, the aim of this study was to analyze the growth of *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. in the presence and absence of Al, as well as physiological and metabolic aspects concerning the role of this metal in this species. Also, the mobilization of Al within the plant was also investigated in order to understand how this species reacts to the presence and absence of Al. Therefore, 120 day-old *Q. dichotoma* plants were grown with and without Al (AlCl_3 - 150 μM). Growth analyses were performed at 30, 60 and 120 days using 20 individuals of each treatment. After 60 days, photosynthetic pigments, Al mobilization by histochemical tests and quantification of metabolites by GC-MS in both treatments were analyzed. Sixty-day old plants treated with Al had higher shoot and root growth, as well as higher levels of chlorophyll *a*, *b* and carotenoids. The histochemical test revealed that both treatments showed staining for leaf (midrib) and root, but plants grown with Al appeared to stain more intensely. The shoot of plants that did not receive Al showed no staining, indicating that it does not accumulate Al and work as a pathway from roots to shoots. The metabolic analysis showed that there was four times more organic acids in plants that did not receive Al, suggesting the possibility of *Q. dichotoma* plants were under stress Al due to the lack of Al. Additionally, the amino acid serine was abundant in roots from control plants. Moreover, together with the high content of reducing sugars may indicate an abiotic stress associated with the absence of Al supplementation. Conversely, the greater abundance of *myo*-inositol, quinic acid and sucrose in leaves and roots of Al-treated plants may be related to better development of these plants. The data strongly suggests that *Q. dichotoma* use Al in its metabolism, which, somehow, promotes better growth and development of this plant.

Keywords: Aluminium, *Qualea dichotoma*, Metabolic profile, histochemistry, physiological response.

2. Perfil metabólico de *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. (Vochysiaceae) em resposta à presença de alumínio com análises histoquímicas e fisiológicas.

2.1. Resumo

O Al, em solos ácidos, torna-se bastante tóxico para muitas plantas e limita a produção de culturas em todo o mundo. No entanto algumas espécies do Cerrado não ressentem a presença do Al, pelo contrário, beneficiam-se desse metal, acumulando-o em grandes quantidades em seus tecidos. As respostas para este evento ainda não são muito conhecidas devido poucos trabalhos retratarem os aspectos bioquímicos e moleculares a respeito. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi analisar o crescimento de *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. na presença e ausência de Al, bem como analisar aspectos fisiológicos e metabólicos relacionados com o papel deste metal nesta espécie. Além disso, a mobilização do Al dentro da planta foi investigada, a fim de compreender como esta espécie reage na presença e ausência de Al. Portanto, por 120 dias plantas de *Q. dichotoma* foram cultivadas na presença e ausência de AlCl_3 (150 μM). As análises de crescimento foram realizadas aos 30, 60 e 120 dias, utilizando 20 indivíduos de cada tratamento. Após 60 dias foram analisados os pigmentos fotossintéticos, a mobilização do Al por testes histoquímicos e a quantificação de metabólitos por GC-MS nos dois tratamentos. A partir dos 60 dias as plantas tratadas com Al apresentaram maiores crescimentos aéreo e radicular assim como maiores teores de clorofila *a*, *b* e carotenoides. O teste histoquímico revelou que ambos tratamentos apresentaram coloração para folha(nervura central) e raiz, porém as plantas cultivadas com Al tiveram coloração mais intensa. O caule das plantas que não receberam Al não apresentaram nenhuma coloração, indicando que este não acumula Al e pode ser apenas um caminho do metal das raízes para as folhas. A análise metabólica mostrou que havia quatro vezes mais ácidos orgânicos nas plantas que não receberam Al, indicando a possibilidade de *Q. dichotoma* não sofrer com o estresse do Al. Adicionalmente o aminoácido serina foi abundante em raízes das plantas controle. Além disso, juntamente com o elevado teor de açúcares redutores pode indicar um estresse abiótico associado com a ausência de Al. Em contrapartida, a maior abundância de *mio*-inositol, ácido quínico e sacarose nas folhas e raízes das plantas tratadas com Al pode estar relacionada ao melhor desenvolvimento dessas plantas. Os dados sugerem fortemente que *Q. dichotoma* utiliza

o Al em seu metabolismo, o que, de alguma forma, promove um melhor crescimento e desenvolvimento da planta.

Palavras chave: Alumínio, *Qualea dichotoma*, perfil metabólico, histoquímica, resposta fisiológica.

3. INTRODUÇÃO GERAL

O alumínio tem sido um fator que muito tem contribuído para a limitação na produção de inúmeras culturas em diversas partes do mundo. Quando em $\text{pH} < 5,5$ o Al é solubilizado no solo e forma o íon trivalente Al^{3+} que é sua versão mais tóxica para a maioria das plantas (Kochian, 1995). O fato é que para estas plantas a presença desse metal no solo juntamente com outros fatores pode ocasionar dentre outras consequências uma diminuição de elementos como fósforo (P), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e potássio (K) que são essenciais para o crescimento normal das plantas (Kochian, 1995; Echart e Cavalli-Molina, 2001).

Desta forma, com tamanha importância para agricultura e conseqüentemente para economia, o efeito tóxico do Al em plantas tem sido bastante estudado nas últimas décadas, sendo relatado por vários autores muitos efeitos que são comuns para a maioria das plantas consideradas sensíveis, como trigo (Delhaize e Ryan, 1995; Ma *et al.*, 2004), arroz (Vicente *et al.*, 1998), milho (Wang *et al.*, 2015) e feijão (Massot *et al.*, 1999, 2002). Estas plantas quando expostas mesmo a quantidades mínimas de Al são afetadas drasticamente.

Este efeito tóxico mais severo se dá basicamente pela capacidade que o Al mais fitotóxico (Al^{3+}) tem de se ligar a componentes celulares como membrana plasmática, parede celular e protoplasma (Kochian *et al.*, 2004). Uma vez apresentado à planta, o Al afeta o sistema radicular e compromete a absorção de água e nutrientes levando a uma diminuição do crescimento e desenvolvimento geral das plantas sensíveis (Tabaldi, 2008). Em consequência, as características da intoxicação observadas na parte aérea da planta em geral são de deficiências nutricionais como clorose e atrofiamento foliar (Codognotto *et al.*, 2002).

Em resumo, o Al pode agir direta ou indiretamente no funcionamento de todo o metabolismo da planta, podendo oxidar biomoléculas como pigmentos fotossintetizantes, proteínas, lipídios e ácidos nucléicos (Minocha *et al.* 1992; Kochian, 1995). Em consequência este metal pode afetar negativamente eventos essenciais como a fotossíntese e a síntese de aminoácidos, ácidos orgânicos e açúcares (Miguel *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2016).

Contudo os efeitos maléficos do Al são sentidos diferentemente por cada espécie de vegetal. Estudos relatam que muitas espécies desenvolveram mecanismos capazes de defender a planta contra os efeitos do Al (Kochian, 1995; Ma *et al.*, 2001; Delhaize *et al.*, 2012). O primeiro é conhecido como mecanismo de exclusão, no qual a planta libera ácidos orgânicos capazes de quelar o Al ainda na rizosfera, não permitindo a entrada deste no simplasto (Kochian, 1995; Ma *et al.*, 2001). Espécies com mecanismos de exclusão geralmente não conseguem acumular mais que 0,1g de Al.Kg⁻¹ de matéria seca (Chenery, 1948) sendo chamadas de resistentes. Já as plantas capazes de tolerar quantidades de pelo menos 1g de Al.Kg⁻¹ de matéria seca (Chenery, 1948) em seus tecidos são conhecidas como tolerantes. Estas espécies realizam o segundo mecanismo, que é relatado na literatura como desintoxicação interna, ou seja, a planta permite a entrada do Al, porém imobiliza-o internamente com ácidos orgânicos em compartimentos celulares inativando-o na planta (Kochian, 1995; Ma *et al.*, 2001; Hartwig *et al.*, 2007; Ryan *et al.*, 2011).

Estudos tem mostrado que biomas como o Cerrado, que possui um solo tipicamente ácido, abriga diversas famílias com espécies representantes capazes de acumular grandes quantidades Al que podem chegar até 14 g de Al.Kg⁻¹ de matéria seca em tecido foliar. Dentre estas, algumas famílias (Melastomataceae, Rubiaceae e Vochysiaceae) têm recebido destaque na literatura (Haridasan, 1982). Até o momento os estudos envolvendo estas espécies e o Al tem sido voltado para aspectos fisiológicos e histoquímicos, os quais revelaram uma dependência facultativa ou não destas plantas ao metal e sua translocação dentro da planta (Machado, 1985; Haridasan, 2008¹; Silva, 2012). Diante disto torna-se de grande valia estudos moleculares e bioquímicos que possam contribuir para a elucidação do metabolismo do Al nestas plantas já que estes são pouco encontrados na literatura (Silva, 2012).

Portanto a espécie escolhida para a realização deste trabalho foi a *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm., dentre outros fatores por estar inserida em uma família (Vochysiaceae) do Cerrado, na qual todos os indivíduos são acumuladores de grandes quantidades de Al. *Q. dichotoma* pode ser encontrada em diversos tipos de solos, porém com maior frequência em solo distrófico com pH 4,5 a 4,7 (Rodrigues e Monteiro de Araújo, 2013). O objetivo deste trabalho é analisar esta espécie na presença e ausência de Al quanto aos aspectos fisiológicos, morfológicos, histoquímicos e

metabólicos a fim de se obter informações que possam vislumbrar o metabolismo do Al nesta espécie acumuladora.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Alumínio no solo

Os solos do Cerrado são tipicamente ácidos (pH ~ 5,5) e distróficos. Esse fato se deve à intensa lixiviação durante longo período geológico que levou ao empobrecimento nutricional e acidez característica. Tais características do solo do Cerrado se devem à contínua retirada de elementos químicos do solo como Ca e Mg e a concomitante substituição destes por Al e hidrogênio (H). Além disso, os baixos teores de matéria orgânica, de nitrogênio (N), de K e elevados níveis de ferro (Fe) e manganês (Mn), que contribuem para aumentar a acidez são características destes solos (Malavolta, 1980; Lopes *et al.*, 1991; Oliveira *et al.*, 2005; Coutinho, 2006).

O Al é o terceiro elemento mais abundante na crosta terrestre (Jansen *et al.*, 2002) perdendo apenas para o silício (Si) e oxigênio (O) (Ma *et al.*, 2001). A disponibilidade do Al é controlada principalmente pelo fator pH do solo (Malavolta, 1980). Em solos neutros o Al forma complexos estáveis com o Si e O, porém em solos ácidos (pH < 5,5) este metal é solubilizado na solução do solo formando o íon trivalente Al^{3+} . O Al^{3+} é a forma de maior fitotoxicidade para a maioria das plantas (Kochian, 1995; Ma *et al.*, 2001; Jansen *et al.*, 2002).

A literatura mostra que, mesmo em concentrações reduzidas, muitas espécies de plantas são negativamente afetadas pelo Al^{3+} nos solos, limitando a produtividade de muitas culturas como de trigo (Delhaize e Ryan, 1995; Ma *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2004; Freitas *et al.*, 2006), sorgo (Andrade Júnior *et al.*, 2005), arroz (Vicente *et al.*, 1998), milho (Li *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2015), feijão (Massot *et al.*, 1999, 2002) e pinheiro (Zhang *et al.*, 2014). Desta forma, para a prática da agricultura no Cerrado é essencial o uso da calagem, que consiste na adição de calcário nas camadas superficiais do solo visando a elevação do pH. Além de corrigir a acidez, a calagem facilita o acesso das raízes a diversos nutrientes existentes no solo. Esse processo aumenta os níveis de Ca e Mg nos solos, e também eleva a saturação de bases além de diminuir os teores de H^+ e Al^{3+} (Natale *et al.*, 2007).

4.2. Efeitos do Al nas plantas

O Al, em plantas sensíveis, forma um complexo com alguns elementos essenciais como Ca, Mg, molibdênio (Mo), K e principalmente o P, interferindo na absorção e movimentação desses elementos na planta (Kochian, 1995; Echart e Cavalli-Molina, 2001). Em arroz, De Mendonça *et al.* (2003) observaram que o Al reduziu significativamente a eficiência de utilização de P e Ca. Esse efeito do Al também foi observado por Freitas *et al.* (2006) na mesma espécie, onde além destes nutrientes o Al também reduziu a absorção de Mg e K. Igualmente em raízes de milho, baixas quantidades de Al foram suficientes para diminuir a quantidade de K, P e Mg (Wang *et al.*, 2015). Em pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) o aumento da concentração de Al na solução reduziu os teores de P nas folhas e de Ca e Mg nas folhas e raízes (Steiner *et al.*, 2012).

Portanto, alguns dos sinais vistos em plantas sensíveis ao Al são decorrentes da deficiência de nutrientes provocados pela presença desse metal, pois este pode se ligar a compostos como o P por exemplo e formar aluminofosfatos que são menos solúveis para as plantas. Em consequência ocorre a diminuição na absorção de P (Basso *et al.*, 2003; Liao *et al.*, 2006; Basso *et al.*, 2007; Ward *et al.*, 2011; Mimmo *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015) que leva à algumas anormalidades como por exemplo clorose provocada pela interferência na biossíntese de clorofila e atrofiamento das folhas (Codognotto *et al.*, 2002; Peixoto *et al.*, 2007).

Diversos estudos apontam o ápice radicular como sítio primário da ação do Al, sendo que seus efeitos sobre o crescimento e desenvolvimento das raízes são rapidamente refletidos em toda planta (Kochian, 1995; Braccini *et al.*, 1998; Kochian *et al.*, 2004; Barceló e Poschenrieder, 2002; Andrade Júnior *et al.*, 2005; Hartwig *et al.*, 2007; Steiner *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015). Delhaize e Ryan (1995) observaram que o início da inibição do crescimento de raízes de feijão ocorria em apenas 60 s após exposição a concentrações micromolares de Al. Além disso, esses autores observaram que o ápice radicular acumulava mais Al que outras partes da raiz. Adicionalmente, em pinhão-manso (*Jatropha curcas*) foi verificado uma diminuição progressiva do crescimento tanto de raízes quanto da parte aérea à medida que se aumentava as concentrações de Al de 370 a 1.480 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Steiner *et al.*, 2012). Além

disso, plantas de pinhão tratadas com Al apresentaram anormalidades típicas de injúrias provocadas por este metal. Um padrão similar ao descrito acima de resposta ao Al também foi verificado em sorgo (Andrade Júnior *et al.*, 2005), feijão (Massot *et al.*, 1999, 2002), trigo (Delhaize e Ryan, 1995; Ma *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2004; Freitas *et al.*, 2006), arroz (Vicente *et al.*, 1998) e milho (Li *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2015).

Em geral as raízes das plantas crescidas com Al apresentam coloração amarelada ou escuras nas pontas devido a oxidação de compostos fenólicos. Além destes sinais de toxicidade do Al, as raízes podem se apresentar tortuosas e espessadas, com ramificações laterais e sem a presença de pelos absorventes. Como resultado disso, a absorção de água e nutrientes é seriamente afetada. Anatomicamente um fenômeno que também contribui para isso é o enrugamento ou até mesmo o colapso das células radiculares em função do tempo de exposição e quantidade de Al (Codognotto *et al.*, 2002; Peixoto *et al.*, 2010; Miguel *et al.*, 2010.). Em adição, foi verificado que a coifa e meristemas do ápice também são afetados. Nesse caso se observa que o tamanho da coifa é reduzido e os tecidos meristemáticos sofrem um rearranjo (Codognotto *et al.*, 2002; Peixoto *et al.*, 2010). Assim, com os problemas de absorção de água e nutrientes como efeitos do Al, bem como no transporte destes na planta torna o desenvolvimento geral da planta comprometido (Tabaldi, 2008).

Outros efeitos do Al no metabolismo das plantas também estão relatados na literatura. Por exemplo, o Al tem sido associado com a diminuição do crescimento pela inibição da divisão celular por agir sobre elementos do citoesqueleto, como microtúbulos e actina (Duressa *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014). Nesse caso o Al interage com a enzima fosfolipase C que está associada às vias de transporte de Ca, o qual tem seus níveis e translocação alterados. Isso faz com que as células percam sua elasticidade e tenham volume diminuído (Kochian, 1995; Sivaguru *et al.*, 1999; Hartwig *et al.*, 2007). Em *Pinus massoniana* Lamb. crescendo na presença de Al se observou a formação de microtúbulos descontínuos ou fragmentados, resultando em aberrações cromossômicas e conseqüentemente na inibição da divisão celular (Zhang *et al.*, 2014).

Além das alterações nutricionais e citológicas na planta, o Al também pode provocar alterações fisiológicas e bioquímicas, afetando o metabolismo de açúcares, a fotossíntese, a respiração, a síntese de aminoácidos e de ácidos orgânicos (Rossiello e

Neto *apud* Fernandes, 2006; Miguel *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2016). Como exemplo, sabe-se que a síntese de cisteína é aumentada em resposta à presença de Al (Duressa *et al.*, 2011). A cisteína é um aminoácido crucial para a síntese de vários metabólitos como a glutatona reduzida, adenosil-metionina e metionina que participam em processos de antioxição e desintoxicação do Al relacionados com a tolerância ao Al (Yang *et al.*, 2007; Duressa *et al.*, 2011). Adicionalmente, em plantas resistentes/tolerantes o Al aumenta a biossíntese e acúmulo de ácidos orgânicos que também participam do processo de desintoxicação ao quelar e inativar o Al (Kumari *et al.*, 2008; Eticha *et al.*, 2010; Kosova *et al.*, 2011; Inostroza-Blancheteau *et al.*, 2012; Brunner e Sperisen, 2013; Kochian *et al.*, 2015).

Outro efeito metabólico do Al é o acúmulo de ROS (espécies reativas de oxigênio – O₂ e H₂O₂). Nesse processo ocorre um aumento de peroxidases (catalase, peroxirredoxina), as quais são importantes na eliminação dessas ROS (Yamamoto *et al.*, 2002; Sharma e Dubey, 2007), visto que esses compostos são que auxiliam no processo de antioxição celular (Sharma e Dietz, 2006). Além disso, tem-se verificado uma maior expressão de outras proteínas como Rubisco e ATP sintase relacionadas com a fotossíntese e produção de energia na planta, respectivamente (Silva, 2012). Alterações na permeabilidade da membrana plasmática em resposta à presença de Al também foram constatadas. Em cultivares como arroz e soja quando submetidas ao metal apresentaram aumento na expressão de proteínas de membrana, as quais são responsáveis por intermediar a transdução de sinal além de funcionar como fatores de transcrição e transporte (Yang *et al.*; 2007; Zhen *et al.*, 2007).

4.3. Mecanismos de tolerância ao Al

As plantas desenvolveram alguns mecanismos de defesa contra o Al. Esses mecanismos podem ser classificados da seguinte forma: o primeiro é caracterizado como mecanismo de exclusão, pois as plantas não permitem a entrada desse metal e os teores de Al não ultrapassam mais que 0,1g de Al.Kg⁻¹ de matéria seca (Chenery, 1948). O segundo mecanismo de proteção contra o Al é caracterizado pela desintoxicação interna. Assim, o Al é quelado no interior das plantas e os ácidos orgânicos fazem a imobilização do Al no simplasto, sequestrando e formando complexos estáveis no citosol e dentro de compartimentos celulares como vacúolos e membrana plasmática

(Kochian, 1995; Ma *et al.*, 2001; Hartwig *et al.*, 2007; Ryan *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2014).

Concernente às plantas que possuem o mecanismo de exclusão do Al, ácidos orgânicos como malato, citrato e oxalato são liberados pelas raízes formando complexos estáveis com este metal imobilizando o Al na rizosfera. Essa estratégia impede que o Al adentre o simplasto ou interaja com algum componente celular da planta. (Delhaize *et al.*, 1993; Kochian, 1995; Kochian *et al.*, 2004; Ma, 2000, Ma *et al.*, 2001; Ryan *et al.*, 2001, 2009, 2011; Mariano *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2014; Kochian *et al.*, 2015).

Muitas plantas de interesse agrônômico possuem cultivares que têm a exclusão do Al como mecanismo de defesa como, por exemplo, a cevada (*Hordeum vulgare* L.) (Zhao *et al.*, 2003), *Citrus junos* Sieb. ex Tanaka (Deng *et al.*, 2009), *Citrus grandis* L. Osbeck (Yang *et al.*, 2011), e *Citrus sinensis* L. Osbeck (Yang *et al.*, 2012), milho (*Zea mays* L.) (Pellet *et al.*, 1995), soja (*Glycine max* L. Merr.) (Yang *et al.*, 2000; Liao *et al.*, 2006), trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum* Moench. cv. Jianxi) (Zheng *et al.*, 1998) centeio (*Secale cereale* L. cv King) (Li *et al.*, 2000), sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) (Kochian *et al.*, 2005). É importante ressaltar que nem sempre a quantidade de ácidos orgânicos secretado é parâmetro para se medir o nível de resistência de determinada planta ao Al. Existem vários exemplos na literatura que mostram genótipos mais sensíveis ao Al que exsudam mais ácidos orgânicos do que os mais tolerantes (Nian *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2008).

Tem-se constatado que a exsudação de ácidos orgânicos pode ocorrer de formas diferentes dentro do mecanismo de exclusão (Ma, 2000; Ma *et al.*, 2001) No padrão I, a partir do momento em que a planta é exposta ao Al os ácidos orgânicos são rapidamente ativados e exsudados a partir da ativação de um transportador na membrana. Nesse padrão a taxa de secreção dos ácidos orgânicos permanece constante mesmo aumentando o tempo de exposição e, portanto, não há a necessidade para ativação de genes (Ma, 2005; Mariano *et al.*, 2005).

Já no padrão II, o Al induz a expressão de genes e a síntese de proteínas envolvidas no metabolismo e transporte de ânions de ácidos orgânicos. A liberação dos ácidos orgânicos acontece de forma mais tardia e ocorre um aumento na taxa de

secreção desses ácidos de acordo com o tempo de exposição ao Al (Ma, 2000,2005; Ma *et al.*, 2001; Mariano *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2013).

Com respeito ao mecanismo de desintoxicação interna do Al, este tipo é mais comumente verificado em espécies conhecidas como acumuladoras de Al, as quais estocam no mínimo 1g de Al.Kg⁻¹ de matéria seca (Chenery, 1948). Um exemplo clássico de acumuladora de Al é a hortênsia (*Hydrangea macophylla* Thunb. Ser) que é capaz de acumular até 3 g de Al.Kg⁻¹ de matéria seca, complexados com citrato em suas folhas e pétalas quando em solos ácidos (Ma *et al.*, 1997). Em outra planta acumuladora, *Melastoma malabathricum* L., o Al também é complexado com citrato (Ma *et al.*, 2001; Watanabe e Osaki, 2002). Uma planta acumuladora, *Camellia sinensis* L., uma espécie de chá, tem recebido muita atenção em estudos sobre tolerância a este metal. Essa planta além de acumular altos teores de Al em suas folhas tem seu crescimento favorecido na presença de Al (Mukhopadyay *et al.*, 2012; Hajiboland *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2016). Além dessas espécies, o trigo sarraceno (Klug e Hort, 2010), *Brachiaria decumbens* (Stapf cv Basilisk) e *Brachiaria ruziziensis* (R. Ger e Evrard.) (Wenzl *et al.*, 2001, 2002) também são tolerantes ao Al e acumulam altos teores desse metal.

4.4. Efeitos do Al em plantas do Cerrado acumuladoras de Al

Plantas acumuladoras de Al têm sido estudadas há bastante tempo, podendo ser encontradas em savanas da Austrália, assim como em outras partes do mundo. No Cerrado, Goodland (1971) foi um dos pioneiros a estudar a relação dos altos teores de Al presente nos solos deste bioma e em sua flora. Goodland (1971) sugeriu que o escleromorfismo apresentado por espécies nativas estaria diretamente associado às condições ácidas dos solos do Cerrado. No entanto, foi Haridasan (1982) quem constatou a presença de elevadas quantidades de Al em folhas de espécies do Cerrado pertencentes às famílias Melastomataceae (*Miconia ferruginata* DC. e *Miconia pholiana* Cogn.), Rubiaceae (*Palicourea rígida* Kunth.) e Vochysiaceae (*Qualea grandiflora* Mart., *Qualea multiflora* Mart., *Qualea parviflora* Mart., *Vochyseia thyrsoides* Phol., *Vochyseia elíptica* Mart.). O Autor observou que essas plantas continham mais de 1g de Al.Kg⁻¹ de matéria seca em suas folhas. Por essa razão, essas plantas foram classificadas como acumuladoras de Al (Chenery, 1948). Adicionalmente,

em estudos posteriores de Haridasan e Araújo (2005) mostraram que todas as Vochysiaceae são acumuladoras de Al.

As plantas do Cerrado estão adaptadas às condições edáficas deste bioma. Tem-se verificado que algumas espécies acumuladoras também podem ocorrer em solos mesotróficos (pH > 6,0 e teores de Ca e Mg mais elevados) como é o caso da *Callisthene fasciculata* e várias espécies de *Qualea* (Haridasan, 1982; Medeiros e Haridasan, 1985; Haridasan e Araújo, 1988). *Q. grandiflora* é conhecida por acumular Al tanto em solos distróficos como em solos mesotróficos (Haridasan, 1987). Plantas de *Q. grandiflora* se desenvolvem melhor na presença de Al (Silva, 2012). Assim, comparadas com o respectivo controle (sem Al) plantas crescidas com Al apresentaram maior peso seco, maior crescimento da parte aérea e radicular e não apresentaram sinais de senescência. Por outro lado, a ausência de Al resultou em sinais de clorose e necrose em folhas, além de raízes oxidadas (Figura 1). Esse fato já havia sido observado anteriormente por Haridasan (2008¹) em *M. albicans*, que também é acumuladora de Al, quando em solos calcários e com baixos teores de Al apresentou sinais cloróticos nas folhas, porém ao serem transplantadas para solos ácidos a clorose foliar desapareceu. Semelhantemente, *Vochysia thyrsoidea* Pohl também teve o seu crescimento e aparência foliar comprometidos em solos calcários (Machado, 1985).

Quanto a acumulação de Al em acumuladoras nativas deste bioma, pode chegar até 14 g de Al. Kg⁻¹ de matéria seca (Haridasan, 1982) em tecidos dos representantes da família Vochysiaceae. Baseado no índice de valor de importância (IVI), como mostrado por Ribeiro (1985) em estudos com composição florística de três fitofisionomias do Cerrado, esta é uma das famílias mais importantes da flora lenhosa do Cerrado (Haridasan e Araújo, 1988).

O Al está presente em todas as espécies da família Vochysiaceae (Jansen *et al.*, 2002) sendo possível encontrar diversos estudos que relacionam crescimento e desenvolvimento das plantas com o Al. Em muitos destes estudos é notável que os autores não tem considerado o efeito tóxico do Al para estas espécies, visto que a ausência do metal tem causado sintomas na planta semelhantes a estresse (Machado, 1985; Haridasan, 2008^{1,2}, Silva, 2012).

Uma das espécies de Vochysiaceae, *Qualea grandiflora*, se destaca por ser uma das mais abundantes e mais importantes do Cerrado, como por exemplo em aspectos nutricionais (Goodland, 1971; Ribeiro, 1983; Araújo, 1984). Além disso, entre as acumuladoras do gênero, *Q. grandiflora* tem se destacado em estudos relacionados ao Al como de análise de crescimento, localização do metal em tecidos e perfil proteico (Haridasan, 1982; Andrade *et al.*, 2007; Silva, 2012).



Figura 1. Plantas de *Qualea grandiflora* aos 120 dias de crescimento. **A.** planta sem adição de Al apresentando folhas com sinais de clorose. **B.** planta com adição de Al apresentando folhas vistosas. **C.** raiz da planta sem adição de Al (esquerda) e com adição de Al

4.5. *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. (Vochysiaceae)

Inserida na família Vochysiaceae, *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. (Figura 2), planta objeto do presente estudo, é popularmente conhecida como pau terra da areia, de hábito arbóreo, medindo de 10 – 18 m de altura e DAP (diâmetro à altura do peito) de 40-50 cm. Suas folhas são simples e coriáceas, tomentosas na face abaxial e glabras na face adaxial. A floração ocorre entre outubro e novembro e o amadurecimento dos frutos de Agosto a Setembro do ano subsequente (Lorenzi, 1992).

Q. dichotoma é uma planta com muitas características xeromórficas e pode ser encontrada em vários tipos de solos incluindo terrenos arenosos, contudo prefere terrenos onde a drenagem é baixa (Lorenzi, 1992). *Q. dichotoma* pode ser encontrada também na formação de florestas semi-decídua (Oliveira-Filho e Fontes, 2000). Porém, assim como a maioria das espécies de Vochysiaceae, *Q. dichotoma* ocorre com maior

frequência em solo distrófico com pH 4,5 a 4,7 e saturação de bases de 4% a 5% (Rodrigues e Monteiro de Araújo, 2013).

Estudos em matas de galeria ou ciliares foi verificado a ocorrência de *Q. dichotoma* neste ambiente. Nessas condições *Q. dichotoma* é uma das representantes com maior DAP médio e maior capacidade de produção de carvão vegetal, além de ter a maior produção de biomassa conjuntamente com outras acumuladoras de Al como *Vochysia pyramidalis* e *Callisthene major* (De Paula *et al.*, 1996).

Esta espécie foi selecionada para este estudo por pertencer à família e gênero com maior número de representantes que têm capacidade de acumular Al. Além disso, como dito anteriormente, essas plantas não são prejudicadas quanto à absorção de nutrientes e desenvolvimento em função da presença de Al no solo (Haridasan, 2008¹). Adicionalmente, embora a literatura mostre que sementes dessa espécie tenha uma porcentagem de germinação aproximadamente de 20% (Lorenzi, 1992), essa espécie se mostrou adequada para os experimentos devido uma grande quantidade de sementes germinadas, aproximadamente 90%.



Figura 2. Fotos de *Q. dichotoma* (Mart.) Warm. adulta no campo. **A-** Vista geral da planta adulta. **B** – Detalhe do tronco. **C** – Vista detalhada das folhas. **D** – Vista do fruto discente já aberto sem sementes. Fotos cedidas por Natália Pires (2016).

5. JUSTIFICATIVA

A análise e identificação de metabólitos como ácidos orgânicos, açúcares, dentre outros abundantemente diferentes em plantas crescidas na presença e ausência de Al poderão contribuir para entender os processos fisiológicos e metabólicos do Al em plantas acumuladoras nativas.

A literatura mostra que alguns destes compostos como, por exemplo, ácidos orgânicos estão envolvidos no metabolismo do Al em plantas resistentes e tolerantes (Kochian, 1995; Ma *et al.*, 2001) além disso muitos outros compostos tanto do metabolismo primário quanto secundário podem ser peças fundamentais para elucidação dos processos metabólicos que envolvem este metal em plantas; Xu *et al.*, 2016).

6. OBJETIVO GERAL

Determinar o perfil metabólico de plantas de *Qualea dichotoma* Mart. (Warm.) cultivadas na presença e ausência de Al, assim como os efeitos da ausência desse metal sobre o crescimento de plantas dessa espécie.

6.1. Objetivos específicos

- Realizar a análise comparativa de crescimento das plantas de *Q. dichotoma* cultivadas na presença e ausência de Al.
- Detectar a presença e distribuição de Al em diversos órgãos dessa planta.
- Quantificar pigmentos fotossintéticos (clorofila a, b e carotenoides) nas folhas de *Q. dichotoma* crescidas na presença e ausência de Al.
- Quantificar comparativamente metabólitos como ácidos orgânicos, açúcares e aminoácidos em folhas e raízes de *Q. dichotoma*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE JUNIOR, V. C.; MOTA, J. H.; CASTRO, N. E. A. DE. Avaliação da tolerância a alumínio de dois genótipos de sorgo. Revista Científica Eletrônica de Agronomia, n.7, 2005.

ANDRADE, L. R. M.; FRANCO, A. C.; HARIDASAN, M.; BARROS, L. M.G.; GEEST, J. J. V. D.; COTTA, M. G.; RIBEIRO, D. G. R. Alumínio nos ápices radiculares de espécies nativas do Cerrado. EMBRAPA Cerrados, 2007.

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.

BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. 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, v. 48, n. 1, p.75-92, 2002.

BASSO, L. H. M.; GONÇALVES, A. N.; SILVEIRA, L. V. A.; LIMA, G. P. P. Efeito do alumínio no crescimento de brotações de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivadas in vitro. Revista Scientia Florestalis, v. 63, p. 167-177, 2003.

BASSO, L. H. M.; LIMA, G. P. P.; GONÇALVES, A. N.; VILHENA, S. M. C.; PADILHA, C. C. F. Efeito do alumínio no conteúdo de poliaminas livres e atividade da fosfatase ácida durante o crescimento de brotações de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* cultivadas in vitro. Revista Scintia Florestalis, n. 75, p. 9-18, 2007.

BRACCINI, M. C. L.; MARTINEZ, H. E. P.; PEREIRA, P. R. G.; SAMPAIO, N. F.; SILVA, E. A. M. Tolerância de genótipos de cafeeiro ao alumínio em solução nutritiva. I. Crescimento e desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular. Revista Brasileira de Ciências do Solo, v. 22, p. 435-442, 1998.

BRUNNER, I; SPERISEN, C. Aluminum exclusion and aluminum tolerance in woody plants. In: REWALD, B.; FALIK, O.; GODBOLD, D.; RACHMILEVITCH, S. (ed.). Ecophysiology of Root Systems-environment Interaction. Frontiers in Plant Science, p. 96-107, 2013.

CHENERY, E.M. Aluminium in the plant world. Part I – General Survey in Dicotyledons. Kew Bulletin, v.2, p.173-183, 1948.

CODOGNOTTO, L. M.; SANTOS, D. M. M.; LEITE, I. C.; MARIN, A.; MADALENO, L. L.; KOBORI, N. N.; BANZATTO, D. A. Efeito do alumínio nos teores de clorofilas de plântulas de feijão-mungo e labe-labe. Revista Ecosistema, v. 27, n. 2, p. 27-39, 2002.

COUTINHO, L. M. O conceito de bioma. Acta Botanica Brasilica, v. 20, n. 1, p. 13-23, 2006.

DE MENDONÇA, R. J.; CAMBRAIA, J.; DE OLIVEIRA, J. A.; OLIVA, M. A. Efeito do alumínio na absorção e na utilização de macronutrientes em duas cultivares de arroz. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 38, p. 843-848, 2003.

DE PAULA, J. E; IMAÑA-ENCINAS, J.; SILVA PEREIRA, B. A. Parâmetros volumétricos e da biomassa da mata ripária do córrego dos macacos. Cerne, v. 2, n. 2, p. 91-105, 1996.

DELHAIZE, E.; RYAN, P.R.; RANDALL, P. J. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) (II. Aluminum stimulated excretion of malic acid from root apices). Plant Physiology, v.103, p. 695-702, 1993.

DELHAIZE, E.; RYAN, P. R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. Plant Physiology. v.107, p.315-321, 1995.

DELHAIZE, E.; RYAN, P.R.; JAMES, R.A. Aluminium tolerance of root hairs underlies genotypic differences in rhizosheath size of wheat (*Triticum aestivum*) grown on acid soil. Journal New Phytol. v.195. n.3. p. 609-619, 2012.

DENG, W.; LUO, K.; LI, Z.; YANG Y., HU, N.; WU, Y., Overexpression of *c* mitochondrial citrate synthase gene in *Nicotiana benthamiana* confers aluminum tolerance. Planta, vol. 230, n. 2, p. 355–365, 2009.

DURESSA, D.; SOLIMAN, K.; TAYLOR, R.; ZACHARY SENWO, Z. Proteomic Analysis of Soybean Roots under Aluminum Stress. *Journal of Plant Genomics*. v. 12, p.1-12, 2011.

ECHART, C. L.; CAVALLI-MOLINA, S. Fitotoxicidade do alumínio: efeitos, mecanismo de tolerância e seu controle genético. *Revista Ciência Rural*, v. 31, n. 3, p. 531-541, 2001.

ETICHA, D.; ZAHN, M.; REMER, M.; YANG, Z.; RANGEL, A. F.; RAO, I. M.; HORST, W. J. Transcriptomic analysis reveals differential gene expression in response to aluminium in common bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes. *Annals of Botany*, v.105, p.1119–1128, 2010.

FREITAS, F. A.; KOPP, M. M.; SOUSA, R. O.; ZIMMER, P. D.; CARVALHO, F. I. F.; OLIVEIRA, A. C. Absorção de P, Mg, Ca e K e tolerância de genótipos de arroz submetidos a estresse por alumínio em sistemas hidropônicos. *Revista Ciência Rural*, v. 36, n. 1, p. 72-79, 2006.

GOODLAND, R. Oligotrofismo e alumínio no Cerrado. In FERRI, M.G (ed), III Simpósio sobre o cerrado. p. 44- 60. EDUSP, São Paulo, 1971.

HAJIBOLAND, R.; BAHRAMI RAD, S.; BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Mechanisms of aluminum-induced growth stimulation in tea (*Camellia sinensis*). *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, v. 176, p. 616 – 62, 2013.

HARIDASAN, M. Alumínio é um elemento tóxico para as plantas nativas do cerrado? In: Prado, CHBA; Casali, CA. *Fisiologia Vegetal: práticas em relações hídricas, fotossíntese e nutrição mineral*. Barueri: Editora Manole, v.85, n.204, p.1553-1559, 2008².

HARIDASAN M.; ARAÚJO, G. M. Perfil nutricional de espécies lenhosas de duas florestas semidecíduas em Uberlândia, MG. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 28, p. 295-303, 2005.

HARIDASAN, M. Nutritional adaptations of native plants of the Cerrado biome in acid soils. *Brazilian Journal Plant Physiology*, v.20, n. 3, 2008¹.

HARIDASAN, M. Aluminium accumulation by some Cerrado native species of central Brazil. *Plant and Soil*, v. 65, p. 265-273, 1982.

HARIDASAN, M. Distribution and mineral nutrition of aluminium-accumulating species in different plant communities of the cerrado region of central Brazil. In SAN, JOS, J. J. MONTES, R. (eds.) *La Capacidad Bioproductiva de Sabanas*. I.V.I.C., Caracas, Venezuela. 545p. p. 309-348, 1987.

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. Mecanismos associados à tolerância ao alumínio em plantas. *Ciências Agrárias*. v. 28, p. 219-228, 2007.

INOSTROZA-BLANCHETEAU, C.; RENGEL, Z.; ALBERDI, M.; DE LA LUZ MORA, M.; AQUEA, F.; ARCE-JOHNSON, P.; REYES-DÍAZ, M. Molecular and physiological strategies to increase aluminum resistance in plants. *Molecular Biology Reports*, v.39, n. 3, p. 2069-2079, 2012.

JANSEN, S.; BROADLEY, M.; ROBBRECHT, E.; SMETS, E. Aluminium hyperaccumulation in angiosperms: a review of its phylogenetic significance. *The Botanical Review*, v. 68, n. 2. p. 235-269, 2002.

KLUG, B., W.; HORST, J. Spatial characteristics of aluminum uptake and translocation in roots of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). *Physiologia Plantarum*, v. 139, 181-191, 2010.

KOCHIAN, L. V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annual Review of Plant Biology*, v. 46, n. 1, p. 237-260, 1995.

KOCHIAN, L. V.; PIÑEROS, M. A.; HOEKENGA, O. A. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. *Plant and Soil*, v. 274, n. 1, p. 175–195, 2005.

KOCHIAN, L. V.; PIÑEROS, M. A.; LIU, J.; MAGALHAES, J. V. Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum resistance. *Annual Review of Plant Biology*, 66, p. 571-598, 2015.

KOCHIAN, L.V.; HOEKENGA, O. A.; PIÑEROS, M. A. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Journal of Plant Biology*, v. 55. p.459–493, 2004.

KOSOVA, K.; VITAMVAS, P.; PRASIL, I. T.; RENAUT, J. Plant proteome changes under abiotic stress—contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal of Proteomics*, v. 74, p. 1301–1322, 2011.

KUMARI, M.; TAYLOR, G. J.; DEYHOLOS, M. K. Transcriptomic responses to aluminum stress in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Genetics and Genomics*, v.279, p. 339–357, 2008.

LI, X. F.; MA, J. F; MATSUMOTO, H. Pattern of aluminum induced secretion of organic acids differs between rye and wheat. *Plant Physiology*, v. 123, n. 4, p. 1537–1544, 2000.

LIAO, H.; WAN, H.; SHAFF, J.; WANG, X.; YAN; KOCHIAN, L.V. 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*, v. 141, n. 2, p. 674–684, 2006.

LOPES, A. S.; SILVA, M. C.; GUIMARÃES GUILHERME, L. R. Correção da acidez do solo. São Paulo: ANDA. 22p. (Boletim Técnico 1), 1991.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 352 p, 1992.

MA, J. F. Physiological mechanisms of Al resistance in higher plants. *Soil Science and Plant Nutrition*, v. 51, n. 5, p. 609–612, 2005.

MA, J. F. Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants. *Plant and Cell Physiology*, v. 41, n. 4, p. 383–390, 2000.

MA, J. F.; RYAN, P. R.; DELHAIZE E. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends in Plant Science*, v. 6, n. 6, p. 273–278, 2001.

MA, J. F.; SHEN, R. F.; NAGAO, S.; TANIMOTO, E. Aluminum targets elongating cells by reducing cell wall extensibility in wheat roots. *Plant and Cell Physiology*, v. 45. p. 583-589, 2004.

MA, J.F.; ZHENG, S.J.; MATSUMOTO, H. Specific secretion of citric acid induced by Al stress in *Cassia tora* L. *Plant and Cell Physiology* v. 38, p. 1019–1025, 1997.

MACHADO, J. W. B. Acumulação de alumínio em *Vochysia thyrsoidea* Pohl. Dissertação de Mestrado, Brasília, DF, Universidade de Brasília, 1985.

MALAVOLTA, E. Elementos de Nutrição Mineral de Plantas. São Paulo: Editora agronômica Ceres Ltda, 251 p. 1980.

MARIANO, E. D.; JORGE, R. A.; KELTJENS, W.G; MENOSSI, M. Metabolism and root exudation of organic acid anions under aluminium stress. *Journal of Plant Physiology*, v.17, n. 1, p. 157-172, 2005.

MASSOT, N. NICANDER B, BARCELÓ J, POSCHENRIEDER C, TILLBERG E. A rapid increase in cytokinin levels and enhanced ethylene evolution precede Al³⁺-induced inhibition of root growth in bean seedlings (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Growth Regulation*, v. 37. p. 105–12, 2002.

MASSOT, N.; LLUGANY, M.; POSCHENRIEDER C, BARCELÓ J. Callose production as indicator of aluminum toxicity in bean cultivars. *Journal of Plant Nutrition*, v.22, p.1–10, 1999.

MEDEIROS, R.A.; M. HARIDASAN. Seasonal variations in the foliar concentrations of nutrients in some aluminium accumulating and non-accumulating species of the cerrado region of central Brazil. *Plant and Soil*, v.88, p.433 - 436, 1985.

MIGUEL, P. S. B.; GOMES, F. T.; DA ROCHA, W. S. D.; DE CARVALHO, C. A.; DE OLIVEIRA, A. V. Efeitos tóxicos do alumínio no crescimento das plantas: mecanismos de tolerância, sintomas, efeitos fisiológicos, bioquímicos e controles genéticos. *CES Revista*, v. 24, n. 1, p. 13-29, 2010.

MIMMO, T.; GHIZZI, M.; CESCO, S.; TOMASI, N.; PINTON, R.; PUSCHENREITER, M. Aluminium–phosphate interactions in the rhizosphere of two

bean species: *Phaseolus lunatus* L. and *Phaseolus vulgaris* L. Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 93, n. 15, p. 3891-3896, 2013.

MINOCHA, R.; MINOCHA, S.C.; STEPHANIE, L.L.; SHORTLE, W.C. Effects of aluminum on DNA synthesis, cellular polyamines, polyamine biosynthetic enzymes and inorganic ions in cell suspension cultures of a woody plant. *Catharauthus roseus*. Journal of Plant Physiology, v. 85, p. 417-424, 1992.

MUKHOPADYAY, M.; BANTAWA, P.; DAS, A.; SARKAR, B.; BERA, B.; GHOSH, P.; MONDAL, T. K. Changes of growth, photosynthesis and alteration of leaf antioxidative defence system of tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] seedlings under aluminum stress. Biometals, v. 25, n. 6, p. 1141-1154, 2012.

NATALE W.; PRADO R. M.; ROZANE D. E.; ROMUALDO L. M. Efeitos da calagem na fertilidade do solo e na nutrição e produtividade da goiabeira. Revista Brasileira de Ciências do Solo, v. 31, p. 1475-1485, 2007.

NIAN, H.; YANG, Z.; HUANG, H.; YAN, X.; MATSUMOTO, H. Citrate secretion induced by aluminum stress may not be a key mechanism responsible for differential aluminum tolerance of some soybean genotypes. Journal of Plant Nutrition, v. 27, n.11, p. 2047–2066, 2005.

OLIVEIRA, I. P.; COSTA, K. A. P.; SANTOS, K. J. G.; MOREIRA, F. P. Considerações sobre a acidez dos solos de Cerrado. Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos, v.1, n. 1, p. 1-12, 2005.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; FONTES, M. A. L. Patterns of floristic differentiation among atlantic forests in Southeastern Brazil and the influence of climate. Biotropica, v. 32, n. 4b, p. 793-810, 2000.

PEIXOTO, P. H. P.; PIMENTA, D. S.; CAMBRAIA, J. Alterações morfológicas e acúmulo de compostos fenólicos em plantas de sorgo sob estresse de alumínio. Bragantia, v. 66, n.1, p. 17-25, 2007.

PELLET, D. M.; GRUNES, D. L.; KOCHIAN, L. V. Organic acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). *Planta*, v. 196, n. 4, p. 788–795, 1995.

RIBEIRO, J.F. Comparação da concentração de nutrientes na vegetação arbórea e nos solos de um cerrado e de um cerradão no Distrito Federal, Brasil. Dissertação de Mestrado, Brasília, DF, Universidade de Brasília, 1983.

RIBEIRO, J. F. Fitossociologia de tipos fisionômicos de cerrado em Planaltina, DF. *Revista Brasileira de Botânica*, v.8, p.131-142, 1985.

RODRIGUES, R. F.; MONTEIRO DE ARAUJO, G. Vegetation structure and soil characteristics of a dystrophic and a mesotrophic cerradão in the Triângulo Mineiro. *Bioscience Journal*, v. 29, p. 2013 -2029, 2013.

ROSSIELLO, R. O. P.; NETTO, J. J. Toxidez de alumínio em plantas: novos enfoques para um velho problema. In: FERNANDES, M. S. (Ed.). *Nutrição Mineral de Plantas*. Vicosa: SBCS, 432 p. 2006.

RYAN, P. R.; RAMAN H.; GUPTA S.; HORST W. J.; DELHAIZE E. A second mechanism for aluminum resistance in wheat relies on the constitutive efflux of citrate from roots. *Journal of Plant Physiology*, v. 149, p. 340–351, 2009.

RYAN, P. R.; TYERMAN, S. D.; SASAKI, T.; FURUICHI, T.; YAMAMOTO, Y.; ZHANG, W. H.; DELHAIZE, E. The identification of aluminium-resistance genes provides opportunities for enhancing crop production on acid soils. *Journal of Experimental Botany*, v. 62, n. 1, p. 9–20, 2011.

RYAN, P.R.; DELHAIZE, E.; JONES, D.L. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 52, p. 527–560, 2001.

SHARMA, S. S.; DIETZ, K. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *Journal of Experimental Botany*, v.57 n. 4, p.711- 726, 2006.

SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum. *Plant Cell Reports*, v. 26, p. 2027–2038, 2007.

SILVA, R. C. C. Aspectos fisiológicos, fitoquímicos e proteômicos de *Qualea grandiflora* Mart. em resposta ao alumínio. Dissertação de Mestrado, Brasília, DF, Universidade de Brasília. 2012.

SIVAGURU, M.; BALUSKA, F.; VOLKMANN, D.; FELLE, H. H.; HORST, W. J. Impacts of aluminum on the cytoskeleton of the maize root apex. Short-term effects on the distal part of the transition zone. *Plant Physiology*, v. 119, p. 1073-1082, 1999.

STEINER, F.; ZOZ, T. ; PINTO JÚNIOR, A. S.; CASTAGNARA, D. D. ; DRANSKI, J. A. L. Effects of aluminum on plant growth and nutrient uptake in young physic nut plants. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 33, p. 1779-1788, 2012.

TABALDI, L. A. Avaliação bioquímica-fisiológica de clones de batata em relação ao alumínio. Tese de doutorado, Santa Maria, RS, Universidade Federal de Santa Maria, 2008.

VICENTE, F. M. P.; ROSSIELO, R. O. P.; PEREIRA, M. B. Características indicativas de sensibilidade ao alumínio em arroz. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 33, n. 1, p. 9-15, 1998.

WANG, L.; FAN, X. W.; PAN, J. L.; HUANG, Z. B.; LI, Y. Z. Physiological characterization of maize tolerance to low dose of aluminum, highlighted by promoted leaf growth. *Planta*, v. 242, n. 6, p. 1391-1403, 2015.

WARD, C. L.; KLEINERT, A.; SCORTECCI, K. C.; BENEDITO, V. A.; VALENTINE, A. J. Phosphorus-deficiency reduces aluminium toxicity by altering uptake and metabolism of root zone carbon dioxide. *Journal of Plant Physiology*, v. 168, n. 5, p. 459-465, 2011.

WATANABE, T.; OSAKI, M. 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*, v. 33, p. 1247-1260, 2002.

WENZL, P.; CHAVES, A. L.; PATIÑO, G. M.; MAYER, J. E.; RAO, I. M. Aluminum stress stimulates the accumulation of organic acids in root apices of *Brachiaria* species. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, n. 165, v. 5, p. 582-588, 2002.

WENZL, P.; PATIÑO, G. M.; CHAVES, A. L.; MAYER, J. E.; RAO, I. M. The high level of aluminum resistance in signalgrass is not associated with known mechanisms of external aluminum detoxification in root apices. *Plant Physiology*, v.125, n. 3, p. 1473-1484, 2001.

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. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 101, p. 162-172, 2016.

YAMAMOTO Y.; KOBAYASHI Y.; DEVI S. R.; RIKIISHI S.; MATSUMOTO H. Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells. *Journal of Plant Physiology*, v. 128, p. 63–72, 2002.

YANG, J. L.; ZHANG, L.; ZHENG, S. J. Aluminum-activated oxalate secretion does not associate with internal content among some oxalate accumulators. *Journal of Integrative Plant Biology*, v. 50, n. 9, p. 1103–1107, 2008.

YANG, L. T.; JIANG, H. X.; QI, Y. P.; CHEN, L. S. Differential expression of genes involved in alternative glycolytic pathways, phosphorus scavenging and recycling in response to aluminum and phosphorus interactions in *Citrus* roots. *Molecular Biology Reports*, v. 39, n. 5, p. 6353-6366, 2012.

YANG, L. T.; JIANG, H. X.; TANG, N.; CHEN, L. S. Mechanisms of aluminum-tolerance in two species of citrus: secretion of organic acid anions and immobilization of aluminum by phosphorus in roots. *Plant Science*, v. 180, n. 3, p. 521-530, 2011.

YANG, Q.; WANG, Y.; ZHANG, J.; SHI, W. QIAN, C. PENG, X. Identification of aluminum-responsive proteins in rice roots by a proteomic approach: Cysteine synthase as a key player in Al response. *Journal of Proteomics*, v. 7, p. 737–749, 2007.

YANG, Z. M.; SIVAGURU, M. ; HORST, W. J.; MATSUMOTO, H. Aluminium tolerance is achieved by exudation of citric acid from roots of soybean (*Glycine max*), Review Physiologia Plantarum, v. 110, n. 1, p. 72–77, 2000.

YANG, L.T.; QI, Y. P.; JIANG, H. X.; CHEN, L. S. Roles of Organic Acid Anion Secretion in Aluminium Tolerance of Higher Plants. BioMed Research International, v. 2013, 2013.

ZHANG, H.; JIANG, Z.; QIN, R.; ZHANG, H.; ZOU, J.; JIANG, W.; LIU, D. Accumulation and cellular toxicity of aluminum in seedling of *Pinus massoniana*. BMC Plant Biology, v. 14, 2014.

ZHANG, S.; ZHOU, J.; WANG, G.; WANG, X.; LIAO, H. The role of mycorrhizal symbiosis in aluminum and phosphorus interactions in relation to aluminum tolerance in soybean. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 99, n. 23, p. 10225-10235, 2015.

ZHAO, Z.; MA, J. F.; SATO, K.; TAKEDA, K. Differential Al resistance and citrate secretion in barley (*Hordeum vulgare* L.). Planta, v. 217, n. 5, p. 794–800, 2003.

ZHEN, Y.; QI, J. L.; WANG, S. I.; SU, J.; XUA, G. H.; ZHANGA, M. S.; MIAOA, L. V.; PENG, X.; TIANA, D.; YANG, Y. Comparative proteome analysis of differentially expressed proteins induced by Al toxicity in soybean. Review Physiologia Plantarum, v. 131, n. 4, p. 542–554, 2007.

ZHENG, L.; LAN, P.; SHEN, R. F.; LI, W. F. Proteomics of aluminum tolerance in plants. Proteomics, v. 14, n. 4-5, p. 566-578, 2014.

ZHENG, S. J.; MA, J. F.; MATSUMOTO, H. Continuous secretion of organic acids is related to aluminium resistance during relatively long-term exposure to aluminium stress. Physiologia Plantarum, v. 103, n. 2, p. 209–214, 1998.

ZHENG, S. J.; YANG, J. L.; HE, Y. F.; YU, X. H.; ZHANG, L.; YOU, J. F.; SHEN, R. F.; MATSUMOTO, H. Immobilization of aluminum with phosphorus in roots is associated with high aluminum resistance in buckwheat. Plant Physiology, v. 138, n. 1, p. 297–303, 2005.

CAPÍTULO I: Análise da resposta fisiológica de *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. (Vochysiaceae) na presença e ausência de alumínio.

1. Análise da resposta fisiológica de *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. Vochysiaceae na presença e ausência de alumínio.

1.1. Abstract

The toxic effect of Al on sensitive plants has been a major problem in acid soils, which is a limitation to the growth of many crop plants. The Al^{3+} is phytotoxic because it can bind to several molecules such as the membrane phospholipids, which reduces the plasma membrane permeability. In addition, this metal may decrease chlorophyll biosynthesis. Many plants can reduce these toxic effects by excluding or tolerating large amounts of Al. Other plants, however, some found in the Cerrado, besides not resenting the presence of Al, it helps in the growth and development of these plants. The aim of this study was to analyze the growth of *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. in the presence and absence of Al, as well as to quantify the content of photosynthetic pigments in both treatments. After germination, *Q. dichotoma* plants were grown in vermiculite for 120 days and fed with nutrient solution with and without Al in the form of $AlCl_3$ (150 M). The measurements of the parameters took place at the 30, 60 and 120 day. Photosynthetic pigments were measured at the 60 day of cultivation. *Q. dichotoma* plants grown with Al had a growth of the shoot (104,67%) and root (54,52%) of the control plants after 60 days of cultivation. These plants also had healthier characteristics. In the analysis of photosynthetic pigments, plants grown with Al also had higher contents of chlorophyll *a*, *b* and carotenoids (16,96, 12,10, 4,78) $\mu g.cm^{-2}$ than control plants (8,61, 4,03, 1,91) $\mu g.cm^{-2}$. The results indicated that *Q. dichotoma* uses Al in several physiological processes, which leads to better growth and development.

Keywords: Aluminum, *Qualea dichotoma*, physiological response, Cerrado, Vochysiaceae.

2. Análise da resposta fisiológica de *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. (Vochysiaceae) na presença e ausência de alumínio.

2.1. Resumo

O efeito tóxico do Al sobre as plantas sensíveis tem sido um grande problema em locais de solos ácidos devido a limitação do crescimento de muitas culturas vegetais. O Al^{3+} é fitotóxico uma vez que pode se ligar a diversas moléculas tais como os fosfolípidios de membrana e reduzir a permeabilidade da membrana plasmática. Além disso, este metal também pode diminuir a biossíntese de clorofila. Muitas plantas podem reduzir esses efeitos tóxicos pela exclusão ou tolerar grandes quantidades de Al. Outras plantas, porém, encontradas no Cerrado além de não serem afetadas pelo Al se desenvolvem melhor em sua presença. O objetivo deste trabalho foi analisar o crescimento de *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. na presença e ausência de Al, assim como analisar seus pigmentos fotossintetizantes nos dois tratamentos. Após germinação as plantas de *Q. dichotoma* foram cultivadas em vermiculita durante 120 dias e nutridas com solução nutritiva com e sem Al na forma de AlCl_3 (150 μM). Aos 30, 60 e 120 dias foram realizadas medidas da parte aérea e radicular. Os pigmentos fotossintéticos foram quantificados aos 60 dias de cultivo. As plantas cultivadas com Al superaram o crescimento aéreo (104,67%) e radicular (54,52%) das plantas controle a partir dos 60 dias de cultivo. Estas plantas também apresentaram características mais saudáveis. Na análise de pigmentos fotossintéticos, as plantas cultivadas com Al também obtiveram maiores teores de clorofila *a*, *b* e carotenoides (16,96, 12,10, 4,78) $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ do que as plantas controle (8,61, 4,03, 1,91) $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Os resultados indicaram que *Q. dichotoma* utiliza o Al em vários processos fisiológicos, o que leva a um melhor crescimento e desenvolvimento.

Palavras chave: Alumínio, *Qualea dichotoma*, resposta fisiológica, Cerrado, Vochysiaceae.

3. INTRODUÇÃO

O efeito tóxico do Al sobre as plantas tem sido amplamente estudado e discutido em diversos trabalhos. Por longos anos a fitotoxicidade desse metal tem sido um grande problema dos solos ácidos, limitando o crescimento de muitas culturas vegetais (Delhaize e Ryan, 1995).

Em plantas sensíveis, o Al provoca uma diminuição na absorção, translocação e transporte de água e nutrientes como P, K, Ca, Mg e Mo (Freitas *et al.*, 2006), assim como severas alterações citológicas como alterações em microtúbulos, desorganização das proteínas nucleolares e fragmentação do cromossomo, resultando em mutações nas fases da divisão celular (Echart e Cavali-Molina, 2001; Zhang *et al.*, 2014). Esses eventos ocorrem, dentre outros fatores, pelo fato do Al se ligar a diversas moléculas como por exemplo os fosfolipídios de membrana e assim reduzir a permeabilidade da membrana plasmática (Jones e Kochian, 1995; Ahn *et al.*, 2001).

Em raízes de plantas sensíveis expostas ao Al se verifica um engrossamento da raiz principal, aumento da sua tortuosidade, assim como das ramificações, amarelecimento ou escurecimento dos ápices e menor número de pelos absorventes (Tabaldi, 2008; Miguel *et al.*, 2010). Em pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) o aumento do Al em solução resultou num menor crescimento do sistema radicular como um todo (Steiner *et al.*, 2012). Concomitantemente, o crescimento da parte aérea das plantas de *J. curcas* também apresentou anormalidades morfológicas com a exposição ao Al. Além disso, comparadas com plantas crescidas sem Al os teores de P, Ca e Mg decresceram nas folhas, assim como as quantidades de Ca e Mg em raízes (Steiner *et al.*, 2012). Em *Pinus massoniana* foi possível observar o efeito do Al sob a divisão celular no ápice das raízes. O aumento da concentração de Al levou a deformações drásticas nos microtúbulos levando a uma divisão celular irregular (Zhang *et al.*, 2014). Como resultado desses fatores, o crescimento das raízes é drasticamente inibido afetando também o crescimento da parte aérea de plantas sensíveis (Paterniani e Furlani, 2002; Hartwig *et al.*, 2007).

Concernente à parte aérea das plantas, em folha, os sintomas clássicos de intoxicação por Al encontrado na maioria das plantas sensíveis são a clorose no limbo foliar pela diminuição na biossíntese de clorofila, o arroxamento nas margens do limbo

e bainha, além da atrofia foliar em função da redução na absorção de P. As folhas jovens também podem apresentar aspectos semelhantes à deficiência de Ca, como, por exemplo, o enrolamento e colapso no ápice e do pecíolo. Como consequência da toxicidade do Al, toda a planta tem seu crescimento e desenvolvimento comprometidos (Codognotto *et al.*, 2002; Peixoto *et al.*, 2002; Tabaldi, 2008;).

Com a finalidade de minimizar os efeitos tóxicos do Al muitas espécies de plantas desenvolveram mecanismos de desintoxicação. Em geral a maioria das plantas cultivadas e de valor comercial que possui menor capacidade de acumular Al em seus tecidos consegue driblar esse efeito tóxico excluindo o Al quando este ainda se encontra no apoplasto da célula. Isso é possível devido à liberação de ácidos orgânicos como citrato, oxalato e malato que se ligam ao Al imobilizando-o e impedindo sua entrada no interior celular. Outro mecanismo pode ser visto em plantas conhecidas como tolerantes, as quais são capazes de acumular maiores quantidades de Al em seus tecidos e por isso permitem a entrada do Al no simplasto e só então os ácidos orgânicos sequestram o Al para inativá-lo em compartimentos celulares (Delhaize *et al.*, 1993; Kochian, 1995; Ma, 2000, Ma *et al.*, 2001; Ryan *et al.*, 2001, 2009, 2011; Kochian *et al.*, 2004, 2015; Mariano *et al.*, 2005; Hartwig *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2014).

Em plantas tolerantes tem-se verificado que em algumas espécies o Al ministrado em concentrações mínimas (dependendo da espécie e do genótipo) pode estimular o crescimento de raízes e parte aérea, sendo tóxico apenas em altas concentrações. O arroz é uma dessas espécies, sendo verificado em alguns trabalhos sintomas de toxidez só acima de 10 mg. Kg⁻¹ de Al (Fageria e Zimmermann, 1979; Fageria *et al.*, 1989). Thawornwong e Diest (1974) chegaram a sugerir a dependência em pequenas quantidades de Al no desenvolvimento normal do arroz. Resultados semelhantes também são verificados em trigo sarraceno (Klug e Hort, 2010), *Brachiaria decumbens*, *Brachiaria ruziziensis* (Wenzl *et al.*, 2001, 2002), em mudas de goiabeira (*Psidium guajava* L.) (Salvador *et al.*, 2000). Em *Picea Rubens* Sarg. e *Abies balsamiae* (L.) Mill os efeitos negativos no crescimento só foram observados por Schier (1985) em concentrações de Al superiores a 50,0 mg.L⁻¹.

Trabalhos mais recentes têm mostrado que *Camellia sinensis* tem capacidade de acumular Al em seus tecidos (0,3 g de Al Kg⁻¹ de matéria seca) apresentando um desenvolvimento melhor quando exposta a pequenas quantidades de Al (Morita *et al.*, 2008, 2011; Mukhopadyay *et al.*, 2012; Hajiboland *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2016). Em muitas plantas do Cerrado o efeito benéfico do Al não se restringe somente a pequenas concentrações. Em espécies acumuladoras de Al como *Vochysia thyrsoidea* Pohl, *Qualea grandiflora* e todas da família Vochysiaceae, assim como *Miconia albicans* (Melastomataceae) requerem a presença de Al para terem um desenvolvimento adequado (Machado, 1985; Haridasan, 2008²; Silva, 2012).

Silva (2012) estudou o efeito da presença e ausência de Al (150 µM) sobre o crescimento de *Qualea grandiflora* por 120 dias. Verificou-se que aquelas plantas que receberam Al tiveram um melhor desenvolvimento do sistema radicular e parte aérea onde se constatou que essas plantas apresentaram maior crescimento e biomassa e maiores teores de pigmentos fotossintéticos que aquelas que não receberam esse metal. Com base nesses dados foi sugerido que o Al tem papel importante no crescimento e desenvolvimento desta espécie (Silva, 2012). Além disso, é importante relatar que folhas das plantas que não receberam o metal apresentaram clorose e necrose (Silva, 2012). Machado (1985) já havia observado a importância do Al no crescimento e desenvolvimento de outras espécies acumuladoras de Al da mesma família, como *V. thyrsoidea*. Essa planta quando em solos calcários apresentou folhas necrosadas e cloróticas (Machado, 1985). Outrossim, a transferência de plantas de *V. thyrsoidea* para solos ácidos com disponibilidade de Al foi capaz de reverter os sinais de estresse. Adicionalmente, o mesmo fenômeno foi observado em planta de *M. albicans* quando em solos com calcário (Haridasan, 2008²).

Como mencionado, o Al pode afetar o teor de pigmentos fotossintéticos (Codognotto *et al.*, 2002). Segundo Xinwen *et al.* (2008) em condições adversas a clorofila, o principal pigmento no processo de fotossíntese, é um excelente indicador da atividade fotossintética, e, portanto, diretamente associado ao processo de desenvolvimento das plantas. Na literatura pode-se verificar que o estresse ambiental como, por exemplo, estresse salino na maioria das vezes causa danos ao aparato fotossintético (Sharma e Hall, 1991; Khan, 2003; Gomes *et al.*, 2011). Este tipo de estresse além de diminuir a síntese de clorofila também reflete negativamente sobre a síntese de carotenoides, os quais são responsáveis por proteger a clorofila contra a foto-

oxidação (Taiz e Zeiger, 2009). No caso do Al, o seu efeito sobre a quantidade de pigmentos fotossintéticos depende da planta em questão. Em plantas sensíveis a resposta ao Al é uma redução no desenvolvimento foliar e conseqüentemente uma diminuição de clorofilas e carotenoides (Carvalho *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2011), já em plantas nativas os teores destes pigmentos aumentam de forma significativa (Silva, 2012).

Visando dar continuidade aos estudos sobre a função metabólica e fisiológica do Al em plantas nativas a espécie *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. (Vochysiaceae) foi escolhida para análise metabólica e fisiológica. Plantas de *Q. dichotoma* suplementadas ou não com Al e a quantificação de diversos metabólitos, assim como, análise de crescimento dessas plantas foram realizadas. Os resultados desse estudo trazem valiosas informações sobre a função fisiológica desse metal em *Q. dichotoma*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Frutos de *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. (Vochysiaceae) foram coletados em Cerrado *stricto sensu* no mês de Agosto de 2014 na Reserva Ecológica do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) – DF. O local da coleta possui as seguintes coordenadas geográficas: S: 15° 55' 49.8" e W: 47° 52' 43.6". Os frutos foram deixados à temperatura ambiente para que houvesse uma deiscência completa e liberação das sementes.

4.1. Germinação

Sementes de *Q. dichotoma* foram desinfestadas com álcool etílico 70% por 1 min e em seguida com NaClO (hipoclorito de sódio) a 2% cloro ativo por 30 min e então lavadas com água bidestilada autoclavada. Em seguida as sementes foram germinadas em gerbox (25 em cada) com papel germitest autoclavado e água destilada, incubadas em câmara de crescimento (B.O.D) a 25°C e fotoperíodo de 18h. As gerbox foram vedadas com papel PVC. O período de germinação foi monitorado com reposição de água a cada três dias ou quando se fazia necessário. As sementes começaram a germinar por volta do 7º dia na câmara de germinação onde permaneceram por 20 dias.

4.2. Desenvolvimento das plantas

Após 20 dias na câmara de crescimento as plantas foram selecionadas de acordo com o tamanho dos cotilédones e sistema radicular (em torno de 2-3 cm). Foram realizadas três repetições com dois tratamentos cada (240 plantas no total do experimento). Subsequentemente em cada repetição 40 plantas foram separadas e transferidas para sacos plásticos perfurados contendo vermiculita autoclavada. Em seguida foram regadas com solução nutritiva de $1/5$ MS (Murashige e Skoog, 1962) com adição de $150 \mu\text{M}$ de AlCl_3 (cloreto de alumínio). Semelhantemente, outras 40 plantas foram regadas com $1/5$ MS sem suplementação de AlCl_3 , constituindo o tratamento controle. O pH do meio nutritivo foi ajustado e mantido entre 4,8 - 5,0 para que o Al permanecesse em solução. Todas as plantas foram regadas com as soluções nutritivas a cada dois dias por todo período do experimento. As plantas de ambos os tratamentos foram colocadas em sala de crescimento onde permaneceram durante todo o período de análises a temperatura de 25°C , umidade relativa de 70% e fotoperíodo de 18 h.

A coleta de dados para a análise de crescimento ocorreu aos 30, 60 e 120 dias de cultivo e 20 plantas de cada tratamento foram retiradas da vermiculita e lavadas para serem tomados os seguintes parâmetros: o comprimento da raiz principal e parte aérea (acima dos cotilédones). Além disso, o registro fotográfico das plantas de cada tratamento foi realizado para visualmente analisar os efeitos da ausência de Al no crescimento de *Q. dichotoma*. Além desses parâmetros também foi feita a quantificação de pigmentos fotossintéticos (apenas 60 dias de cultivo) como descritos abaixo.

4.3. Quantificação de pigmentos fotossintéticos

Aos 60 dias de cultivo, cinco plantas de cada tratamento foram selecionadas para a quantificação dos pigmentos fotossintéticos através de metodologia proposta por Wellburn (1994). Um dia anterior à coleta do material 2 mL de DMF (N, N-dimetilformamida – $\text{HCON}(\text{CH}_3)_2$) (Vetec) foi adicionado a cinco tubos Eppendorf para cada tratamento. Os tubos foram envolvidos em papel alumínio e mantidos a 4°C por 24 h. Discos de cada folha do 3º nó (um disco por folha) de cada uma das plantas selecionadas foram extraídos. Foi utilizado um extrator foliar de diâmetro igual a 0,54 cm. Depois de retirados os discos foliares (um disco para cada tubo), as amostras foram transportadas, ainda em gelo, para geladeira a 4°C onde foram mantidas durante 48 h

no escuro para o processo de extração dos pigmentos. Ao término desse período cada amostra teve lida a absorvância nos seguintes comprimentos de onda: 663,8 nm, 646,8 nm, 480 nm para clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides, respectivamente. As leituras foram feitas em espectrofotômetro Genesys 2 (Termo Spectromic). Para cálculo dos valores de cada pigmento foram usadas as equações descritas abaixo (Ronen e Galun, 1984; e Barnes *et al.*, 1992).

$$1- \text{Clorofila A} = ((12 * \text{Ab}_{663,8} - 3,11 * \text{Ab}_{646,8}) * \text{Vol}) / A$$

$$2- \text{Clorofila B} = ((20,78 * \text{Ab}_{646,8} - 4,88 * \text{Ab}_{663,8}) * \text{Vol}) / A$$

$$3- \text{Carotenoides} = (((1000 * \text{Clorofila A} - 1,12 * \text{Clorofila B} - 34,07 * \text{Ab}_{480}) / 245) * 2) / A$$

(Ab= absorvância; A= área do disco coletado)

4.4. Análise estatística

Para os tratamentos estatísticos das médias dos comprimentos da parte aérea e radicular e das médias de absorvância dos pigmentos foi aplicado o teste t com significância $P \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Germinação e cultivo das plantas: Preparação para os experimentos

A germinação das sementes de *Qualea dichotoma* em B.O.D. iniciou por volta do sétimo dia. A literatura relata que a taxa de germinação desta espécie é de apenas 20% (Lorenzi, 1992). Contudo, os dados dos testes de germinação com as sementes de *Q. dichotoma* apresentaram mais de 90% de germinabilidade após um período de 20 dias (Figura 1-A). Sementes germinadas com sistema radicular de 3-4 cm foram transferidas para vermiculita e após 15 dias de cultivo abriram seus cotilédones, os quais permaneceram fixados às plantas durante todo o experimento (Figura 1-B). Algumas sementes transplantadas morreram por volta do 3º ou 4º dia após a emissão dos cotilédones. Os cotilédones desta espécie têm aparência foliar e nos dois tratamentos verificou-se uma coloração verde intensa sem diferença visual no tamanho ou pigmentação, mesmo após 15 dias de cultivo (Figura 1-C).

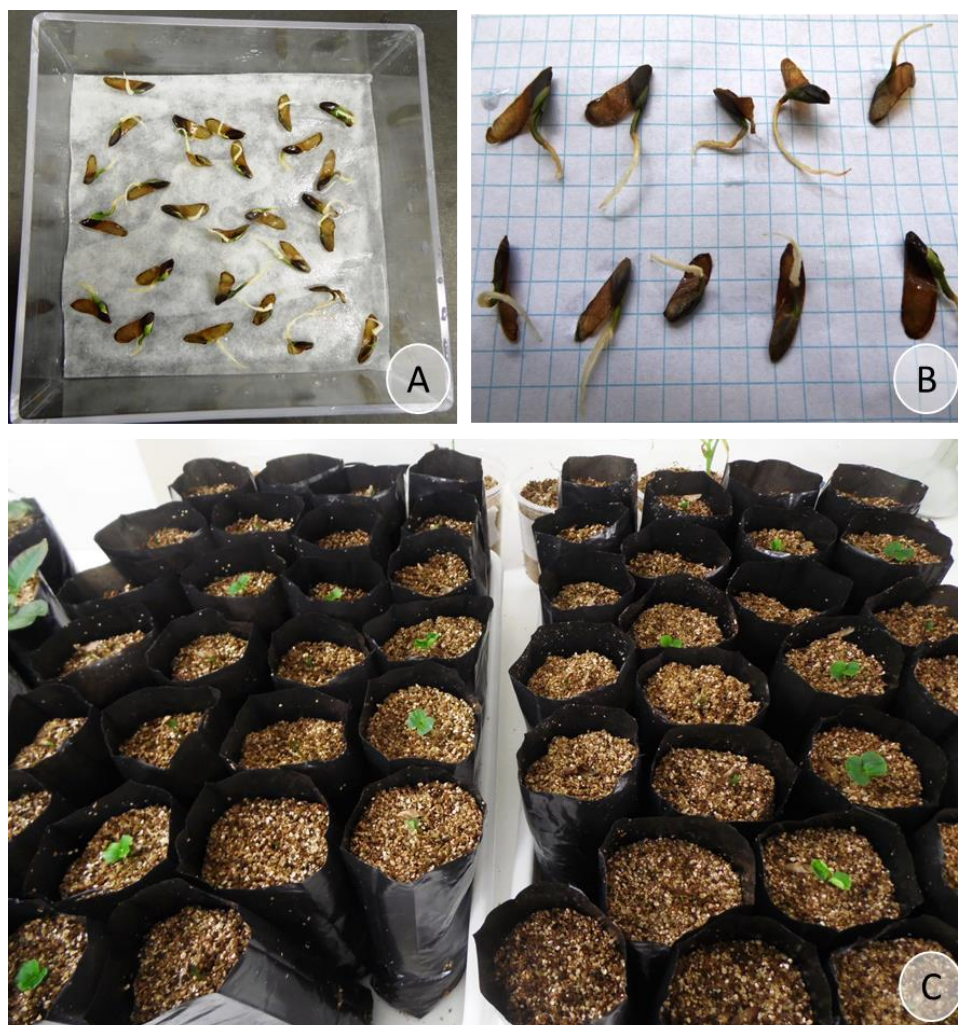


Figura 1. **A** - Vista geral de sementes de *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. aos 20 dias de germinação em gerbox e papel germitest. **B** – Semente de *Q. dichotoma* germinadas mostrando o sistema radicular (3 - 4 cm) com 20 dias de germinação. **C** – Plantas de *Q. dichotoma* em sacos plásticos com vermiculita após 15 dias de cultivo. À esquerda com Al e à direita sem Al.

5.2. Descrição morfológicas e análise de crescimento das plantas *Qualea dichotoma* crescidas na presença e ausência de alumínio

Em geral, as plantas de *Q. dichotoma* crescidas na presença de Al não mostraram sinais de senescência. Ao contrário, essas plantas tinham folhas verdes e visualmente estavam maiores que as que não foram suplementadas com este metal. Entretanto, as plantas do tratamento controle tinham sinais de clorose (Figuras 2-A-C).

Com relação à análise de crescimento das plantas dos dois tratamentos, com e sem Al, ocorreram diferenças significativas tanto na parte aérea quanto no sistema radicular (Figuras 2 a 4). Em relação à parte aérea, aos 30 dias de cultivo, não houve

diferença significativa entre os tratamentos (Figuras 2-A e 4-A). Contudo, a parte aérea das plantas tratadas com Al eram, em média, cerca de 17% maiores que o respectivo tratamento controle. As plantas que receberam Al tinham caules com comprimento médio de 2,41 cm ($\pm 0,1898$) contra 2,05 cm ($\pm 0,4047$) daquelas não suplementadas com este metal (Figura 2-A e 4-A). É importante salientar, que com 30 dias de cultivo as plantas suplementadas com Al já tinham desenvolvido um segundo par de folhas em alguns indivíduos. Por outro lado, boa parte das plantas do tratamento controle nem as primeiras folhas estavam presentes e naquelas que tinham folhas, já havia indícios de clorose no limbo e no bordo (Figuras 2-A e 4-A). Quanto à parte radicular das plantas com 30 dias de cultivo, o crescimento médio das raízes foi de 8,42 cm ($\pm 0,6429$) e 7,21 cm ($\pm 0,4223$) para plantas crescidas com e sem Al, respectivamente (Figura 2-A). Apesar de não haver diferença significativa, plantas tratadas eram em média 16,78% maiores que os respectivos controles (Figura 2-A e 4-B).

As diferenças morfológicas e de crescimento se acentuaram a medida que as plantas se desenvolveram. Aos 60 dias, as plantas de *Q. dichotoma* tratadas com Al eram maiores e mais saudáveis que aquelas crescidas sem esse metal (Figura 2-B). Com respeito ao comprimento médio da parte aérea foi de 7,88 cm ($\pm 0,3343$) nas plantas tratadas com Al e de 3,85 cm ($\pm 0,2029$) naquelas do tratamento controle (Figuras 2-B e 4-B). Pode-se notar que o Al induziu um crescimento significativamente maior nas plantas suplementadas com este metal, cuja diferença foi de 104,67% (Figuras 2-B e 4-B). Consistentemente com o que ocorreu com a parte aérea, o crescimento médio das raízes aos 60 dias das plantas tratadas com Al foi de 28 cm ($\pm 0,4575$) enquanto que do tratamento controle foi de 18,12 cm ($\pm 0,7277$). Assim, se verificou uma diferença significativa no tamanho das raízes entre os dois tratamentos de 54,52% (Figura 2-B).

As Figuras 2-C e 3 mostram aspectos morfológicos da parte aérea, folhas e raízes de plantas de *Q. dichotoma* crescidas com e sem Al aos 120 dias de cultivo. É possível perceber que as plantas tratadas com Al tinham um aspecto mais saudável que aquelas crescidas sem a suplementação desse metal (Figura 2-C). Esse fato é confirmado quando se compara o tamanho das folhas e raízes dessas plantas. Plantas que receberam a suplementação de Al não tinham apenas raízes e folhas mais desenvolvidas, mas a coloração e morfologia das folhas também demonstrava que essas plantas eram mais saudáveis (Figura 3-A - C). Além disso, no período compreendido

entre 60 e 120 dias de cultivo, ficou mais perceptível o surgimento de necroses e cloroses nas folhas das plantas não suplementadas com Al (Figuras 2-B, C e 3-A).

Adicionalmente, aos 120 dias de cultivo as diferenças no comprimento médio da parte aérea entre plantas de *Q. dichotoma* crescidas com e sem Al permaneceram significativas (Figura 2-C e 4-A). Na média, a presença do Al na solução nutritiva induziu a um crescimento 83,41% maior que as plantas controle (Figura 2-C). Adicionalmente, se verificaram diferenças significativas no crescimento do sistema radicular entre os dois tratamentos aos 120 dias de cultivo (Figura 4-B). Plantas tratadas com Al apresentaram médias de crescimento de 41,52 cm ($\pm 1,3349$) e de 22,9 cm ($\pm 1,1103$) para aquelas crescidas sem Al. Isto significa que as plantas que receberam Al tinham raízes, que em média, eram 81,31% maiores do que as raízes daquelas do tratamento controle.

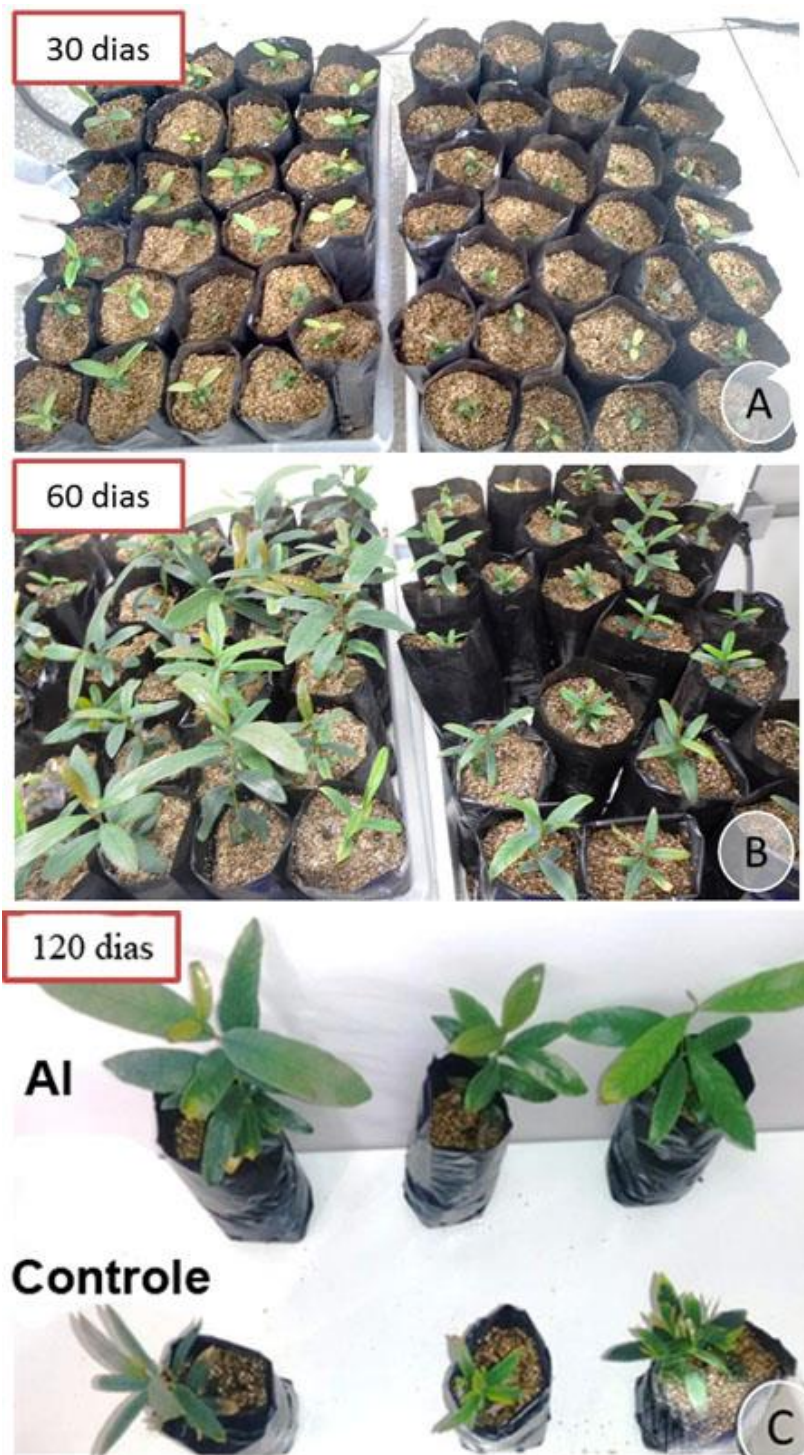


Figura 2. Plantas de *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. cultivadas em meio $\frac{1}{5}$ MS com e sem a adição de Al ($150 \mu\text{M}$) por 30, 60 e 120 dias. **A** – Plantas *Q. dichotoma* cultivadas por 30 dias sem Al (à direita) e com Al (à esquerda). **B**- Plantas de *Q. dichotoma* crescidas por 60 dias sem Al (à direita) e com Al (à esquerda). **C** - Plantas de *Q. dichotoma* cultivadas por 120 dias sem Al (controle - abaixo) e com Al (acima).

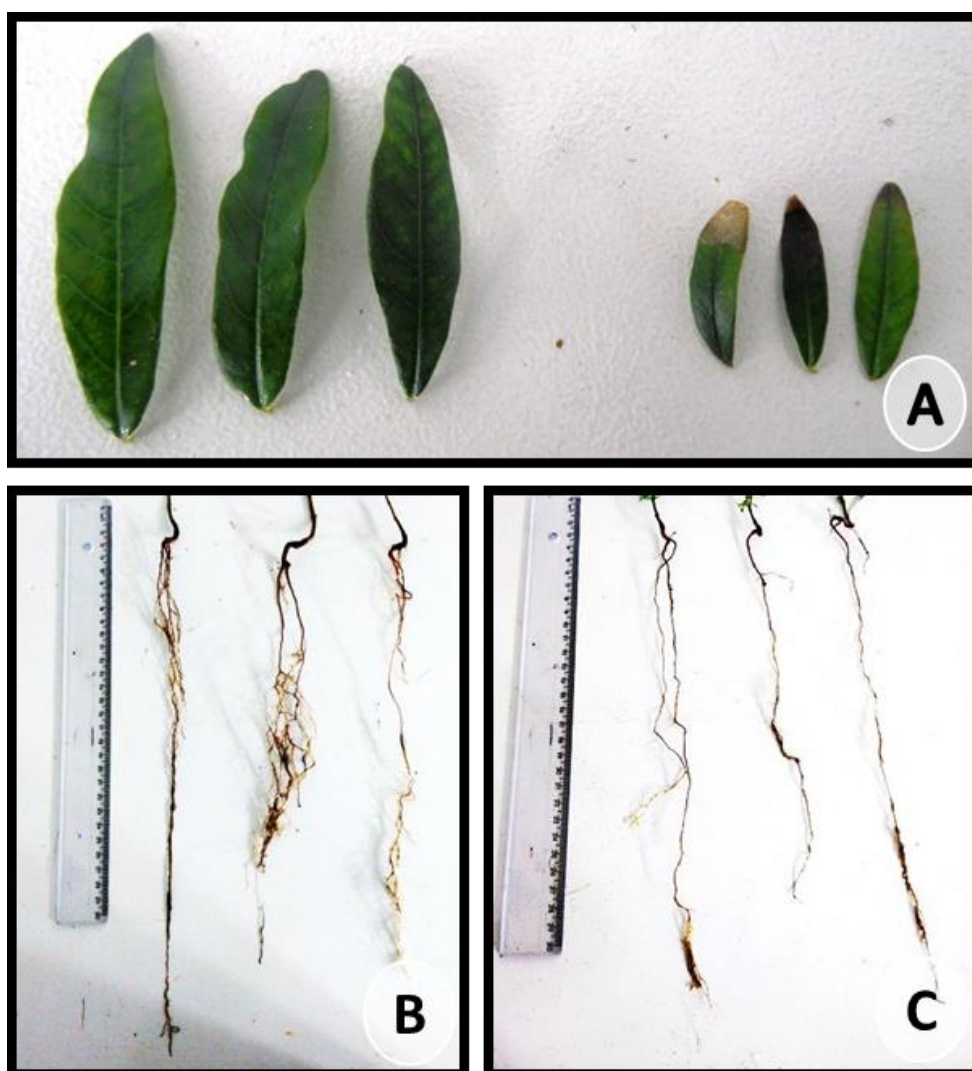


Figura 3: Aspectos morfológicos das folhas e raízes de *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. cultivadas na presença e ausência de Al aos 120 dias de cultivo. **A** – Folhas de plantas *Q. dichotoma* aos 120 dias, cultivadas sem Al (à direita) e com Al (à esquerda). **B** - Raízes de plantas de *Q. dichotoma* cultivadas por 120 dias na presença de Al. **C** – Raízes de plantas *Q. dichotoma* cultivadas por 120 dias sem Al.

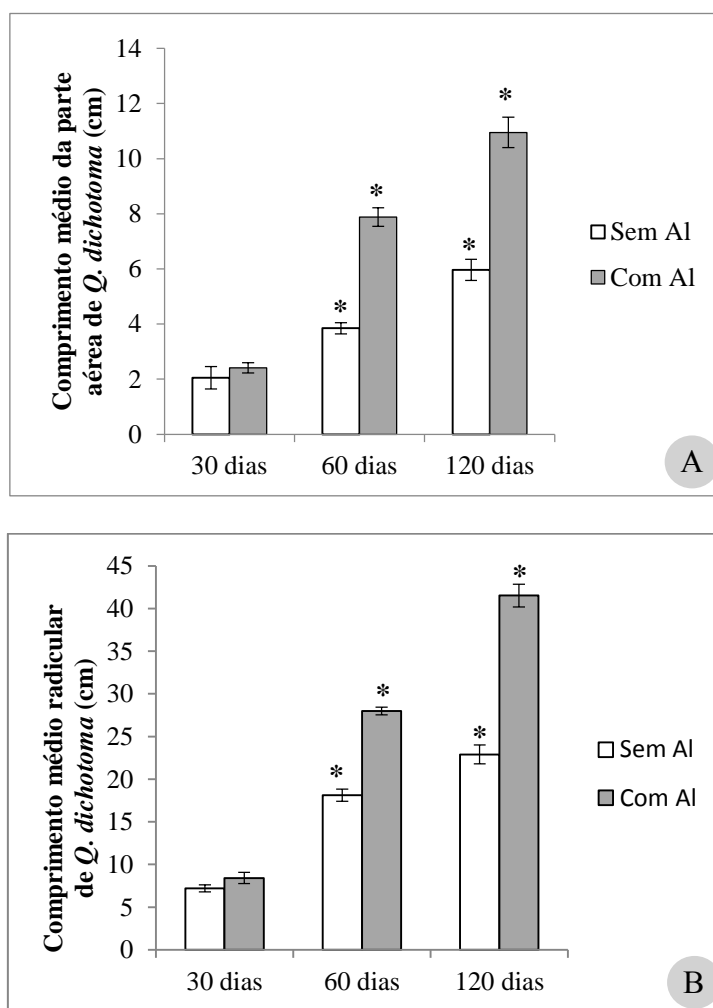


Figura 4. Comprimento médio de plantas de *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. cultivadas com e sem Al. **A-** Comprimento médio da parte aérea de plantas de *Q. dichotoma* aos 30, 60 e 120 dias de cultivo. **B-** Comprimento médio radicular de plantas de *Q. dichotoma* aos 30, 60 e 120 dias de cultivo. As médias seguidas por (*) são significativamente diferentes pelo teste t ($P \leq 0,05$).

5.3. Pigmentos fotossintéticos

Quanto a análise dos pigmentos fotossintéticos, foi realizado o experimento com as plantas aos 60 dias de cultivo. É importante salientar que nesse período as diferenças morfológicas e de crescimento estavam mais acentuadas além de estatisticamente diferentes (Figuras 2-B e 4-B). Nas folhas das plantas controle eram perceptíveis sinais de clorose e algumas necroses nas bordas o que em geral não foi observado nas plantas suplementadas com Al.

Os valores médios de clorofila *a* ($8,61 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2} \pm 0,877$), clorofila *b* ($4,03 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2} \pm 0,759$), carotenoides ($1,91 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2} \pm 0,082$) e clorofila *a+b* ($10,75 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2} \pm 0,918$) nas plantas controle foram consistentes com os aspectos visuais constatados nas mesmas e significativamente diferentes quando comparadas aos respectivos valores das plantas suplementadas com Al, onde obtiveram valores de $16,96 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($\pm 1,131$) para clorofila *a*, $12,10 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($\pm 1,346$) para clorofila *b*, $4,787 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($\pm 0,335$) para carotenóides $22,84 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($\pm 1,623$) para clorofilas *a+b* (Figura 5).

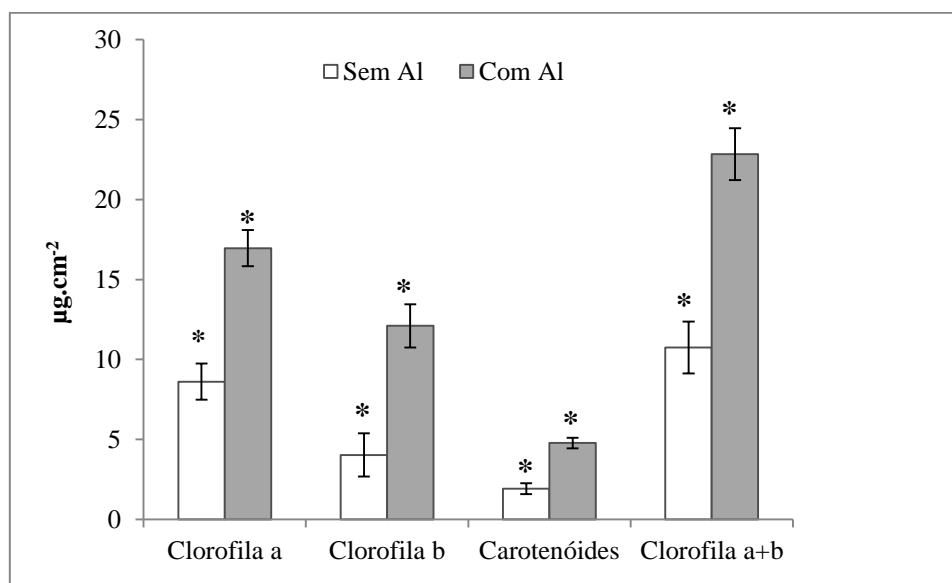


Figura 5. Teores médios dos pigmentos fotossintéticos clorofila *a*, clorofila *b*, carotenoides e clorofila *a+b* de plantas de *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. cultivadas por 60 dias com e sem Al ($150 \mu\text{M}$). Os asteriscos (*) representam diferença significativa pelo teste t ($P \geq 0,05$).

6. DISCUSSÃO

6.1. Desenvolvimentos das plantas

Os resultados mostram que além de tolerar o Al no solo, *Q. dichotoma* provavelmente se beneficia desse metal e o utiliza no seu metabolismo, visto que as plantas suplementadas com Al tiveram um melhor rendimento em todos os parâmetros analisados. Por outro lado, a ausência de Al refletiu resposta bastante negativa nessa espécie. Esses resultados são consistentes com estudos realizados com outras três plantas nativas acumuladoras de Al (*Vochysia thyrsoidea*, *Miconia albicans* e *Qualea*

grandiflora) que tiveram o mesmo comportameto na presença e ausência de Al (Haridasan e Araújo, 1988; Machado, 1985; Silva, 2012).

Plantas de *Q. dichotoma* tratadas com Al apresentaram maior crescimento radicular e aspectos visuais de plantas sem deficiências nutricionais tanto em desenvolvimento quanto na coloração e integridade das folhas em relação às plantas não suplementadas com Al. Este resultado está em concordância com alguns trabalhos onde autores relatam que espécies acumuladoras de Al não mostram diferenças nas concentrações de nutrientes essenciais quando comparadas com espécies não acumuladoras. Esse fato justifica também a adaptação destas plantas em solos ácidos (Machado, 1985; Furlani e Furlani, 1991; Haridasan, 2008^{1,2}).

Está claro que plantas tratadas com Al cresceram mais que as do controle. Na parte aérea, *Q. dichotoma* tratada com Al cresceu quase o dobro após 120 dias (83,41%) quando comparadas com as não tratadas. Resultado similar foi visto na parte radicular (81,31%). Esses dados são consistentes com o que foi verificado em *Q. grandiflora* (Silva, 2012). Além disso, o aspecto visual das folhas de *Q. dichotoma* mostrou que as plantas do controle (sem Al) apresentaram necroses e cloroses, similar ao que foi visto em plantas de *Q. grandiflora* quando não tratadas com Al (Silva, 2012).

Semelhantemente, *V. thyrsoidea* em condições de campo cresceu em solo ácido distrófico de forma satisfatória, no entanto, ao adicionar calcário no solo as plantas começaram a apresentar necroses e cloroses em suas folhas (Machado, 1985). O desenvolvimento normal foi restabelecido após as plantas serem tranferidas novamente para solos ácidos (Machado, 1985). O mesmo processo ocorreu em plantas de *M. albicans*, as quais não se desenvolvem adequadamente quando cultivadas em solos calcariados (Haridasan, 1988). A conclusão que os autores chegaram a respeito dessas espécies (*V. thyrsoidea*, *M. albicans* e *Q. grandiflora*), se baseia no fato destas plantas não conseguirem um suprimento ideal de Al nas condições diferentes do seu habitat natural (Machado, 1985; Haridasan, 1988; Silva, 2012).

Em plantas de chá, *C. sinensis*, outra acumuladora de Al, porém não nativa, foi possível observar que o Al tem efeito benéfico no seu crescimento. Nessa planta, quando tratada com Al se verifica um rápido crescimento de novas raízes, além de uma melhora no estado geral da planta (Jansen *et al.*, 2002). Contudo, mesmo com

capacidade de acumular Al, quando exposta a doses muito elevadas desse metal, seu crescimento é prejudicado (Hajiboland *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2016). Semelhantemente, outros trabalhos relataram o efeito benéfico do Al no desenvolvimento de outros genótipos mais tolerantes ao metal de espécies como milho (Wang *et al.*, 2015), arroz (Fageria, 1982; Fageria *et al.*, 1989), trigo (Delhaize *et al.*, 1993), trigo sarraceno (Klug e Hort, 2010), *B. decumbens*, *B. ruziziensis* (Wenzl *et al.*, 2001, 2002) e goiabeira (Salvador *et al.*, 2000). Tais trabalhos mostram que para cada espécie existe um limite de concentração de Al que beneficia o desenvolvimento

Outro fator verificado foi que o efeito da ausência do Al não foi imediato nas plantas de *Q. dichotoma*. É sabido, que as plantas acumuladoras conseguem estocar grandes quantidades de Al em diversos órgãos, como por exemplo as sementes (Haridasan, 2008²). Desta forma, é provável que as plantas controle de *Q. dichotoma*, no início do seu desenvolvimento, consigam manter o seu desenvolvimento normal, por obterem Al dos estoques presentes nas sementes. Por isto, na fase inicial (aos 30 dias) do desenvolvimento das plantas de *Q. dichotoma* não se percebeu diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 4). Entretanto, para dar mais consistência a essa hipótese a quantidade de Al nas sementes de *Q. dichotoma* deve ser quantificada.

É possível que em *Q. dichotoma* o Al seja de alguma forma um elemento essencial no metabolismo que favorece o crescimento e desenvolvimento ao passo que sua ausência pode ser vista como um estresse abiótico para esta espécie.

6.2. Análise de pigmentos fotossintéticos

Em geral o Al é considerado como prejudicial ao aparato fotossintético de plantas cultivadas como milho, soja, sorgo e trigo por afetar a absorção e translocação de nutrientes, dentre eles o magnésio e nitrogênio que constituem a molécula de clorofila (Codognotto *et al.*, 2002). O Al também afeta a absorção de luz, o transporte fotossintético de elétrons, as trocas gasosas, os sistemas de fotoproteção e a síntese de pigmentos fotossintéticos (Ohki, 1986; Moustakas *et al.*, 1995; Peixoto *et al.*, 2002; Milivojevic e Stojanovic, 2003; Jiang *et al.*, 2008; Konarska, 2010).

No entanto, o efeito do Al na fotossíntese depende da espécie, e mesmo entre genótipos de uma mesma espécie é possível verificar efeitos diferenciados em diversos

componentes do aparato fotossintético (Codognotto *et al.*, 2002). A literatura traz dados de trabalhos onde genótipos mais tolerantes ao Al apresentaram poucos (Moustakas *et al.*, 1997; Peixoto *et al.*, 2002) ou nenhum dano ao processo da fotossíntese, como é o caso do feijão-mungo (Codognotto *et al.*, 2002) e tomate (Simon *et al.*, 1994).

Quanto à quantidade de pigmentos fotossintéticos, *Q. dichotoma* apresentou diferenças significativas entre os tratamentos. Assim, em plantas tratadas com Al a quantidade de clorofila *a* (96,98%) foi praticamente o dobro que no controle. A quantidade de clorofila *b* foi ainda maior, três vezes maior que nas plantas não tratadas com Al. O mesmo se verificou com respeito aos carotenoides, 150,62% nas plantas tratadas com Al em comparação com às do controle. Resultados similares foram observados em *Qualea grandiflora* (Silva, 2012). Segundo Haridasan (2008²), estas espécies possuem um mecanismo adaptativo que leva a um crescimento rápido na presença de Al. Além dessas, outras acumuladoras de Al como *V. thyrsoidea* e *M. albicans* são exemplos clássicos de que o Al não afeta os teores de pigmentos fotossintéticos (Machado, 1985; Haridasan, 1988).

Além disso, o Al também estimulou o desenvolvimento e expansão das folhas resultando em uma área foliar maior em *Q. dichotoma* (Figura 3-A), o que pode resultar numa melhor fixação de carbono nas plantas tratadas. Adicionalmente, plantas não tratadas com Al mostraram sinais de necrose e clorose que pode prejudicar a fixação de carbono via fotossíntese. Em conjunto com a quantificação de pigmentos fotossintéticos, tais características atuam em desfavor das plantas controle no quesito eficiência fotossintética. Isso sugere que essas plantas podem estar sob estresse provocado pela ausência deste metal, o que suporta a ideia que há uma dependência metabólica de Al em *Q. dichotoma* para que atividades como fotossíntese promova um desenvolvimento adequado da planta.

7. CONCLUSÕES

- A presença do Al na solução nutritiva influenciou positivamente no crescimento aéreo e radicular das plantas de *Q. dichotoma* a partir de 60 dias de cultivo.
- Os teores de pigmentos fotossintéticos também foram maiores nas plantas que cresceram com a presença do Al
- Visualmente as plantas que foram suplementadas com Al mostraram folhas mais verdes e vistosas sem aspectos de deficiências nutricionais.
- Além de tolerar o Al *Qualea dichotoma* apresenta uma dependência metabólica a este metal para um desenvolvimento adequado.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, S. J.; SIVAGURU, M.; OSAWA, H.; CHUNG, G. P.; MATSUMOTO, H. Aluminum inhibits the H⁺ ATPase activity by permanently altering the plasma membrane surface potentials in squash roots. *Journal of Plant Physiology*, v. 126, p. 1381-1390, 2001.

BARNES, J. D.; BALAGUER, L.; MANRIQUE, E.; ELVIRA, S.; DAVISON, A.W. A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls a and b in lichens and higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, v. 32, p. 85-100, 1992.

CARVALHO, A. P. F.; BUSTAMANTE, M. M. C.; KOZOVITS, A. R.; ASNER, G. P. Variações sazonais nas concentrações de pigmentos e nutrientes em folhas de espécies de Cerrado com diferentes estratégias fenológicas. *Revista Brasileira de Botânica*. v. 30. n. 1. p. 19-27, 2007.

CODOGNOTTO, L. M.; SANTOS, D. M. M.; LEITE, I. C.; MARIN, A.; MADALENO, L. L.; KOBORI, N. N.; BANZATTO, D. A. Efeito do alumínio nos teores de clorofilas de plântulas de feijão-mungo e labe-labe. *Revista Ecosistema*, v. 27, n. 2, p. 27-39, 2002.

DELHAIZE, E.; RYAN, P. R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiology*. v.107, p.315-321, 1995.

DELHAIZE, E.; RYAN, P.R.; RANDALL, P. J. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) (II. Aluminum stimulated excretion of malic acid from root apices). *Plant Physiology*, v.103, p. 695-702, 1993.

ECHART, C. L.; CAVALLI-MOLINA, S. Fitotoxicidade do alumínio: efeitos, mecanismo de tolerância e seu controle genético. *Revista Ciência Rural*, v. 31, n. 3, p. 531-541, 2001.

FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V. C.; WRIGHT, R. J. The effects of aluminum on growth and uptake of Al and P by rice. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 24, n.6, p.677-682, 1989.

FAGERIA, N. K.; CARVALHO, J. R. P. Influence of aluminum in nutrient solutions on chemical composition in upland rice cultivars. *Plant and Soil*, v. 69, p. 31-44, 1982.

FAGERIA, N. K.; ZIMMERMANN, F. J. P. Seleção de cultivares de arroz para tolerância a toxidez de alumínio em solução nutritiva. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.14, n. 2, p.141-147, 1979.

FREITAS, F. A.; KOPP, M. M.; SOUSA, R. O.; ZIMMER, P. D.; CARVALHO, F. I. F.; OLIVEIRA, A. C. Absorção de P, Mg, Ca e K e tolerância de genótipos de arroz submetidos a estresse por alumínio em sistemas hidropônicos. *Revista Ciência Rural*, v. 36, n. 1, p. 72-79, 2006.

FURLANI, P.R.; FURLANI, A.M.C. Tolerância a alumínio e eficiência a fósforo em milho e arroz: características independentes. *Bragantia*, Campinas, v. 50, n. 2, p. 331-340, 1991.

GOMES, M.A.C.; SUZUKI, M.S.; CUNHA, M.; TULLII, C. F. Effect of salt stress on nutrient concentration, photosynthetic pigments, proline and foliar morphology of *Salvinia auriculata* Aubl. *Acta Limnologica Brasiliensia*, v. 23, n. 2, p. 164-176, 2011.

HAJIBOLAND, R.; BAHRAMI, R. S.; BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Mechanisms of aluminum-induced growth stimulation in tea (*Camellia sinensis*). *Journal of Plant Nutrition Soil Science*, v. 176, p. 616 - 625, 2013.

HARIDASAN, M. Alumínio é um elemento tóxico para as plantas nativas do cerrado? In: Prado, CHBA; Casali, CA. *Fisiologia Vegetal: práticas em relações hídricas, fotossíntese e nutrição mineral*. Barueri: Editora Manole, v.85, n. 204, p. 1553-1559, 2008¹.

HARIDASAN, M. Nutritional adaptations of native plants of the Cerrado biome in acid soils. *Brazilian Plant Physiology*, v. 20, n. 3, 2008².

HARIDASAN, M.; ARAÚJO, G. M. Aluminium-accumulating species in two forest communities in the Cerrado region of central Brazil. *Forest Ecology and Management*. v. 24, p. 15-26, 1988.

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. Mecanismos associados à tolerância ao alumínio em plantas. *Ciências Agrárias*. v. 28, p. 219-228, 2007.

JANSEN, S.; BROADLEY, M.; ROBBRECHT, E.; SMETS, E. Aluminium hyperaccumulation in angiosperms: a review of its phylogenetic significance. *The Botanical Review*, v. 68, n. 2. p. 235-269, 2002.

JIANG, H. X.; CHEN, L. S.; ZHENG, J. G.; HAN, S.; TANG, N.; SMITH, B.R. Aluminum-induced effects on photosystem II photochemistry in citrus leaves assessed by the chlorophyll a fluorescence transient. *Tree Physiology*, v. 28, p. 1863-1871, 2008.

JONES, D. L.; KOCHIAN, L. V. Aluminum inhibition of the inositol 1,4,5-triphosphate signal transduction pathway in wheat roots: a role of aluminum toxicity. *Plant Cell*, v. 7, n. 11, p. 1913-1922, 1995.

KHAN, N. A. NaCl-inhibited chlorophyll synthesis and associated changes in ethylene evolution and antioxidative enzyme activities in wheat. *Biologia Plantarum*, v. 47, n. 3, p. 437-440, 2003.

KLUG, B. W.; HORST, J. Spatial characteristics of aluminum uptake and translocation in roots of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). *Physiologia Plantarum*, v. 139, p. 181-191, 2010.

KOCHIAN, L. V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annual Review of Plant Biology*, v. 46, n. 1, p. 237-260, 1995.

KOCHIAN, L. V.; PIÑEROS, M. A.; LIU, J.; MAGALHAES, J. V. Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum resistance. *Annual Review of Plant Biology*, v. 66, p. 571-598, 2015.

KOCHIAN, L.V.; HOEKENGA, O. A.; PIÑEROS, M. A. How do crop plants tolerate acid soils? mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Journal of Plant Biology*, v. 55, p.459–493, 2004.

KONARSKA, A. Effects of aluminum on growth and structure of red pepper (*Capsicum annuum* L.) leaves. *Acta Physiology Plant*, v. 32, p. 145- 151, 2010.

LIU, C.; LIU, Y.; GUO, K.; FAN, D.; LI, G.; ZHENG, Y.; YU, L.; YANG, R. Effect of drought on pigments, osmotic adjustment and antioxidant enzymes in six Woody plant species in karst habitats of southwestern China. *Journal Environmental and Experimental Botany*, v.71, p. 174-183, 2011.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 352 p, 1992.

MA, J. F. Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants. *Plant and Cell Physiology*, v. 41, n. 4, p. 383–390, 2000.

MA, J. F.; RYAN, P. R.; DELHAIZE E. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends in Plant Science*, v. 6, n. 6, p. 273–278, 2001.

MACHADO, J. W. B. Acumulação de alumínio em *Vochysia thyrsoidea* Pohl. Dissertação de Mestrado, Brasília, DF, Universidade de Brasília, 1985.

MARIANO, E. D.; JORGE, R. A.; KELTJENS, W.G; MENOSSI, M. Metabolism and root exudation of organic acid anions under aluminium stress. *Journal Plant Physiology*, v.17, n. 1, p. 157-172, 2005.

MIGUEL, P. S. B.; GOMES, F. T.; DA ROCHA, W. S. D.; DE CARVALHO, C. A.; DE OLIVEIRA, A. V. Efeitos tóxicos do alumínio no crescimento das plantas: mecanismos de tolerância, sintomas, efeitos fisiológicos, bioquímicos e controles genéticos. *CES Revista*, v. 24, n. 1, p. 13-29, 2010.

MILIVOJEVIC, D. B.; STOJANOVIC, D. D. Role of calcium in aluminum toxicity on content of pigments and pigments-protein complexes of soybean. *Journal of Plant Nutrition*, v. 26, n. 2, p. 341-350, 2003.

MORITA, A.; YANAGISAWA, O.; MAEDA, S.; TAKATSU, S.; IKKA, T. Tea plant (*Camellia sinensis* L.) roots secrete oxalic acid and caffeine into medium containing aluminum. *Soil Science. Plant Nutrition*, v. 57, p. 796 e 802, 2011.

MORITA, A.; YANAGISAWA, O.; TAKATSU, S.; MAEDA, S.; HIRADATE, S. Mechanism for the detoxification of aluminum in roots of tea plant (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze). *Phytochemistry*, v. 69, p. 147 e 153, 2008.

MOUSTAKAS, M.; OUZOUNIDOU, G.; LANNOYE, R. Aluminum effects on photosynthesis and elemental uptake in an aluminum-tolerant and non-tolerant wheat cultivars. *Journal of Plant Nutrition*, v. 18, p. 669-683, 1995.

MOUSTAKAS, M.; ELEFThERIOU, E. P.; OUZOUNIDOU, G. Short-term effects of aluminium at alkaline pH on the structure and function of the photosynthetic apparatus. *Photosynthetica*, v. 34, p. 169–177, 1997.

MUKHOPADYAY, M.; BANTAWA, P.; DAS, A.; SARKAR, B.; BERA, B.; GHOSH, P.; MONDAL, T. K. Changes of growth, photosynthesis and alteration of leaf antioxidative defence system of tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] seedlings under aluminum stress. *Biometals*, v. 25, n. 6, p. 1141-1154, 2012.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Journal of Plant Physiology*, v. 15, p. 473-497, 1962.

OHKI, K. Photosynthesis, chlorophyll, and transpiration responses in aluminum stressed wheat and sorghum. *Crop Science*, v. 26, p. 572-575, 1986.

PATERNIANI, M. E. A. G.; FURLANI, P. R. Tolerância à toxicidade de alumínio de linhagens e híbridos de milho em solução nutritiva. *Bragantia*, v. 61, n. 1, p. 11-16, 2002.

PEIXOTO, P. H.; DA MATTA, F.M.; CAMBRAIA, J. Responses of the photosynthetic apparatus to aluminum stress in two sorghum cultivars. *Journal of Plant Nutrition*, v. 25, p. 821-832, 2002.

RONEN, R.; GALUN, M. Pigment extraction from lichens with Dimethyl Sulfoxide (DMSO) and estimation of chlorophyll degradation. *Environmental and Experimental Botany*, v. 24, p. 239-245, 1984.

RYAN, P. R.; DELHAIZE, E.; JONES, D. L. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Journal Plant Physiology, Plant Molecular Biology*, v. 52, p. 527–560, 2001.

RYAN, P. R.; RAMAN H.; GUPTA S.; HORST, W. J.; DELHAIZE, E. A second mechanism for aluminum resistance in wheat relies on the constitutive efflux of citrate from roots. *Journal Plant Physiology*, v. 149, p. 340–351, 2009.

RYAN, P. R.; TYERMAN, S. D.; SASAKI, T.; FURUICHI, T.; YAMAMOTO, Y.; ZHANG, W. H.; DELHAIZE, E. The identification of aluminium-resistance genes provides opportunities for enhancing crop production on acid soils. *Journal of Experimental Botany*, v. 62, n. 1, p. 9-20, 2011.

SALVADOR, J. O.; MOREIRA, A.; MALAVOLTA, E.; CABRAL, C. P. Influência do alumínio no crescimento e na acumulação de nutrientes em mudas de goiabeira. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 24, n. 4, p. 787-796, 2000.

SCHIER, G. A. Response of red spruce and balsam fir seedlings to aluminium toxicity in nutrient solutions. *Canadian Journal of Forest Research*. v.15, n. 1, p. 29-33, 1985.

SHARMA, P. K.; HALL, D. O.; Interaction of salt stress and photoinhibition on photosynthesis in barley and sorghum. *Journal of Plant Physiology*, v. 138, n. 5, p. 614-619, 1991.

SILVA, R. C. C. Aspectos fisiológicos, fitoquímicos e proteômicos de *Qualea grandiflora* Mart. em resposta ao alumínio. Dissertação de Mestrado, Brasília, DF, Universidade de Brasília. 2012.

SIMON, L.; SIMALLEY, T. J.; JONES, J. B.; LASSEIGNE, F. T. Aluminium toxicity in tomato. Part 2. Leaf gas exchange, chlorophyll content, and activity. *Journal of Plant Nutrition*, v. 17, p. 307–311, 1994.

STEINER, F.; ZOZ, T. ; PINTO JÚNIOR, A. S.; CASTAGNARA, D. D. ; DRANSKI, J. A. L. Effects of aluminum on plant growth and nutrient uptake in young physic nut plants. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 33, p. 1779-1788, 2012.

TABALDI, L. A. Avaliação bioquímica-fisiológica de clones de batata em relação ao alumínio. Tese de doutorado, Santa Maria, RS, Universidade Federal de Santa Maria, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 4.ed. Porto Alegre: Artmed. 819p. 2009.

THAWORNWONG, N.; DIEST, A. V. Influence of high acidity and aluminum on the growth of lowland rice. *Plant and Soil*, Netherlands, v. 41, n.1, p.141-159, 1974.

WANG, L.; FAN, X. W.; PAN, J. L.; HUANG, Z. B.; LI, Y. Z. Physiological characterization of maize tolerance to low dose of aluminum, highlighted by promoted leaf growth. *Planta*, v. 242, n. 6, p. 1391-1403, 2015.

WELLBURN, A. R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, v. 144, p. 307-313, 1994.

WENZL, P.; CHAVES, A. L.; PATIÑO, G. M.; MAYER, J. E.; RAO, I. M. Aluminum stress stimulates the accumulation of organic acids in root apices of *Brachiaria* species. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, n. 165, v. 5, p. 582-588, 2002.

WENZL, P.; PATIÑO, G. M.; CHAVES, A. L.; MAYER, J. E.; RAO, I. M. The high level of aluminum resistance in signal grass is not associated with known mechanisms of external aluminum detoxification in root apices. *Plant Physiology*, v. 125, n. 3, p. 1473-1484, 2001.

XINWEN, X.; HAILIANG, X.; YANGLING, W.; XIAOJING, W.; YONGZHI, Q.; BO, X. The effect of salt stress on the chlorophyll level of the main sand-binding plants in the shelter belt along the Tarim Desert Highway. *Chinese Science Bulletin*, v. 53, p. 109-111, 2008.

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. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 101, p. 162-172, 2016.

YANG, L.T.; QI, Y.P.; JIANG, H. X.; CHEN, L. S. Roles of Organic Acid Anion Secretion in Aluminium Tolerance of Higher Plants. *BioMed Research International*, v. 2013, 2013.

ZHANG, H.; JIANG, Z.; QIN, R.; ZHANG, H.; ZOU, J.; JIANG, W.; LIU, D. Accumulation and cellular toxicity of aluminum in seedling of *Pinus massoniana*. *BMC Plant Biology*, v. 14, 2014.

ZHENG, L.; LAN, P.; SHEN, R. F.; LI, W. F. Proteomics of aluminum tolerance in plants. *Proteomics*, v. 14, p. 566-578, 2014.

CAPÍTULO II – Análise histoquímica com hematoxilina em plantas de *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. (Vochysiaceae) em resposta à presença de alumínio.

1. Histochemistry analysis with hematoxylin in plant *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. (Vochysiaceae) in response to the presence of aluminum.

1.1. Abstract

When solubilized in acid soils (pH <5,5), the Al becomes toxic to most plants. However, some plants, even in acid soils, are able to tolerate and accumulate this metal in their tissues. Some Cerrado plants are classic examples of such behavior. The Al location within the plant may help to better understand the translocation and accumulation of the metal takes place in these plants, as well as how they benefit from it. The objective of this study was to detect the presence and distribution of Al in leaves (midrib, stem and root) of *Qualea dichotoma*. *Q. dichotoma* plants were grown in nutrient solution with and without Al for 60 days.. Handmade cross sections were immersed in hematoxylin solution (0,2% hematoxylin + 0,02% NaIO₃). The sections from both treatments were observed and photographed with a camera attached to the microscope. Hematoxylin was able to detect Al in plant organs of individuals grown with Al, nevertheless; in the control plants the reaction was more intense in leaves and roots only. In leaves, the adaxial epidermal and parenchymal chlorophyll of plants grown with Al were not stained, and in the control plants only stained the abaxial epidermis and xylem (slightly). In the stems of the plants treated with Al were stained. Conversely, the control plants no tissue of the stem showed positive reaction. Root from plants treated with Al had all tissues stained, whereas the control only the cortex showed positive reaction. According to the results it is concluded that in *Q. dichotoma* Al may be translocated from roots to leaves. The color, although less intense in plant tissues, plants that those that did not receive Al, the positive reactions for the presence of this metal may be associated with Al present in seeds.

Keywords: Aluminum, hematoxylin, tissue, Vochysiaceae

2. Análise histoquímica com hematoxilina em plantas de *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. (Vochysiaceae) em resposta à presença de alumínio.

2.1. Resumo

Ao ser solubilizado em solos ácidos (pH < 5,5), o Al torna-se tóxico para a maioria das plantas. No entanto, algumas plantas, mesmo em solos ácidos são capazes de tolerar e acumular este metal em seus tecidos. Algumas plantas do Cerrado são exemplos clássicos de tal comportamento. A localização do Al dentro da planta pode ajudar a compreender melhor a translocação e acúmulo desse metal, bem como o efeito benéfico do Al nesta planta. O objetivo deste estudo foi detectar a presença e distribuição de Al nas folhas (nervura central, caule e raiz) de *Qualea dichotoma*. Plantas de *Q. dichotoma* foram cultivadas em solução nutritiva com e sem Al por 60 dias. Foram realizados cortes transversais com micrótomo de bancada e estes imersos em solução de hematoxilina (0,2% hematoxilina + 0,02% NaIO₃). Os cortes dos dois tratamentos foram visualizados e fotografados com microscópio com câmera acoplada. A hematoxilina foi capaz de detectar Al em órgãos das plantas cultivadas com Al, no entanto, nas plantas controle a reação foi mais intensa apenas para folhas e raízes. Nas folhas, a epiderme adaxial e parênquima clorofiliano das plantas cultivadas com Al também não foram corados, assim como nas plantas controle, as quais tiveram apenas epiderme abaxial e xilema corados (ligeiramente). Nos caules das plantas tratadas com Al todos os tecidos foram corados. Ao contrário, nas plantas controle nenhum tecido apresentou reação positiva. Já em raiz das plantas tratadas todos os tecidos foram corados, enquanto que no controle somente o córtex apresentou reação positiva. De acordo com os resultados conclui-se que em *Q. dichotoma* o Al pode ser translocado das raízes até as folhas. A coloração, embora menos intensa nos tecidos das plantas que não receberam o metal pode estar associada com o Al presente nas sementes.

Palavras chave: Alumínio, hematoxilina, tecidos, Vochysiaceae

3. INTRODUÇÃO

3.1. Detecção da presença de Al em órgãos vegetais

O Al é um elemento abundante em solos ácidos que ao ser solubilizado torna-se tóxico para a maioria das plantas e limita inúmeras culturas em torno do mundo (Delhaize e Ryan, 1995). Os efeitos deste metal em plantas sensíveis ou menos tolerantes são geralmente negativos, como, por exemplo, a interrupção da divisão celular e conseqüentemente, o crescimento radicular. Em processos fisiológicos é possível também verificar danos em proteínas de transporte na membrana e na homeostase do cálcio (Garzon *et al.*, 2011).

No entanto boa parte das plantas do Cerrado é capaz de acumular Al em seus tecidos devido estratégias desenvolvidas para imobilizar o metal com ácidos orgânicos em compartimentos celulares específicos como cloroplastos e protoplastos (Tabaldi, 2008). Além de tolerar o Al, as plantas nativas do Cerrado possuem uma característica peculiar de não serem afetadas negativamente pelo metal, pelo contrário o Al parece desempenhar uma importante função no metabolismo destas espécies sem que haja efeito tóxico (Haridasan, 2008). Exemplificando, estudos com *Vochysia thyrsoidea* e *M. albicans* mostraram menor desempenho com folhas cloróticas e necrosadas quando crescidas em solos calcariados (Machado, 1985; Haridasan, 1988). Resultados semelhantes foram encontrados também em *Q. grandiflora* quando cultivada na ausência de Al (Silva, 2012).

Adicionalmente, Zheng *et al.* (1998) verificaram que em *Fagopyrum esculentum* Moench. o Al estava complexado com o citrato no xilema, enquanto que Shen *et al.* (2002) encontraram na mesma espécie 80% do Al complexado com oxalato no protoplastos foliar. Em *Hydrangea macrophylla* (Thunb.). Ser. Ma *et al.* (1997) mostraram que o Al formava complexos estáveis com citrato nos tecidos foliares desta espécie. Além dessas, muitas outras espécies do Cerrado acumulam grandes quantidades de Al em partes aéreas. Haridasan (2008) sugere que esse transporte ocorra das raízes para as partes aéreas via xilema.

Desta forma, além da peculiaridade de acumular Al devido as características de solo ácido do Cerrado, alguns estudos mostram que as espécies acumuladoras de Al

também são muito importantes em diversas fitofisionomias do Cerrado. O índice de valor de importância (IVI) dessas espécies chega a mais de 43% (Ribeiro, 1983; Haridasan, 1987; Haridasan e Araújo, 1988). O estudo de qualquer natureza dessas plantas se torna valioso tanto para o bioma quanto para o entendimento da mobilização do Al nestas espécies bem como seu metabolismo, o qual ainda não está bem elucidado (Haridasan *et al.*, 1986; Haridasan, 2008; Silva, 2009). Como citado anteriormente, o conhecimento mais difundido sobre o Al nestas acumuladoras até o momento gira em torno de mecanismos de desintoxicação do Al através de ligantes como ácidos orgânicos (Ma *et al.*, 2001; Watanabe e Osaki, 2002). Sabe-se que nestas plantas nativas ocorre uma compartimentalização do Al. Desta forma, o metal é estocado em diferentes locais intra e extracelular, como vacúolo e tecidos foliares sem que interfira no metabolismo da planta (Ma *et al.*, 2001; Watanabe e Osaki, 2002).

Além da compartimentalização, algumas pesquisas sugerem que o transporte de Al ocorre via xilema e/ou floema, devido às altas concentrações em folhas jovens e sementes, o que também pode indicar uma função metabólica desse elemento nessas plantas (Haridasan *et al.*, 1986; Haridasan, 2008). Em *V. thyrsoidea*, *Miconia pohliana* Gogn. e *Vochysia rufa* (Spr.) Mart. por exemplo, pesquisadores verificaram que o Al era acumulado nas sementes e a translocação para as folhas ocorria via floema (Haridasan *et al.* 1986, 1987). Em outras espécies como *Faramea marginata* e *Palicourea rigida* o Al foi localizado na epiderme das folhas (Matsumoto, 1976; Haridasan *et al.*, 1986). Igualmente em *Q. grandiflora*, *Q. parviflora* e *Q. multiflora* foi localizado Al em grandes quantidades na epiderme e parede celular de tecido foliar (Haridasan *et al.*, 1986).

3.2. Testes histoquímicos na detecção de Al e plantas acumuladoras

Os testes histoquímicos consistem de reações cromáticas que usam reagentes que tenham especificidade para determinadas estruturas ou compostos celulares ou em tecidos, como por exemplo, elementos na membrana ou outras organelas no interior celular (Costa e Proença da Cunha, 2000). Assim, o uso dessa técnica possibilitou mostrar que partes aéreas como folhas e sementes de plantas acumuladoras de Al continham esse metal, o qual foi provavelmente transportado da raiz para as partes aéreas da planta (Ma *et al.*, 1997; Haridasan, 2008). Os testes histoquímicos geralmente

são de natureza qualitativa, porém é possível analisar componentes celulares quantitativamente (Gersbach *et al.*, 2001).

Estudos histoquímicos com corantes específicos têm auxiliado a entender melhor o processo de translocação e distribuição do Al na planta. Através de testes específicos é possível detectar esse metal nos diversos tecidos vegetais (Cotta *et al.*, 2008). Além do uso de corantes ser uma técnica relativamente de baixo custo, sua ação ocorre de forma rápida e eficiente se considerados todos os parâmetros necessários como por exemplo a razão H⁺/OH⁻ no meio intra e extracelular, estágio de crescimento do órgão e no caso do Al o seu sítio de acumulação provável na planta (Jacob Neto *et al.*, 1991; Jacob Neto, 1993; Barceló e Poschenraider, 2002; Rossiello e Jacob Neto, 2006).

Dentre os corantes que vem sendo utilizado com eficiência para detecção de Al estão a hematoxilina, quinalizarina, azul de metileno, aluminon e violeta de pirocatecol (Haridasan *et al.*, 1986; Kinraide, 1988; Massot *et al.*, 1991; Jacob Neto, 1993; Wagatsuma *et al.*, 1998; Cotta *et al.*, 2008; Silva 2012). O corante hematoxilina tem sido utilizado e mostrado resultados eficientes em trabalhos com espécies do gênero *Qualea*.

Em *Qualea grandiflora*, o uso dos corantes hematoxilina e aluminon possibilitou detectar a presença de Al em vários tecidos e órgãos dessa planta (Haridasan *et al.* 1986; Barros *et al.*, 2000). Consistentemente, Haridasan *et al.* (1987) e Haridasan (2008) obtiveram resultados semelhantes com os mesmos corantes em *Qualea multiflora* Mart., *Palicourea rigida* H.B.K., e *Vochysia thyrsoidea* Pohl. Cotta *et al.* (2008) também mostraram a presença de Al em tecidos de várias outras espécies acumuladoras do Cerrado utilizando os mesmos corantes mencionados acima. Esses autores concluíram que esses corantes são eficientes na detecção desse metal em tecidos vegetais e pode ser um método complementar para se entender melhor a translocação e distribuição do Al dentro da planta. No entanto em trabalho recente com *Q. grandiflora* foi feita uma comparação entre a eficiência entre hematoxilina e aluminon na identificação de Al em diversos órgãos, concluindo que o aluminon foi mais sensível na detecção de quantidades menores de Al em tecido foliar. Para caule e raiz a intensidade das reações foi basicamente igual nos diversos tecidos (Silva, 2012).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material vegetal para testes histoquímicos

Sementes de *Qualea dichotoma* foram germinadas por 20 dias em B.O.D sendo mantidas com água destilada em papel absorvente. Aos 20 dias, plantas com raízes de 2-3 cm de comprimento, tamanhos uniformes e aparência sadia foram selecionadas e transferidas para sacos plásticos contendo vermiculita autoclavada. As plantas foram divididas em dois tratamentos e regadas a cada dois dias com solução nutritiva de $1/5$ MS (Murashige e Skoog, 1962) com adição de 150 μ M de $AlCl_3$ (cloreto de alumínio) e com $1/5$ MS sem suplementação de $AlCl_3$. O pH do meio nutritivo foi ajustado com HCl 0,1 M e KOH 0,1 M, ficando entre 4,8 -5,0 para que o Al pudesse se solubilizar na solução. As plantas foram mantidas a temperatura de 25 °C, umidade relativa de 70% e fotoperíodo de 18 h.

4.2. Detecção de Al em lâmina foliar, caule e raiz

Aos 60 dias as amostras da porção mediana da lâmina foliar (do 2° nó e expandidas), caule e raiz de quatro indivíduos de cada tratamento foram retiradas e colocadas em água para mantê-las até o momento de cortes. Posteriormente foram feitos cortes em secções transversais em micrótomo de bancada. Em sequência, os cortes de lâmina foliar, caule e raízes foram imersos por 1 h em solução de hematoxilina (0,2% hematoxilina + 0,02% $NaIO_3$) (Vetec) e em seguida lavadas por 5 min em água Milli-Q (adaptado de Silva, 2012). As lâminas foram montadas com glicerina 1:1 e analisadas imediatamente em microscópio Axioscope (Zeiss) com câmera digital acoplada.

5. RESULTADOS

5.1. Diferenças morfoanatômicas para lâmina foliar, caule e raiz de *Q. dichotoma* em resposta ao Al.

Morfologicamente, as folhas das plantas tratadas com Al eram maiores e possuíam um aspecto mais saudável que aquelas do controle (Figura 1-A). Anatomicamente não houve diferença perceptível na estrutura foliar das plantas de *Q. dichotoma* cultivadas por 60 dias de cultivo quando se comparou aquelas tratadas com Al e controle. Na nervura principal foi possível observar feixes vasculares colaterais compostos por xilema e floema secundários formando um semicírculo. Além disso,

havia feixes de fibras descontínuos que circundavam a nervura central. Na face adaxial, entre as fibras e o xilema havia uma região parenquimática (medula). Ainda, compondo a região da nervura principal foi observado um parênquima clorofiliano paliádico interrompido na face adaxial e parênquima incolor na face abaxial seguido da epiderme mais externamente (Figura 1 B-E).

A epiderme do caule é simples (Figura 2-A). Logo abaixo da epiderme se percebia a presença de uma possível hipoderme e uma camada adicional de parênquima incolor, compondo o córtex caulinar (Figura 2-A). Internamente ao córtex havia uma região descontínua de fibras, provavelmente compondo um desativado floema primário (Figura 2-A). abaixo do córtex era possível observar o floema secundário razoavelmente desenvolvido. Interno ao floema secundário estava o câmbio vascular e então uma espessa camada de xilema secundário e medula parenquimática (Figura 2-A-C).

A raiz estava em transição de estrutura primária para secundária (Figura 3-A). A epiderme era simples e havia uma região cortical internamente que já mostrava sinais de rompimento devido à quantidade de tecido vascular secundário (Figura 3-A-C). Junto ao córtex, percebia-se que o periciclo estava se tornando em felogênio, com células já em processo de divisão celular (Figura 3-C). O xilema secundário já havia se tornado circular e era circundado por floema secundário (Figura 3-B e D). Não foi possível classificar o xilema primário quanto ao número de polos de protoxilema em função da quantidade de câmbio vascular secundário (Figura 3-B-F).

5.2. Eficiência do reagente hematoxilina na detecção de Al em tecidos de folha, caule e raiz de *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm.

Os resultados do teste com hematoxilina mostraram uma coloração que vai de azul a roxo escuro, sendo que, em geral, foi possível observar maior intensidade nos tecidos das plantas crescidas com Al (Figuras 1 a 3). Nas plantas controle, também coraram com hematoxilina, que pareceu ser menos intensa que naquelas tratadas com Al (Figuras 1 a 3). A Tabela 1 mostra de forma geral a detecção de Al nos três órgãos (folha, caule e raiz) das plantas cultivadas com e sem Al. É mostrada a intensidade do corante hematoxilina para cada tecido dos órgãos citados, sendo: (-) não houve reação, (+) houve reação e (+ +) reação intensa.

A Figura 1 mostra a folha de *Q. dichotoma* aos 60 dias de cultivo sob tratamento com e sem Al corada com hematoxilina. É possível verificar a diferença no tamanho das folhas cultivadas com Al (à esquerda) e sem Al (à direita) (Figura 1-A). Os cortes transversais das folhas cultivadas sem Al (Figura 1-B) e com Al (Figura 1-C) representando o controle para o teste histoquímico. Na Figura 1 se observa cortes da lâmina foliar das plantas cultivadas sem Al e com Al. O teste com hematoxilina mostra que aquelas crescidas com Al tiveram uma reação mais intensa que as folhas do controle.

No Caule (Figura 2) as secções transversais mostram resultados semelhantes ao que foi observado em folhas (Figura 1). A diferença da reação entre os tratamentos também foi perceptível no caule. A Figura 2-D-F mostra o caule das plantas cultivadas sem Al, nas quais nenhum dos tecidos mostrou a reação positiva. Por outro lado, na Figura 2-G-I mostra o corte transversal de caule das plantas cultivadas com Al, onde foi possível observar coloração intensa na epiderme, medula, córtex, xilema, floema e fibras do floema.

Em raiz (Figura 3-A-C) a reação com hematoxilina foi menos intensa nos dois tratamentos. Em geral, todos os tecidos da raiz de *Q. dichotoma* com menos intensidade com hematoxilina (Figura 3-D-F). Nas raízes de plantas tratada com Al coradas com hematoxilina não se percebe grande diferença em relação às raízes de plantas não tratadas (Figura 3-G-I).

Tabela 1. Detecção de Al por análise histoquímica com hematoxilina na raiz, caule e lâmina foliar de plantas de *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. aos 60 dias de cultivo na presença e ausência de Al (150 µM).

Órgão /tecido	Sem Al	Com Al
Folha		
Epiderme adaxial	-	-
Epiderme abaxial	+	++
Xilema	+	++
Floema	-	++
Câmbio vascular	-	-
Parênquima	-	++
Parênquima clorofiliano	-	-
Caule		
Epiderme	-	++
Córtex	-	++
Xilema	-	++
Fibras do floema	-	++
Floema	-	++
Medula	-	++
Raiz		
Epiderme	-	+
Endoderme	-	+
Córtex	+	+
Floema	-	+
Xilema	-	+

(-) não houve reação, (+) reação positiva, (+ +) reação positiva intensa

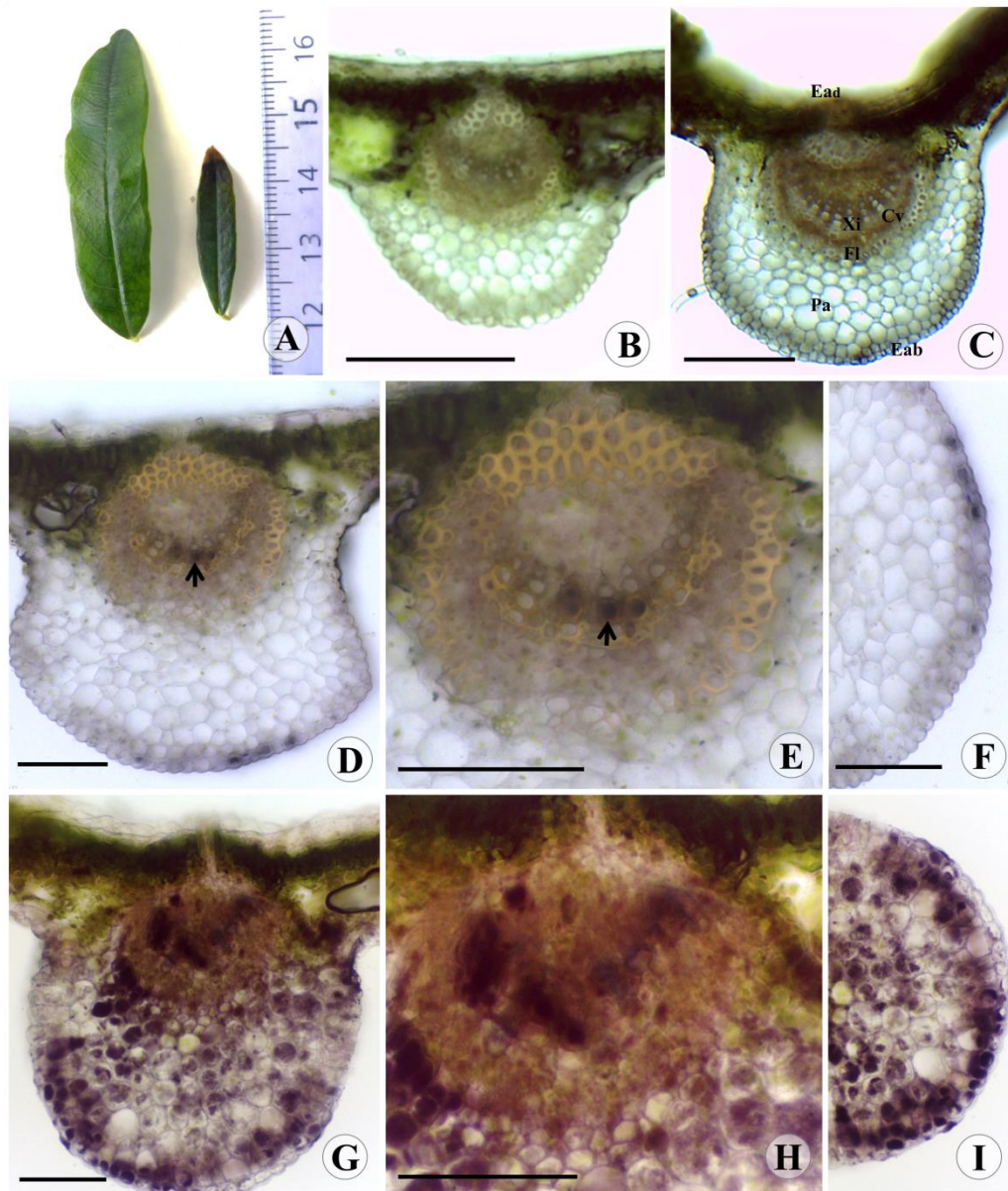


Figura 1. Teste histoquímico com hematoxilina em lâmina foliar de *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. aos 60 dias de cultivo com e sem Al. **A-** Aspecto geral das folhas dos tratamentos. À esquerda folha de planta crescida com Al. À direita folha de planta crescida sem Al. **B-** Secção transversal da nervura principal da folha de *Q. dichotoma* cultivada sem Al sem reação com hematoxilina. **C-** Secção transversal da nervura de *Q. dichotoma* cultivada com Al não corada com hematoxilina. **D-F-**Secção transversal da folha de *Q. dichotoma* corada com hematoxilina cultivadas sem a presença de Al. **D-** Nervura principal. **E-** Detalhe do feixe vascular da nervura principal. **F-** Região parenquimática da nervura principal. **G-I-** Cortes transversais da folha de *Q. dichotoma* corada com hematoxilina cultivadas na presença de Al. **G-** Nervura principal de folha corada com hematoxilina. **H-** Feixe vascular da nervura principal. **I-** Parênquima da Nervura principal na face abaxial. Eab: epiderme abaxial, Ead: Epiderme adaxial, cv: câmbio vascular, Pa: parênquima, Fl: floema, Xi: xilema. Barras de Escalas: B-C: 200 μ m; D-H: 100 μ m; F-I: 25 μ m. Seta indica a reação positiva no xilema.

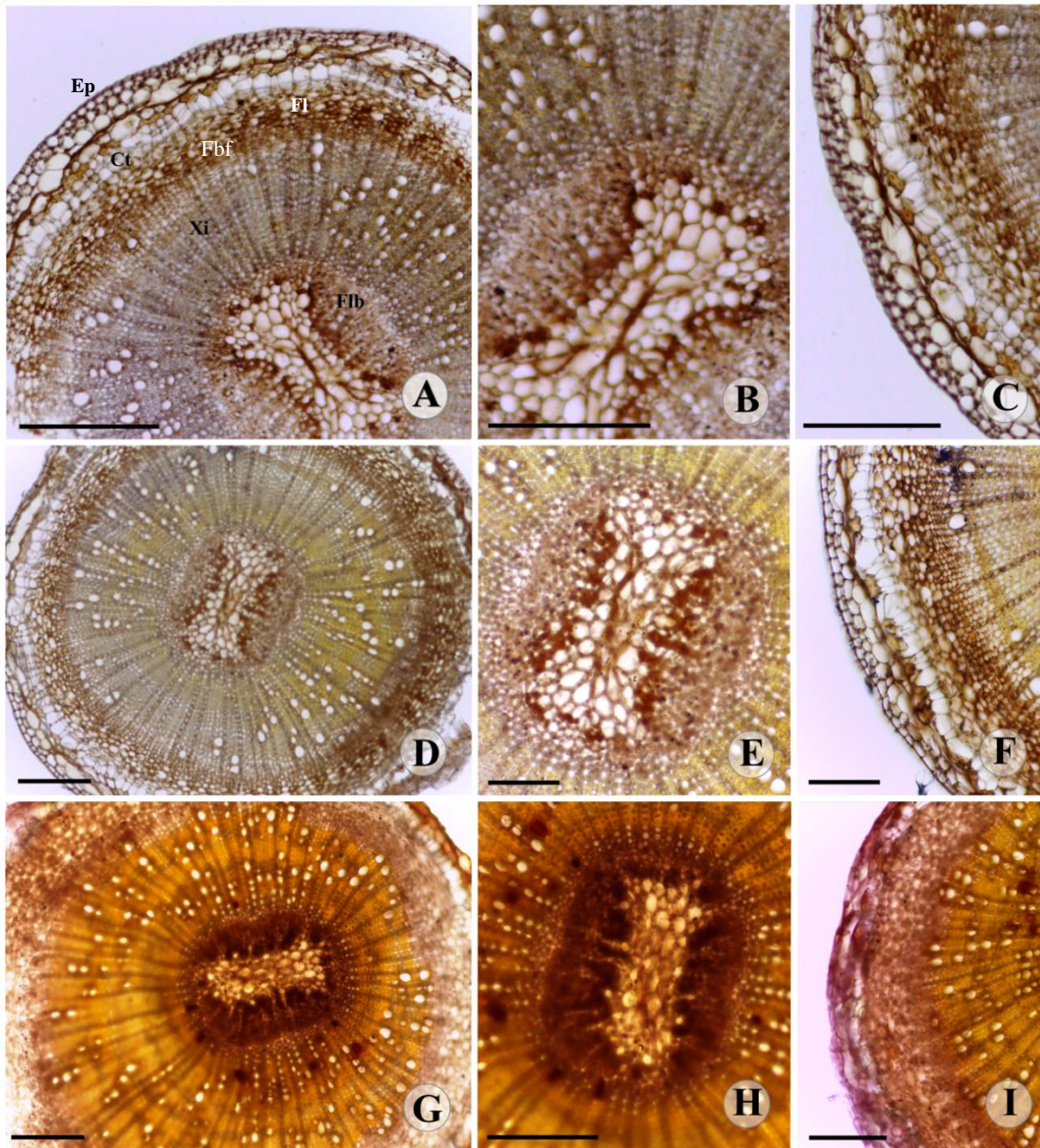


Figura 2. Teste histoquímico para detecção de Al em caule de *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. com 60 dias de cultivo na presença e ausência de Al. **A-C-** Secções transversais do caule de *Q. dichotoma* sem uso de corante. **D-F-** Cortes transversais do caule de *Q. dichotoma* cultivada sem Al corado com hematoxilina. **G-I-** Caule de *Q. dichotoma* em secção transversal cultivada com Al corado com hematoxilina. Perceba a diferença na intensidade de coloração entre amostras dos dois tratamentos. Ct: córtex, Ep: epiderme, Fbf: fibras do floema, Flb: f ibras libriformes, Fl: floema, Me: medula, Xi: xilema. Escalas: A, B, D, E, I – 200 μm ; C, F, G, H – 100 μm .

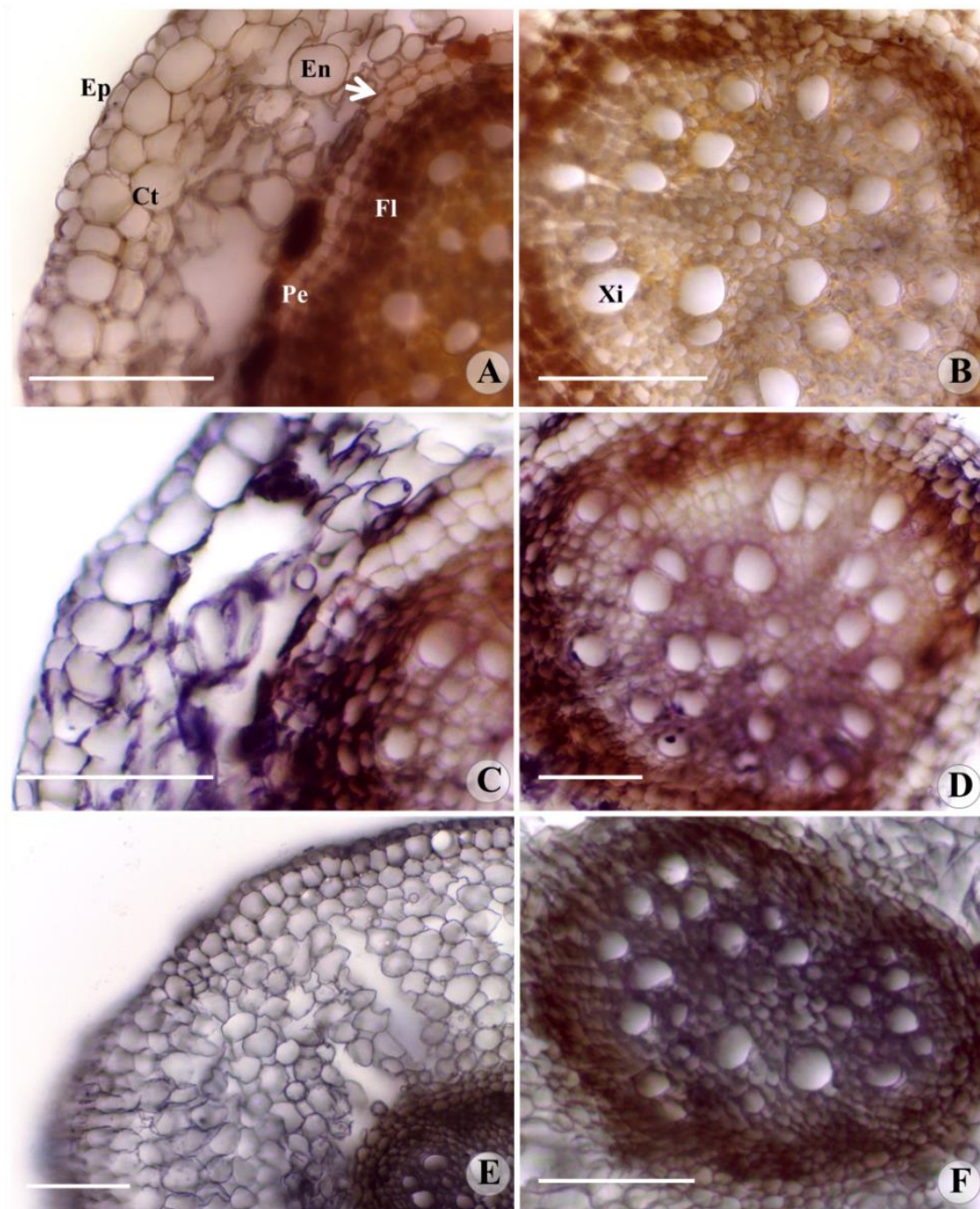


Figura 3. Secções transversais de raízes de *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. aos 60 dias de cultivo na presença e ausência de Al coradas com hematoxilina. **A-B-** Raízes de *Q. dichotoma* sem uso de corante. **C-D.** Raízes de *Q. dichotoma* cultivada sem Al e coradas com hematoxilina. **E-F-** Raízes de *Q. dichotoma* cultivadas com Al e coradas com hematoxilina. Ct: córtex, En: endoderme; Ep: epiderme, Fl: floema secundário, Pe: periderme, Xi: xilema secundário. Barras de Escalas: A, C, F – 100 μ m; E – 200 μ m.

6. DISCUSSÃO

6.1. Análise anatômica

Anatomicamente, após 60 dias de cultivo plantas de *Q. dichotoma* crescidas com e sem Al não apresentaram grandes diferenças internas na raiz, caule e lâmina foliar. É provável que o tempo de exposição ainda não tenha sido suficiente para que a presença ou ausência do Al provocasse uma alteração anatômica. De forma semelhante, estudos com plantas de *Q. grandiflora* nas mesmas condições, com 120 dias de cultivo não foi verificado diferenças anatômicas entre os tratamentos. A sugestão foi que o desenvolvimento das plantas ainda estivesse em fase inicial sendo ainda cedo para perceber diferenças desta natureza (Silva, 2012).

6.2. Localização do Al em *Q. dichotoma* evidenciado pelo corante hematoxilina

A utilização de testes histoquímicos tem sido bastante usada para detectar metais em diferentes tecidos e compartimentos celulares, sendo de grande importância nos estudos de localização de íons de Al (Haridasan, 1986). No presente trabalho foi analisada a eficiência do corante hematoxilina em detectar Al nos tecidos de folha, caule e raiz de plantas de *Q. dichotoma* cultivadas com e sem Al, fornecido na forma de $AlCl_3$ (150 μ M) durante 60 dias.

Os resultados (Tabela 1) mostram que a hematoxilina foi capaz de detectar a presença de Al nas plantas de *Q. dichotoma* cultivadas sem a presença do Al. No entanto, a maior intensidade de reação foi nas plantas tratadas com Al, notada principalmente em lâmina foliar e caule. Entretanto, em raízes a reação com hematoxilina mostrou diferença sutil de intensidade de coloração entre os tratamentos. Devido a essas inconsistências, serão necessários novos testes com outros corantes mais sensíveis que consigam detectar pequenas quantidades de Al.

Em *Q. dichotoma* a detecção da presença de Al em tecidos de lâmina foliar e raiz das plantas que não receberam Al já era esperada. Semelhantemente, *Q. grandiflora*, espécie do mesmo gênero, submetida a condições similares de crescimento, a hematoxilina também mostrou a presença de Al em tecidos do caule e raiz (Silva, 2012). Já no limbo foliar (Tabela 1) de *Q. dichotoma*, o tratamento controle também evidenciou a presença deste metal na epiderme abaxial, fato que não ocorreu em *Q.*

grandiflora (Silva, 2012). Portanto, os resultados em *Q. dichotoma* são consistentes com os encontrados em *Q. grandiflora* e *V. pyramidalis* quando em baixas concentrações de Al (Andrade *et al.*, 2009).

A detecção de Al no limbo foliar das plantas que não receberam Al indica que o Al pode ser mobilizado das sementes para as partes aéreas. A mobilização do Al também foi sugerida por Haridasan (1986) ao utilizar o corante aluminon e verificar intensa coloração nos elementos do floema de folhas de espécies das famílias Melastomataceae, Rubiaceae e Vochysiaceae. Desta última família, foram analisadas três espécies de *Qualea*, *Q. grandiflora*, *Q. multiflora* e *Q. parviflora*.

As indicações deste teste mostram que plantas que receberam Al houve detecção do metal na epiderme abaxial, xilema, floema e parênquima das folhas. Não se observou reação positiva no parênquima clorofiliano e epiderme adaxial. O parênquima clorofiliano é mostrado sem reação positiva em trabalho com dez acumuladoras de Al ao serem coradas com aluminon (Haridasan *et al.*, 1986). Porém, em *Q. grandiflora* se verificou uma coloração deste tecido na presença de hematoxilina. Isto sugere que possa haver acúmulo de Al neste tecido e os cloroplastos podem ser um local de acúmulo (Silva, 2012). Isto também foi observado em estudos *Vochysia pyramidalis*, *Sclerobium paniculatum* e *Q. grandiflora* (Andrade *et al.*, 2009).

Desta forma é possível concluir que a detecção e intensidade da coloração podem variar de espécie para espécie e mesmo dentro da mesma planta dependendo das condições de crescimento. Além disso, é possível que o tempo de crescimento e exposição ao Al também possa influenciar na eficiência do corante. Outros trabalhos histoquímicos com hematoxilina mostram resultados parecidos em tecidos foliares de *Qualea multiflora* Mart., *Palicourea rigida* H.B.K., e *Vochysia thyrsoidea* (Haridasan *et al.*, 1987; Haridasan, 2008). Cotta *et al.* (2008) também utilizaram hematoxilina para confirmar a presença de Al nas folhas de *Vochysia thyrsoidea* e *Q. grandiflora*.

A falta de reação positiva nos tecidos do caule das plantas controle de *Q. dichotoma* (Tabela 1) mostra que este órgão pode não acumular Al, mas ser apenas o caminho para a mobilização deste metal pela planta. Resultados similares foram vistos em *Q. grandiflora* onde a hematoxilina também não evidenciou a presença de Al em alguns tecidos deste órgão (Silva, 2012). Outra possibilidade seria a capacidade de

resolução da hematoxilina em detectar a presença de Al. É possível que este corante não seja capaz de detectar concentrações menores de Al. Outra questão se refere à consistência deste corante em detectar este metal, visto que ele foi capaz de mostrar a presença de Al em tecidos condutores de vários órgãos (Haridasan *et al.*, 1986; Haridasan, 2008), porém em tecidos caulinares de *Q. dichotoma* que não receberam Al não houve reação positiva. É importante ressaltar que mesmo sem receber o metal estas plantas possuem Al em seus tecidos devido o suprimento pelas sementes.

Em raiz de *Q. dichotoma* ocorreu coloração no córtex das plantas de ambos os tratamentos. Este fato também foi verificado em raízes de *Q. grandiflora* coradas com hematoxilina (Silva, 2012). A coloração de tecidos da raiz como epiderme, parênquima cortical, endoderme e floema também foi verificada em outras plantas como *Q. grandiflora* (Silva, 2012) e já em outro trabalho com *V. pyramydalis* e *Q. grandiflora* a reação positiva na epiderme se observou apenas sob altas concentrações de Al (Andrade *et al.*, 2009). Semelhantemente, *Vochysia rufa* Mart., outra acumuladora de Al, reações positivas para Al foram verificadas somente sob concentrações elevadas de Al disponível (Andrade *et al.*, 2009). Contudo, *V. pyramydalis* apresentou reação positiva para córtex e endoderme como encontrado independentemente da quantidade de Al fornecida à planta (Andrade *et al.*, 2009).

7. CONCLUSÕES

- Na lâmina foliar, a alta intensidade na coloração das plantas que receberam Al, em especial no parênquima clorofiliano, confirma que *Q.dichotoma* acumula grandes quantidades de Al em suas folhas.
- A falta de reação positiva nos tecidos do caule das plantas controle sugere que este órgão pode não acumular Al mas ser apenas um caminho para a mobilização desse metal na planta.
- Em geral a coloração nos tecidos condutores da lâmina foliar, raízes e caule das plantas que receberam Al sugere a mobilização do metal para outras partes da planta durante seu desenvolvimento.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE JÚNIOR, V. C.; MOTA, J. H.; CASTRO, N. E. A. DE. Avaliação da tolerância a alumínio de dois genótipos de sorgo. Revista científica eletrônica de agronomia. n. 07, 2005.

ANDRADE, L. R. M.; WATTEAU, F.; BARROS, L. M.G.; ECHEVARRIA, G.; COTTA, M. G.; Localização de Alumínio em folhas de plantas do cerrado através de hematoxilina e micro-análises de raio X. *In XII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal. Desafios para a produção de alimentos e bioenergia. Fortaleza, CE. 2009.*

BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. 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, Oxford, v.48, n.1, p. 75-92, 2002.*

BARROS, L. M. G.; ANDRADE, L. R. M.; GEEST, J. J. V. D.; COTTA, M. G.; RIBEIRO, D. G.; BRACCINI, M. C. L.; MARTINEZ, H. E. P.; SILVA, E. A. M.; BRACCINI, A. L.; SCAPIM, C. A. Crescimento da planta e coloração das raízes com hematoxilina como critérios de avaliação de genótipos de café quanto à tolerância à toxidez por alumínio. *Revista Brasileira de ciência e solo. v. 24. p. 59-68, 2000.*

COSTA, A. F.; PROENÇA DA CUNHA, A. *Farmacognosia. Calouste Gulbenkian. Lisboa. 3º ed. v. 3, 2000.*

COTTA, M. G.; ANDRADE, L. R. M.; DER GEEST, J. J. V.; GOMES, A. C. M. M.; DE SOUZA, C. M. D.; DE ALMEIDA, J. D.; BARROS, L. M. G. Diferenças entre hematoxilina e aluminon na detecção de alumínio em tecidos foliares de plantas nativas do cerrado. *In IX Simpósio Nacional Cerrado. Brasília – DF, 2008.*

DELHAIZE, E.; RYAN, P. R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiology. v.107, p.315-321, 1995.*

GARZÓN, T.; GUNSÉ, B.; MORENO, A. R.; TOMOS, A. D.; BARCELÓ, J.; POSCHERIEDER, C. Aluminum-induced alteration of ion homeostasis in root tip vacuoles of two maize varieties differing in Al tolerance. *Plant Science, v. 180, n. 5, p. 709-715, 2011.*

GERSBACH, P. V.; WILLIE, S. G.; SARAFIS, V. A new histochemical method for localization of the site of monoterpene phenol accumulation in plant secretory structures. *Annals of Botany*. v. 88. p. 521-525, 2001.

HARIDASAN, M. Distribution and mineral nutrition of aluminium-accumulating species in different plant communities of the cerrado region of central Brazil. In San José, J.J. Montes, R. (eds.) *La Capacidad Bioproductiva de Sabanas*. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas. p. 309-348, 1987.

HARIDASAN, M. Nutritional adaptations of native plants of the Cerrado biome in acid soils. *Brazilian Plant Physiology*, v. 20, n. 3, 2008.

HARIDASAN, M.; ARAÚJO, G. M. Aluminium-accumulating species in two forest communities in the Cerrado region of central Brazil. *Forest Ecology and Management*. v. 24, p. 15-26, 1988.

HARIDASAN, M.; PAVIANI, T. I.; SCHIAVINI, I. Localization of aluminium in the leaves of some aluminium accumulating species. *Journal of Plant and Soil* v.95. p. 435-437, 1986.

JACOB NETO, J. The interactions of H⁺/ OH⁻ exchanges between roots and rhizosphere with plant nutrition and aluminium effects. Tese de Doutorado. Dundee, University of Dundee, 281p. 1993.

JACOB NETO, J.; RAVEN , J. A.; WOLLENWEBER, B. Aluminium in the rhizosphere of *Phaseolus vulgaris* L. In International conference on heavy metals in the environment, Edinburg. Proceedings. Edinburg, CEP Consultants, p. 103-106, 1991.

KINRAIDE, T. B. Proton extrusion by wheat roots exhibiting severe aluminum toxicity symptoms. *Journal of Plant Physiology*. v. 88. p. 418 - 423, 1988.

MA, J. F.; RYAN, P. R.; DELHAIZE, E. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends in Plant Science*, vol. 6, n. 6, p. 273–278, 2001.

- MA, J.F.; ZHENG, S. J.; MATSUMOTO, H. Specific secretion of citric acid induced by Al stress in *Cassia tora* L. *Journal Plant and Cell Physiology*, v. 38, p. 1019–1025. 1997.
- MACHADO, J. W. B. Acumulação de alumínio em *Vochysia thyrsoidea* Pohl. Dissertação de Mestrado, Brasília, DF, Universidade de Brasília, 1985.
- MASSOT, N.; POSCHENRIEDER, C.; BARCELÓ, J. Aluminum tolerance assessment in bush bean cultivars by root growth analysis and hematoxylin staining. *Revista Suelo Planta*, v. 1, p. 25-32, 1991.
- MATSUMOTO, H.; HIRASAWA, E.; MORIMURA, S.; TAKAHASHI, E. Localization of aluminum in tea leaves. *Journal Plant and Cell Physiology*, v. 17, p. 627-631, 1976.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v. 15, p. 473-497, 1962.
- RIBEIRO, J. F. Comparação da concentração de nutrientes na vegetação arbórea e nos solos de um cerrado e de um cerrado no Distrito Federal, Brasil. Dissertação de Mestrado, Brasília, DF, Universidade de Brasília, 1983.
- ROSSIELLO, R. O. P.; JACOB-NETTO, J. Toxicidade de alumínio em plantas: novos enfoques para um velho problema. In: FERNANDES, M. S. (Ed.). *Nutrição Mineral de Plantas*. Viosa: SBCS, 432 p., 2006.
- SHEN, R. F.; MA, J. F.; KYO, M.; IWASHITA, T. Compartmentation of aluminium in leaves of an Al accumulator, *Fagopyrum esculentum* Moench. *Planta*, v. 215, n. 3, p. 394-398, 2002.
- SILVA, R. C. C. Aspectos fisiológicos, fitoquímicos e proteômicos de *Qualea grandiflora* Mart. em resposta ao alumínio. Dissertação de Mestrado, Brasília, DF, Universidade de Brasília. 2012.

SILVA, A. C. Avaliação da tolerância ao alumínio em plântulas de maracujazeiro e mamoeiro. Dissertação de Mestrado. Seropédica, RJ. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2009.

TABALDI, L. A. Avaliação bioquímica-fisiológica de clones de batata em relação ao alumínio. Tese de doutorado, Santa Maria, RS, Universidade Federal de Santa Maria, 2008.

WAGATSUMA, T.; KAWASHIMA, T.; TAWARYA, K. Comparative stainability of plant root cells with basic dye (methylene blue) in association with aluminium tolerance. *Communications in Soil Science and Journal Plant Analysis*, , v.19. p. 1207-1215, 1998.

WATANABE, T.; OSAKI, M. 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*, v. 33, p. 1247-1260, 2002.

ZHENG, S. J.; MA, J. F.; MATSUMOTO, H. High aluminum resistance in buckwheat: I. Al-induced specific secretion of oxalic acid from root tips. *Plant Physiology*, v. 117, n. 3, p. 745-751, 1998.

CAPÍTULO III - Análise do perfil metabólico de *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. (Vochysiaceae) por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (GC-MS) em resposta à presença ou ausência de Al.

1. Analysis of metabolic profile *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. (Vochysiaceae) by gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS) in response to the presence or absence of Al.

1.1. Abstract

Numerous plants are metabolically affected by the toxic effects of Al. However, during the evolutionary process, some plants have developed mechanisms to minimize or neutralize the harmful effects of Al on cellular metabolism. These plants are known in the literature as either resistant or tolerant according to the type of mechanism. The literature also shows that there are plants that besides tolerate also accumulate large amounts of Al in their tissues. Typically, the Cerrado has acid soils and many Al accumulating species. Among which is *Qualea dichotoma*, the object this study. Therefore, the metabolic profile of *Q. dichotoma* plants grown with or without Al was investigated. After cultivation of plants for 60 days in nutrient solution supplemented or not with Al, samples of plants from both treatments were collected and analyzed to determine their metabolic profiles by GC-MS. The identification of compounds was performed by comparison existing data from NIST library and AMDIS program. The metabolic map was constructed by VANTED 2.5 program. The components detected in leaves and roots showed the presence of organic acids, sugars, sugar alcohols and amino acids. In leaves, organic acids were found in greater abundance in samples from plants grown without Al, with the exception of quinic and shikimic acid. Regarding the sugar alcohols, the myo-inositol was 46,94% higher in the samples of plants grown with Al. Furthermore, the amino acid pyroglutamic acid was 285,53% more abundant in leaf samples from plants not treated with Al. In roots, the acid quinic was twice as high as in plants treated with Al. Sucrose exceeded by 64,79% the value found in the control samples. Only serine presented in greater abundance in roots of the control, which was 133,96% higher than in plants treated with Al. We conclude that *Q. dichotoma* is not affected negatively by Al. On the contrary, most likely, this species needs this metal for better metabolism of their performance.

Keywords: Metabolic profile, aluminum accumulator, gas chromatography.

2. Análise do perfil metabólico de *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (GC-MS) em resposta à presença ou ausência de Al.

2.1. Resumo

Inúmeras plantas são afetadas metabolicamente com os efeitos tóxicos do Al. Contudo, ao longo do processo evolutivo, algumas plantas desenvolveram mecanismos para minimizar ou neutralizar os efeitos maléficos do Al sobre o metabolismo celular. Estas plantas são conhecidas na literatura como resistentes e tolerantes de acordo com o tipo de mecanismo que realizam. A literatura mostra ainda a existência de plantas que além de tolerar também acumulam grandes quantidades de Al em seus tecidos. Normalmente o Cerrado tem solos ácidos e muitas espécies acumuladoras de Al. Dentre essas está *Qualea dichotoma*, objeto deste estudo, portanto, o perfil metabólico de *Q. dichotoma* cultivada com e sem Al foi investigada. Após cultivo das plantas por 60 dias em solução nutritiva com e sem Al, amostras de plantas de ambos os tratamentos foram coletadas e analisadas para determinar o perfil metabólico por GC-MS. A identificação dos compostos foi realizada por comparação de dados existentes no banco de dados da biblioteca NIST e com programa AMDIS. O mapa metabólico foi construído através do programa VANTED 2.5. Os componentes detectados mostraram que tanto nas amostras de folhas quanto de raízes foram encontrados ácidos orgânicos, açúcares, açúcares alcoólicos e aminoácidos. Em folhas, os ácidos orgânicos foram encontrados em maior abundância nas amostras de plantas cultivadas sem Al, com exceção dos ácidos quínico e chiquímico. Em relação aos açúcares alcoólicos, o *mio*-inositol foi 46,94% maior nas amostras de plantas cultivadas com Al e o aminoácido ácido piroglutâmico 285,53% mais abundante nas amostras de folhas de plantas não tratadas com Al. Em raízes, o ácido quínico foi duas vezes maior nas plantas tratadas com Al assim como sacarose que superou em 64,79 % o valor encontrado nas amostras do tratamento controle. Somente serina apresentou em raízes maior abundância nas plantas controle, superando em 133,96% as plantas tratadas com Al. Conclui-se que *Q. dichotoma* não é afetada negativamente pelo Al, e pelo contrário, é provável que ela necessite deste metal para melhor desempenho do seu metabolismo.

Palavras chave: Perfil metabólico, acumuladora de alumínio, cromatografia gasosa.

3. INTRODUÇÃO

3.1. O efeito do Al nas plantas

O Al presente no solo, quando solubilizado, se torna tóxico para boa parte das plantas. Estudos têm mostrado que essa toxicidade afeta mais frequentemente espécies de interesse agrônomo como é o caso do arroz (*Oriza sativa* L.) (Vicente *et al.*, 1998), milho (*Zea mays* L.) (Li *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2015), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) (Massot *et al.*, 1999, 2002). Nestas plantas o metabolismo celular é prejudicado, assim como o sistema radicular, o que resulta na diminuição do crescimento das raízes (Kochian, 1995; Kochian *et al.*, 2004; Barceló e Poschenrieder, 2002; Hartwig *et al.*, 2007). Conseqüentemente, a absorção de água e outros nutrientes minerais pelas raízes decrescem consideravelmente prejudicando o desenvolvimento da planta (Wang *et al.*, 2015).

Ao longo do processo evolutivo, algumas plantas desenvolveram mecanismos para minimizar ou neutralizar os efeitos maléficos do Al sobre o metabolismo celular. Em decorrência disso, existem plantas que toleram e acumulam grandes quantidades de Al em seus tecidos (>1g de Al. Kg⁻¹ de matéria seca) e aquelas que excluem esse metal não permitindo sua entrada em seus órgãos (Chenery, 1948). Ambos os mecanismos têm o envolvimento de ácidos orgânicos. Como exemplo, o mecanismo de exclusão consiste na liberação de ácidos orgânicos que se ligam ao Al, imobilizando-o na rizosfera evitando assim a entrada desse metal na planta. Por outro lado, plantas capazes de acumular Al toleram grandes quantidades deste elemento em seus órgãos e tecidos. Neste processo, os ácidos orgânicos quelam o Al no simplasto e o transporta para compartimentos celulares como vacúolo (Delhaize *et al.*, 1993; Kochian, 1995; Kochian *et al.*, 2005; Hartwig *et al.*, 2007; Kochian *et al.*, 2015).

Além disso, algumas plantas não apenas acumulam Al, mas precisam deste elemento para crescer e desenvolverem adequadamente. Como exemplo, a planta *Camellia sinensis* tem um melhor crescimento radicular quando exposta a pequenas quantidades de Al (Xu *et al.*, 2016). Adicionalmente, plantas do Cerrado também estão adaptadas a altos teores de Al nos solos, e se desenvolvem melhor na presença deste metal, sendo que sua ausência leva essas plantas a apresentarem sinais de estresse (Machado, 1985; Haridasan, 2008^{1,2}; Silva, 2012).

3.2. A metabolômica no estudo de estresses de plantas

A resposta dos seres vivos (tolerância/adaptação) a estresses abióticos tem sido mais profundamente compreendida com o avanço das tecnologias pós-genômicas como transcriptoma, proteômica e metabolômica (Urano *et al.*, 2010). Nesse sentido, os metabólitos são resultados da expressão de genes que respondem a estímulos do meio ambiente (Arbona *et al.*, 2013), resultando em fenótipo específico (Fukusaki e Kobayashi, 2005). Assim, metabolômica sendo a ciência, que entre as “ômicas”, tem como objetivo a caracterização, identificação e quantificação dos metabólitos em determinado órgão, tecido ou célula de um dado organismo em determinada fase de desenvolvimento ou condição ambiental (Fiehn, 2001; Arbona *et al.*, 2009; Arbona *et al.*, 2013).

O uso da metabolômica pode fornecer informações valiosas que podem contribuir para esclarecer mecanismos complexos onde muitos metabólitos estão inseridos (Patti *et al.*, 2012; Chagoyen e Pazos, 2012), assim esclarecer processos metabólicos envolvidos nas respostas fisiológicas a diversos tipos de estresses bióticos e abióticos. No caso de estresses abióticos as plantas são capazes de responder com mudanças metabólicas a fim de desenvolver adaptações para suportar e minimizar o efeito do estresse (Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 2006).

A grande variedade das moléculas com diferentes estruturas e propriedades químicas torna a metabolômica uma tarefa bastante difícil de ser executada (Kim e Verpoorte, 2010). Assim, os pesquisadores têm se concentrado em estudar o que representa apenas uma fração do metaboloma, focando em metabólitos específicos associados à determinada condição, tal estudo de apenas uma parte do metaboloma é conhecido como perfil metabólico (Desbrosses *et al.*, 2005). Em plantas, a complexidade metabólica é maior que em muitos outros organismos (Allen *et al.*, 2009; Sweetlove e Ratcliffe, 2011). Esse fato se deve a muitos fatores, dentre eles está a vulnerabilidade às condições ambientais em decorrência de ser um organismo sésil (Sweetlove e Ratcliffe, 2011).

Diante dessa peculiaridade, para alcançar o maior número de metabólitos envolvidos em vias metabólicas em plantas submetidas a condições específicas têm sido

utilizadas técnicas analíticas de separação acoplado e compatível a um detector de massas (Desbrosses *et al.*, 2005). A cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (GC-MS) é uma das técnicas mais usadas na metabolômica de plantas até o presente momento, sendo capaz de selecionar grupos de metabólitos, principalmente os voláteis e metabólitos primários como aminoácidos, açúcares e intermediários do ciclo TCA (ácido tricarboxílico) (Desbrosses *et al.*, 2005; Schauer e Fernie, 2006).

Outra vantagem do uso do GC-MS é o fato de ser uma alternativa de custo menos elevado se comparado a outras técnicas usadas para o mesmo fim. Porém, é necessário que a amostra seja volátil para ser analisada mas isso é facilmente conseguido por uma derivatização química. Os picos cromatográficos provindos das análises das amostras no GC-MS são identificados com maior eficiência com o uso do sistema de identificação AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution and identification System) (Haelket *et al.*, 1999). Uma das desvantagens dessa técnica é devido à grande quantidade de dados gerados para serem identificados. Quando o objetivo da análise é a identificação de metabólitos primários o nível de dificuldade é reduzido devido uma maior disponibilidade de informações em banco de dados para estes metabólitos (Luedemann *et al.*, 2008), ao contrário do que ocorre com metabólitos secundários, onde a quantidade de informações sobre estes é bem menor em banco de dados (Matsuda *et al.*, 2009).

Inúmeros estudos de estresses ambientais em plantas têm sido realizados com a utilização do GC-MS, porém são relativamente reduzidos os estudos de caracterização de metabólitos relacionados a estresse por metais em geral (Wang *et al.*, 2015). Menor ainda é a quantidade de trabalhos na literatura que traz o perfil metabólico de plantas na interação com o Al. Devido ser uma técnica relativamente nova os poucos trabalhos encontrados são recentes (Xu *et al.*, 2016). No caso de *Qualea dichotoma* (Mart.)Warm., foco deste trabalho, não há na literatura sobre o seu perfil metabólico em resposta à presença ou ausência de Al.

3.3. Perfil metabólico de plantas submetidas a estresses ambientais

A sensibilidade, tolerância ou a superação de qualquer condição de estresse envolvem alterações metabólicas da planta em resposta às condições a ela imposta (Cattivelli *et al.*, 2008). Arbona *et al.* (2013) listaram diversos estímulos abióticos tais

como seca, alagamento, temperatura e salinidade e as respectivas mudanças induzidas por estes no metabolismo das plantas. Segundo esses autores, as respostas metabólicas mais evidentes diante de estresses ambientais ocorrem no metabolismo primário, onde os níveis de açúcares, açúcares alcoólicos, aminoácidos e intermediários do TCA apresentam alterações. Além disso, alterações no metabolismo secundário são menos evidentes, porém, podem ocorrer dependendo do tipo de estresse.

Em geral, o aumento nas quantidades de ácidos orgânicos como malato, citrato, fumarato, oxalato e lactato têm sido frequentemente relacionadas com diversos tipos de estresses ambientais (Arbona *et al.*, 2013). No caso de estresse por Al, as plantas aumentam a síntese dos ácidos orgânicos com a finalidade de formar compostos estáveis com este metal, dentro ou fora da planta, resultando no aumento da tolerância/resistência a este elemento (Kumari *et al.*, 2008; Eticha *et al.*, 2010; Inostroza-Blancheteau *et al.*, 2012; Brunner e Sperisen, 2013; Ding *et al.*, 2013; Kochian *et al.*, 2015). No entanto, outros autores mostram que para algumas plantas não há correlação direta entre Al e aumento de ácidos orgânicos. Nesses casos, os níveis de ácidos orgânicos podem até diminuir em plantas/cultivares mais tolerantes como verificado em arroz (Yang *et al.*, 2008; Famoso *et al.*, 2010) e milho (Alves *et al.*, 2001).

Com relação aos níveis de açúcares em resposta a estresses abióticos, diversos trabalhos relatam que um aumento nos açúcares redutores pode conferir osmoproteção e, em consequência, manter a performance da fotossíntese nas plantas diante de estresses ambientais (Chaves Filho e Stacciarini-Seraphin, 2001; Kaplan e Guy; Sharp *et al.*, 2004; Iordachescu e Imai, 2008; Arbona *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015). Adicionalmente, osmoproteção pode ser incrementada com o aumento de aminoácidos como prolina, cuja síntese é maior em situações de estresses contribuindo com a manutenção de turgência celular que é essencial para o funcionamento adequado do seu metabolismo (Arbona *et al.*, 2003, 2008, 2013).

É fato que as respostas metabólicas induzidas especificamente pelo Al em plantas podem variar dependendo da espécie. Uma planta muito estudada pela sua relação com este metal é a *C. sinensis*. Esta planta é capaz de acumular grandes quantidades de Al nos seus tecidos e tem seu crescimento radicular estimulado, até certo

ponto por este metal. O primeiro estudo de perfil metabólico desse tipo de chá através de GC- MS foi realizado por Xu *et al.* (2016). Esse trabalho fornece novas informações sobre as respostas do Al em plantas. Em resumo, nesta espécie o Al alterou os níveis de ácido quínico, assim como a via do ácido chiquímico nas raízes. Estas alterações foram consideradas como adaptações de *C. sinensis* à presença do Al. Esses compostos podem agir de forma conjunta para formar ácidos capazes de auxiliar na eliminação de ROS na planta que podem ser formadas pela presença do Al assim como pela respiração (De Maria e Moreira, 2004; Pérez-Urria Carril e Ávalos García, 2009). Além disso, se verificou um aumento nos níveis de ácidos orgânicos como malato e lactato em dois genótipos (sensível e tolerante) dessa mesma planta em resposta à ausência de Al (Xu *et al.*, 2016).

O perfil metabólico de *C. sinensis* pode ser semelhante ao de plantas acumuladoras nativas como *Q. grandiflora*, *Q. dichotoma* e *V. thyrsoidea*. É importante salientar que essas plantas têm o seu desenvolvimento comprometido na ausência do Al enquanto *C. sinensis* desenvolve melhor as raízes quando em pequenas quantidades de Al (Machado, 1985; Silva, 2012; Xu *et al.*, 2016). Até onde se sabe, não há relatos de nenhum trabalho até o momento que aborde alterações metabólicas em uma destas espécies do Cerrado. Portanto o perfil metabólico de *Q. dichotoma* pode vir a trazer grande contribuição e ajudar na elucidação do metabolismo do Al em plantas acumuladoras deste metal.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A extração de metabólitos foi realizada em amostras de folhas e raízes de plantas de *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. (Vochysiaceae) submetidas a dois tratamentos, plantas crescidas com Al e sem Al, após 60 dias de cultivo. Foram realizadas cinco repetições para cada órgão e cada condição, sendo cada repetição composta por pool de três indivíduos.

4.1. Extração de metabólitos

O material foi liofilizado por 48 h e macerados com pistilo de vidro. Foram pesados aproximadamente 10 mg de cada amostra e colocados em tubo plástico de microcentrífuga (ependorf) de 2 mL. A extração foi realizada através do método

metanol-ribitol relatado por Lisec *et al.* 2006, com modificações. Às amostras foram adicionados 1,4 mL de metanol PA (Sigma-Aldrich) e 60 µL de Ribitol (Sigma-Aldrich) a 0,2 mg. mL⁻¹. O Ribitol foi adicionado como padrão interno para suprir qualquer perda de material de cada amostra que tenha ocorrido durante a extração. Esta solução foi então vortexada por 10 s para ressuspensão do material. Em seguida as amostras foram incubadas a 70 °C por 10 min em termoagitador. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 10 min para formação do pellet, e do sobrenadante foram retirados 750 µL e transferidos para microtubo de vidro (Vials). Ao sobrenadante (750 µL) foram adicionados 375 µL de clorofórmio gelado (-20 °C) mais 750 µL de MilliQ H₂O gelada (4 °C). Essa mistura foi vortexada por 10 s e centrifugada a 2.200 g por 10 s formando duas fases. Foram transferidos da fase superior para um novo tubo de plástico 150 µL de cada amostra. As amostras foram colocadas em um concentrador a 25 °C por 2 h a vácuo para secá-las. Para uma posterior derivatização as amostras foram estocadas a -80 °C.

4.2. Derivatização e espectrometria de massa

As etapas de derivatização e análise das amostras também seguiram o protocolo de Lisec *et al.* (2006) como descrito a seguir. Para início da derivatização as amostras foram colocadas em um concentrador a vácuo a 20 °C por 30 min para secar gotas de água formadas durante o armazenamento. Aos tubos com as amostras foram adicionados 40 µL de cloridrato de metoxiamina a 20 mg. mL⁻¹ (Sigma-Aldrich) em piridina PA e vortexados por 10 s. Em seguida foram colocadas em termoagitador por 2 h a 37 °C e centrifugadas por 10 s. Foi adicionada 70 µL de MSTFA (N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide) e colocados novamente no termoagitador por 30 min a 37 °C. Em seguida foi realizada centrifugação por 10 s para remover o reagente condensado na parede e/ou tampa dos tubos. Foram transferidos 100 µL da amostra para tubos de microvolume de vidro (*inserts*) que permaneceram encaixados em microtubos de vidro (Vials). A análise da amostra adquirida após a derivatização foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS).

O gás de arraste utilizado foi o gás hélio com fluxo de 1,5 mL.min⁻¹ com manutenção da taxa de fluxo constante. Os microtubos de vidro contendo as amostras foram inseridos no equipamento, e 1 µL de cada amostra foi retirado com injeção,

acoplada ao GC-MS, a 230 °C e injetada na proporção 10:1 tanto para folha quanto para raiz. A corrida no cromatógrafo foi executada com o auxílio de uma coluna de 30 m HP-5. O programa iniciou com temperatura de 70 °C mantidos por 5 min, e em seguida a temperatura foi aumentada na taxa de 5 °C. min⁻¹ até atingir 330 °C e estabilizada por 10 min. No detector de massas a faixa de massa registrada foi de 70 a 600 m/z e o detector de voltagem foi de aproximadamente 1700-1850 V.

4.3. Análise dos espectros obtidos pelo GC-MS e construção do mapa metabólico

A identificação dos compostos foi realizada por comparação dos espectros de massas das amostras com aqueles existentes no banco de dados da biblioteca NIST (*National Institute of Standards and Technology*) com programa AMDIS. A quantificação foi baseada nas áreas dos picos, considerando a área total dos picos como 100%. Através deste programa foi possível identificar dentre outras informações, a massa e o número de *scan* de cada composto encontrado. Foi feito um cruzamento destes dados de massa e *scan* encontrados a partir do AMDIS com os dados gerados após o alinhamento de todas as amostras, o qual mostrou a abundância comparativa de cada metabólito nas amostras de plantas crescidas com e sem Al. Os metabólitos detectados na amostra controle, ou seja, o branco foram ignorados nas amostras para efeito de análise.

O perfil metabólico foi obtido pela análise de comparação dos valores médios com aplicação do Teste t (significância 5%) realizado no próprio programa Visualisation and Analysis of Networks containing Experimental Data (VANTED) 2.5. O mapa metabólico foi construído de acordo com modelo já pré-estabelecido pelo programa, porém com modificações de retirada ou acréscimo de alguns metabólitos encontrados ou não em *Q. dichotoma*.

5. RESULTADOS

5.1. Perfil metabólico por GC-MS

As Tabelas 1 e 2 mostram a abundância relativa média dos metabólitos presentes nas folhas e raízes de *Q. dichotoma* com 60 dias de cultivo crescidas com e sem Al. A coluna de porcentagem mostra o aumento relativo de cada metabólito em cada

tratamento. Assim, tanto nas amostras de folhas quanto de raízes foram encontrados ácidos orgânicos, açúcares, açúcares alcoólicos e aminoácidos.

Em folhas, os ácidos orgânicos foram encontrados em maior abundância nas amostras de plantas crescidas sem Al, com exceção dos ácidos quínico e chiquímico. Assim, quando comparadas com plantas tratadas com Al, a abundância relativa dos ácidos orgânicos malato, citrato, ácido glicérico e ácido treônico nas plantas do tratamento sem Al foram respectivamente 269,08%, 364,68%, 104,36% e 110,09% maiores (Tabela 1). É importante salientar que as abundâncias relativas dos ácidos orgânicos com maiores quantidades relativas no controle foram significativamente diferentes entre os dois tratamentos. Por outro lado, nas plantas crescidas com Al, o ácido quínico e ácido chiquímico tiveram maiores abundâncias que nas amostras do tratamento sem Al. Contudo, com relação a esses ácidos orgânicos, não se verificou diferenças significativas entre os dois tratamentos (Tabela 1).

Quanto aos açúcares, os monossacarídeos frutose, glicose, e galactose foram detectados nas amostras de folhas de *Q. dichotoma*. Embora esses açúcares tenham sido encontrados em maior quantidade no tratamento sem Al, não houve diferenças significativas entre os valores detectados para nenhum desses açúcares (Tabela 1). No que se refere à sacarose, apesar desse dissacarídeo ter sido encontrado com abundância de 33,82% maior que o controle, não houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 1). Os açúcares alcoólicos, como glicerol e mio-inositol, também foram encontrados nas amostras de folhas de plantas de *Q. dichotoma*. Todavia, apenas o mio-inositol apresentou diferença significativa entre os dois tratamentos, e foi 46,94% maior nas amostras de plantas crescidas com Al (Tabela 1).

Em relação aos aminoácidos, somente serina e ácido piroglutâmico foram detectados em amostras de folhas. No entanto, mesmo que a quantidade relativa de serina fosse maior quantidade nas plantas crescidas sem Al, apenas o ácido piroglutâmico mostrou diferença significativa entre os tratamentos, sendo 285,53% mais abundante nas amostras de folhas de plantas não tratadas com Al (Tabela 1).

A Tabela 2 mostra os metabólitos e respectivas abundâncias relativas presentes nas amostras de raiz de plantas crescidas com e sem Al. Em raízes, foram detectados os seguintes ácidos orgânicos: oxalato, ácido glucônico, malato, citrato, ácido chiquímico e

ácido quínico. Embora oxalato e ácido glucônico tenham sido encontrados em maior abundância em raízes de plantas crescidas sem Al, não houve diferença estatística entre os tratamentos para esses compostos. Semelhantemente, malato, citrato e ácido chiquímico também não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos. Por outro lado, no que diz respeito ao ácido quínico, sua abundância foi significativamente maior nas raízes de plantas crescidas com Al apresentando praticamente o dobro da quantidade observada nas amostras do tratamento controle (Tabela 2).

Monossacarídeos também foram detectados em raízes de *Q. dichotoma* e estão listados na Tabela 2. Frutose, glicose e galactose, apesar de maior abundância nas plantas crescidas sem Al, não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos. No entanto, a abundância do dissacarídeo sacarose foi significativamente maior nas raízes de plantas tratadas com Al, superando em 64,79 % o valor encontrado nas amostras do tratamento controle (Tabela 2). Quanto aos açúcares alcoólicos, glicerol e mio-inositol, não se observou diferenças significantes entre os tratamentos (Tabela 2).

Ainda em raiz, dois aminoácidos, serina e ácido piroglutâmico foram encontrados em maior abundância nas plantas crescidas sem Al. No entanto, apenas serina apresentou diferença significativa entre os tratamentos, e sua abundância relativa foi 133,96% maior nas amostras de plantas crescidas sem Al (Tabela 2).

Tabela 1- Relação de metabólitos encontrados em folha de *Qualea dichotoma* (Mart.)Warm. aos 60 dias de cultivo, crescidas com e sem alumínio.

Metabólitos	Massa	Tempo de retenção (min)	Abundância relativa (sem Al)	Abundância relativa (com Al)	$\Delta\%$ (em relação ao controle)
Ácidos orgânicos					
Malato *	233	22541466	561	152	-269,08
Citrato *	273	30122116	1092	235	-364,68
Ácido quínico	345	31121651	184131	301301	+63,63
Ácido chiquímico	204	29880667	2572	5419	+110,69
Ácido glicérico *	189	18425434	562	275	-104,36
Ácido treônico *	292	24478733	454	218	-110,09
Açúcares					
Sacarose	361	44772449	105231	140827	+33,82
Frutose	217	31413633	20472	18940	-8,08
Glicose	319	31930250	33727	30342	-11,15
Galactose	319	32267166	3785	3415	-10,83
Açúcares alcoólicos					
Glicerol	205	16847534	432	483	+11,80
Mio-inositol *	217	35501583	22818	33531	+46,94
Aminoácidos					
Serina	219	16156866	58	42	-38,09
Ácido piroglutâmico *	156	23164749	3898	622	-285,53
Outros					
Etanolamina	174	15438100	2009	2279	+13,43

* Compostos seguidos por este símbolo são significativamente diferentes pelo Teste t (P<0,05).

Tabela 2- Relação de metabólitos identificados em raiz de *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. aos 60 dias de cultivo, crescidas com e sem alumínio.

Metabólitos	Massa	Tempo de retenção (min)	Abundância relativa (sem Al)	Abundância relativa (com Al)	Δ% (em relação ao controle)
Ácidos					
Malato	233	22541466	1225	1379	+12,57
Citrato	273	30122116	2770	2903	+4,80
Oxalato	219	11473733	281	212	-32,54
Ácido quínico *	345	31110451	36469	74512	+104,31
Ácido chiquímico	204	28875084	1067	1340	+25,58
Ácido glucônico	292	33850716	231	217	-6,45
Açúcares					
Sacarose *	361	44772449	138918	228930	+64,79
Frutose	217	31413633	21943	26128	+19,07
Glicose	319	31930250	51610	43930	-17,48
Galactose	319	32267166	6382	5559	-14,80
Açúcares alcoólicos					
Glicerol	205	16847534	13634	13293	-2,56
Mio-inositol	217	35501583	4795	6698	+39,68
Aminoácidos					
Serina *	219	16156866	248	106	-133,96
Ácido piroglutâmico	156	23164749	39567	26415	-49,78
Outros					
Etanolamina	174	15438100	786	910	+15,77

* Compostos seguidos por este símbolo são significativamente diferentes pelo Teste t (P<0,05)

5.2. Mapas metabólicos

As Figuras 1 e 2 mostram os mapas metabólicos construídos pelo programa VANTED 2.5 representando o perfil metabólico nas folhas e raízes de *Q. dichotoma* de plantas crescidas com e sem suplementação de Al. É importante dizer que os referidos mapas não representam exatamente o metabolismo total das folhas e raízes dessas plantas, mas apenas, e de forma simplificada, as vias nas quais os metabólitos encontrados estão envolvidos. O sentido da reação não está mostrado neste mapa e as setas indicam apenas a interligação de compostos quando metabolizados.

Quanto ao número e tipos de metabólitos encontrados tanto nas folhas quanto raízes, pode-se dizer que os resultados mostram similaridade entre os dois órgãos, havendo poucos metabólitos exclusivos de um determinado órgão. Os ácidos orgânicos, como por exemplo, o ácido glicérico e o ácido treônico foram somente encontrados em folhas de *Q. dichotoma* (Tabela 1 e Figura 1). Já em raízes, os ácidos glucônico e oxalato são exclusivos deste órgão (Tabela 2 e Figura 2).

A Figura 1 mostra o mapa metabólico comparativo nas folhas de *Q. dichotoma* cultivada com e sem Al aos 60 dias de cultivo. Neste mapa é possível observar as correlações entre as diversas rotas sintéticas dos diferentes compostos detectados em folhas. Pode-se observar que as rotas metabólicas compreendem a síntese de compostos do metabolismo primário, na grande maioria, como também do metabolismo secundário. Nesse contexto, temos os açúcares, os aminoácidos proteicos e ácidos orgânicos como compostos resultantes do metabolismo primário (Figura 1). Conseqüentemente, esses compostos são produtos da atividade direta dos ciclos de Calvin e Krebs. Adicionalmente, alguns metabólitos secundários foram identificados, como os ácidos chiquímico e quínico que fazem parte do metabolismo aromático em plantas. Além destes, o aminoácido não proteico piroglutamato (ácido piroglutâmico), que é um intermediário da degradação da glutatona, se mostrou abundante nas amostras de folhas das plantas controle (Tabela 1 e Figura 1).

O que chama a atenção no modelo mostrado pelo mapa metabólico é a posição central do ciclo de Krebs. Grande parte dos compostos quer sejam produtos do metabolismo primário ou secundário usam esqueletos de carbono derivados do ciclo de Krebs. A grande abundância dos ácidos orgânicos malato e citrato em amostras de

plantas controle são consistentes com esta observação. Considerações similares são válidas tanto para amostras de folhas e raízes de plantas tratadas ou não com Al (Figuras 1 e 2).

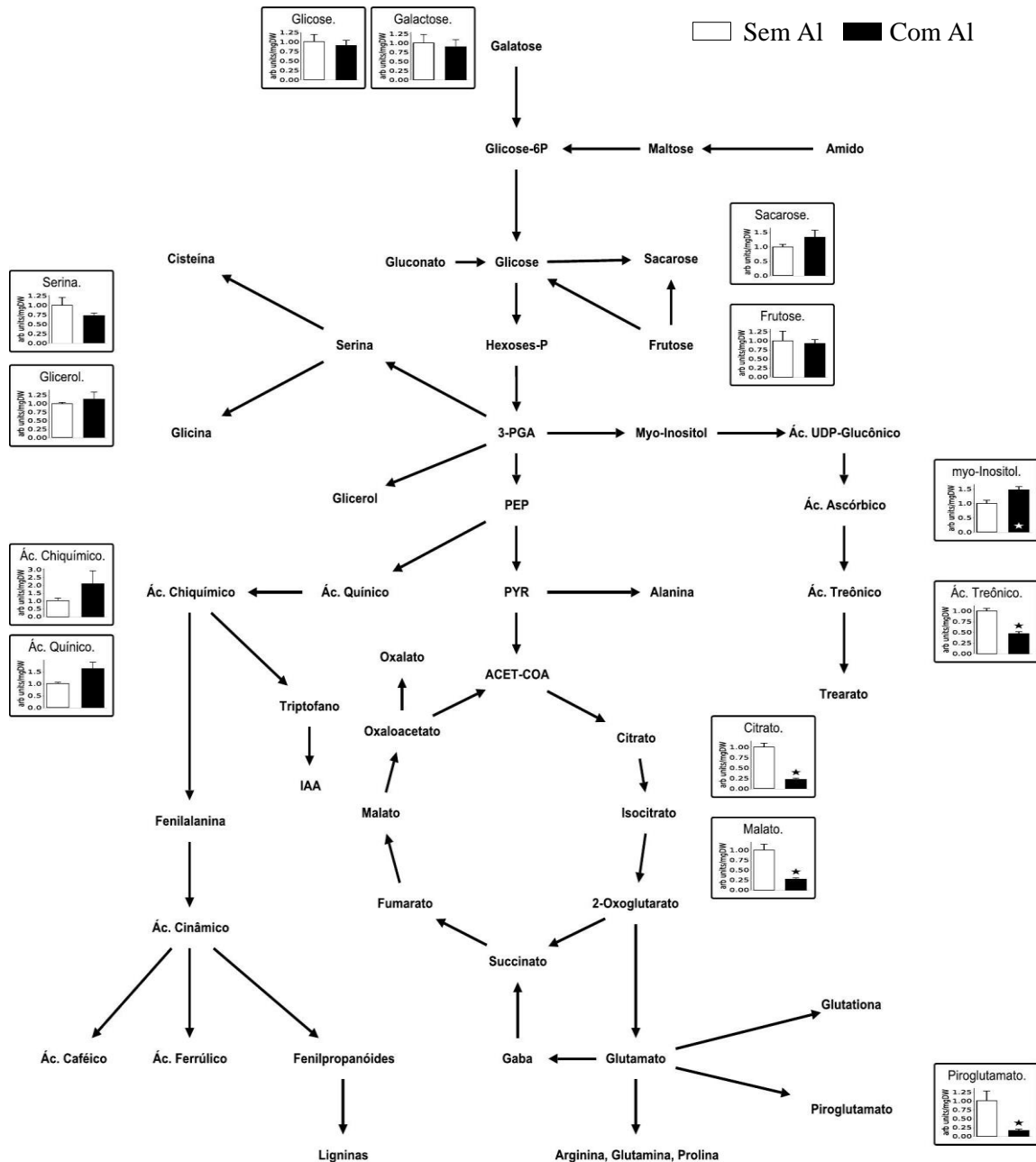


Figura 1: Perfil metabólico comparativo em folha de *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. cultivada por 60 dias com e sem Al. O asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos ($P \leq 0,05$).

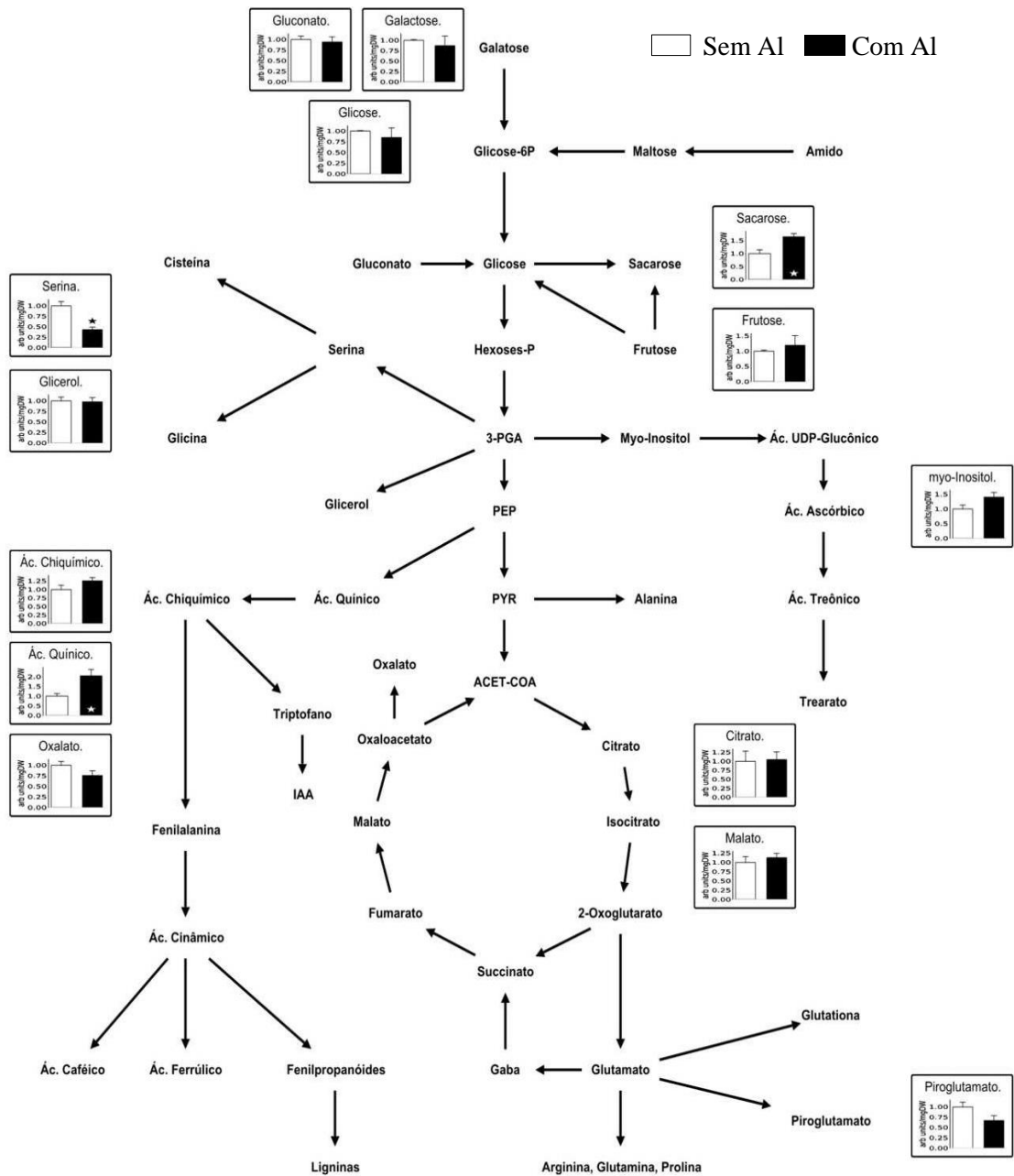


Figura 2: Perfil metabólico comparativo em raiz de *Qualea dichotoma* (Mart.) Warm. cultivada por 60 dias com e sem AI. O asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos ($P \leq 0,05$).

Em raízes, praticamente as mesmas rotas metabólicas identificadas nas amostras de folhas estão mapeadas na Figura 2. O destaque está relacionado mais com os compostos cujas abundâncias relativas foram significativamente diferentes entre os tratamentos. Como exemplo, sacarose, um dissacarídeo derivado do metabolismo primário, assim como o ácido quínico do metabolismo secundário. Em ambos os casos, a maior quantidade desses produtos foi observada nas amostras de plantas crescidas com Al (Figura 2). O que também chamou a atenção nas plantas cultivadas sem Al foi a grande quantidade do aminoácido proteico como serina quando comparadas as plantas do tratamento com Al (Figura 2). É importante salientar que uma das principais rotas de síntese desse aminoácido está relacionado ao processo de fotorrespiração.

6. DISCUSSÃO

6.1. Metabolismo dos ácidos orgânicos em resposta ao Al

Como mencionado anteriormente, os ácidos orgânicos como citrato, malato e oxalato estão envolvidos com processos de tolerância/resistência ao Al e são capazes de imobilizar este metal tanto na rizosfera ou no interior de órgãos vegetais formando complexos não tóxicos à planta (Maron *et al.*, 2010). Para muitas espécies a quantidade de ácidos orgânicos sintetizados para quelar o Al expressa o nível de tolerância da planta ao metal. É farto na literatura os exemplos de plantas que respondem ao Al dessa forma, como por exemplo, a correlação positiva entre a liberação de ácidos orgânicos e a resistência ao Al em três variedades de milho (Kidd *et al.*, 2001). Contudo, em estudos com genótipos de soja com diferentes níveis de tolerância foi encontrado que não se foi possível estabelecer uma correlação entre tolerância ao Al e a quantidade de ácidos orgânicos (Nian *et al.*, 2005). Adicionalmente, em *B. decumbens* suplementada com Al se constatou que a liberação de ácidos orgânicos pelo ápice da raiz foi até 30 vezes menor que a de outras cultivares menos tolerantes como milho e trigo mourisco (Wenzl *et al.*, 2001). Isto mostra que elevados níveis de ácidos orgânicos e menores de toxidez do Al nem sempre mantêm uma correlação automática.

Assim, diferente das plantas cuja tolerância/resistência ao Al dependem desses ácidos orgânicos, em *Q. dichotoma* não se verificou uma correlação positiva entre a suplementação de Al e aumento da abundância de ácidos orgânicos. Assim, em folhas

foram verificados valores significativamente maiores de citrato e malato nas amostras de plantas do tratamento controle. Na verdade, a correlação entre a adição de Al na solução nutritiva e quantidade de ácidos orgânicos foi na sua maioria negativa, ou seja, plantas que não receberam Al produziram mais ácidos orgânicos. Esse fato já é suficiente para qualificar *Q. dichotoma* a parte da maioria das plantas tolerantes/resistentes ao Al. Consistente com essa afirmação, em raízes de *Q. dichotoma* também não se verificou aumento na produção desses compostos nas plantas tratadas com Al. Com exceção do ácido quínico, não houve diferenças relevantes entre as quantidades dos demais ácidos orgânicos.

Não seria nenhum absurdo se esperar que plantas de *Q. dichotoma* que recebessem Al e são conhecidas como acumuladoras desse metal produzissem uma quantidade mais expressiva de ácidos orgânicos visando estocá-lo em seus tecidos. Entretanto, o que se verificou foi o contrário, ou seja, as quantidades de citrato e malato nas folhas das plantas controle foram cerca de quatro vezes maiores que nas plantas que receberam Al (Tabela 1). Assim, é provável que os ácidos orgânicos citrato e malato não tenham a mesma função observada em outras plantas que requerem este tipo de composto para lidar com os efeitos maléficos do Al no metabolismo. Esses compostos são conhecidos por conferir proteção contra estresse oxidativo induzidos por metais, incluindo o Al como pode ser visto em milho (Boscolo *et al.*, 2003). Com base nessas observações, é possível que *Q. dichotoma* não sofra estresse pela presença de Al. Adicionalmente, os resultados mostram que a ausência de Al possa estar induzindo algum estresse nessas plantas. Essa ideia é consistente com as observações morfoanatômicas e análises de crescimento apresentadas em capítulos anteriores, onde plantas de *Q. dichotoma* sem suplementação de Al pareceram estar sob estresse. Resultados semelhantes foram apresentados por Silva (2012) com *Q. grandiflora*. Nesta espécie, plantas não tratadas com Al também manifestaram sinais cloróticos e menor crescimento que aquelas suplementadas com Al (Silva, 2012).

Este cenário pode ser melhor entendido ao comparar o padrão fisiológico de *Q. dichotoma* com outras plantas também acumuladoras de Al como *Vochysia thyrsoidea* onde o mesmo padrão de desenvolvimento foi verificado na presença e ausência de Al (Machado, 1985). Esses fatos corroboram que o Al não representa toxicidade para a maioria das plantas nativas do cerrado como afirmado por Haridasan (2008¹).

Outras espécies também apresentam o mesmo padrão verificado em *Qualea* e outras nativas. *Camellia sinensis* L. pode acumular em seus tecidos foliares até 0,3 g de Al.Kg⁻¹ de peso seco (Matsumoto, 1976). Essa planta também mostrou que o Al pode beneficiar o seu crescimento, visto que em duas variedades o crescimento aéreo e radicular foi maior na presença de 0,8 mM de Al (Xu *et al.*, 2016). Porém, a concentração de Al de 1,6 mM foi estressante para a planta. Curiosamente, a planta que não recebeu Al teve seu desenvolvimento geral comprometido e apresentou maiores teores de malato e lactado, o que é consistente com os dados obtidos com *Q. dichotoma*. Assim, a variedade menos tolerante ao Al apresentou maiores teores de malato além de outros ácidos orgânicos participantes do ciclo de Krebs como fumarato e lactato (Xu *et al.*, 2016).

Desta forma, não é inconsistente afirmar que em *Q. dichotoma* o Al tenha uma função metabólica, o que tem o suporte dos dados apresentados neste estudo. O mesmo foi sugerido para *Q. grandiflora* ao apresentar melhor padrão fisiológico na presença de Al (Silva, 2012).

Outro ácido orgânico que mostrou diferença significativa e parece confirmar as afirmações acima é o ácido quínico. Comparado com o tratamento controle, este composto apresentou o dobro da abundância relativa nas raízes de plantas crescidas com Al (Tabela 2). Em espécies de *Brachiaria* foi observado uma correlação positiva entre o teor de ácido quínico e biomassa do sistema radicular (Wenzl *et al.*, 2000). Esse dado é consistente com o que foi observado em *Q. dichotoma*, visto que esta espécie também apresentou maior crescimento nas raízes de plantas tratadas com Al que o controle (capítulo 1).

Em adição, o ácido quínico, além de ser precedente do ácido chiquímico (Figuras 1 e 2), também participa da formação de compostos fenólicos com função ácida, os quais são denominados de ácidos clorogênicos. A via do ácido chiquímico é responsável por produzir compostos fenólicos que conferem à planta uma proteção contra fatores ambientais e bióticos (Pérez-Urria Carril e Ávalos García, 2009). O ácido cinâmico, por exemplo, é um importante composto fenólico capaz de produzir derivados como o ácido cafeico e o ácido ferúlico, os quais podem se ligar ao ácido quínico e formar os ácidos clorogênicos: cafeoilquínico, dicafeoilquínico e feruloilquínico (De

Maria e Moreira, 2004). Os ácidos clorogênicos são relatados na literatura com função adstringente, neste caso inibem enzimas que estão relacionadas a fase inicial de desenvolvimento da planta e função antioxidante (De Maria e Moreira, 2004; Pérez-Urria Carril e Ávalos García, 2009) devido atuar como um acceptor de radicais livres (Luzia *et al.*, 1998 apud De Maria e Moreira, 2004). Portanto é possível que o acúmulo de ácido quínico e ácido chiquímico esteja relacionado com a limpeza de ROS provavelmente produzidas em maior quantidade pelas plantas tratadas com Al durante a fotossíntese e respiração, já que seu crescimento aéreo superou as do controle como pode ser visto no capítulo 1.

O ácido treônico foi um composto encontrado exclusivamente em folhas. A quantidade verificada em amostras das plantas controle foi pelo menos o dobro daquela vista em plantas crescidas com Al. Este composto foi relacionado com estresse salino. Em plantas de lentilha sob alta salinidade se observou que o ácido treônico acumulou mais em genótipos mais tolerantes (Muscolo *et al.*, 2015). Isso pode indicar que por algum motivo as plantas de *Q. dichotoma* podem estar com alguma dificuldade em absorver água devido à falta de Al. Contudo, será necessário investigar esse tópico de forma mais profunda para esclarecer com maior acurácia as razões para esse fato.

6.2. Metabolismo de Açúcares não redutores: sacarose

A sacarose é um açúcar não redutor mais comumente translocado pelo floema após o processo de fotossíntese em função de ser menos reativo que os açúcares redutores (Taiz e Zeiger, 2002). Em *Q. dichotoma* se observou maior abundância de sacarose tanto nas folhas (>33,82%) quanto nas raízes (>64,79%) de plantas tratadas com Al. É importante salientar que somente em raízes houve diferença significativa entre os tratamentos. Na maioria das plantas, em geral, a síntese de sacarose ocorre nas folhas, sendo exportada para outros órgãos da planta (incluindo raízes) para ser utilizada no crescimento e/ou armazenada na forma de amido (Kingston-Smith *et al.*, 1999). Assim, as maiores quantidades deste açúcar em plantas tratadas com Al podem ser correlacionadas com o melhor desenvolvimento dessas plantas comparadas com o controle. Este fato sugere que o Al afeta positivamente a fotossíntese de *Q. dichotoma*, o que poderia resultar no acúmulo de sacarose e conseqüentemente em um desenvolvimento mais eficiente da parte aérea e radicular.

Uma correlação positiva entre taxa fotossintética, nível de sacarose e exposição ao Al foi observada em plantas de chá (*C. sinensis*) quando cultivadas em sistema hidropônico sob deficiência de boro. Após receber 300 μM de Al estas plantas reestabeleceram o desenvolvimento normal e até ultrapassaram em biomassa aérea as plantas controle. Segundo os autores esta superação só foi possível devido um aumento na taxa fotossintética e no nível de sacarose (Hajiboland *et al.*, 2013). Conseqüentemente, o menor teor de sacarose observado nas folhas e raízes das plantas controle reforça a sugestão de que estas plantas, pela falta do Al, não conseguem fotossintetizar adequadamente. Essa suposição também encontra suporte no fato de que essas plantas tinham sinais de clorose na folha e menor conteúdo de pigmentos fotossintéticos como mostrado anteriormente no capítulo 1.

6.3. Metabolismo de açúcares redutores

Em geral as plantas utilizam como fonte de energia sacarose e amido ao invés de glicose quando em situação de estresses (Sharp *et al.*, 2004; Sales *et al.*, 2012; Arbona *et al.*, 2013). Os monossacarídeos encontrados em *Q. dichotoma* foram glicose, frutose e galactose. É fato que não houve diferenças significativas entre os tratamentos. Em termos de homeostase osmótica nas células isso parece estar correto. Estes metabólitos são monossacarídeos, e como toda molécula pequena, seu acúmulo excessivo tem grandes implicações no equilíbrio osmótico das células (Chaves Filho e Stacciarini-Seraphin, 2001; Iordachescu e Imai, 2008). Portanto, a manutenção da turgência celular em intervalos adequados ao funcionamento metabólico e da estabilização das membranas celulares é crucial para a integridade fisiológica da planta como um todo (Arbona *et al.*, 2003; Arbona *et al.*, 2008; Willadino e Camara, 2010).

6.4. Metabolismo de açúcares alcoólicos: *mio*-inositol

Tanto em folhas quanto raízes a maior abundância de *mio*-inositol foi encontrada nas amostras de plantas crescidas com Al. No entanto, somente em folhas a diferença foi significativa com abundância de quase 47% maior que no tratamento controle. Contudo vale ressaltar que em raízes essa diferença foi de aproximadamente 40%, não sendo muito inferior ao verificado nas folhas. É provável que o aumento de *mio*-inositol em folha tenha sido importante para o melhor crescimento e desenvolvimento das

planas tratadas com Al, visto que esse composto tem sido associado a um aumento de tolerância a determinados estresses.

Em plantas de arroz submetidas ao estresse salino, a superexpressão da enzima sintase *mio*-inositol-3-fosfato, enzima que catalisa o primeiro passo da biossíntese de *mio*-inositol, resultou em aumento do nível de tolerância das plantas (Kusuda *et al.*, 2015). Foi verificado que essa proteína também se manteve inalterada em plantas de arroz selvagem após serem submetidas a estresse salino conferindo maior tolerância (Majee *et al.* 2004). Estes resultados foram confirmados posteriormente por Das-Chatterjee *et al.* (2006), mostrando que essa tolerância era abrangente para outros organismos eucariotos e procariotos.

O *mio*-inositol é importante para síntese de ácido ascórbico, que é um poderoso antioxidante. Assim, esse composto é oxidado na via metabólica a ácido UDP-glucurônico através da enzima *meso*-inositoloxigenase (Loewus e Murthy, 2000). Após uma série de reações catalisadas por várias outras enzimas intermediárias levando a formação do ácido ascórbico (Loewus e Murthy, 2000; Smirnoff *et al.*, 2001; Lorence *et al.*, 2004) (Figuras 1 e 2). O ácido ascórbico tem contribuição na redução do estresse oxidativo causados pelo acúmulo das ROS que são produzidas naturalmente nas plantas pela reação da fotossíntese e respiração celular (Ma *et al.*, 2015). No presente estudo, embora a taxa fotossintética não tenha sido medida, os resultados da análise de crescimento e do conteúdo de pigmentos fotossintéticos (capítulo 1) nos leva supor de que as plantas tratadas com Al foram fotossinteticamente mais eficientes que aquelas do tratamento controle. Portanto, o aumento de ROS via fotossíntese e respiração pode estar associado com uma maior abundância de *mio*-inositol em plantas que receberam Al.

Além disso, o *mio*-inositol é um componente essencial em sinal de transdução, cascatas de reação sinalizadora em plantas e também está envolvido em muitas vias de regulação das enzimas biossintéticas (Stevenson *et al.*, 2000; Xue *et al.*, 2007). Também possui participação na via de sinalização para a produção de fosfatidilinositol (Kersting *et al.*, 2003; Dong *et al.*, 2013), biossíntese de ácido fítico (Ali *et al.*, 2013) da parede celular, e se relaciona com a produção de moléculas ligadas ao estresse e ao controle hormonal de auxina AIA (ácido-3-indol-acético) (Loewus e Murthy, 2000).

Níveis mais baixos de mio-inositol têm sido verificados em plantas sob algum tipo de estresse. Ao analisar o perfil metabólico de rabanete sob estresse a metais pesados como chumbo (Pb) e cádmio (Cd) se verificou uma considerável diminuição na quantidade de mio-inositol em raízes dessa planta (Wang *et al.*, 2015). Este fato pode sugerir que a ausência de Al induz algum tipo de estresse em *Q. dichotoma*. No entanto, ainda não é possível dizer qual (is) é (são) o (s) tipo (s) de estresse (s) acarretado pela ausência desse metal nessas plantas.

6.5. Metabolismo dos aminoácidos

Quanto aos aminoácidos encontrados em *Q. dichotoma*, observaram-se maiores quantidades de serina e ácido piroglutâmico em folha e raiz nas amostras das plantas controle. Esses dados estão em consonância com trabalhos em que mostram que plantas sob estresses abióticos sintetizam mais aminoácidos (Arbona *et al.*, 2003; Arbona *et al.*, 2008) e açúcares solúveis (Iordachescu e Imai, 2008). Por exemplo em espécie de citrus (*Carrizo citrange*) sob estresse salino foi constatado aumento do aminoácido prolina em 1,8 vezes a mais que no controle (Arbona *et al.*, 2003).

A serina em plantas, além de formar parte das proteínas e realizar funções catalíticas em muitas enzimas, também participa da biossíntese de várias biomoléculas necessárias para a proliferação celular, como aminoácidos, bases nitrogenadas, fosfolipídios e esfingolipídios (Karp, 2013). Como mencionado, a serina tem um papel indispensável em vários processos celulares, tais como o metabolismo de carbono (Kalhan e Hanson, 2012) ou em mecanismos de sinalização, onde é um dos três aminoácidos que são fosforiladas por quinases. O metabolismo da serina é essencial para o metabolismo do glicolato, embriogênese, desenvolvimento radicular pós-embriônico e fotorrespiração, sendo esta última a principal via de síntese de serina nas plantas para tipos específicos de células envolvidas em eventos do desenvolvimento. (Collakova *et al.*, 2008; Bauwe *et al.*; Maurino e Peterhansel, 2010; Srivastava *et al.*, 2011; Ros *et al.*, 2014).

Existem evidências que sugerem que a serina esteja envolvida na resposta a estresses bióticos e abióticos, por meio do evento de fotorrespiração que pode ocorrer em plantas sob estas condições (Pimentel, 1998). Em plantas de seringueira sob déficit de nitrogênio apresentou alta taxa de fotorrespiração que acarretou na diminuição da

taxa de assimilação de carbono (Carneiro, 2014). Tais resultados, assim como em *Q. dichotoma*, podem ser devido ao aumento na degradação de proteína (Catala *et al.*, 2007), como a redução da síntese das mesmas (Kawaguchi *et al.*, 2004). Esse acúmulo de serina em *Q. dichotoma* nas plantas controle pode ser interpretada como um estresse abiótico causado pela falta do Al, levando a planta a realizar a fotorrespiração e conseqüentemente elevar a síntese de serina.

Assim como a serina, o acúmulo de ácido piroglutâmico principalmente em folhas (285,53%) de plantas que não foram suplementadas com Al pode remeter a um estresse abiótico, visto que, o aumento de aminoácidos em geral é uma resposta a esta condição (Arbona *et al.*, 2003; Arbona *et al.*, 2008). O ácido piroglutâmico conhecido também como 5-oxoprolina (5-OP) é um constituinte normal das plantas superiores, sendo estas capazes de produzir glutamato a partir de 5-OP e convertê-lo a glutamina (Mazelis *et al.*, 1976).

O 5-OP é um aminoácido não proteico envolvido em sistemas antioxidantes e tem sido associado com a adaptação das plantas a estresse abiótico (Yang *et al.*, 2014). Em uma espécie de gramínea perene (*Agrostis stolonifera*) sensível à salinidade, quando submetida a estresse salino e adicionado um precursor de clorofila (alanina) foi verificado um aumento de ácido piroglutâmico no tecido foliar (Yang *et al.*, 2014). Assim, em *Q. dichotoma* o aumento desse composto sugere o estresse da planta que não foi suplementada com Al.

7. CONCLUSÕES

- As plantas cultivadas com suplementação de Al não apresentaram maior abundância de ácidos orgânicos tanto em raiz quanto em folhas que aquelas do controle.
- O Al é um elemento essencial para que o metabolismo de *Q. dichotoma* funcione de forma adequada.
- A ausência do Al induz nessa espécie um quadro semelhante à algum tipo de estresse abiótico.
- Para melhor construção e maior entendimento do perfil metabólico faz-se necessário novas análises em GC-MS com outras concentrações das amostras para detecção de novos metabólitos como outros aminoácidos que não foram detectados no presente estudo.
- Estudos mais aprofundados em metabolômica como balanço e fluxo de metabólitos trarão informações mais precisas para análise do mapa metabólico.

7.1. CONCLUSÃO GERAL

Q. dichotoma necessita do Al em seu metabolismo como um elemento essencial, desta forma quando na ausência deste metal esta espécie responde com efeitos que indicam estresse abiótico.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, D. K.; LIBOUREL, I. G. L.; SHACHAR-HILL, Y. Metabolic flux analysis in plants: coping with complexity. *Plant, cell & environment*, v.32, n. 9, p. 1241–57, 2009.

ALI, N.; PAUL, S.; GAYEN, D.; SARKAR, S. N.; DATTA, S. K.; DATTA, K. RNAi mediated down regulation of *myo*-inositol-3-phosphate synthase to generate low phytate rice. *Rice*, p. 6-12, 2013.

ALVES, V. M. C.; MAGALHÃES, J.; SHAFF, J. E.; PIÑEROS, M. A.; PURCINO, A.; PARENTONI, S. N.; PITTA, G. V. E.; PRATES, H. T.; SCHAFFERT, R. E.; KOCHIAN, L. V. Exsudação de ácidos orgânicos como mecanismo de tolerância a alumínio em milho. In congresso Brasileiro de fisiologia vegetal, v. 8, p. 163, 2001.

ARBONA, V.; FLORS, V.; JACAS, J.; GARCÍA-AGUSTÍN, P.; GÓMEZ-CADENA, A. Enzymatic and non-enzymatic antioxidant responses of *Carrizo citrange*, a salt sensitive citrus rootstock, to different levels of salinity. *Plant Cell Physiology*, v. 44, p. 388–394, 2003.

ARBONA, V.; HOSSAIN, Z.; LÓPEZ-CLIMENT, M. F.; PÉREZ-CLEMENTE, R. M.; GÓMEZ-CADENAS, A. Antioxidant enzymatic activity is linked to waterlogging stress tolerance in citrus. *Physiology Plant*, v. 132, p. 452–466, 2008.

ARBONA, V.; IGLESIAS, D. J.; TALON, M.; GÓMEZ-CADENAS, A. Plant phenotype demarcation using nontargeted LC-MS and GC-MS metabolite profiling. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 57, n.16, p. 7338-7347, 2009.

ARBONA, V.; MANZI, M.; OLLAS, C.; GÓMEZ-CADENAS, A. Metabolomics as a Tool to Investigate Abiotic Stress Tolerance in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 14, p. 4885-4911, 2013.

BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. 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*, v. 48, n.1, p.75-92, 2002.

BAUWE, H.; HAGEMANN, M.; FERNIE, A. R. Photorespiration: Players, partners and origin. *Trends in Plant Science*, v. 15, p. 330–336, 2010.

BOSCOLO, P. R. S.; MENOSSE, M., JORGE, R. A. Aluminum-induced oxidative stress in maize. *Phytochemistry*, v. 62, p. 181–189, 2003.

BRUNNER, I.; SPERISEN, C. Aluminum exclusion and aluminum tolerance in woody plants. In: REWALD, B.; FALIK, O.; GODBOLD, D.; RACHMILEVITCH, S. (ed.). *Ecophysiology of Root Systems-environment Interaction*. *Frontiers in Plant Science*, p. 96-107, 2013.

CARNEIRO, M. M. L. C. Fisiologia de plantas jovens de seringueira cultivadas em diferentes fontes nitrogenadas e sob baixa disponibilidade de água e oxigênio. Lavras: UFLA, 108p, 2014.

CATALA, R.; OUYANG, J.; ABREU, I. A.; HU, Y.; SEO, H.; ZHANG, X.; CHUA, N. H. The Arabidopsis E3 SUMO ligase SIZ1 regulates plant growth and drought responses. *Plant Cell*, v.19, p. 2952-2966, 2007.

CATTIVELLI, L.; RIZZA, F.; BADECK, F. W.; MAZZUCOTELLI, E.; MASTRANGELO, A. M.; FRANCA, E.; MARÉ, C.; TONDELLI, A.; STANCA, A. M. Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. *Field Crops Research*, v. 105, p. 1–14, 2008.

CHAVES FILHO, J. T.; STACCIARINI-SERAPHIN, E. Alteração no potencial osmótico e teor de carboidratos solúveis em plantas jovens de lobeira (*Solanum lycocarpum* St.-Hil.) em resposta ao estresse hídrico. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 24, n. 2, p. 199-204, 2001.

CHAGOYEN, M.; PAZOS, F. Tools for the functional interpretation of metabolomic experiments. *Briefings in Bioinformatics*, v.14, p. 737–744, 2012.

CHENERY, E. M. Aluminium in the plant world. Part I – General Survey in Dicotyledons. *Kew Bulletin*, v. 2, p. 173-183, 1948.

COLLAKOVA, E.; GOYER, A.; NAPONELLI, V.; KRASSOVSKAVA, I.; GREGORY, J. F.; HANSON, A. D.; SHACHAR-HILL, Y. Arabidopsis 10-formyl tetrahydrofolate deformylases are essential for photorespiration. *Plant Cell*, v. 20, p. 1818 - 1832, 2008.

DAS-CHATTERJEE, A.; GOSWAMI, L.; MAITRA, S.; DASTIDAR, K. G.; RAY, S.; MAJUMDER, A. L. Introgression of a novel salt-tolerant L-myo-inositol 1-phosphate synthase from *Porteresia coarctata* (Roxb.) Tateoka (PcINO1) confers salt tolerance to evolutionary diverse organisms. *FEBS letters*, v. 580, n. 16, p. 3980-3988, 2006.

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Métodos para análise de ácido clorogênico. *Química Nova*, v. 27, n. 4, p. 586-592, 2004.

DELHAIZE, E.; RYAN, P. R.; RANDALL, P. J. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) (II. Aluminum stimulated excretion of malic acid from root apices). *Plant Physiology*, v.103, p. 695-702, 1993.

DESBROSSES, G.; STEINHAUSER, D.; KOPKA, J. Metabolome analysis using GC-MS. Springer Netherlands, p. 165–174, 2005.

DING, H.; WEN, D.; FU, Z.; QIAN, H. The secretion of organic acids is also regulated by factors other than aluminum. *Environ Monit Assess.* v. 186, n. 2, p. 1123-31, 2013.

DONG, J.; YAN, W.; BOCK, C.; NOKHRINA, K.; KELLER, W.; GEORGES, F. Perturbing the metabolic dynamics of myo-inositol in developing *Brassica napus* seeds through in vivo methylation impacts its utilization as phytate precursor and affects downstream metabolic pathways. *Bio Med Central Plant Biology*, v. 13, p. 84-91. 2013.

ETICHA, D.; ZAHN, M.; REMER, M.; YANG, Z.; RANGEL, A. F.; RAO, I. M.; HORST, W. J. Transcriptomic analysis reveals differential gene expression in response to aluminium in common bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes. *Annals of Botany.* v.105, p.1119–1128, 2010.

FAMOSO, A. N.; CLARK, R. T.; SHAFF, J. E.; Craft, E., MCCOUCH, S. R.; KOCHIAN, L. V. Development of a novel aluminum tolerance phenotyping platform used for comparisons of cereal aluminum tolerance and investigations into rice aluminum tolerance mechanisms,” *Plant Physiology*, vol. 153, n. 4, p. 1678–1691, 2010.

FIEHN, O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comparative and functional genomics*, v. 2, n. 155–168, 2001.

FUKUSAKI, E.; KOBAYASHI, A. Plant metabolomics: potential for practical operation. *Journal of Bioscience Bioengineering*. v. 100, n. 4, p. 347-54, 2005.

HAELKET, J. M.; PRZYBOROWSKA, A.; STEIN, S. E.; MALLARD, W. G.; DOWN, S.; CHALMERS, R. A. Deconvolution gas chromatography/mass spectrometry of urinary organic acids—potential for pattern recognition and automated identification of metabolic disorders. *Rapid communications in mass spectrometry*, v. 13, n. 4, p. 279-284, 1999.

HAJIBOLAND, R.; BAHRAMI, R. S.; BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Mechanisms of aluminum-induced growth stimulation in tea (*Camellia sinensis*). *Journal of Plant Nutrition Soil Science*, v. 176, p. 616 - 625, 2013.

HARIDASAN, M. Alumínio é um elemento tóxico para as plantas nativas do cerrado? In: Prado, CHBA; Casali, CA. *Fisiologia Vegetal: práticas em relações hídricas, fotossíntese e nutrição mineral*. Barueri: Editora Manole, v. 85, n. 204, p. 1553-1559, 2008¹.

HARIDASAN, M. Nutritional adaptations of native plants of the Cerrado biome in acid soils. *Brazilian Plant Physiology*, v. 20, n. 3, 2008².

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. Mecanismos associados à tolerância ao alumínio em plantas. *Ciências Agrárias*. v. 28, p. 219-228, 2007.

INOSTROZA-BLANCHITEAU, C.; RENGEL, Z.; ALBERDI, M.; DE LA LUZ MORA, M.; AQUEA, F.; ARCE-JOHNSON, P.; REYES-DÍAZ, M. Molecular and physiological strategies to increase aluminum resistance in plants. *Molecular biology reports*, v.39, n. 3, p. 2069-2079, 2012.

IORDACHESCU, M.; IMAI, R. Trehalose biosynthesis in response to abiotic stresses. *Journal Integr.Plant Biology*, v. 50, p. 1223–1229, 2008.

KALHAN, S. C.; HANSON, R. W. Resurgence of serine: an often neglected but indispensable amino Acid. *Journal of Biological Chemistry*, v. 287, p. 19786 - 19791, 2012.

KAPLN, F.; GUY, C. L. β -Amylase induction and the protective role of maltose during temperature shock. *Plant Physiology*, v. 135, p. 1674–1684, 2004.

KARP G. *Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments*. Wiley Global Education 7th Edition, 832 p. 2013.

KAWAGUCHI, R.; GIRKE, T.; BRAY, E. A.; BAILEY-SERRES, J. Differential mRNA translation contributes to gene regulation under non-stress and dehydration stress conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, v. 38, p. 823-839, 2004.

KERSTING, M. C.; BOYETE, M.; MASSEY, J.; RYALS, P. E. Identification of the inositol isomers present in Tetrahymena. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 50, p. 164–168, 2003.

KIDD, P. S.; LLUGANY, M.; POSCHENRIEDER, C.; GUNSE, B.; BARCELÓ, J. “The role of root exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L.),” *Journal of Experimental Botany*, v. 52, n. 359, p. 1339–1352, 2001.

KIM, H. K.; VERPOORTE, R. Sample preparation for plant metabolomics. *Phytochem Anal*, v. 21, p. 4–13, 2010.

KINGSTON-SMITH, A. H.; WALKER, R. P.; POLLOCK, C. J. Invertase in leaves: conundrum or control point? *Journal of Experimental Botany*, v. 50, p. 735-743, 1999.

KOCHIAN, L. V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annual Review of Plant Biology*, v. 46, n. 1, p. 237-260, 1995.

KOCHIAN, L. V.; HOEKENGA, O. A.; PIÑEROS, M. A. How do crop plants tolerate acid soils? mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Journal Plant Biology*, v. 55, p. 459–493, 2004.

KOCHIAN, L. V.; PIÑEROS, M. A.; HOEKENGA, O. A. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. *Plant and Soil*, v. 274, n. 1, p. 175–195, 2005.

KOCHIAN, L. V.; PIÑEROS, M. A.; LIU, J.; MAGALHAES, J. V. Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum resistance. *Annual Review of Plant Biology*, v. 66, p. 571-598, 2015.

KUMARI, M.; TAYLOR, G. J.; DEYHOLOS, M. K. Transcriptomic responses to aluminum stress in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Genetics and Genomics*, v.279, p. 339–357, 2008.

KUSUDA, H.; KOGA, W.; KUSANO, M.; OIKAW, A.; SAITO, K.; HIRAI, M. Y.; YOSHIDA, K. T. Ectopic expression of *myo*-inositol 3-phosphate synthase induces a wide range of metabolic changes and confers salt tolerance in rice. *Plant Science*, v. 232, p. 49-56, 2015.

LI, X. P.; BJÖRKMAN, O.; SHIH, C.; GROSSMAN, A. R.; ROSENQUIST, M.; JANSSON, S.; NIYOGI, K. K. A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting, *Journal Nature*. v. 403, p. 391–395, 2000.

LISEC, J.; SCHAUER, N.; KOPKA, J.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A. R. Gas chromatography mass spectrometry–based metabolite profiling in plants. *Nature protocols*, v. 1, n. 1, p. 387-396.

LOEWUS, F. A.; MURTHY, P. P. N. *Myo*-inositol metabolism in plants. Review Article. *Plant Science*, v. 150, n 1, p.1-19, 2000.

LORENCE, A.; CHEVONE, B. I.; MENDES, P.; NESSLER, C. L. *Myo*-inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis. *Plant Physiology*, v. 134, p. 1200–1205, 2004.

LUEDEMANN, A.; STRASSBURG, K.; ERBAN, A.; KOPKA, J. Tag Finder for the quantitative analysis of gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS)-based metabolite profiling experiments. *Bioinformatics*, v. 24, n. 5, p. 732-737, 2008.

MA, L.; TIAN, T.; LIN, R.; DENG, X. W.; WANG, H.; LI, G. FHY3 Arabidopsis e FAR1 Regular Light-Induced *mio*-inositol Biossíntese e respostas ao estresse oxidativo através da transcrição de ativação de MIPS1. *Molecular Plant*, v. 9, n. 4, p. 541-557, 2015.

MACHADO, J. W. B. Acumulação de alumínio em *Vochysia thyrsoidea* Pohl. Dissertação de Mestrado, Brasília, DF, Universidade de Brasília, 1985.

MAJEE, M.; MAITRA, S.; DASTIDAR, K. G.; PATTAIK, S.; CHATTERJEE, A.; HAIT, N. C. A novel salt tolerant L-*myo*-inositol-1-phosphate synthase from *Porteresia coarctata* (Roxb.) Tateoka, a halophytic wild rice. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, p. 28539–28552, 2004.

MARON, L. G.; PIÑEROS, M. A.; GUIMARÃES, C. T.; MAGALHAES, J. V.; PLEIMAN, J. K.; MAO, C.; SHAFF, J.; Belicuas, S. N. J.; KOCHIAN, L. V. Two functionally distinct members of the MATE (multi-drug and toxic compound extrusion) family of transporters potentially underlie two major aluminum tolerance QTLs in maize. *The Plant Journal*, v. 61, n. 5, p. 728-740, 2010.

MASSOT, N.; NICANDER, B.; BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C.; TILLBERG, E. A rapid increase in cytokinin levels and enhanced ethylene evolution precede Al³⁺ induced inhibition of root growth in bean seedlings (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Growth Regulation*, v. 37, p. 105–12, 2002.

MATSUDA, F.; YONEKURA-SAKAKIBARA, K.; NIIDA, R.; KUROMORI, T.; SHINOZAKI, K.; SAITO, K. MS/MS spectral tag-based annotation of non-targeted profile of plant secondary metabolites. *The Plant Journal*, v. 57, p. 555–577, 2009.

MATSUMOTO, H.; HIRASAWA, E.; MORIMURA, S.; TAKAHASHI, E. Localization of aluminium in tea leaves. *Plant and Cell Physiology*, v.17, n. 3, p. 627-631, 1976.

MAURINO, V. G.; PETERHANSEL, C. Photorespiration: Current status and approaches for metabolic engineering. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 13, p. 249–256, 2010.

MAZELIS, M.; MIFLIN, B. J.; PRATT, H. M. A chloroplast-localized diaminopimelate decarboxylase in higher plants. *FEBS letters*, v. 64, n. 1, p. 197-200, 1976.

MUSCOLO, A.; JUNKER, A.; KLUKAS, C.; WEIGELT-FISCHER, K.; RIEWE, D.; ALTMANN, T. Phenotypic and metabolic responses to drought and salinity of four contrasting lentil accessions. *Journal of experimental botany*, v. 66, n. 18 p. 5467–5480, 2015. 2015.

NIAN, H.; YANG, Z.; HUANG, H.; YAN, X.; MATSUMOTO, H. Citrate secretion induced by aluminum stress may not be a key mechanism responsible for differential aluminum tolerance of some soybean genotypes. *Journal of Plant Nutrition*, v. 27, n.11, p. 2047–2066, 2005.

PATTI, G. J.; YANES, O.; SIUZDAK, G. Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 13, p. 263–269, 2012.

PÉREZ-URRIA CARRIL, E.; ÁVALOS GARCÍA, A. Metabolismo secundário de plantas. *REDUCA*, v. 2, n. 3, p. 119-145, 2009.

PIMENTEL, C. Metabolismo de Carbono na Agricultura Tropical. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, p.106-108, 1998.

ROS, R.; OZ-BERTOMEU, J. M.; KRUGER, S. Serine in plants: biosynthesis, metabolism, and functions. *Trends in Plant Science*, v. 19, n. 9, 2014.

SALES, C. R. G.; RIBEIRO, R. V.; MACHADO, D. F. S. P.; MACHADO, R. S.; DOVIS, V. L.; LAGÔA, A. M. M. A. Gas exchange and carbohydrate balance in sugarcane plants under root stressful conditions. *Bragantia*, v. 71, n. 3, p. 319-327, 2012.

SCHAUER, N.; FERNIE, A. R. Plant metabolomics: towards biological function and mechanism. *Trends Plant Science*, v. 11, p. 508–516, 2006.

- SHARP, R. E.; POROYKO, V.; HEJLEK, L. G.; SPOLLEN, W. G.; SPRINGER, G. K.; BOHNERT, H. J.; NGUYEN, H. T. Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *Journal of Experimental Botany*, v. 55, n. 407, 2004.
- SILVA, R. C. C. Aspectos fisiológicos, fitoquímicos e proteômicos de *Qualea grandiflora* Mart. em resposta ao alumínio. Dissertação de Mestrado, Brasília, DF, Universidade de Brasília. 2012.
- SMIRNOFF, N.; CONKLIN, P. L.; LOEWUS, F. A. Biosynthesis of ascorbic acid in plants: a renaissance. *Annual reviews Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 52, p. 437-467, 2001.
- SRIVASTAVA, A. C.; RAMOS-PARRA, P. A.; BEDAIR, M.; ROBLEDO-HERNANDEZ, A. L.; YUHONG TANG; SUMNER, L. W.; DIAZ DE LA GARZA R. I.; BLANCAFLOR, E. B. The folylpolyglutamate synthetase plastidial isoform is required for postembryonic root development in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, v. 155, n. 3, p. 1237-1251, 2011.
- STEVENSON, J. M.; PERERA, I. Y., HEILMANN, I.; PERSSON, S.; BOSS, W. F.; Inositol signaling and plant growth. *Trends in Plant Science*, v. 5, p. 252–258, 2000.
- SWEETLOVE, L.; RATCLIFFE, R.G. Flux-balance modeling of plant metabolism. *Frontiers in plant science*, v.2, n.38. p.11-10, 2011.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Plant Physiology*. University of California, Los Angeles. 3 ed. 2002.
- URANO, K.; KURIHARA, Y.; SEKI, M.; Shinozaki, K. ‘Omics’ analyses of regulatory networks in plant abiotic stress responses. *Current opinion in plant biology*, v. 13, n. 2, p. 132-138, 2010.
- VICENTE, F. M. P.; ROSSIELO, R. O. P.; PEREIRA, M. B. Características indicativas de sensibilidade ao alumínio em arroz. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 33, n. 1, p. 9-15, 1998.

WANG, L.; FAN, X. W.; PAN, J. L.; HUANG, Z. B.; LI, Y. Z. Physiological characterization of maize tolerance to low dose of aluminum, highlighted by promoted leaf growth. *Planta*, v. 242, n. 6, p. 1391-1403, 2015.

WENZL, P.; CHAVES, A. L.; MAYER, J. E.; RAO, I. M.; NAIR, M. G. Roots of nutrient-deprived *Brachiaria* species accumulate 1,3-di-O-trans-feruloylquinic acid. *Phytochemistry*, v. 55, n. 5, p. 389-395, 2000.

WENZL, P.; PATIÑO, G. M.; CHAVES, A. L.; MAYER, J. E.; RAO, I. M. The high level of aluminum resistance in signal grass is not associated with known mechanisms of external aluminum detoxification in root apices. *Plant Physiology*, v. 125, n. 3, p. 1473-1484, 2001.

WILLADINO, L.; CAMARA, T. R. Tolerância das plantas à salinidade: aspectos fisiológicos e bioquímicos. *Enciclopédia biosfera*, v. 6, n. 11, p. 1-23, 2010.

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. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 101, p. 162-172, 2016.

XUE, H.; CHEN, X.; Li, G. Involvement of phospholipid signaling in plant growth and hormone effects. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 10, p. 483 – 489, 2007.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review of Plant Biology*, v. 57, p. 781-803, 2006.

YANG, J. L.; Li, Y. Y.; ZHANG, Y. J.; ZHANG, S. S.; WU, Y. R.; WU, P.; ZHENG, S. J. Cell wall polysaccharides are specifically involved in the exclusion of aluminum from the rice root apex. *Plant Physiology*, v. 146, n. 2, 602-611, 2008.

YANG, Z.; CHANG, Z.; SUN, L.; YU, J.; HUANG, B. Physiological and metabolic effects of 5-aminolevulinic acid for mitigating salinity stress in creeping bentgrass. *PloS one*, v. 9, n. 12, e116283, 2014.