

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 27/03/2021.

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA VEGETAL)

*OS MECANISMOS DE TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM STYRAX CAMPORUM
ENVOLVEM SÍNTESE E SECREÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS?*

BRENDA MISTRAL DE OLIVEIRA CARVALHO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências biológicas (Biologia Vegetal).

Fevereiro - 2018

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA VEGETAL)

*OS MECANISMOS DE TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM STYRAX CAMPORUM
ENVOLVEM SÍNTESE E SECREÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS?*

BRENDA MISTRAL DE OLIVEIRA CARVALHO

ORIENTADOR: PROF. DR. GUSTAVO HABERMANN

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia vegetal).

581.5264 Carvalho, Brenda Mistral de Oliveira
C331s Os mecanismos de tolerância ao alumínio em *Styrax
camporum* envolvem síntese e secreção de ácidos orgânicos? /
Brenda Mistral de Oliveira Carvalho. - Rio Claro, 2018
31 f. : il., figs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Gustavo Habermann

1. Cerrados. 2. Mecanismo de tolerância ao alumínio. 3.
Ácido cítrico. 4. Ácido oxálico. 5. Acumuladora de alumínio.
6. Exclusão de alumínio. I. Título.



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Os mecanismos de tolerância ao alumínio em *Styrax comporum* envolvem síntese e secreção de ácidos orgânicos?

AUTORA: BRENDA MISTRAL DE OLIVEIRA CARVALHO

ORIENTADOR: GUSTAVO HABERMANN

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA VEGETAL), área: BIOLOGIA VEGETAL pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. GUSTAVO HABERMANN
Departamento de Botânica / Instituto de Biociências de Rio Claro - SP

Prof. Dr. MÁRCIO ROBERTO SOARES
Departamento de Recursos Naturais e Proteção Ambiental / Universidade Federal de São Carlos/ SP

Prof. Dr. JORGE FERNANDO PEREIRA
EMBRAPA / Embrapa Gado de Leite

Rio Claro, 27 de março de 2018

*“A vida não está aqui para satisfazer
as nossas projeções e exigências, ela
apenas está fluindo”*

Mooji

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e infinito amor. Aos meus pais, Gilson e Patricia, por terem permitido minha experiência nessa vida, sem eles nada seria possível. A minha mãe, pelo enorme incentivo desde a infância e, principalmente, por cada palavra de amor. Eterna gratidão a minha avó Ordalia, meu maior exemplo de sabedoria. A minha querida irmã Barbara, por todo carinho e amor.

Aos meus tios e tias, pelos incentivos e grandes aprendizados que me proporcionaram com seus exemplos. Em diferentes aspectos, cada um deles tiveram papel essencial em minha formação. Aos meus primos, que sempre torceram pelo meu melhor, ainda que distantes. Ao meu amor, Pierre, por tornar cada dia mais leve com seu apoio, carinho e compreensão.

Agradeço especialmente ao Prof. Gustavo pela oportunidade e confiança. Obrigada pela excelente orientação, por todo o conhecimento transmitido e pelo apoio nos “altos e baixos”. Sua constante integridade e franqueza nas palavras e atos são exemplos para mim. Também, agradeço a todas as pessoas que tive contato no CEIS, principalmente ao Sebastião, pelo apoio no planejamento e execução deste trabalho, e por tirar minhas dúvidas com tanta paciência em suas explicações.

Aos queridos amigos Carolina, Giselle, Lorena, Mariana, Marina, Matheus e Otávia, saber que tenho suas amigas me fortalece. Agradeço de coração à Anninha, por ter me recebido com tanto acolhimento e carinho desde os primeiros contatos com Rio Claro. E minha irmã de coração, Lorena, pelo companheirismo e cumplicidade. Também, sou grata por todos os outros amigos que Rio Claro me trouxe, dentre eles, Ju, Laila, Laurinha, Mari Dairiel; aos amigos que estiveram comigo mesmo distantes, Carola, Marcus, Daniella e Julia; e a todos os outros amigos que aqui não foram citados.

INDÍCE

| | |
|---|-----------|
| RESUMO..... | 06 |
| ABSTRACT..... | 07 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 08 |
| 2. REFERÊNCIAS..... | 10 |
| 3. CAPÍTULO ÚNICO: First report of organic acid exudation in a moderate aluminum-accumulating species from the Brazilian savana..... | 13 |

| | |
|---------------------------|----|
| Abstract..... | 14 |
| Introduction..... | 15 |
| Material and Methods..... | 16 |
| Results..... | 20 |
| Discussion..... | 21 |
| Acknowledgements..... | 22 |
| References..... | 23 |
| Table..... | 26 |
| Figures..... | 27 |

RESUMO

A vegetação do Cerrado, tipicamente conhecida como ‘Savana brasileira’, é constituída por espécies que são adaptadas a crescer em solos ácidos e ricos em alumínio (Al). Usando *Styrax camporum*, uma planta lenhosa do Cerrado moderadamente acumuladora de Al, examinamos se esta espécie exclui Al de duas raízes por meio da exsudação de ácidos orgânicos (AOs) para manter baixo conteúdo de Al na folha em relação às plantas tipicamente acumuladoras de Al dessa vegetação. Para isso, medimos os ácidos cítrico, málico e oxálico exsudado por *S. camporum* cultivada em solução nutritiva contendo 0, 740 e 1480 μM Al por 30 dias, usando GC-MS. Além disso, a concentração de Al nessas soluções foi medida aos 0 e 30 dias do estudo, usando ICP-OES para estimar a absorção de Al pelas plantas. Exceto para o ácido málico, plantas expostas ao Al exsudaram mais AOs que aquelas não expostas ao Al. Depois de 30 dias, enquanto plantas expostas a 740 μM Al absorveram 40% do Al disponível na solução, plantas expostas a 1480 μM Al absorveram 60%. Ao mesmo tempo, plantas expostas a 1480 μM Al exsudaram menor concentração de ácidos cítrico e oxálico, em relação às plantas expostas a 740 μM Al. Considerando que maior exsudação de AO causou menor absorção de Al, é possível que os ácidos cítrico e oxálico estejam detoxificando o Al nessa espécie moderadamente acumuladora. Além disso, parece que, para esta espécie, concentrações crescentes de Al em solução nutritiva podem causar diminuições proporcionais nos padrões de exsudação de AOs. Portanto, a exsudação de AO parece ser um mecanismo que contribui para a adaptação de *S. camporum* para lidar com alta disponibilidade de Al nos solos ácidos do Cerrado.

Palavras-chave: *Ácido cítrico, ácido oxálico, acumuladora de alumínio, exclusão de alumínio, vegetação do Cerrado*

ABSTRACT

The Cerrado vegetation, typically known as ‘Brazilian Savanna’, is comprised of species that are adapted to grow on soils that are acidic and rich in aluminum (Al). Using *Styrax camporum*, a moderate Al-accumulating Cerrado woody plant, we examined whether this species exclude Al from their roots through organic acids (OAs) exudation in order to maintain a low leaf Al content in relation to typical Al-accumulating plants from this vegetation. For this, we measured citric, malic and oxalic acids exuded by *S. camporum* grown in a nutrient solution containing 0, 740 and 1480 μM Al for 30 days, using a GC-MS. In addition, the Al concentration in these solutions was measured at 0 and 30 days of the study using an ICP-OES in order to estimate the Al uptake by plants. Except for malic acid, plants exposed to Al exuded more OAs than those not exposed to Al. After 30 days, while plants exposed to 740 μM Al absorbed 40% of the Al available in the solution, plants exposed to 1480 μM Al absorbed 60% of it. At the same time, plants exposed to 1480 μM Al exuded lower concentration of citric and oxalic acids in relation to plants exposed do 740 μM Al. Considering that more OA exudation caused lower Al uptake, it is possible that citric and oxalic acids are Al detoxifying mechanisms in this moderate Al-accumulating species. In addition, it seems that for this species, solutions containing increasing Al concentrations may cause decreasing OA exudation patterns. Therefore, OA exudation seems to be a mechanism contributing to adaptation of *S. camporum* to cope with high Al availability in the acidic soils from the Cerrado.

Keywords: *Aluminum exclusion, Al-accumulator, Cerrado vegetation, citric acid, oxalic acid*

1. INTRODUÇÃO

O Alumínio (Al) é o terceiro elemento mais abundante da crosta terrestre e é encontrado no solo principalmente na forma de aluminossilicatos. No entanto, em solos ácidos [pH (em H₂O) < 5.5], que representam 30% dos solos cultiváveis (Foy, 1988; Horst et al., 2010), o Al é solubilizado para diferentes formas iônicas, especialmente o cátion trivalente (Al³⁺), que é tóxico para a maioria das espécies. No Brasil, o pH dos solos varia entre 3,7 e 5,5, e o Al é predominante em mais de 1/3 desses solos (Abreu Jr. et al., 2003).

O principal sintoma da toxicidade ao Al é uma rápida redução do crescimento radicular (Horst et al., 2010; Sun et al., 2010), devido a danos mecânicos causados às células das raízes (Kopittke et al., 2008). Há evidências de que a primeira lesão do Al em plantas é sua ligação às matrizes pécticas da parede celular das células das raízes (Kopittke et al., 2015), inibindo a divisão e o alongamento celular nessa região (Sivaguru & Horst, 1998; Kochian et al., 2004; Doncheva et al., 2005). Além dos efeitos negativos no sistema radicular das plantas, o Al pode causar efeitos de longa distância, como diminuição do crescimento de caules (Jiang et al., 2009) e redução das trocas gasosas e reações fotoquímicas (Konrad et al., 2005; Lidon et al., 1999; Banhos et al., 2016a).

Embora a fitotoxicidade do Al seja um fator limitante para a produtividade das culturas em locais com solos ácidos, o Brasil é uma potência agrícola. A expansão agrícola brasileira, sobretudo depois de 1960, se fez à custa da substituição da vegetação nativa do Cerrado, adaptada a solos oligotróficos, ácidos, álicos e distróficos (Pinheiro & Monteiro, 2010), pelos campos de cultivo. Assim, a agricultura depende até hoje da correção do pH do solo desses locais.

Por outro lado, há espécies que acumulam considerável quantidade de Al sem que este cause danos aparentes aos seus tecidos. Plantas que acumulam mais de 1000 mg Al por kg de folhas secas são definidas como acumuladores de alumínio (Chenery, 1948; Jansen et al., 2002), abrangendo espécies pertencentes a cerca de 45 famílias (sendo Melastomataceae, Rubiaceae, Simplicaceae, Theaceae e Vochysiaceae exemplos das mais estudadas) (Jansen et al., 2002). Além de acumular consideráveis quantidades de Al, plantas acumuladoras podem também detoxificar o Al externamente, no apoplasto das células radiculares (Horst et al., 2010). Desta forma, ácidos orgânicos (AOs), como os ácidos cítrico, málico, oxálico e succínico são exudados pelas raízes das plantas, formando complexos estáveis com o Al e não fitotóxicos (Kochian et al., 2004; Brunner and Sperisen, 2013). Esse processo evita a reação do Al com os sítios carregados negativamente no apoplasto, onde ocorre a lesão primária do

Al nas raízes das plantas (Kopittke et al., 2015). Por exemplo, *Camellia sinensis* (Theaceae), *Fagopyrum esculentum* (Polygonaceae) e *Colocasia esculenta* (Araceae), que acumulam significativa quantidade de Al na parte aérea, exsudam AOs das raízes em resposta ao Al (Ma et al., 1997; Ma and Miyasaka, 1998; Morita et al., 2011).

Pouca atenção é dada às espécies de comunidades nativas que toleram o Al. A vegetação do Cerrado é adaptada a solos ácidos (pH < 5,0) e apresenta saturação por Al (m%) maior que 50% da capacidade da troca de cátion (Haridasan, 2008; Souza et al., 2015b; Bressan et al., 2016). Algumas espécies lenhosas do Cerrado, consideradas acumuladoras de Al, podem mostrar de 4.000 a 15.000 mg (ou mais) de Al por kg de folhas secas: *Miconia sp.* (Melastomataceae), *Palicourea rigida*, *Rudgea viburnoides* (Rubiaceae), *Qualea sp.* and *Vochysia sp.* (Vochysiaceae) (Haridasan 1982; Bressan et al., 2016; Malta et al., 2016). Por outro lado, a maiorias das espécies lenhosas desta vegetação se classificam como não acumuladoras, armazenando de 100 a 600 mg Al por kg de folhas secas (Haridasan, 1982; Souza et al., 2015a). No entanto, até onde sabemos, não há estudos sobre como as espécies acumuladoras e não acumuladoras do Cerrado lidam com a grande disponibilidade de Al no ambiente radicular. É possível que essas plantas utilizem o mecanismo de exclusão por meio da exsudação de AOs pelas raízes.

Styrax camporum (Styracaceae) é uma planta lenhosa do Cerrado considerada moderadamente acumuladora de Al (~1500 mg/kg) (Bressan et al., 2016). Assim, é esperado que essa planta exclua o Al a partir das raízes e isso poderia explicar o menor conteúdo de Al nas folhas em relação às plantas do Cerrado tipicamente acumuladoras de Al. Em um estudo anterior, *S. camporum* apresentou trocas gasosas reduzidas e diminuição da parte aérea quando cultivada em solução nutritiva contendo 1480 μM Al, comparada às plantas não expostas ao Al (Banhos et al., 2016b), indicando que 1480 μM Al pode ser tóxico para essa espécie. Assim, sugere-se que uma concentração menor de Al não cause danos a essa espécie, podendo induzir maior exclusão de Al.

No presente estudo, nós testamos a hipótese de que a exsudação de AOs está associada com a presença de Al no ambiente radicular de *S. camporum* cultivada em solução nutritiva. Além disso, esperamos que 740 μM Al cause um aumento na exsudação de AOs em relação às plantas expostas a 1480 μM Al. Para isso, quantificamos os ácidos cítrico, málico e oxálico exsudados pelas raízes de *S. camporum* cultivada em solução nutritiva por 30 dias.

2. REFERÊNCIAS

- Abreu JCH, Muraoka T, Lavorante A (2003) Relationship between acidity and chemical properties of Brazilian soils. *Scientia Agricola* 60: 337–343
- Banhos OFAA, Carvalho BMO, Da Veiga EB, Bressan ACG, Tanaka FAO, Habermann, G (2016a) Aluminum-induced decrease in CO₂ assimilation in ‘Rangpur’ lime is associated with low stomatal conductance rather than low photochemical performances. *Scientia Horticulturae* 205: 133–140
- Banhos OFAA, Souza, MC, Habermann, G (2016b) High aluminum availability may affect *Styrax camporum*, an Al non-accumulating species from the Brazilian savanna. *Theoretical and Experimental Plant Physiology* 28: 321–332
- Bressan ACG, Coan, AI, Habermann G (2016) X-ray spectra in SEM and staining with chrome azurol S show Al deposits in leaf tissues of Al-accumulating and non-accumulating plants from the cerrado. *Plant and Soil* 404: 293–306
- Brunner I, Sperisen C (2013) Aluminum exclusion and aluminum tolerance in woody plants. *Frontiers in Plant Science* 4: 1–12
- Chenery EM (1948) Aluminum in plants and its relation to plant pigments. *Annals of Botany* 12: 121–136
- Doncheva S, Amenos M, Poschenrieder C, Barcelo J (2005) Root cell patterning: a primary target for aluminium toxicity in maize. *Journal of Experimental Botany* 56: 1213–1220
- Foy CD (1988) Plant adaptation to acid: aluminum-toxic soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 19: 959–987
- Haridasan M (1982) Aluminium accumulation by some cerrado native species of central Brazil. *Plant and Soil* 65: 265–273
- Haridasan M (2008) Nutritional adaptations of native plants of the cerrado. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 20: 183–195
- Horst WJ, Wang Y, Eticha D (2010) The role of the root apoplast in aluminium-induced inhibition of root elongation and in aluminium resistance of plants: a review. *Annals of Botany* 106: 187–197
- Jansen S, Broadley MR, Robbrecht E, Smets E (2002) Aluminum Hyperaccumulation in Angiosperms: A review of its phylogenetic significance. *The Botanical Review* 68: 235–269

- Jiang HX, Tang N, Zheng JG, Li Y, Chen LS (2009) Phosphorous alleviates aluminum-induced inhibition of growth and photosynthesis in *Citrus grandis* seedlings. *Physiologia Plantarum* 137: 298–311
- Kochian LV, Hoekenga OA, Piñeros MA (2004) How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annual Review of Plant Biology* 55: 459–493
- Konrad MLF, Silva JAB, Furlani PR, Machado EC (2005) Trocas gasosas e fluorescência da clorofila em seis cultivares de cafeeiro sob estresse de alumínio. *Bragantia* 64: 339–347
- Kopittke PM, Blamey FPC, Menzies NW (2008) Toxicities of Al Cu, and Lainclude ruptures to rhizodermal and root cortical cells of cowpea. *Plant Soil* 303: 217–227
- Kopittke PM, Moore KL, Lombi E, Gianoncelli A, Ferguson BJ, Blamey FPC, Menzies NW, Nicholson TM, McKenna BA, Wang P, Gresshoff PM, Kourousias G, Webb RI, Green K, Tollenaere A (2015) Identification of the primary lesion of toxic aluminum in plant roots. *Plant Physiology* 167: 1402–1411
- Lidon FC, Barreiro MG, Ramalho JC, Lauriano JÁ (1999) Effects of aluminum toxicity on nutrient accumulation in maize shoots: implications on photosynthesis. *Journal of Plant Nutrition* 22: 397–416
- Ma JF, Hiradate S, Nomoto K, Iwashita T, Matsumoto H (1997) Internal detoxification mechanism of Al in hydrangea: identification of Al form in the leaves. *Plant Physiology* 113: 1033–1039
- Ma Z, Miyasaka SC (1998) Oxalate exudation by taro in response to Al. *Plant Physiology* 118: 861–865
- Malta PG, Arcanjo-Silva S, Ribeiro C, Campos NV, Alves-Azevedo A (2016) *Rudgea viburnoides* (Rubiaceae) overcomes the low soil fertility of the Brazilian Cerrado and hyperaccumulates aluminum in cell walls and chloroplast. *Plant Soil* 408: 369–384
- Morita A, Yanagisawa O, Maeda S, Takatsu S, Ikka T (2011) Tea plant (*Camellia sinensis* L.) roots secrete oxalic acid and caffeine into medium containing aluminum. *Soil Science and Plant Nutrition* 57: 796–802
- Pinheiro MHO, Monteiro R (2010) Contribution to the discussions on the origin of the cerrado biome: Brazilian savanna. *Brazilian Journal of Biology* 70: 95–102
- Sivaguru M, Horst WJ (1998) The distal part of the transition zone in the most aluminium-sensitive apical root zone of maize. *Plant Physiology* 116: 155–163

- Souza MC, Bueno PCP, Morellato LPC, Habermann G (2015a) Ecological strategies of Al-accumulating and non-accumulating functional groups from the cerrado sensu stricto. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* 87: 813–823
- Souza MC, Franco A, Haridasan M, Rossatto DR, de Araújo JF, Morellato LPC, Habermann G (2015b) The length of the dry season may be associated with leaf scleromorphism in cerrado plants. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* 87: 1691–1699
- Sun P, Tian QY, Chen J, Zhang WH (2010) Aluminium-induced inhibition of root elongation in *Arabidopsis* is mediated by ethylene and auxin. *Journal of Experimental Botany* 61: 347–356.
- von Uexküll HR., Mutert E. (1995) Global extent, development and economic impact of acid soils. *Plant and Soil* 171: 1–15