



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Botânica

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal



Juliana Batista de Souza

CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E MOLECULAR DO MICROTOMATEIRO
CV. MICRO-TOM
(*Solanum lycopersicum*) E SEUS MUTANTES *dgt* E *Nr* E TRANSGÊNICOS
HORMONAIIS *DR5-GUS* E *EBS-GUS* EM RESPOSTA A TOXICIDADE POR
ALUMÍNIO.

BELO HORIZONTE

2023

Juliana Batista de Souza

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E MOLECULAR DO MICROTOMATEIRO
CV. MICRO-TOM
(*Solanum lycopersicum*) E SEUS MUTANTES *dgt* E *Nr* E TRANSGÊNICOS
HORMONAIIS *DR5-GUS* E *EBS-GUS* EM RESPOSTA A TOXICIDADE POR
ALUMÍNIO.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biologia Vegetal.

Área de Concentração: Fisiologia Vegetal

Orientador: Prof. Dr. Marcel Giovanni Costa França

Coorientador: Prof. Dr. Joni Esrom Lima

BELO HORIZONTE

2023

043 Souza, Juliana Batista de.

Caracterização fisiológica e molecular do microtomateiro cv. Micro-Tom (*Solanum lycopersicum*) e seus mutantes dgt e Nr e transgênicos hormonais DR5-GUS e EBS-GUS em resposta a toxicidade por alumínio [manuscrito] / Juliana Batista de Souza. – 2023.

142 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Marcel Giovanni Costa França. Coorientador: Joni Esrom Lima.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal.

1. Biologia Vegetal. 2. Alumínio. 3. *Lycopersicon esculentum*. 4. Fenômenos Fisiológicos Vegetais. 5. Toxicidade. I. França, Marcel Giovanni Costa. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 581



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

ATESTADO

Atesto que **Juliana Batista de Souza** defendeu a sua tese de doutorado em Biologia Vegetal intitulada, "**Caracterização fisiológica e molecular do microtomateiro cv. MicroTom (*Solanum lycopersicum*) e seus mutantes *dgt* e *Nr* e transgênicos hormonais *DR5-GUS* e *EBS-GUS* em resposta a toxicidade por alumínio**", sob a orientação do professor Marcel Giovanni Costa França, no dia 31/05/2023 no Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, e foi aprovada pela banca examinadora.

Este atestado é válido por 60 (sessenta) dias, após o que é necessária apresentação da ata de defesa.

Comissão Examinadora

Dr. Marcel Giovanni Costa França (Universidade Federal de Minas Gerais)

Dra. Janaína Guernica Silva (Universidade Federal do Mato Grosso do Sul)

Dra. Isabel Regina Prazeres de Souza (Embrapa - Unidade Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG)

Dra. Alessandra Giani (Universidade Federal de Minas Gerais)

Dra. Maria Rita Scotti Muzzi (Universidade Federal de Minas Gerais)

Belo Horizonte, 02 de junho de 2023.

Professora Juliane Karine Ishida

Subcoordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal - ICB/UFMG



Documento assinado eletronicamente por **Juliane Karine Ishida, Membro**, em 02/06/2023, às 13:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2357953** e o código CRC **DA38B685**.

Dedico este trabalho ao meu marido Lúcio e
aos meus filhos Vítor e Tales. Amo vocês!

Agradecimentos

Agradeço ao nosso Pai maior pela oportunidade de realizar mais este aprendizado e pela vida. Aos meus pais por tanto me amarem e torcerem por mim. Por terem me ensinado a trilhar o caminho do bem e por me incentivarem sempre! Amo vocês! E aos meus irmãos por dividirem comigo as angústias e as alegrias na realização desse trabalho. Em especial a mana Gê, e meu irmão querido Adônis (*in memoria*)!

Ao meu núcleo familiar, meu marido Lúcio, meus filhos Vítor e Tales, à minha nora Isabelly e à minha neta Alícia. Gratidão por vocês estarem comigo nessa caminhada, tornando-a mais leve, com paciência e compreensão, inclusive nos dias mais difíceis. Lúcio para você um especial agradecimento, por toda a paciência, amparo emocional e amor. Gratidão por você vivenciar comigo essa conquista. Saiba que foi também por você e pela nossa família! Sempre! Amo muito vocês!

Ao meu orientador professor Marcel Giovanni Costa França por acreditar em meu potencial, pelos incentivos e pelos ensinamentos.

Ao professor Joni Eron Lima agradeço pela doação das sementes e pelos esclarecimentos em momentos oportunos.

À querida e professora Clésia Cristina Nascentes, por todo auxílio em bancada, pelo apoio de sempre, pelos valiosos ensinamentos de química, pela disponibilidade e por todo o carinho que teve comigo. Você é inspiradora! Gratidão imensa por ter conhecido você, que muito admiro!

À todos os professores do departamento de Botânica / ICB que contribuíram para minha formação. Um agradecimento especial ao professor José Pires Lemos Filho por todas as sugestões e comentários importantíssimos!

Aos pesquisadores Isabel Regina Prazeres de Souza, Andréa Almeida Carneiro, Ubiraci Gomes de Paula Lana por terem sido tão atenciosos e por terem me ensinado tanto em bancada e em nossas reuniões. Saibam que tenho carinho, respeito e gratidão enorme por vocês. Agradeço também ao pesquisador Paulo César Magalhães, pela disponibilidade, pelo suporte técnico, pelo carinho e atenção. Aos pesquisadores Isabel Prazeres de Souza e Camilo de Lelis um agradecimento especial também pela acolhida e por me fazerem sentir tão bem nesses últimos 6 meses em condução da tese. Desejo que possamos continuar a brindar os momentos bons como estes que vivi com vocês.

Aos colegas e estagiários da EMBRAPA Milho e Sorgo, especialmente à Eliete Lopes, que pôde me ajudar com acolhida carinhosa em dias que precisei pernoitar na fazenda.

Aos meus colegas de laboratório de fisiologia vegetal / Departamento de Botânica / ICB pela cooperação nos momentos de realização dos experimentos, especialmente ao Felipe Della Torre, Tiago Vilas Boas e Ana Kely Oliveira. Agradeço também pela companhia e amizade, e por tantos momentos divertidos e alegres em nossa convivência aos amigos Arthur, Áurea, Dani Boanares, DaniPianetti, Humberto e Aldneia. Isso realmente alimentou minha alma!

À querida Amanda Neris dos Santos, pelo auxílio com as análises na Faculdade de Farmácia da UFMG, e por todo o cuidado com os dados gerados nos testes. Gratidão pela amizade e carinho.

Aos colegas do laboratório de química, no Departamento de Química da UFMG, especialmente à Fernanda e à Nathália pelo carinho e disponibilidade em me ensinar e auxiliar nos procedimentos técnicos. Gratidão! Adorei conhecer e conviver com vocês!

Aos colegas do laboratório de anatomia vegetal do Departamento de Botânica / ICB por compartilhar comigo um pouco dos conhecimentos e práticas com as técnicas utilizadas para a

composição desse trabalho. Em especial para Igor Abba Arriola, pelos ensinamentos e pela dedicação na cooperação de parte desse trabalho.

Ao laboratório de Sistemática Vegetal do Departamento de Botânica / ICB, por permitirem o uso dos aparelhos lupa e câmera para registros das imagens.

À nossa querida secretária da pós-graduação, Denise Márcia Figueiredo Monteiro, por estar sempre pronta para me ouvir, pela compreensão e carinho, e pelo excelente trabalho com os trâmites necessários para o andamento de minha pesquisa.

Ao programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal e à CAPES pelo financiamento de minha pesquisa.

À Universidade Federal de Minas Gerais.

Gratidão!

Devagar, mas sempre

Observo o espírito de sequência e gradação que prevalece nos mínimos setores da natureza.

Nada se realiza aos saltos e, na pauta da Lei divina, não existe privilégio em parte alguma.

Enche-se a espiga de grão em grão.

Desenvolve-se a árvore, milímetro a milímetro.

Nasce a floresta de sementes insignificantes.

Levanta-se a construção peça por peça.

Começa o tecido nos fios.

As mais famosas páginas foram produzidas letra a letra...

... Há ensejo favorável à realização?

Age com regularidade, de alma voltada para a meta.

Há percalços e lutas, espinhos e pedrouços na senda?

Prossegue mesmo assim.

O tempo, implacável dominador de civilizações e homens, marcha apenas com sessenta minutos por hora, mas nunca se detém.

Guardemos a lição e caminhemos para diante, com a melhoria de nós mesmos.

Devagar, mas sempre.

Francisco Cândido Xavier/Emmanuel. Fonte Viva 37ª edição, 517 p.

Resumo

O alumínio (Al) é um elemento tóxico existente no solo, promovendo alterações de crescimento, desenvolvimento e a produtividade das culturas. Os objetivos desta pesquisa foram verificar as respostas fisiológicas e anatômicas de *Solanum lycopersicum* L. (Solanaceae) cv. Micro-Tom cultivadas com Al, e caracterizar o potencial desta planta como modelo genético para estudo quanto à toxicidade a este metal; verificar a possibilidade de duas linhagens mutantes hormonais de Micro-Tom, com baixa sensibilidade para AIA (*dgt*) e para ETo (*Nr*) demonstrarem alterações fisiológicas de crescimento, desenvolvimento e produtividade, na presença do Al; e verificar a expressão dos hormônios auxina e etileno para o desenvolvimento do fruto e da semente sob ação do Al, através da expressão dos promotores de transcrição fusionados ao gene repórter *GUS* em duas linhagens transgênicas de Micro-Tom, *pDR5::GUS* e *pEBS::GUS*. Cultivaram-se as plantas em solução nutritiva até a frutificação. Avaliou-se: concentração de nutrientes nos órgãos vegetais, taxas fotossintéticas, teor de pigmentos cloroplásticos, crescimento, produtividade dos frutos, localização histológica do Al nos frutos e sementes, lignificação das raízes, expressão e atividade da enzima *GUS* fusionada aos genes promotores da transcrição em frutos de 5 e 8mm e maduros. Plantas de Micro-Tom apresentaram redução na absorção dos nutrientes Mg, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn e Mo, assim como no crescimento, produtividade e teor relativo de água, principalmente nas concentrações de 200 μM e 300 μM de Al. Houve maior concentração do teor de sólidos solúveis nos frutos das plantas cultivadas com 300 μM Al. A histolocalização com Morin mostrou o Al presente nos frutos e sementes, principalmente no xilema, evidenciando a translocação do Al para a parte aérea. Em *dgt* na presença do Al houve maior redução de biomassa e da concentração de nutrientes na raiz, menor acúmulo de Al nas raízes e nos frutos comparados à linhagem selvagem (*WT*), redução nos teores de pigmentos cloroplastídicos e nas taxas de assimilação de carbono e transpiração, presença de mais frutos verdes que maduros, maior teor de sólidos solúveis na fase intermediária de desenvolvimento, e textura mais rígida. Em *Nr* houve redução da concentração de nutrientes na raiz e elevação de Mg nos frutos, porém não houve aumento na concentração de Al como ocorrido para *WT* e *dgt* nos frutos. Houve redução do crescimento radicular, elevação do teor de clorofila *b*, menor taxa para eficiência da fluorescência da clorofila *a*, a mesma proporção de frutos verdes e maduros, maior teor de sólidos solúveis nos frutos, e textura dos frutos

menos rígida como encontrado em plantas *WT*. O Al alterou crescimento e desenvolvimento da parte aérea e raízes nas linhagens *pDR5::GUS* e *pEBS::GUS*. Nos frutos a transcrição dos genes fusionados aos promotores de auxina e etileno ocorreu de forma antagônica nos estágios de desenvolvimentos avaliados. A atividade da enzima GUS foi mais elevada nos frutos de 5mm e maduros na linhagem *pDR5-GUS* e mais elevada nos frutos de 8mm em *pEBS-GUS*, indicando sinalização dos hormônios em resposta ao Al através da indução do prolongamento no amadurecimento do fruto e desenvolvimento da semente.

Palavras-chave: Micro-Tom. Histolocalização de alumínio. Auxina e etileno. Desenvolvimento vegetal.

Abstract

Aluminum (Al) is a toxic element found in the soil, promoting changes in growth, development and crop productivity. The objectives of this research were to verify the physiological and anatomical responses of *Solanum lycopersicum* L. (Solanaceae) cv. Micro-Tom cultivated with Al, and to characterize the potential of this plant as a genetic model for studying the toxicity to this metal; to verify the possibility of two Micro-Tom hormonal mutant strains, with low sensitivity for AIA (*dgt*) and for ETo (*Nr*) demonstrating physiological changes in growth, development and productivity, in the presence of Al; and to verify the expression of the hormones auxin and ethylene for fruit and seed development under Al action, through the expression of transcription promoters fused to the GUS reporter gene in two Micro-Tom transgenic lines, *pDR5::GUS* and *pEBS::GUS*. Plants were cultivated in nutrient solution until fruiting. The following were evaluated: concentration of nutrients in plant organs, photosynthetic rates, content of chloroplastic pigments, growth, fruit productivity, histological location of Al in fruits and seeds, lignification of roots, expression and activity of the GUS enzyme fused to transcription promoting genes in fruits of 5 and 8 mm and mature. Micro-Tom plants showed a reduction in the absorption of nutrients Mg, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn and Mo, as well as in growth, productivity and relative water content, mainly in the concentrations of 200 μM and 300 μM of Al. There was a higher concentration of soluble solids in the fruits of plants cultivated with 300 μM Al. Histolocalization with Morin showed Al present in the fruits and seeds, mainly in the xylem, evidencing the translocation of Al to the aerial part. In *dgt* in the presence of Al, there was a greater reduction in biomass and nutrient concentration in the root, less accumulation of Al in roots and fruits compared to the wild strain (*WT*), reduction in chloroplast pigment contents and in carbon and carbon assimilation rates. transpiration, presence of more unripe than ripe fruits, higher content of soluble solids in the intermediate stage of development, and more rigid texture. In *Nr* there was a reduction in the concentration of nutrients in the root and an increase in Mg in the fruits, but there was no increase in the concentration of Al as occurred for *WT* and *dgt* in the fruits. There was reduced root growth, increased chlorophyll b content, lower rate for chlorophyll a fluorescence efficiency, the same proportion of unripe and ripe fruit, higher soluble solids content in the fruit, and less rigid fruit texture as found in plants *wt*. Al altered shoot and root growth and development in *pDR5::GUS* and *pEBS::GUS* strains. In fruits, transcription of genes fused to auxin and ethylene promoters occurred in an antagonistic

manner in the evaluated developmental stages. GUS enzyme activity was highest in 5mm and mature fruits in the *pDR5-GUS* strain and highest in 8mm fruits in *pEBS-GUS*, indicating hormone signaling in response to Al through induction of prolonged fruit ripening and development of the seed.

Keywords: Micro-Tom. Aluminum histolocalization. Auxin and ethylene. Plant development.

Sumário

Introdução geral	16
Referências	19
Capítulo 1: Localização histológica do alumínio e seus efeitos morfofisiológicos em <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Microtom	21
Resumo:.....	21
ABSTRACT:.....	22
Introdução	23
Materiais e métodos	25
Cultivo das plantas	25
Avaliação da fluorescência da clorofila <i>a</i> e eficiência no transporte de elétrons (ETRmax)	26
Avaliação das trocas gasosas foliares.....	27
Parâmetros de crescimento e acúmulo de biomassa	28
Teor de pigmentos cloroplastídicos	28
Conteúdo relativo de água	29
Análise da produtividade	29
Avaliação de elementos químicos.....	26
Avaliação anatômica e histoquímica dos frutos de tomate para detecção do Al.....	30
Análise estatística.....	31
Resultados	31
Avaliação de elementos químicos.....	31
Avaliação da fluorescência da clorofila <i>a</i> e eficiência no transporte de elétrons (ETRmax)	33
Teor de pigmentos cloroplastídicos	33
Avaliação das trocas gasosas foliares.....	34
Conteúdo Relativo de Água (CRA).....	34
Parâmetros de crescimento e acúmulo de biomassa	34

Análise de produtividade	35
Avaliação anatômica e histoquímica dos frutos de tomate.....	36
Discussão	37
Conclusão	43
Referências	43
Anexos.....	49
Capítulo 2: Efeito fisiológico da toxicidade do alumínio em linhagem selvagem e mutantes de sensibilidade para auxina e etileno em <i>Solanum lycopersicum</i>, cv MicroTom.....	59
Resumo:.....	59
Abstract:.....	60
Introdução	61
Materiais e métodos.....	65
Cultivo das plantas	65
Avaliação dos elementos químicos minerais	66
Avaliação da fluorescência da clorofila <i>a</i>	67
Avaliação das trocas gasosas foliares.....	68
Parâmetros de crescimento e acúmulo de biomassa	68
Teor de pigmentos cloroplastídicos	69
Análise de produtividade	69
Análise estatística.....	70
Resultados	71
Análise dos elementos químicos em raízes e frutos com semente	71
Teor de pigmentos cloroplastídicos	72
Avaliação da fluorescência da clorofila <i>a</i>	73
Avaliação das trocas gasosas foliares.....	73
Parâmetros de crescimento e acúmulo de biomassa	75

Análise de produtividade	77
Discussão	79
Conclusões	86
Referências Bibliográficas	87
Anexos.....	94
Capítulo 3: Uso do gene repórter <i>GUS</i>, para avaliação da transcrição de auxina e etileno, em plantas transgênicas do microtomateiro MicroTom cultivadas na presença de alumínio.	109
Resumo:.....	109
Abstract:	110
Introdução	111
Materials e métodos.....	114
Cultivo das plantas	114
Parâmetros de crescimento e desenvolvimento	116
Análise histoquímica de lignina.....	117
Análise histoquímica da enzima repórter β -glucoronidase (GUS)	118
Quantificação da atividade da enzima repórter β -glucoronidase (GUS)	119
Análise estatística.....	120
Resultados	120
Parâmetros de crescimento e desenvolvimento	120
Análise histoquímica de lignina.....	121
Análise histoquímica da enzima repórter β -glucoronidase (GUS)	121
Quantificação da Atividade da Enzima Repórter β -glucoronidase (GUS)	123
Discussão	124
Conclusões	128
Referências	129
Anexos.....	134

Introdução geral

A toxicidade do alumínio (Al) é um dos principais problemas de estresse abiótico em todo o mundo onde o solo ácido está presente. Al mostra um efeito tóxico entre o pH do solo 4,5 e 5,5. A toxicidade do alumínio (Al) é uma das principais limitações ao crescimento radicular, prejudicando a absorção de água e nutrientes e comprometendo o desenvolvimento como um todo das plantas (Rahman *et al.*, 2020; Rahman e Upadhyaya, 2021).

O alumínio tem efeitos benéficos e tóxicos nas plantas dependendo do pH do solo, das espécies químicas de Al, do genótipo e condição de crescimento da planta (Rahman e Upadhyaya, 2021). Algumas pesquisas mostram que o Al favorece o crescimento radicular de plantas acumuladoras de Al, como em plantas de *Camellia sinensis* L. melhorando a absorção de fósforo (Konishi, 1992) e aliviando o estresse causado por toxicidade de Mg em plantas de *Camellia japonica* (Liu *et al.*, 2020). Haridasan, (1982) demonstrou que em plantas acumuladoras de Al, como *Qualea grandiflora*, *Q. parviflora*, *Q. multiflora*, *Vochysia thyrsoidea*, *V. elliptica*, *Miconia ferruginata*, *M. pohliana*, *Palicourea rigida* a elevada concentração foliar de Al não alterou a concentração de nutrientes essenciais como cálcio, magnésio, potássio, ferro, manganês, zinco e fósforo.

Na contra-mão das investigações dos efeitos benéficos do Al em plantas, os efeitos da toxicidade deste metal ainda vem sendo investigados em vários genótipos e cultivares para elucidar os mecanismos que envolvem a sensibilidade e tolerância ao Al. Plantas afetadas pela toxicidade do alumínio podem apresentar a alteração na anatomia das raízes, como um dos primeiros sintomas em consequência ao efeito tóxico, tendo as células epidérmicas rompidas, a redução no tamanho da coifa e o desarranjo de tecidos meristemáticos. As raízes então ficam mais grossas e com coloração mais escura, além de apresentar altos teores de lignina

em regiões próximas ao ápice radicular. O que explica a redução no crescimento das raízes na presença do alumínio (Gupta *et al.*, 2013; Hartwig *et al.*, 2007).

Pesquisas mais recentes trazem a investigação de estratégias para mitigação dos efeitos tóxicos atribuídos ao Al, com o uso dos nutrientes boro, magnésio, silício e enxofre em incrementos no solo. E outra vertente vem trazer o resultado de aplicações dos hormônios como a auxina, ácido salicílico, brassinoesteróides e jasmonato para estimular o crescimento das plantas e aliviar o sintomas de estresse por Al (Rahman e Upadhyaya, 2021) .

Além disso, o cultivo em sistemas hidropônicos utilizando plantas modelos com modificações genéticas têm também possibilitado o avanço das pesquisas para a compreensão dos efeitos do Al em plantas. Segundo Miguel *et al.*, (2010) os sistemas hidropônicos sob condições controladas são uma forma adequada de avaliação de progênies resistentes e tolerantes aos elementos minerais, por proporcionarem vantagens como o pronto acesso ao sistema radicular e a possibilidade de monitoramento e controle do pH e das concentrações de alumínio e de outros íons importantes à expressão das reações de sensibilidade ou não.

A utilização de plantas modelo vem ocorrendo em investigações que associam a genética e a fisiologia para elucidar mecanismos de detoxificação e de tolerância ao estresse por Al. Esta prática auxiliará não só o entendimento dos efeitos do Al em plantas agricultáveis, mas também permitirá a conhecer como plantas nativas toleram melhor o Al no solo. Nesse sentido o microtomateiro, *Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom (Solanaceae), uma planta modelo, vem ganhando muito espaço nas investigações científicas para o entendimento de diversos tipos de estresse biótico e abiótico. Vários genótipos mutantes e transgênicos utilizando o Micro-Tom já foram desenvolvidos, possibilitando o entendimento de muitos aspectos fisiológicos. De acordo com Meissner *et al.*, (1997) e Lima *et al.*, (2004) o uso desta

planta é vantajoso, pois o ciclo de vida desde a semeadura à maturação dos frutos é curto, e sendo plantas de pequeno porte requerem pequenos espaços para seu cultivo.

Sendo assim, este trabalho foi construído em três capítulos. No primeiro capítulo investigou-se a hipótese de que o Micro-Tom seria uma planta modelo promissora para a utilização em estudos com alumínio. No segundo capítulo a hipótese investigada foi de que plantas mutantes hormonais cultivados na presença do Al podem demonstrar alterações fisiológicas que revelem as consequências da toxicidade ao metal sob as ações hormonais de auxina e do etileno. E no terceiro capítulo foram testadas as hipóteses de que frutos de plantas transgênicas cultivadas com alumínio e em estágios diferentes de desenvolvimento podem ter alterado a produção de auxina e etileno e que a expressão desses hormônios pode ser realizada de forma sincronizada para promover o desenvolvimento do fruto e da semente.

Os resultados apresentados nesta tese indicam que, o Micro-Tom apresentou-se como um modelo promissor para estudos relacionados à toxicidade do Al. Os hormônios auxina e etileno, sinergicamente, contribuem para o crescimento adequado das raízes e da parte aérea das plantas. O Al afetou mais o crescimento e a produtividade de plantas com comprometimento da percepção de auxina do que aquelas para percepção do etileno. E quando foram utilizadas plantas mutantes e transgênicas cultivadas com Al ocorreu a expressão de auxina e etileno de forma sincronizada, porém antagônica, em diferentes estágios maturação do fruto e além disso o Al favoreceu a expressão desses hormônios por um tempo mais prolongado no desenvolvimento.

Os resultados deste trabalho poderão auxiliar as pesquisas que buscam entender os mecanismos de ação do Al nas plantas e como ocorre a adaptação à condição de estresse, além de sugerir a incorporação de genes ligados ao desenvolvimento em técnicas de melhoramento para que as plantas possam ter um melhor desempenho em solos ácidos.

Referências

- Gupta N., Gaurav S.S., Kumar A. (2013). Molecular basis of aluminium toxicity in plants: a review. *Am J Plant Sci.* 4:21–37.
- Haridasan, M., (1982). Aluminium accumulation by some cerrado native species of central Brazil. *Plant and Soil.* 265-273.
- Hartwig I., Oliveira A. C., Carvalho F. I. F., Bertan I., José Silva J. A. G., Schmidt D. A. M., Valério I. P., Maia L. C., Fonseca D. A. R., Reis C. E. R. (2007). Mecanismos associados à tolerância ao alumínio em plantas. *Semina: Ciências Agrárias.* **28 (2)**: 219-228.
- Konishi, S. (1992). Promotive effects of aluminium on tea plant growth. *Japan Agricultural Research Quarterly.* **26**: 26-26.
- Lima, J. E., Carvalho, F. R., Neto, A. T., Figueira, A., Peres, L. E. P. 2004. Micro-MsK: a tomato genotype with miniature size, short life cycle, and improved in vitro shoot regeneration. *Plant Science.* **167 (4)**: 753–757.
- Liu, Y., Tao, J., Cao, J., Zeng, Y., Li, X., Ma, Ma J., Huang, Z., Jiang M. & Sun, L. (2020). The beneficial effects of aluminum on the plant growth in *Camellia japonica*. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition.* **20**: 1799-1809.
- Meissner, R., Jacobson, Y., Melamed, S., Levyatuv, S., Shalev, G., Ashri, A, Elkind, Y., Levy, A. 1997. A new model system for tomato genetics. *The Plant Journal.* **12 (6)**: 1465–1472.
- Miguel, P. S. B., Gomes, F. T., da Rocha, W. S. D., de Carvalho, C. A., & de Oliveira, A. V. (2010). Efeitos tóxicos do alumínio no crescimento das plantas: mecanismos de tolerância, sintomas, efeitos fisiológicos, bioquímicos e controles genéticos. *CES revista,* **24(1)**: 13-29.

Rahman M., Lee S. H., Ji H. C., Kabir A. H., Jones C. S., Lee K. W. (2018). Importance of mineral nutrition for mitigating aluminum toxicity in plants on acidic soils: current status and opportunities. *International journal of molecular sciences*. **19 (10)**: 3073.

Rahman R., Upadhyaya H. (2021) Aluminium Toxicity and Its Tolerance in Plant: A Review. *J. Plant Biol.* **64**: 101–121.

Capítulo 1: Localização histológica do alumínio e seus efeitos morfofisiológicos em *Solanum lycopersicum* cv. Micro-tom

Resumo: O alumínio (Al) é um dos principais elementos tóxicos existentes no solo, o que prejudica a produção vegetal em todo o mundo. O objetivo deste trabalho foi verificar as respostas fisiológicas e anatômicas de *Solanum lycopersicum* L. (Solanaceae) cv. Micro-Tom ao cultivo com Al, e caracterizar o potencial desta planta como modelo genético para estudo quanto à toxicidade a este metal. Para tanto, plantas Micro-Tom foram germinadas em substrato comercial e posteriormente cultivadas em solução nutritiva contendo 0 (controle), 100, 200 e 300 μM de Al até a frutificação. Avaliaram-se a concentração de nutrientes nos órgãos vegetais, as taxas fotossintéticas, o teor de pigmentos cloroplásticos, o crescimento, a produtividade, a qualidade dos frutos e a localização histológica do Al nos frutos e sementes. Os resultados mostraram que as plantas Micro-Tom apresentaram redução na absorção dos nutrientes Mg, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn e Mo, assim como no crescimento, produtividade e teor relativo de água, principalmente nas concentrações de 200 μM e 300 μM de Al. Houve maior concentração do teor de sólidos solúveis nos frutos das plantas cultivadas em solução nutritiva contendo 300 μM Al, provavelmente devido ao menor teor relativo de água encontrado nas plantas submetidas a esse tratamento. A localização histológica do Al com Morin mostrou que o Al estava presente nos frutos e sementes, principalmente nos vasos do xilema, evidenciando a translocação do Al para a parte aérea da planta. Com base nesses resultados, o Micro-Tom apresentou-se como um modelo promissor para estudos relacionados à toxicidade do Al.

Palavras-chave: Histolocalização de alumínio, metal, nutrição vegetal, Micro-Tom, xilema.

Histological location of aluminum and its morphophysiological effects in *Solanum lycopersicum* cv. Microtom

ABSTRACT: Aluminum (Al) is one of the main toxic elements in the soil, which harms plant production worldwide. The objective of this work was to verify the physiological and anatomical responses of *Solanum lycopersicum* L. (Solanaceae) cv. Micro-Tom to cultivation with Al, and to characterize the potential of this plant as a genetic model for studying the toxicity to this metal. For this purpose, Micro-Tom plants were germinated in commercial substrate and later cultivated in nutrient solution containing 0 (control), 100, 200 and 300 μM of Al until fruiting. The concentration of nutrients in plant organs, photosynthetic rates, content of chloroplastic pigments, growth, productivity, fruit quality and histological location of Al in fruits and seeds were evaluated. The results showed that the Micro-Tom plants presented a reduction in the absorption of nutrients Mg, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn and Mo, as well as in growth, productivity and relative water content, mainly in the concentrations of 200 μM and 300 μM of Al. There was a higher concentration of soluble solids content in the fruits of plants grown in nutrient solution containing 300 μM Al, probably due to the lower relative water content found in plants submitted to this treatment. The histological location of Al with Morin showed that Al was present in the fruits and seeds, mainly in the xylem vessels, evidencing the translocation of Al to the aerial part of the plant. Based on these results, the Micro-Tom presented itself as a promising model for studies related to Al toxicity.

Keywords: Aluminum hystolocation, metal, plant nutrition, Micro-Tom, xylem.

Introdução

O alumínio (Al) é um elemento mineral que apresenta ampla distribuição na crosta terrestre, sendo sua toxidez o principal fator limitante à produtividade vegetal em solos ácidos, os quais abrangem cerca de 40 a 50% das áreas agricultáveis do mundo, particularmente na região tropical e subtropical (Kochian, 1995; Kochian *et al.*, 2015). Os íons Al^{3+} são progressivamente solubilizados conforme o pH do solo se reduz e em quantidades que limitam o crescimento das raízes (Kochian, 1995; Marschener, 1997). Dentre as principais consequências da acidificação do solo estão: alterações na disponibilidade de nutrientes essenciais, substituição de cátions de bases trocáveis como cálcio (Ca^{2+}), magnésio (Mg^{2+}) e potássio (K^+), por Al^{3+} e H^+ e dissolução de complexos minerais contendo Al, manganês e ferro (Rahman, 2018), o que resulta em sintomas de deficiência mineral e severas alterações metabólicas.

Além do efeito de inibição do alongamento da raiz, íons Al^{3+} também podem provocar alterações em outros processos moleculares e fisiológicos, como na duplicação de DNA, na divisão celular, na respiração, no alongamento celular e no metabolismo mineral e hormonal (Kochian, 1995). Têm-se sugerido que o primeiro dano provocado pelo Al se localiza na parede celular, com alteração de suas propriedades, reduzindo o crescimento das células (Klimashevskii e Dedov, 1975). Segundo Kochian (1995), há dificuldades em separar respostas primárias ou iniciais, relacionadas à inibição do crescimento de raízes, de respostas secundárias, que surgem como resultado do dano ao sistema radicular, como a redução da absorção de água e de nutrientes.

Em recente revisão Rahman e Upadhyaya (2021) resumem a fitotoxicidade do Al, quanto ao aspecto anatômico considerando lesão do ápice radicular, nas células meristemáticas na zona de alongação das raízes, deposição de calose e lignina nas células radiculares, lesão da

membrana plasmática, redução de células estomáticas, danos às membranas dos cloroplastos e degradação de clorofilas, espessamento e escurecimento radicular e necrose foliar. Quanto ao aspecto bioquímico e fisiológico os autores citam, a redução na aquisição de água e nutrientes, inibição de transporte intracelular através dos plasmodesmos, peroxidação lipídica, produção de espécies reativas de oxigênio e redução nas taxas fotossintéticas, além da inibição do crescimento da raiz, da germinação, do crescimento da parte aérea e curvamento de folhas jovens.

Várias espécies, genótipos e cultivares de plantas vêm sendo investigados ou servindo de modelos para elucidar os mecanismos de toxidez, sensibilidade e tolerância ao Al. Neste sentido, diversas plantas da família Solanaceae, inclusive importantes espécies empregadas na alimentação humana, foram identificadas como sensíveis ao Al e apresentam de maneira precoce sintomas comprometendo o crescimento radicular, comprometendo a produtividade (He *et al.*, 2019). Portanto, estudos que possam demonstrar os efeitos tóxicos do Al em plantas de significativo interesse econômico, como as da família Solanaceae, e que tem muitos representantes importantes comercialmente, devem ser continuamente produzidos. E assim, estes estudos podem auxiliar também em pesquisas de controle genético da tolerância e sensibilidade ao Al em programas de melhoramento genético.

Neste trabalho foram utilizadas plantas de *Solanum lycopersicum* L. cv. Micro-Tom (Solanaceae), considerada uma planta modelo, e muito investigada em estudos clássicos da fisiologia vegetal para o entendimento de diversos tipos de estresse biótico e abiótico. Genótipos mutantes e transgênicos de Micro-Tom já foram desenvolvidos, possibilitando o entendimento de muitos aspectos fisiológicos, como hormonal, por exemplo. A experimentação com plantas de Micro-Tom é vantajosa, pois seu cultivo pode ser conduzido sob luz fluorescente com alta densidade (Shikata e Ezura, 2016). O seu ciclo de vida desde a

semeadura à maturação dos frutos compreende entre 70 – 90 dias, e por serem plantas de pequeno porte, requerem pequenos espaços para seu cultivo (Meissner *et al.*, 1997; Lima *et al.*, 2004).

O objetivo deste trabalho foi verificar as respostas fisiológicas e anatômicas de *Solanum lycopersicum* L. (Solanaceae) cv. Micro-Tom ao cultivo com Al, e caracterizar o potencial desta planta como modelo genético para estudo quanto à toxicidade a este metal.

Materiais e métodos

Cultivo das plantas

A pesquisa foi desenvolvida no Departamento de Botânica (ICB/UFMG) em Belo Horizonte / MG.

Sementes do cultivar Micro-Tom (*Solanum lycopersicum* L.) foram colocadas para germinar em potes plásticos descontaminados, contendo a mistura de substrato comercial Bioplant e vermiculita média na proporção de 1:1 (V/V) e a germinação das sementes ocorreu em sala de crescimento, sob condições de bancada com estrutura de luz artificial, de condição de luminosidade de aproximadamente $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 12 h e 90% de umidade.

Após 7 dias da germinação, as plântulas com 2 pares de folhas verdadeiras foram individualizadas e transferidas para caixas de acrílico pretas de tamanho de 42,5 cm de comprimento x 10,5 cm de altura x 12,0 cm de largura, e com capacidade para 5 L. As caixas foram preenchidas com solução nutritiva de Watanabe e Osaki (2001) para o cultivo hidropônico, e as plantas permaneceram suspensas em suporte de borracha EVA (Etil Vinil Acetato). Inicialmente as plantas permaneceram por sete dias, com a metade da força iônica desta solução nutritiva, para aclimação. Todo o cultivo hidropônico foi conduzido em sala

de crescimento, nas mesmas condições de luminosidade, fotoperíodo e umidade que foram germinadas.

Após a aclimação, a solução hidropônica inicial foi substituída por solução nutritiva com 100% de força iônica, e mesma composição química inicial exceto pela inclusão do cloreto de alumínio (AlCl_3). Foram definidas 8 plantas para cada tratamento: 0 μM Al (controle), 100 μM Al, 200 μM Al e 300 μM Al. Todas as soluções nutritivas com e sem Al foram trocadas uma vez por semana, para manutenção do aporte de nutrientes, e o pH corrigido para 4,3. Este procedimento se repetiu até o encerramento do cultivo aos 110 dias após a germinação (d.a.g).

Avaliação de elementos químicos

Ao encerramento do cultivo, amostras de raiz, caule, folha, fruto e semente, das plantas que cresceram sob concentrações diferentes de Al, foram secas em estufa à 70°C por 48h, trituradas em moinho (Micro Moinho Tipo Willye, TE-648, Tecnal) e acondicionadas em recipientes herméticos para posterior análise química dos elementos, no Departamento de Química da UFMG.

Para análise dos elementos químicos as amostras foram submetidas à digestão ácida de acordo com o protocolo descrito por Masson *et al.*, (2010), com algumas modificações. Aproximadamente 0,1g de massa seca de raiz, folha, caule, fruto e sementes, de 5 plantas de cada tratamento, escolhidas aleatoriamente, foram pesadas em balança analítica e submetida à digestão com ácido nítrico (HNO_3) por 12h. Em seguida, as amostras foram diluídas em água MiliQ e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e levadas para completa digestão em Microondas (Ethos1) por 1h15min. Após resfriamento, as amostras foram transferidas para tubos falcon de 15 ml e o volume ajustado para 12 ml com água MiliQ. As amostras foram lidas em ICPMS

(plasma–mass spectrometry) model ASX 500. Foram avaliados o conteúdo dos seguintes nutrientes no tecidos analisados: Na, Mg, Al, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, e Mo.

Avaliação da fluorescência da clorofila *a* e eficiência no transporte de elétrons (ETR_{max})

As determinações relativas à emissão de fluorescência da clorofila *a* foram efetuadas à temperatura ambiente, utilizando medidor de fluorescência modulada (MINI – PAM, WALZ). Os valores do rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_V/F_M) foram determinados em folhas intactas, na altura do 5º entrenó, para cada uma das 8 plantas por tratamento, após adaptação ao escuro por 1h (Lemos Filho, 2000).

A performance fotossintética foi determinada empregando níveis crescentes de luz durante cerca de 4 min, em oito estádios de 30s cada. Ao final de cada nível de luz foi aplicado um pulso saturante para determinar os valores de F_V/F_M e ETR_{max} , em fases de antese, frutos verdes e frutos maduros.

Avaliação das trocas gasosas foliares

As medidas de condutância estomática (g_s), da transpiração (E) e da taxa de assimilação do carbono (A) foram realizadas em folhas, em fase de antese, frutos verdes e frutos maduros, com o auxílio do medidor de gases por infravermelho (IRGA) Licor (LI 6400XT) na altura do 5º entrenó de cada uma das 8 plantas por tratamento, sob densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) de $1000 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ fornecida por uma lâmpada de led acoplada.

Parâmetros de crescimento e acúmulo de biomassa

Foram realizadas as medidas para avaliação do crescimento e acúmulo de biomassa aos 110 d.a.g.. O diâmetro do caule na altura do 6º entrenó, o comprimento total da planta, a altura do 3º, 4º e 5º entrenós foram avaliados com o auxílio de um paquímetro digital de 0,150 mm (modelo Eda 7 VS 6”). Foram também avaliados o número de folhas das plantas até a 1º inflorescência no caule principal.

O material vegetal foi separado em parte aérea e radicular para obtenção da massa fresca (g) e seca (g) empregando a balança analítica. A soma da massa fresca (g) e seca (g) das partes configurou a massa fresca (g) e seca (g) total de cada plântula, respectivamente. A massa seca foi avaliada após 70°C de manutenção do material vegetal em estufa de secagem a 48h.

A área foliar específica foi medida considerando a 5º e 6º folhas das plantas. Utilizou-se o Scanner HP Scanjet G4050 para obtenção das imagens e o programa Image J para o cálculo da área foliar. O valor resultante foi levado em consideração para obtenção da área foliar específica, segundo a fórmula: $AFE = AF \text{ (área foliar) (cm}^2\text{)} / MS \text{ (massa seca) (g)}$

Teor de pigmentos cloroplastídicos

Três secções de aproximadamente 1,0 cm de diâmetro da parte mediana da 7º folha de cada uma das 8 plantas por tratamento foram cortadas e imediatamente pesadas em balança analítica de precisão. Cada amostra foi colocada em tubos Eppendorf com 500 µL de dimetilsulfóxido (NEON, São Paulo) e deixada em local escuro à temperatura ambiente por 72h. Foram retirados 250 µL do sobrenadante da solução e aplicados em placa Elisa e submetido à análise em Espectrofotômetro Leitor de Microplacas (ELISA, Thermo Scientific

Multiskan FC), nos comprimentos de onda de 480, 649 e 665 nm. O teor de clorofila *a*, *b*, e carotenóides foi calculado de acordo com as equações propostas por Wellburn (1994).

Conteúdo relativo de água

Ao encerramento do experimento de cultivo, retirou-se a 3ª folha, mais próxima da base do caule, de cada uma das 8 plantas por tratamento, com o pecíolo intacto, e as mesmas foram pesadas imediatamente após a remoção, para obtenção da massa fresca. Em seguida, as folhas foram submersas em água destilada por 24 h e então pesadas para obtenção da massa túrgida (g). As amostras, então, foram colocadas em estufa a 70°C por 48h, para obtenção da massa seca. A partir desses dados foi calculado o conteúdo relativo de água, segundo Barrs (1968), de acordo com a fórmula: $\{(Massa\ fresca - Massa\ Seca) / (Massa\ Túrgida - Massa\ Seca)\} * 100$

Análise da produtividade

Para análise da produtividade as características avaliadas foram: número total de frutos; frequência de frutos verdes e maduros; massa fresca dos frutos (g); diâmetro de frutos (mm); teor de sólidos solúveis (% °Brix).

O diâmetro dos frutos foi medido com paquímetro digital de 0,150 mm (modelo Eda 7 VS 6”) considerando o sentido horizontal de cada fruto, posicionando a inserção do pecíolo voltado para cima.

Para a avaliação do teor de sólidos solúveis foi utilizado o refratômetro digital HANNA modelo HI96801 (0 a 85% de °Brix). As amostras de frutos, sem as sementes, foram processadas em um almofariz com auxílio de um pistilo para a coleta de frações líquidas, que foram colocadas sob o prisma do aparelho.

Para definição da maturação dos frutos, foi utilizado o método de coloração, segundo a classificação para o tomateiro disponível em Rodrigues *et al.*, (2007), com modificações, pois foram adotados os critérios estágio verde (frutos totalmente verdes) e estágio maduro (frutos coloridos ou totalmente vermelhos).

Avaliação anatômica e histoquímica dos frutos de tomate para detecção do Al

Para a histolocalização de Al, foi utilizado o teste com o marcador bioquímico Morin. Amostras de frutos contendo sementes obtidas após o cultivo das plantas em 0 μMol (controle), 100 μMol , 200 μMol e 300 μMol de Al foram fixadas em solução de Karnovsky (2,5% glutaraldeído e 4,5% de formaldeído, em 0,1 mol^{-1} tampão fosfato, em pH 7.2) (Karnovsky, 1965) por 48 h, desidratada em etanol, emblocadas em Paraplast Plus® (Sigma-Aldrich), e seccionadas (14-16 μm) em um micrótomo rotativo (Leica Jung Biocut) (Johansen, 1940). As lâminas foram desparafinizadas em acetato de butila à 40°C e imersas em etanol 95% por 10 min, cobertas com solução de morin (Morin 0,2%, ácido acético 0,5% e etanol 85%). Posteriormente, as lâminas foram lavadas com etanol 95% e montadas em água destilada (Vitorello e Haug, 1997).

A análise das lâminas foi realizada em microscópio de epifluorescência (Leica DM2500 Led, Wetzlar, Alemanha) com um filtro FITC (excitação de 450–490 nm luz). E as lâminas desparafinadas e não submetidas ao Morin foram imersas em etanol 95%, lavadas, montadas com água destilada e analisadas como controles. Reações positivas foram indicadas por fluorescência verde conforme descrito por Vitorello e Haug (1997).

Análise estatística

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado. Os resultados das análises foram tratados estatisticamente utilizando análise de variância por GLM seguido por análise de contraste, considerando diferença significativa de $P \leq 0,05$, de acordo com o programa R (R Core Team, 2015).

Todos as figuras para os dados quantitativos foram elaboradas com o auxílio do programa GraphPad Prism versão 6,01.

Resultados

Avaliação de elementos químicos

A presença do Al comprometeu a concentração dos nutrientes minerais nos diferentes órgãos da planta. Foi encontrada maior concentração de Al nas raízes das plantas submetidas às diferentes concentrações do metal e em relação aos outros órgãos das plantas testadas (Figura 1). A concentração de Al foi maior na parte aérea nas folhas de plantas submetidas ao Al, destacando-se a concentração de 200 μM de Al, e nas sementes submetidas à concentração de 100 μM de Al.

A concentração de sódio (Na) foi elevada nos órgãos das plantas submetidas aos tratamentos com o Al, principalmente na raiz, caule e folha, quando submetidos à concentração de 100 μM de Al. A concentração de magnésio (Mg) apresentou-se mais elevada apenas no caule das plantas submetidas a 100 μM de Al. Todos os tratamentos com o Al induziram uma redução significativa na concentração de Mg na raiz, folha e fruto. Da mesma forma foi encontrado redução significativa na concentração de magnésio (Mg) nas sementes nas plantas cultivadas com 200 e 300 μM de Al. Houve redução significativa na concentração de potássio (K) nas folhas e frutos principalmente quando as plantas foram submetidas às

concentrações de 200 e 300 μ M de Al. Apenas nas sementes de plantas submetidas à 300 μ M de Al foram encontrados valores superiores de K. Houve maior redução da concentração de cálcio (Ca) nas plantas submetidas à 300 μ M de Al, inclusive nas folhas. A concentração de Mn diminuiu nas raízes, folhas, e frutos, principalmente nos tratamentos de 200 e 300 μ M de Al, sendo que as sementes submetidas a 300 μ M de Al apresentaram os menores valores de Mn, quando comparado aos demais tratamentos de Al. A concentração de ferro (Fe) diminuiu significativamente nas raízes de plantas submetidas ao Al. Para os tratamentos de 100 e 300 μ M de Al foram encontradas as maiores reduções de Fe nas folhas e nos frutos. Houve uma redução no acúmulo de Fe apenas nas sementes das plantas submetidas à 200 μ M de Al. As reduções significativas do acúmulo de cobre (Cu) foram encontrados nas folhas de plantas submetidas ao tratamento de 100 μ M de Al e nos frutos das plantas submetidas a todas as concentrações de Al. Nas sementes houve redução significativa na concentração de Cu quando submetidas à 200 e 300 μ M de Al. As plantas que foram submetidas às concentrações de 200 e 300 μ M de Al tiveram as maiores reduções para as concentrações de zinco (Zn) nas raízes, folhas e frutos. Houve o aumento significativo de Zn nas folhas de plantas submetidas à 100 μ M de Al e diminuição da concentração deste elemento nos frutos e sementes de plantas cultivadas a 200 e 300 μ M de Al. Todos os órgãos apresentaram redução da concentração de Mo, principalmente a parte aérea das plantas, destacando as sementes submetidas à 300 μ M de Al. Nas raízes foram encontrados as maiores reduções quando as plantas foram submetidas a 100 e 300 μ M de Al.

Alguns sintomas de deficiência mineral foram observados nas plantas tratadas com o Al em relação ao controle (Figura 2A). Nas plantas tratadas com 100 μ M de Al (Figura 2B) não estão destacados estes sintomas, pois foram pouco aparentes. Porém, nos exemplares submetidos a 200 (Figura 2C) e 300 μ M de Al (Figura 2D) acentuou-se: o retorcimento e

enrugamento das folhas, e a clorose foliar principalmente nas folhas mais velhas, o verde escuro das folhas (Figura 2B, 2C e 2D), a cor púrpura dos caules (Figura 2D), o amarelamento e a necrose das pontas do limbo foliar (Figuras 2C e 2D). E em relação às raízes foi possível observar o escurecimento principalmente nas plantas submetidas à maior concentração de Al, com cor acastanhada (Figura 2D).

Avaliação da fluorescência da clorofila *a* e eficiência no transporte de elétrons (ETR_{max})

É possível observar redução significativa ($P \leq 0,05$) do rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_V/F_M), nas plantas submetidas aos tratamentos de Al na fase de frutos maduros (Figura 3C). Na fase de antese e frutos verdes não houve variação significativa nos valores de F_V/F_M .

A eficiência na taxa de transporte de elétrons (ETR) foi reduzida significativamente ($P \leq 0,05$) nas plantas submetidas ao tratamento com Al, nas fases de antese (Figura 3D) e de frutos maduros (Figura 3F), e com as duas maiores concentrações de Al na fase de frutos verdes (Figura 3E).

Teor de pigmentos cloroplastídicos

Em relação aos pigmentos fotossintetizantes (Figura 4) verificou-se redução significativa quanto ao teor de clorofila *a* nas plantas cultivadas na maior concentração de Al, assim como redução significativa no teor de clorofila *b* nas plantas submetidas a todos os tratamentos com Al. A razão clorofila *a/b* e os teores de carotenóides não foram alterados. A razão carotenóides/clorofilas aumentou progressivamente nas plantas submetidas à maior concentração de Al.

Avaliação das trocas gasosas foliares

Em plantas submetidas aos tratamentos contendo Al em fase de antese (Figura 5A e 5D) não foram observadas alterações significativas para os parâmetros g_s e E . Enquanto que, em fase de frutos verdes (Figuras 5B e 5E) e maduros (Figuras 5C e 5F) os valores para estes parâmetros foram significativamente menores para g_s e E , respectivamente.

Quanto à taxa de assimilação de carbono interno apenas nas plantas submetidas a 200 μM de Al, na fase de antese (Figura 5H), houve aumento significativo. E em fases de frutos verdes (Figura 5H) e maduros (Figura 5I) houve queda significativa desses valores, assemelhando-se aos parâmetros de g_s e E já destacados para essas fases.

Conteúdo Relativo de Água (CRA)

A Figura 6 apresenta a relação existente entre o conteúdo relativo de água (CRA) e os tratamentos contendo Al na solução nutritiva. Foi observado uma redução significativa no CRA de plantas submetidas às diferentes concentrações de Al.

Parâmetros de crescimento e acúmulo de biomassa

As plantas tratadas com Al tiveram redução significativa do diâmetro do caule na altura do 6º entrenó, no comprimento do 3º, 4º e 5º entrenós e no comprimento total das plantas (Figura 7A, B, C, D e E, respectivamente). As plantas submetidas à 300 μM de Al alcançaram um menor crescimento total comparado aos outros tratamentos com Al e em relação ao controle.

Todos os tratamentos de Al induziram também a redução significativa da área foliar específica (AFE) considerando as 5º folhas das plantas (Figura 7F), enquanto que, a análise da AFE das 6º folhas, indicou que não houve alteração nas plantas submetidas ao Al (Figura 7G).

Houve redução significativa da massa fresca e seca das raízes nas plantas tratadas com 200 e 300 μM de Al (Figuras 8A e B), enquanto que em relação à parte aérea observou-se valor menor de massa fresca nas plantas submetidas a todos os tratamentos de Al (Figura 8C) e redução significativa na massa seca de plantas submetidas à 300 μM de Al (Figura 8D).

Análise de produtividade

Houve uma diminuição significativa na produção de frutos em plantas tratadas com 200 e 300 μM de Al. Plantas tratadas com 200 μM de Al produziram cerca de 35% a menos de frutos, enquanto que nas plantas que foram tratadas com 300 μM de Al essa redução foi ainda mais acentuada, chegando a aproximadamente 80% a menos de frutos (Figura 9A).

A frequência de frutos verdes (Figura 9B) no período de encerramento de avaliação das plantas mostrou ser menor em plantas tratadas com 200 e 300 μM de Al, respectivamente, quando comparadas ao tratamento sem Al e com 100 μM de Al. Em contrapartida a esse resultado houve aumento significativo na frequência de frutos maduros (Figura 9C) em plantas submetidas com as maiores concentrações de Al no encerramento do período de avaliação das plantas.

Plantas tratadas com 200 μM de Al tiveram redução de 26% no diâmetro dos frutos, enquanto que plantas tratadas com 300 μM de Al apresentaram a redução de 46% no diâmetro, em relação aos frutos de plantas cultivadas sem Al (Figura 9D). Além disso, todos os tratamentos de Al reduziram significativamente a massa fresca dos frutos, chegando a pesar 49% menos (Figura 9E).

Apesar das reduções no número total de frutos, diâmetro de frutos e massa fresca houve aumento significativo no teor de sólidos solúveis em frutos verdes e maduros de plantas submetidas ao Al. Esse aumento foi progressivo conforme o aumento de Al em solução

nutritiva, sendo que os frutos verdes e maduros de plantas tratadas com 300 μM de Al chegaram a apresentar cerca de 43% a mais de teor de sólidos solúveis em frutos verdes e 40% a mais de teor de sólidos solúveis em frutos maduros, que os frutos de plantas cultivadas sem Al (Figuras 9F e 9G, respectivamente).

Avaliação anatômica e histoquímica dos frutos de tomate

No corte longitudinal do pedúnculo (Pe) conectado ao fruto apresentado na Figura 10A, é possível evidenciar o xilema (Xy) entrando na região do parênquima da columela (Cm). Na Figura 10C a exoderme (Ex) aparece recoberta por cutícula espessa (Cu) e camadas celulares do mesocarpo (Me). E na Figura 10I encontra-se o diagrama da organização anatômica do tecido das sementes, com testa (Te), endosperma (En) e embrião (Em). Observa-se a detecção fraca de Al na testa (Te) e no endosperma (En) nas plantas cultivadas sem Al (Figura 10J).

Destaca-se a reação observada com Morin quando a planta foi submetida à concentração de para o 100 μM de Al, na Figura 10D, evidenciando a autofluorescência da cutícula e a reação levemente positiva para Al nas paredes celulares do pericarpo (exocarpo + mesocarpo), e em (K) a detecção ligeiramente moderada de Al na testa (Te) e na endoderme (En) da semente.

Em plantas tratadas com 200 μM de Al observa-se a reação Al positiva do Morim nas paredes celulares das células do mesocarpo (Me) (Figura 10E), a presença de Al nas paredes do xilema (Xy) nos feixes vasculares que estão imersos no mesocarpo (Me) (Figura 10F) e a reação positiva para Al no xilema (Xy) e no núcleo das células do parênquima da região da placenta (Pl) ligadas à semente (S) (Figura 10H). A Figura 10 L evidencia a detecção forte de Al no tegumento (Te), endosperma (En) e embrião.

Para plantas de Micro-Tom tratadas com 300 μM de Al destaca-se a reação de Morin positiva para Al, nas células do xilema (Xy) do pedúnculo (Pe) e nos núcleos (Nu) das células parenquimáticas adjacentes (Figura 10B) e a marcação intensa de Al no xilema (Xy) e no núcleo (Nu) das células do parênquima na região da placenta (Pl) (Figura 10G).

Discussão

Nas plantas de Micro-Tom testadas neste trabalho foi possível constatar a presença do Al em todos os órgãos das plantas, inclusive no fruto e na semente. Resultados semelhantes foram encontrados para trigo (Scott *et al.*, 1992) e arroz (Macêdo e Jan, 2008), por exemplo.

As folhas de plantas de Micro-Tom chegaram a apresentar 788,1 mg.Kg^{-1} de Al em plantas submetidas a 200 μM de Al, e 646,17 mg.Kg^{-1} de Al em plantas submetidas a 300 μmol de Al. Segundo Foy (1984), plantas com teores maiores de 1.000 mg.kg^{-1} de Al nas folhas são consideradas acumuladoras. Logo, usando essa referência de classificação, pode-se dizer que as plantas de Micro-Tom testadas neste trabalho não acumularam Al nas folhas o suficiente para serem consideradas como plantas acumuladoras.

Logo, a presença do Al na parte aérea dessas plantas, mesmo que em concentrações menores quando comparados com as raízes, evidenciou a mobilidade deste íon tóxico entre os órgãos, demonstrando que as raízes das plantas de Micro-Tom tiveram comprometida a função de barrar a entrada ou de reter o Al em suas superfícies. O que permitiu que este elemento fosse transportado para a parte aérea, demonstrando o contrário do que é relatado para plantas tolerantes ao Al, como descrito por Foy *et al.*, (1978).

As plantas de Micro-Tom submetidas ao Al, principalmente àquelas crescidas em maiores concentrações de Al, apresentaram nos órgãos a redução na concentração dos seguintes elementos minerais: Mg, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn e Mo. Os resultados reafirmam aqueles

achados por Simon *et al.*, (1994), que investigaram *Lycopersicum esculentum* em solução nutritiva contendo 0, 10, 25 e 50 μM de Al e verificaram também a redução do conteúdo de Ca, K, Mg, Mn, Fe e Zn nas raízes, caules e folhas. He *et al.*, (2019) relataram em revisão, a ocorrência de deficiência mineral em consequência à toxicidade imposta pelo Al também já foi encontrado em diversos genótipos de *Solanum tuberosum*.

Neste trabalho as reduções de nutrientes nos órgãos das plantas podem ter ocorrido pela presença do Al, que por sua vez pode estar indisponibilizando alguns desses nutrientes em solução, mesmo tendo sido realizado o controle do pH no cultivo. E pode ter ocorrido também a competição do Al com alguns elementos pelos sítios de absorção celular. A exemplo disto é a competição entre o Al com o Ca e Mg pelos mesmos sítios de absorção nos canais de membrana, como já relatado por Matsumoto (2000). E provavelmente, por este motivo que plantas cultivadas com Al podem apresentar os sintomas relacionados à deficiência de Ca e Mg.

No presente trabalho foram observados alguns sintomas visuais da deficiência de K, Zn e Cu (retorcimento e enrugamento das folhas), Mg, Fe, Mn e Mo (clorose foliar principalmente nas folhas mais velhas), e outros sintomas como redução do diâmetro do caule, pode ser relacionado à deficiência de K e Zn. E isto foi também com as avaliações nas medidas de crescimento. A deficiência de Ca pôde ser observada também na demonstração da cor acastanhada e escura das raízes nas plantas submetidas à maior concentração de Al. e apesar de não ter sido avaliado a concentração de fósforo (P) nas folhas, sugere-se a presença de sintomas de deficiência relacionada a este elemento, como o verde escuro das folhas, a cor vermelho púrpura dos caules, o amarelamento e a necrose das pontas do limbo foliar.

Singh *et al.* (2017), em sua revisão, explicitam a ligação do Al aos constituintes das paredes celulares de células da raiz, acaba interferindo na função destes constituintes, altera a

extensibilidade da parede celular, e desta forma ocorre a restrição do movimento da água para dentro das células e na aquisição de nutrientes minerais. Logo, como afirma Freitas *et al.* (2006), o Al favorece a deficiência mineral em plantas, por interferir no processo de absorção, translocação e transporte de nutrientes.

Resultados semelhantes foram relatados para outras plantas relacionando o estresse por Al com a deficiência mineral de plantas, principalmente de P, K, Ca, Mg e Mo (Freitas *et al.* 2006; Macêdo e Jan, 2008; Rahman *et al.* 2018). Bhalerao e Prabhu (2013) também destacaram que vários trabalhos já comprovaram a deficiência mineral de macro e micronutrientes em genótipos sensíveis ao Al em trigo, milho e até em pteridófitas.

As menores concentrações encontrados para as plantas de Micro-Tom, relacionados ao Mg, Fe e Mo podem ser somados aos resultados encontrados para a análise de pigmentos e parâmetros de fotossíntese das plantas tratadas com o alumínio, já que esses elementos estão diretamente relacionados à formação de pigmentos (associação do Mg e clorofila), e nas reações da fotossíntese (Fe e Mo). Logo, a redução significativa no teor de clorofilas, principalmente nas plantas submetidas à maior concentração de Al, induziu também a redução nas taxas fotossintéticas. Segundo Shaul (2002), o íon Mg pode estar relacionado ao controle das correntes iônicas através dos cloroplastos e dos vacúolos, e no controle do equilíbrio iônico nas células, além de auxiliar no controle da abertura estomática, sendo assim um macronutriente essencial para o crescimento da planta, maturação do fruto e melhoria da qualidade dos frutos. As reduções na concentração de Mg nas plantas de Micro-Tom tratadas com Al podem ser um importante fator que colaborou para os valores das taxas de condutância estomática, transpiração e assimilação de CO₂. Foi possível verificar redução significativa desses parâmetros, principalmente em plantas cultivadas sob 300 µM de Al, em fase de frutificação. Vários são os estudos, que também relataram esse efeito do Al sob o

aparato fotossintético em plantas de café (Konrad *et al.*, 2005), arroz (Silva *et al.*, 2012) e em várias espécies de solanáceas (He *et al.*, 2019).

As plantas de Micro-Tom submetidas ao Al apresentaram redução no crescimento total, no desenvolvimento das folhas, nos teores de massa seca e fresca das raízes e parte aérea, na produção e no desenvolvimento dos frutos.

Resultados de redução de biomassa se assemelham aos demonstrados por Simon *et al.*, (1994) no cultivo do *Lycopersicum esculentum* principalmente quando submetidos à concentração mais elevada de Al em seu experimento, que correspondeu a 50 μM de Al, demonstrando que o Al em solução nutritiva interferiu na nutrição mineral e reduziu o crescimento destas plantas.

A redução na taxa de crescimento do caule principal observado neste trabalho, pode ser consequência da exposição das plantas ao Al, como já relatado em outros trabalhos. Segundo Gupta *et al.* (2013), a redução do crescimento da parte aérea como consequência da toxicidade por Al pode ser agravada pela falta de água e nutrientes minerais, induzidos pelo tempo de exposição ao metal e também pela sua concentração na solução, além das deformações morfológicas das plantas afetando consequentemente funções metabólicas e fisiológicas, como a manutenção da atividade fotossintética, o que contribuiria diretamente para o agravamento da condição do estresse.

Segundo Bhalerao e Prabhu, 2013, danos à área foliar, como necrose e enrolamento do limbo, como os que foram relatados aqui para plantas submetidas ao tratamento com Al, são comuns em plantas submetidas ao estresse por este metal e provocam redução da área foliar e da fotossíntese. Resultados semelhantes de redução do diâmetro do caule e da área foliar também já foram relatados por Vasconcelos *et al.* (2020), quando investigados os sintomas de

toxidez de Al em feijão (*Phaseolus vulgaris*) e por Silva *et al.* (2013), quando avaliando cultivares sensível e tolerante em arroz (*Oryza sativa* L.).

Os resultados encontrados para o conteúdo relativo de água (CRA), significativamente menores em folhas de plantas tratadas com Al sugerem a ocorrência de deficiência hídrica destas plantas, talvez imposta pela limitação da absorção de água em consequência dos danos ao sistema radicular. Neste trabalho foi possível observar o escurecimento das raízes indicando possível necrose de tecido radicular, principalmente nas plantas crescidas com 300 μM de Al, o que estaria comprometendo a absorção de água e nutrientes por estas plantas. Além disso, os dados encontrados para o CRA certamente colaboraram para a elevação significativa dos sólidos solúveis em frutos de Micro-Tom cultivados em 300 μM de Al. Surapu *et al.* (2014), também observaram redução do CRA principalmente do cultivar sensível de *Lycopersicon esculentum*, quando cultivada em solução nutritiva com 500 μM de Al.

Em relação ao teste histoquímico com a solução de Morin, em células e tecidos de plantas de Micro-Tom, confirmou a eficiência do reagente na detecção do Al mesmo em baixíssimas concentrações, como já evidenciado por Havas (1986). O Morin também foi eficiente para detecção do alumínio no simplasto e no apoplasto, como também evidenciado por Vitorello e Haug (1997) e Arriola *et al.* (2020). Além disso, o Al pôde ser encontrado ligado às ultraestruturas da célula como o núcleo, às paredes celulares de tecidos de preenchimento e vascular. Neste trabalho, assim como foi possível detectar a presença do Al em todo o corpo das plantas de Micro-Tom tratadas com este metal, através das análises químicas, pode-se observar também através da utilização da solução de Morim, o transporte de Al via xilema e a presença desse metal nas sementes.

Muitos trabalhos mencionam a presença do Al ligados a estruturas e tecidos celulares da região radicular, por ser o alvo primário da ligação do Al aos componentes carregados negativamente na parede celular. De acordo com Hartwig *et al.* (2007), as altas concentrações de Al em solução podem causar severas alterações citológicas, impedindo assim o crescimento do sistema radicular e reduzindo de forma drástica a produtividade do vegetal. Bhalerao e Prabhu (2013) ressaltam que o Al no apoplasto tem muita afinidade pelos grupos carboxílicos das pectinas das paredes celulares. E esta ligação pode afetar a função das paredes e reduzir assim a extensibilidade das células da raiz e o alongamento desse órgão. Além disso, o Al pode se ligar à estrutura da membrana plasmática alterando a absorção de íons como o Ca, Mg e K, entre outros. Como reportado por Panda e Matsumoto (2007), o Al já dentro da célula pode associar-se, por exemplo, a microtúbulos de actina do citoesqueleto alterando assim sua conformação, e contribuindo para inibição dos processos de divisão celular, diferenciação e biossíntese de parede celular, culminando assim na inibição do crescimento radicular. Adicionalmente, o Al pode acumular em organelas como plastídeos, mitocôndrias, vacúolos, complexo de Golgi e retículo endoplasmático alterando sua forma e a função, e ainda provocar o surgimento da calose nos plasmodesmos interrompendo a comunicação intercelular. Segundo Gupta *et al.* (2013), o Al pode interagir com o núcleo celular, alterando a composição do DNA e a estrutura da cromatina.

Os resultados apresentados aqui, contribuem para caracterizar o modelo genético do Micro-Tom quanto aos estudos de toxicidade de Al, em relação a investigação dos aspectos fisiológicos e anatômicos, visando maior entendimento dos efeitos do Al em órgãos, tecidos e estruturas celulares. Este tipo de investigação poderá auxiliar nas pesquisas básicas e contribuir na elucidação dos mecanismos de tolerância e de sensibilidade ao Al, de outras plantas, inclusive de interesse econômico. E poderá indicar estratégias de melhoramento

genético, com a identificação de genes para a maior tolerância ao Al, contribuindo para o aumento da produção em solos ácidos, assim como já descrito por Ryan *et al.* (2011).

Conclusão

Os resultados aqui apresentados demonstraram que o Al alterou o balanço nutricional afetando a absorção e acúmulo de nutrientes, foi translocado e encontrado por toda a planta, inclusive nos frutos e sementes. Todos os parâmetros fisiológicos e morfológicos avaliados evidenciaram redução da performance de crescimento e produtividade, principalmente quando as plantas de Micro-Tom foram submetidas às concentrações de 200 e 300 μM de Al. Portanto, é possível afirmar que as plantas de Micro-Tom podem ser identificadas como um modelo de planta promissor para os estudos relacionados à toxicidade do Al, e a partir destes resultados é possível sugerir que outras investigações possam ser continuamente produzidas para auxiliar na compreensão de outros mecanismos envolvidos na regulação do desenvolvimento das plantas quando em contato com o Al.

Referências

- Arriola I. A., Figueiredo M. A., Boaneres D., Franca M. G. C., Isaias R. M. S. (2020) Apoplast-symplast compartmentalization and functional traits of iron and aluminum in promeristematic tissues of nematode induced galls on *Miconia* spp. *Plant Physiol Bioch.* **154**:360–368
- Bhalerao S. A., Prabhu D. V. (2013). Aluminium toxicity in plants-a review. *Journal of Applicable Chemistry.* **2 (3)**: 447–474.
- Barrs H.P. (1968). Determination of water deficits in plant tissues. In Kozlowski (ed.). *Water deficits and plant growth.* Academic Press, New York. 235-368.

- Foy, C. D., Chaney, R. T., White, M. C. (1978). The physiology of metal toxicity in plants. *Annual review of plant physiology*, **29** (1), 511-566.
- Foy C.D. (1984). Physiological effects of hydrogen, aluminum, and manganese toxicity in acid soil. In: Adams, F., Ed., Soil acidity and liming. *American Society of Agronomy*, Madison. 57-98.
- Freitas F. A., Kopp M. M., Sousa R. O., Zimmer P. D., Carvalho F. I. F., Oliveira A. C. (2006). Absorção de P, Mg, Ca e K e tolerância de genótipos de arroz submetidos a estresse por alumínio em sistemas hidropônicos. *Revista Ciência Rural*. **36** (1): 72-79.
- Gupta N., Gaurav S.S., Kumar A. (2013). Molecular basis of aluminium toxicity in plants: a review. *Am J Plant Sci*. **4**:21–37.
- Hartwig I., Oliveira A. C., Carvalho F. I. F., Bertan I., José Silva J. A. G., Schmidt D. A. M., Valério I. P., Maia L. C., Fonseca D. A. R., Reis C. E. R. (2007). Mecanismos associados à tolerância ao alumínio em plantas. *Semina: Ciências Agrárias*. **28** (2): 219-228.
- Havas, M., 1986. A hematoxylin staining technique to locate sites of aluminum binding in aquatic plants and animals. In: *Martin, H.C. (Ed.), Acidic Precipitation. Springer, Dordrecht*. 735–741.
- He H., Li Y., He L. F. (2019). Aluminum toxicity and tolerance in Solanaceae plants. *South African Journal of Botany*. **123**: 23-29.
- Karnovsky, M. J., 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal Cell Biology*. **27**: 137–138.
- Klimashevskii E.L., Dedov V.M. (1975). Localization of the mechanism of growth – inhibiting action of Al^{+3} in elongating cell walls. *Soviet Plant Physiol*. **22**: 1040 – 1046.
- Kochian L.V. (1995). Cellular mechanism of aluminum toxicity and resistance in plants. *Ann. Rev. Plant Physiology Molecular Biology*. **46**: 237-260.

- Kochian L.V., Piñeros M.A., Liu J., Magalhaes J.V. (2015). Plant adaptation to acid soils: The molecular basis for crop aluminum resistance. *Annu. Rev. Plant Biol.* **66**: 571–598.
- Konrad M. L. F., Silva J. A. B. D., Furlani P. R., Machado E. C. (2005). Trocas gasosas e fluorescência da clorofila em seis cultivares de cafeeiro sob estresse de alumínio. *Bragantia*. **64**: 339-347.
- Kopittke P.M. (2016). Role of phytohormones in aluminium rhizotoxicity. *Plant Cell Environ.* **39** (10):2319-28.
- Lemos-Filho J. P. (2000). Fotoinibição em três espécies de cerrado (*Annona crassifolia*, *Eugenia dysenterica* e *Campomanesia adamantium*) na estação seca e na chuvosa. *Revista brasileira de Botânica*. **23** (1): 45 –50.
- Lima, J. E., Carvalho, F. R., Neto, A. T., Figueira, A., Peres, L. E. P. 2004. Micro-MsK: a tomato genotype with miniature size, short life cycle, and improved in vitro shoot regeneration. *Plant Science*. **167** (4): 753– 757.
- Macêdo Cristiane EC, Jan Veronique VS. (2008). Effect of aluminum stress on mineral nutrition in rice cultivars differing in aluminum sensitivity. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. **12**: 363-369.
- Marschner H. (1997). Mineral nutrition of higher plants. Second edition. *Harcourt Brace & Company Publishers*, London, San Diego, New York. 889 pp.
- Masson P., Dalix T., Bussiere S. (2010). Determination of major and trace elements in plant samples by inductively coupled plasma–mass spectrometry. *Communications in soil science and plant analysis*, **41**(3): 231-243.
- Meissner, R., Jacobson, Y., Melamed, S., Levyatuv, S., Shalev, G., Ashri, A., Elkind, Y., Levy, A. (1997). A new model system for tomato genetics. *The Plant Journal*. **12** (6): 1465–1472.

- Matsumoto H. (2000). Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. *International Review of Cytology*. **200**:1–46.
- Panda S. K., Matsumoto H. (2007). Molecular physiology of aluminum toxicity and tolerance in plants. *The botanical review*. **73** (4): 326-347.
- R Core Team. 2015. R: a Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rahman M., Lee S. H., Ji H. C., Kabir A. H., Jones C. S., Lee K. W. (2018). Importance of mineral nutrition for mitigating aluminum toxicity in plants on acidic soils: current status and opportunities. *International journal of molecular sciences*. **19** (10): 3073.
- Rahman R., Upadhyaya H. (2021) Aluminium Toxicity and Its Tolerance in Plant: A Review. *J. Plant Biol.* 64: 101–121.
- Rodrigues L. R., Zambon F. R. A., Muraro D. (2007). Classificação do tomate por atacadistas e produtores Curitiba. *Horticultura Brasileira*. **25**: 521-526.
- Ryan, P. R., Tyerman, S. D., Sasaki, T., Furuichi, T., Yamamoto, Y., Zhang, W. H., Delhaize, E. (2011). The identification of aluminium-resistance genes provides opportunities for enhancing crop production on acid soils. *Journal of Experimental Botany*. **62** (1): 9-20.
- Scott B. J., Fisher J. A., Spohr L. J. (1992). Tolerance of Australian wheat varieties to aluminium toxicity. *Communication Soil Science and Plant Analysis*. **23** (1): 509-526.
- Silva J. D. O. C., Paiva E. A. S., Modolo, L. V., Nascentes C. C., & França M. G. C. (2013). Removal of root apices enables study of direct toxic effects of aluminum on rice (*Oryza sativa* L.) leaf cells. *Environmental and experimental botany*. **95**: 41-49.
- Silva S., Pinto G., Dias M. C., Correia C. M., Moutinho-Pereira J., Pinto-Carnide O., Santos C. (2012). Aluminium long-term stress differently affects photosynthesis in rye genotypes. *Plant Physiology and Biochemistry*. **54**: 105-112.

- Simon L., Smalley T. J., Jones Jr J. B., Lasseigne F. T. (1994). Aluminum toxicity in tomato. Part 1. Growth and mineral nutrition. *Journal of Plant Nutrition*. **17(2-3)**: 293-306.
- Singh S., Tripathi D. K., Singh S., Sharma S., Dubey N. K., Chauhan D. K., Vaculik M. (2017). Toxicity of aluminium on various levels of plant cells and organism: a review. *Environmental and Experimental Botany*, **137**: 177-193.
- Shaul O. (2002). Magnesium transport and function in plants: The tip of the iceberg. *Biometals*. **15 (3)**:307–321.
- Shikata, M.; Ezura, H. Micro-Tom Tomato as an Alternative Plant Model System: Mutant Collection and Efficient Transformation. 2016 - Chapter 5. *in*: Jose R. Botella and Miguel A. Botella (eds.), *Plant Signal Transduction: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 1363, Springer Science+Business Media, New York.
- Surapu V., Ediga A., Meriga B. (2014). Salicylic acid alleviates aluminum toxicity in tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum* Mill.) through activation of antioxidant defense system and proline biosynthesis. *Adv Biosci Biotechnol*. **5**:777–789.
- Vasconcelos, C. V., Costa, A. C., Müller, C., Castoldi, G., Costa, A. M., de Paula Barbosa, K., Da Silva, A. A. (2020). Potential of calcium nitrate to mitigate the aluminum toxicity in *Phaseolus vulgaris*: effects on morphoanatomical traits, mineral nutrition and photosynthesis. *Ecotoxicology*. **29(2)**: 203-216.
- Vitorello V.A., Haug A. (1997). An aluminum-morin fluorescence assay for the visualization and determination of aluminum in cultured cells of *Nicotiana tabacum* L. cv. BY-2. *Plant Sci*. **122**: 35–42.
- Watanabe, T., Osaki, M. (2001). Influence of aluminum and phosphorus on growth and xylem sap composition in *Melastoma malabathricum* L. *Plant and Soil*. **237(1)**, 63-70.

- Wellburn A.R. (1994). The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *Journal of Plant Physiology*. **144**: 307–313.
- Yang Z. B., He C., Ma Y., Herde M., Ding Z. (2017). Jasmonic acid enhances Al-induced root growth inhibition. *Plant physiology*. **173(2)**: 1420-1433.

Anexos

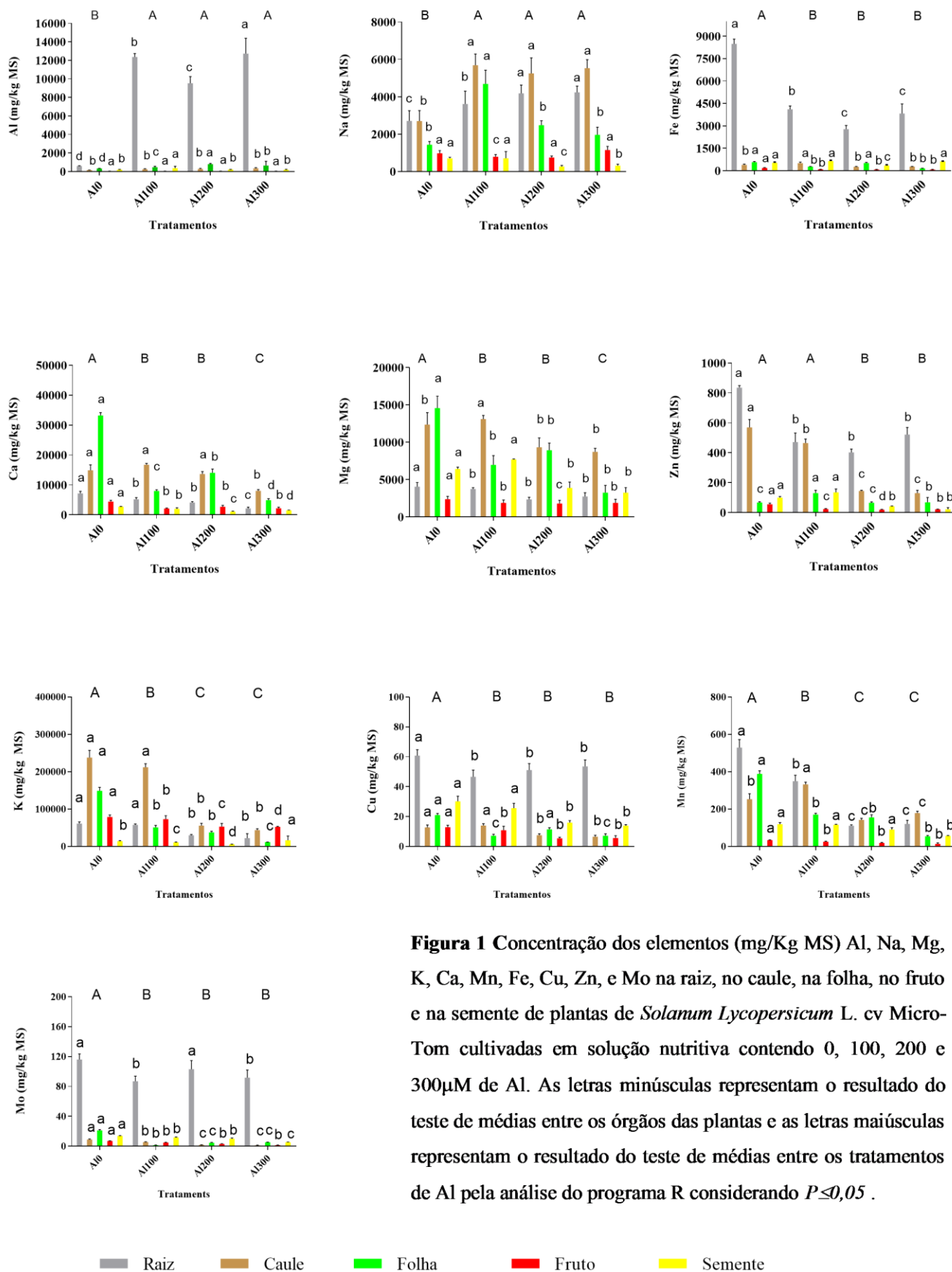


Figura 1 Concentração dos elementos (mg/Kg MS) Al, Na, Mg, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, e Mo na raiz, no caule, na folha, no fruto e na semente de plantas de *Solanum Lycopersicum* L. cv Micro-Tom cultivadas em solução nutritiva contendo 0, 100, 200 e 300µM de Al. As letras minúsculas representam o resultado do teste de médias entre os órgãos das plantas e as letras maiúsculas representam o resultado do teste de médias entre os tratamentos de Al pela análise do programa R considerando $P \leq 0,05$.

Raiz
 Caule
 Folha
 Fruto
 Semente

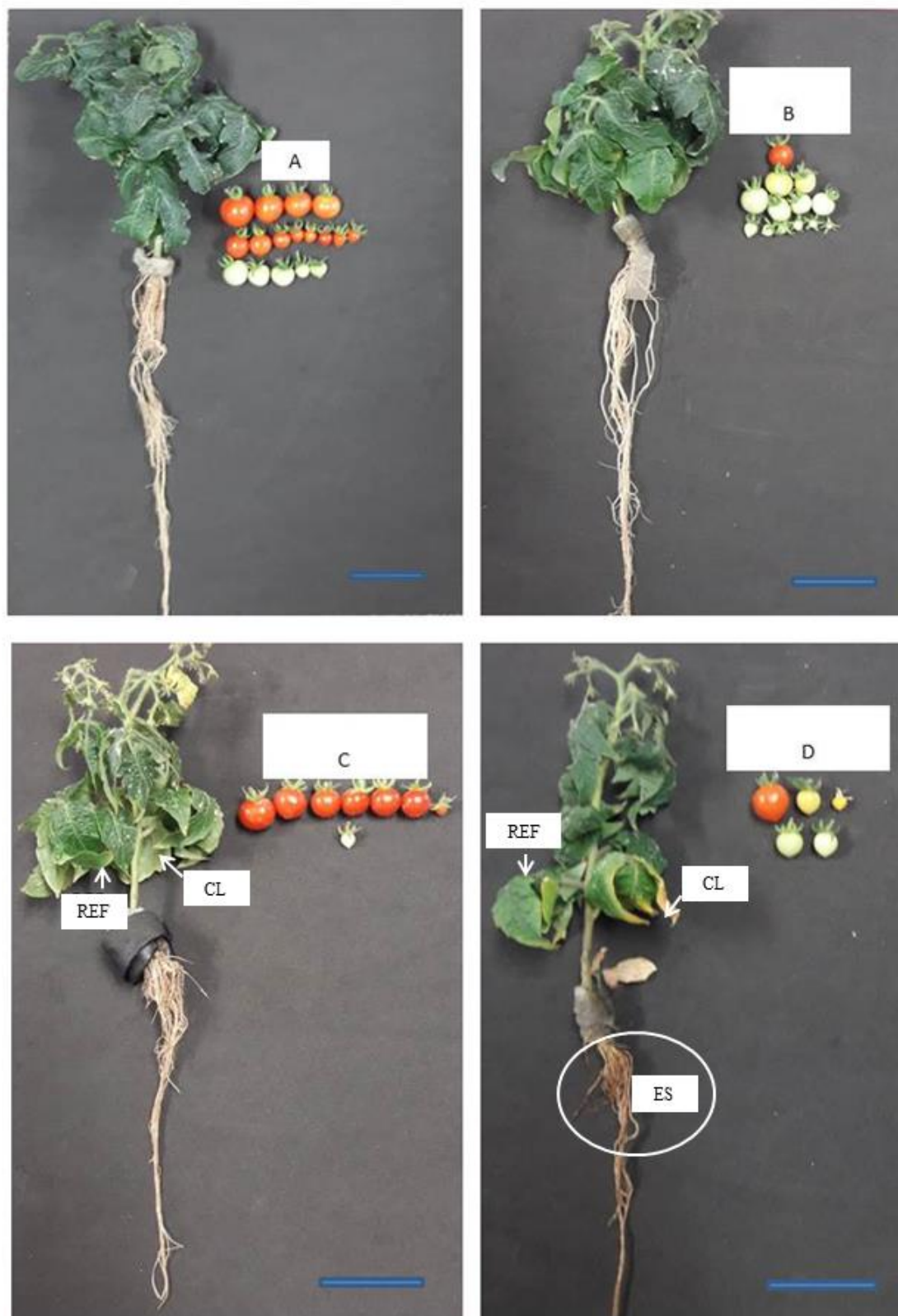


Figura 2: Exemplos de Plantas de de *Solanum lycopersicum* L. cv. Micro-Tom submetidas às concentrações de Al (μM): Controle 0 (A), 100 (B), 200(C), e 300 (D), após 100 dias de germinação, Retorcimento e Enrugamento das Folhas (REF), Clorose Foliar (CL), Escurecimento das Raízes (ES). Barras representam a escala correspondente a 5,0cm.

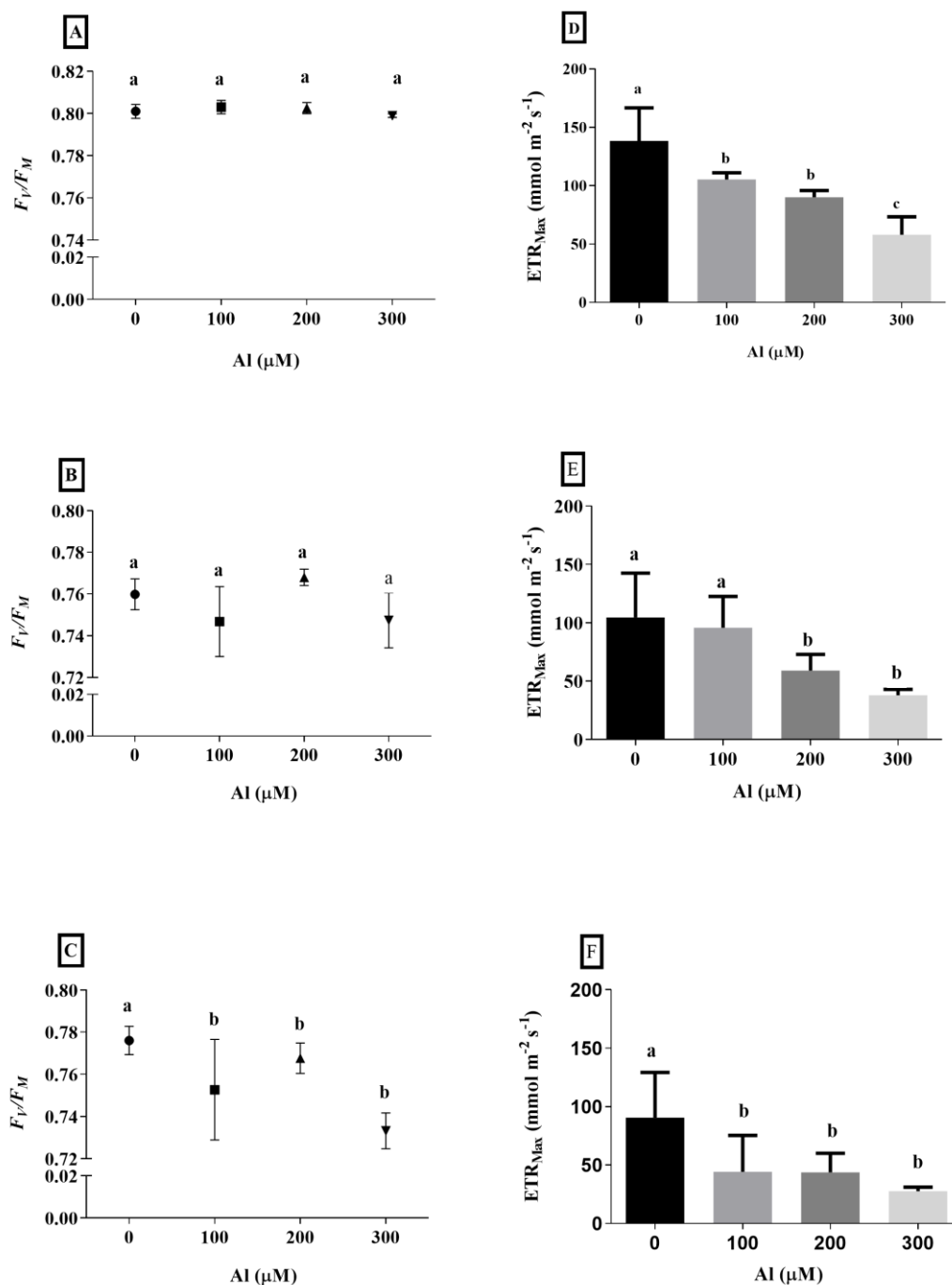


Figura 3: Fluorescência da Clorofila a (F_V/F_M) e Eficiência do Transporte de Elétron (ETR_{max}) em Plantas de *Solanum Lycopersicum* L. Cv. Micro-Tom submetidas às concentrações de 0 (Controle), 100, 200, e 300 μM Al, em fase de antese (A e D), fruto verde (B e E) e fruto maduro (C e F). As letras minúsculas representam o resultado do teste de média entre os tratamentos de Al pela análise do programa R considerando $P \leq 0,05$.

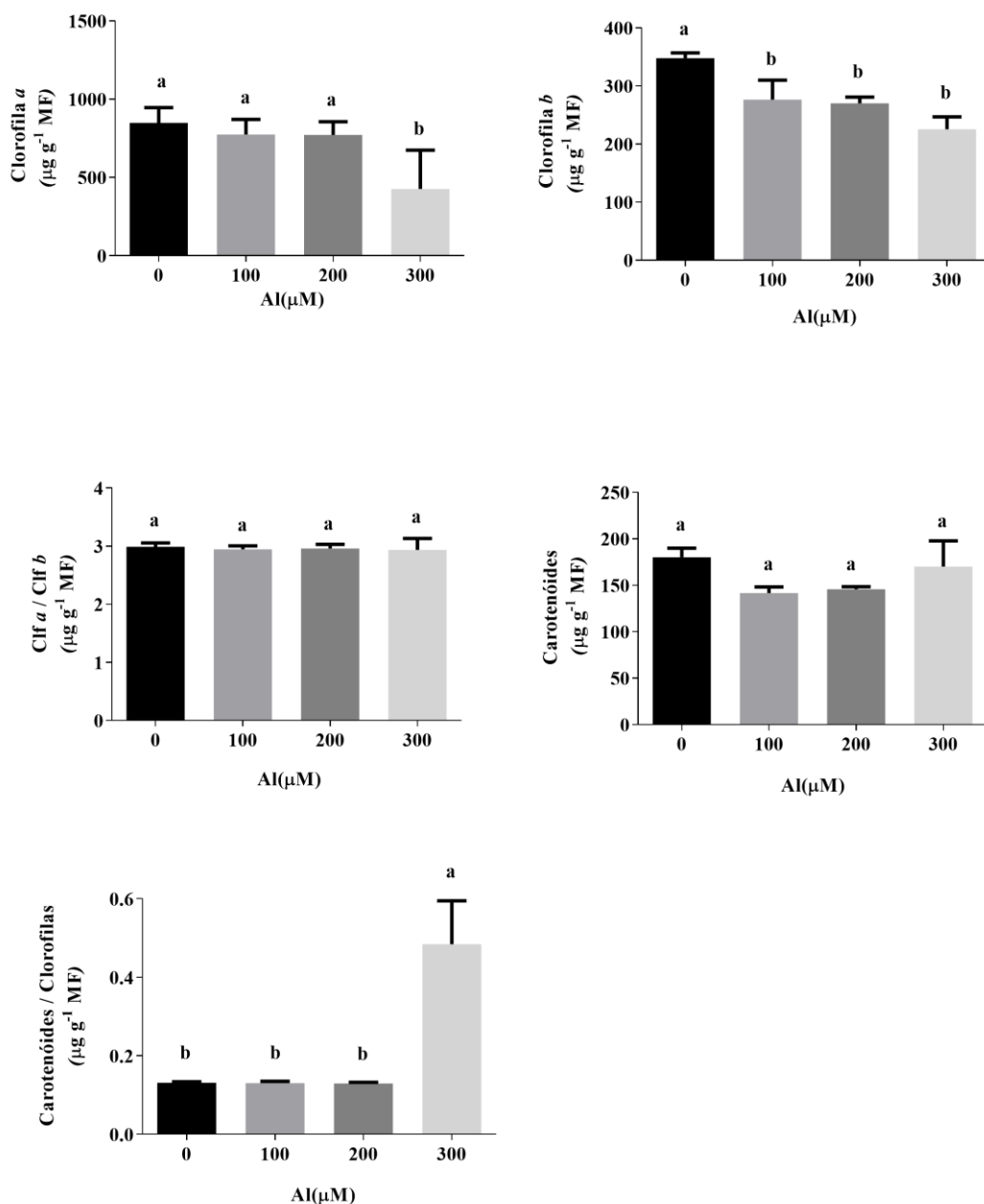


Figura 4. Teor de pigmentos fotossintetizantes, Clorofila a, Clorofila b, Carotenóides, Clorofila a/Clorofila b, e Carotenóides/Clorofilas, em Plantas de *Solanum Lycopersicum* L. cv. Micro-Tom submetidas às concentrações de 0 (Controle), 100, 200, e 300 µM Al. As letras minúsculas representam o resultado do teste de média entre os tratamentos de Al pela análise do programa R considerando $P \leq 0,05$.

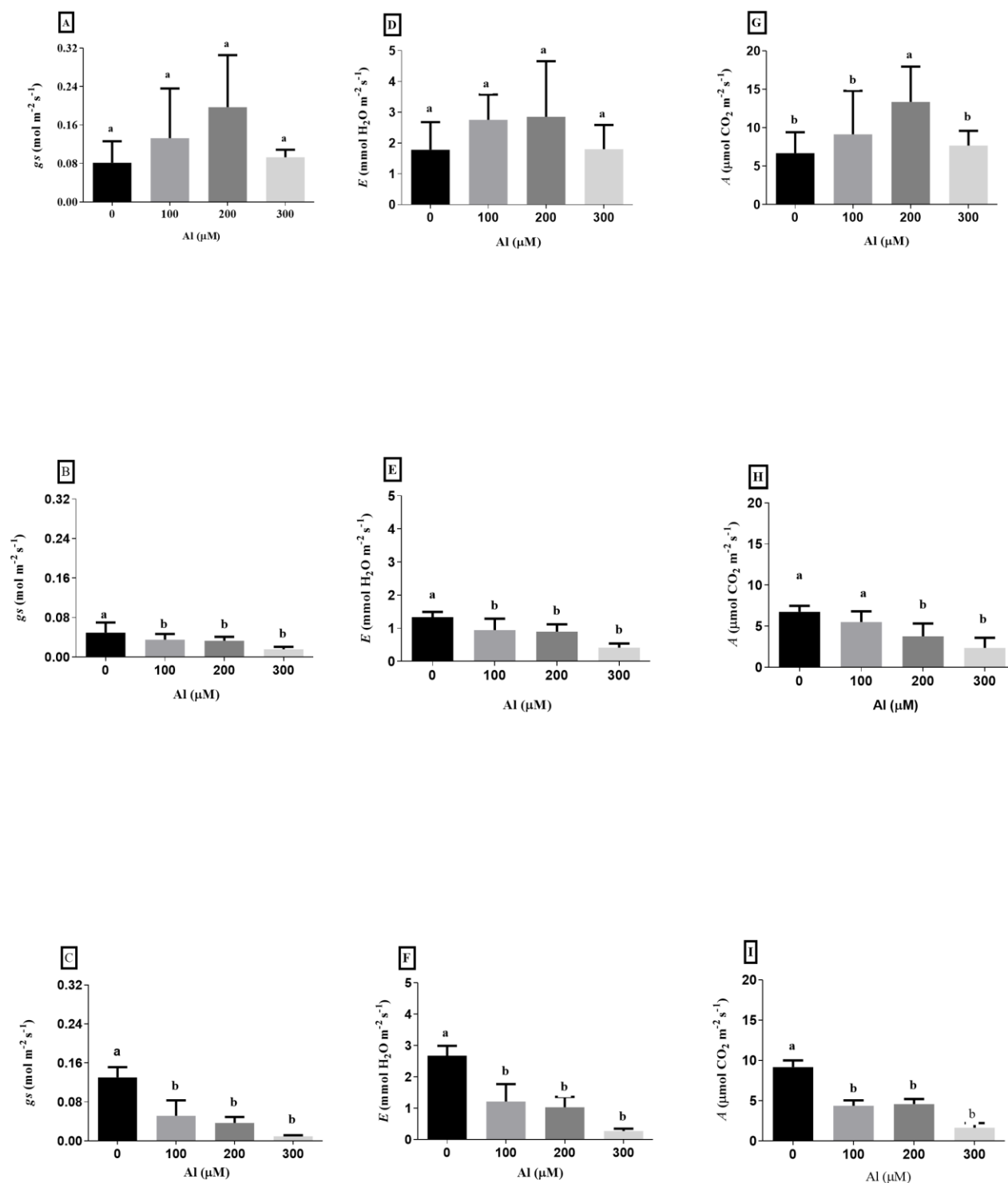


Figura 5: Condutância estomática (g_s), Transpiração (E) e Assimilação de carbono interno (A) em Plantas de *Solanum Lycopersicum* L. cv. Micro-Tom submetidas às concentrações de 0 (Controle), 100, 200, e 300 μM Al, em antese (A, D, G), fase de fruto verde (B, E, H) e fruto maduro (C, F, I). As letras minúsculas representam o resultado da análise estatística entre os tratamentos de Al pela análise do programa R considerando $P \leq 0,05$.

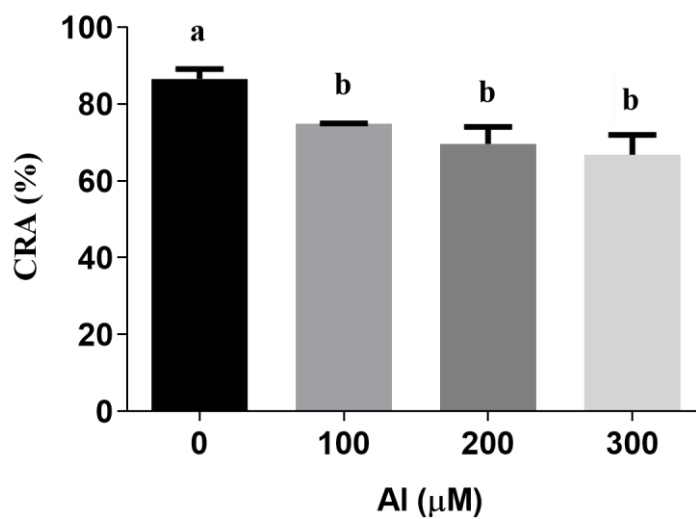


Figura 6. Conteúdo Relativo de Água (CRA) em folhas de *Solanum Lycopersicum* L. cv. Micro-Tom submetidas às concentrações de 0 (Controle), 100, 200, e 300 µM Al. As letras minúsculas representam o resultado do teste de média entre os tratamentos de Al considerando $P \leq 0,05$.

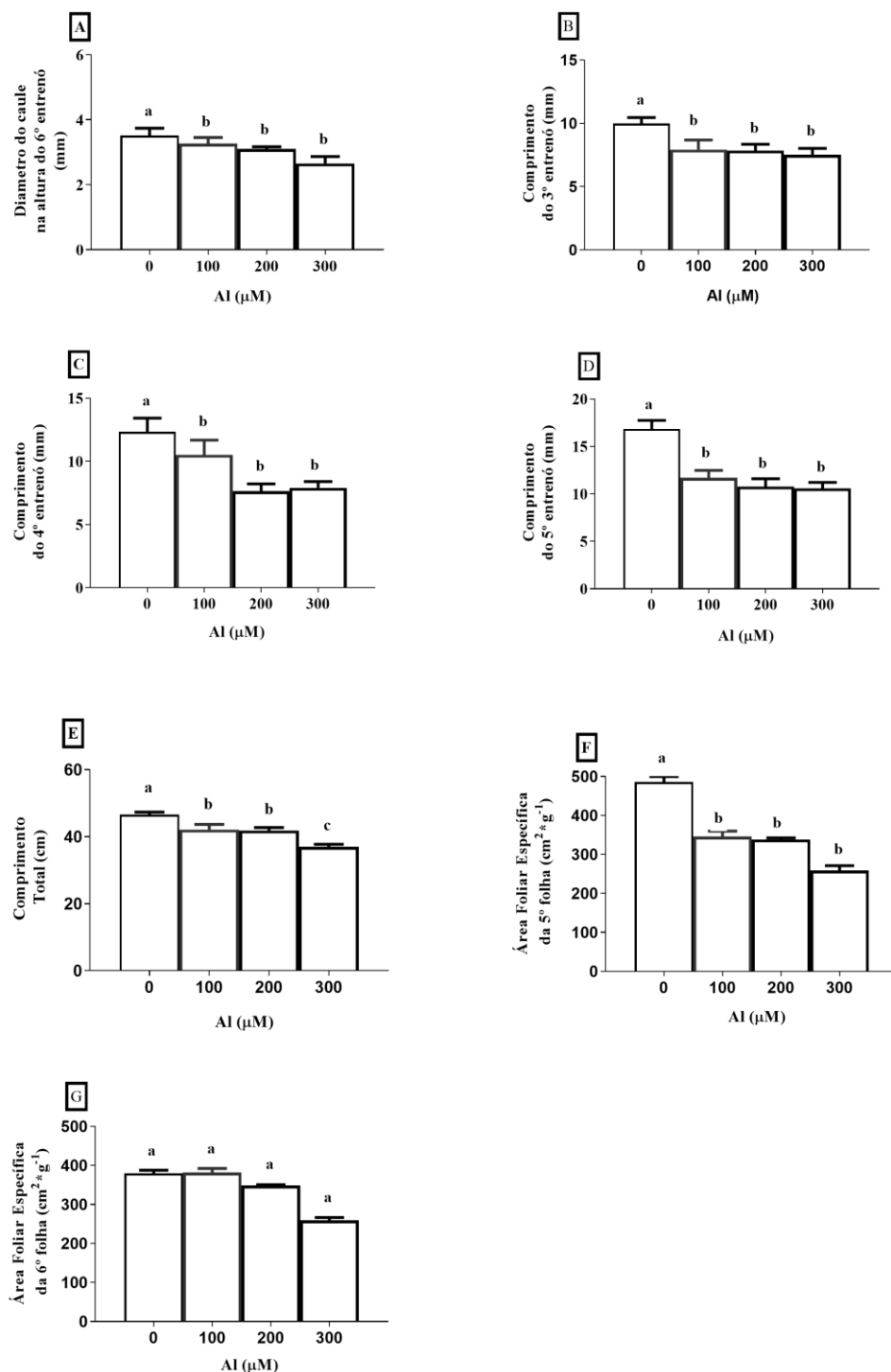


Figura 7: Diâmetro do caule na altura do 6^o entrenó (A), comprimento do 3^o entrenó (B), comprimento do 4^o entrenó (C), comprimento do 5^o entrenó (D), comprimento total (E) área foliar específica da 5^o folha (F) e área foliar específica da 6^o folha (G) de Plantas de *Solanum Lycopersicum* L. cv. Micro-Tom submetidas às concentrações de 0 (Controle), 100, 200, e 300 μM Al. As letras minúsculas representam o resultado do teste de média entre os tratamentos de Al pela análise do programa R considerando $P \leq 0,05$.

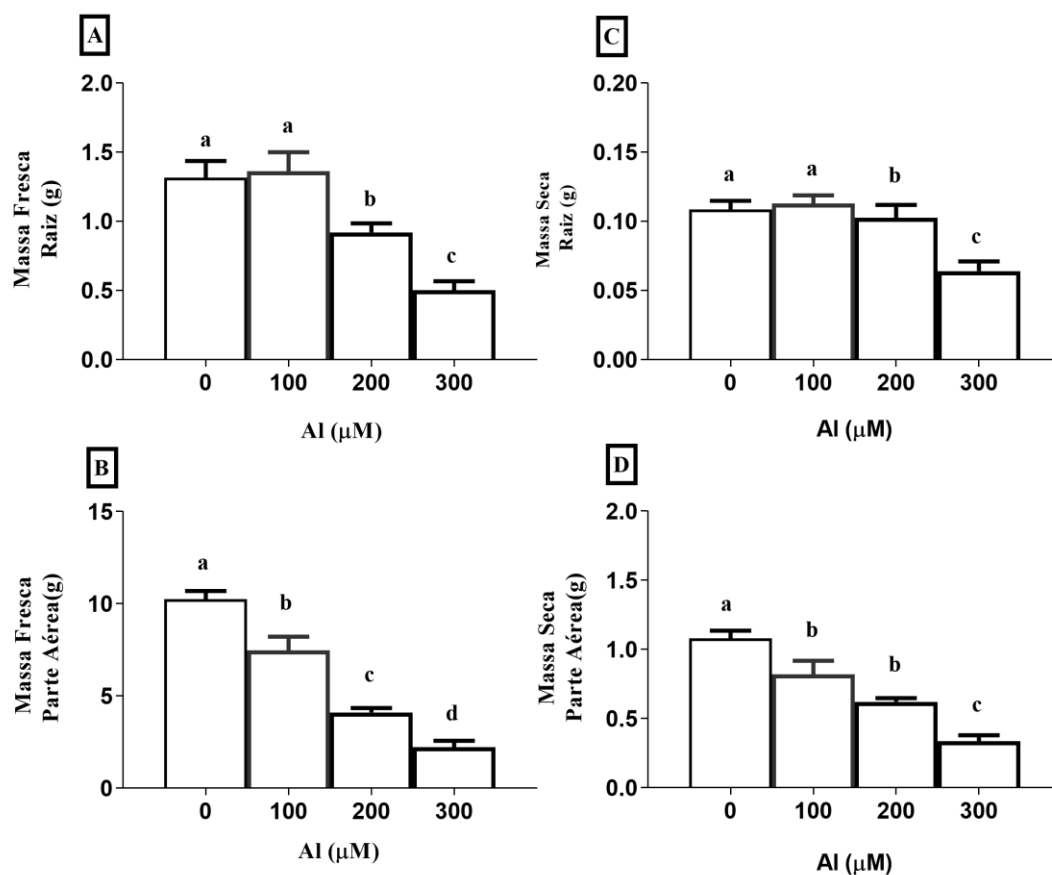


Figura 8: Massa fresca da raiz (A) e da parte aerea (B), e massa seca da raiz (C) e da parte aérea (D) de Plantas de *Solanum Lycopersicum* L. cv. Micro-Tom submetidas às concentrações 0 (Controle), 100, 200, e 300 μM Al. As letras minúsculas representam o resultado do teste de média entre os tratamentos de Al pela análise do programa R considerando $P \leq 0,05$.

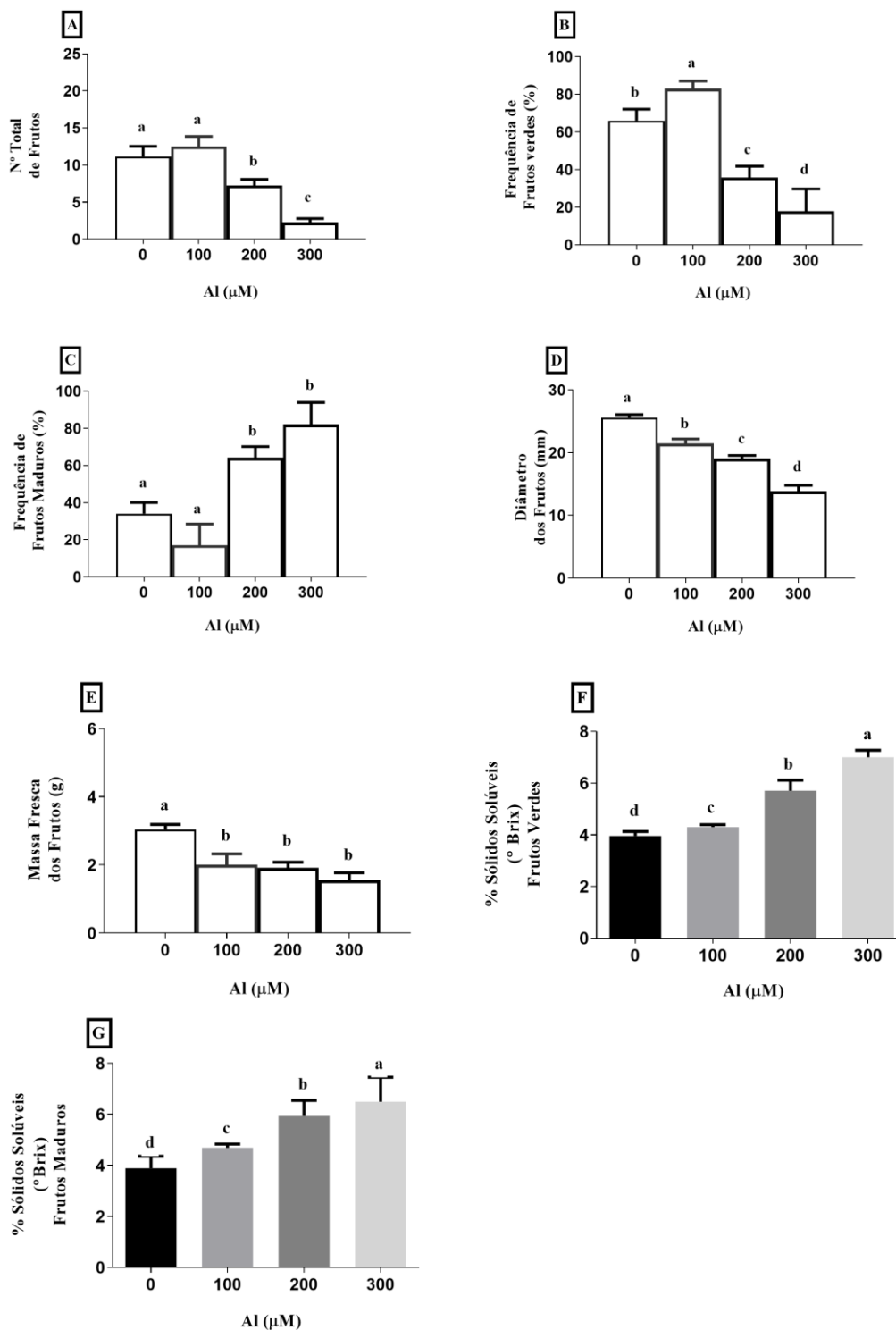


Figura 9: Número total de frutos (A) frequência (%) de frutos verdes (B), frequência (%) de frutos maduros (C), diâmetro de frutos (D), massa fresca dos frutos (E), % Sólidos Solúveis (°Brix) em frutos verdes (F) e % Sólidos solúveis (°Brix) em frutos maduros (G) de Plantas de *Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom submetidas às concentrações de 0 (Controle), 100, 200, e 300 μM Al. As letras minúsculas representam o resultado do teste de média entre os tratamentos de Al pela análise do programa R considerando $P \leq 0,05$.

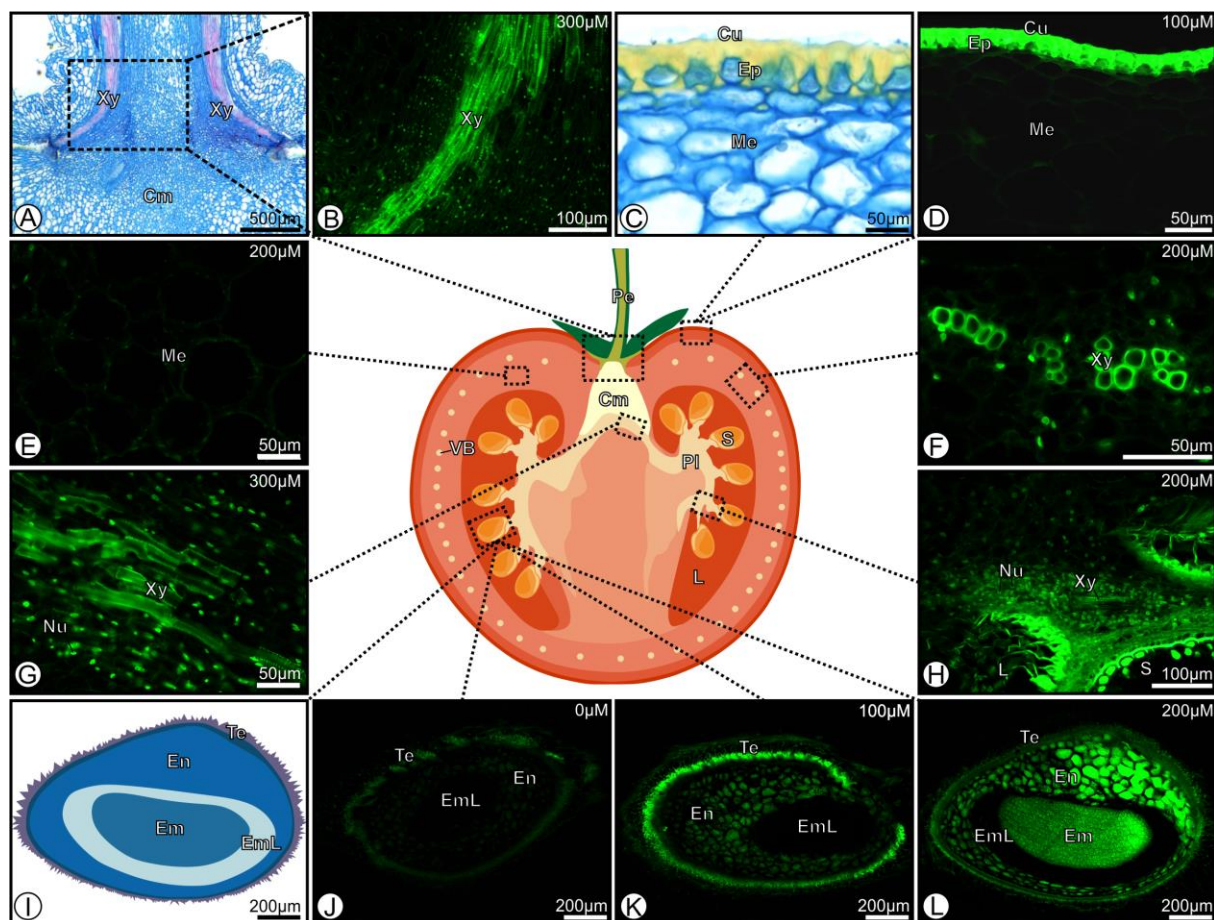


Figura 10: Análises anatômicas e histoquímicas evidenciando a presença de alumínio em frutos e sementes de *Solanum lycopersicum* L. (Solanaceae) cv. Micro-Tom cultivados em diferentes concentrações de alumínio. (A) Corte longitudinal do pedúnculo (Pe) do fruto, evidenciando a região do xilema (Xy) do parênquima da columela (Cm). (B) Detecção de Al nas células do xilema na região Pe e nos núcleos (Nu) das células parenquimáticas adjacentes. (C) Epicarpo (Ex + Me) coberto por uma cutícula espessa (Cu), e as camadas de células do mesocarpo (Me). (D) Autofluorescência da cutícula e reação levemente positiva para Al nas paredes das células Ex e Me. (E) Al reação positiva nas paredes celulares das células Me. (F) Feixes vasculares (VB) imersos no Me evidenciando a presença do Al nas paredes do Xy. (G) Marcação intensa de Al em Xy e Nu de células do parênquima na região da placenta (Pl). (H) Reação positiva para Al no xilema e Nu das células do parênquima da placenta (Pl) conectado com a semente (S). (I) Esquema da organização anatômica das sementes, com testa (Te), endosperma (En) e embrião (Em). (J) Fraca detecção de Al no Te e En a 0 μM . (K) Detecção levemente moderada de Al na Te e En a 100 μM . (L) Forte detecção de Al na Te, En e Em a 200 μM . Abreviaturas: Ex (exocarpo), Em (embrião) EmL (lóculo embrionário); L (lóculo da semente).

Capítulo 2: Efeito fisiológico da toxicidade do alumínio em linhagem selvagem e mutantes desensibilidade para auxina e etileno em *Solanum lycopersicum*, cv Micro-Tom

Resumo: O Al em solos ácidos promove alterações de crescimento, desenvolvimento e a produtividade das culturas. Verificou-se a possibilidade de plantas mutantes hormonais na presença do Al demonstrar alterações fisiológicas de crescimento, desenvolvimento e produtividade, sob ações hormonais da auxina (AIA) e etileno (ETo). Investigou-se parâmetros de biomassa, quantificação de nutrientes e de Al, análise do teor de pigmentos e fluorescência da clorofila *a*, produtividade e qualidade dos frutos, em três linhagens de *Solanum lycopersicum*, cv MicroTom, selvagem (*WT*) e mutantes hormonais com baixa sensibilidade para AIA (*dgt*) e para ETo (*Nr*), em hidroponia, contendo 0 e 300 μ M Al. Em *dgt* na presença do Al houve maior redução de biomassa e da concentração de nutrientes na raiz, menor acúmulo de Al nas raízes e nos frutos comparados a *WT*, redução nos teores de pigmentos cloroplastídicos e nas taxas de assimilação de carbono e transpiração, presença de mais frutos verdes que maduros, maior teor de sólidos solúveis na fase intermediária de desenvolvimento, e textura mais rígida. Em *Nr* houve redução da concentração de nutrientes na raiz e elevação de Mg nos frutos, porém não houve aumento significativo na concentração de Al como ocorrido para *WT* e *dgt* nos frutos. Houve redução do crescimento radicular, elevação do teor de clorofila *b*, menor taxa para eficiência da fluorescência da clorofila *a*, a mesma proporção de frutos verdes e maduros, maior teor de sólidos solúveis nos frutos, e textura dos frutos menos rígida como encontrado em *WT*. Os resultados evidenciaram que os hormônios auxina e etileno, sinergicamente, contribuem para o crescimento adequado das raízes e da parte aérea das plantas. O Al afetou mais o crescimento e a produtividade de plantas com comprometimento da percepção de AIA do que aquelas para percepção do ETo.

Palavras-chaves: Al, Micro-Tom, *diageotropica* e *Never ripe*, auxina e etileno

Physiological effect of aluminum toxicity on wild line and auxin and ethylene sensitivity mutants in *Solanum lycopersicum*, cv MicroTom

Abstract: Al in acid soils promotes changes in growth, development and crop productivity. It was verified the possibility of hormonal mutant plants in the presence of Al to demonstrate physiological changes in growth, development and productivity, under hormonal actions of auxin (AIA) and ethylene (ETo). Biomass parameters, nutrient and Al quantification, analysis of pigment content and chlorophyll a fluorescence, productivity and fruit quality were investigated in three strains of *Solanum lycopersicum*, cv MicroTom, wild (WT) and hormonal mutants with low sensitivity for AIA (dgt) and for ETo (Nr), in hydroponics, containing 0 and 300 μ M Al. In dgt, in the presence of Al, there was a greater reduction in biomass and nutrient concentration in the root, less accumulation of Al in roots and fruits compared to WT, reduction in chloroplast pigment contents and in rates of carbon assimilation and transpiration, presence of more green than ripe fruits, higher content of soluble solids in the intermediate phase of development, and more rigid texture. In Nr there was a reduction in the concentration of nutrients in the root and an increase in Mg in the fruits, but there was no significant increase in the concentration of Al as occurred for WT and dgt in the fruits. There was a reduction in root growth, an increase in chlorophyll b content, a lower rate for chlorophyll a fluorescence efficiency, the same proportion of green and ripe fruits, higher soluble solids content in the fruits, and less rigid fruit texture as found in WT. The results showed that the hormones auxin and ethylene, synergistically, contribute to the proper growth of roots and shoots of plants. Al affected the growth and productivity of plants with impaired AIA perception more than those with ETo perception.

Keywords: Al, Micro-Tom, *diageotropica* and *Never ripe*, auxin and ethylene

Introdução

O Alumínio (Al) é um elemento químico considerado como um fator desencadeador de estresse para muitas espécies vegetais. A toxicidade a este metal irá depender do pH do solo, das espécies iônicas do Al, genótipo e condição de crescimento da planta. Em solos com valores de pH menores que 5,5, as formas iônicas do Al mais tóxicas são Al^{2+} e Al^{3+} . Essas formas químicas do Al, principalmente o Al^{3+} , induzem sintomas de toxicidade no ápice das raízes, parede celular, membrana plasmática, citoesqueleto e núcleo, além de reduzir o crescimento, desenvolvimento e a produtividade vegetal (Bhalerao e Prabhu, 2013; Rahman e Upadhyaya, 2020). As plantas cultivadas com Al apresentam frequentemente sintomas de deficiência mineral associada com fósforo, potássio, cálcio, magnésio e molibdênio, provocando desbalanço nutricional e metabólico (Sivaguru e Horst, 1998; Gupta *et al.*, 2013).

O processo de toxicidade do Al em plantas, assim como a identificação de fatores que podem estar associados à tolerância ao metal, vem ganhando novas abordagens científicas. Nesta perspectiva têm surgido vários estudos que apontam a influência dos hormônios vegetais na determinação de sintomas desencadeados nas plantas em contato com o Al. De acordo com Rajan *et al.*, (2021) os fitohormônios, são considerados a chave para o crescimento e desenvolvimento normal das plantas, bem como sob várias condições de estresses ambientais, incluindo a toxicidade pelo Al. Kopittke (2016) em sua revisão acerca da relação dos hormônios vegetais e a toxicidade de Al relata evidências de várias pesquisas associadas com as alterações na expressão dos hormônios, principalmente relacionadas à auxina (AIA) e etileno (Eto). O autor ainda relata que a área de investigação entre toxicidade do Al e alterações hormonais é muito pouco explorada.

É do conhecimento comum que o crescimento e o desenvolvimento das raízes estão ligados essencialmente à biossíntese, ao transporte e à distribuição de AIA (Blilou *et al.*,

2005). O AIA é um hormônio sintetizado a partir da rota metabólica do chiquimato e do triptofano (Husen, 2021) e atua na dominância apical e no alongamento caulinar. O desenvolvimento da planta é dependente da dinâmica de modulação das vias de síntese, transporte, conjugação e degradação da auxina. Após sintetizada, AIA é transportado em sentido basípeto preferencialmente por transporte polar, lento e ativo gasto de energia e também via plasmodesmos de célula a célula (Cassel *et al.*, 2021). O transporte polar ocorre via sistema de proteínas carreadoras de efluxo (saída) e influxo (entrada) das células, até chegar às raízes modulando o metabolismo e o crescimento. As proteínas carreadoras de influxo no sentido polar são chamadas de PIN (PIN-FORMED) (Blilou *et al.*, 2005) e as proteínas de influxo são conhecidas como AUX (AUXIN RESISTENT) (Bennet *et al.*, 1996). Segundo Cassel *et al.*, (2021), descobertas recentes sugerem que AIA se concentra principalmente nas zonas de alongamento e maturação do caule determinando o alongamento celular e atuando na promoção do crescimento em busca de luz. Além disso, AIA tem papel importante na dominância apical, inibindo o desenvolvimento de gemas axilares e influenciando na arquitetura da planta. Wang *et al.*, (2016), investigando a toxidez de Al no crescimento de alfafa, concluíram que, o Al^{3+} pode interagir com as vias de sinalização de AIA afetando o transporte polar, o acúmulo e a distribuição nas raízes desse hormônio. Shen *et al.*, (2008) relatam que, em raízes de *Arabidopsis thaliana*, o Al bloqueia um carreador de efluxo de AIA, conhecido como *PIN2*, levando ao bloqueio do seu transporte e consequentemente inibição do crescimento das raízes.

Outro hormônio importante associado com o crescimento das raízes é o Eto, hormônio gasoso associado à regulação do desenvolvimento da planta, desde a germinação (Wilson *et al.*, 2014) até a senescência de folhas e flores (Tsuchisaka e Theologis, 2004). Etileno é produzido em todas as partes das plantas, incluindo folhas, caules, raízes, flores, frutos e

tubérculos de plantas jovens ou adultas. Vários fatores externos em resposta a estresses ambientais podem estimular a produção de etileno (Steffens, 2014). Em vegetais superiores a biossíntese do Eto ocorre a partir da metionina e o cobre (Cu^{2+}) é um importante cofator que participa das reações metabólicas para a síntese desse hormônio (Yang e Hoffman, 1984). Como o Eto é gasoso, a difusão ocorre através dos espaços intercelulares e desta forma ele é transportado por toda a planta até o exterior dos tecidos, possibilitando o controle de sua concentração nos diferentes tecidos e órgãos (Gomes, 2011).

Sun *et al.*, (2007), em seu estudo com *Lotus japonicus* verificaram que a inibição da produção de Eto esteve diretamente ligada à inibição do alongamento radicular quando as plantas foram expostas ao Al^{3+} e indicaram que a expressão de um conjunto de genes envolvidos na biossíntese do Eto, conhecidos como ACSs e ACOs são intensificadas pela presença do Al, indicando que estes genes tem um papel importante na inibição do crescimento radicular na presença do metal.

Vários estudos com *Arabidopsis thaliana* já foram realizados investigando o efeito sinérgico entre AIA e Eto para a promoção do crescimento radicular, como o de Stepanova *et al.*, (2007), que sugerem a existência de um modelo de interação entre esses dois hormônios nas raízes de *Arabidopsis*, em que o Eto e a AIA podem regular reciprocamente às biossínteses um do outro, influenciando nas vias de resposta um do outro e/ou agindo independentemente nos mesmos genes-alvo. Sun *et al.* (2010) investigaram duas plantas mutantes insensíveis ao etileno (*etr1-3* e *ein2-1*) e dois mutantes para transportadores polares de auxina (*aux1-7* e *pin2*) de *Arabidopsis thaliana*, e concluíram que o Eto induzido por Al^{3+} pode atuar como um fator que dispara a inibição do alongamento radicular, interrompendo a distribuição e transporte de AIA em raízes. Yang *et al.* (2017) demonstraram que a inibição do crescimento radicular em plantas de *Arabidopsis thaliana* na presença de Al, está associada

com a modulação sinérgica de AIA e citocininas no meristema da parte aérea, e com efeitos antagônicos desses hormônios no meristema radicular. Além disso, o etileno afeta o transporte e a distribuição de AIA nos ápices das raízes. Vários trabalhos mostram que em condição de estresse por Al ocorre o aumento rápido de Eto e de AIA nos ápices das raízes, levando a alteração da extensão da parede celular, a diminuição do transporte de AIA entre a zona de transição e de alongamento, a inibição do afrouxamento das paredes celulares, culminado na inibição do alongamento da raiz (Kopittke, 2016).

Apesar dos avanços na área de genética e biologia molecular, há poucos trabalhos que demonstram a relação entre as consequências da toxidez de Al e a ação dos hormônios vegetais, AIA e ETo, associados com diferentes parâmetros fisiológicos e de produtividade das plantas. Segundo Magalhães *et al.* (2016) os programas de melhoramento genético vegetal, vem sendo bem-sucedidos na identificação de fontes de tolerância ao Al em plantas. Porém, ainda há necessidade de se investir esforços na investigação genética, fisiológica e molecular da tolerância ao Al.

Diante desses aspectos, neste trabalho foi testada a hipótese de que plantas mutantes hormonais cultivados na presença do Al podem demonstrar alterações fisiológicas que revelem as consequências da toxicidade do metal sob as ações da AIA e do Eto. E para testar essa hipótese foi escolhido o microtomateiro, *Solanum lycopersicum L. Syn Lycopersicon esculentum* Mill, cultivar Micro-Tom, uma planta modelo, mutante e muito utilizada para estudos genéticos e de fisiologia, por inclusive já ter sido desenvolvido vários mutantes que apresentam alterações no metabolismo e/ou sensibilidade a vários hormônios (Emmanuel e Levy, 2002).

O objetivo deste trabalho foi então avaliar a ação dos hormônios auxina e etileno, na promoção do crescimento, do desenvolvimento e da produtividade de duas linhagens de

plantas mutantes de *Solanum lycopersicum*, cv MicroTom, com baixa sensibilidade para estes hormônios cultivadas em hidroponia na presença e na ausência de alumínio.

Materiais e métodos

Cultivo das plantas

O cultivo das plantas foi em sala de crescimento no Departamento de Botânica (ICB/UFMG) em Belo Horizonte/MG com duas linhagens de mutantes hormonais (Tabela 1) e a linhagem selvagem do cv Micro-Tom (*Solanum lycopersicum* L.) para cultivo em hidroponia.

Tabela 1: Caracterização das linhagens de mutantes de MicroTom utilizadas.

Linagem mutante	Classe hormonal	Efeito e função gênica	Fenótipo	Referência
MT- <i>dgt diageotropica</i>	Auxina	Baixa sensibilidade para auxina; defectivo para a biossíntese de proteína ciclofilina.	Planta anã; Raízes sem ramificações; Folhas hiponásticas	Oh <i>et al.</i> , (2006)
MT- <i>Nr Never ripe</i>	Etileno	Baixa sensibilidade para etileno; defectivo para o receptor de etileno <i>LeETR3</i> .	Frutos não amadurecem totalmente; Retenção de pétalas e anteras não senescentes;	Wilkinson <i>et al.</i> , (1995)

As sementes das três linhagens do cv. Micro-Tom, selvagem MT-*WT* (Wild Type), MT-*dgt* e MT-*Nr* foram colocadas para germinar em potes plásticos descontaminados, contendo a mistura de substrato comercial Bioplant e vermiculita média na proporção de 1:1 (V/V) e a germinação das sementes ocorreu em sala de crescimento, sob condições de bancada com

estrutura de luz artificial, de condição de luminosidade de aproximadamente $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 12 h e 90% de umidade.

Após 7 dias da germinação, as plântulas com 2 pares de folhas verdadeiras foram individualizadas e transferidas para caixas de acrílico pretas de tamanho de 42,5 cm de comprimento x 10,5 cm de altura x 12,0 cm de largura, e com capacidade para 5 L. As caixas foram preenchidas com solução nutritiva de Watanabe e Osaki (2001) para o cultivo hidropônico, e as plantas permaneceram suspensas em suporte de borracha EVA (Etil Vinil Acetato). Inicialmente as plantas permaneceram por sete dias, com a metade da força iônica desta solução nutritiva, para aclimação. Todo o cultivo hidropônico foi conduzido em sala de crescimento, nas mesmas condições de luminosidade, fotoperíodo e umidade que foram germinadas.

Após a aclimação, a solução hidropônica inicial foi substituída por solução nutritiva com 100% de força iônica, e mesma composição química inicial exceto pela inclusão do cloreto de alumínio (AlCl_3). Estabeleceu-se então dois tratamentos, um com $0 \mu\text{M Al}$ (controle) e outro com $300 \mu\text{M Al}$ e 8 plantas para cada tratamento. As soluções nutritivas com e sem Al foram trocadas uma vez por semana e o pH corrigido para 4,3. Este procedimento se repetiu até o encerramento do período de crescimento aos 110 dias após a germinação (d.a.g).

Avaliação dos elementos químicos minerais

Para a comparação das plantas entre tratamentos de Al foram priorizadas as quantificações dos elementos químicos nas raízes e nos frutos com sementes. Ao final do período de crescimento, amostras de raízes e frutos com sementes, foram secas em estufa à 70°C durante 48h e trituradas em moinho Willey (TE-648, Tecnal) e acondicionadas em recipientes herméticos para posterior análise elementar no Departamento de Química da UFMG.

Para análise dos elementos químicos as amostras foram submetidas à digestão ácida como descrito por Masson *et al.*, (2010), com modificações. Foram obtidas com auxílio de balança analítica, aproximadamente 0,1g de massa seca, de raiz e do fruto com sementes, de 5 plantas de cada tratamento, escolhidas aleatoriamente, para digestão com ácido nítrico (HNO₃) por 12h. Em seguida as amostras foram diluídas em água MiliQ e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e levadas para completa digestão em Microondas (Ethos1) por 1:15h. Após resfriamento, as amostras foram transferidas para tubos falcon de 15 mL e o volume ajustado para 12 mL com água MiliQ. As amostras foram submetidas a espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS model ASX 500) para avaliação dos nutrientes, Al, zinco (Zn), manganês (Mn), boro (Bo), molibdênio (Mo), cobre (Cu), ferro (Fe), sódio (Na), magnésio (Mg), cálcio (Ca) e potássio (K).

Avaliação da fluorescência da clorofila *a*

As determinações relativas à emissão de fluorescência da clorofila *a* foram efetuadas à temperatura ambiente, utilizando medidor de fluorescência modulada (MINI – PAM, WALZ). Os valores para o rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_V/F_M), em fases de antese e frutos maduros, foram determinados em folhas intactas e expandidas, na altura do 5º entrenó, a partir do ápice, para cada uma das 8 plantas por tratamento e após adaptação ao escuro por 1h (Lemos Filho, 2000). A performance fotossintética foi determinada empregando níveis crescentes de luz durante cerca de 4 min, em oito estádios de 30s cada. Ao final de cada nível de luz foi aplicado um pulso saturante para determinar os valores de F_V/F_M .

Avaliação das trocas gasosas foliares

As medidas de condutância estomática (g_s), da transpiração (E) e da taxa de assimilação de CO_2 (A) foram realizadas em folhas das plantas em fases de antese e frutos maduros, com o auxílio do medidor de gases por infravermelho (IRGA) Licor (LI 6400XT) na altura do 5º entrenó, a partir do ápice, de cada uma das 8 plantas por tratamento, sob radiação fotossinteticamente ativa (RFA) de $1000 \text{ mmol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ fornecida por uma lâmpada led acoplada.

Parâmetros de crescimento e acúmulo de biomassa

Foram realizadas observações macroscópicas do aspecto geral das plantas no início do desenvolvimento com 38 d.a.g. e no final com 110 d.a.g. As medidas para avaliação do crescimento e acúmulo de biomassa foram realizadas com 110 d.a.g. O diâmetro do caule na altura do 6º entrenó, o comprimento total da planta, a altura do 3º, 4º e 5º entrenós, de cada uma das 8 plantas por tratamento, foram avaliados com o auxílio de um paquímetro digital de 0,150 mm (modelo Eda 7 VS 6"). Foram também avaliados o número de folhas das plantas até a 1º inflorescência no caule principal.

O material vegetal foi separado em parte aérea e radicular para obtenção da massa fresca e seca empregando a balança analítica. A soma da massa fresca e seca das partes configurou a massa fresca e seca total de cada plântula, respectivamente. A massa seca foi avaliada após 70°C de manutenção do material vegetal em estufa de secagem a 48h.

A área foliar específica foi medida considerando a 5º e 6º folhas de 8 plantas por tratamento. Utilizou-se o Scanner HP Scanjet G4050 para obtenção das imagens e o programa Image J para o cálculo da área foliar. O valor resultante foi levado em consideração para

obtenção da área foliar específica, segundo a fórmula $AFE = AF \text{ (área foliar) (cm}^2\text{)} / MS$ (massa seca) (g).

Teor de pigmentos cloroplastídicos

A análise dos teores de pigmentos cloroplastídicos foi realizada ao encerramento do experimento. Três secções de aproximadamente 1,0 cm da parte mediana da 7ª folha de cada uma das 8 plantas por tratamento foram cortadas e imediatamente pesadas em balança analítica de precisão. Cada amostra foi colocada em tubos Eppendorf com 500 µL de dimetilsulfóxido (DMSO - NEON, São Paulo) e deixada em local escuro à temperatura ambiente por 72h. O sobrenadante formado foi retirado e submetido à análise em espectrofotômetro leitor de microplacas (ELISA, Thermo Scientific Multiskan FC), nos comprimentos de onda de 480, 649 e 665 nm. Foram adicionados 250 µL de sobrenadante em cada local da placa de ELISA. O teor de clorofila *a*, *b*, e carotenóides foi calculado de acordo com as equações propostas por Wellburn (1994).

Análise da produtividade

Todas as coletas para os dados de produtividade ocorreram ao longo de 4 dias ao final do período de crescimento das plantas em intervalo de dois dias, para que fossem coletados frutos no mesmo estágio de maturação. Para definição da maturação dos frutos, foi utilizado o método de coloração, segundo a classificação para o tomateiro (Rodrigues *et al.*, 2007) com modificações, adotando os critérios de estágio verde contendo frutos totalmente verdes e estágio maduro contendo frutos coloridos ou totalmente vermelhos.

Para análise da produtividade as características avaliadas foram: número total de frutos verdes e maduros por planta; massa fresca dos frutos (g); diâmetro de frutos (mm); teor de

sólidos solúveis (% °Brix) e textura dos frutos. O diâmetro dos frutos foi medido com paquímetro digital de 0,150 mm (Eda 7 VS 6”) considerando o sentido horizontal de cada fruto, posicionando a inserção do pecíolo voltado para cima.

Para a avaliação do teor de sólidos solúveis foi utilizado o refratômetro digital (HANNA HI96801) com leituras de 0 a 85% de °Brix. As amostras de frutos com sementes, foram maceradas em almofariz com auxílio de um pistilo. O líquido gerado de cada maceração foi coletado por pipeta de Pasteur, e levado para leitura no refratômetro a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Foram analisados 1 fruto de cada planta por dia de coleta considerando os tratamentos com Al, e realizadas 3 leituras em cada um dos frutos.

A textura dos frutos foi avaliada considerando a determinação das propriedades mecânicas, através da ruptura do epicarpo, segundo o método descrito por Arquelau *et al.*, (2019), usando um texturômetro (Stable Micro Systems, TA.XT2i, Inglaterra), com uma célula de carga de 5 kg, sonda SMS p/2N, distância de 50 mm e velocidade de teste de 1 mm s^{-1} . Foram analisados 3 frutos de cada planta (8 plantas/tratamento). Os tomates foram inicialmente seccionados pela metade, no sentido longitudinal de crescimento, para melhor apoio na mesa de medida do aparelho. E as medidas com a sonda do texturômetro ocorreram no sentido transversal do fruto e os resultados obtidos a partir da curva força (N) versus distância (mm).

Análise estatística

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado. Os resultados foram analisados e as figuras foram construídas com o programa GraphPad Prism 8.01. A análise de variância utilizada foi two-way ANOVA, no arranjo fatorial de 2 concentrações de alumínio x 3 linhagens e para as análises de sólidos solúveis e textura foram considerados o arranjo fatorial de 2 (concentrações de alumínio) x 3 (linhagens) x 4 (tempos de desenvolvimento

das plantas – d.a.g), seguido por múltiplas comparações. Considerou-se para todas as análises o teste de Tukey para a avaliação das interações entre as concentrações de alumínio e as linhagens e diferenças significativas a $P \leq 0,05$.

Resultados

Análise dos elementos químicos em raízes e frutos com semente

As concentrações de quase todos os elementos químicos avaliados variaram em razão da interação entre as linhagens e as concentrações de Al em solução nutritiva. Nas raízes não houve variação das concentrações de Cu e Ca em função da interação. Nos frutos não foram encontradas variações de concentrações dos elementos Mn, Bo, Na, Ca e K, considerando a interação linhagem e concentração de Al (Tabela 2).

A concentração de Al nas linhagens de *WT*, *dgt* e *Nr* no tratamento com Al foi mais elevada nas raízes do que nos frutos (Figuras 1A e B).

A análise química das raízes das linhagens *dgt* e *Nr* revelou aumento da concentração de Al, assim como também ocorreu com a linhagem *WT*. Esse aumento foi mais expressivo para as linhagens *WT* e *Nr* (Figura 1A). Na análise dos frutos (Figura 1B) observou-se aumento da concentração de Al na linhagem *WT* e *Nr*. Esse aumento foi menos expressivo na linhagem *Nr* quando submetido a 300 μM Al. Essa variação na concentração de Al nas raízes e frutos das linhagens *WT*, *dgt* e *Nr*, também foi acompanhada pela variação dos outros elementos químicos analisados nestes órgãos.

Nas raízes das linhagens *WT*, *dgt* e *Nr*, quando submetidas a 300 μM Al, foi encontrada maiores reduções nas concentrações dos elementos Zn, Mn, Bo, Fe e K (Figuras 1C, E e G, 2E e 3E, respectivamente). Dentre esses valores, as reduções mais expressivas nas concentrações desses elementos para todas as linhagens estudadas, foram as representadas

para *WT* e *Nr* (Zn, Mn, Bo, Fe e K) e para *dgt* (Zn, Mn, Fe e K). Destacou-se ainda a redução na concentração de Mo para a linhagem *Nr* na mesma concentração de Al.

Nos frutos das linhagens *WT*, *dgt* e *Nr*, as maiores reduções nas concentrações dos elementos ocorreram em relação ao Bo, Mo, Cu, Fe e K (Figuras 1H, 2B, D, F e 3F, respectivamente) quando as plantas foram submetidas a 300 μ M Al. Nessa mesma concentração de Al a linhagem *WT* apresentou também maior redução na concentração de Zn (Figura 1D).

Na linhagem *dgt* foram encontrados maiores valores para as concentrações de Mn (Figura 1E) e Fe (Figura 2E) nas raízes de plantas não submetidas ao Al, em comparação as outras linhagens. E quando as plantas *dgt* foram submetidas à 300 μ M Al houve expressiva redução nos valores de concentração destes elementos químicos nas raízes.

Na presença de 300 μ M Al quando comparados à linhagem selvagem (*WT*), ocorreram reduções nas concentrações de Mo nos frutos nas plantas das linhagens *dgt* e *Nr* (Figura 2B), nas raízes reduções na concentração de Cu em *dgt* e *Nr* (Figura 2C) e de Mg em *dgt* (Figura 3A). Nos frutos foram encontrados também concentrações mais elevadas de Mg na linhagem *Nr* submetidos à 300 μ M Al, em relação às linhagens *WT* e *dgt* (Figura 3B).

Teor de pigmentos cloroplastídicos

A análise dos pigmentos cloroplastídicos mostrou que houve variação nos teores de clorofila *b* e carotenoides, em função das linhagens e das concentrações de Al (Tabela 3). Para os teores de clorofila *a* não houve variação em função dessa interação.

As plantas das linhagens *dgt* e *Nr* apresentaram maiores teores de clorofila *a* em relação a linhagem *WT* (Figuras 4A e B) quando cultivadas sem Al. Na presença do Al o teor de

clorofila *a* diminuiu para as plantas das três linhagens, porém tanto para *dgt* quanto para *Nr* os resultados ainda permaneceram mais elevados que as plantas da linhagem *WT*. O teor de clorofila *b* (Figura 4B) diminuiu para as plantas dos linhagens *dgt* quando estas foram expostas à 300µM Al. Enquanto que as plantas da linhagem *Nr* apresentaram os maiores teores quando comparados às plantas *dgt* e *WT* para a mesma concentração de Al.

Os teores de carotenóides também foram mais elevados para as plantas das linhagens *dgt* e *Nr* quando as plantas foram cultivadas sem Al em comparação as plantas *WT* na mesma condição (Figura 4C). O cultivo em 300µM Al determinou a redução do teor de carotenóides apenas nas plantas de *dgt* enquanto nas plantas de *Nr* e *WT* não houve alteração nesses valores em relação as plantas das mesmas linhagens cultivadas sem o Al.

Avaliação da fluorescência da clorofila *a*

A concentração de Al juntamente com as linhagens foram fatores que influenciaram nos valores para o rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_M) (Figuras 4D e E e Tabela 4) para a fase de antese, onde apenas as plantas da linhagem *Nr* submetidas ao Al apresentaram o menor valor para F_v/F_M .

Na fase de frutos maduros as plantas da linhagem *Nr* também cultivadas na presença de Al apresentaram maior redução nos valores do F_v/F_M quando comparadas aos demais tratamentos.

Avaliação das trocas gasosas foliares

A análise das trocas gasosas em fase de antese e de frutos maduros variaram em função das linhagens juntamente com os tratamentos sem e com Al (Tabela 4). Na fase da antese as

plantas da linhagem *Nr* e cultivadas com Al apresentaram redução na condutância estomática (g_s) em comparação com as plantas cultivadas sem o Al (Figura 4A). Além disso, as plantas dessa linhagem apresentaram menor valor da g_s quando comparado aos valores encontrados para as plantas das linhagens *WT* e *dgt* submetidas ao Al.

Em relação a assimilação de CO_2 (A) quando as linhagens *dgt* e *Nr* foram cultivadas com Al, os valores encontrados foram menores na fase da antese (Figura 4B) em relação às plantas *WT*. Além disso, os valores da ACO_2 para as plantas *Nr* cultivadas com Al, foram também menores que os valores encontrados para as plantas da mesma linhagem cultivadas sem o Al.

Para as plantas da linhagem *dgt* cultivadas com Al, foi encontrado elevação na taxa de transpiração na fase da antese em relação a mesma linhagem cultivadas sem Al (Figura 4C). Apesar disso, a taxa de transpiração encontrada para *dgt* foi semelhante às encontradas para *WT* e *Nr* na mesma condição de cultivo com Al. Entretanto, não houve variação entre os valores da transpiração nas plantas *WT* e *Nr*, independente dos tratamentos com e sem Al.

Na fase de frutos maduros foi encontrado redução na g_s nas plantas da linhagem *Nr* cultivadas com Al em relação às plantas da mesma linhagem cultivadas sem o Al (Figura 5D). E os maiores valores de g_s foram observados nas plantas *WT*, cultivadas com Al, em relação às plantas de *dgt* e *Nr* também cultivadas com Al.

Para as linhagens *dgt* e *Nr* cultivadas com Al a ACO_2 na fase de frutos maduros foi reduzida em relação à mesma linhagem cultivada sem Al (Figura 5E).

Os resultados encontrados para as taxas de E na fase de frutos maduros mostraram uma tendência semelhante aos valores encontrados para g_s e ACO_2 nesta fase. E a redução nos valores de E também foi observado nas plantas das linhagens *dgt* e *Nr* quando cultivadas com alumínio (Figura 5F).

Parâmetros de crescimento e acúmulo de biomassa

Na tabela 5 observa-se que os parâmetros de crescimento avaliados apresentaram variação resultante da linhagem e da concentração de Al, exceto para os parâmetros comprimento total da planta, diâmetro do caule na altura do 6º entrenó, e do número de folhas até a 1ª inflorescência no caule principal.

A figura 6 apresenta o aspecto das plantas de todas as linhagens avaliadas com 38 d.a.g. Nas plantas cultivadas sem Al as plantas das linhagens *WT* e *Nr* (Figuras 6A e C) apresentaram maior volume de raízes secundárias em desenvolvimento na região de ramificação, em relação às plantas *dgt* (Figura 6E). Além disso, foi possível verificar que o Al induziu menor volume dessas raízes para as plantas de todas as linhagens (Figuras 6B, D e F).

O aspecto geral das plantas de todas as linhagens aos 110 d.a.g. pode ser observado na Figura 7. Observou-se visualmente que as plantas cultivadas sem Al apresentavam regiões de ressecamento no limbo foliar indicando o início da senescência. Quando cultivadas em solução com Al essas áreas ainda foram observadas principalmente nas folhas de *WT* e *Nr*, e, além disso, pontos de clorose também foram observados em todas as linhagens. As plantas da linhagem *Nr* apresentavam pétalas persistentes ainda nesta fase do crescimento, o que caracteriza uma condição natural, segundo a descrição para a linhagem. Na linhagem *dgt* sob cultivo com Al notou-se poucas folhas persistentes no caule.

Os maiores valores encontrados para o crescimento da parte aérea até a 1ª inflorescência no caule principal foi identificado para as plantas de todas as linhagens cultivadas sem Al. Contudo, não houve redução neste parâmetro para as plantas de *WT* e *Nr* cultivadas com Al sendo possível observar apenas nas plantas *dgt* cultivadas com Al (Figura 8A).

A Figura 8B apresenta o crescimento da parte aérea considerando o caule secundário, entre as plantas das linhagens *WT*, *dgt* e *Nr* cultivadas sem Al, e mostra que não houve diferenças

entre as linhagens. Entretanto, quando as plantas foram cultivadas com Al a maior redução para esse parâmetro foi encontrado nas plantas *dgt*, indicando que o crescimento da parte aérea foi menor considerando o caule secundário.

Quanto ao comprimento da raiz (Figura 8C) não foram observadas alterações nas plantas das linhagens *WT* e *dgt* cultivadas com o Al. Enquanto que, para as plantas da linhagem *Nr* houve redução do crescimento radicular na presença do Al. Além disso, no cultivo sem Al as plantas *dgt* apresentaram o menor comprimento radicular que as plantas *WT* e *Nr*. E para todas as linhagens cultivadas com Al houve redução no comprimento total. A maior redução foi observada nas plantas de *dgt* (Figura 8D).

Em relação aos valores apresentados para o comprimento do 3º, 4º e 5º entrenó das plantas das três linhagens houve variação significativa em função da interação linhagens e Al (Tabela 5). Nas plantas da linhagem *dgt* o Al induziu maior comprimento dos 3º, 4º e 5º entrenós em relação as plantas *WT* e *Nr* (Figuras 8E, F, G). Enquanto que em *WT* ocorreu a redução no comprimento do 3º entrenó na presença do Al.

De acordo com o demonstrado na Figura 8H e na Tabela 5 o diâmetro do caule na altura do 6º entrenó não apresentou variação em relação a interação entre linhagens e Al, porém, foi possível observar nas plantas *Nr* maiores valores para este parâmetro quando cultivadas com Al.

O número de folhas até a primeira inflorescência no caule principal foi um parâmetro de crescimento que os tratamentos com e sem Al não induziram variação significativa entre as linhagens *WT*, *dgt* e *Nr* (Figura 8I e Tabela 5).

Em relação a área foliar específica os menores valores foram encontrados nas 5º e 6º folhas das plantas da linhagem *dgt* cultivadas com Al (Figuras 9G e 9H), embora, tenha sido encontrado também para as linhagens *WT* e *Nr* redução da área foliar das 5º e 6º folhas.

O Al induziu variações em todos os parâmetros de biomassa avaliados o que pode ser devido a interação entre linhagens e tratamentos com e sem Al (Tabela 6).

Os maiores valores para a massa fresca da raiz e da parte aérea (Figuras 9A e B) foram encontrados para as linhagens *WT* e *Nr* cultivadas sem Al e também no tratamento com Al. Entretanto, Al induziu em todas as linhagens redução nestes parâmetros, destacando-se a maior redução na linhagem *dgt*.

De forma semelhante, a massa seca da raiz e da parte aérea (Figuras 9C e D) apresentaram maiores valores para as linhagens *WT* e *Nr* cultivadas sem Al, e também quando as plantas foram submetidas ao Al as plantas de todas as linhagens apresentaram redução nestes valores, destacando-se as plantas *dgt* com a maior redução. Sendo assim, as plantas *WT* e *Nr* apresentaram maior acúmulo de biomassa na raiz e na parte aérea quando cultivadas com Al em relação a linhagem *dgt*.

Houve redução na massa seca da 5ª folha de todas as linhagens na presença de Al, enquanto que houve redução da massa seca das 6ª folhas apenas para as plantas das linhagens *WT* e *dgt* (Figuras 9E e F).

Análise de produtividade

Foi observada variação nos parâmetros de produtividade em função das interações entre linhagens e tratamentos com e sem Al, exceto para diâmetro e textura dos frutos (Tabelas 7 e 8).

Aos 110 d.a.g foi determinado o número de frutos verdes e maduros existentes (Figuras 10A e B). Um maior número de frutos verdes foi encontrado nas linhagens *dgt* e *Nr* em relação à linhagem *WT*, quando essas linhagens foram cultivadas sem Al. Por outro lado, Al induziu maior produção de frutos verdes em relação a frutos maduros na linhagem *dgt*, e em

Nr foram encontradas proporções semelhantes de frutos verdes e maduros. Al também induziu a produção de maior número de frutos maduros do que verdes em *WT*.

Em relação à massa fresca dos frutos, foram encontrados maiores valores para plantas *WT* e *Nr* cultivadas sem Al por outro lado, Al induziu redução na massa fresca dos frutos, mas mesmo assim permaneceram mais altos quando comparados com as plantas *dgt* (Figura 10C).

Maiores valores para o diâmetro dos frutos (Figura 10D) foram observados nas plantas *WT* e *Nr* quando o Al estava ausente. E quando as três linhagens foram cultivadas com Al não houve alteração no diâmetro dos frutos.

A análise do teor de sólidos solúveis nos frutos (Figura 10E) mostrou que o Al induziu nas plantas *WT* aos 97 d.a.g e *Nr* aos 95 d.a.g um maior teor de sólidos solúveis e a mesma resposta se repetiu ao longo de três dias de coleta de frutos. Para as plantas *dgt* cultivadas com Al foi observado maior teor de sólidos solúveis para os frutos coletados com 97 e 99 d.a.g. Embora tenha ocorrido variação no teor de sólidos solúveis entre tratamentos com e sem Al, pode-se observar que não houve variação no sólidos solúveis quando se comparou as linhagens dentro de cada tratamento.

A análise da textura dos frutos evidenciou que a variação dessa propriedade mecânica não ocorreu em função da interação entre linhagens e Al (Tabela 8), e que apenas as linhagens contribuíram como uma fonte de variação dos resultados. A avaliação da força máxima para ruptura do epicarpo nos frutos das plantas *WT* mostrou que não houve variação entre tratamentos em nenhum dos momentos de coleta.

Para os frutos das plantas da linhagem *dgt* cultivadas com Al, em todos os momentos de coleta, foi observado valor maior de força máxima, para ruptura do epicarpo, quando comparados aos frutos das plantas cultivadas sem o Al, que necessitaram de força menor para rompimento do epicarpo (Figura 10F). E em comparação com frutos de plantas das linhagens

WT e *Nr* também cultivadas com Al, os frutos da linhagem *dgt* foram os que apresentaram força maior para a ruptura do epicarpo principalmente aos 97 d.a.g e 101 d.a.g.

E para os frutos das plantas da linhagem *Nr* cultivadas com Al, apenas com 97 d.a.g foi observado valor de força máxima maior para ruptura do epicarpo em relação aos frutos das plantas semAl. Nos outros momentos de coleta os resultados para essa avaliação foram semelhantes tanto para os frutos das plantas crescidas sem alumínio quanto para os frutos das plantas submetidas ao Al (Figura 10F).

Discussão

A resposta da raiz acumular mais alumínio corrobora com os achados de diversas pesquisas mostrando que este órgão é o principal alvo da toxicidade do alumínio, como relatado por Bhalerao e Prabhu (2013). Além disso, as plantas de *dgt* demonstraram menor acúmulo de alumínio tanto nas raízes quanto nos frutos. Essa resposta pode estar associada às características das raízes que desenvolvem poucas ramificações por estarem menos sensibilizadas à auxina, como descrito por Zobel (1974) e com isso elas absorveram e concentraram menos alumínio em suas células.

O fato das plantas das linhagens *WT* e *Nr*, terem demonstrado maior acúmulo de alumínio em comparação às plantas da linhagem *dgt* pode estar associado à disponibilidade de auxina e à sensibilidade das linhagens *WT* e *Nr* a este hormônio, contribuindo então para a regulação da absorção do alumínio e distribuição nas células das raízes nestas linhagens, corroborando com o pressuposto por Yang *et al.* (2014).

As reduções nas concentrações dos elementos químicos encontrados para as raízes de *dgt* e *Nr*, e de quase todos os elementos químicos nos frutos de todas as linhagens, em cultivo de 300 μ M Al, também refletem os efeitos tóxicos do alumínio quando em contato com as

raízes dessas plantas, prejudicando a absorção e o transporte desses elementos. Segundo Rahman *et al.* (2018) o alumínio está associado com diversas mudanças no sistema radicular, e acaba interferindo na absorção, transporte e utilização de nutrientes minerais. E de acordo com Miguel *et al.* (2010), a deficiência de nutrientes essenciais ou combinações que afetem a disponibilidade deles provocam distúrbios no metabolismo, evidenciados no decréscimo do teor de proteínas, clorose nas folhas além de outras anormalidades.

As respostas das linhagens *dgt* e *Nr* para a redução de nutrientes minerais podem estar associadas também à baixa sensibilidade aos hormônios auxina e etileno, apresentada por estas linhagens. E o alumínio pode atuar e contribuir para a diminuição da absorção dos elementos químicos essenciais, pois é capaz de interagir com a parede celular e com a membrana plasmática, alterando a permeabilidade da água e dos nutrientes. Essa interação do Al com as paredes celulares podem modificar as propriedades da parede celular, reduzindo a sua plasticidade e elasticidade, devido a modificação da ação de enzimas importantes que conferem essas funções à parede celular, como por exemplo, as extensinas, além de xiloglucanos (Kochian *et al.*, 2015; Matsumoto, 2000). Segundo Gillaspay *et al.* (1993), a auxina tem um papel importante nesse processo de auxiliar a expansão celular e a manutenção da integridade da parede celular, Logo, provavelmente qualquer fator de estresse como, por exemplo, a presença do alumínio nas células, capaz de modificar as propriedades funcionais da parede celular, pode estar associado também com a regulação do hormônio auxina e contribuir para alterar a permeabilidade das membranas celulares à água e aos elementos minerais tidos como nutrientes para as plantas.

De acordo com Muday *et al.*, (2012) a auxina e o etileno participam da regulação do alongamento radicular da raiz primária e formação das raízes laterais desencadeada por várias deficiências de nutrientes. O alongamento da raiz primária é inibido pela ação sinérgica de

auxina e etileno, enquanto a formação de raízes laterais é estimulada pelo acúmulo de auxina, mas bloqueada pelo etileno. No cilindro central da raiz, o etileno promove a regulação positiva dos transportadores de efluxo de auxina *PIN3* e *PIN7*, que são responsáveis pelo transporte de auxinas para a raiz. Isso promove o acúmulo de auxinas no ápice da raiz, e leva à inibição do surgimento das raízes laterais através então da regulação negativa pelo etileno. E então, no ápice radicular, ocorre o aumento da expressão dos transportadores de influxo de auxina *AUX1* e dos transportadores de efluxo de auxina *PIN2*, que irão promover a liberação de auxina resultando na inibição do crescimento radicular.

Interessante notar nos resultados do presente estudo, que as plantas da linhagem *dgt* em cultivo sem alumínio (0 μ M Al) demonstraram maior teor de carotenóides em comparação às outras linhagens, e alto teor de clorofila *a*, assim como as plantas de *Nr*, na mesma condição de cultivo. O que corroborou com o relatado por Zobel, (1973) e (1974) mostrando que as plantas da linhagem *dgt* apresentam como característica natural da linhagem, altos níveis de clorofilas.

Contudo, é importante ressaltar que houve na presença do alumínio redução dos teores de pigmentos cloroplastídicos clorofila *a* (para *WT*, *dgt* e *Nr*), Clorofila *b* (para *WT* e *dgt*), além da redução de carotenóides (para *dgt*) e isso pode estar indicando o efeito que o alumínio causa nos cloroplastos. Segundo Zhan *et al.*, (2018) o alumínio pode causar degradação dos pigmentos nos centros de reações, nos cloroplastos, por causar a o processo de oxidação através da geração de radicais livres, destruindo assim as moléculas dos pigmentos fotossintetizantes.

A diferença encontrada para as linhagens quanto ao teor de pigmentos cloroplastídicos, na presença do alumínio, pode estar associada também com a variação na concentração de elementos químicos absorvidos pelas plantas. A molécula de clorofila, por

exemplo, contém um átomo de magnésio (Mg) no centro de sua estrutura. E alterações na concentração desse elemento químico nas plantas podem alterar o seu teor de clorofilas (Taiz *et al.*, 2017). No presente estudo este efeito foi visualizado nas plantas da linhagem *Nr*, que demonstram aumento na concentração do magnésio nos frutos de plantas cultivadas com o Al, e em paralelo foi possível verificar maior teor de clorofila *b* encontrado nas folhas das plantas dessa linhagem, em comparação com os achados para *WT* e *dgt*.

A redução na concentração de manganês (Mn) nas plantas também pode prejudicar a eficiência da fotossíntese, por danificar os cloroplasto e prejudicar a formação das clorofilas, além de afetar a atividade das enzimas que atuam como cofatores para a realização da fotossíntese (Pan *et al.*, 2018). E neste estudo foi observada para as plantas de todas as linhagens a redução na concentração de Mn nas raízes e nos frutos na presença do alumínio, o que poderia estar contribuindo para a redução da eficiência fotossintética de todas as linhagens nesta condição de cultivo.

Além disso, as plantas de todas as três linhagens apresentaram valores para F_v/F_m semelhantes nas fases de antese e de frutos maduros, na concentração de $0\mu\text{M}$ Al. Porém, em fase de antese e de frutos maduros as plantas de *Nr* apresentaram menor valor para F_v/F_m quando as plantas foram submetidas ao Al em comparação com as outras linhagens. O que indica que o alumínio estaria afetando as taxas fotossintéticas das plantas levando as plantas da linhagem *Nr* a uma condição de fotoinibição. Fato não ocorrido para as outras linhagens mesmo quando cultivadas com o alumínio em fase de antese e de frutos maduros. Segundo Chen *et al.* (2010) a fotoinibição de plantas sob o estresse por alumínio é causada quando a integridade dos cloroplastos e de seus pigmentos cloroplastídicos é afetada.

Os resultados deste trabalho para a condutância estomática e transpiração, além dos teores de pigmentos e eficiência fotossintética na presença do alumínio refletem a maior

possibilidade de estar ocorrendo o processo de estresse hídrico mais severo para as plantas da linhagem *Nr* do que para *WT* e *dgt*. Essa interpretação mostra como a falta de percepção do hormônio etileno em *Nr* poderia estar interferindo na regulação ao estresse imposto pelo alumínio, embora não tenham sido avaliados outros parâmetros para se confirmar essa condição fisiológica de estresse hídrico.

Segundo Klay *et al.* (2018), o etileno desempenha importante função na identificação da ocorrência do estresse causado por um estresse abiótico, e é capaz de modular a expressão de uma variedade de genes, desencadeando mecanismos de tolerância ao estresse, contribuindo assim para que a planta possa se adequar e sobreviver.

De acordo com LeNoble *et al.* (2004), plantas que apresentam a síntese do etileno suprimida ou que tenham baixa sensibilidade ao etileno podem ter acúmulo de ácido abscísico. Há relatos na literatura de que os hormônios ácido abscísico e etileno compartilham a mesma via de sinalização para o estresse hídrico, como demonstrado por Zhai *et al.* (2017). Além disso, o alumínio pode desencadear a regulação dos níveis de ácido abscísico, como verificado por Reyna-Llorens *et al.* (2015), em seu estudo com trigo sarraceno, onde demonstrou que altas concentrações de alumínio pode desencadear o aumento de ácido abscísico na região radicular. Sendo assim, as plantas da linhagem *Nr* poderiam estar usando a via de sinalização do ácido abscísico para interpretar o possível déficit hídrico causado pelo alumínio, já que o etileno não está sendo percebido por suas células nos órgãos alvos de ação do etileno.

Ao observar o crescimento das plantas das três linhagens na presença do alumínio foi possível verificar como a baixa sensibilidade ao hormônio auxina, pode afetar o crescimento das plantas, principalmente quando estão em condição de estresse.

Como descrito anteriormente, as plantas da linhagem *dgt* são plantas que trazem como características as raízes com pouca ou nenhuma ramificação e as folhas hiponásticas (Oh *et al.*, 2006). Na presença de alumínio as plantas da linhagem *dgt* continuaram a apresentar essas características, e, além disso, cresceram menos, acumularam menos biomassa na raiz e parte aérea, desenvolveram menos frutos maduros do que *WT*, apresentaram menor valor de massa fresca dos frutos quando comparadas as plantas de *WT* e *Nr*, e aumentaram o teor de sólidos solúveis apenas no período intermediário de amadurecimento. Em resumo, as plantas da linhagem *dgt* mostraram maior déficit de crescimento, desenvolvimento e produtividade, em função da ausência de percepção ao hormônio auxina circulante nestas plantas, que por consequência deixa de estimular o crescimento do caule e a expansão foliar. E isso se intensificou pelo estresse causado pelo alumínio.

Segundo Balbi e Lomax (2003), a mutação *dgt* atrasa o início do desenvolvimento reprodutivo e reduz o tamanho dos frutos e isto talvez sejam resultados indiretos da área foliar reduzida e sistemas radiculares e vasculares típicos dessa linhagem.

Os resultados apresentados para as plantas de *Nr* mostram como a ausência de percepção de etileno pode não interferir na sensibilização dessas plantas à auxina. Desta forma a auxina, presente em *Nr* poderia estar promovendo o crescimento da raiz e desenvolvimento da parte aérea sem interferência do etileno. Porém, o cultivo com o alumínio pode controlar negativamente o crescimento, desenvolvimento e produtividade destas plantas. Essa ação hormonal em conjunto com o alumínio foi vista para as plantas de *Nr*, quando as plantas desta linhagem tiveram redução no crescimento da parte radicular, redução da massa seca da raiz e da parte aérea. Da mesma forma, Sun *et al.*, (2010) e Yang *et al.*, (2014) trabalhando com *Arabidopsis* relacionam a indução da inibição do crescimento radicular, pelo alumínio, com a promoção a sinalização, o acúmulo e a distribuição de auxina. Segundo Sun

et al., (2010) a inibição do crescimento radicular induzida por alumínio é controlada por dois genes de transporte de auxina conhecidos como *Aux 1* e *Pin2*. E de acordo com Yang *et al.*, (2014) revelou que o alumínio pode afetar a expressão de vários genes associados com a transcrição do hormônio auxina, como *ARF10* e *ARF16*, que são expressos na epiderme e no córtex do ápice radicular, e desta forma pode ser controlado as funções da parede celular neste local.

Embora tenha ocorrido esse efeito negativo quando cultivadas com alumínio, é importante enfatizar ainda, que esta linhagem apresentou melhor desempenho quanto ao crescimento e ao acúmulo de biomassa, mesmo em condição de estresse, quando comparado às plantas da linhagem *dgt*. E essa resposta talvez esteja associada com a presença de auxina circulante nas plantas de *Nr*, que deve ter possibilitado, mesmo em condição de estresse por alumínio, o crescimento e desenvolvimento das plantas, como discutido anteriormente.

Um sinal importante da falta de percepção do hormônio etileno pelas plantas da linhagem *Nr* foi a presença de pétalas e anteras retidas nas plantas de *Nr* tanto no cultivo sem alumínio, quanto no cultivo com alumínio, como relatado, além de apresentarem proporções semelhantes de frutos verdes e maduros. O que vem corroborar com a descrição realizada por Wilkinson *et al.* (1995), de que a linhagem *Nr* apresenta naturalmente como característica o não amadurecimento total dos frutos e as pétalas e anteras ficam retidas nas plantas, por conta da falta de senescência não estimulada pela falta de percepção ao etileno.

Quanto ao acúmulo de sólidos solúveis na linhagem *Nr*, foi visto que isso ocorreu ao longo de todo o desenvolvimento possivelmente em consequência ao estresse imposto pelo alumínio. Então em uma forma de compensar as perdas causadas pelo alumínio, os órgãos das plantas podem estar estimulando maior transporte e mobilização de carboidratos e açúcares para os frutos, alocando esses recursos nos frutos e sementes em desenvolvimento. Segundo

Ho, (1988) normalmente, apenas durante a fase posterior de desenvolvimento, que se caracteriza pela expansão celular, desenvolvimento e maturação das sementes, para a maioria dos frutos acumulam altos níveis de carboidratos na forma de açúcares ou amido.

O resultado da análise de textura para os frutos das plantas da linhagem *dgt* demonstraram que foi necessário a aplicação de força maior para a ruptura do epicarpo desses frutos, principalmente aos 97 d.a.g e 101 d.a.g (dias após germinação) em comparação com *WT* e a partir de 97 d.a.g. em comparação com *Nr*. Possivelmente, esse resultado apresentado para os frutos das plantas da linhagem *dgt* pode estar ocorrendo pela presença do alumínio, que pode estar deixando as paredes dos frutos mais rígidas. O alumínio pode está interagindo com enzimas como a extensina e com xiloglucanos da parede celular e alterando a integridade da parede celular (Kochian *et al.*, 2015; Matsumoto, 2000). Além disso, esse efeito pode estar ocorrendo também pela ausência da sensibilidade ao hormônio auxina, pelas células dos frutos, e desta forma esse sintoma poderia ser o reflexo da falta de ação hormonal para o aumento da expansão celular, que conseqüentemente determinou a espessura da parede celular das células do exocarpo. De acordo com Gillaspay *et al.* (1993), as auxinas também estão envolvidas na expansão celular nos tecidos dos frutos e que durante o desenvolvimento do fruto do tomate, ocorrem dois picos de aumento no conteúdo de auxina. O primeiro pico ocorre 10 dias após a antese, coincidindo com início da expansão celular e o segundo pico aparece mais tarde e coincide com a fase final de desenvolvimento embrionário.

Conclusões

Este trabalho mostrou o efeito tóxico do alumínio, principalmente para as raízes das plantas, corroborando com outras pesquisas já realizadas e que investigaram esse efeito em diversas culturas.

Confirmou-se a hipótese deste trabalho, de que os mutantes hormonais cultivados na presença do alumínio podem demonstrar alterações fisiológicas de crescimento, desenvolvimento e produtividade, que revelem as consequências da toxicidade do alumínio sob as ações hormonais da auxina e etileno.

Os resultados de uma forma geral demonstram que para as linhagens testadas neste trabalho a percepção aos hormônios auxina e etileno, juntos contribuem para o crescimento adequado das raízes e da parte aérea das plantas. Além disso, o alumínio é capaz de afetar mais o crescimento, o desenvolvimento e a produtividade de plantas que tenham comprometimento da percepção do hormônio auxina do que de plantas que comprometimento da percepção do hormônio etileno.

Estudos futuros, que possam avaliar a expressão dos genes envolvidos na expressão dos hormônios auxina e etileno, nas raízes e nos frutos de plantas cultivadas na presença do alumínio, podem continuar a auxiliar no entendimento e na interpretação de como ocorre a regulação e a modulação desses dois hormônios para promover melhor crescimento e desenvolvimento das plantas sob estresse.

Referências Bibliográficas

- Arquelau, P. B.F, Silva, V. D. M., Garcia, M. A. V. T., de Araújo, R. L. B., & Fante, C. A. (2019). Characterization of edible coatings based on ripe “Prata” banana peel flour. *Food Hydrocolloids*, 89, 570-578.
- Balbi, V., & Lomax, T. L. (2003). Regulation of early tomato fruit development by the diageotropica gene. *Plant physiology*, **131**(1): 186-197.
- Bennett MJ, Marchant A, Gren HG, May ST, Ward SP, Milner PA, Walker AR, Schultz B, Feldmann KA. 1996. Arabidopsis AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* **273**, 948–950.

- Bhalerao S. A., Prabhu D. V. (2013). Aluminium toxicity in plants-a review. *Journal of Applicable Chemistry*. **2 (3)**: 447–474.
- Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Friml, J., ... & Scheres, B. (2005). The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature*, **433(7021)**: 39-44.
- Cassel, J. L., Rother, G. M., Pimenta, B. D., & dos Santos, D. B. (2021). Ação da auxina sobre plantas de soja. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, **4(3)**: 4628-4643.
- Chen, L. S., Qi, Y. P., Jiang, H. X., Yang, L. T., & Yang, G. H. (2010). Photosynthesis and photoprotective systems of plants in response to aluminum toxicity. *African Journal of Biotechnology*. **9(54)**: 9237-9247.
- Emmanuel, E., & Levy, A. A. (2002). Tomato mutants as tools for functional genomics. *Current opinion in plant biology*. **5(2)**: 112-117.
- Gillaspy, G., Ben-David, H., & Gruissem, W. (1993). Fruits: a developmental perspective. *The Plant Cell*, **5(10)**: 1439.
- Gomes, A.M.F. (2011). Interações hormonais no crescimento de raízes de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom) sob estresse osmótico. Dissertação de mestrado. ESALQ, Piracicaba. 71pp. disponível em: www.teses.usp.br/teses.
- Gupta, N., Gaurav, S. S., & Kumar, A. (2013). Molecular basis of aluminium toxicity in plants: a review. *American Journal of Plant Sciences*. **4**: 21-37.
- Klay, I., Gouia, S., Liu, M., Mila, I., Khoudi, H., Bernadac, A., Bouzayen M. & Pirrello, J. (2018). Ethylene Response Factors (ERF) are differentially regulated by different abiotic stress types in tomato plants. *Plant science*, **274**: 137-145.

- Kochian, L. V., Piñeros, M. A., Liu, J., & Magalhaes, J. V. (2015). Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum resistance. *Annual Review of Plant Biology*, **66**: 571-598.
- Kopittke, P. M. (2016). Role of phytohormones in aluminium rhizotoxicity. *Plant, Cell & Environment*, **39**(10): 2319-2328.
- Ho, L. C., & Hewitt, J. D. (1986). Fruit development. The tomato crop: a scientific basis for improvement. 201-239.
- Husen, H. (2021). *Plant Performance Under Environmental Stress*. Springer International Publishing.
- Lemos-Filho J. P. (2000). Fotoinibição em três espécies de cerrado (*Annona crassifolia*, *Eugenia dysenterica* e *Campomanesia adamantium*) na estação seca e na chuvosa. *Revista brasileira de Botânica*. **23** (1): 45 –50.
- LeNoble, M. E., Spollen, W. G., & Sharp, R. E. (2004). Maintenance of shoot growth by endogenous ABA: genetic assessment of the involvement of ethylene suppression. *Journal of Experimental Botany*: **55**(395): 237-245.
- Magalhaes, J. V., Carvalho Júnior, G. A. de, Schaffert, R. E., Landau, E. C., Miranda, R. A. de, Viana, J. H. M., Menezes, C. B. de, Silva, L. A., Guimaraes, C. T. e Coelho, A. M. (2016). O gene de tolerância ao alumínio, sbMATE, aumenta a produção de grãos de sorgo cultivado em solos ácidos. *Circular técnica nº 218*. ISSN 1679-1150. <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1063395>>.
- Masson P., Dalix T., Bussiere S. (2010). Determination of major and trace elements in plant samples by inductively coupled plasma–mass spectrometry. *Communications in soil science and plant analysis*. **41**(3): 231-243.

- Matsumoto, H. (2000). Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. *International Review of Cytology. Elsevier*. **200**: 1-46.
- Miguel, P. S. B., Gomes, F. T., da Rocha, W. S. D., de Carvalho, C. A., & de Oliveira, A. V. (2010). Efeitos tóxicos do alumínio no crescimento das plantas: mecanismos de tolerância, sintomas, efeitos fisiológicos, bioquímicos e controles genéticos. *CES revista*, **24(1)**: 13-29.
- Muday, G. K., Rahman, A., & Binder, B. M. (2012). Auxin and ethylene: collaborators or competitors?. *Trends in plant Science*. **17(4)**: 181-195.
- Oh K, Ivanchenko MG, White TJ, Lomax TL (2006) The diageotropica gene of tomato encodes a cyclophilin: a novel player in auxin signaling. *Planta*. **224**: 133-144.
- Pan, G., Liu, W., Zhang, H., & Liu, P. (2018). Morphophysiological responses and tolerance mechanisms of *Xanthium strumarium* to manganese stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **165**: 654-661.
- Rahman, M. A., Lee, S. H., Ji, H. C., Kabir, A. H., Jones, C. S., & Lee, K. W. (2018). Importance of mineral nutrition for mitigating aluminum toxicity in plants on acidic soils: current status and opportunities. *International journal of molecular sciences*, **19(10)**: 3073.
- Rahman R., Upadhyaya H. (2020) Aluminium Toxicity and Its Tolerance in Plant: A Review. *J. Plant Biol.* 64: 101–121.
- Ranjan, A., Sinha, R., Lal, S. K., Bishi, S. K., & Singh, A. K. (2021). Phytohormone signalling and cross-talk to alleviate aluminium toxicity in plants. *Plant Cell Reports*, **40(8)**: 1331-1343.
- Reyna-Llorens, I., Corrales, I., Poschenrieder, C., Barcelo, J., & Cruz-Ortega, R. (2015). Both aluminum and ABA induce the expression of an ABC-like transporter gene (FeALS3) in

- the Al-tolerant species *Fagopyrum esculentum*. *Environmental and Experimental Botany*, **111**: 74-82.
- Rodrigues L. R., Zambon F. R. A., Muraro D. (2007). Classificação do tomate por atacadistas e produtores Curitiba. *Horticultura Brasileira*. **25**: 521-526.
- Shen, H., Hou, N., Schlicht, M., Wan, Y., Mancuso, S., & Baluska, F. (2008). Aluminium toxicity targets PIN2 in *Arabidopsis* root apices: effects on PIN2 endocytosis, vesicular recycling, and polar auxin transport. *Chinese Science Bulletin*. **53(16)**: 2480-2487.
- Sivaguru, M., & Horst, W. J. (1998). The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize. *Plant Physiology*, **116 (1)**: 155-163.
- Steffens, B. (2014). The role of ethylene and ROS in salinity, heavy metal, and flooding responses in rice. *Frontiers in plant Science*. **5**: 685.
- Stepanova, A. N., Yun, J., Likhacheva, A. V., & Alonso, J. M. (2007). Multilevel interactions between ethylene and auxin in *Arabidopsis* roots. *The Plant Cell*, **19(7)**: 2169-2185.
- Sun, P., Tian, Q. Y., Zhao, M. G., Dai, X. Y., Huang, J. H., Li, L. H., & Zhang, W. H. (2007). Aluminum-induced ethylene production is associated with inhibition of root elongation in *Lotus japonicus* L. *Plant and Cell Physiology*, **48(8)**: 1229-1235.
- Sun, P., Tian, Q. Y., Chen, J., & Zhang, W. H. (2010). Aluminium-induced inhibition of root elongation in *Arabidopsis* is mediated by ethylene and auxin. *Journal of Experimental Botany*, **61(2)**: 347-356.
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2017). Fisiologia e desenvolvimento vegetal. *Artmed Editora*. 888pp.

- Tsuchisaka, A., & Theologis, A. (2004). Unique and overlapping expression patterns among the Arabidopsis 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase gene family members. *Plant Physiology*. **136(2)**: 2982-3000.
- Wang, S., Ren, X., Huang, B., Wang, G., Zhou, P., & An, Y. (2016). Aluminium-induced reduction of plant growth in alfalfa (*Medicago sativa*) is mediated by interrupting auxin transport and accumulation in roots. *Scientific reports*, **6(1)**: 30079.
- Watanabe, T., Osaki, M. (2001). Influence of aluminum and phosphorus on growth and xylem sap composition in *Melastoma malabathricum* L. *Plant and Soil*. **237(1)**: 63-70.
- Wellburn, A.R., 1994. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *Journal of Plant Physiology*. **144**: 307–313.
- Wilkinson JQ, Lanahan MB, Yen H-C, Giovannoni JJ, Klee HJ (1995) An ethyleneinducible component of signal transduction encoded by Never-ripe. *Science* **270**: 1807- 1809.
- Wilson RL, Bakshi A, Binder BM. 2014. Loss of the ETR1 ethylene receptor reduces the inhibitory effect of far-red light and darkness on seed germination of *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*. **5**: 1–13.
- Yang, S. F., & Hoffman, N. E. (1984). Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual review of plant physiology*, **35(1)**: 155-189.
- Yang, Z. B., Geng, X., He, C., Zhang, F., Wang, R., Horst, W. J., & Ding, Z. (2014). TAA1-regulated local auxin biosynthesis in the root-apex transition zone mediates the aluminum-induced inhibition of root growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. **26(7)**: 2889-2904.

- Yang ZB, Liu G, Liu J, Zhang B, Meng W, Muller B, Hayashi KI, Zhang X, Zhao Z, Smet ID, Ding Z (2017) Synergistic action of auxin and cytokinin mediates aluminum-induced root growth inhibition in Arabidopsis. *EMBO reports*. **18**:1213–1230.
- Zhang, Y. H., Wang, E. M., Zhao, T. F., Wang, Q. Q., & Chen, L. J. (2018). Characteristics of chlorophyll fluorescence and antioxidant-oxidant balance in PEPC and PPKK transgenic rice under aluminum stress. *Russian Journal of Plant Physiology*. **65**: 49-56.
- Zhai, Y., Shao, S., Sha, W., Zhao, Y., Zhang, J., Ren, W., & Zhang, C. (2017). Overexpression of soybean GmERF9 enhances the tolerance to drought and cold in the transgenic tobacco. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. **128(3)**: 607-618.
- Zobel, R. W. (1973). Some physiological characteristics of the ethylene-requiring tomato mutant diageotropica. *Plant Physiology*, **52(4)**: 385-389.
- Zobel RW (1974). Control of morphogenesis in the ethylene-requiring tomato mutant, diageotropica. *Canadian Journal of Botany*. **52**:735-741

Anexos

Elemento químico mineral	Órgão da planta	Fonte de variação		
		Linhagem X Concentração de Al	Linhagem	Concentração de Alumínio
		P valor		
Al	Raiz	0,0044 **	0,0040 **	<0,0001 ****
	Fruto	0,0027 **	<0,0001 ****	0,0021**
Zn	Raiz	0,0294 *	0,0635 NS	<0,0001 ****
	Fruto	<0,0001****	<0,0001 ****	0,0001***
Mn	Raiz	0,0016 **	0,0003 ***	<0,0001 ****
	Fruto	0,1078 NS	0,0024 **	0,0002 ***
Bo	Raiz	<0,0001 ****	0,0002 ***	<0,0001 ****
	Fruto	0,3619 NS	0,7364 NS	<0,0001 ****
Mo	Raiz	0,0146 *	<0,0001 ****	0,0003 ***
	Fruto	0,0042 **	<0,0001 ****	<0,0001 ****
Cu	Raiz	0,7475 NS	0,0115 *	0,0007 ***
	Fruto	<0,0001 ****	<0,0001 ****	0,0001 ****
Fe	Raiz	0,0001 ***	<0,0001 ****	<0,0001 ****
	Fruto	0,0035 **	0,0015 **	0,0002 ***
Na	Raiz	0,0176 *	0,0010 ***	0,0124 *
	Fruto	0,8314 NS	0,1378 NS	0,8671 NS
Mg	Raiz	0,0314 *	<0,0001 ****	<0,0001 ****
	Fruto	0,0073 **	0,0033 **	0,0003 ***
Ca	Raiz	0,1072 NS	0,0004 ***	0,0020 **
	Fruto	0,2610 NS	0,0034 **	0,0008 ***
K	Raiz	0,0045 **	0,0004 ***	<0,0001 ****
	Fruto	0,0552 NS	0,0620 NS	<0,0001 ****

Tabela 2: Resumo da análise de variância, para as concentrações dos elementos químicos nas raízes e frutos das linhagens *WT*, *dgt* e *Nr* de Micro-Tom, considerando diferença significativa de $P \leq 0,05$ pelo teste de Tukey.

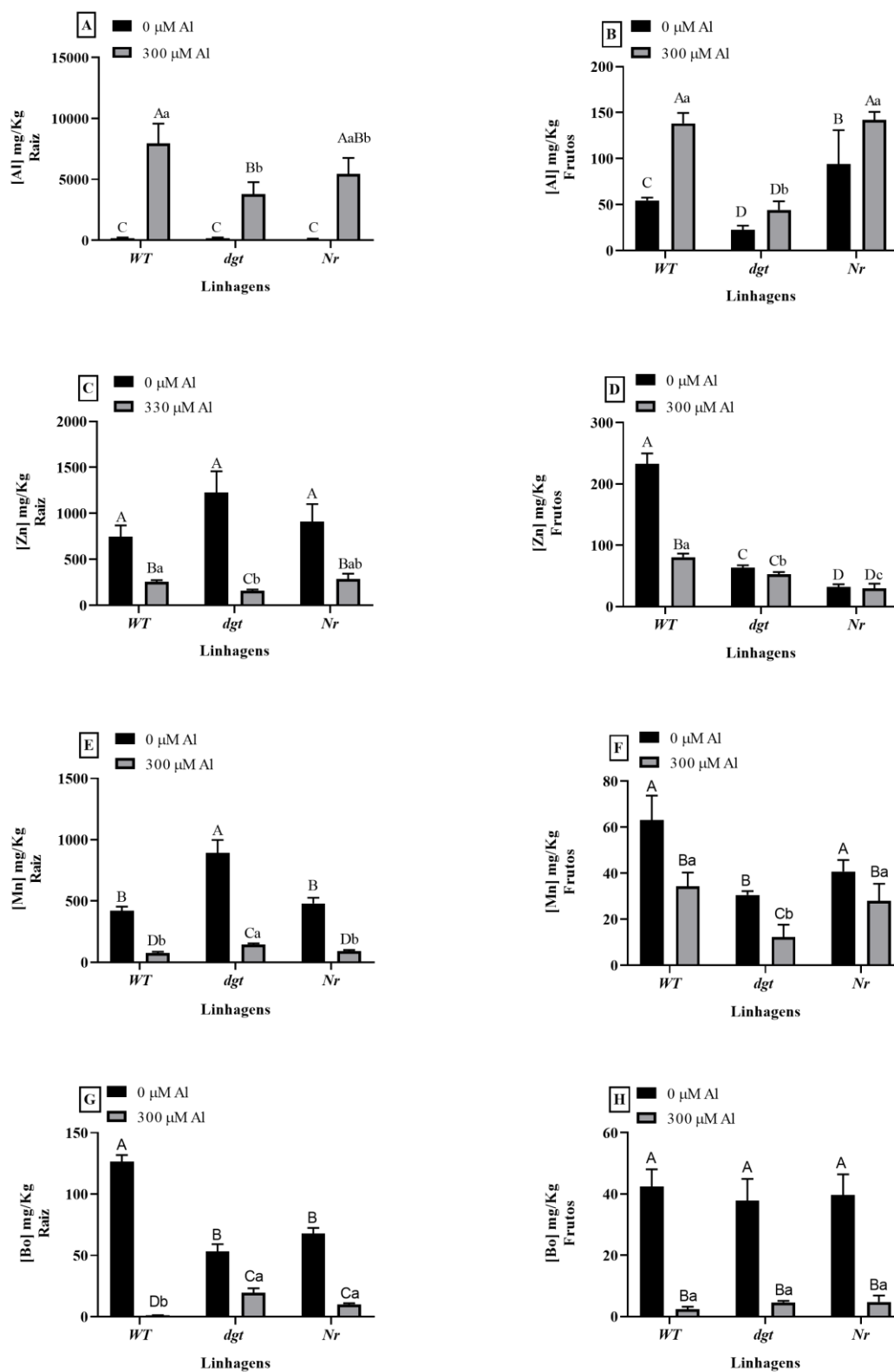


Figura 1: Concentrações dos elementos (A) Al, (C) Zn, (E) Mn e (G) Bo nas raízes e (B) Al, (D) Zn, (F) Mn e (H) Bo frutos das linhagens *WT*, *dgt* e *Nr* de Micro-Tom, considerando diferença significativa de $P \leq 0,05$ pelo teste de Tukey. As letras maiúsculas comparam os tratamentos das linhagens dentro do tratamento de 0μM Al e as letras minúsculas comparam as linhagens dentro do tratamento de 300μM Al.

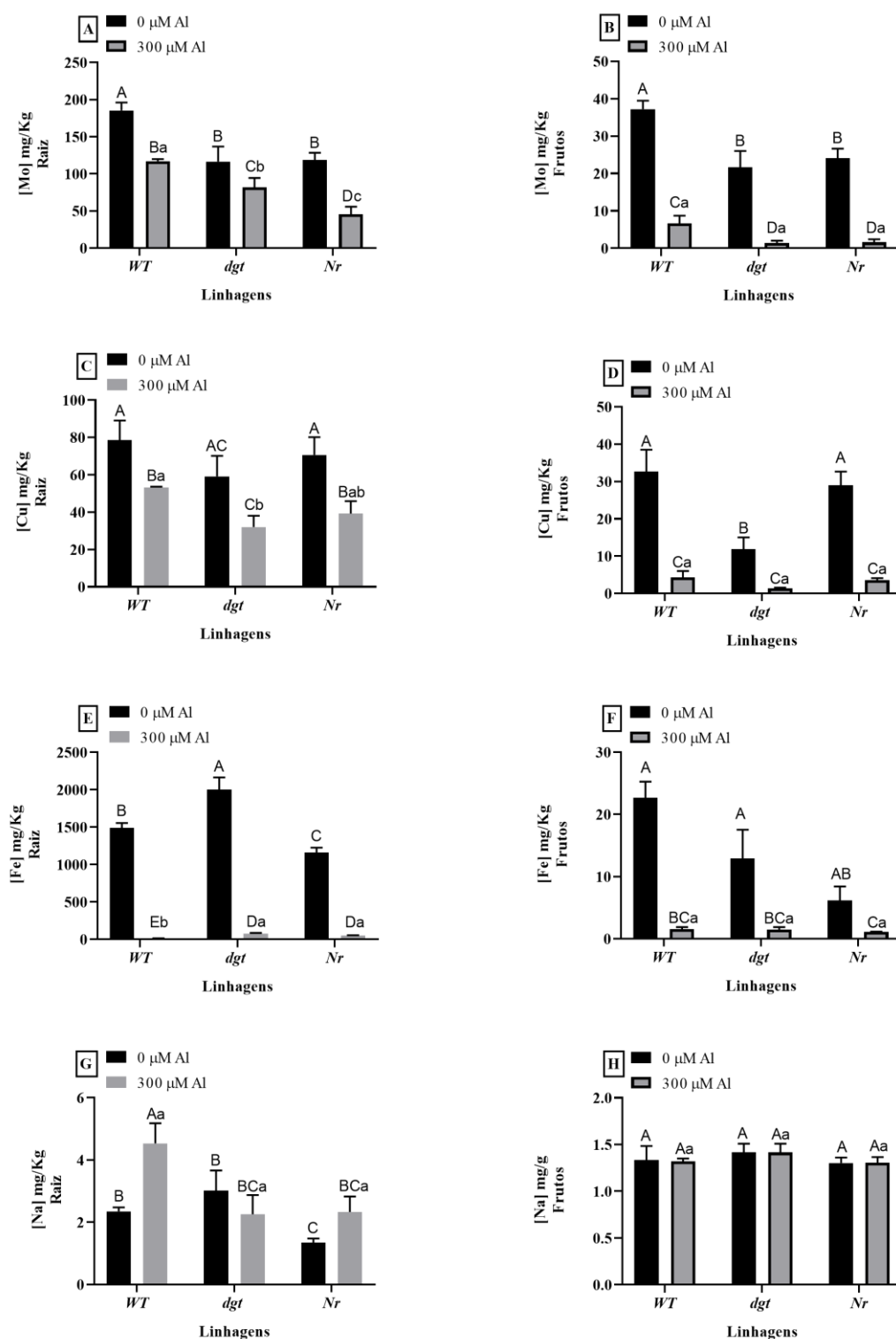


Figura 2: Concentrações dos elementos (A) Mo, (C) Cu, (E) Fe e (G) Na, nas raízes e (B) Mo, (D) Cu, (F) Fe e (H) Na, nos frutos das linhagens *WT*, *dgt* e *Nr* de Micro-Tom, considerando diferença significativa de $P \leq 0,05$ pelo teste de Tukey. As letras maiúsculas comparam os tratamentos das linhagens dentro do tratamento de $0\mu\text{M Al}$ e as letras minúsculas comparam as linhagens dentro do tratamento de $300\mu\text{M Al}$.

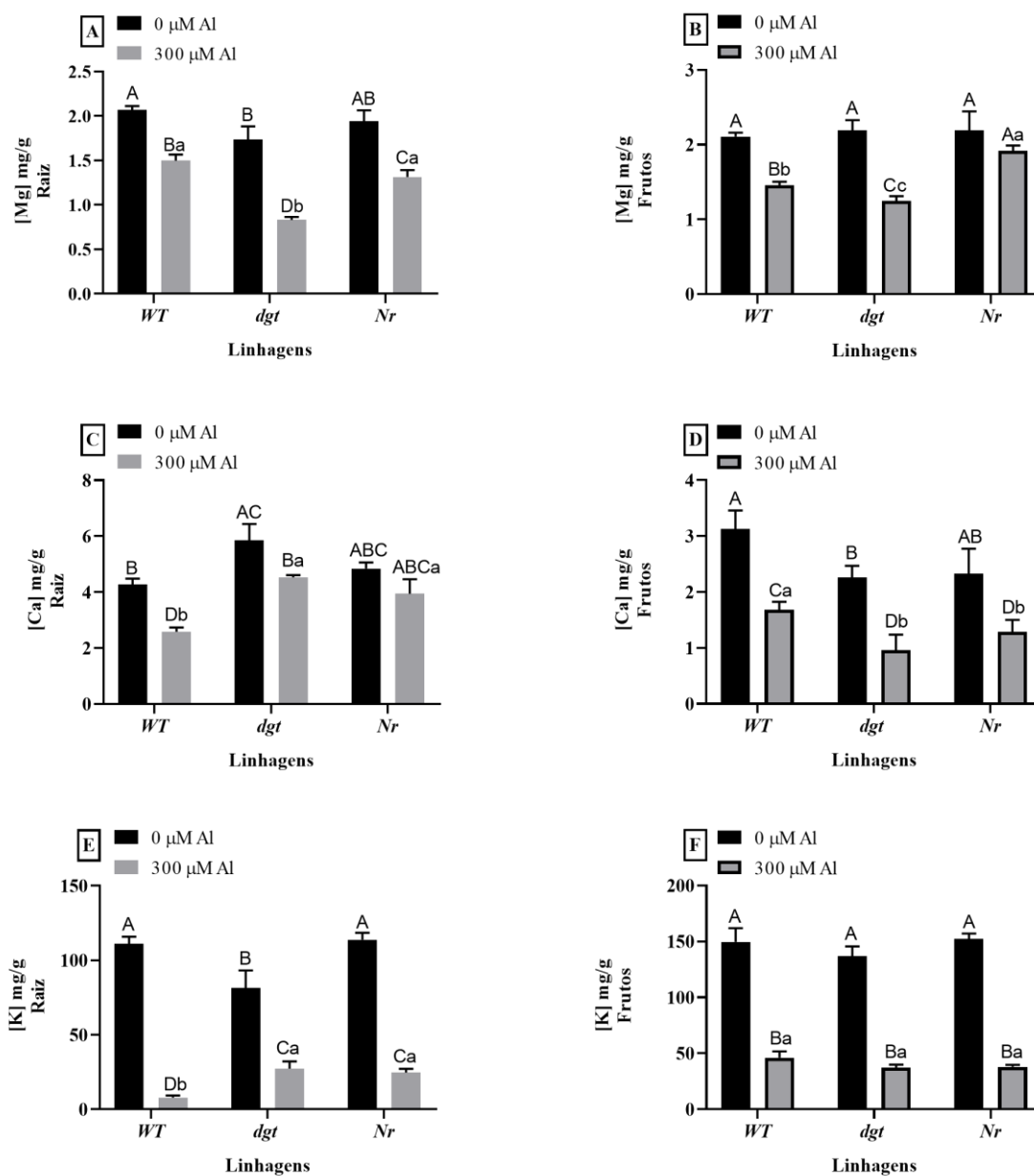


Figura 3: Concentrações dos elementos (A) Mg, (C) Ca, e (E) K nas raízes e (B) Mg, (D) Ca, e (F) K frutos das linhagens *WT*, *dgt* e *Nr* de Micro-Tom, considerando diferença significativa de $P \leq 0,05$ pelo teste de Tukey. As letras maiúsculas comparam os tratamentos das linhagens dentro do tratamento de 0 μM Al e as letras minúsculas comparam as linhagens dentro do tratamento de 300 μM Al.

Tabela 3: Resumo da análise de variância, para o teor de pigmentos cloroplastídicos das linhagens *WT*, *dgt* e *Nr* de Micro-Tom, considerando diferença significativa de $P \leq 0,05$ pelo teste de Tukey.

Pigmentos Cloroplastídicos	Fonte de variação		
	Linhagem X Concentração de Al	Linhagem	Concentração de Alumínio
	P valor		
Clorofila a	0,0555 NS	<0,0001 ****	<0,0001 ****
Clorofila b	0,0234 *	0,0008 ***	0,0157 *
Carotenóides	0,0062 **	0,0038 **	0,0200 *

Tabela 4: Resumo da análise de variância, taxa de condutância estomática (*gs*); taxa de assimilação de carbono (*A*) e taxa de transpiração (*E*) das linhagens *WT*, *dgt* e *Nr* de Micro-Tom, em fase de antese e em fase de frutos maduros, considerando diferença significativa de $P \leq 0,05$ pelo teste de Tukey.

Análise	Fase da planta	Fonte de variação		
		Linhagem X Concentração de Al	Linhagem	Concentração de Alumínio
<i>Fv/Fm</i>	Antese	0,0009 ***	0,0320 *	0,0393 *
	Frutos Maduros	0,0610 NS	0,0503 NS	0,0002 ***
Condutância estomática (<i>gs</i>)	Antese	0,0002 ***	0,0529 NS	0,7048 NS
	Frutos Maduros	0,0217 *	0,0530 NS	0,0092 **
Assinalação de CO_2 (<i>A</i>)	Antese	0,0005 ***	0,6872 NS	0,0546 NS
	Frutos Maduros	0,0174 *	0,0031 **	0,0035 **
Transpiração (<i>E</i>)	Antese	0,0023 **	0,1220 *	0,5825NS
	Frutos Maduros	0,0124 *	0,6692 NS	0,005 **

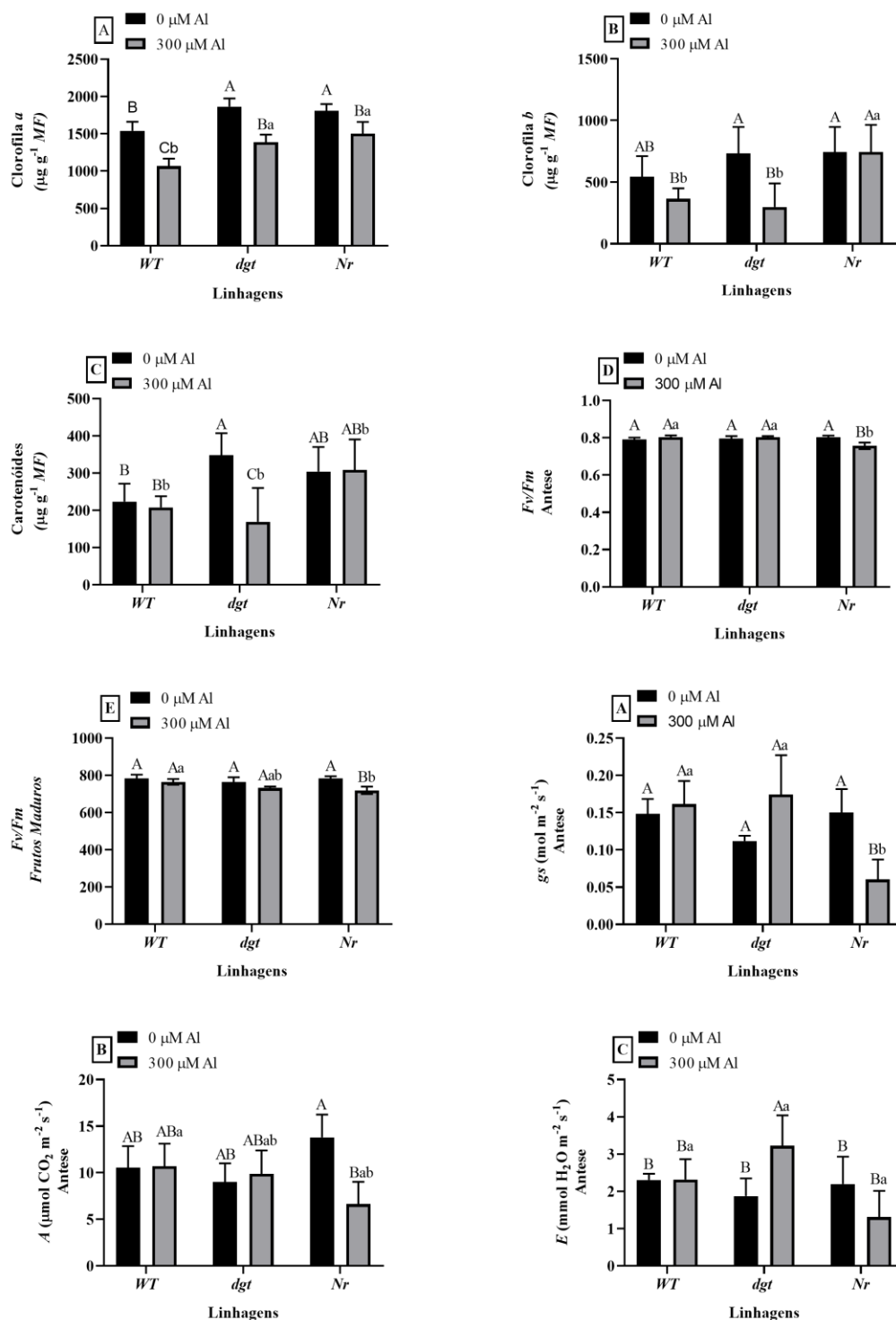


Figura 4: (A) Teor de Clorofila *a*; (B) Teor de Clorofila *b*, (C) Teor de Carotenóides, fluorescência da Clorofila *a* (D) F_v/F_m em fase de antese e (E) F_v/F_m em fase de frutos maduros; (F) taxa de condutância estomática em antese; (G) taxa de assimilação de carbono em antese e (H) taxa de transpiração em antese, das linhagens *WT*, *dgt* e *Nr* de Micro-Tom, considerando diferença significativa de $P \leq 0,05$ pelo teste de Tukey. As letras maiúsculas comparam os tratamentos das linhagens dentro do tratamento de 0 $\mu\text{M Al}$ e as letras minúsculas comparam as linhagens dentro do tratamento de 300 $\mu\text{M Al}$.

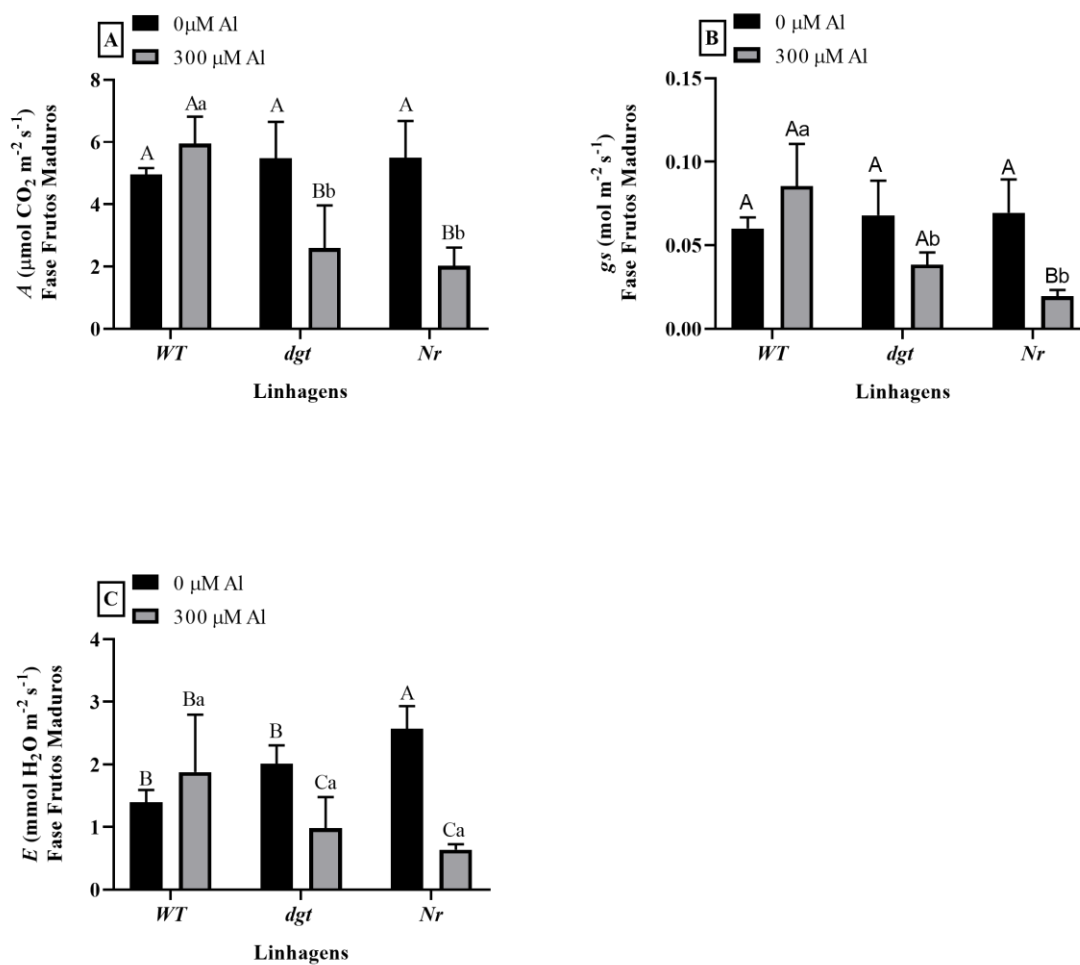


Figura 5: (A) Taxa de assimilação de carbono em fase de frutos maduros, (B) Taxa de condutância estomática em fase de frutos maduros; e (C) taxa de transpiração em fase de frutos maduros das linhagens *WT*, *dgt* e *Nr* de Micro-Tom, considerando diferença significativa de $P \leq 0,05$ pelo teste de Tukey. As letras maiúsculas comparam os tratamentos das linhagens dentro do tratamento de $0\mu\text{M Al}$ e as letras minúsculas comparam as linhagens dentro do tratamento de $300\mu\text{M Al}$.

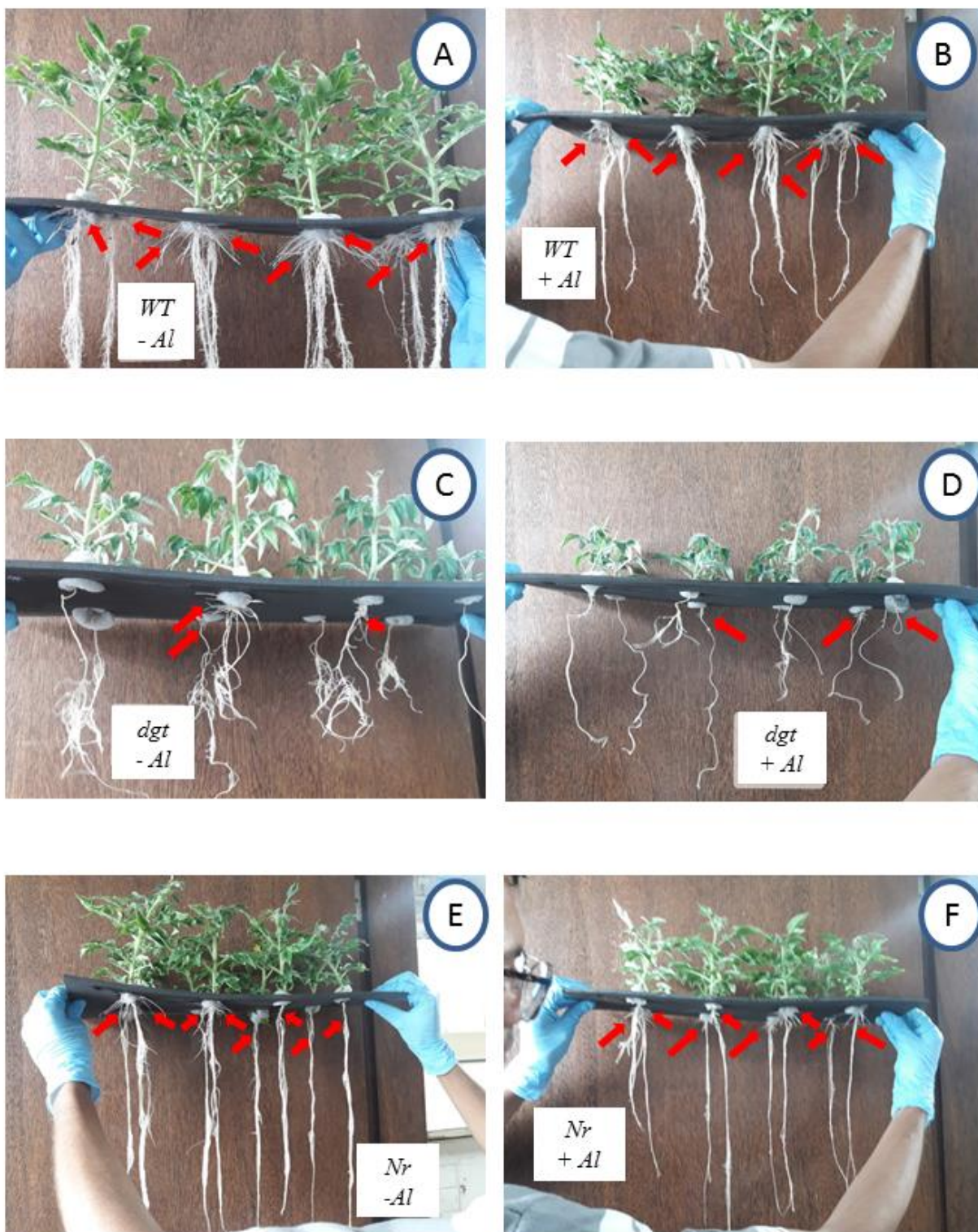


Figura 6: Aspecto das plantas das linhagens *WT*, *dgt*, e *Nr* cultivadas em hidroponia nas concentrações de 0 μM Al (A, C e E) e 300 μM Al (B, D e F), com 38 d.a.g (dias após germinação). As setas em vermelho mostram o desenvolvimento de raízes secundárias.

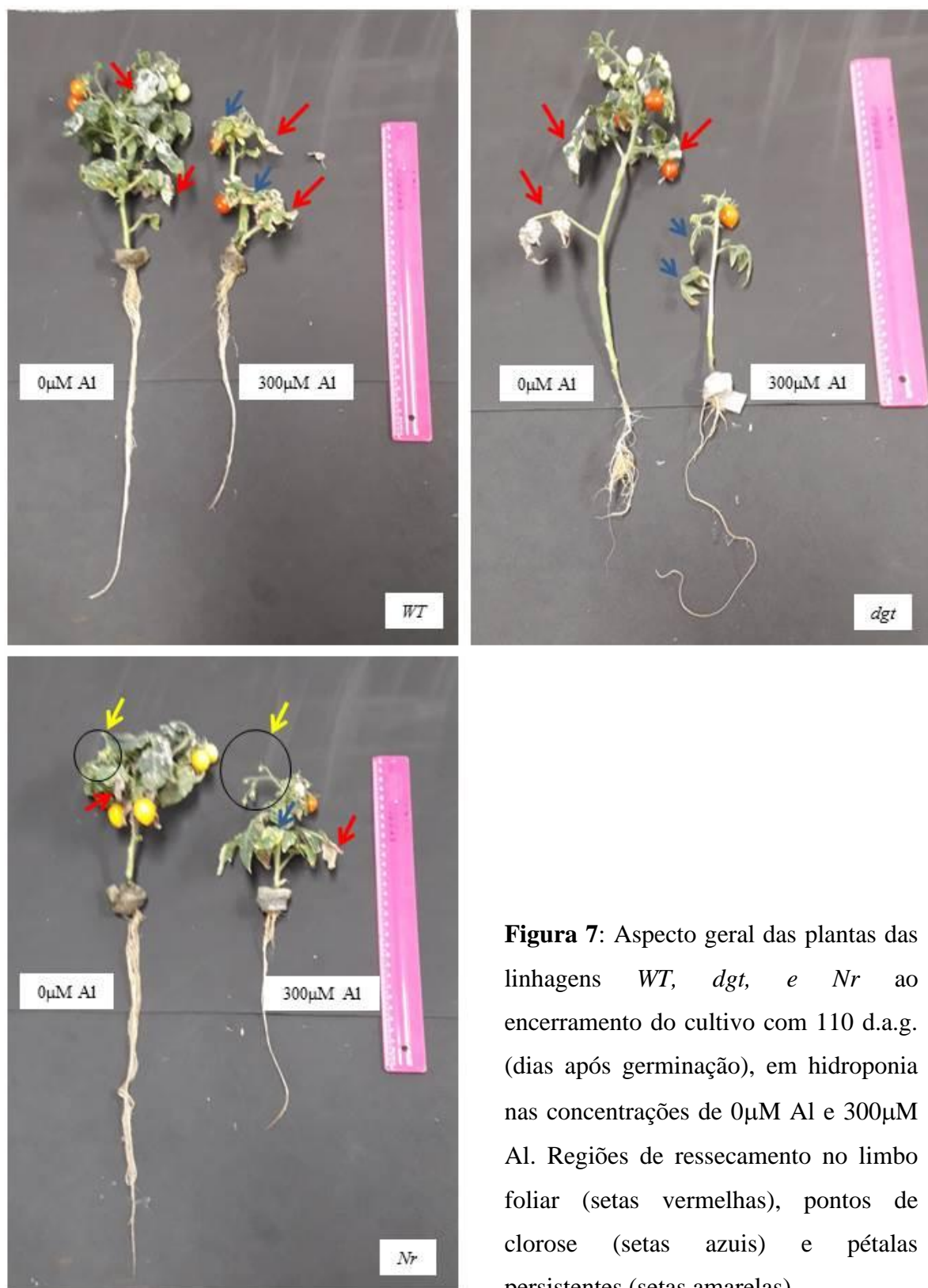


Figura 7: Aspecto geral das plantas das linhagens *WT*, *dgt*, e *Nr* ao encerramento do cultivo com 110 d.a.g. (dias após germinação), em hidroponia nas concentrações de 0 μM Al e 300 μM Al. Regiões de ressecamento no limbo foliar (setas vermelhas), pontos de clorose (setas azuis) e pétalas persistentes (setas amarelas).

Tabela 5: Resumo da análise de variância, para Comprimento da parte aérea até a primeira inflorescência (caule primário); comprimento da parte aérea (caule secundário); comprimento radicular; comprimento total; comprimento do 3º, 4º e 5º entrenó; diâmetro do caule (na altura do 6º entrenó), nº de folhas (até a primeira inflorescência no caule principal), área foliar específica da 5º e 6º folhas das linhagens *WT*, *dgt* e *Nr* de Micro-Tom, em fase de antese e em fase de frutos maduros, considerando diferença significativa de $P \leq 0,05$ pelo teste de Tukey.

Análise de Crescimento	Fonte de variação		
	Linhagem X Concentração de Al	Linhagem P valor	Concentração de Alumínio
Comprimento da parte aérea (até a 1º inflorescência) no caule primário	0,0065 **	0,0271 *	0,0174 *
Comprimento da raiz	0,0376 *	0,0024 **	0,0695 NS
Comprimento total	0,5001 NS	0,0045 **	<0,0001 ****
Comprimento da parte aérea (caule secundário)	0,0080 **	0,0212 *	0,0003 ***
Diâmetro do caule na altura do 6º entrenó	0,5488 NS	<0,0001 ****	0,0005 ***
Comprimento do 3º entrenó	0,0002 ***	0,0002 ***	0,3981 NS
Comprimento do 4º entrenó	0,0083 **	0,0015 **	0,4672 NS
Comprimento do 5º entrenó	0,0096 **	<0,0001 ****	0,6106 NS
Nº de folhas (até a primeira inflorescência) no caule principal	0,3776 NS	0,0514 NS	0,2910 NS
Área foliar específica da 5º folha	0,0056 **	<0,0001 ****	0,0004 ***
Área foliar específica 6º folha	0,0001 ***	<0,0001 ****	<0,0001 ****

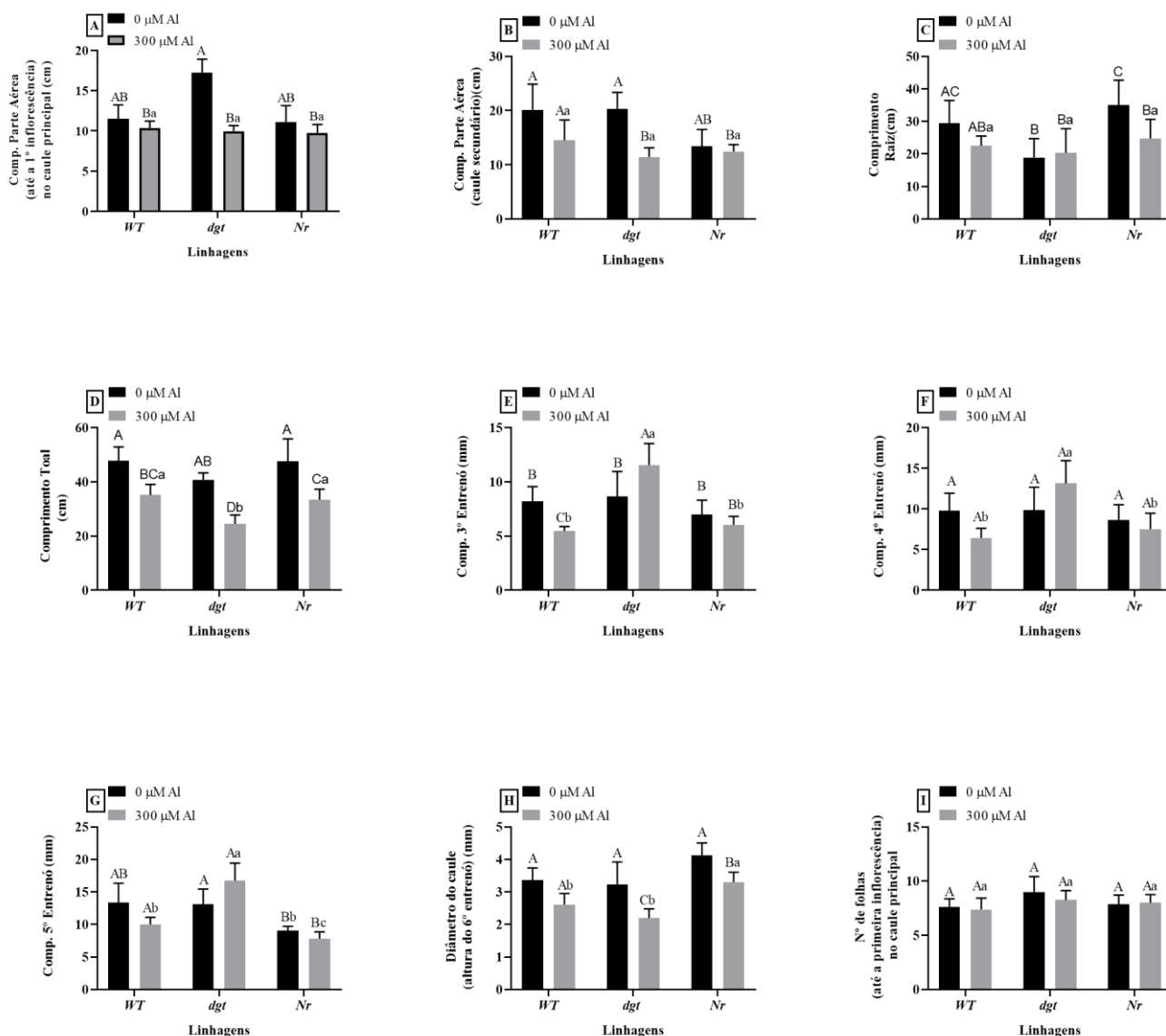


Figura 8: (A) Comprimento da parte aérea até a primeira inflorescência (caule primário); (B) comprimento da parte aérea (caule secundário); (C) comprimento radicular; (D) comprimento total; comprimento do (E) 3º, (F) 4º e (G) 5º entrenó; (H) diâmetro do caule (na altura do 6º entrenó) e (I) nº de folhas (até a primeira inflorescência no caule principal) das linhagens *WT*, *dgt* e *Nr* de Micro-Tom, considerando diferença significativa de $P \leq 0,05$ pelo teste de Tukey. As letras maiúsculas comparam os tratamentos das linhagens dentro do tratamento de 0 μM Al e as letras minúsculas comparam as linhagens dentro do tratamento de 300 μM Al.

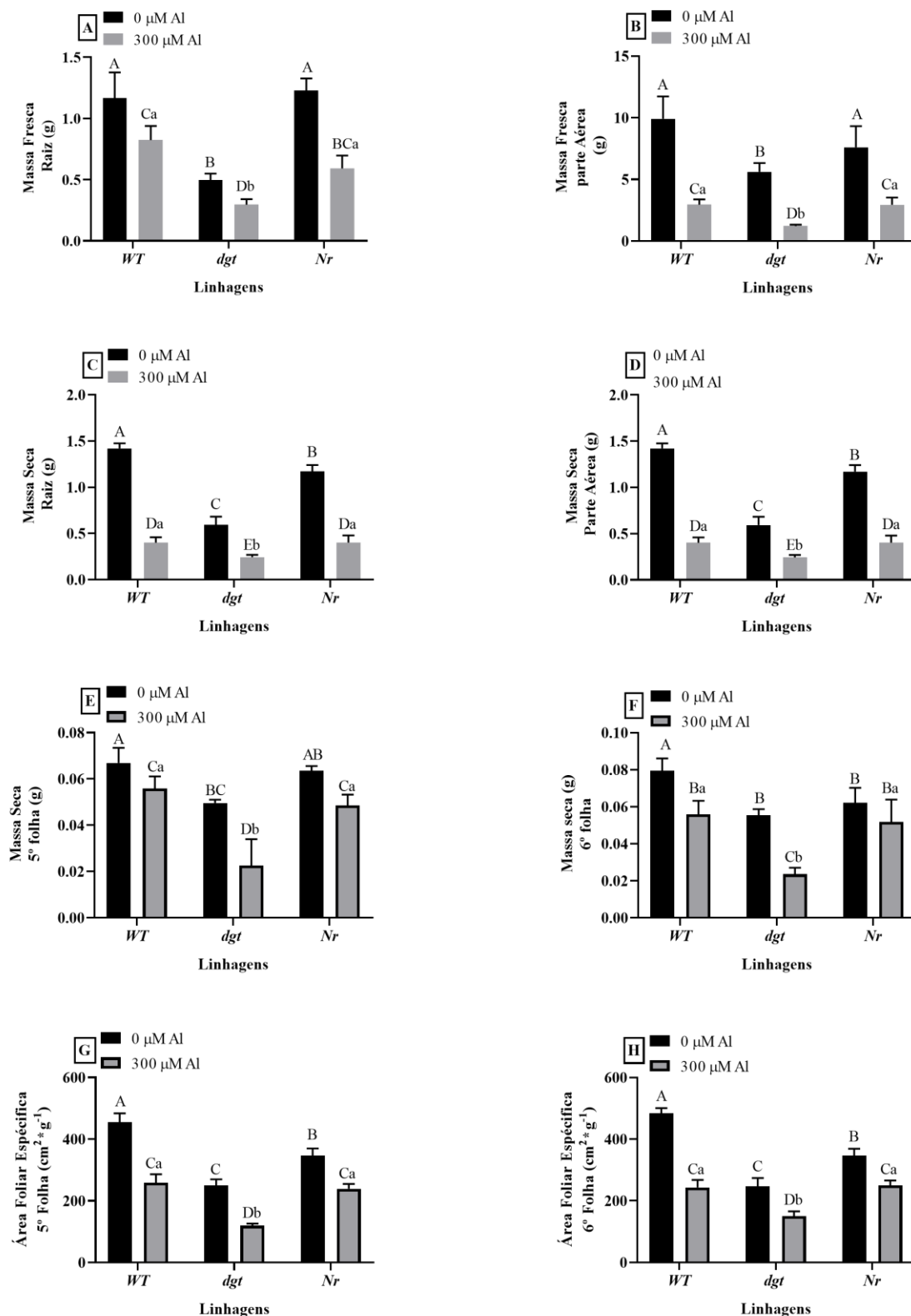


Figura 9: (A) massa fresca da raiz; (B) massa fresca da parte aérea; (C) massa seca da raiz; (D) massa seca da parte aérea; massa seca da (E) 5º e (F) 6º folhas; (G) área foliar específica da 5º e (H) 6º folhas das linhagens *WT*, *dgt* e *Nr* de Micro-Tom, considerando diferença significativa de $P \leq 0,05$ pelo teste de Tukey. As letras maiúsculas comparam os tratamentos das linhagens dentro do tratamento de 0µM Al e as letras minúsculas comparam as linhagens dentro do tratamento de 300µM Al.

Tabela 6: Resumo da análise de variância, para Massa fresca da raiz; massa fresca da parte aérea; massa seca da raiz; massa seca da parte aérea; massa seca da 5° e 6° folhas das linhagens *WT*, *dgt* e *Nr* de Micro-Tom, em fase de antese e em fase de frutos maduros, considerando diferença significativa de $P \leq 0,05$ pelo teste de Tukey.

Análise de Biomassa	Fonte de variação		
	Linhagem X Concentração de Al	Linhagem	Concentração de Alumínio
	P valor		
Massa Fresca Raiz	<0,0001 ****	<0,0001 ****	<0,0001 ****
Massa Fresca Parte Aérea	0,0248 *	0,0007 ***	<0,0001 ****
Massa Seca Raiz	<0,0001 ****	<0,0001 ****	<0,0001 ****
Massa Seca Parte Aérea	<0,0001 ****	<0,0001 ****	<0,0001 ****
Massa Seca da 5° Folha	0,0479 *	0,0005 ***	0,0008 ***
Massa Seca da 6° Folha	0,0455 *	<0,0001 ****	0,0001 ***

Tabela 7: Resumo da análise de variância, para N° total de frutos verdes; N° total de frutos maduros; massa fresca dos frutos e diâmetro dos frutos das linhagens *WT*, *dgt* e *Nr* de Micro-Tom, em fase de antese e em fase de frutos maduros, considerando diferença significativa de $P \leq 0,05$ pelo teste de Tukey.

Análise de Produtividade	Fonte de variação		
	Linhagem X Concentração de Al	Linhagem	Concentração de Alumínio
	P valor		
N° total de frutos verde	0,0197 *	0,0002 ***	<0,0001 ****
N° total de frutos Maduros	0,0026 **	<0,0001 ****	0,0153 *
Massa Fresca dos frutos	0,0001 ***	0,0010 **	<0,0001 ****
Diâmetro dos frutos	0,5448 NS	0,0005 ***	0,0014 **

Tabela 8: Resumo da análise de variância, para % sólidos solúveis (°Brix) e textura dos frutos das linhagens *WT*, *dgt* e *Nr* de Micro-Tom, em fase de antese e em fase de frutos maduros, considerando diferença significativa de $P \leq 0,05$ pelo teste de Tukey.

Análise de Produtividade	Fonte de variação		
	Tratamentos X Concentração de Al	Tratamentos Linhagens / [Al]	Dias após germinadas
	P valor		
% Sólidos Solúveis (°Brix)	0,0338 *	<0,0001 ****	0,1582 NS
Textura	0,0649 NS	<0,0001 ****	0,1534 NS

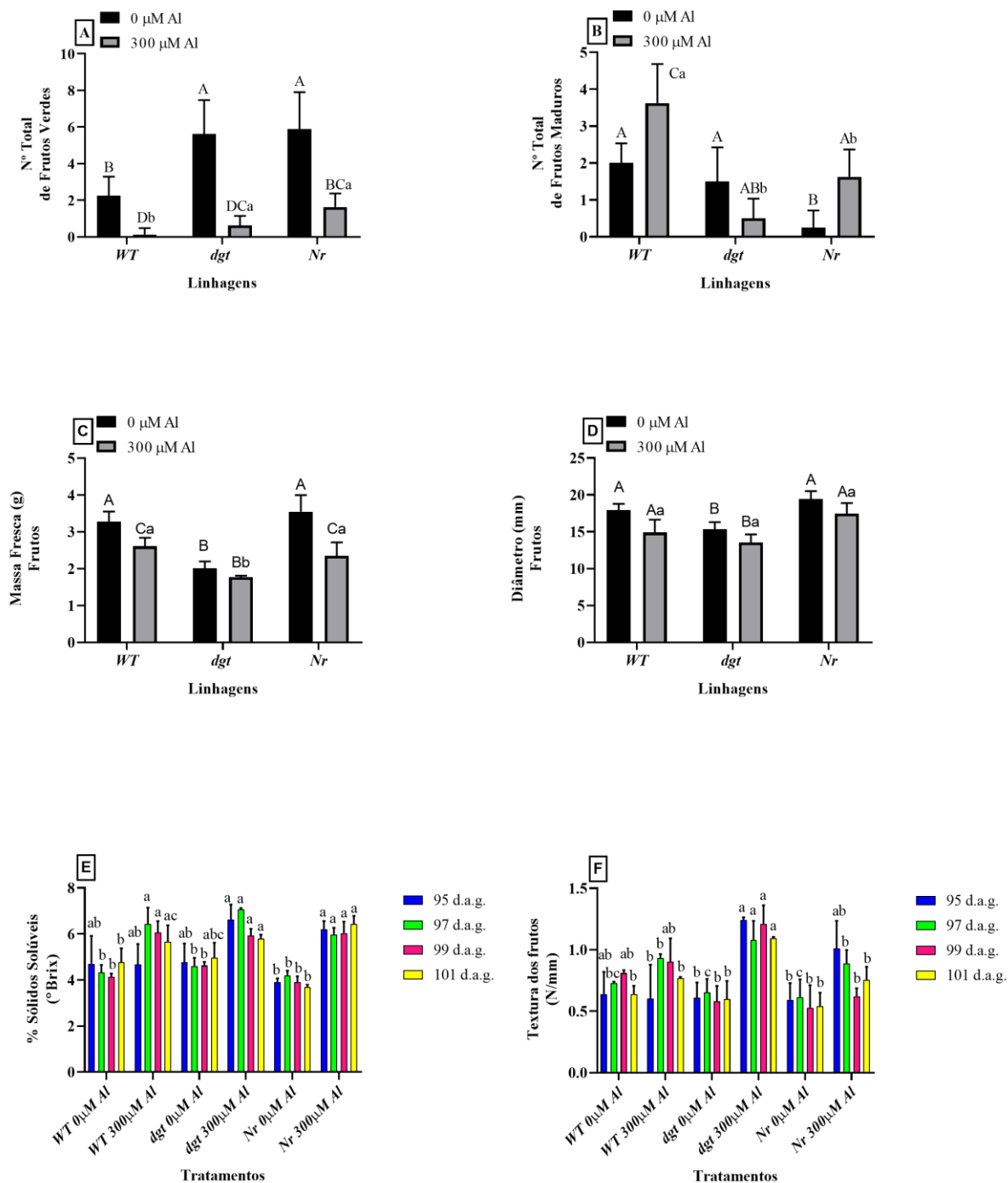


Figura 10: (A) N° total de Frutos verdes; (B) N° total de frutos maduros; (C) Massa fresca dos frutos; (D) diâmetro dos frutos; (E) % sólidos solúveis (°Brix) e (F) textura dos frutos das linhagens *WT*, *dgt* e *Nr* de Micro-Tom, considerando diferença significativa de $P \leq 0,05$ pelo teste de Tukey. As letras maiúsculas comparam os tratamentos das linhagens dentro do tratamento de $0\mu\text{M Al}$ e as letras minúsculas comparam as linhagens dentro do tratamento de $300\mu\text{M Al}$.

Capítulo 3: Uso do gene repórter *GUS*, para avaliação da transcrição de auxina e etileno, em plantas transgênicas do microtomateiro MicroTom cultivadas na presença de alumínio.

Resumo: A toxicidade do alumínio (Al) afeta o crescimento radicular e reduz a produtividade vegetal em solos ácidos. Neste trabalho foram testadas as hipóteses de que frutos do microtomateiro Micro-Tom (MT), transgênicos para auxina e etileno, são afetados em diferentes estágios de desenvolvimento quando cultivados sob toxicidade por Al. Foi testado também se a expressão desses hormônios é realizada de forma sincronizada para o desenvolvimento do fruto e da semente. A síntese desses hormônios foi avaliada através da expressão dos promotores de transcrição fusionados ao gene repórter *GUS*. As linhagens de MT, *WT*, *pDR5::GUS* e *pEBS::GUS* foram avaliadas quanto ao crescimento das raízes e parte aérea, lignificação das raízes, expressão da enzima β -glucuronidase fusionada aos genes promotores da transcrição e atividade da enzima em frutos de 5 e 8mm e maduros. Os resultados indicaram que o Al altera crescimento e desenvolvimento da parte aérea e raízes nas linhagens *pDR5::GUS* e *pEBS::GUS*. Além disso, foi observado nos frutos a expressão dos promotores de auxina e etileno de forma antagônica nos estágios de desenvolvimentos avaliados. A atividade da enzima β -glucuronidase foi mais elevada nos frutos de 5mm e maduros na linhagem *pDR5-GUS* e mais elevada nos frutos de 8mm em *pEBS-GUS*, indicando sinalização dos hormônios em resposta ao Al através da indução do prolongamento no amadurecimento do fruto e desenvolvimento da semente. Os resultados podem auxiliar com as pesquisas que buscam o entendimento dos mecanismos de ação do Al em plantas e a adaptação à condição desse estresse, além de sugerir a incorporação de genes para o melhoramento genético e melhor desempenho de plantas em solos com elevada saturação por Al.

Palavras-chaves: Estresse abiótico, fitohormônios, desenvolvimento vegetal, tomate.

Use of the GUS reporter gene for the evaluation of auxin and ethylene transcription in transgenic plants of the MicroTom microtomato plant grown in the presence of aluminum.

Abstract: Aluminum (Al) toxicity affects root growth and reduces plant productivity in acidic soils. In this work, the hypotheses were tested that fruits of the MicroTom (MT) microtomato plant, transgenic for auxin and ethylene, are affected at different stages of development when cultivated under Al toxicity. It was also tested whether the expression of these hormones is carried out in a synchronized way for the development of the fruit and the seed. The synthesis of these hormones was evaluated through the expression of transcription promoters fused to the *GUS* reporter gene. The MT, WT, *pDR5::GUS* and *pEBS::GUS* lines were evaluated for root and area growth, root lignification, expression of the β -glucuronidase enzyme fused to transcription-promoting genes, and enzyme activity in fruits of 5 and 8mm and mature. The results indicated that Al alters shoot and root growth and development in *pDR5::GUS* and *pEBS::GUS* line. In addition, the expression of auxin and ethylene promoters was observed in the fruits in an antagonistic way in the evaluated developmental stages. The activity of the β -glucuronidase enzyme was higher in the 5mm and mature fruits in the *pDR5-GUS* line, and higher in 8mm fruits in *pEBS-GUS*, indicating hormone signaling in response to Al through induction of prolonged fruit ripening and seed development. The results can help with research that seeks to understand the mechanisms of action of Al in plants and the adaptation to this stress condition, in addition to suggesting the incorporation of genes for genetic improvement and better performance of plants in soils with high saturation by Al .

Keywords: Abiotic stress, phytohormones, plant development, tomato.

Introdução

Em plantas a toxicidade por alumínio (Al^{3+}) é um dos principais problemas de estresse abiótico em solos ácidos com elevada saturação pelo metal (Singh *et al.*, 2017). A inibição do crescimento radicular é considerada o sintoma primário da toxicidade, e isso afeta o crescimento e o desenvolvimento levando à redução da produtividade vegetal (Rahman e Upadhyaya, 2021).

Muitas pesquisas avançaram na elucidação dos mecanismos de tolerância e ou resistência ao alumínio, ou seja, como as plantas crescem e se adaptam quando encontram o Al em concentração tóxica no solo (Liu *et al.*, 2014). Porém ainda há muito por esclarecer sobre a ligação do Al com moléculas e estruturas celulares e as vias de sinalização do estresse pelas plantas (Liu *et al.*, 2014; He *et al.*, 2015).

Em revisão, Kopittke (2016), relata que vários estudos têm demonstrado a importância de aumentos rápidos de etileno (Eto) e auxina (AIA) nos ápices das raízes, e como esses hormônios, podem levar à inibição do afrouxamento da parede e alongamento celular, regulando a liberação de ácidos orgânicos para complexar o Al na região da rizosfera. Sun *et al.* (2010), utilizaram mutantes defectivos na sinalização de Eto e no transporte polar de AIA, além de inibidores da síntese de Eto e de percepção do transporte polar de AIA, para analisar o efeito desses hormônios no alongamento celular na presença do Al. Esses autores evidenciaram que o Al altera os padrões de acúmulo e distribuição de AIA nas raízes, e contribui para a inibição do alongamento radicular. Eles concluíram que esse processo pode também ter o envolvimento do Eto, pois o Al provocou mudanças na distribuição de AIA afetando, transportadores de influxo e efluxo desse hormônio, como *AUX1* e *PIN2*. E isso indicou que a interrupção da distribuição de AIA induzida por Al é um evento posterior a produção de Eto induzida por Al.

Apesar destas descobertas, ainda não há registro de pesquisas realizadas para avaliar o controle da modulação hormonal induzidas por Al, no desenvolvimento de frutos. Uma poderosa ferramenta para auxiliar nestes estudos é o uso de promotores constitutivos de transcrição hormonal que pode ser utilizado para determinar e elucidar padrões de expressão de genes envolvidos com a expressão hormonal em células, tecidos e órgãos em plantas e especialmente em frutos. Segundo Tsunada (2018) promotores constitutivos são úteis para a produção da proteína de interesse em todos os tecidos e durante todo o desenvolvimento vegetal. Em exemplo disto, o promotor responsivo a auxina, *p-DR5*, vem sendo muito utilizado como ferramenta para monitoramento da localização tecidual de auxina ou sinalização de auxina (Ulmasov *et al.*, 1997).

Desta forma, a investigação da expressão dos hormônios AIA e Eto, utilizando plantas transgênicas, construídas com marcadores de genes promotores de transcrição hormonal em frutos pode auxiliar na análise da síntese e distribuição hormonal nos tecidos dos frutos, assim como nos tecidos das raízes de plantas afetadas pela toxicidade por Al. Segundo Jefferson *et al.* (1987) o gene da enzima β -glucuronidase, é considerado um marcador, também chamado de gene repórter, e muito utilizado para construções transgênicas em plantas. Esse gene foi clonado e sequenciado e codifica uma enzima estável que possui propriedades desejáveis para a construção e análise de fusões de genes. Os autores ainda ressaltam que esse método de investigação com marcadores de genes promotores é fácil, sensível e barato e que pode ser testado *in vitro* e também pode ser analisado histoquimicamente na localização da atividade enzimática GUS, transcrita juntamente com os promotores fusionados de interesse.

O gene β -glucuronidase tem sido incorporado na construção genética do Micro-Tom, um cultivar de tomate mutante, da espécie *Solanum lycopersicum*. Segundo Emmanuel e Levy (2002), esse cultivar é uma planta modelo, que vem sendo muito utilizada para estudos

genéticos e de fisiologia, por inclusive já ter sido desenvolvido vários mutantes que apresentam alterações no metabolismo e/ou sensibilidade a diferentes hormônios.

Algumas pesquisas associando o Micro-Tom com toxicidade ao Al já foram realizadas, mas poucas relacionam os efeitos do metal ao desenvolvimento de frutos. O entendimento da ação do Al na síntese de hormônios em frutos pode ajudar a elucidar mecanismos envolvidos na toxicidade do Al nas plantas. Sasaki *et al.* (2016) investigaram dois genes da família de transportadores de malato ativados por Al; *SIALMT4* e *SIALMT5* foram expressos durante o desenvolvimento dos frutos em plantas de MicroTom observados através de transformação genética e uso do gene *GUS*. Os autores relataram que houve a expressão dos dois genes nos feixes vasculares e nas sementes de frutos maduros.

A exsudação radicular de ácidos orgânicos, como malato e citrato, é um dos mecanismos de resistência mais conhecido e está associado com a complexação do Al na rizosfera (Liu *et al.*, 2014). Esse mecanismo é mediado por AIA, que estimula a atividade de H⁺-ATPases de membrana plasmática (Wang *et al.*, 2013 e 2016). Estas pesquisas têm orientado novas descobertas em resposta à sinalização do Al ao longo do desenvolvimento de frutos.

O desenvolvimento do fruto ocorre em de acordo com a modulação de vários hormônios. Em frutos climatéricos, como o tomate e de acordo com Trainotti *et al.* (2007) várias linhas de evidência sugerem que tanto o Eto quanto AIA estão envolvidos no *crossstalk* entre si durante o amadurecimento.

As AIAs participam desde a formação do fruto após a fertilização com a formação do carpelo, da placenta e dos óvulos, até na fase de desenvolvimento da semente (Robert *et al.*, 2015; Olimpieri *et al.*, 2007). Na fase do amadurecimento, há um declínio da síntese de AIA, citocinina e giberelina, e um aumento de ácido abscísico e Eto, ocasionando no transporte de açúcares, redução da acidez e alteração da cor e aroma do fruto (Klee e Giovannoni, 2011).

Trainotti *et al.* (2007) também demonstraram a existência de um importante *cross-talk* entre AIA e Eto, com genes no domínio de AIA regulado por Eto e genes no domínio etileno regulado pela AIA nessa fase do desenvolvimento.

Neste trabalho foi testada a hipótese de que frutos de plantas transgênicas cultivadas em solução contendo Al e em estágios diferentes de desenvolvimento podem sofrer alterações na síntese de AIA e Eto, e a expressão desses hormônios pode ser realizada de forma sincronizada no desenvolvimento de frutos e sementes.

O objetivo do trabalho foi avaliar a produção de AIA e Eto através da expressão dos promotores de transcrição fusionados ao gene repórter *GUS*, para a transcrição desses hormônios em plantas transgênicas de Micro-Tom cultivadas em hidroponia com Al.

Materials e métodos

Cultivo das plantas

O cultivo das plantas foi desenvolvido no Departamento de Botânica da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG) em Belo Horizonte / MG. Foram utilizadas linhagens do microtomateiro MicroTom mutantes hormonais para auxina (AIA) e etileno (Eto), além do cultivar selvagem *WT*. Os experimentos foram conduzidos em câmara de crescimento em cultivo hidropônico. A caracterização dos mutantes hormonais encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1: Caracterização das linhagens de mutantes de MicroTom para auxina e etileno

Linhagem Mutante	Caracterização	Referência
MT- <i>pDR5::GUS</i>	Gene repórter <i>GUS</i> fusionado a um promotor de transcrição para auxina	Ulmasov <i>et al.</i> , 1997
MT- <i>pEBS::GUS</i>	Gene repórter <i>GUS</i> fusionado a um promotor de transcrição para etileno	Stepanova <i>et al.</i> , 2007

Sementes das três linhagens do cv. Micro-Tom (*Solanum lycopersicum* L.), selvagem MT-*WT* (Wild Type), MT-*pDR5::GUS* e MT-*pEBS::GUS* foram colocadas para germinar em potes plásticos descontaminados, contendo a mistura de substrato comercial BioPlant e vermiculita média na proporção de 1:1 (V/V) e a germinação das sementes ocorreu em sala de crescimento, sob condições de bancada com estrutura de luz artificial, de condição de luminosidade de aproximadamente $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 12 h e 90% de umidade.

Após 7 dias da germinação, as plântulas com 2 pares de folhas verdadeiras foram individualizadas e transferidas para caixas de acrílico pretas de tamanho de 42,5 cm de comprimento x 10,5 cm de altura x 12,0 cm de largura, e com capacidade para 5 L de solução nutritiva para o cultivo hidropônico. As caixas foram preenchidas com solução nutritiva de Watanabe e Osaki (2001) para o cultivo hidropônico, e as plantas permaneceram suspensas em suporte de borracha EVA (Etil Vinil Acetato). Inicialmente as plantas permaneceram por sete dias, com a metade da força iônica desta solução nutritiva, para aclimação. Todo o cultivo hidropônico foi conduzido em sala de crescimento, nas mesmas condições de luminosidade, fotoperíodo e umidade que foram germinadas.



Figura 1: Plantas em cultivo hidropônico e diferentes concentrações de alumínio

Após a aclimatação, a solução hidropônica inicial foi substituída pela mesma solução com 100% de força iônica e iniciou-se a exposição ao cloreto de alumínio (AlCl_3). Foram definidas 8 plantas para cada tratamento: 0 (controle) e $300 \mu\text{M Al}$. As soluções nutritivas com e sem Al foram trocadas uma vez por semana, para manutenção do aporte de nutrientes, e o pH corrigido para 4,3. Este procedimento se repetiu até o encerramento do cultivo aos 110 dias após a germinação (d.a.g).

Parâmetros de crescimento e desenvolvimento

O material vegetal foi separado em parte aérea e radicular para avaliação do crescimento da raiz e da parte aérea. Foram utilizadas as 8 (oito) plantas para análise do sistema radicular e parte aérea.

As raízes das plantas das três linhagens foram individualizadas e dispostas em uma cuba de acrílico de 20 cm de largura por 30 cm de comprimento, contendo água destilada, e a morfologia de cada raiz foi analisada utilizando o sistema WinRHIZO Pro acoplado a um scanner profissional Epson XL 10000 equipado com unidade de luz adicional. Foi utilizada uma definição de 400 dpi, como descrito por Bouma *et al.* (2000). As características morfológicas radiculares avaliadas foram o comprimento total de raiz (cm); diâmetro médio de raiz (mm) e volume de raiz total (cm³). Além disso, foram realizadas classificações de raízes por três classes de diâmetro, como proposto por Bhom (1979), que forneceram comprimento de raiz e volume de raízes muito finas ($\varnothing < 0,5$ mm); finas ($0,5$ mm $< \varnothing < 2$ mm) e grossas ($\varnothing > 2$ mm).

A área foliar foi medida considerando 8 plantas por tratamento. Utilizou-se o integrador de área foliar modelo Li-3100.

Análise histoquímica de lignina

Para a análise do acúmulo de lignina foram escolhidos três fragmentos de raízes laterais de todas as plantas (Figura 2) das três linhagens, *WT*, *DR5-GUS* e *EBS-GUS*, e seccionadas com auxílio de um estilete.



Figura 2: Região selecionada (elipse) da raiz para as três linhagens, *WT*, *DR5-GUS* e *EBS-GUS*, para análise histoquímica de lignina.

As raízes foram avaliadas com o emprego da técnica histoquímica de coloração e identificação da lignina com o corante ácido floroglucinol (solução A- 2% floroglucina e solução B-25% de ácido clorídrico aplicado por 5 min) como descrito por Johansen, (1940). As raízes foram observadas no Laboratório de Sistemática do Departamento de Botânica ICB/UFMG, em lupa da marca ZEISS (Modelo Stemi 508), com câmera acoplada da marca ZEISS (modelo AXIOCAM 105 Color) e para o processamento das imagens foi utilizado o software Zen 2 da marca ZEISS.

Análise histoquímica da enzima repórter (GUS) β -glucuronidase

A análise histoquímica de GUS (β -glucuronidase) foi realizada nos frutos de *WT*, *DR5-GUS* e *EBS-GUS*. Foram utilizados os frutos em três estágios de desenvolvimento. Os frutos foram retirados das plantas durante o período da frutificação sendo frutos verdes com 5 e 8 mm de diâmetro e frutos maduros de estágio *Orange* de amadurecimento (Gillaspy *et al.*, 1993). Foram coletados três frutos de cada planta (8 plantas), para serem submetidos à coloração histoquímica de GUS de acordo com o método descrito por Jefferson *et al.* (1987) com algumas modificações.

Os frutos, em cada estágio de desenvolvimento foram colocados imersos por 5min em recipientes plásticos individuais, contendo 300 μ M de solução de GUS (100 mM de solução tampão de fosfato de sódio, em pH 7,0; 10 mM de EDTA em pH 8,0; 0,5 mM de ferrocianeto de potássio, 0,5 mM de ferricianeto de potássio; 0,05% de Triton X-100 e 10 mg mL⁻¹ de X-Gluc [5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronideo] em 500 μ M de DMSO). Em seguida foram incubados a 37 °C em estufa no escuro por 12 h, e posteriormente lavados com água destilada e incubados em etanol 70%. A observação da reação histoquímica nos frutos foi realizada em lupa da marca ZEISS (modelo Stemi 508), com câmera acoplada da marca

ZEISS (AXIOCAM 105 Color), e para o processamento das imagens foi utilizado o software Zen 2 (ZEISS).

Segundo Jefferson (1987), na presença da enzima β -glucuronidase, o substrato X-gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronídeo cicloexil amina) é clivado e o produto desta reação, na presença de oxigênio, forma dímeros resultando em um precipitado insolúvel de cor azul. Logo, a ocorrência da cor azul nas células e tecidos nos frutos das linhagens testadas neste trabalho foi interpretada como reação positiva.

Quantificação da atividade da enzima repórter β -glucuronidase (GUS)

A atividade da enzima GUS foi avaliada em frutos coletados e processados em laboratório para quantificação total das proteínas (Bradford, 1976) e do ensaio fluorimétrico (Lana *et al.*, 2017). Foram coletados três frutos maduros, de estágio *Orange* de amadurecimento (Gillaspy *et al.*, 1993) de cada planta, para preparo de uma amostra composta para análise. Através do ensaio fluorimétrico, reação abaixo, foi possível identificar a formação do composto 4-metilumbeliferona (MU), que apresenta fluorescência máxima em pH alto, resultante da reação entre o composto 4-metilumbeliferil- β -D-glicuronídeo e a enzima GUS, e os resultados expressos em $\mu\text{mol de MU/min/mg de proteína}$.



Para análise de proteínas totais nos frutos foi necessário o ajuste nas concentrações de albumina de soro bovino (BSA), incluindo mais 4 pontos de análise para o preparo da curva

padrão. Os valores das concentrações para obtenção da curva padrão foram: 4, 3, 2, 1,4, 1,2, 1,0, 0,8, 0,5, 0,3, 0,1 e 0 mg mL⁻¹.

Análise estatística

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado e os resultados analisados com o programa GraphPad Prism versão 8.01, utilizando análise de variância two-way ANOVA, no arranjo fatorial de 2 (concentrações de alumínio) x 3 (linhagens), seguido por múltiplas comparações. Para a análise estatística do resultado da quantificação da atividade da enzima repórter β -glucuronidase (GUS) foi considerado o arranjo fatorial de 3 (tratamentos: Linhagens / [Al]) x 3 (estágios de desenvolvimento dos frutos). Considerou-se para todas as análises o teste estatístico de Tukey para a comparação das médias e a avaliação das interações entre as concentrações de Al e as linhagens. Para todas as avaliações foram consideradas diferença significativa de $P \leq 0,05$ e as figuras para os dados quantitativos elaboradas com o mesmo programa.

Resultados

Parâmetros de crescimento e desenvolvimento

Os resultados encontrados indicaram os efeitos do Al nas raízes e na parte aérea nas três linhagens de MT. De maneira geral não houve diferença entre as linhagens, em relação aos parâmetros analisados. Porém, a presença do Al em solução possibilitou o surgimento dos sintomas do estresse associados ao crescimento da parte aérea e das raízes (Figuras 3, 4 e Tabela 2). Visualmente foi também possível perceber essas diferenças (Figura 5).

Quando comparadas as plantas cultivadas com e sem alumínio, foi possível observar a redução significativa, da área foliar, comprimento total das raízes e volume das raízes

(Figuras 3A, 3B e 3D) nas plantas de todas as linhagens quando cultivadas com 300 μ M Al, enquanto que houve aumento significativo do diâmetro das raízes das plantas de todas as linhagens (Figura 3C).

A análise do diâmetro diferencial das raízes, demonstrou que o Al reduziu de forma significativa o comprimento e o volume radicular. Apesar disto, o comprimento das raízes mais finas (Figura 4A) foi maior que o das raízes de diâmetro fino (Figura 4B) e o das raízes de diâmetro maior (Figura 4C). Enquanto que, as raízes mais grossas (Figura 4D) apresentaram maior volume que as raízes finas (Figura 4E) e muito finas (Figura 4F).

Análise histoquímica de lignina

A análise histoquímica por floroglucina possibilitou a identificação das regiões nos tecidos das raízes com depósito de lignina. E foi possível observar que as raízes laterais das três linhagens apresentaram a região de tecido vascular (V) coradas com floroglucina (Figura 6). Porém, as raízes das plantas de todas as linhagens apresentaram coloração mais intensa em toda a superfície radicular, incluindo a epiderme (Figura 6B, 6D e 6F).

E em observação da estrutura das raízes também foi possível notar várias regiões com ramificações laterais pouco desenvolvidas nas três linhagens. E estas regiões também se encontraram fortemente corados por floroglucina, indicando a presença da lignina.

Análise histoquímica da enzima repórter β -glucoronidase (GUS)

A análise histoquímica com a enzima repórter β -glucoronidase (GUS) dos frutos foi possível identificar as regiões de tecidos que demonstraram a reação positiva para a solução de

GUS, e esta reação positiva refletiu a expressão do gene promotor *GUS* referente ao hormônio associado com a construção transgênica de cada linhagem.

A linhagem selvagem *WT*, funcionou como o controle negativo para a análise histoquímica de GUS por não ter o gene GUS fusionado a nenhum promotor em sua constituição genética. E como esperado, não apresentou a coloração característica de GUS, em nenhuma região de tecido dos frutos de 5 e 8mm e aqueles maduros (Figura 7), de plantas cultivadas com e sem Al.

A linhagem *DR5-GUS* demonstrou reação positiva para a histoquímica de GUS, em todas as fases de desenvolvimento avaliadas. Porém, foi evidenciado uma coloração mais acentuada nos frutos de 5e 8mm nas plantas cultivadas sem Al (Figura 8A e 8B), principalmente na região do pedúnculo (PD), da columela (CL), da placenta (PL), do mesocarpo (M) bem próximo ao endocarpo (EN) e da região próxima da semente (S). Na presença do Al as plantas de *DR5-GUS* com 5 e 8mm (Figuras 8D e 8E), continuaram a apresentar a reação positiva de GUS para as mesmas regiões de tecidos, principalmente na placenta próximo das sementes. E para o fruto maduro de plantas de *DR5-GUS*, cultivadas sem Al (Figuras 8C) foi possível observar a reação positiva de GUS restrita à região do pedúnculo e da columela. Enquanto que nos frutos maduros das plantas de *DR5-GUS*, cultivadas com Al a reação ocorreu nas regiões do pedúnculo, da columela e da placenta próxima da semente (S) (Figura 8F).

A linhagem *EBS-GUS* mostrou reação positiva de GUS, nos frutos de 5 mm das plantas cultivadas sem e com Al (Figura 9A e 9D) de forma muito semelhante em todas as regiões de tecidos do órgão e de forma mais homogênea do que nos frutos de *DR5-GUS*. Nos frutos de 8 mm (Figuras 9B e 9E), a reação de GUS foi mais acentuada em todos as regiões do fruto, principalmente na região do exocarpo, mesocarpo próximo ao endocarpo, principalmente na ausência de Al. Enquanto que na presença do Al a reação positiva de GUS ocorreu em todo o

órgão, também de forma mais homogênea, e marcante principalmente na região dos vasos e da placenta. E nos frutos maduros das plantas da linhagem *EBS-GUS*, cultivadas sem AI (Figura 9C), não foi observada reação positiva de GUS, porém nos frutos maduros das plantas dessa linhagem cultivadas com AI foi observada reação positiva de GUS para as regiões do pedúnculo, dos vasos e da semente (Figura 9F).

Quantificação da Atividade da Enzima Repórter β -glucoronidase (GUS)

A atividade da enzima repórter β -glucoronidase apresentou-se de forma diferente para as linhagens testadas e a presença do AI também influenciou nos resultados (Figura 10).

Nos frutos das plantas da linhagem *DR5-GUS* a atividade da enzima GUS foi semelhante ao estágio de desenvolvimento de 5 mm em cultivo em ambos tratamentos de AI. Enquanto que, a atividade desta enzima foi mais acentuada nos frutos das plantas da linhagem *EBS-GUS* com 5 mm quando cultivadas sem AI, e mais elevada que o valor apresentado para os frutos da linhagem *DR5-GUS*, considerando a mesma condição de cultivo. Houve redução da atividade da enzima GUS nos frutos de 8 mm e de frutos maduros de plantas da linhagem *DR5-GUS* cultivadas com AI.

Para os frutos de 5 mm das plantas da linhagem *EBS-GUS* houve redução da atividade da enzima GUS, quando cultivadas com AI, e para os frutos de 8 mm a concentração de AI não influenciou na atividade da enzima. Além disso, os valores para os frutos de 8 mm das plantas da linhagem *EBS-GUS* também foram bem mais elevados que os valores apresentados para os frutos da linhagem *DR5-GUS* nas mesmas condições de cultivo. No estágio maduro dos frutos das plantas de *EBS-GUS* não foram observados atividade da enzima GUS quando cultivados sem AI. Porém os frutos das plantas de *EBS-GUS* cultivadas em solução com AI demonstraram atividade da enzima GUS.

Discussão

As diferenças encontradas entre os mutantes MT para o crescimento e desenvolvimento das raízes e da parte aérea das plantas das três linhagens confirmaram os achados na literatura, como documentam Sasaki *et al.* (1996), Horst *et al.* (2010), Singh *et al.* (2017) e Rahman *et al.* (2018), para os estudos envolvendo outras espécies sensíveis ao Al, e que mostram redução do alongamento radicular, aumento da espessura das raízes, diminuição do crescimento da parte aérea entre outros sintomas associados com a toxidez induzida por Al. As plantas das três linhagens avaliadas mostraram comportamento semelhante quando submetidas ao Al, quanto à redução da área foliar, redução do crescimento radicular, espessamento das raízes, redução do volume das raízes muito finas e finas e aumento do volume das raízes mais grossas. Esses efeitos semelhantes para as raízes e parte aérea, das plantas dessas três linhagens, refletem a construção genética dessas plantas, e reforçam o que as diferenciam, ou seja, apenas a presença do gene repórter *GUS* fusionado ao gene promotor para transcrição dos hormônios AIA, para a linhagem *DR5-GUS*, e *Eto*, para a linhagem *EBS-GUS*. Então o que se esperava era exatamente que o comportamento dessas linhagens na presença do Al, fosse semelhante ao comportamento da linhagem selvagem *WT*. O que foi confirmado nas investigações desse trabalho.

A análise histoquímica para identificação de lignina também foi importante para confirmar o que a literatura tem documentado a respeito da fitotoxicidade do Al em relação às raízes. Segundo Yoon *et al.* (2015) a lignina é um polímero hidrofóbico aromático de natureza fenólica que impregna nas redes de celulose e hemicelulose da parede celular, enrijecendo a célula e protegendo-a de interferências externas físicas e biológicas. A análise do processo de lignificação das raízes foi importante para auxiliar também no entendimento da redução de crescimento das raízes provocada pelo Al, pois isso pode estar associado ao aumento da

rigidez da parede celular, como relatado em plantas de trigo e milho (Sasaki *et al.*, 1996; Budikova, 1999), o que acaba por interferir nos processos de transporte de água e minerais, no metabolismo e até mesmo influenciar os processos de divisão celular. Kopittke *et al.* (2008) sugeriram que as raízes de plantas cultivadas com Al podem ter a ruptura da parede celular das células que compõem as raízes, devido ao aumento da rigidez. Esse processo ocorre devido a ligação do Al à parede celular, e que conseqüentemente leva à perda da elasticidade da célula.

As três linhagens de Micro-Tom testadas mostraram também menor desenvolvimento de raízes laterais em conseqüências à toxicidade de Al. De acordo com Macedo (2011), o acúmulo de Al ocorre preferencialmente no sistema radicular reduzindo então seu crescimento causando aumento no diâmetro das raízes e redução do número de raízes laterais. E esses sintomas podem ser um efeito indireto do déficit hídrico determinado pela resposta à toxicidade do Al. Segundo Kauffmann & Gardner (1978) em condições de cultivo no solo o excesso de Al na região das raízes freqüentemente impede o seu desenvolvimento nas zonas mais profundas do solo. E por este motivo ocorre maior expansão das raízes laterais em comparação com a raiz principal.

A histolocalização da expressão do gene repórter GUS fusionado ao promotor de transcrição de AIA e Eto, permitiu que fossem reconhecidas as regiões de tecidos que estavam expressando AIA e Eto nos frutos das linhagens de Micro-Tom investigadas. Sendo assim, o gene *GUS* sob controle do promotor *pDR5* demonstrou expressão da AIA, identificada pela cor azul da reação enzimática entre glucoronidase com o substrato X-Gluc, como relatado, para as regiões de tecidos dos frutos das plantas da linhagem *DR5-GUS*, com 5 e 8mm, indicando que nestes locais o transporte e a maior ação desse hormônio poderia estar ocorrendo. Além disso, os frutos maduros de plantas da linhagem *DR5-GUS* cultivadas sem e com alumínio

demonstraram menor intensificação da reação de GUS em algumas regiões de tecidos. Achon Forno (2017), investigando sobre o controle hormonal no desenvolvimento de frutos de Micro-Tom, evidenciaram que AIA é produzida em maior quantidade nos frutos em fases entre 10 e 15 d.p.a, com maior expressão do *p-DR5::GUS*, nas regiões do pedúnculo e da placenta. E ainda que a AIA pode ser expressa nestas regiões dos frutos até 25 d.p.a. e que depois disso somente a região da semente apresenta concentração maior de AIA. Neste trabalho, a presença de Al possibilitou identificar também na região da placenta próxima da semente, coloração azul, evidenciando a expressão do *p-DR5::GUS*, inclusive em frutos maduros.

Estes resultados podem ser associados de forma complementar aos resultados encontrados por Sasaki *et al.* (2016) que investigando os genes *SIALMT4* e *SIALMT5* da família de transportadores de malato ativados por Al e expressos durante o desenvolvimento dos frutos de Micro-Tom, observaram a expressão dos dois genes nos feixes vasculares e nas sementes de frutos maduros. Segundo Wang *et al.* (2013 e 2016) o mecanismo de exsudação de malato e citrato é mediado pelo hormônio AIA, que estimula o aumento da atividade de H^+ -ATPases uma enzima da membrana plasmática, permitindo sugerir que as regiões dos frutos marcados por *p-DR5::GUS*, são as mesmas identificadas por Sasaki *et al.*, (2016).

E o gene GUS sob controle do promotor *pEBS* demonstrou expressão do Eto, identificada pela cor azul da reação enzimática, em todos os tecidos dos frutos com 5 e 8mm, além disso, nos frutos maduros das plantas submetidas ao Al foi observada reação positiva de GUS na região da semente, o que não ocorreu nos frutos das plantas cultivadas sem Al, indicando possível influência do Al estimulando a expressão do Eto nos frutos maduros ainda nesta fase. Esses resultados para a linhagem *EBS-GUS* no cultivo sem Al se assemelham aos resultados encontrados por Achon Forno (2017), que demonstrou para os frutos de *EBS-GUS*, não haver

expressão do *p-EBS-GUS* nas sementes de frutos com desenvolvimento inicial de 10 até 30 d.p.a, e que a expressão foi observada apenas aos 10 d.p.a., na placenta e no pericarpo, e depois diminuiu para um nível basal semelhante aos frutos com desenvolvimento inicial de 10 até 30 d.p.a.

A atividade da enzima GUS analisada possibilitou a confirmação dos resultados encontrados através da histolocalização da expressão do gene repórter *GUS* fusionado ao promotor de transcrição responsivo para AIA e Eto. Foi possível observar que o AI promoveu a redução da enzima GUS nos frutos de 8mm e nos maduros da linhagem *DR5-GUS*, indicando que houve redução da transcrição do gene responsivo para AIA para os frutos nesse estágio do desenvolvimento. Por outro lado, AI induziu a redução da atividade GUS nos frutos das plantas da linhagem *EBS-GUS* no estágio de desenvolvimento de 5 mm, indicando redução da transcrição do gene responsivo para Eto nesta fase. E em fase de frutos maduros, AI induziu elevação da atividade enzima GUS, demonstrando aumento também na transcrição do gene responsivo para Eto nesta fase. Gillaspay *et al.* (1993) relataram aumentos no teor de AIA em frutos de tomate na fase de maturação de forma semelhante para a produção de Eto em frutos climatéricos o que não foi observado nas plantas neste estudo.

Os resultados sugerem que o AI pode estar contribuindo para prolongamento do período de amadurecimento dos frutos, e que uma regulação desses dois hormônios ocorre estimulada pelo AI de forma sinalizadora ao estresse. Afinal a transcrição do gene responsivo para AIA permanece ao longo do desenvolvimento dos frutos sem grandes alterações, talvez por manter o desenvolvimento da semente, enquanto a transcrição do gene responsivo para Eto se reduz muito na fase inicial do desenvolvimento e retornando no final da fase do amadurecimento dos frutos. Esses resultados também podem indicar uma resposta sincronizada, porém antagônica desses dois hormônios. Recentemente, Tobaruela *et al.* (2021) também relataram

resposta antagônica em frutos de Micro-Tom quanto à avaliação da produção de compostos voláteis na fase do amadurecimento. E Su *et al.* (2015) e Li *et al.* (2016) demonstraram que AIA foi detectada atuando como um repressor do amadurecimento diferentemente do Eto que tem a função de promover a indução do amadurecimento dos frutos.

Conclusões

Os resultados indicaram que linhagens transgênicas de Micro-Tom construídas com promotores fusionados com o gene GUS para os hormônios auxina (*pDR5::GUS*) e etileno (*pEBS::GUS*) apresentam alterações de crescimento e desenvolvimento da parte aérea e radicular em consequência da toxicidade induzida por Al. Além disso, foi possível observar que os frutos das plantas submetidas ao alumínio apresentaram expressão dos promotores dos hormônios AIA para *p-DR5::GUS* e Eto para *p-EBS::GUS* de forma antagônica nos estágios de desenvolvimentos avaliados, e a atividade da enzima β -glucoronidase foi mais elevada nos frutos de 5 mm e maduros na linhagem *DR5-GUS*, enquanto que a atividade dessa enzima foi maior para os frutos de 8 mm para a linhagem *EBS-GUS*, indicando que esses hormônios podem sinalizar uma condição de estresse favorecendo o amadurecimento do fruto e o prolongamento da formação da semente. Os resultados podem auxiliar com as pesquisas que buscam o entendimento dos mecanismos de ação do Al em plantas e como ocorre a adaptação à condição do estresse, além de sugerir a incorporação de genes ligados ao desenvolvimento no melhoramento genético para obtenção de plantas com melhor desempenho em solos com elevada saturação por Al.

Referências

- Achon Forno, I. (2017). Redefining the hormonal control of tomato (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) fruit development (Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo).
- Bhom, W. (1979). Methods of studying root systems. *New York: Springer-Verlag*. 189 p.
- Bouma, T. J., Nielsen, K. L., & Koutstaal, B. A. S. (2000). Sample preparation and scanning protocol for computerised analysis of root length and diameter. *Plant and soil*. **18**: 185-196.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. **72**: 248-254.
- Budíková, S. (1999). Structural changes and aluminium distribution in maize root tissues. *Biologia plantarum*. **42**: 259-266.
- Emmanuel, E., & Levy, A. A. (2002). Tomato mutants as tools for functional genomics. *Current opinion in plant biology*. **5(2)**: 112-117.
- Gillaspy, G., Ben-David, H., & Gruissem, W. (1993). Fruits: a developmental perspective. *The Plant Cell*. **5(10)**: 1439.
- Horst, W. J., 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(1)**: 185-197.
- He, H., He, L., & Gu, M. (2015). Signal transduction during aluminum-induced secretion of organic acids in plants. *Biologia plantarum*. **59(4)**: 601-608.
- Johansen, D. A. (1940). Plant microtechnique. *McGraw-Hill Book Company, Inc*: London. 530p.

- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., & Bevan, M. W. (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO journal*. **6(13)**: 3901-3907.
- Kauffman, M. D., e Gardner, E. H. (1978). Segmental Liming of Soil and Its Effect on the Growth of Wheat 1. *Agronomy Journal*. **70(2)**: 331-336.
- Klee, H. J., & Giovannoni, J. J. (2011). Genetics and control of tomato fruit ripening and quality attributes. *Annual review of genetics*. **45**: 41-59.
- Kopittke, P. M., Blamey, F. P. C., & Menzies, N. W. (2008). Toxicities of soluble Al, Cu, and La include ruptures to rhizodermal and root cortical cells of cowpea. *Plant and Soil*. **303**: 217-227.
- Kopittke, P. M. (2016). Role of phytohormones in aluminium rhizotoxicity. *Plant, Cell & Environment*. **39(10)**: 2319-2328.
- Lana, U. D. P., Negri, B., & de Sousa, S. M. (2017). Quantificação da atividade da enzima repórter β -glucoronidase (GUS) em plantas. (Documentos / Embrapa Milho e Sorgo - .Sete Lagoas): 15 p.
- Li, J., Tao, X., Li, L., Mao, L., Luo, Z., Khan, Z. U., & Ying, T. (2016). Comprehensive RNA-Seq analysis on the regulation of tomato ripening by exogenous auxin. *PLoS One*. **11(5)**: e0156453.
- Liu, J., Piñeros, M. A., & Kochian, L. V. (2014). The role of aluminum sensing and signaling in plant aluminum resistance. *Journal of Integrative Plant Biology*. **56(3)**: 221-230.
- Macedo, F. L. D., Pedra, W. N., Silva, S. A. D., Barreto, M. C. D. V., & Silva-Mann, R. (2011). Efeito do alumínio em plantas de pinhão-mansó (*Jatropha curcas* L.), cultivadas em solução nutritiva. *Semina. Ciências Agrárias*. **32(1)**: 157-163.

- Olimpieri, I., Siligato, F., Caccia, R., Soressi, G. P., Mazzucato, A., Mariotti, L., & Ceccarelli, N. (2007). Tomato fruit set driven by pollination or by the parthenocarpic fruit allele are mediated by transcriptionally regulated gibberellin biosynthesis. *Planta*. **226**: 877-888.
- Rahman, M. A., Lee, S. H., Ji, H. C., Kabir, A. H., Jones, C. S., & Lee, K. W. (2018). Importance of mineral nutrition for mitigating aluminum toxicity in plants on acidic soils: current status and opportunities. *International journal of molecular sciences*. **19(10)**: 3073.
- Rahman, R., & Upadhyaya, H. (2021). Aluminium toxicity and its tolerance in plant: A review. *Journal of Plant Biology*. **64**: 101-121.
- Robert, H. S., Crhák Khaitová, L., Mroue, S., & Benková, E. (2015). The importance of localized auxin production for morphogenesis of reproductive organs and embryos in *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany*. **66(16)**: 5029-5042.
- Sasaki, M., Yamamoto, Y., & Matsumoto, H. (1996). Lignin deposition induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum*) roots. *Physiologia Plantarum*. **96(2)**: 193-198.
- Sasaki, T., Tsuchiya, Y., Ariyoshi, M., Nakano, R., Ushijima, K., Kubo, Y., Mori I. C., Higashiizumi E., Galis I. & Yamamoto, Y. (2016). Two members of the aluminum-activated malate transporter family, SIALMT4 and SIALMT5, are expressed during fruit development, and the overexpression of SIALMT5 alters organic acid contents in seeds in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Plant and Cell Physiology*. **57(11)**: 2367-2379.
- Singh, S., Tripathi, D. K., Singh, S., Sharma, S., Dubey, N. K., Chauhan, D. K., & Vaculík, M. (2017). Toxicity of aluminium on various levels of plant cells and organism: a review. *Environmental and Experimental Botany*. **137**: 177-193.

- Stepanova, A. N.; Yun, J.; Likhacheva, A. V.; Alonso, J. M. (2007). Multilevel interactions between ethylene and auxin in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell, Rockville*, **19** (19): 2169–2185.
- Su, L., Diretto, G., Purgatto, E., Danoun, S., Zouine, M., Li, Z., ... & Chervin, C. (2015). Carotenoid accumulation during tomato fruit ripening is modulated by the auxin-ethylene balance. *BMC plant biology*. **15**(1): 1-12.
- Sun, P., Tian, Q. Y., Chen, J., & Zhang, W. H. (2010). Aluminium-induced inhibition of root elongation in *Arabidopsis* is mediated by ethylene and auxin. *Journal of Experimental Botany*. **61**(2): 347-356.
- Tobaruela, E. D. C., Gomes, B. L., Bonato, V. C. D. B., Lima, E. S. D., Freschi, L., & Purgatto, E. (2021). Ethylene and auxin: Hormonal regulation of volatile compound production during tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit ripening. *Frontiers in Plant Science*. **2724**.
- Trainotti, L., Tadiello, A., & Casadoro, G. (2007). The involvement of auxin in the ripening of climacteric fruits comes of age: the hormone plays a role of its own and has an intense interplay with ethylene in ripening peaches. *Journal of Experimental Botany*. **58**(12): 3299-3308.
- Tsunada, Max Seiji. Promotores induzidos por seca em raízes de cana-de-açúcar ("*Saccharum*" spp.): Drought-inducible promoters in sugarcane roots ("*Saccharum*" spp.). 2018. 1 recurso online (p.) Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP. Disponível em: <https://hdl.handle.net/20.500.12733/1638698>.

- Ulmasov, T.; Murfett, J.; Hagen, G.; Guilfoyle, T.J. (1997). Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell*. **9**: 1963–1971.
- Wang Q, Nian F, Zhao L, Li F, Yang H, Yang Y (2013) Exogenous indole-3-acetic acid could reduce the accumulation of aluminum in root apex of wheat (*Triticum aestivum* L.) under Al stress. *J Soil Plant Nutr*. **13**:534–543.
- Wang P, Yu W, Zhang J, Rengel Z, Xu J, Han Q, Chen L, Li K, Yu Y, Chen Q (2016) Aluminium -induced citrate exudation through upregulation of GmMATE and activation of the plasma membrane H⁺- ATPase in soybean roots. *Ann Bot*. **118**(5):933–940.
- Yoon, J., Choi, H., & An, G. (2015). Roles of lignin biosynthesis and regulatory genes in plant development. *Journal of integrative plant biology*. **57**(11). 902-912.

Anexos

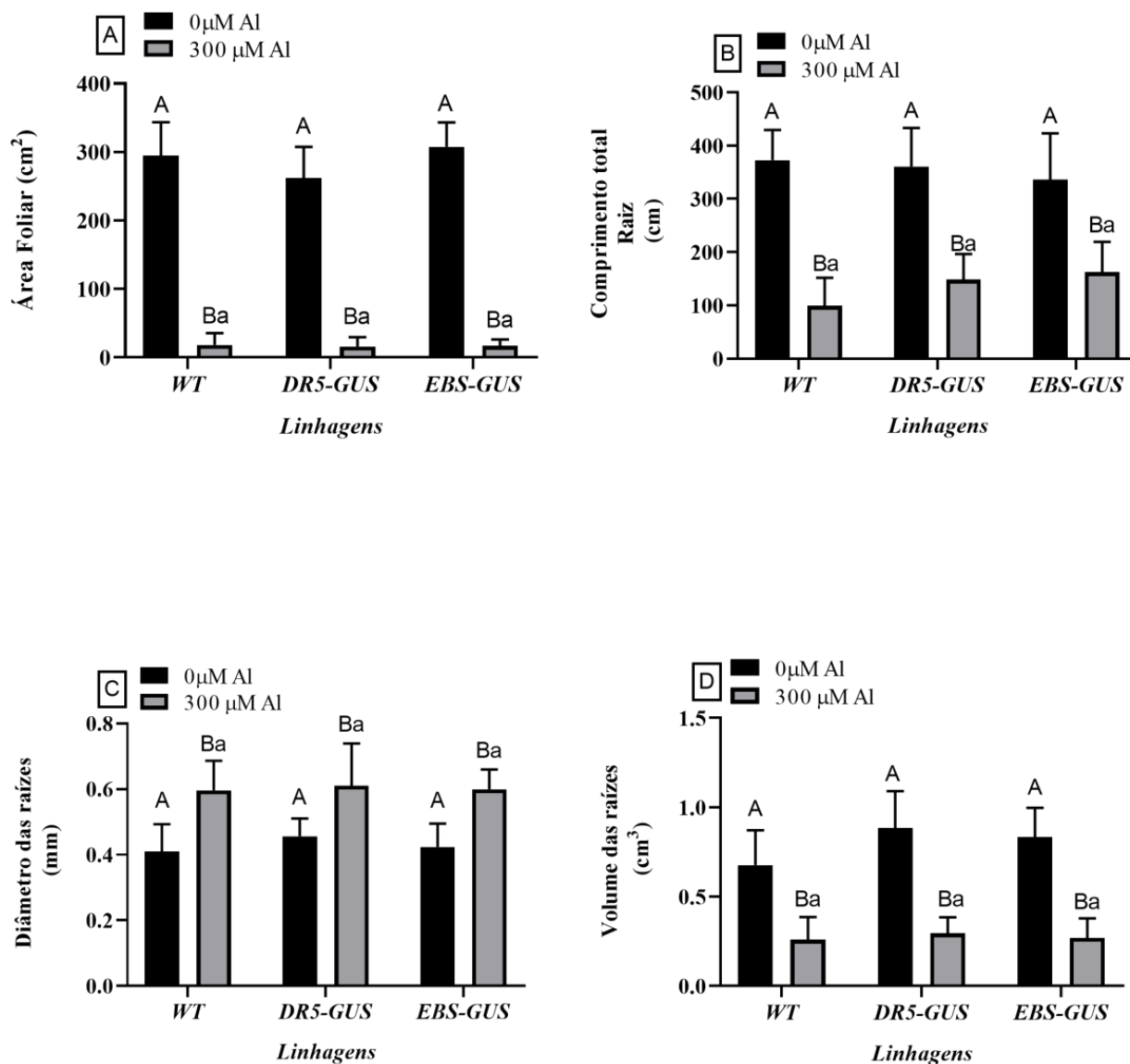


Figura 3: (A) Área foliar (cm^2), (B) comprimento total da raiz (cm), (C) diâmetro das raízes (mm) e (D) volume das raízes (cm^3) das linhagens selvagem (WT), transgênicas para os hormônios auxina ($p\text{-DR5}::GUS$) e etileno ($p\text{-EBS}::GUS$) em cultivo de 0 e 300 μM Al. Os valores correspondem as médias das amostras considerando Tuckey e $P \leq 0,05$. As letras maiúsculas comparam os tratamentos das linhagens dentro do tratamento de 0 μM Al e as letras minúsculas comparam as linhagens dentro do tratamento de 300 μM Al.

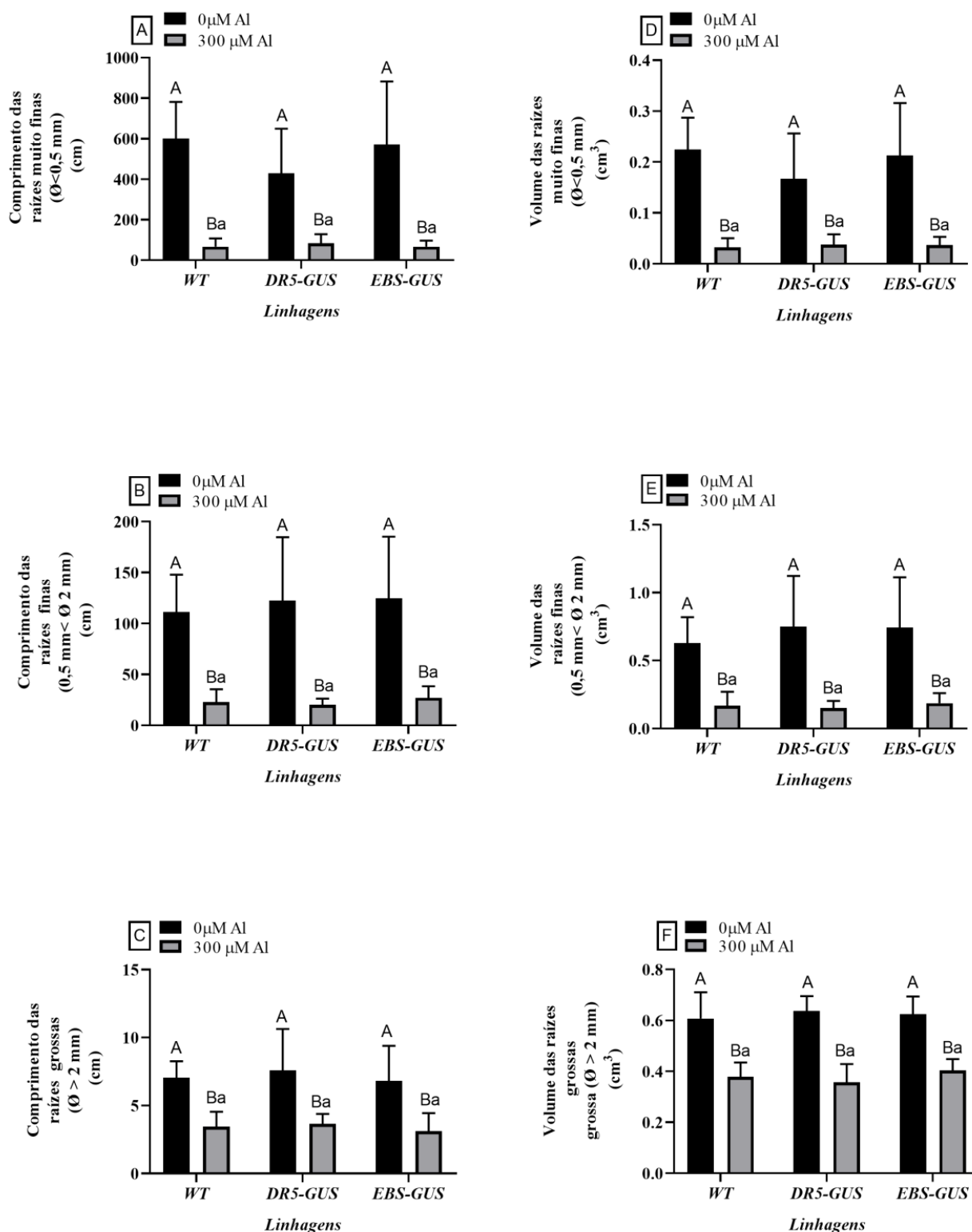


Figura 4: (A) Comprimento das raízes muito finas ($\text{Ø} < 0,5 \text{ mm}$) (cm), (B) comprimento das raízes finas ($0,5 \text{ mm} < \text{Ø} < 2 \text{ mm}$) (cm), (C) comprimento das raízes grossas ($\text{Ø} > 2 \text{ mm}$), (D) volume das raízes muito finas ($\text{Ø} < 0,5 \text{ mm}$) (cm^3), (E) volume das raízes finas ($0,5 \text{ mm} < \text{Ø} < 2 \text{ mm}$) (cm^3), e (F) volume das raízes grossas ($\text{Ø} > 2 \text{ mm}$) (cm^3) das linhagens selvagem (WT), transgênicas para os hormônios auxina ($p\text{-DR5}::GUS$) e etileno ($p\text{-EBS}::GUS$) em cultivo de 0 e 300 μM Al. Os valores correspondem as médias das amostras considerando Tukey e $P \leq 0,05$. As letras maiúsculas comparam os tratamentos das linhagens dentro do tratamento de 0 μM Al e as letras minúsculas comparam as linhagens dentro do tratamento de 300 μM Al.

Tabela 2: Resumo da análise de variância Two-Way para os parâmetros: Área foliar, Comprimento total de raiz, diâmetro das raízes, volume das raízes, comprimento das raízes muito finas ($\varnothing < 0,5$ mm) (cm), comprimento das raízes finas ($0,5 \text{ mm} < \varnothing < 2$ mm) (cm), comprimento das raízes grossas ($\varnothing > 2$ mm) (cm), volume das raízes muito finas ($\varnothing < 0,5$ mm) (cm^3), volume das raízes finas ($0,5 \text{ mm} < \varnothing < 2$ mm) (cm^3), e volume das raízes grossas ($\varnothing > 2$ mm) (cm^3) das linhagens selvagem (*WT*), transgênicas para os hormônios auxina (*p-DR5::GUS*) e etileno (*p-EBS::GUS*) em cultivo de 0 e 300 μM Al, de acordo com o teste de Tukey e $P \leq 0,05$.

Análise de Crescimento	Fonte de variação		
	Linhagem X Concentração de Al	Linhagem	Concentração de Alumínio
	P valor		
Área Foliar (cm^2)	0,284 NS	0,1775 NS	<0,0001 ****
Comprimento total da raiz (cm)	0,0727 NS	0,6477 NS	<0,0001 ****
Diâmetro das raízes (mm)	0,8162 NS	0,3788 NS	0,0001 ***
Volume das raízes (cm^3)	0,1950 NS	0,1225 NS	<0,0001 ****
Comprimento de raízes muito finas ($\varnothing < 0,5$ mm) (cm)	0,306 NS	0,3978 NS	<0,0001 ****
Comprimento de raízes finas ($0,5 \text{ mm} < \varnothing < 2$ mm)	0,8891 NS	0,8178 NS	<0,0001 ****
Comprimento de raízes grossas ($\varnothing > 2$ mm)	0,7938 NS	0,1782 NS	0,0008 ***
Volume das raízes mais finas ($\varnothing < 0,5$ mm) (cm^3)	0,3616 NS	0,4238 NS	<0,0001 ****
Volume das raízes finas ($0,5 \text{ mm} < \varnothing < 2$ mm) (cm^3)	0,7246 NS	0,7336 NS	<0,0001 ****
Volume das raízes grossas ($\varnothing > 2$ mm) (cm^3)	0,9685 NS	0,6127 NS	0,0003 ***

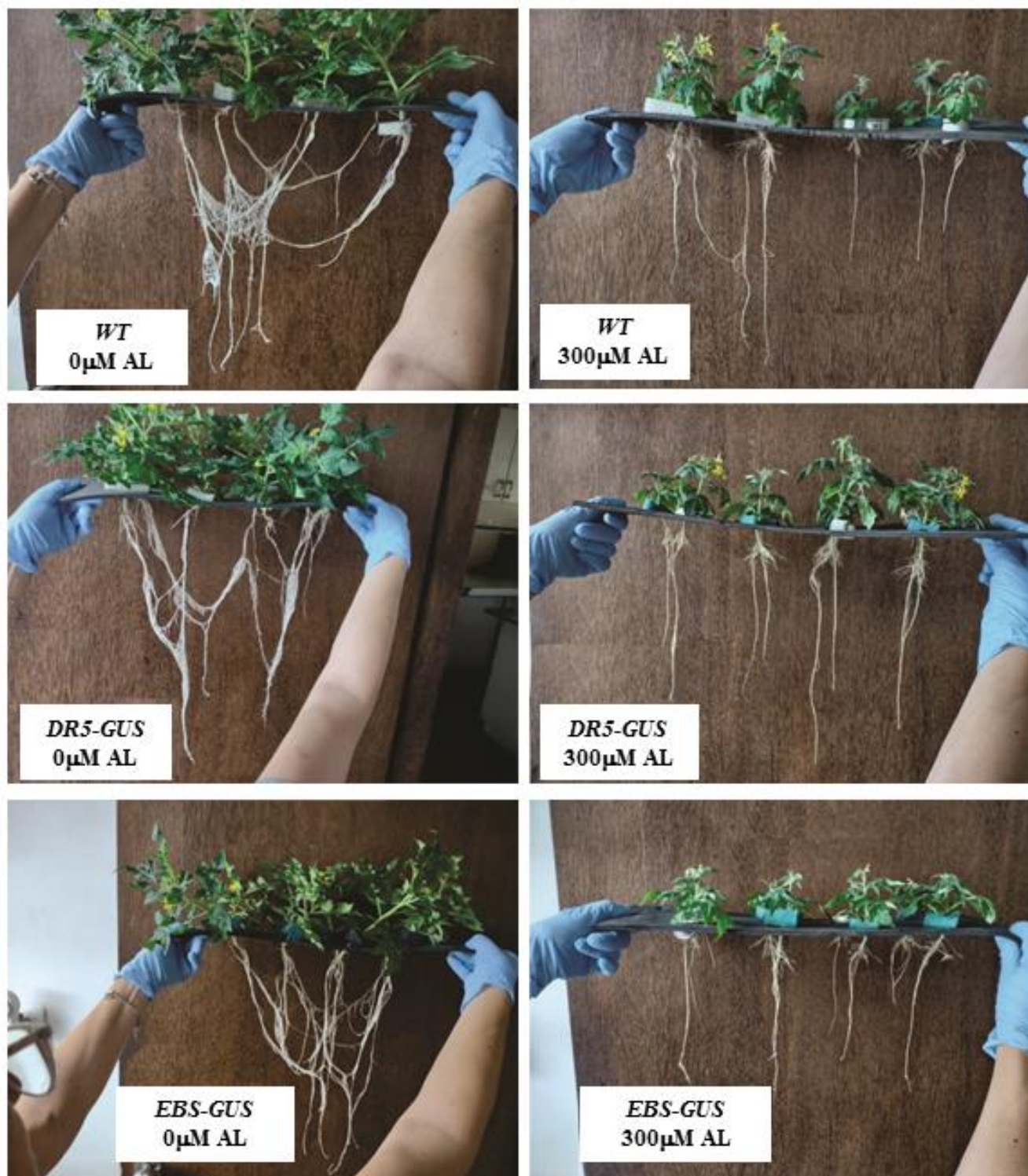


Figura 5: Imagens das plantas das linhagens selvagem (WT), transgênicas para os hormônios auxina (*p-DR5::GUS*) e etileno (*p-EBS::GUS*), com 35 em cultivo de 0 e 300 μ M Al e 48 dias após germinadas (d.a.g.).

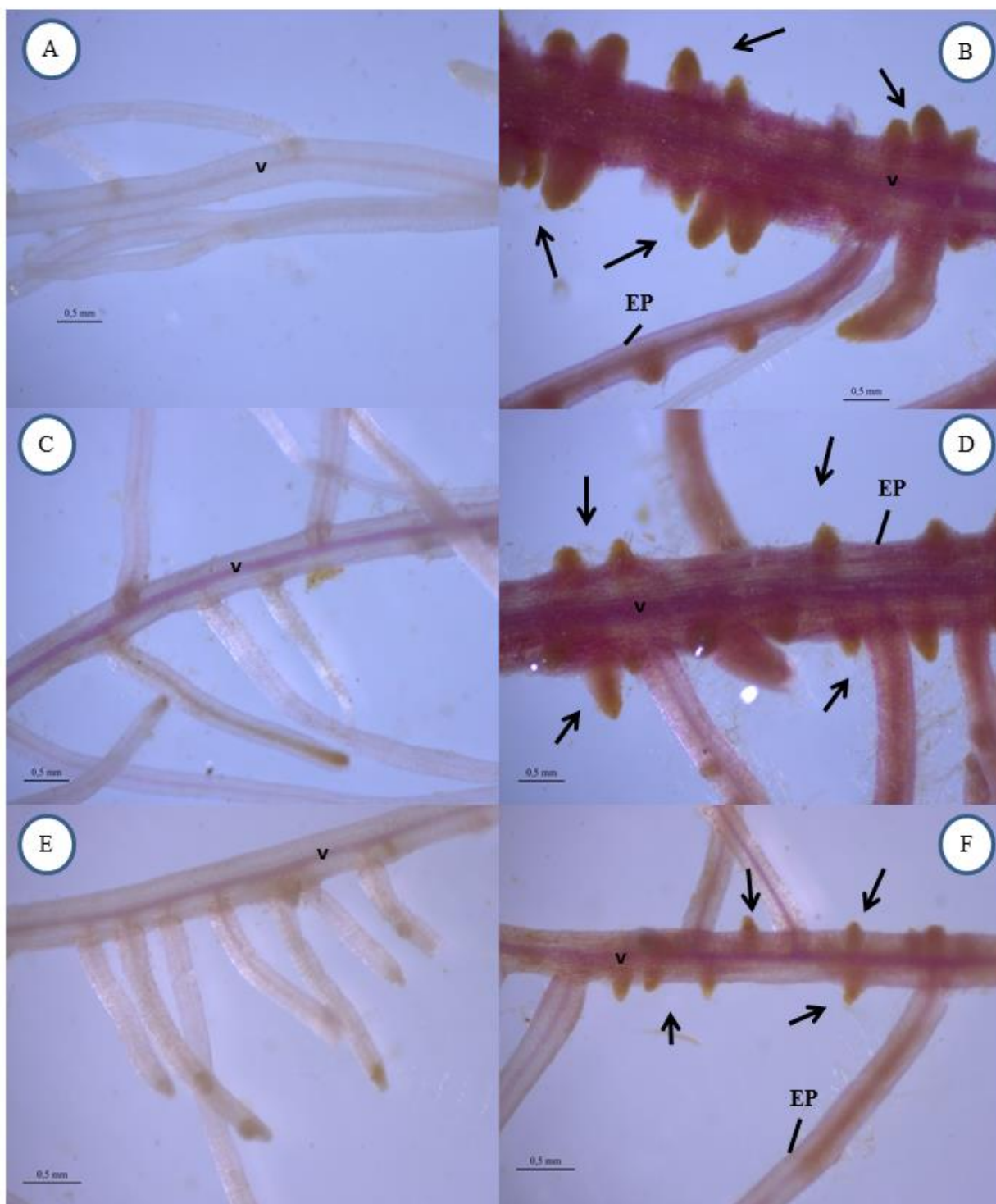
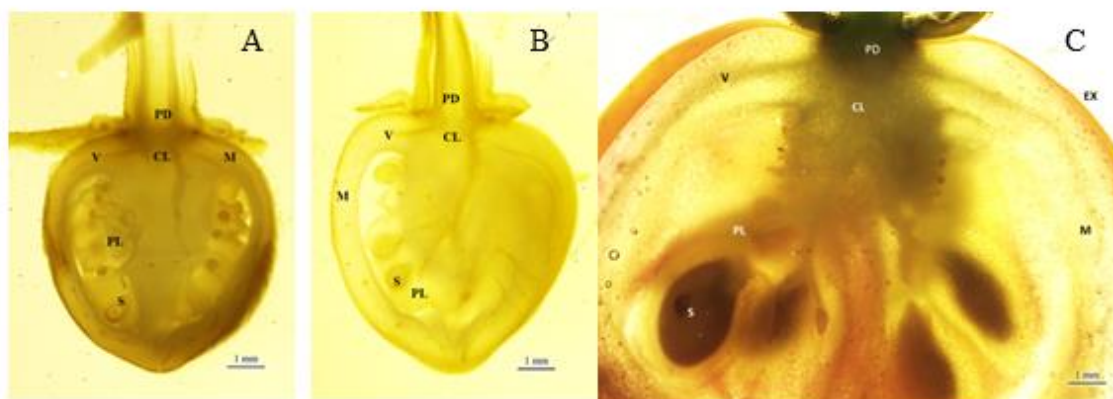


Figura 6: Raízes de plantas coradas com floroglucina. Linhagens: selvagem (WT): (A) e (B); transgênica para o hormônio auxina (*p-DR5::GUS*): (C) e (D); e transgênica para o hormônio etileno (*p-EBS::GUS*): (E) e (F). Cultivadas com 0 μM Al (A, C e E) e 300 μM Al (B, D e F) e 110 dias após germinadas (d.a.g.).



Atividade
da enzima
GUS

0

0

0



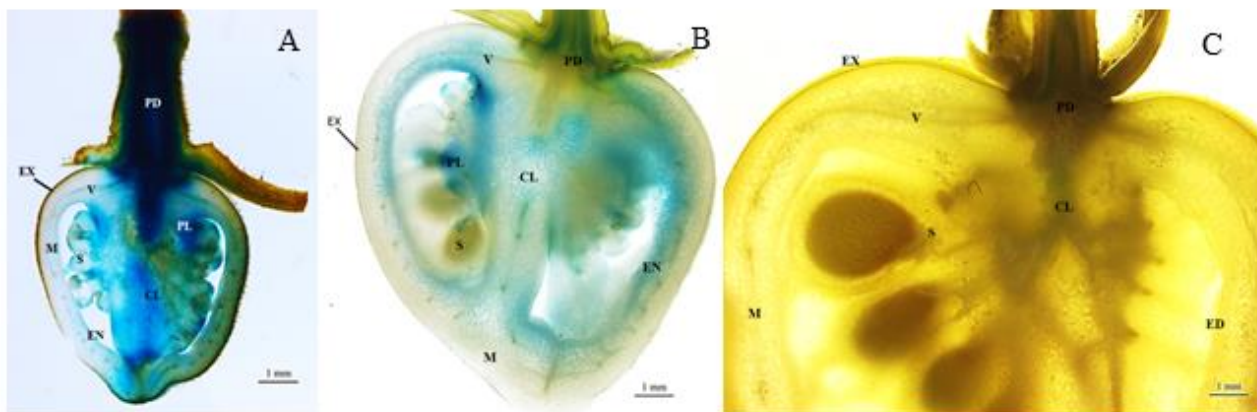
Atividade
da enzima
GUS

0

0

0

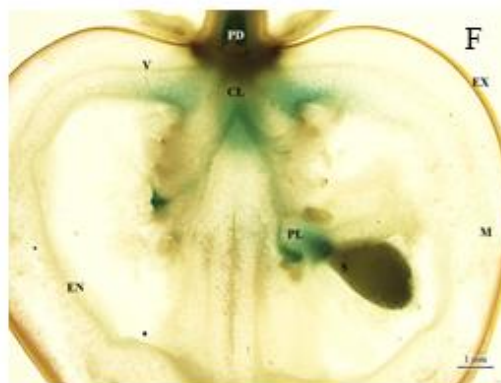
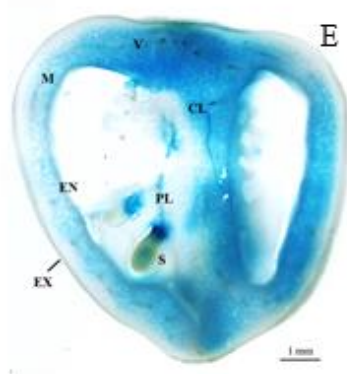
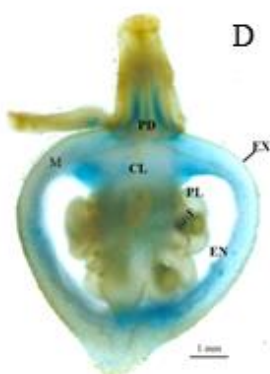
Figura 7: Imagens de frutos da linhagem *WT* submetidos à técnica histoquímica para identificação da enzima repórter β -glucuronidase (GUS) e atividade da enzima GUS expressa em $\text{nmol de } \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína. Frutos de plantas cultivadas com $0 \mu\text{M Al}$ (A, B e C) e Frutos de plantas cultivadas com $300 \mu\text{M Al}$ (D, E e F). CL (Columela), EX (Exocarpo), M (Mesocarpo), PD (Pedúnculo), S (Semente), V (vasos). A barra de escala nas fotos corresponde a 1mm. Aumento: $10 \times 0,8$.



Atividade
da enzima
GUS 1792,38

1309,15

850,696

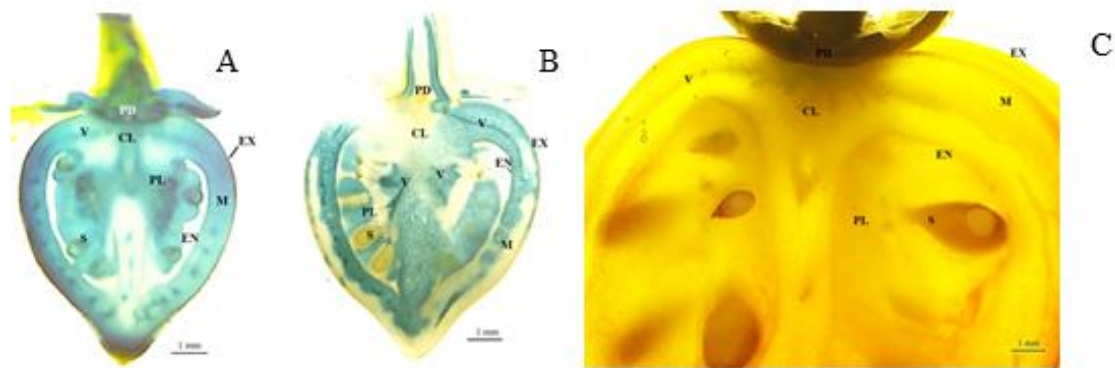


Atividade
da enzima
GUS 1595,72

782,725

502,333

Figura 8: Imagens de frutos da linhagem *DR5-GUS* submetidos à técnica histoquímica para identificação da enzima repórter β -glucuronidase (GUS) e atividade da enzima GUS expressa em nmol de $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína. Frutos de plantas cultivadas com $0 \mu\text{M}$ Al (A, B e C) e frutos de plantas cultivadas com $300 \mu\text{M}$ Al (D, E e F). CL (Columela), EN (Endocarpo), EX (Exocarpo), M (Mesocarpo), PD (Pedúnculo), PL (Placenta), S (Semente), V (vasos). A barra de escala nas fotos corresponde a 1mm. Aumento: $10 \times 0,8$.

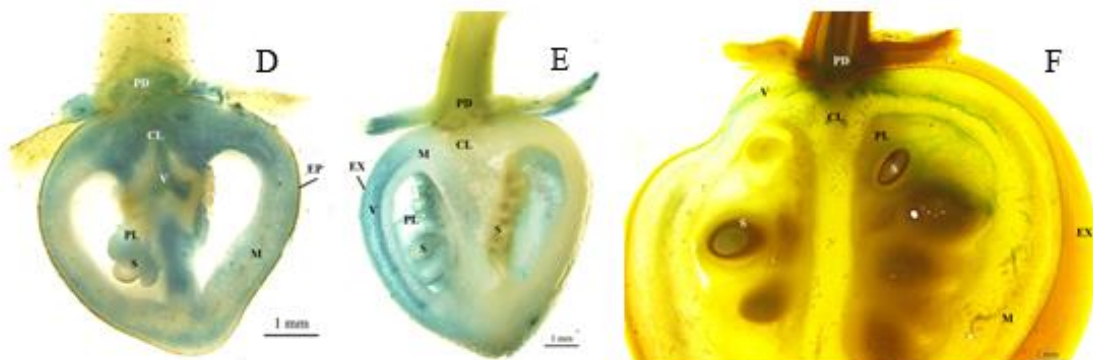


Atividade
da enzima
GUS

23.499,3

41.286,9

0



Atividade
da enzima
GUS

864,7

40.957,1

162,833

Figura 9: Imagens de frutos da linhagem *EBS-GUS* submetidos à técnica histoquímica para identificação da enzima repórter β -glucuronidase (GUS) e atividade da enzima GUS expressa em $\mu\text{mol de mu/min/mg}$ de proteína. Frutos de plantas cultivadas com $0 \mu\text{M Al}$ (A, B e C) e frutos de plantas cultivadas com $300 \mu\text{M Al}$ (D, E e F). CL (Columela), EN (Endocarpo), EX (Exocarpo), M (Mesocarpo), PD (Pedúnculo), PL (Placenta), S (Semente), V (vasos). A barra de escala nas fotos corresponde a 1mm. Aumento:10 x 0,8.

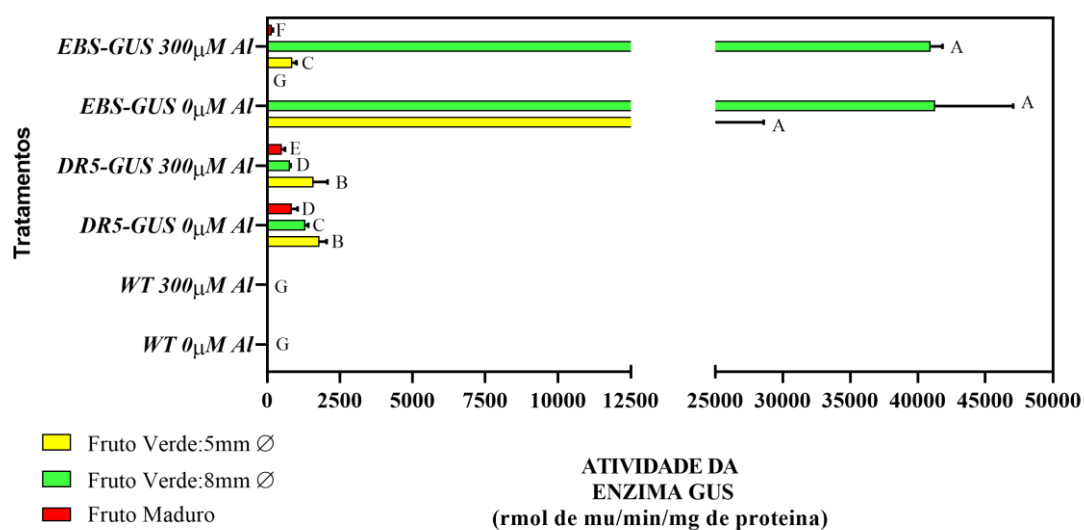


Figura 10: Atividade da enzima β -glucoronidase (GUS) em frutos verdes de 5mm, 8mm e em frutos maduros de plantas das linhagens: selvagem (*WT*) transgênica para o hormônio auxina (*p-DR5::GUS*) e transgênica para o hormônio etileno (*p-EBS-GUS*). Cultivadas com 0 e 300 μ M Al. Os valores correspondem as médias das amostras considerando Tukey e $P \leq 0,05$.

Tabela 3: Resumo da análise de variância Two-Way para a atividade da enzima GUS para a linhagem selvagem (*WT*); transgênica para o hormônio auxina (*p-DR5::GUS*) e transgênica para o hormônio etileno (*p-EBS-GUS*). Cultivadas com 0 e 300 μ M Al.

Atividade da enzima GUS	Fonte de variação		
	Tratamento X Fase de desenvolvimento	Tratamentos: Linhagem / [Al] P valor	Fase de desenvolvimento
	0,006 **	0,0011 **	0,0012 **