

RENATA ANDRADE

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E METABÓLICA DE RAÍZES DE
SOJA EXPOSTAS AO ALUMÍNIO**

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

Orientador: Cleberson Ribeiro

Coorientadores: Danielle Santos Brito
Genaina Aparecida de Souza
Maximiller Dal Bianco L. Costa

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

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

A553c
2022
Andrade, Renata, 1993-
Caracterização morfofisiológica e metabólica de raízes de
soja expostas ao alumínio / Renata Andrade. — Viçosa, MG,
2022.
1 dissertação eletrônica (74 f.): il. (algumas color.).
Orientador: Cleberson Ribeiro.
Dissertação (mestrado) - (Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Geral, 2022.
Inclui bibliografia.
DOI: <https://doi.org/10.4732/fi/ufvbbt.2022.224>
Modo de acesso: World Wide Web.
I. Soja — Efeito do alumínio. *. Alumínio — Testes de
toxicidade. 3. Raízes (Botânica). 1. Gênero. 5. Antioxidantes. 6. Soja — Fisiologia. 7. Soja — Morfologia.
1. Ribeiro, Cleberson, 1980-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação
em Fisiologia Vegetal. 111. Título.

CDD 22. ed. 633.34

CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E METABÓLICA DE RAÍZES DE SOJA EXPOSTAS AO ALUMÍNIO

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

APROVADA: 23 de fevereiro de 2022.

Assinatura:



Renata Andrade
Autora



Cleberson Ribeiro
Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação. Ao departamento de Biologia Vegetal e especificamente ao Bioagro (Instituto de Biotecnologia Aplicada em agropecuária).

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

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento do projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

A minha mãe Lucíneia, meus irmãos Patrícia e Willian e ao Lucas, pessoas próximas que me deram apoio e me ajudaram na fase difícil e nunca me abandonaram.

Ao Prof. Dr Cleberson pela sua orientação nesse período, as Doutora Danielle e Genaina pela coorientação, ensinamento, paciência, amizade e o tempo que me dedicaram para o trabalho acontecer e todo o auxílio nos últimos meses. Sou muito grata por encontrar pessoas tão boas.

Gostaria de agradecer imensamente a Luciene, secretaria do programa de fisiologia vegetal, que é dedicada, que ajuda os alunos do início ao fim de todo período mestrado e doutorado. E me ajudou imensamente em todos os períodos do mestrado da inscrição até a defesa, você foi meu anjo, muito obrigada.

Agradecer imensamente meus amigos de laboratório e para vida Bruno, Jailson, Maria e Rafael por toda a ajuda, suporte e aguentar todos os meus problemas.

E a todos de alguma forma contribuíram pelo trabalho.

Obrigada!

“Sabe, a ignorância é uma benção. Às vezes o ato de esquecer é uma defesa involuntária, porém crucial, para suportar determinadas verdades que de outra maneira seriam insuportáveis...”.

(SPORH, E. Filhos do Éden, Paraíso Perdido. Livro 3, 190).

RESUMO

ANDRADE, Renata, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2022.
Caracterização morfofisiológica e metabólica de raízes de soja expostas ao alumínio.
Orientador: Cleberson Ribeiro. Coorientadores: Danielle Santos Brito, Genaina Aparecida de Souza e Maximiller Dal Bianco Lamas Costa.

Solos ácidos com elevada saturação de alumínio (Al) ocorrem, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, podendo comprometer a produtividade de plantas cultivadas. Sob essas condições, o alongamento da raiz pode ser prejudicado e, portanto, perturbar a absorção de água e nutrientes. No presente estudo, investigamos os sítios de acúmulo do Al nas raízes e seus efeitos sobre o crescimento, a fisiologia, o metabolismo em raízes de soja (*Glycine max L.*) nos genótipos A7002 e Suprema. As plântulas de soja foram cultivadas em sala de crescimento com solução de Clark contendo 0 (controle) e 100 μM de AlCl_3 , sob pH 4,0 e aeração constante, por 72 horas. Avaliamos os danos causados no alongamento da raiz, na morfologia e anatomia radicular e o teor relativo de Al no ápice da raiz. Também abordamos as respostas antioxidantes da soja ao estresse por Al, bem como moléculas indicadoras de estresses, como ROS e MDA. Os ajustes metabólicos pelas plantas frente ao estresse por Al também foram investigados. Nossos resultados mostraram maior acúmulo de Al nas camadas superficiais do genótipo A7002 e mais internamente no genótipo Suprema. Além disso, o genótipo Suprema acumulou maior teor de Al, fato que prejudicou o crescimento da raiz nesse genótipo. Ambos os genótipos apresentaram resultado positivo para o corante Chrome Azurol'S e pela microanálise de raios-X acoplada ao microscópio eletrônico de varredura (MEV-EDS), sendo possível observar acúmulo de Al nas células do ápice celular. Adicionalmente, pela micrografia obtida pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) observa-se uma descamação nas células das células externas do ápice radicular após exposição ao Al. Ambos os genótipos apresentaram aumento na concentração de açúcares solúveis como glicose e frutose, e para o teor de amido houve redução na Suprema. Já em A7002 ocorreu aumento na concentração de malato nas raízes. Entretanto para as enzimas do estresse oxidativo não ocorreu diferenças significativas quanto suas atividades em ambos os genótipos. Desta forma, o genótipo A7002 demonstrou maior tolerância em frente ao Al principalmente pela utilização de dois importantes mecanismos: exsudação de malato e restrição à entrada radial do Al nas raízes imposta pelas células externas das raízes. Por outro lado, o genótipo Suprema se mostrou suscetível ao estresse por Al, acumulando altas

concentrações desse metal nas raízes, promovendo danos ao crescimento radicular e modificando o metabolismo primário, além de aumentar a concentração de espécie reativa de oxigênio.

Palavras-chave: Toxicidade do alumínio. Ápice radicular. *Glycine max*. Metabolismo primário. Enzimas antioxidantes.

ABSTRACT

ANDRADE, Renata, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2022. **Morphophysiological and metabolic characterization of soybean roots exposed to aluminum.** Adviser: Cleberson Ribeiro. Co-advisers: Danielle Santos Brito, Genaina Aparecida de Souza and Maximiller Dal Bianco Lamas Costa.

Acid soils also with higher saturation of aluminum (Al) occurrence, mainly in tropical and subtropical regions, offering the productivity of cultivated plants. Under these conditions, root elongation can be impaired and therefore disturb the absorption of water and nutrients. In the present study, we investigated the place of Al accumulation in roots and their effects on growth, physiology, metabolism in soybean roots (*Glycine max L.*) in genotypes A7002 and Suprema. Soybean seedlings were grown in a growth room with Clark's solution containing 0 (control) and 100 μM of AlCl_3 , under pH 4.0 and constant aeration, for 72 hours. We evaluated the damage caused by root elongation, root morphology and anatomy and the relative Al content at the root apex. We also address soy's antioxidant responses to Al stress, as well as stress-indicating molecules such as ROS and MDA. The metabolic adjustments by plants against Al stress were also investigated. Our results showed higher Al accumulation in the surface layers of the A7002 genotype and more internally in the Suprema genotype. In addition, the Suprema genotype accumulated higher Al content, which impaired root growth in this genotype. Both genotypes were positive for the Chrome Azurol's dye and by x-ray microanalysis, coupled to a scanning electron microscope (MEV-EDS), and it was possible to observe Al accumulation in the cells of the cell apex after exposure to Al. Additionally, the micrograph obtained by scanning microscopy (MEV) technique shows desquamation in the cells of the external cells of the root apex after exposure to Al. Both genotypes showed an increase in the concentration of soluble sugars such as glucose and fructose, and for the starch content there was a reduction in Suprema. In A7002, there was an increase in malate concentration in the roots. However, for oxidative stress enzymes, there were no significant differences regarding their activities in both genotypes. In this way, the genotype A7002 showed greater tolerance in front of Al mainly by use of two important mechanisms: malate exudation and restriction the radial entry of Al in the roots imposed by the external cells of the roots. On the other hand, the Suprema genotype was susceptible to Al stress, accumulating high concentrations of this metal in the roots, promoting damage to root growth and

modifying the primary metabolism, in an addition to increasing the concentration of reactive oxygen specie.

Keywords: Aluminum toxicity. Root apex. *Gycine max*. Primary metabolism, Antioxidant enzymes.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	12
CAPITULO 1	18
RESISTÊNCIA AO ALUMÍNIO INDUZIDA PELO MALATO E PELA EPIDERME EM RAÍZES DO GENÓTIPO DE SOJA A7002.....	18
1 INTRODUÇÃO.....	20
2 MATERIAL E MÉTODOS	21
2.1. CONDIÇÕES DE CULTIVO E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	21
2.2. AVALIAÇÃO DO ALUMÍNIO NAS RAÍZES.....	22
2.2.1. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ALUMÍNIO.....	22
2.2.2. COLORAÇÃO DOS ÁPICES RADICULARES POR HEMATOXILINA.....	22
2.2.3. HISTOLOCALIZAÇÃO DO ALUMÍNIO PELO CORANTE CHROME AZUROL' S	23
2.3. PARÂMETROS FENOTÍPICOS.....	23
2.4. MICROMORFOLOGIA E MICROANÁLISE DO ALUMÍNIO EM ÁPICES RADICULARES	23
2.4.1. ANÁLISE EM MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA (MEV).....	23
2.4.2. MICROANÁLISE DE RAIO-X (MEV-EDS)	24
2.5. DETERMINAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA, AMIDO, AMINOÁCIDOS TOTAIS, AÇÚCARES SOLÚVEIS, MALATO E FUMARATO	24
2.6. QUANTIFICAÇÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	24
2.7. ENZIMAS DO METABOLISMO ANTIOXIDATIVO	25
2.7.1. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS SOD, CAT, APX E POX.....	25

2.7.2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD, EC 1.15.1.1)	25
2.7.3. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA CATALASE (CAT, EC 1.11.1.6)	25
2.7.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ASCORBATO PEROXIDASE (APX, EC 1.11.1.11)	26
2.7.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA PEROXIDASE (POX, EC 1.11.1.7)	26
2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
3. RESULTADOS	26
4. FIGURAS	28
5 DISCUSSÃO	33
6. CONCLUSÕES.....	35
7. REFERÊNCIA.....	35
CAPÍTULO 2	43
DANOS METABÓLICOS E MORFOFISIOLÓGICOS INDUZIDOS PELO ALUMÍNIO EM RAÍZES DO GENÓTIPO DE SOJA SUPREMA	43
1 INTRODUÇÃO.....	44
2 MATERIAL E MÉTODOS	45
2.1. CONDIÇÕES DE CULTIVO E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	45
2.2. AVALIAÇÃO DO ALUMÍNIO NAS RAÍZES.....	45
2.2.1. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ALUMÍNIO.....	45
2.2.2. COLORAÇÃO DOS ÁPICES RADICULARES POR HEMATOXILINA.....	46
2.2.3. HISTOLOCAÇÃO DO ALUMÍNIO	46
2.3. PARÂMETROS FENOTÍPICOS.....	46
2.4.1. COLORAÇÃO DOS ÁPICES RADICULARES POR HEMATOXILINA.....	47

2.4.2. HISTOLOCALIZAÇÃO DO AL NAS RAÍZES PELO CORANTE CHROME AZUROL' S	47
2.4.3. ANÁLISE EM MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA (MEV).....	47
2.4.5. MICROANÁLISE DE RAIOS-X (MEV-EDS)	48
2.5. DETERMINAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA, AMIDO, AMINOÁCIDOS TOTAIS, AÇÚCARES SOLÚVEIS, MALATO E FUMARATO	48
2.6. QUANTIFICAÇÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	48
2.7. ENZIMAS DO METABOLISMO ANTIOXIDATIVO	49
2.7.1. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS SOD, CAT, APX E POX.....	49
2.7.2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD, EC 1.15.1.1)	49
2.7.3. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA CATALASE (CAT, EC 1.11.1.6).....	50
2.7.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ASCORBATO PEROXIDASE (APX, EC 1.11.1.11)	50
2.7.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA PEROXIDASES (POX, EC 1.11.1.7)..	50
2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
3. RESULTADOS	51
4. FIGURAS	52
5. CONCLUSÕES	59
6. BIBLIOGRAFIA.....	60
7. CONCLUSÕES GERAIS	74

Introdução Geral

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma planta leguminosa cultivada de grande importância na alimentação humana e animal devido ao elevado teor de proteína, óleo vegetal no seu grão e não existe nenhuma outra proteína de origem vegetal com melhor custo benefício. Esses fatos entre outros, fazem a soja uma cultura amplamente difundida, responsável por alavancar o PIB do país, em conjunto com as demais cadeias do agronegócio (Day, 2013., Aprosoja Brasil 2021). Além disso, a cultura é considerada uma importante matéria-prima para a produção de biodiesel com uma representatividade elevada no agronegócio internacional, sendo a produção agrícola de 2021/2022 estimada em 268,2 milhões de toneladas (CONAB 2021). A receita proveniente das exportações do complexo agroindustrial brasileiro de soja supera os dez bilhões de dólares, representando cerca de 8% do total exportado pelo Brasil que lidera o ranking de produtos mais exportados há mais de 22 anos (Embrapa 2019).

O potencial produtivo da soja é afetado por fenômenos climáticos extremos como secas e inundações (Silvente, 2012; Rose et al. 2016), além de variações nutricionais no solo, como por exemplo, a presença de alumínio (Al) na forma tóxica, que após interagir com a raiz, pode comprometer a absorção de nutrientes essenciais e a água (Rahnama et al. 2011). Toxicidade de prótons, deficiência de P, Mg e Ca, toxicidade de metais pesados contaminantes, seca, temperatura adversa, poluição do ar e fatores bióticos são estressores adicionais que podem modificar as respostas das plantas (Poschenrieder 2008). Razões de raiz/aérea são reduzidas a biomassa e comprimento total, além disso, o alumínio não afeta apenas o tamanho da raiz, mas causa mudanças na arquitetura como sistema radicular curto, grosso e quebradiço, esta zona radicular específica percebe o estado nutricional do solo e com essa informação é traduzida levando respostas adaptativa. (Poschenrieder 2008). O solo ácido inclui níveis tóxicos de Al, manganês (Mn) e ferro (Fe), e deficiências de vários elementos minerais essenciais, sendo o fósforo (P) o principal nutriente limitante em solos ácidos assim provocam uma deficiência no crescimento da raiz (Kochian 2004).

Os solos ácidos ($\text{pH} < 5,0$) são uma das limitações de maior impacto para a produção agrícola em todo o mundo (Kochian, 1995; Ma, 2007; Nunes-Nesi ET al. 2014). Cerca de 50% de toda área agricultável ou potencialmente agricultável do mundo encontra-se em regiões de solos ácidos que limita a produção agrícola mundial, principalmente inibindo o crescimento da raiz. (Kochian et al. 2004). Dessas áreas, aproximadamente 60% estão localizadas nas regiões tropicais e subtropicais (Kochian et al. 2004). Só no Brasil, mais de

500 milhões de hectares são cobertos por solos ácidos, que compreendem cerca de dois terços do território, sendo a maior área de solos ácidos dentro de um único país (Vitorello et al. 2005).

A acidez do solo promove a biodisponibilidade do Al facilitando sua absorção pelas raízes. O alumínio é o terceiro elemento mais abundante da crosta terrestre e pode ser encontrado de três formas disponíveis no solo e sua disponibilidade depende do pH do solo abaixo de 5,5 e sua forma iônica. Em plantas, o Al pode ter efeito benéfico ou tóxico, dependendo de fatores como concentração, forma química e condições de crescimento e espécies vegetais (Bojórquez-Quintal et al. 2017). Assim este elemento pode alcançar várias estruturas e regiões celulares como apoplasto, simplasto, parede celular, membrana plasmática, mitocôndria e DNA resultando em danos irreversíveis ao metabolismo da planta (Kopittke et al. 2016; Eekhout et al. 2017; Geng et al. 2017).

Entretanto, plantas adaptadas a solos ácidos desenvolveram mecanismos para enfrentar o estresse por Al (Hosrt et al. 2010; Kochian et al. 2015). A estratégia melhor documentada é a exclusão de ácidos orgânicos (OAs) para evitar a internalização do Al, enquanto outras estratégias dependem da capacidade da planta em suportar o Al absorvido (Ma, 2007; Nunes-Nesi, 2014; Kochian et al. 2015). Os ácidos orgânicos malato e citrato, principais intermediários do Ciclo do Ácido Tricarboxílico (TCA), e o oxalato, produto do metabolismo de carbono, foram relatados como componente chave envolvidos na desintoxicação interna e externa do Al e na aquisição de fosforo (P) (López-Bucio et al. 2000 a, b).

Nas últimas décadas, um número considerável de genes envolvidos com a síntese e o transporte de OAs foi caracterizado por meio de abordagens moleculares e genéticas (Zhang et al. 2016). Essas descobertas aceleram os esforços de melhoramento genético para gerar plantas adaptadas a solos ácidos (Inostroza-Blancheteau et al. 2010, Chen et al. 2019). O efluxo de malato em raiz ativado por Al é considerado um dos principais mecanismos para a tolerância ao Al em várias espécies de plantas, incluindo trigo, *Arabidopsis* e triticales (*Triticum* × *Secale* hexaploid) (Delhaize et al. 1993b; Pellet et al. 1996; Larsen et al. 1998; Ma et al. 2000).

Toxicidade do Al na soja é um dos principais problemas da cultura em solos ácidos, principalmente devido à espécie fitotóxica de Al (Al^{3+}). Assim, a presença desse cátion trivalente vem se tornando um fator que limita o desenvolvimento e a produtividade dessa cultura (Liu et al. 2021). Após o contato da raiz com o Al, o primeiro sintoma é a alteração no crescimento e no alongamento da raiz, no qual o Al^{3+} solúvel danifica células do ápice radicular (Poschenrieder, et al. 2008). Devido à toxicidade do Al, o sistema radicular se torna

quebradiço e poroso (Rahman, et al. 2021), com muitas raízes laterais atarracadas, mas sem ramificações finas (Vitorello et al. 2005). Além dos efeitos no sistema radicular, o estresse por Al causa danos na parte aérea, como redução na altura das plantas e na área foliar (Steiner et al. 2012).

Adicionalmente, o Al altera a anatomia do sistema radicular, reduzindo o tamanho das células, interferindo na divisão celular e na estrutura das membranas e paredes celulares (Silva et al. 2020). Esses efeitos se devem ao fato do Al interromper o crescimento normal da parede celular, reduzindo a concentração de Ca^{2+} abaixo do necessário para compor os pectatos, além de induzir a despolarização da membrana plasmática (Pellet et al. 1996).

Essas alterações anatômicas podem ser iniciadas pelo desbalanço do sistema redox das células durante o estresse por Al. Na presença de Al pode ocorrer aumento na produção/acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Ma, 2007, Kochian et al. 2015, Yu et al. 2019). Assim, o Al induz a oxidação celular através do aumento na geração de $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e ^-OH , como demonstrado em raízes de *Allium cepa* L e de arroz (Achary et al 2008, Bera et al. 2017). A elevação da concentração desses compostos no metabolismo celular pode induzir à peroxidação lipídica, danos ao DNA, carbonilação de proteínas e morte celular em tecidos da raiz (Carvalho, 2008; Anjum et al. 2015; Chowra et al. 2016). Por outro lado, esses danos oxidativos podem ser controlados pela atividade antioxidante de enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX). Assim, o aumento da atividade dessas enzimas pode estabelecer o equilíbrio redox das células, e consequentemente a normalidade do metabolismo (Chowra et al. 2016; Shahnawaz, 2017).

Variações na concentração de ROS, e consequentemente na peroxidação lipídica podem ocorrer dentro de uma mesma espécie durante o estresse por Al, o que reflete em tolerância diferencial de certos genótipos a este metal (Sun et al. 2013; Guo et al. 2018; Chen et al. 2019). Assim, plantas dentro de uma mesma espécie podem responder de forma diferente ao estresse induzido pelo Al, utilizando estratégias anatômicas, fisiológicas e/ou metabólicas para combater os danos induzidos por este Al (Brunner e Sperisen, 2013; Nunes- Nesi et al. 2014; Kochian et al. 2015).

Dessa forma, fica evidente que o acúmulo de Al em tecidos radiculares pode induzir alterações na fisiologia, na morfologia e no metabolismo das plantas. Assim, nosso objetivo foi avaliar os sítios de acúmulo de Al nas raízes, e as alterações estruturais induzidas nesse órgão por este elemento. Além de investigar as respostas de toxicidade e de resistência envolvidas com o metabolismo primário e antioxidativo em dois genótipos de soja com tolerância diferencial ao Al.

E por fim, nosso objetivo geral do trabalho foi avaliar os sítios de acúmulo de Al nas raízes, e as alterações estruturais induzidas nesse órgão por este elemento. Além de investigar as respostas de toxicidade e de resistência envolvidas com o metabolismo primário e antioxidativo em dois genótipos de soja com tolerância diferencial a este elemento. Sendo que cada capítulo aborda os danos nos ápices radiculares e diferencia entre eles.

Referência

- Achary, Y.Y.M.M, June. S, Panda, K.K, Panda, B. B, (2008) Aluminum induce oxidatives stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. **Ecotoxicolgy and Environmental Safety**.
- Anjum N, A., Sofo, A., Scopa, A et al (2015) Lipids and proteins--major targets of oxidative modifications. in abiotic stressed plants. **Environ Sci Pollut Res** 22: 4099- 4121.
- Bera, T, Sharma, S., Thind, H,S., Sidhu, H,S., Jat, M.L (207). Soil biochemical changes at different Wheat growth stages in response to conservation agriculture practices in a rice-wheat system of north-westerb India. **Soil, research**, 56(1), 91-104.
- Bojórquez-Quinral, E., Escalante-Magaña, C., Echevarría-Machado, I., Martínez-Estévez, M. (2017) Aluminum, a Friend or Foe of Higher Plants in Acid Soils. **Frontiers in Plant Science**.
- Brunner, I., Sperisen, C. (2013) Aluminum exclusion and aluminum tolerance in woody plants. **Front. Plant Sci** 12:1-12.
- Carvalho, M.H.C. (2008) Drought stress and reactive oxygen species. Production,
- Fernie, A.R., Willmtzer, L, (2001) Molecular and biochemical triggers of potato tuber development. **Plant Physiology**.
- Chen, J., Duan, X, R., Hu, J-W., Zhang NI-NA, Lin, X-Y, Zhang, H-J, Zheng. (2019), Unravelling calcium-alleviated aluminium toxicity in *Arabidopsis thaliana*: Insights into regulatory mechanisms using proteomics, , **Journal of proteomics**. 15-30.
- Chowra, U., Yanases. R, Koyma, H., Panda, K,S. (2016)Aluminum induced excessive ROS causes cellular damage and metabolic shifts in back Vigmo mungo (L.) Hepper. **Protoplasma**.
- Dall' Agnol, A., De Oliveira, A, B., Lazzaritti, J, J., Hirakuri, M, H. (2019). Importância socioeconômica da soja. Agência Embrapa de Informação e Tecnológica.
- Day, L. (2013) Proteins from land plants - Potential resources for human nutrition and food. **Trends Food Sci Technol** 32: 25-42.

- Delhaize E, Ryan PR, Randall PJ (1993b) Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) (Aluminium-stimulated excretion of malic acid from root apices). **Plant Physiol** 103: 695–702.
- Eekhout, T., Larsen, P., Veylder, De, L., (2017) Modification of DNA Checkpoints to confer aluminum tolerance. **Trends in plant Science**. 102-105.
- Geng, X, Horst, W.J, Golz, J.F., Lee, J.E., Ding, Z, Yang, Z.B., (2017) Leunig homolog transcriptional co-repressor mediates aluminum sensitivity through Methylesterase 4,6-module root cell wall pectin methylesterification in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, 1-14.
- Guo, P., Qi, P, Y., Cai, Y, T., Yang, T, Y., Yang, T, L., Huang, R, H., Chen, S.L. (2018). Aluminum effects on photosynthesis, reactive oxygen species and methylglyoxal detoxification in two Citrus species differing in aluminum tolerance. **Tree Physiology**. 1548- 1565.
- Gupta, N., Gaurav, S. S., Kumar, A. (2013). Molecular basis of aluminium toxicity in plants: a Review. **Am. J. Plant Science** 4: 21–37.
- Horst, J. W., 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.**
- Inostroza-Blancheteau, C., Soto, B., Ibáñez, C., Ulloa, P., Aquea, F., Arce-Johnson, P., Reyes-Díaz, M., (2010). Mapping aluminum tolerance loci in cereals: a tool available for crop breeding. *Electron. J. Biotechnol.* 13, 1-12.
- Kochian, L.V. (1995) Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Plant & Cell Physiology** 46: 237–260.
- Kochian, L.V., Hoekenga, O.A., Pineros, M.A. (2004) How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annu. Rev. Plant Biology* 55: 459–493.
- Kochian, L.V., Piñeros, M.A., Liu, J., Magalhães, J.V. (2015) Plant Adaptation to Acid Soils: The Molecular Basis for Crop Aluminum Resistance. **Annual Review of Plant Biology** 66: 571-98.
- Kopittke, M, P., Menzies, N.W., Wang, P., Blamey, F.P.C. (2016) Kinetics and nature of aluminium rhizotoxic effects: a review. **Journal of Experimental Botany**. 4451-4467.
- Larsen, P.B., Degenhardt, J., Tai, C.Y Stenzler, L.M., Howell, S.H., Kochian, L.V (1998) Aluminum-resistant *Arabidopsis* mutants that exhibit altered patterns of aluminum accumulation and organic acid release from roots. **Plant Physiol** 117:–18.

- Liu, J., Wang, X., Wang, N., Yang, L., Jin, T., Gai, J., Li, Y (2021). Comparative analyses reveal peroxidases play important roles in soybean tolerance to aluminum toxicity. **Agronomy**.
- López-Bucio, J., de La Vega, O.M., Guevara-García, A., Herrera-Estrella, L., (2000a.) Enhanced phosphorus uptake in transgenic tobacco plants that overproduce 476 citrate. **Nat. Biotechnol.** 18, 450-453. 477.
- Ma, J.F. (2000). Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants. **Plant & Cell Physiology** 41:383–390.
- Ma, J.F., (2007) Síndrome de toxicidade de alumínio e diversidade de alumínio resistência mínima em plantas superiores. **Int Rev Cytol** 264: 225–252.
- Nunes-Nesi, A. Brito, D.S, Inostroza- Blancheteau, C. Fernie, A.R, Araújo, W.L. (2014) The complex role of mitochondrial metabolism in plant aluminum resistance. **Trends Plant Sci** 19:399-407.
- Pellet, D, M.; Papernik, L, A., Kochian, L,V. (1996). Multiple aluminum resistance mechanisms in wheat: roles of root apical phosphate and malate exudation. **Plant Physiol**, 112:591–597.
- Poschenrieder, C., Gunsé, B., Corrales, I., Barceló, J. (2008). A glance into aluminum toxicity and resistance in plants. **Science of Total Environment**.
- Rahnama, A., Munns, R., Poustini, K., Watt, M. (2011). A screening method to identify genetic variation in root growth responses to a salinity gradient. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 69–77.
- Rahman, R., Udadhyaya, H (2021) Aluminium toxicity and its tolerance in plant: Review. **Journal of Plant Biology** 64:101–121.
- Rose. G., Osborne, T., Helen Greatrex, H., Wheeler, T. (2016) Impact of progressive global warming on the global-scale yield of maize and soybean. **Climatic Change** 134: 417.
- Shahnawaz, M,D., Chiuhan, R., Sanashaya (2017) Impact of Aluminum toxicity on Physiological aspects of Bakey (*Hordeum vulgare L*) Cultivars and its Alleviation through Ascorbic acid and Salicylic Priming. **Int.J.Curr. Microbiol.App. Sci** 6(5): 875-891.
- Silva, R, G., Berger, M., Bernardy, D., Tabaldi, L. A., Birck, T, P., Tarouco, C, P., Silva, O, C. Brito, S, B, DA Silva, A. A., Rosa R. V., Santos, M, F, S., Souza, A., S., Azevedo, A, A., DAL-BIANCO. M., Oliveira, J,A., Ribeiro. C. (2020) Differential accumulation of aluminum in root tips of soybean seedling. **Brazilian Journal of Botany**.
- Sun, C., Lu, L., Liu, L., Liu, W, Yu, Y., Liu, X, Hu, Y., Jin, C., Lin, X., (2013) Nitrate reductase-mediated early nitric oxide burst alleviates oxidative damage induced by aluminum

through enhancement of antioxidant defenses in roots of wheat (*Triticum aestivum*). **New phytologist**.

Steiner, F., Zoz, T., Pinto, Junior, A. S., Castagnara, D., Lopes Dranski, J. A. (2012). Effects of aluminum on plant growth and nutrient uptake in young physic nut plants. **Ciências agrárias**.

Silvente, S., Anatoly, P.S., Lara, M. (2012) Metabolite adjustments in drought tolerant and sensitive soybean genotypes in response to water stress. **PLoS One**.

Vitorello, V.A., Capaldi, F.R., Stefanuto, V.A., (2005) Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. **Brazilian J Plant Physiol** 17: 129-143.

Yu, Y., Zhou, w., Liang, X., Zhou, K., Lin, X. (2019). Increased bound putrescine accumulation contributes to the maintenance of antioxidant enzymes and higher aluminum tolerance in wheat. **Environmental pollution**. 10.10.10106.

Zhang, L. et al. (2016) Polyphenol-aluminum complex formation: Implications for aluminum tolerance in plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 64, 3025–3033.

Capítulo 1

Resistência ao alumínio induzida pelo malato e pela epiderme em raízes do genótipo de soja A7002

Resumo

Principal cultura agrícola do país, o cultivo da soja vem sendo ampliado a regiões marginais. Entretanto, o potencial produtivo dessa cultura é afetado por estresses abióticos, como à seca e a presença de alumínio (Al), comum em solos ácidos, sendo a maioria dos solos no Brasil. Para entender as alterações impostas pelo Al sobre a morfologia e o metabolismo da soja avaliamos o acúmulo de Al nas raízes, as alterações anatômicas, morfológicas e bioquímicas no genótipo de soja A7002. Para isso plântulas de soja foram submetidas aos tratamentos controle (sem a presença de Al) e a 100 µM de AlCl₃, pH 4,0, com aeração constante em sala de crescimento por 72 horas, em delineamento inteiramente casualizado com seis repetições. O genótipo A7002 acumulou grande quantidade de Al, o qual ficou complexado nas células mais externas da coifa. Por outro lado, o Al não afetou o crescimento radicular, porém afetou a produção de ápices radiculares e bifurcações. Houve aumento nas concentrações de açúcares e malato após a aplicação de Al, sugerindo que o mecanismo de tolerância desse genótipo frente ao Al se baseia na complexação desse metal nas camadas mais externas da raiz. A

atividade das enzimas do estresse oxidativo não foi alterada na presença do Al. Apesar do teor de H_2O_2 ter aumentado na presença de Al, a taxa da peroxidação lipídica não foi alterada, demonstrando ausência de dano oxidativo nas raízes. Assim o genótipo A7002 demonstrou tolerância frente ao Al, através da epiderme radicular e pela presença de malato. Por outro lado, o sistema de defesa antioxidativo enzimático foi pouco influenciado pelo metal.

Palavras-chaves: Toxicidade do alumínio. Ápice radicular. *Glycine max*. Metabolismo primário. Enzimas antioxidantes.

1 Introdução

O grão da soja é amplamente utilizado na alimentação humana e animal devido a sua ampla composição de nutrientes, além dos elevados teores de proteína e óleo, o mesmo óleo usado para a produção de medicamentos, biodiesel, entre outros. Sendo assim é a principal cultura agrícola do país, e segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), a estimativa para o ciclo 2021/2022, indica que o Brasil deverá produzir 268,2 milhões de toneladas de grãos, 14,7% ou 37 milhões de toneladas superiores ao obtido na safra 2020/21 (Conab, 2021).

A grande demanda pela soja e seus produtos em todo mundo contribui para um elevado grau de investimento, para aumentar a produtividade da cultura. Entretanto, o potencial produtivo da soja é afetado por fenômenos abióticos, como a seca, além de variações nutricionais no solo, como por exemplo, a presença de alumínio (Al) (Rose et al. 2016).

A acidificação do solo é um fenômeno natural, além disso, alguns fatores podem acelerar essa acidificação, como a agricultura intensiva, a lixiviação acentuada de cátions básicos, como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} e as chuvas ácidas (Guo et al. 2010). A diminuição do pH do solo pode prejudicar diversas culturas, uma vez que este fenômeno está diretamente relacionado ao aumento da solubilidade do Al. Assim, a acidez do solo promove a biodisponibilidade do Al facilitando sua absorção pelas raízes, podendo resultar em danos irreversíveis ao metabolismo e a estrutura do sistema radicular (Kopittke et al., 2016; Eekhout et al. 2017; Geng et al. 2017). Após ser absorvido, o Al pode interagir com diferentes biomoléculas, vias bioquímicas, processos celulares e funções fisiológicas resultando em danos anatômicos e/ou morfofisiológicos em plantas (Kisnieriene, Lapeikaite, 2015; Bojórquez-Quintal et al. 2017; Silva et al. 2020).

O Al é predominantemente acumulado na região apoplástica da raiz, que abrange, aproximadamente, 30% a 90% do Al acumulado nas células periféricas na planta (Doncheva et al. 2005., Frantzios et al. 2005). Além de regular o crescimento e o desenvolvimento da planta, a parede celular desempenha um papel importante na percepção e expressão da toxicidade do Al (Yang et al. 2011). Adicionalmente, plantas submetidas ao estresse por Al podem acumular espécies reativas de oxigênio (ROS) em organelas como nas mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos (Kochian et al. 2004), induzindo danos aos componentes celulares. Para desintoxicar as células dessas ROS, as plantas recorrem ao complexo de sistema antioxidante enzimático e não enzimático (Silva et al. 2000).

Plantas submetidas ao estresse por Al podem modificar a síntese de seus metabólitos para se adaptarem e sobreviverem às pressões do ambiente (Arbona et al. 2013). Métodos metabolômicos são cada vez mais utilizados para estudar as respostas aos estresses abióticos, incluindo tensões por íons, e analisando as alterações na síntese de carboidratos, e intermediários do Ciclo do Ácido Tricarboxílico e aminoácidos (Obata e Fernie 2012, Arbona et al. 2013, Zhuang et al. 2014).

Em plantas, os mecanismos que permitem à planta conviver com o Al podem ser divididos em aqueles que ajudam na exclusão de Al das células da raiz (mecanismo de exclusão) e os que permitem que as plantas tolerem o Al, após sua entrada na região do simplasto da raiz (mecanismo de tolerância interna) (Brunner, Sperisen's, 2013). Os principais compostos metabólicos relacionados à tolerância ao Al estão associados à atividade mitocondrial, como o metabolismo mitocondrial e o transporte de ácidos orgânicos (Nunes- Nesi et al. 2014).

Nos últimos anos, avanços científicos foram alcançados com estudos envolvendo os mecanismos de resistência de plantas cultivadas frente ao Al (Xu et al. 2016; Lin et al. 2020). Sob estresse por Al, a exsudação de ácidos orgânicos (OAs), tais como malato, citrato e oxalato, é um mecanismo importante de resistência das plantas à toxicidade desse metal (Kochian et al. 2015). Os ácidos orgânicos são exsudados a partir das raízes para a rizosfera e são capazes de quelar as moléculas de Al livre (Al^{3+}). Essa quelação substitui o Al tóxico por moléculas estáveis e não fitotóxicas, e é documentada como mecanismo de exclusão (Kochian et al. 2005).

Contudo ainda são escassos os estudos com a cultura da soja frente ao Al, principalmente com foco no metabolismo e na anatomia das raízes, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os sítios de acúmulo de Al nas raízes, e as alterações estruturais induzidas nesse órgão por este metal, além de investigar as respostas no metabolismo primário e no sistema de defesa antioxidativo no genótipo de soja A7002.

2 Material e Métodos

2.1. Condições de cultivo e delineamento experimental

Sementes do genótipo de soja A7002 foram adquiridas através do Banco de Sementes do Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja do Bioagro na UFV. As sementes foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 5% durante 5 minutos, sendo em seguida

lavadas em água destilada. Posteriormente, as sementes foram germinadas em rolos de papel germitest umedecidos com solução de germinação (CaCl_2 100 μM), pH 7,0 e mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25°C (± 2) e umidade de 80% (± 10). Após três dias no escuro, os rolos foram expostos à luz e permaneceram por mais três dias na sala de crescimento. No sétimo dia as plântulas foram transferidas para a solução de Clark (1975), pH 4,0, para aclimação por 48 horas, com fotoperíodo de 16/8h (luz/escuro), sob aeração constante e temperatura controlada de 25°C (± 2). Após a aclimação as plântulas foram padronizadas quanto ao comprimento da raiz e da parte aérea. Em seguida, foram transferidas para vasos de 2L com solução de Clark (1975), pH 4,0, sob aeração constante nos seguintes tratamentos: controle (0 μM de Al) e presença de Al (100 μM de Al) na forma de AlCl_3 , durante 72h. O pH foi ajustado diariamente para 4,0. A dose escolhida já é trabalhada com plantas de soja em outros experimentos, pois causam danos nos ápices das raízes.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 6 repetições por tratamento e a unidade experimental consistia de 4 plantas por vaso.

2.2. Avaliação do alumínio nas raízes

2.2.1. Determinação do teor de alumínio

As raízes foram secas em estufa de ventilação forçada à 70°C e moídas manualmente. Amostras de 0,2 g de raiz foram digeridas em solução nitroperclórica (3:1) em bloco digestor com temperatura controlada (Tedesco et al. 1995). As concentrações de Al foram determinadas por espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado.

2.2.2. Coloração dos ápices radiculares por hematoxilina

O acúmulo de Al nos ápices radiculares foi analisado pela coloração com hematoxilina férrica (Polle et al. 1978). Ápices radiculares com 1 cm de comprimento foram mergulhados em solução de hematoxilina férrica 0,2% (p/v) em NaIO_3 0,02% (p/v), durante 25 minutos. Após, as amostras foram lavadas em água deionizada por 15 min para remover o excesso de corante. Finalmente, as raízes foram coletadas e observadas em lupa Axio Cam Erc 5s e fotografadas. A reação positiva da hematoxilina com o Al é comprovada pela coloração arroxeada.

2.2.3. Histolocalização do alumínio pelo corante Chrome Azurol' S

Ápices radiculares com 1 cm de comprimento (4 amostras por repetição, totalizando 24 amostras por tratamento) foram coletados e fixados em FAA 50% (formaldeído, ácido acético e álcool) e armazenados em álcool etílico 70%. Em seguida, parte das amostras foi desidratada em série etílica e infiltrada em resina pura e álcool 95% por 7 dias sob vácuo intermitente. Os fragmentos de raízes foram emblocados em resina metacrilato (Historesina- Leica) no plano de corte (longitudinal da raiz). Os cortes de 5 µm de espessura foram realizados em micrótomo rotativo de avanço automático (model RM 2155. Leica Microsystems Inc., Deerfield USA), com navalha de vidro. Os cortes foram corados com Chrome Azurol' S 0,5% (Kukachka e Miller, 1980). As imagens foram obtidas por câmera fotográfica digital (modelo Zeiss AxioCam HRc, Göttinger, Germany), acoplada ao microscópio de luz (modelo AX-70 TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japan), com sistema de captura de imagens Axion Vision.

2.3. Parâmetros fenotípicos

Ao final das 72 horas foi obtido o comprimento radicular (cm) através de uma régua milimétrica. Adicionalmente, o sistema radicular foi digitalizado pelo sistema de análise de imagem de varredura da raiz através do Software WinRHIZO®, para obtenção dos parâmetros: número de ápices de raízes, diâmetro médio de raízes, volume de raízes, área superficial de raízes e número de bifurcações das raízes.

2.4. Micromorfologia e microanálise do alumínio em ápices radiculares

2.4.1. Análise em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

Ápices radiculares, de aproximadamente 0,5 cm, foram obtidos de raízes principais e fixados em glutaraldeído 2,5%. Em seguida, foram desidratados em série etílica, secos com CO₂ em equipamento de ponto crítico (CPD 030, Baltec, Liechtenstein), fixados em suporte e cobertos com ouro em metalizador (FDU 010, Balzers, Liechtenstein). O material foi observado e fotografado em microscópio eletrônico de varredura (Leo 1430VP, Cambridge, Inglaterra).

2.4.2. Microanálise de raio-X (MEV-EDS)

Ápices radiculares de aproximadamente 0,5 cm foram obtidos a partir das raízes principais e fixados em 2,5% de glutaraldeído. Em seguida, foram desidratadas em série etílica, secas com CO₂ em equipamento de ponto crítico (CPD 030, Baltec, Liechtenstein). Após secagem, o material vegetal foi fixado em suporte e coberto com carbono no evaporador de carbono (Q150T, Quorum Technologies, Ashford, Kent, UK). O material foi analisado em microscópio eletrônico de varredura (Leo 1430VP, Cambridge, Inglaterra) com sonda de raio-X (MEV-EDS) acoplada para avaliação da distribuição do Al.

2.5. Determinação da quantificação de proteína, amido, aminoácidos totais, açúcares solúveis, malato e fumarato

Amostras de 200 mg de raízes foram maceradas e, posteriormente os metabólitos foram extraídos pela mistura de metanol, água e clorofórmio segundo protocolo de Lisec et al., 2006. A fração solúvel e o material precipitado resultante da extração foram armazenados a -80°C para posteriores análises. A fração solúvel foi utilizada para a quantificação dos teores de glicose, frutose e sacarose (Ferne et al. 2001b), aminoácidos solúveis totais (Yemm et al; 1955) e os ácidos orgânicos malato e fumarato (Nunes-Nesi et al. 2007). No precipitado foram quantificados os teores de amido (Ferne et al. 2001a) e proteínas (Bradford, 1976).

2.6. Quantificação do peróxido de hidrogênio e da peroxidação lipídica

Para a determinação da concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 100 mg de raízes foram homogeneizadas em meio de extração constituído de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% e polivinilpolipirrolidona (PVPP), e centrifugados a 12.000xg, por 15 minutos a 4 °C. Alíquotas de 125 µl do sobrenadante foram adicionadas a 250 µl do meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 2,5 mM pH 7,0 e iodeto de potássio (KI) 1M com leituras a 390 nm realizadas em espectrofotômetro (UV/Visível Multiskan GO®). As concentrações de peróxido de hidrogênio foram estimadas com base em curva de calibração preparada com padrões de H₂O₂ (Velikova et al. 2000).

O grau de peroxidação lipídica foi medido pela quantificação de malondialdeído (MDA), para isso amostras de 0,3 g da matéria fresca de raiz foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 1% (p/v). Os homogeneizados foram centrifugados a 14.000 rpm por 15 minutos. Todas as etapas necessárias ao processo de extração foram conduzidas a 4° C. Alíquotas de 0,5 ml do

sobrenadante foram adicionadas a 1,5 ml de uma solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (p/v) em TCA 20% (p/v), e colocada em banho-maria a 95° C. Após 30 min, a reação foi paralisada em banho de gelo. Posteriormente, foram centrifugados a 14000 rpm por 10 minutos e a absorbância dos sobrenadantes foi determinada a 532 nm. A absorbância inespecífica a 600 nm foi medida e subtraída das amostras. A concentração do complexo aldeído malônico-TBA foi calculada usando-se o coeficiente de absorvidade molar de $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Heath and Packer, 1968).

2.7. Enzimas do metabolismo antioxidativo

2.7.1. Obtenção dos extratos enzimáticos SOD, CAT, APX E POX

Para a determinação da atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e peroxidase (POX) 0,3 g de raízes foram maceradas em nitrogênio líquido e, homogeneizadas com tampão de extração constituído de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, EDTA 0,1 mM, PMSF 1 mM e PVPP 1% (p/v). Após, o material foi centrifugado a 14.000 rpm por 15 min a 4°C. Por fim, o sobrenadante foi coletado e utilizado nas avaliações enzimáticas e para as dosagens de proteína. Todas as etapas necessárias ao processo foram executadas a 4°C.

2.7.2. Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)

À mistura de reação, constituída de metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT), 75 μM , EDTA 0,1 μM e riboflavina 2 μM , em tampão de fosfatode sódio 50 mM, pH 7,8 (Del longo et al., 1993), foi adicionado 50 μL do extrato enzimático. A reação foi conduzida a 25°C por 5 min numa câmara de reação sob a iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W (Giannopolitis e Ries, 1977). A produção de formazana azul, resultante da foto-redução do NBT, foi medida pela determinação do incremento na absorvância a 560 nm, que foi subtraída de um “branco”, no qual a mistura de reação foi mantida no escuro. Uma unidade da SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a foto-redução do NBT (Beauchamp e Fridovic, 1971).

2.7.3. Determinação da atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

A atividade da CAT foi determinada pela adição de 10 μL do extrato enzimático bruto a 190 μL de meio de reação, constituído de H_2O_2 12,5 mM, pH 7,0 em tampão fosfato de

potássio 100 mM, pH 7,0, a 30°C (Havner e Mchale, 1987). A atividade da enzima foi determinada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm durante 1 min. A atividade da CAT foi calculada, utilizando-se, o coeficiente de extinção molar de $36 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (ANDERSON et al., 1995).

2.7.4. Determinação da atividade da ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11)

A atividade da APX foi determinada de acordo com o método de NAKANO e ASADA (1981), e modificado por KOSHIBA (1993). A atividade foi determinada pela adição de 10 μL do extrato bruto enzimático a 180 μL do meio de reação, constituído de tampão de fosfato de potássio 100 mM, ácido ascórbico 0,5 mM, água e H_2O_2 1 mM. O decréscimo na absorbância das amostras a 290 nm durante 1 minuto a cada 15 segundos, foi utilizado para determinar a atividade da enzima, utilizando o coeficiente de extinção molar de $2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Nakano & Asada, 1981).

2.7.5. Determinação da atividade da peroxidase (POX, EC 1.11.1.7)

A atividade da POX foi determinada pela adição 10 μL do extrato enzimático bruto a 290 μL de meio de reação, constituído de tampão fosfato 25 mM, pH 6,8, H_2O_2 20 mM, pirogalol 20 mM e água. O incremento da absorbância foi avaliado durante o primeiro minuto de reação a 420 nm, a 25 C. A atividade enzimática foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de $2,4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Chance e Maehley, 1955).

2.8. Análise estatística

Os dados quantitativos de biometria, metabolismo primário, estresse oxidativo e enzimas do sistema oxidante foram submetidos à análise de variância e suas médias foram submetidas ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, homogeneidade de variância de Bartlett comparadas pelo teste de turkey no nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$) no software R x 64.3.5.3 (R Core Team, 2019).

3. Resultados

Após 72 h de exposição ao Al, as raízes acumularam cerca de 6 vezes mais Al comparado as raízes do controle (Fig 1A). Na detecção do Al pelo corante hematoxilina foi observada reação positiva (coloração arroxeada), apenas nas raízes tratadas com Al, sendo essa coloração uniforme ao longo da raiz (Fig. 1B). A histoquímica do Al pelo corante

Chrome Azurol'S evidenciou reação positiva (coloração azul), com o Al em células mais externa da raiz (Fig.1D). Essa coloração foi intensa na parede celular das células externa radicular e do ápice, onde o Al se acumulou. Não foi observado acúmulo de Al nas células do promeristema e do meristema fundamental (Fig. 1D, E). No tratamento controle houve reação negativa ao corante Chrome Azurol'S (Fig. 1C).

Após exposição do genótipo A7002 ao Al, não houve alteração nos parâmetros: comprimento da raiz, volume de raízes e área superficial de raízes (Fig. 2A, D, E). Os parâmetros, número de ápices de raízes e número de bifurcações das raízes (Fig. 2B, F) reduziram após exposição ao Al. Por outro lado, o Al aumentou o diâmetro médio de raízes (Fig. 2C). O aumento no diâmetro das raízes também pode ser observado pela técnica de microscopia de luz (Fig. 1C: controle e Fig. 1D: + Al) e pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (Fig. 3A: controle e Fig. 3C: + Al). O fenótipo do genótipo A7002 pode ser observado na (Fig. 3G). Por essa figura é possível observar a manutenção do comprimento da raiz e a redução no número de ápices radiculares e no número de bifurcações após tratamento com Al. Além disso, é possível observar redução no comprimento da parte aérea após exposição ao Al.

Pela micrografia obtida pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) observa-se uma descamação das células da células externas do ápice radicular após exposição ao Al (Fig. 3A, C). Já pela microanálise de raios-X acoplada ao microscópio eletrônico de varredura (MEV-EDS) é possível observar acúmulo de Al no ápice radicular, representada pela cor vermelha (Fig. 3D). Por outro lado, no tratamento controle foi observada marcação negativa para o Al (ausência de cor vermelha) (Fig. 3B).

Em plantas tratadas com Al houve aumento de 1,5 vezes nos teores de glicose e frutose (Fig. 4A, B). Por outro lado, o teor de sacarose não foi alterado (Fig. 4 C). O Al também não alterou os teores de aminoácidos e proteínas totais (Fig. 4 D, E). Já para o metabolismo de ácido orgânico, houve aumento de 1,2 vezes no teor de malato após tratamento com Al (Fig. 4 F). Não foi identificada a presença do ácido orgânico fumarato nas raízes do genótipo A7002, independente do tratamento. O teor de amido nas raízes não foi alterado após tratamento com Al (Fig. 4 G).

Na avaliação do metabolismo antioxidativo, apenas a concentração do peróxido de hidrogênio foi alterada após exposição ao Al, com aumento de 2,3 vezes na sua concentração (Fig. 5A). O teor da peroxidação lipídica (MDA) e a atividade das enzimas SOD, POX, APX e CAT manteve-se inalterada após exposição ao Al (Fig. 5 B-F).

4. Figuras:

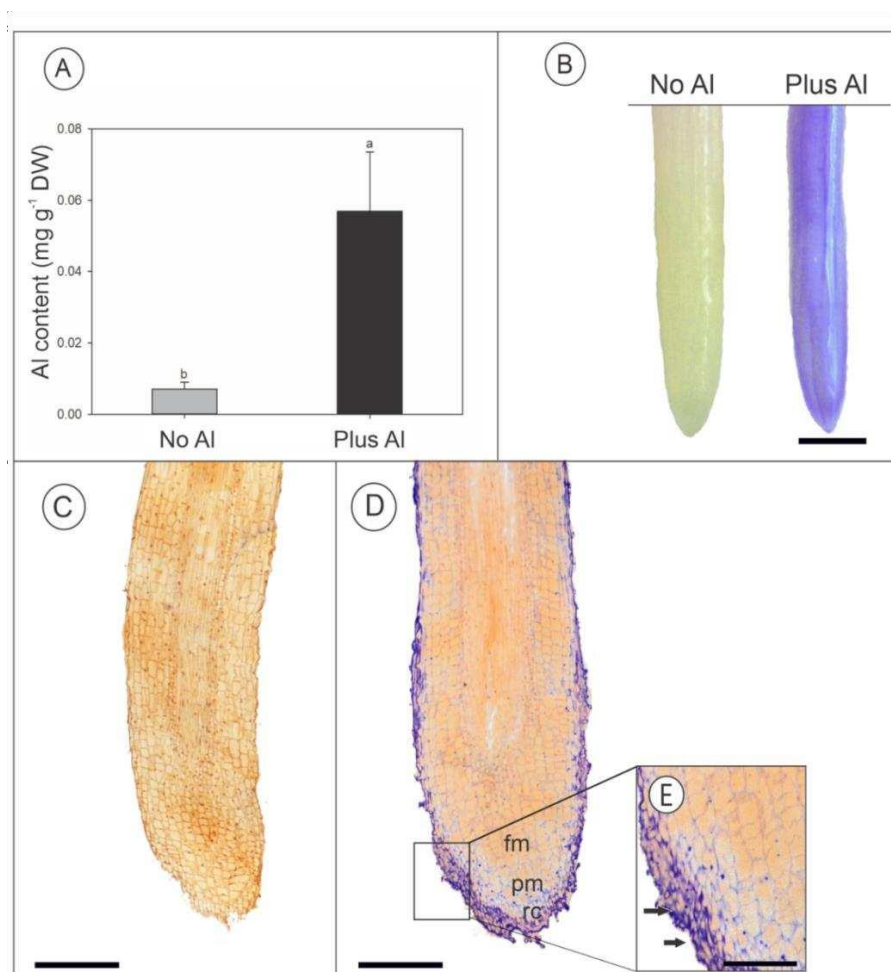


Figura 1. Teor e histolocalização do alumínio (Al) em raízes do genótipo de soja A7002 cultivado por sete dias em solução hidropônica com duas concentrações de Al: No Al (0 μ M) e Plus Al (100 μ M Al), após 72h. **A:** Teor de alumínio na raiz. Barras verticais representam o erro padrão (n = 5) e letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey (p < 0,05). **B:** Histoquímica do Al na raiz pela coloração com o corante hematoxilina. **C, D e E:** Anatomia da raiz e histoquímica do Al pelo corante Chrome Azurol'S 0,5% em tecidos radiculares com corte longitudinal em ponta de raiz. **C:** controle do genótipo A7002. **D:** Coloração azul arroxeada indica reação positiva ao corante Chrome Azurol'S, **E:** Setas pretas indicam presença de Al entre as camadas de células. Barras: B = 55 mm; C e D = 500 μ m e E= 1000 μ m. rc: coifa da raiz, pm: promeristema e fm: meristema fundamental.

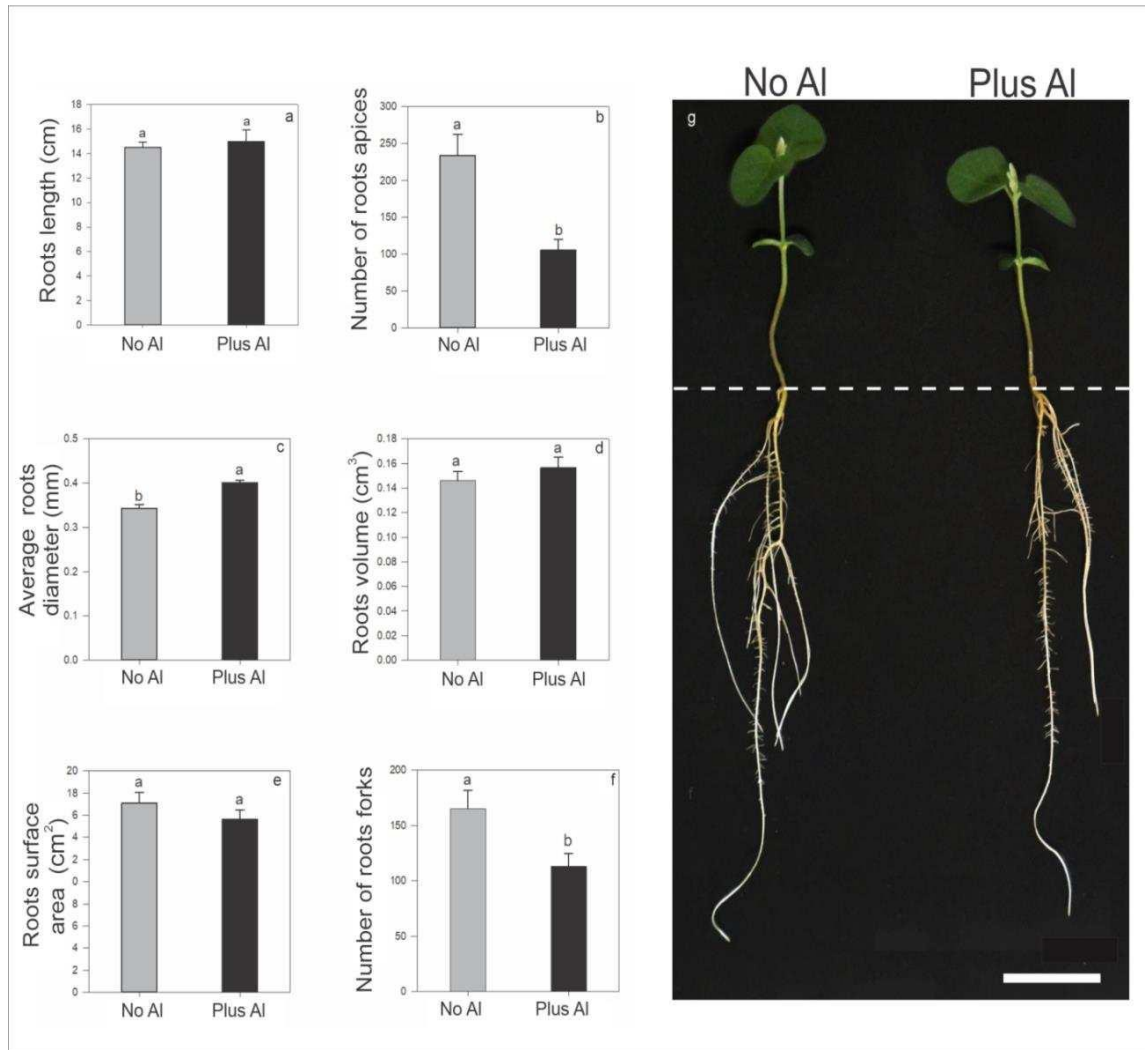


Figura 2. Parâmetros biométricos e fenótipo do genótipo de soja A7002 cultivado por sete dias em solução hidropônica com duas concentrações de Al: No Al (0 μM) e Plus Al (100 μM Al), após 72h. **a:** comprimento da raiz; **b:** número de ápices de raízes; **c:** diâmetro médio de raízes; **d:** volume de raízes; **e:** área superficial de raízes; **f:** número de bifurcações das raízes. Barras verticais representam o erro padrão ($n = 5$) e letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). **g:** Fenótipo do genótipo A7002. Barras = 5 cm.

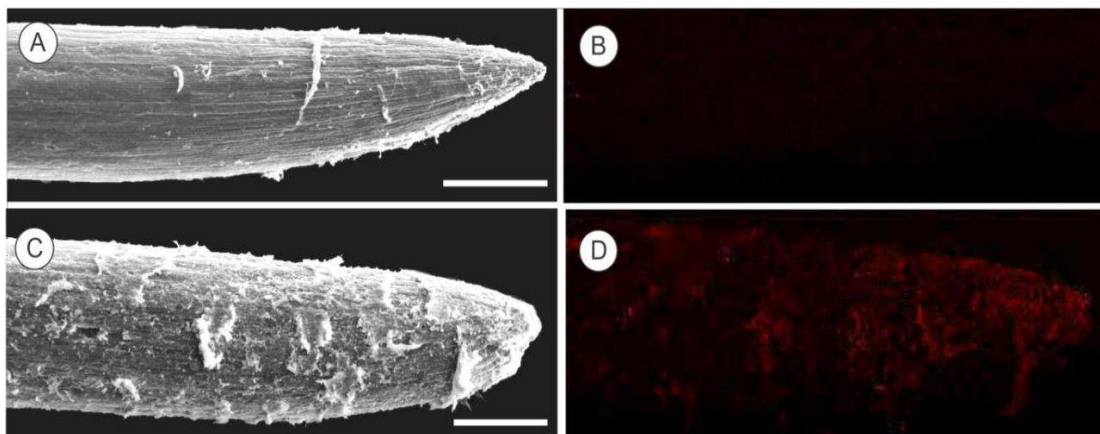


Figura 3: Micrografia dos ápices radiculares do genótipo de soja A7002 cultivado por sete dias em solução hidropônica com duas concentrações de Al: No Al (0 μM) e Plus Al (100 μM Al), após 72h. **A e C:** microscopia eletrônica de varredura (MEV); **B e D:** localização do acúmulo de Al por espectrometria de energia dispersiva de raio-X (EDS). As áreas vermelhas indicam a presença de Al. Barra = 200 μm .

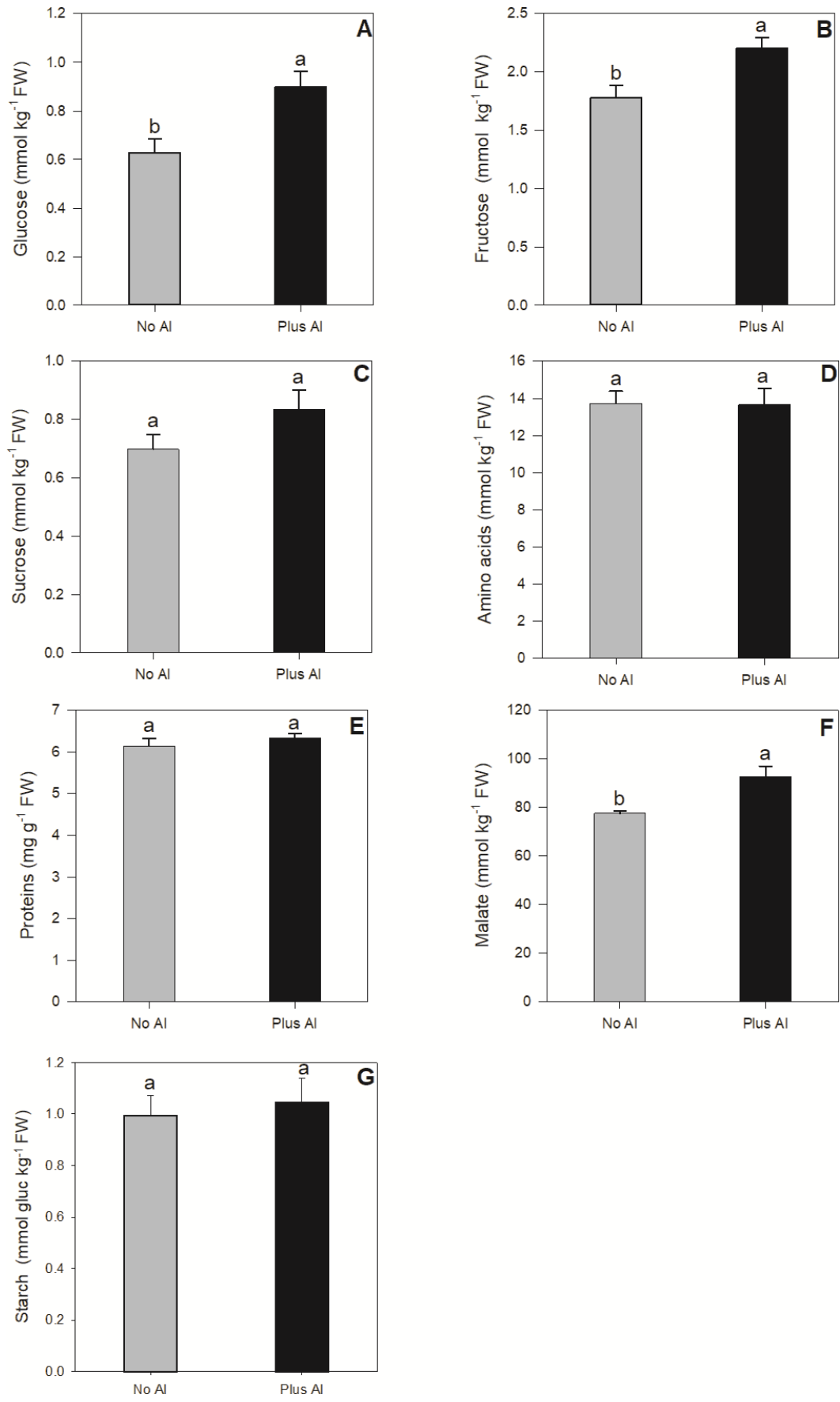


Figura 4. Concentração de metabólitos primários em raízes do genótipo de soja A7002 cultivadas por sete dias em solução hidropônica com duas concentrações de Al: No Al (0 μM) e Plus Al (100 μM Al), após 72h. **A:** glicose; **B:** frutose; **C:** sacarose; **D:** aminoácidos; **E:** proteínas; **F:** malato; **G:** amido. Barras verticais representam o erro padrão ($n = 5$) e letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

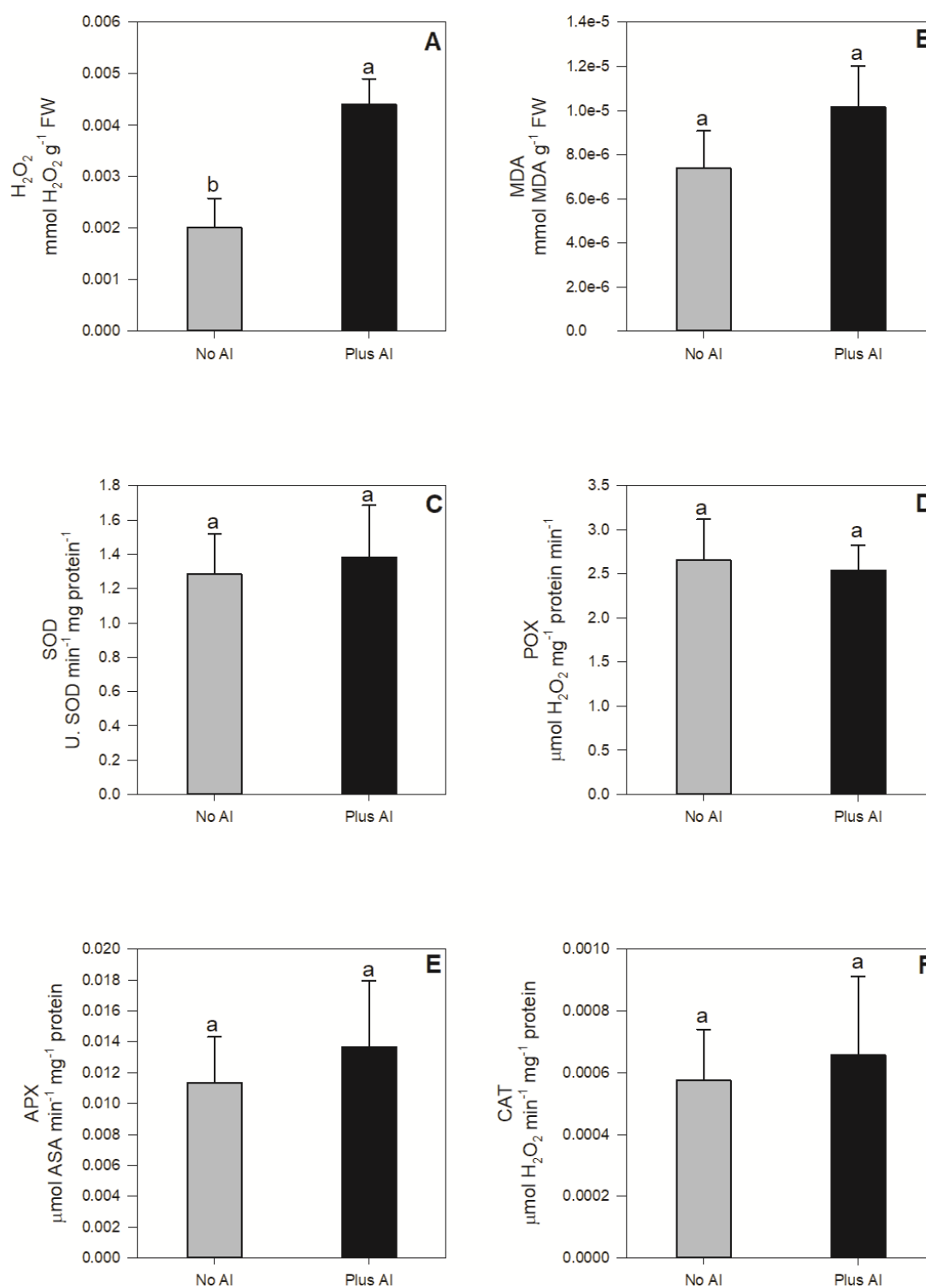


Figura 5. Metabolismo antioxidativo em raízes do genótipo de soja A7002 cultivado por sete dias em solução hidropônica com duas concentrações de Al: No Al (0 μ M) e Plus Al (100 μ M Al), após 72h. **A:** Concentração de peróxido de hidrogênio, **B:** concentração de malonaldeído (MDA), **C:** Atividade da dismutase do superóxido (SOD); **D:** Atividade da peroxidase total (POX) **E:** Atividade da peroxidase do ascorbato (APX); **F:** Atividade da catalase (CAT). Barras verticais representam o erro padrão (n = 5) e letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey (p <0,05).

5 Discussão

Para algumas plantas cultivadas, como milho, arroz e sorgo, há informações sobre os sítios de acúmulo de Al nas raízes (Kollmeier et al. 2000; Yang et al. 2008; Too et al. 2014). No entanto, para a cultura da soja, uma das mais importantes culturas do agronegócio brasileiro, não está claro onde esse metal se acumula na raiz, e consequentemente os possíveis danos morfológicos, fisiológicos e metabólicos gerados por este metal neste órgão. Assim, no presente trabalho, demonstramos que o genótipo de soja A7002 acumulou maiores teores de Al nas raízes (Fig. 1A), contudo esse metal ficou restrito às células da externas das raízes (Fig. 1B, D). Embora o Al tenha acumulado nas raízes (Fig. 1), não houve redução no crescimento da raiz (Fig. 2A, G), e poucas variações foram observadas no metabolismo primário (Fig. 4) e no metabolismo antioxidativo (Fig. 5). Desta forma, a manutenção do crescimento da raiz sob condições estressantes de Al é frequentemente associada a plantas resistentes ao Al (Kochian et al. 2004, 2015). Assim, nas condições experimentais do presente trabalho, nossos resultados indicam que o genótipo A7002 é tolerante ao Al.

Apesar do teor de Al aumentar cerca de seis vezes nas raízes após tratamento com este metal (Fig. 1A), a maior parte desse metal ficou nas células mais externas das raízes (Fig. 1D, E). Resultado confirmado pelo corante hematoxilina (Fig. 1B) e pela localização do Al pela técnica de MEV-EDS (Fig. 3D). O Al absorvido nas células radiculares liga-se, principalmente, à matriz de pectina da parede celular, mais especificamente, aos grupos carboxílicos carregados negativamente (Chang et al. 1999). Dessa forma, a ligação forte e rápida do Al a estes componentes químicos permite uma menor mobilidade deste metal, impedindo sua chegada à região simplástica. Consequentemente reduz os danos a importantes regiões celulares, como os meristemas apicais e principalmente o núcleo celular; além de organelas, como mitocôndrias e cloroplastos (Kochian et al. 2005).

O acúmulo de Al nas raízes não alterou os parâmetros de comprimento, volume e área superficial das raízes (Fig. 2A, D, E). Geralmente, a região da planta mais facilmente afetada

pela toxidez do Al é a raiz. A fitotoxicidade do Al se deve à inibição do crescimento radicular e interferem na absorção e translocação de nutrientes e água, que afetam o crescimento (Siqueira et al. 2020). Contudo, no presente trabalho a imobilização do Al as células mais externas da raiz promoveu um crescimento normal da raiz, mesmo na presença desse metal. Por outro lado, o acúmulo de Al nas células mais externa da raiz, evidenciado por diferentes técnicas de histolocalização (Fig. 1B, 1D, 3D) resultou em alterações estruturais na anatomia externa da raiz. Esse acúmulo de Al resultou em descamação das células do ápice da raiz após exposição ao metal (Fig. 3A, C). Esses danos estruturais são induzidos pelo rompimento de algumas células mais externas, epiderme e ou cortex, provavelmente pelo crescimento desigual, uma vez que a presença de Al aumenta a rigidez das paredes e pode induzir expansões desiguais em diferentes regiões da célula (Ciamporová, 2000; Tabuchi e Matsumoto, 2001).

Além da descamação radicular, outra alteração induzida pelo Al no genótipo de soja A7002 foi à redução no número de ápices radiculares (Fig. 2B, G) e aumento no diâmetro das raízes (Fig. 2C). Isso ocorre, pois a exposição ao Al interrompe a expansão celular através da desorganização de microtúbulos e microfilamento nas células radiculares (Wallace e Andersen, 1984; Frantzios et al., 2001; Alessa e Oliveira, 2001). O Al leva à redução da divisão celular e bloqueio da ação do citoesqueleto. As deformações morfológicas e estruturais podem ser mais facilmente manifestadas (Ciamporová, 2002; Panda et al., 2009; Silva, 2012; Kopittke et al., 2015).

Paralelamente a neutralização do Al aos componentes químicos da parede celular, observamos também um acréscimo no teor do ácido orgânico malato nas células radiculares após tratamento com Al (Fig. 4F). A atuação concomitante dessas respostas pode caracterizar um importante mecanismo de resistência em raízes do genótipo de soja A7002. Desta forma, além do Al ser imobilizado pelos componentes da parede celular das células da epiderme, esse metal pode ser quelado por esse ácido orgânico, e neutralizado para formas não tóxicas. Além disso, o malato pode ser exsudado pelas raízes, impedindo o influxo de Al (Chen et al 2016).

A maior concentração dos açúcares solúveis glicose e frutose (Figura 4A, B) pode estar relacionada com a manutenção do desenvolvimento mesmo sob estresse, não precisando interferir nos estoques de amido (Figura 4G). Os açúcares solúveis podem acumular nas células em respostas a diferentes tipos de estresses (Cárcamo et al. 2019). O fornecimento de carbono e sua utilização são importantes para o crescimento e desenvolvimento da planta (Smith e Stitt, 2007; Muller et al. 2011). Assim, glicose e frutose podem ser utilizadas como

fonte de energia para manter o crescimento das raízes do genótipo de soja A7002 mesmo na presença de Al.

Para controlar o estresse nas plantas devido à condição de estresse há mecanismos de defesa própria que são as enzimas oxidativas, que podem perceber o estresse e provocar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em vários compartimentos como nas mitocôndrias e peroxissomos (Kochian et al. 2004; Silva et al. 2020). ROS podem causar danos oxidativos aos componentes celulares se sobrecarregar o sistema antioxidante (Sivaguru et al. 2013, Silva et al. 2020).

Além dos mecanismos de defesas enzimáticas, há o mecanismo defesas não enzimático, com destaque para o ascorbato (AsA) e a glutathione (GSH) que podem neutralizar a citotoxicidade das ROS. Esses podem evitar formação de radicais livres, promover degradação prevenindo danos às células e o acionamento de enzimas antioxidativas (Serkedjieva, 2011). Contudo, o equilíbrio entre a produção e a neutralização pode ser alterado, com o estresse aplicado (Cyrne et al., 2003).

6. Conclusões

Apesar de acumular em tecidos radiculares, o Al induziu poucos danos às raízes do genótipo de soja A7002, o que permitiu uma manutenção do crescimento e do desenvolvimento desse órgão. O menor dano gerado pelo Al está relacionado à maior produção do ácido orgânico malato em células radiculares e ao acúmulo de Al nas paredes celulares das células externas do ápice radicular. Assim, o malato pode estar envolvido com sua acumulação nas raízes, numa tentativa de quelação com o Al, além da neutralização (acúmulo) do Al em células radiculares mais externas, impedindo sua interiorização para tecidos de transporte e para regiões meristemáticas, impedindo o fator de estresse.

7. Referência

- Alessa, L. Oliveira, L. (2001) Aluminum toxicity studies in *Vaucheria longicaulis* var. *Macounii* (Xanthophyta Tribophyceae) II. Effects on the F-Actin array. **Environmental and Experimental Botany** 45: 223–237.
- Arbona, V., Manzi, M., Ollas, C.D., Genez-Cadenao, A., (2013) Metabolites as a tool to investigate abiotic stress tolerance in plants. **International Journal of Molecular Sciences** 14: 4885–4911.

- Achary, Y.Y.M.M, June. S, Panda, K.K, Panda, B.B, (2008) Aluminum induce oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**.
- Anderson, J.S., Lall, S. P., Anderson, D.M, McAniven., Ma (1995) Availability of amino acids from various fish meals fed to Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, 138, 291- 301.
- Anjum, N, A., Sofo, A., Scopa, A et al (2015) Lipids and proteins--major targets of oxidative modifications. in abiotic stressed plants. **Environ Sci Pollut Res** 22: 4099- 4121.
- Arbona, V., Manzi, M., Ollas, C, D., Gonez-Cadenao A. (2013) Metabolites as a tool to investigate abiotic stress tolerance in plants. **International Journal of Molecular ciences** 14: 4885–4911.
- Bera, T, Sharma, S., Thind, H, S., Sidhu, H, S., Jat, M.L (207). Soil biochemical changes at different Wheat growth stages in response to conservation agriculture pratices in a rice-wheat system of north-westerb India. **Soil, research**, 56(1), 91-104.
- 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**, 248-254.
- Beauchamp, C., Fridoviche (1971) Superoxide desmutase: Improved assay and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**.
- Bojórquez-Quintal, E., Escalante-Magana, C. Echevarria-Machado, I., Martínez-Estévez, M. (2017) Aluminum, a Friend or Foe of Higher Plants in Acid Soils. **Frontiers in Plant Science**. Vol. 8, Article 1767.
- Bose, J., Babourina, O., Ma, Y., Zhou, M., Shabala, S., Rengel, Z. (2015). “Specificity of ion uptake and homeostasis maintenance during acid and aluminium stresses,” in *Aluminum Stress Adaptation in Plants*. **Signaling Communication in Plants** vol. 24, eds SK Panda e F. Baluska. Brazilian cerrado and their development. **J Biogeogr** 15:97-108.
- Brito, D.S., Neri-Silva, Roberto., Ribeiro, K, V., Peixoto, P.H.P., Ribeiro. C. (2020) Effects of aluminum on the external morphology of root tips in rice. **Brazilian Journal of Botany**, v. 1, p. 1, 2020. , v. 1, p. 1.
- Brunner, I., Sperisen, C. (2013) Aluminum exclusion and aluminum tolerance in woody plants. **Front. Plant Sci** 12:1-12.
- Cardamom, M, P., Reyes-Díaz, M., Renge, I. Z., Alberdi, M., Omena-Garcia, R, P., Nunes-Nesi, A, .Inostroza-Blancheteau, C., (2019). Aluminum stress differentially affects

physiological performance and metabolic compounds in cultivars of highbush blueberry. **Sci Rep. Aug 2; 9(1):11275.**

Carvalho, M.H.C. (2008) Drought stress and reactive oxygen species. Production,

Fernie, A.R., Willmtzer, L, (2001) Molecular and biochemical triggers of potato tuber development. **Plant Physiology.**

Chance, B, Maehly, A.C., (1955). Assay of Catalase and Peroxidase. **Methods in Enzymology**, 2, 764-775.

Chen, Z.C., Liao, H., (2016) Organic acid anions: An effective defensive weapon for plants against aluminum toxicity and phosphorus deficiency in acidic soils, **Journal of Genetics and Genomics.**

Ciampovorá (2000). Diverses of root cell structure to aluminum stress. **Plant Soil.**

Ciamporová, M (2002) Morphological and structural responses of plant roots to aluminum at organ, tissue and cellular levels. **Biologia Plantarum** 45: 161–171.

Chang, Y, C., Yamamoto, Y., Matsumoto, H (1999). Accumulation of aluminum in the cell wall pectin in cultured tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cells treated with a combination of aluminum and iron. **Plant, Cell & Environment** 22: 1009–1017.

Cyrne, L. et al. (2003) Regulation of antioxidant enzymes gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* during stationary phase. **Free Radical Biology & Medicine**, v.34, p.385-393.

Chen, J., Duan, X.R., Hu, J-W., Zhang NI-NA, Lin, X-Y, Zhang, H-J, Zheng (2019), Unravelling calcium-alleviated aluminium toxicity in *Arabidopsis thaliana*: Insights into regulatory mechanisms using proteomics, , **Journal of proteomics.** 15-30.

Chowra, U., Yanases. R, Koyma, H., Panda, K, S. (2016) Aluminum induced excessive ROS causes cellular damage and metabolic shifts in back Vigmo mungo (L.) Hepper. **Protoplasma.**

Day, L. (2013) Proteins from land plants - Potential resources for human nutrition and food.

Trends Food Sci Technol 32: 25-42.

Del longo, O.T., Gonzáles, C.A., Pastori, G.M., Trippi, V.S (1993) Antioxidant Defenses under Hyperoxygenic and Hyperosmotic Conditions in Leaves of Two Lines of Maize with Differential Sensitivity to Drought. **Plant and Cell Physiology.**

Delhaize, Ryan., Aluminum Tolerance un Wheat (*Triticum aestivum* L.) II. Aluminum-Stimulated Excretion of Malic Acid from Root Apices. **Plant physiology.**

Doncheva, S., Amenos., Poschenrieder, C. Barcelo, J. (2005) Root cell patterning: a primary target for aluminum toxicity in maize. **Journal of Experimental Botany** 56: 1213–1220.

- Duressa, D., Soliman, K., Taylor, R., Senwo, Z. (2011). Proteomic Analysis of Soybean Roots under Aluminum Stress. **International Journal of Plant Genomics**. 10.1155 / 2011- 282531.
- Ezaki, B., Gardner, R. C., Ezaki, Y., Matsumoto, H., (2000) Expression of aluminum-induced genes in transgenic Arabidopsis plants can ameliorate Al stress and/or oxidative stress. **Plant Physiol** 122: 657–665.
- Eekhout, T., Larsen, P., Veylder, De, L., (2017) Modification of DNA Checkpoints to confer aluminum tolerance. **Trends in Plant Science**. 102-105.
- Frantzios, G. Galatis, B. Apostolakis, P. (2001). Aluminum effects on microtubule organization in dividing root tip cells of Triticum turgidum. II. Cytokinetic cells. **Journal of Plant Research** 114: 157–170.
- Frantzios, G., Galati, B., Apostolakis, P. (2005) Aluminum causes variable responses in actin filament cytoskeleton of the root tip cell of Triticum furgidum. **Protoplasma** 225: 129–140.
- Giannopolitis, C. N., Ries, S.K (1977). Superoxide Dismutases I. Occurrence in Higher Plants. **Plant Physiology**, 59, 309-314.
- Geng, X., Horst, W. J., Golz, J. F., Lee, J. E., Ding, Z., Yang, Z. B. (2017) Leunig homolog transcriptional co-repressor mediates aluminum sensitivity through Methylesterase 4,6-module root cell wall pectin methylesterification in Arabidopsis. **The Plant Journal**, 1-14.
- Giannakoula, A., Moustakas, M., Mylona, P., Papadakis, I., Yupsanis, T. (2008) Aluminum tolerance in maize is correlated with increased levels of mineral nutrients, carbohydrates and proline, and decreased levels of lipid peroxidation and Al accumulation. **Journal Plant Physiology** 165, 385–396.
- Guo, T., Zhang, G. Zhou, M. Wu, F. Chen, J. (2004) Effects of aluminum and cadmium toxicity on growth and antioxidant enzyme activities of two barley genotypes with different Al resistance. **Plant and Soil** 258: 241–248.
- Guo, P., Qi, P. Y., Cai, Y. T., Yang, T. Y., Yang, T. L., Huang, R. H., Chen, S. L. (2018). Aluminum effects on photosynthesis, reactive oxygen species and methylglyoxal detoxification in two Citrus species differing in aluminum tolerance. **Tree Physiology**. 1548- 1565.
- Havir, E.A., Mchale, N.A. (1987). Biochemical and developmental characterization of multiple forms of Catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, 84,450-455.
- Heath, R., Packer, L., (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**.

- Horst, J. W., Wang, Y., Eticha, D. (2010) The role of the root apoplast in aluminum-induced inhibition of root elongation and in aluminum resistance of plants: a review. **Annals of Inostroza-Blancheteau, C., Soto, B., Ibáñez, C., Ulloa, P., Aquea, F., Arce-Johnson, P., Reyes-Díaz, M., (2010). Mapping aluminum tolerance loci in cereals: a tool available for crop breeding. Electron. J. Biotechn. 13, 1-12.**
- Kisnieriene, V., Lapeikaite, I. (2015). When chemistry meets biology: the case of aluminum – a review. **CHEMIJA**, vol. 26. No. 3. P. 148–158.
- Kochian, L.V., Pineros, M.S. and Hoekenga, O.A. (2005) The Physiology, Genetics and Molecular Biology of Plant Aluminum Resistance and Toxicity. *Plant and Soil*, 274, 175-195.
- Kochian, L.V., Hoekenga, O.A., Pineros, M.A. (2004). How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annu. Rev. Plant Biology* 55: 459–493.
- Kochian, L.V., Piñeros, M.A., Hoekenga, O.A. (2005) The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. **Plant and Soil** 274: 175– 195.
- Kochian, L.V., Piñeros, M.A., Liu, J., Magalhães, J.V. (2015) Plant Adaptation to Acid Soils: The Molecular Basis for Crop Aluminum Resistance. **Annual Review of Plant Biology** 66: 571-98.
- Kopittke, P.M, Moore K.L, Lombi, E, Gianoncelli, A, Ferguson B.J, Blamey F.P, Menzies, N.W, Nicholson T.M, McKenna B.A, Wang P, Gresshoff, P.M (2015). Identification of the primary lesion of toxic aluminum in plant roots. **Plant Physiology** 167: 1402–1411.
- Kopittke, M.P., Menzies, N.W., Wang, P., Blamey, F.P.C. (2016) Kinetics and nature of aluminum rhizotoxic effects: a review. **Journal of Experimental Botany**. 4451-4467.
- Kollmeur, M., Felle, H.H., Horst, J, Walter., (2000). Genotypical Differences in Aluminum Resistance of Maize are Expressed in the Distal Part of the Transition Zone. Is Reduce Basipetal Auxin Flow Involved in Inhibition of root Elongation by Aluminum? **Plant Physiology**. 945-956.
- Koshiba, T (1993). Cytosolic Ascorbate Peroxidase in Seedling and Leave of Maize (*Zea Mays*). **Plant and Cell Physiology**.713-721.
- Kukachka, B.F., Miller R.B (1980) A chemical spot-test for aluminum and its value in wood identification. **IAWA Journal** 1: 104-109.
- Lisec, I., Schauer, N., Kopka, J, Willmitzer, L., Fernie, A.R. (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. **Nature protocols**.

- Larsen, P.B., Degenhardt, J., Tai, C.Y., Stenzler, L.M., Howell, S.H., Kochian, L.V. (1998) Aluminum-resistant *Arabidopsis* mutants that exhibit altered patterns of aluminum accumulation and organic acid release from roots. **Plant Physiol** 117:–18.
- León, P., Sheen, J. (2003) Sugar and hormone connections. **Trends Plant Sci** 8(3): 110–116.
- Lin, Y.H., Jen-Hshuan, C. (2020). Expression Genetics in plants with different of aluminum resistance. **BIOAGRO**, vol. 32, no. 3,
- Liu, G., Gaol, S., Tian, H., Wul, Wenwen, Robert, S.H., Ding, Z. (2016) Local Transcriptional Control of YUCCA Regulates Auxin Promoted Root-Growth Inhibition in Response to Aluminum Stressing *Arabidopsis*.
- Liu, J., Wang, X., Wang, N., Yang, L., Jin, T., Gai, J., Li, Y. (2021). Comparative analyses reveal peroxidases play important roles in soybean tolerance to aluminum toxicity. **Agronomy**.
- López, B.C., Jacobo, M.F., Rodrigues, V.R., Estrela, L. H. (2000a, b) Organic acid metabolism in plant: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation on extreme soils. *Plant Science*.
- Ma, J. F. (2000). Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants. **Plant & Cell Physiology** 41:383–390.
- Ma, J.F., (2007) Síndrome de toxicidade de alumínio e diversidade de alumínio resistência mínima em plantas superiores. **Int Rev Cytol** 264: 225–252.
- Miguel, P.S.B., Gomes, F.T., Da Rocha, W.S.D., Carvalho, C.A., Oliveira, A.V. (2010) Efeitos tóxicos do alumínio no crescimento das plantas: mecanismos de tolerância, sintomas, efeitos fisiológicos, bioquímicos e controles genéticos. **CES Revista**.
- Muller, B., Pantin, F., Génard, M., Turc, O., Freixes, S., Piques, M., Gibon, Y., (2011) Water deficits uncouple growth from photosynthesis, increase C content, and modify the relationships between C and growth in sink organs. **J. Exp. Bot.** 62, 1715–1729.
- Nakana, Y., Asada, K., (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. **Plant e Cell Physiology**.
- Nunes-Nesi, A., Brito, D.S., Inostroza-Blancheteau, C., Fernie, A.R., Araújo, W.L. (2014). The complex role of mitochondrial metabolism in plant aluminum resistance. **Trends Plant Sci** 19:399-407.
- Nunes-Nesi, A., Carrari, Gibon, Y., Sulpice R., Lytovchenko, A., Fisahn, J., Graham, J., Ratcliffe, R. G., Sweetlove, L. J., Fernie, R. A. (2007) Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomata function. **Plan.J**.

- Obata, T., Fernie, A.R. (2012). The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. **Cellular and Molecular Life Sciences** 69: 3225–3243.
- Panda, S.K., Baluška, F., Matsumoto, H. (2009) Aluminum stress signaling in plants, **Plant Signaling & Behavior**, 4: 592-597.
- Pellet, D, M.; Papernik, L, A., Kochian, L., V. (1996). Multiple aluminum resistance mechanisms in wheat: roles of root apical phosphate and malate exudation. **Plant Physiology**, 112:591–597.
- Panda, S.K., Matsumoto, H., (2007). Molecular physiology of aluminum toxicity and tolerance in plants. **Bot. Rev.** 73 (4), 326–347.
- Panda, S.K., Baluška, F., Matsumoto, H., (2009). Aluminum stress signalling in plants. **Plant Signaling & Behavior** 4: 592–597.
- Polle, E., Konkazak C.F., Kittrick, J.A (1978) Visual detection of aluminum tolerance leaves in wheat by hematoxylin staining of seedling roots. **Crop Science** 18: 823-827.
- Poschenrieder, C., Gunsé, B., Corrales, I., Barceló, J. (2008). A glance into aluminum toxicity and resistance in plants. **Science of Total Environment**.
- Rahman, R., Udadhya, H (2021) Aluminum toxicity and its tolerance in plant: Review. **Journal of Plant Biology** 64:101–121.
- Rahnama, A., Munns, R., Poustini, K., Watt, M. (2011). A screening method to identify genetic variation in root growth responses to a salinity gradient. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 69–77.
- R Core Team (2019) R: A language and environment for statistical computing.
- Rose. G., Osborne, T., Helen Greatrex, H., Wheeler, T. (2016) Impact of progressive global warming on the global-scale yield of maize and soybean. **Climatic Change** 134: 417.
- Sasso, V, M. (2020).Effect of aluminum on morphophysiological and biochemical variables of *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos in hydroponic system. **Braz. J. of Develop.**
- Silva S (2012) Aluminum toxicity targets in plants. **Journal of Botany** 219462: 1–8.
- Silvente, S., Anatoly, P.S., Lara, M. (2012) Metabolite adjustments in drought tolerant and sensitive soybean genotypes in response to water stress. **PLoS One**.
- Shahnawazi, M, D., Sanadhya, (2017). Aluminum induced oxidative stress antioxidants system in two barkey varieties and its alleviation through ascorbic acid and salicylic acid seed priming approach. **International journal of life science & Pharma Research**.
- Shahnawaz, M, D., Chiuhan, R., Sanashaya (2017). Impact of Aluminum toxicity on Physiological aspects of Bakey (*Hordeum vulfare L*) Cultivars and its Alleviation thought Ascorbic acid and SalicyPriming. **Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci** 6(5): 875-891.

- Schmitt, M. Watanabe, T. Jansen, S. (2016). The effects of aluminum on plant growth in a temperate and deciduous aluminum accumulating species. **AoB Plants**.
- Steiner, F., Zoz, T., Pinto-Junior, A. S., Castagnara, D., Lopes-Dranski, J. A. (2012). Effects of aluminum on plant growth and nutrient uptake in young physic nut plants. **Ciências agrárias**.
- Silva, S. (2012) Aluminum toxicity targets in plants. **Journal of Botany** 219462: 1–8.
- Silva, R. G., Berger, M., Bernardy, D., Tabaldi, L. A., Birck, T. P., Tarouco, C. P., Silva, O, C. Brito, S. B, DA Silva, A. A., Rosa R. V., Santos, M, F, S., Souza, A.S., Azevedo, A, A., DAL-BIANCO. M., Oliveira, J, A., Ribeiro. C. (2020). Differential accumulation of aluminum in root tips of soybean seedling. **Brazilian Journal of Botany**. Viçosa, MG; UFV, Imp. Univ., 985:96.
- Serkedjieva, J (2011). Antioxidant effects of plant polyphenols: a case study of a polyphenol-rich extract from *Geranium sanguineum* L. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. **Enfield: Science Publishers**. Chap.13, p.275-293.
- Souza, L.T., Cambraia, J., Ribeiro, C., Oliveira, J.A.D., Silva, L.C.D.(2016) Effects of aluminum on the elongation and external morphology of root tips in two maize genotypes. **Bragantia**, v, 75 p.19-25.
- S.J. (2011). Cell Wall Hemicellulose Contributes Significantly to Aluminum Adsorption and Root Growth in Arabidopsis. **Plant Physiology**, 155 (4) 1885-1892.
- Smith, A.M., Stitt, M., (2007) Coordination of carbon supply and plant growth. **Plant Cell Environ.** 30, 1126–1149.
- Sun, C., Lu, L., Liu, L., Liu, W, Yu, Y., Liu, X, Hu, Y., Jin, C., Lin, X., (2013) Nitrate reductase-mediated early nitric oxide burst alleviates oxidative damage induced by aluminum through enhancement of antioxidant defenses in roots of wheat (*Triticum aestivum*). **New phytologist**.
- Too, E, J., Carlsson, A, S., Onkware A, O et al (2014). Cell membrane integrity, callose accumulation, and root, growth in aluminum-stressed sorghum seedlings. **Biol Plant** 58:768-722.
- Velikova, V., Yordanov, I. e Edreva, A. (2000) Oxidative Stress and Some Antioxidant Systems in Acid Rain-Treated Bean Plants: Protective Role of Exogenous Poly-amines. **Plant Science**, 151, 59-66.
- Vitorello, V.A., Capaldi, F.R., Stefanuto, V.A., (2005) Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. **Brazilian J Plant Physiology** 17: 129-143.

- Yang, J.L., Li, Y., Zhang, Y, J (2008) .Cell wall polysaccharides are specifically involved in the exclusion of aluminum from the rice root apex. *Plant Physiology* 146: 602–611.
- Wallace, S.U, Andersen, I.C (1984) Aluminum toxicity and DNA synthesis in wheat roots. *Agronomy journal American Society of Agronomy* 76: 5–8.
- Yang, J.L., Zhu, X.F., Peng, Y.X., Zheng, C., Li, G.X., Liu, Y., Shi, Y.Z., Zheng, S.J. (2011) Cell wall hemicellulose contributes significantly to aluminum adsorption and root growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 155: 1885–1892.
- Yemm. E. W., Cocking, E.C (1955) The Determination of Amino-acids with Ninhydrin. **Chemistry Department University of Bristol.**
- Yu, H, N., Liu, P., Wang, Z. Y. Chen, W. R., Xu, G. D (2011) The effect of aluminum treatments on the root growth and cell ultrastructure of two soybean genotypes. **Crop Protection**, Volume 30, Issue 3, Pages 323-328.
- Yu, Y., Zhou, W., Liang, X., Zhou, K., Lin, X. (2019). Increased bound putrescine accumulation contributes to the maintenance of antioxidant enzymes and higher aluminum tolerance in wheat. **Environmental pollution**.10.10.10106.
- Zhang, L. et al. (2016) Polyphenol-aluminum complex formation: Implications for aluminum tolerance in plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 64, 3025–3033.
- Zhuang, J., Zhang, J., Hou, X.L., Wang F, Ai-Sheng Xiong, A.S. (2014).
- Tabuchi, A., Matsumoto, H., (2001) Changes in cell-wall properties of wheat (*Triticum aestivum*) roots during aluminum-induced growth inhibition. **Physiologic Plantarum** 112: 353–358.
- Zhuang, Jing, Zhang, J., Hou, X, L., Wang, F. Xuiong, S, A,. (2004). Transcriptomic, Proteomic, Metabolomics and Functional Genomic Approaches for the Study of Abiotic Stress in Vegetable Crops **Reviews in Plant Sciences** 33: 2-3,225-237.

Capítulo 2

Danos metabólicos e morfofisiológicos induzidos pelo alumínio em raízes do genótipo de soja Suprema

Resumo

Os níveis tóxicos de alumínio (Al) em solos podem gerar reduções na produtividade de diferentes culturas sensíveis a este metal. A soja é uma cultura de grande importância agrônômica e dos fatores que influenciam seu crescimento e produtividade é a presença de Al

disponível no solo. Nosso estudo com o genótipo Suprema demonstrou acúmulo de Al nas raízes, principalmente no núcleo da célula. Este acúmulo de Al resultou em decréscimo no crescimento da raiz e em descamação das células radiculares, podendo gerar reduções na absorção de água e de nutrientes pelas raízes. No metabolismo do genótipo Suprema o Al resultou em acréscimo nos níveis de glicose e proteínas, e decréscimo no teor de amido. Além disso, o Al aumentou a concentração de H_2O_2 , contudo sem alterar a taxa da peroxidação lipídica e a atividade das enzimas antioxidativas. Desta forma, o genótipo Suprema demonstrou ser suscetível ao Al, com danos ao sistema radicular e modificações no metabolismo primário, além de aumentar a concentração de espécie reativa de oxigênio.

Palavras-chave: Toxicidade do alumínio. Ápice radicular. *Glycine max*. Metabolismo primário. Enzimas antioxidantes.

1 Introdução

Plantas cultivadas são frequentemente submetidas a uma ampla gama de estresses que podem causar danos ao crescimento e perdas na produtividade. Entre esses agentes estressores, se destaca o alumínio (Al) presente em solos tropicais e subtropicais e com maior biodisponibilidade em solos com baixo pH (Kochian et al. 2004; Muhammad et al. 2019).

O Al, principalmente o cátion trivalente (Al^{3+}), é forma de Al mais biodisponível em solos ácidos para a absorção radicular e impacta negativamente vários processos fisiológicos e bioquímicos na planta (Matsumoto 2000; Ma 2007; Kochian et al. 2015). O ápice da raiz é o primeiro local da fitotoxicidade de Al (Kochian 1995; Kopittke et al. 2015), o que consequentemente reduz a captação de água e nutrientes, pois o alongamento da raiz pode ser prejudicado (Gupta et al. 2013). Essa fitotoxicidade causada pelo Al afeta negativamente as principais culturas de grãos do Brasil (Kochian et al. 2004; Ryan et al. 2011). A soja, por exemplo, é uma planta relativamente mais sensível ao solo ácido na presença de Al do que outras culturas (Yang et al. 2011b; dos Reis et al. 2018). A sensibilidade da soja ao Al se faz, principalmente pelo efeito direto desse metal sobre o sistema radicular (Kopittke et al. 2015)

Os estresses abióticos do meio ambiente causam uma série de mudanças anatômicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares em plantas em crescimento (Srivastava e Dubey 2012). O acúmulo de Al nos tecidos vegetais pode induzir planta respostas diretas ou indiretas no metabolismo da planta, afetando a estrutura da parede celular, da membrana plasmática, a transdução de sinal e a homeostase de nucleotídeo / fosfato e alterando o status antioxidante e osmorregulação das plantas (Kochian et al. 2005, Panda et al. 2009)

O desequilíbrio induzido pelo Al pode resultar em maior acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), e alterações nas propriedades da parede celular, sendo propostos como os dois fatores intrínsecos responsáveis pela toxicidade do Al em plantas. O objetivo do estudo foi analisar os efeitos do Al sobre o metabolismo e a anatomia em raízes do genótipo de soja Suprema.

2 Material e Métodos

2.1. Condições de cultivo e delineamento experimental

Nos experimentos foram utilizadas sementes do genótipo de soja Suprema adquirida através do Banco de Sementes do Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja do Bioagro na UFV. As sementes foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 5% durante 5 minutos, sendo em seguida lavadas em água destilada. Posteriormente, as sementes foram germinadas em rolos de papel germitest umedecidos com solução de germinação (CaCl_2 100 μM), pH 7,0 e mantidas em sala de crescimento com temperatura ($25^\circ\text{C} \pm 2$) e umidade ($80\% \pm 10$) controladas. Após três dias no escuro, os rolos foram expostos à luz e permaneceram por mais três dias na sala de crescimento. No sétimo dia as plântulas foram transferidas para a solução de Clark (1975), pH 4,0, para aclimação por 48 horas, com fotoperíodo de 16/8h (luz/escuro), sob aeração constante e temperatura controlada de $25^\circ\text{C} (\pm 2)$. Após a aclimação as plântulas foram padronizadas quanto ao comprimento da raiz e da parte aérea. Em seguida, foram transferidas para vasos de 2L com solução de Clark (1975), pH 4,0, sob aeração constante nos seguintes tratamentos: controle (0 μM de Al) e presença de Al (100 μM de Al) na forma de AlCl_3 , durante 72h. O pH foi ajustado diariamente para 4,0. A dose escolhida já é trabalhada com plantas de soja em outros experimentos, pois causam danos nos ápices das raízes.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 6 repetições por tratamento e a unidade experimental consistia em 4 plantas por vaso.

2.2. Avaliação do alumínio nas raízes

2.2.1. Determinação do teor de alumínio

As raízes foram secas em estufa de ventilação forçada à 70°C e moídas manualmente. Amostras de 0,2 g de raiz foram digeridas em solução nitroperclórica (3:1), em bloco digestor

com temperatura controlada (Tedesco et al. 1995). As concentrações de Al foram determinadas por espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado.

2.2.2. Coloração dos ápices radiculares por hematoxilina

O acúmulo de Al nos ápices radiculares foi analisado pela coloração com hematoxilina férrica (Polle et al. 1978). Ápices radiculares com 1 cm de comprimento foram mergulhados em solução de hematoxilina férrica 0,2% (p/v) em NaIO₃ 0,02% (p/v), durante 25 minutos. Após as amostras foram lavadas em água deionizada por 15 min para remover o excesso de corante. Finalmente, as raízes foram coletadas observadas em Lupa AxioCamErc 5s e fotografadas. A reação positiva da hematoxilina com o Al é comprovada pela coloração arroxeada.

2.2.3. Histolocalização do alumínio

Ápices radiculares com 1 cm de comprimento (4 amostras por repetição, totalizando 24 amostras por tratamento) foram coletados e fixados em FAA 50% (formaldeído, ácido acético e álcool) e armazenados em álcool etílico 70%. Em seguida, parte das amostras foi desidratada em série etílica e infiltrada em resina pura e álcool 95% por 7 dias sob vácuo intermitente. Os fragmentos de raízes foram emblocados em resina metacrilato (Historesina- Leica) no plano de corte (longitudinal da raiz). Os cortes de 5 µm de espessura foram realizados em micrótomo rotativo de avanço automático (model RM 2155. Leica Microsystems Inc., Deerfield USA), com navalha de vidro. Os cortes foram corados com Chrome Azurol' S 0,5% (Kukachka e Miller, 1980). As imagens foram obtidas por câmera fotográfica digital (modelo Zeiss AxioCam HRC, Göttinger, Germany), acoplada ao microscópio de luz (modelo AX-70 TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japan), com sistema de captura de imagens Axion Vision.

2.3. Parâmetros fenotípicos

Ao final das 72 horas foi obtido o comprimento radicular (cm) através de uma régua milimétrica. Adicionalmente, o sistema radicular foi digitalizado pelo sistema de análise de imagem de varredura da raiz através do Software WinRHIZO®, para obtenção dos parâmetros: número de ápices de raízes, diâmetro médio de raízes, volume de raízes, e número de bifurcações das raízes.

2.4. Mapeamento dos sítios de acúmulo de Al nas raízes

2.4.1. Coloração dos ápices radiculares por hematoxilina

O acúmulo de Al nos ápices radiculares foi analisado pela coloração com hematoxilina férrica (Polle et al, 1978). Ápices radiculares com 1 cm de comprimento foram mergulhados em solução de hematoxilina férrica 0,2% (p/v) em NaIO₃ 0,02% (p/v), durante 25 minutos. Após as amostras foram lavadas em água deionizada por 15 min para remover o excesso de corante. Finalmente, as raízes foram coletadas observadas em Lupa AxioCamErc 5s e fotografadas. A reação positiva da hematoxilina com o Al é comprovada pela coloração arroxeada.

2.4.2. Histolocalização do Al nas raízes pelo corante Chrome Azurol' S

Ápices radiculares com 1 cm de comprimento (4 amostras por repetição, totalizando 24 amostras por tratamento) foram coletados e fixados em FAA 50% (formaldeído, ácido acético e álcool) e armazenados em álcool etílico 70%. Em seguida, parte das amostras foi desidratada em série etílica e infiltrada em resina pura e álcool 95% por 7 dias sob vácuo intermitente. Os fragmentos de raízes foram emblocados em resina metacrilato (Historesina- Leica) no plano de corte (longitudinal da raiz). Os cortes de 5 µm de espessura foram realizados em micrótomo rotativo de avanço automático (model RM 2155. Leica Microsystems Inc., Deerfield USA), com navalha de vidro. Os cortes foram corados com Chrome Azurol' S 0,5% (Kukachka e Miller, 1980). As imagens foram obtidas por câmera fotográfica digital (modelo Zeiss AxioCam HRc, Göttinger, Germany), acoplada ao microscópio de luz (modelo AX-70 TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japan), com sistema de captura de imagens Axion Vision.

2.4.3. Análise em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

Ápices radiculares, de aproximadamente 0,5 cm, foram obtidos das raízes principais e fixados em glutaraldeído 2,5%. Em seguida, foram desidratados em série etílica, secos com CO₂ em equipamento de ponto crítico (CPD 030, Baltec, Liechtenstein), fixados em suporte de alumínio e cobertos com ouro em metalizador (FDU 010, Balzers, Liechtenstein). O material foi observado e fotografado em microscópio eletrônico de varredura (Leo 1430VP, Cambridge, Inglaterra).

2.4.5. Microanálise de raio-X (MEV-EDS)

Ápices radiculares de aproximadamente 0,5 cm foram obtidos a partir das raízes principais e fixados em 2,5% de glutaraldeído. Em seguida, foram desidratadas em série etílica, secas com CO₂ em equipamento de ponto crítico (CPD 030, Baltec, Liechtenstein). Após secagem, o material vegetal foi fixado em suporte de alumínio e coberto com carbono no evaporador de carbono (Q150T, Quorum Technologies, Ashford, Kent, UK). O material, após observação em microscópio de varredura (Leo 1430VP, Cambridge, Inglaterra), foi analisado por sonda de raio-X (MEV-EDS) acoplada ao microscópio eletrônico, para avaliação da distribuição do Al nos ápices radiculares.

2.5. Determinação da quantificação de proteína, amido, aminoácidos totais, açúcares solúveis, malato e fumarato

Amostras de 200 mg de raízes foram maceradas e, posteriormente os metabólitos foram extraídos pela mistura de metanol, água e clorofórmio segundo protocolo de Lisec et al. 2006. A fração solúvel e o material precipitado resultante da extração foram armazenados a - 80°C para posteriores análises. A fração solúvel foi utilizada para a quantificação dos teores de glicose, frutose e sacarose (Fernie et al. 2001b), aminoácidos solúveis totais (Yemm et al; 1995) e os ácidos orgânicos malato e fumarato (Nunes-Nesi et al. 2007). No precipitado foram quantificados os teores de amido (Fernie et al. 2001a) e proteínas (Bradford, 1976).

2.6. Quantificação do peróxido de hidrogênio e da peroxidação lipídica

Para a determinação da concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 100 mg de raízes foram homogeneizadas em meio de extração constituído de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% e polivinilpolipirrolidona (PVPP), e centrifugados a 14.000 rpm, por 15 minutos a 4 °C. Alíquotas de 125 µl do sobrenadante foram adicionadas em 250 µl do meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 2,5 mM pH 7,0 e iodeto de potássio (KI) 1M com leituras a 390 nm realizadas em espectrofotômetro (UV/Visível Multiskan GO®). As concentrações de peróxido de hidrogênio foram estimadas com base em curva de calibração preparada com padrões de H₂O₂ (Velikova et al. 2000).

O grau de peroxidação lipídica foi medido pela quantificação de malondialdeído (MDA), para isso amostras de 0,3 g da matéria fresca de raiz foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 1% (p/v). Os homogeneizados foram centrifugados a 14.000 rpm por 15 minutos. Todas as etapas

necessárias ao processo de extração foram conduzidas a 4° C. Alíquotas de 0,5 ml dos sobrenadantes foram adicionadas a 1,5 ml de uma solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (p/v) em TCA 20% (p/v) e então levados em banho-maria a 95° C. Após trinta minutos, a reação foi paralisada em banho de gelo. Posteriormente, centrifugados a 14000 rpm por 10 minutos e a absorbância dos sobrenadantes foi determinada a 532 nm. A absorbância inespecífica a 600 nm foi medida e subtraída das amostras. A concentração do complexo aldeído malônico-TBA foi calculada usando-se o coeficiente de absorvidade molar de $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Heath and Packer, 1968).

2.7. Enzimas do metabolismo antioxidativo

2.7.1. Obtenção dos extratos enzimáticos SOD, CAT, APX E POX

Para a determinação da atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e peroxidase (POX) 0,3 g de raízes foram macerados em nitrogênio líquido e, homogeneizados com tampão de extração constituído de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, EDTA 0,1 mM, PMSF 1 mM e PVPP 1% (p/v). Após, o material centrifugado a 14.000 rpm por 15 min a 4°C, para a coleta do sobrenadante utilizado nas avaliações enzimáticas e nas dosagens de proteína. Todas as etapas necessárias ao processo foram executadas a 4°C.

2.7.2. Determinação da atividade da Superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)

À mistura de reação, constituída de metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT), 75 μM , EDTA 0,1 μM e riboflavina 2 μM , em tampão de fosfatode sódio 50 mM, pH 7,8 (Del longo et al. 1993), adicionamos 50 μL do extrato enzimático. A reação foi conduzida a 25°C por 5 min numa câmara de reação sob a iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W (Giannopolitis e Ries, 1977). A produção de formazana azul, resultante da foto-redução do NBT, foi medida pela determinação do incremento na absorvância a 560 nm, que foi subtraída de um “branco”, no qual a mistura de reação foi mantida no escuro. Uma unidade da SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a foto- redução do NBT (Beauchamp e Fridovic, 1971).

2.7.3. Determinação da atividade da Catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

A atividade da CAT foi determinada pela adição de 10 μ L do extrato enzimático bruto a 190 μ L de meio de reação, constituído de H_2O_2 12,5 mM, pH 7,0 em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, a 30°C (Havner e Mchale, 1987). A atividade da enzima foi determinada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm durante 1 min. A atividade da CAT foi calculada, utilizando-se, o coeficiente de extinção molar de 36 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (ANDERSON et al. 1995).

2.7.4. Determinação da atividade da Ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11)

A atividade da APX foi determinada de acordo com o método de NAKANO e ASADA (1981), e modificado por KOSHIBA (1993). A atividade foi determinada pela adição de 10 μ L do extrato bruto enzimático a 180 μ l do meio de reação, constituída de tampão de fosfato de potássio 100 mM, ácido ascórbico 0,5 mM, água e H_2O_2 1 mM. O decréscimo na absorbância das amostras a 290 nm durante 1 minuto a cada 15 segundos, foi utilizado para determinar a atividade da enzima, utilizando-se do coeficiente de extinção molar de 2,8 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Nakano & Asada, 1981).

2.7.5. Determinação da atividade da Peroxidases (POX, EC 1.11.1.7)

A atividade da POX foi determinada pela adição 10 μ L do extrato enzimático bruto a 290 μ L de meio de reação, constituído de tampão fosfato 25 mM, pH 6,8, H_2O_2 20 mM, pirogalol 20 mM e água. O incremento da absorbância foi avaliado durante o primeiro minuto de reação a 420 nm, a 25 C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,4 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Chance e Maehley, 1955).

2.8. Análise estatística

Os dados quantitativos de biometria, metabolismo primário, estresse oxidativo e enzimas do sistema oxidante foram submetidos à análise de variância e suas médias foram submetidas ao teste de normalidade de Shapiro-Wik, homogeneidade de variância de Bartlett comparadas pelo teste de turkey no nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$) no software R x 64.3.5.3 (R Core Team, 2019).

3. Resultados

A concentração de Al nas raízes aumentou 11 vezes após exposição do genótipo Suprema a este metal (Fig. 1A). Este acúmulo de Al resultou em redução no comprimento radicular, no número de ápices radiculares e no número de bifurcações (Fig. 1B, C, F, G). Além disso, houve aumento no diâmetro das raízes após tratamento com Al (Fig. 1D).

Para o mapeamento dos sítios de acúmulo de Al nos ápices radiculares, o corante hematoxilina evidenciou forte coloração arroxeada (reação positiva com o Al), nas raízes tratadas com Al, sendo observado reação negativa para o tratamento controle (Fig. 2A). Nos cortes longitudinais de raízes corados com o corante Chrome Azurol'S, ficou evidente a entrada e acúmulo do Al em tecidos e células dos ápices radiculares, evidenciado pela coloração azulada (Fig. B). Células externas apresentaram reação positiva com Al, assim como o núcleo das células do meristema fundamental. Por outro lado, não houve reação positiva do corante Chrome Azurol'S com Al para o tratamento controle (Fig. 2B). Pela da microanálise de raio-X acoplada ao microscópio eletrônico de varredura (MEV-EDS) foi observado presença de Al em todo o ápice radicular, representada pela cor vermelha (Fig. 2C). Por outro lado, no tratamento controle foi observada marcação negativa para o Al (ausência de cor vermelha) (Fig. 2C). Os resultados obtidos pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) evidenciaram a descamação das células radiculares, com maiores danos na região do ápice da raiz (Fig. 2C).

Poucas alterações foram evidenciadas no metabolismo primário após exposição do genótipo Suprema ao Al (Fig. 3). Na presença de Al houve aumento na concentração de proteínas e redução de 1,4 vezes na concentração de amido (Fig. 3E, G). A presença do ácido orgânico fumarato não foi identificada no genótipo após os tratamentos.

Para o metabolismo oxidativo, o Al promoveu aumento de 4 vezes na concentração de peróxido de hidrogênio, não modificando o teor da peroxidação de lipídios (Fig. 4A, B). Adicionalmente, o metabolismo antioxidativo avaliado pela atividade das enzimas SOD, POX, APX e CAT não foi alterado pela presença de Al (Fig. 4, F).

4. Figuras

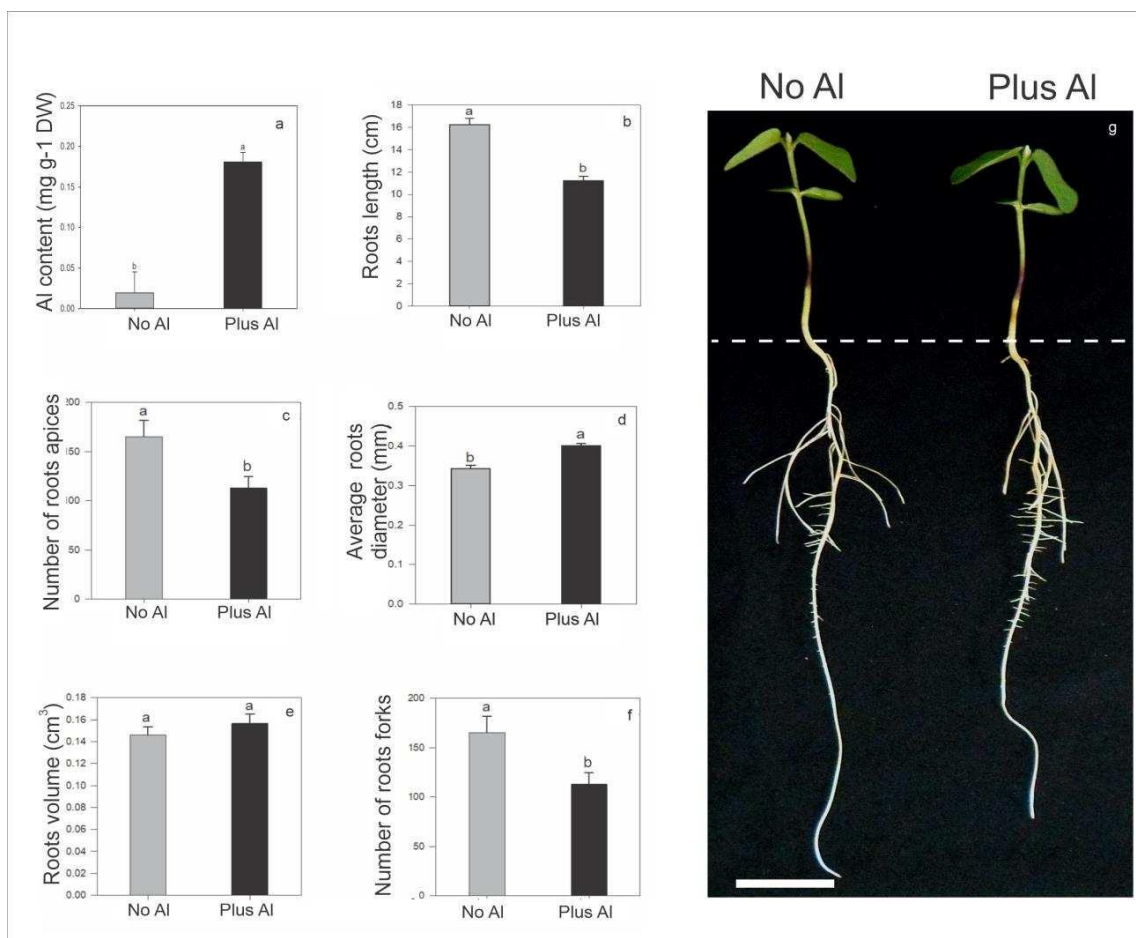


Figura 1. Teor de alumínio e parâmetros biométricos de raízes do genótipo de soja Suprema cultivada por sete dias em solução hidropônica com duas concentrações de Al: No Al (0 μM) e Plus Al (100 μM Al), após 72h. **a:** Teor de alumínio nas raízes; **b:** comprimento da raiz; **c:** número de ápices radiculares; **d:** diâmetro médio de raízes; **e:** volume de raízes; **f:** número de bifurcações das raízes e **g:** fenótipo do genótipo Suprema. Barra da escala = 5 cm. Barras verticais representam o erro padrão ($n = 5$) e letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

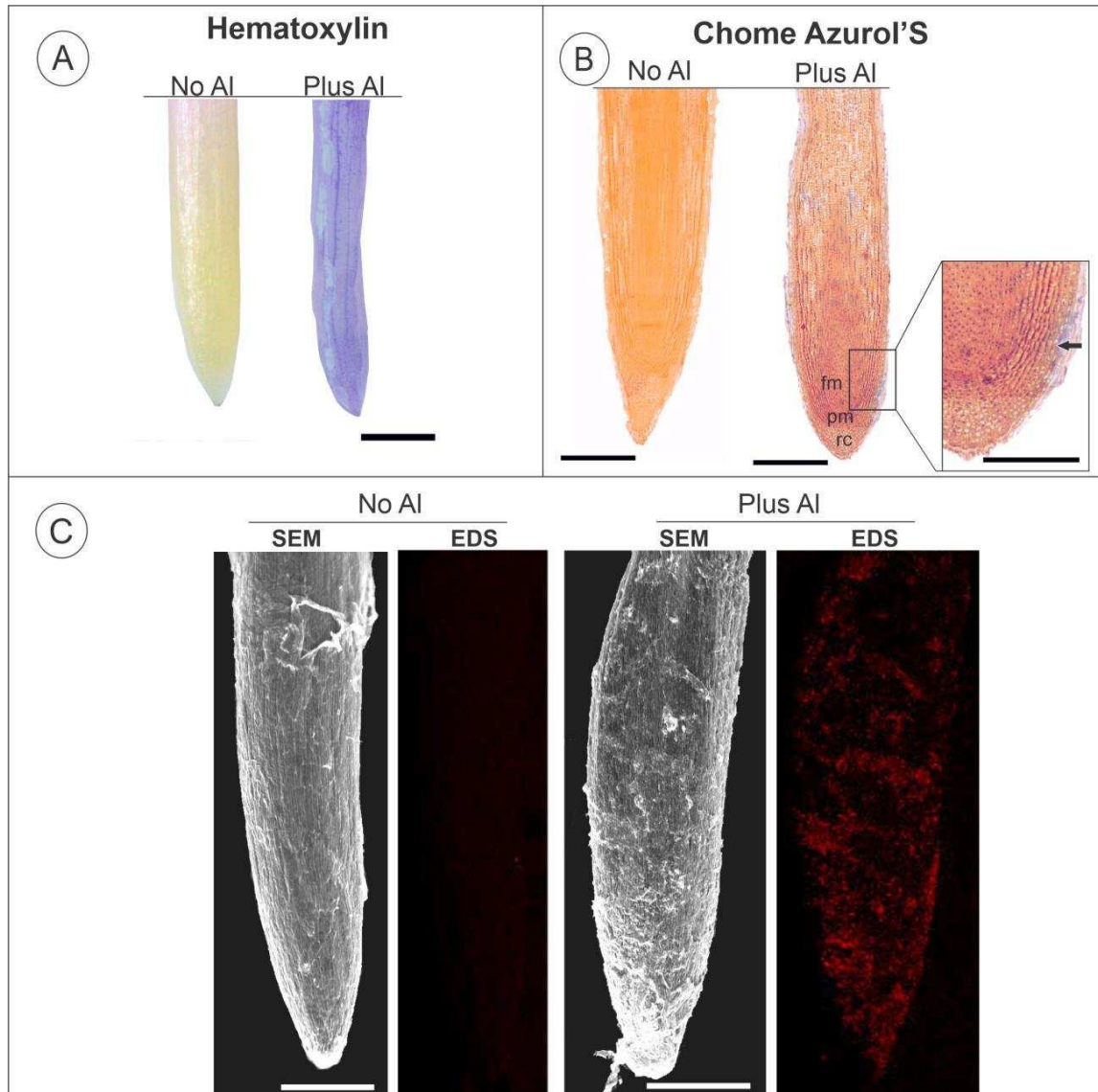


Figura 2. Sítios de acúmulo de alumínio em raízes do genótipo de soja Suprema cultivada por sete dias em solução hidropônica com duas concentrações de Al: No Al (0 μM) e Plus Al (100 μM Al), após 72h. **A:** Coloração do Al pelo corante hematoxilina. Coloração arroxeada indica reação positiva. **B:** Anatomia do Al pelo corante Chrome Azurol'S em corte longitudinal de ápice radicular. Coloração azul indica reação positiva. Setas pretas indicam presença de Al nos núcleos das células. Barras dos tratamentos No Al e Plus Al: 500 μm . Barra da imagem com aumento do tratamento Plus Al: 100 μm . rc- Capa da raiz; pm- Promeristema; fm- Meristema fundamental. **C:** Micrografia dos ápices radiculares por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e localização do acúmulo de Al por espectrometria de energia dispersiva de raio-X (EDS). As áreas vermelhas indicam a presença de Al. Barra = 200 μm .

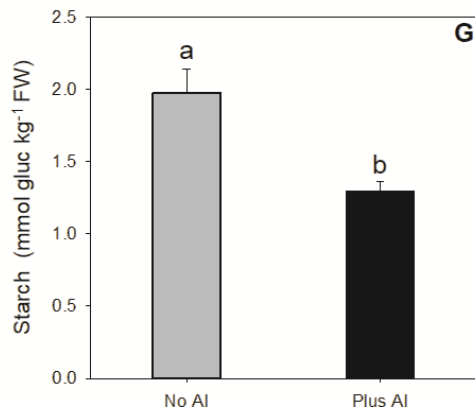
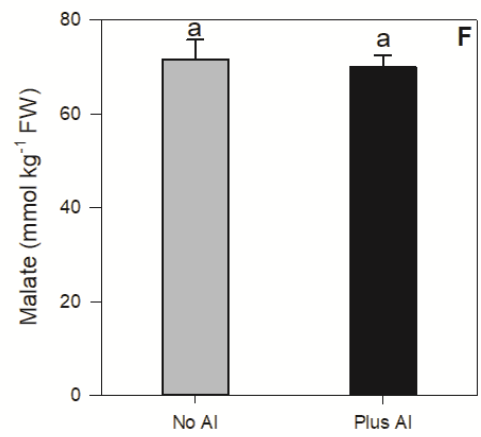
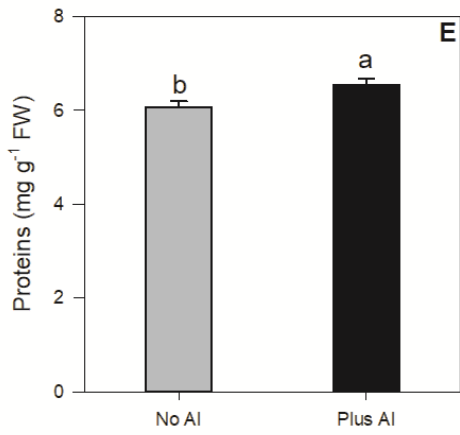
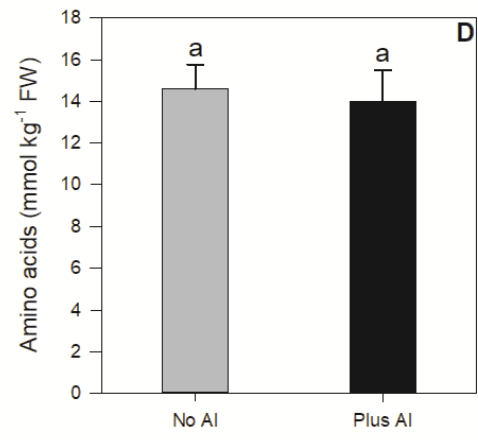
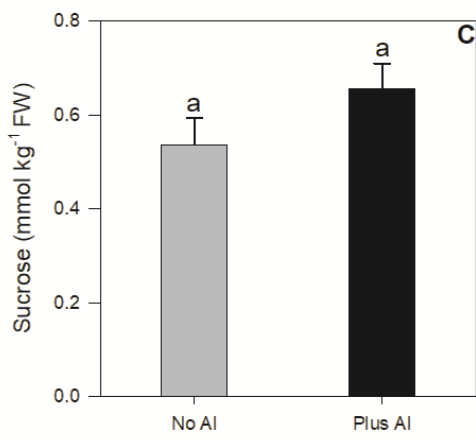
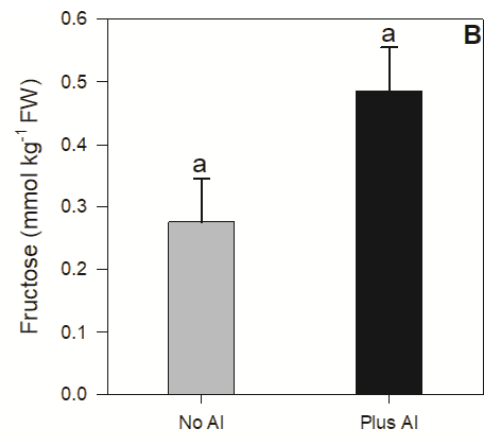
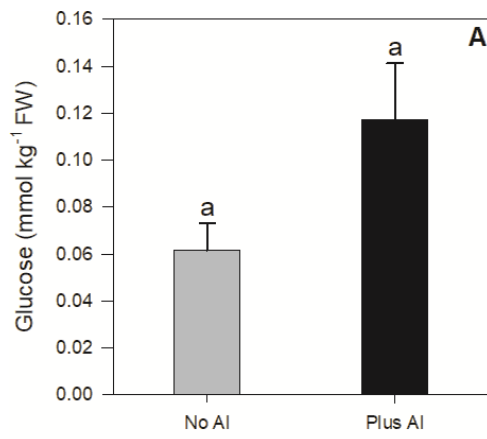


Figura 3. Concentração de metabólitos primários em raízes do genótipo de soja Suprema cultivadas por sete dias em solução hidropônica com duas concentrações de Al: No Al (0 μ M) e Plus Al (100 μ M Al), após 72h. **A:** glicose; **B:** frutose; **C:** sacarose; **D:** aminoácidos. **E:** proteínas; **F:** malato; **G:** amido. Barras verticais representam o erro padrão (n = 5) e letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey (p <0,05).

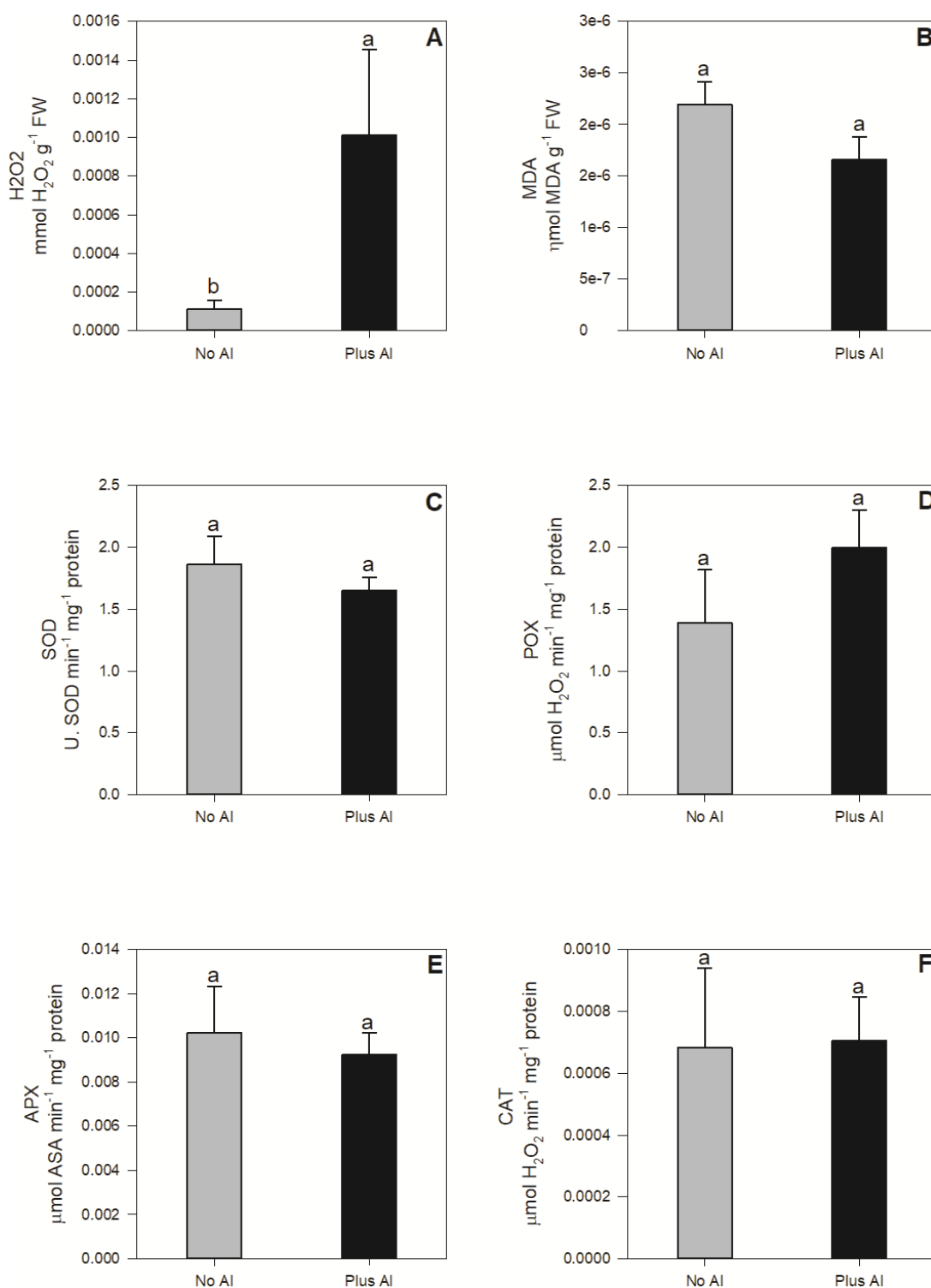


Figura 4. Metabolismo antioxidativo em raízes do genótipo de soja Suprema cultivado por sete dias em solução hidropônica com duas concentrações de Al: No Al (0 μ M) e Plus Al (100 μ M Al), após 72h. **A:** concentração de peróxido de hidrogênio, **B:** concentração de malonaldeído (MDA), **C:** atividade da dismutase do superóxido (SOD); **D:** atividade da peroxidase total (POX) **E:** atividade da peroxidase do ascorbato (APX); **F:** atividade da

catalase (CAT). Barras verticais representam o erro padrão ($n = 5$) e letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4. Discussão

O órgão da planta mais facilmente alterado pela toxidez do Al é a raiz. Em plantas cultivadas essa problemática é intensificada, pois além de comprometer o desenvolvimento e crescimento da planta, pode reduzir a produtividade da cultura (Echart et al. 2001, Horst et al. 2010). No presente trabalho, o acúmulo de Al e os efeitos tóxicos primários desse metal foram observados no sistema radicular do genótipo de soja Suprema (Figs. 1 e 2). Adicionalmente, pequenas variações nos componentes do metabolismo primário (Fig. 3) e do metabolismo antioxidativo também foram observadas nas raízes após tratamento com Al (Fig. 4).

O aumento de 11 vezes na concentração de Al (Fig. 1a), nas raízes do genótipo Suprema reduziu o comprimento radicular e o número de ápices radiculares (Fig. 1B, C, G). No ápice da raiz, as zonas meristemática e de alongamento são altamente sensíveis ao Al, com elevada taxa de acúmulo desse elemento devido a sua capacidade de ligação com inúmeros sítios nas células, alvos potenciais de sua injúria, incluindo a parede celular, membrana plasmática, citoesqueleto e núcleo (Kochian et al. 2004; Zheng e Yang, 2005). Como resultado direto, induz danos físicos a essa região da raiz, e indiretamente pode comprometer a absorção de água e nutrientes reduzindo o crescimento e o desenvolvimento da planta (Kochian et al. 2004, Horst et al. 2010). O dano direto do Al sobre as raízes pode comprometer os processos de divisão e expansão celular (Ciamporova, 2002; Doncheva et al. 2005). Os efeitos do Al sobre a divisão celular parecem estar associados à sua capacidade de ligação aos grupos fosfatos do DNA (Rincón e Gonzales, 1992; Oliveira et al. 2021). Já o efeito do Al sobre alongamento celular parece ser resultado de sua capacidade de reduzir a plasticidade e elasticidade da parede celular (Ma et al. 2004).

Adicionalmente, o acúmulo de Al no sistema radicular do genótipo Suprema aumentou o diâmetro das raízes (Fig. D). O Al pode induzir alterações morfológicas tornando-as raízes mais espessas (Delhaize e Ryan, 1995; Ciamporova, 2002; Zheng e Yang, 2005). Este engrossamento das raízes pode ser resultado do aumento em espessura das paredes celulares (Vázquez et al. 1999; Verma et al. 2021), após deposição de novos compostos químicos, como hemicelulose e lignina (Almeida et al. 2021). Além disso, o Al pode causar alterações no plano de divisão celular, modificando a organização dos microtúbulos e microfilamentos, resultando em divisão celular no plano radial das raízes (Blancaflor et al. 1998; Horst et al. 1999).

Os testes com os corantes hematoxilina (Fig. 2A) e chrome azurol'S (Fig. 2B), além da marcação do Al por espectrometria de energia dispersiva de raio-X (EDS) (Fig. 2C), evidenciaram o acúmulo desse metal em células do ápice radicular. A hematoxilina e o EDS marcaram o Al adsorvido/absorvido as células externas da raiz. Adicionalmente, o corante chrome azurol'S resultou em reação positiva com Al em células mais internas do ápice radicular, assim como no núcleo das células do meristema fundamental (Fig. 2B). O Al pode se ligar a diferentes grupamentos químicos presentes nas células radiculares. Uma parte deste Al pode ser neutralizado nessas ligações, ficando indisponível para induzir danos, sendo caracterizado como mecanismo de resistência (Zhang, Rengek, 1999, Silva et al. 2000; Taylor et al. 2000, Hartwig et al. 2007). Contudo, dependendo da intensidade do Al acumulado, e em qual célula houve esse acúmulo, danos estruturais e metabólicos podem ser induzidos. Assim, no presente trabalho parte do Al absorvido pelas células radiculares resultou em danos ao crescimento (Fig. 1), a estrutura da raiz (Fig. 2C) e ao metabolismo radicular (Figs. 3 e 4). Um dos efeitos mais danosos do Al em células é sua ligação com o núcleo celular (Matsumoto et al. 1976, Echart et al. 2001, Hartwig et al. 2007). O Al pode se ligar aos grupos fosfatos do DNA, formando o complexo DNA-Al, danificando a dupla hélice e dificultando a replicação do DNA (Rincón e Gonzales, 1992; Oliveira et al. 2021), o que pode comprometer a divisão celular conforme observado no presente trabalho (Fig. 1B, G). Aparentemente, o Al é capaz de fragmentar as moléculas de DNA, principalmente em genótipos sensíveis (Meriga et al. 2004). Além disso, o Al ligado aos componentes da parede celular de células externas pode induzir alterações na estrutura das raízes (Delhaize, Ryan, 1995; Ciamporova, 2002; Zheng, Yang, 2005). No genótipo Suprema, a presença do Al nessas células resultou em descamação das células radiculares, com maiores danos na região do ápice (Fig. 2C). As células mais externas das raízes por estarem em contato direto com o Al são alvos primários das injúrias desse elemento (Delhaize, Ryan, 1995; Ciamporova, 2002; Zheng e Yang, 2005). Segundo Ciamporova, (2002), a interação do Al com os componentes das paredes celulares pode resultar em expansão desigual das células, gerando estresse mecânico capaz de causar destruição nos tecidos periféricos da raiz. Essas alterações podem comprometer a absorção de água e nutrientes pelas raízes.

A glicose é um composto chave utilizado como fonte de energia e como substância sinalizadora para promover o crescimento radicular através do metabolismo de nitrogênio (N) e carbono (C) envolvido com a rede de sinalização para promover o crescimento radicular induzido por Al. Em geral, a sacarose é uma fonte de energia para as células vivas, e seus produtos de clivagem, glicose e frutose, são moléculas essenciais para a regulação do

crescimento e desenvolvimento das plantas (Smeekens 2000; León e Sheen 2003; Gibson 2005, Moriyama et al. 2016). Contudo, no presente trabalho a concentração de glicose, frutose e sacarose não foi alterada pela presença de Al nas raízes (Fig. 3A, B, C).

Em tecidos de crescimento ativo, a energia é necessária para apoiar o crescimento do tecido. A energia metabólica no tecido não fotossintético é obtida, principalmente pela respiração, sacarose e amido que são os principais substratos do tecido vegetal (Moriyama et al. 2016). Assim, os açúcares participam do metabolismo intermediário e são substratos para a síntese de carboidratos mais complexos. A concentração de amido diminuiu após tratamento com Al (Fig. 3G), sugerindo que essa molécula seria clivada para açúcares solúveis como a glicose e a frutose, o que resultaria em energia metabólica para vias anabólicas. Contudo, nossos resultados evidenciaram uma manutenção nos níveis de carboidratos (Fig. 3), além de danos ao crescimento das raízes (Fig. 1). Assim, mesmo com a clivagem do amido não foi possível manter o crescimento normal das raízes.

O peróxido de hidrogênio pode funcionar como agente mitigador dos danos oriundos de situações estressoras aos vegetais. Portanto, o estresse de Al pode ter ativado o acúmulo de peróxido de hidrogênio que é uma ROS com elevada estabilidade, e, dependendo das concentrações empregadas, é responsável por regular e induzir processos de aclimação, defesa, desenvolvimento, reduzindo a sensibilidade das plantas aos fatores bióticos e abióticos aos quais são expostas (Neill et al. 2002; Šlesak et al., 2000). A manutenção na taxa de MDA após tratamento com Al pode ter ocorrido devido à presença de mecanismos de defesa não enzimáticos que protegeram a membrana. As defesas não enzimáticas são capazes de neutralizar citotoxicidade das ROS, principalmente pela atuação do ascorbato (AsA) e da glutathione (GSH). Esses podem evitar formação de radicais livres, promover degradação prevenindo danos às células e o acionamento de enzimas antioxidativas (Serkedjieva, 2011). Contudo, o equilíbrio entre a produção e a neutralização pode ser alterado, com o estresse aplicado (Cyrne et al., 2003).

5. Conclusões

O genótipo Suprema é suscetível ao estresse por Al, acumulando elevadas concentrações desse metal com danos ao crescimento e a morfologia das raízes. A sensibilidade desse genótipo está mais relacionada ao acúmulo de Al nos tecidos radiculares, do que com as alterações sobre o metabolismo. Esse metal é principalmente acumulado no ápice radicular, com maior intensidade na coifa, assim como no núcleo das células do

meristema fundamental. Menores alterações foram observadas no metabolismo primário e antioxidativo, com reduções nos teores de amido e acréscimos nos teores de H₂O₂ e proteínas.

6. Bibliografia

Almeida, G. H. G., Soares, R, C, S., Mota, T, R., Oliveira, D, M., Abrahão, J., Felipe, M, P, F, Santos, W, D., Filho, O, F., Marchiosi, R (2020). Aluminum oxide nanoparticles affect the cell wall structure and lignin composition slightly altering the soybean growth. **Plant Physiology and Biochemistry**.

Amen s, M., Corrales, I., Poschenrieder, C., Illéš, P., Baluška, F., Barcel , B., (2009). S of aluminum on the actin cytoskeleton abd brefekdin a-sensitive vesicle recycling in root Apex cells of two maize varieties differing in root elongation rate and aluminum tolerance. **Plant and Cell Physiology**, 528–540.

Achary, Y.Y.M.M, June. S, Panda, K.K, Panda, B.B, (2008). Aluminum induces oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**.

Anderson, J.S., Lall, S. P., Anderson, D.M, McAniven., Ma (1995). Availability of amino acids from various fish meals fed to Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, 138, 291- 301.

Apel, K., Hirt, H., (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. **Annu Rev Plant Biol** 55: 373-399.

Arbona, V., Manzi, M., Ollas, C, D., Gonez-Cadenao A. (2013). Metabolites as a tool to investigate abiotic stress tolerance in plants. **International Journal of Molecular Sciences** 14: 4885–4911.

Awasthi, J, P., Saha, B., Regon, P, Sahoo, S., Chowra, U, et al. (2017). Morpho-physiological analysis of tolerance to aluminum toxicity in rice varieties of North East India. **Plos One**. 12(4): e0176357.

Barceló, J., Poschenrieder, C. (2002): Rapid root growth responses, root exudates and internal detoxification curs for the mechanism of aluminum toxicity and resistance: a review. **Environ. Exp. Robô**.48, 75–92.

Beauchamp, C., Fridoviche., (1971) .Superoxide desmutase: Improved assay and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**.

BlancaFlor, E, B., Jones, D, L, Gilroy, S, (1998). Alterations in the cytoskeleton accompany aluminum-induce growth inhibition and morphological changes in primary roots of maize. **Plant Physiology**. 118:159-172.

- Bitencourt, Gi de A., Chiari, L. Laura, V. A., Do Valle, C. B., Janke, L., Moro, R.J., (2011). Aluminum tolerance on genotypes of signal grass. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 245-250.
- Bojórquez-Quintal, E., Escalante-Magaña, C., Echevarría-Machado, I., Martínez-Estévez, M. (2017). Aluminum, a friend or foe of higher plants in acid soils. **Front in Plant Science** 8, 1767.
- 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**, 248-254.
- Brito, D.S., Neri-Silva, Roberto., Ribeiro, K. V., Peixoto, P.H.P., Ribeiro. C. (2020) Effects of aluminum on the external morphology of root tips in rice. **Brazilian Journal of Botany**.
- Brunner, I., Sperisen, C. (2013). Aluminum exclusion and aluminum tolerance in woody plants. **Frontiers in Plant Science** 4, 172.
- Cárcamo, M. P., Reyes-Díaz, M., Renge, L. Z., Alberdi, M., Omena-Garcia, R. P., Nunes- Nesi, A., Inostroza-Blancheteau, C., (2019). Aluminum stress differentially affects physiological performance and metabolic compounds in cultivars of high bush blueberry. **Sci Rep. Aug 2**; 9(1):11275.
- Cakmak, C.J., Horst, W. J. (1991) Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*) **Physiology Plant.** 83:463–468.
- Ciamporová, M. (2002). Morphological and structural responses of plant roots to aluminum at organ, tissue and cellular levels. **Biologic Plantarum** 45:161-171.
- Chance, B, Maehly, A.C., (1955) Assay of Catalase and Peroxidase. **Methods in Enzymology**, 2, 764-775.
- Chen, Y, Huang, L., Liang., X., Dai., Peibin., Zhang, Y., Li, B., Lin, Xianyong., Sun C., (2020). Enhancement of polyphenolic metabolism as an adaptive response of lettuce (*Lactuca sativa*) roots to aluminum stress. **Environmental Pollution**.261.
- Carvalho, M.H.C. (2008). Drought stress and reactive oxygen species. Production, scavenging and signalling. **Plant Signal Behav** 3: 156–165.
- Chen, J., Duan, X. R., Hu, J-W., Zhang NI-NA, Lin, X-Y, Zhang, H-J, Zheng. (2019). Unraveling calcium-alleviated aluminum toxicity in *Arabidopsis thaliana*: Insights into regulatory mechanisms using proteomics, **Journal of proteomics**. 15-30.
- Choudhury, F.K, Rivero, R.M, Blumwald, E., Mittler, R. (2016). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. **The Plant J** 90: 856–867.

- Couée, I., Sulmon, C., El Amrani, A (2006). Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, vol 57.
- Day, L. (2013) Proteins from land plants - Potential resources for human nutrition and food. **Trends Food Sci Technol** 32: 25-42.
- Darko, E., Végh, B., Khalil, R., Marček, T., Szalai, G., Pál, M. & Janda, T. (2019). Metabolic responses of wheat seedlings to osmotic stress induced by various osmolytes under iso-osmotic conditions. **PloS one**.
- Degenhardt, J., Larsen, P.B., Howell, S.H., et al. (1998). Aluminum resistance in the Arabidopsis mutant alr-104 is caused by an aluminum-induced increase in rhizosphere pH. **Plant Physiology** 117:19-27.
- Delhaize, E., Ryan P. R., (1995). Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiol.** 107:315-321.
- Deleers, M., Servais, J, P., Wülfert, E. (1986). Neurotoxic cations induce membrane rigidification and membrane fusion at micromolar concentrations. **Biochim Biophys Acta**.855 : 271–276.
- Delhaize, E., Craig S, Beaton CD, Bennet, R.J, Jagadish, V.C, Randall, P.J., (1993a). Aluminum tolerance in wheat. *Triticum aestivum* L. I. Uptake and distribution of aluminum in root apices. **Plant Physiology** 103: 685–693.
- Delhaize E, Ryan PR, Randall PJ (1993b) Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) (II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices). **Plant Physiology** 103: 695–702.
- Delhaize, E., Ryan. P, R., (1995). Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiology** 107: 315–321.
- Del longo, O.T., Gonzáles, C.A., Pastori, G.M., Trippi, V.S., (1993). Antioxidant Defenses under Hyperoxygenic and Hyperosmotic Conditions in Leaves of Two Lines of Maize with Differential Sensitivity to Drough. **Plant and Cell Physiology**.
- Devasagayam, T.P.A.; Tilak, J.C, Bollor, k.k, Sane, K, S., Ghaskadbi, S.S., Lele, R.D. (2004). Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. **JAPI**.
- Doncheva, S., Amenos, M., Poschenrieder, C., Barcelo, J. (2005). Root cell patterning: a primary target for aluminium toxicity in maize. **Journal of Experimental Botany** 56: 1213–1220.

- Dong, D., Peng, X., Yan X. (2004). Organic acid exudation induced by phosphorus deficiency and/or aluminium toxicity in two contrasting soybean genotypes. **Physiologia Plantarum** 122:190–199.
- Dos Reis, A.R., Lisboa, L.A.M., Reis, H.P.G. et al. (2018). Retrato das respostas biológicas e ultraestruturais de plantas de soja a condições de estresse por alumínio. **Plant Physiol Biochem** 130: 377–390.
- Duressa, D., Soliman, K., Taylor, R., Senwo, Z. (2011). Proteomic Analysis of Soybean Roots under Aluminum Stress. **International Journal of Plant Genomics**. 10.1155 / 2011- 282531.
- Echart, C.L., Molina, S.C., (2001). Aluminum phytotoxicity: effects, tolerance mechanisms and its genetic control. **Ciência Rural** 31.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. (1974). Anteprojeto de implantação do centro nacional de pesquisa de soja. **Embrapa** 113.
- Eekhout, T., Larsen, P., Veylder, De, L., (2017). Modification of DNA Checkpoints to confer aluminum tolerance. **Trends in Plant Science**.102-105.
- Exley, C. (2013). Human exposure to aluminum. **Environ Sci Process Impacts**.15.1807- 1816.
- Ezaki, B., Gardner, R.C., Ezaki, Y., Matsumoto, H., (2000). Expression of aluminum-induced genes in transgenic Arabidopsis plants can ameliorate Al stress and/or oxidative stress. **Plant Physiol** 122: 657–665.
- Faoro, F., Iriti, M. (2005). Cell death behind invisible symptoms: early diagnosis of ozone injury. **Biologia Plantarum** 49: 585-592.
- Fernie, A.R., Willmtzer, L, (2001). Molecular and biochemical triggers of potato tuber development. **Plant Physiology**.
- Havier, E.A., Mchale, N.A. (1987). Biochemical and developmental characterizations of multiple forms of Catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, 84,450-455.
- Foy, C.D., Fleming, A.I., (1976). The physiology of Plant Tolerance to Excess Available Aluminum and Manganese in Acid Soils. **Soil Acidity and liming**.
- Fujii, M., Yokosho, K., Yamaji, N., Saisho, D., Yamane, M., Takahashi, H., Sato, K., single gene in barley. **Nat Commun** 3: 713.
- Furley, P.A., Ratter, J.A., (1988). Soil resources and plant communities the central Brazilian cerrado and their development. **J Biogeogr** 15:97-108.

- Geng, X, Horst, W, J, Golz, J, F., Lee, J, E., Ding, Z, Yang, Z, B. (2017). Leuning_Homolog transcriptional co-repressor mediates aluminium sensitivity through Pectin Methylesterase46-modulated root cell wall pectin methylesterification in Arabidopsis. **Plant J.** (3):491-504
- Giannopolitis, C, N., Ries, S.K (1977). Superoxide Dismutases I. Occurrence in Higher Plants. **Plant Physiology**, 59, 309-314.
- Giannakoula, A., Moustakas, M., Syros, T., Yupsanis, T. (2010). Aluminum stress induces up-regulation of an efficient antioxidant system in the Al-tolerant maize line but not in the Al-sensitive line. **Environ Exp Bot** 67:598-494.
- Giannakoula, A., Moustakas, M., Mylona, P., Papadakis, I., Yupsanis, T. (2008). Aluminum tolerance in maize is correlated with increased levels of mineral nutrients, carbohydrates and proline, and decreased levels of lipid peroxidation and Al accumulation. **Journal Plant Physiology** 165, 385–396.
- Gibson, S, I. (2005) Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Curr Opin Plant Biol* 8:93–102.
- Guo, P., Qi, P, Y., Cai, Y, T., Yang, T, Y., Yang, T, L., Huang, R, H., Chen, S, L. (2018). Aluminum effects on photosynthesis, reactive oxygen species and methylglyoxal detoxification in two Citrus species differing in aluminum tolerance. **Tree Physiology**.1548- 1565.
- Gupta, N., Gaurav, S.S., Kumar, A. (2013). Molecular basis of aluminum toxicity in plants: a Review. **Am. J. Plant Science** 4: 21–37.
- Hajiboland, R., Rad, S, B., Barceló, J., Poschenriede, C. (2013). Mechanisms of aluminum-induced growth stimulation in tea (*Camelia sinensis*) **J. Plant Nutr. Soil Sci**, 176, 616–625.
- Hartwig, I., Costa de Oliveira, A., De Carvalho, F, I, F., Bertan, I., Gonzalez da Silva, J, A., Schmidt, D, A, M., Valerio, I,P., Maia, L, C., Fonseca, D, A,R., Dos Reis C, E, S. (2007). Associated mechanisms of aluminum tolerance in plant. **Ciências Agrárias**, vol 28, núm 2, pp 219-228.
- Heath, R., Packer, I., (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**.
- Horst, W, J., Schmohl, N., Kollmeier, M., Baluska, F., Sivaguru, M. (1999). Does aluminum affect root growth of maize through interaction with the cell wall-plasma membrane-cytoskeleton continuum? **Plant and Soil**. 2015: 163-174.
- Horst, W, J., (1955). The role of the apoplast in aluminum toxicity and resistance of higher plants: a review. **Z Pflanzenernähr Bodenk**.158:419–428.

- Horst, J. W., 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: 185-197.
- Hymowitz, T. (1970). On the domestication of the soybean. *Economic Botany*, 24:408-421.
- Han, R., Wei, Y., Xie, Y., Liu, L., Jiang, C., & Yu, Y. (2020). Quantitative phosphoproteomic analysis provides insights into the aluminum-responsiveness of Tamba black soybean **PLOS ONE**.
- Inostroza-Blancheteau, C., Soto, B., Ibáñez, C., Ulloa, P., Aquea, F., Arce-Johnson, P., Reyes-Díaz, M., (2010). Mapping aluminum tolerance loci in cereals: a tool available for crop breeding. *Electron. J. Biotechn.* 13, 1-12.
- Inostroza-Blancheteau, C., Rengel, Z., Alberdi, M., de La, Luz Mora, M., Aquea, F., Arce-Johnson, P., and Reyes – Diaz, M. (2012). Molecular and physiological strategies to increase aluminum resistance in plants. **Mol Biol Rep** 39:2069-2079.
- Kato, Y., Miura, E., Matsushima, R., Sakamoto, W (2007) White leaf sectors in yellow variegated are formed by viable cells with undifferentiated plastids. **Plant Physiology** 144: 952-960.
- Kochian, L.V., (1995). Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Plant & Cell Physiology** 46: 237–260.
- Kochian L, V., Hoekenga, O, A., Pineros, M, A. (2004). How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annu. Rev. Plant Biology* 55: 459–493.
- Kochian, L., Piñeros, M., Hoekenga, O. (2005). The Physiology, Genetics and Molecular Biology of Plant Aluminum Resistance and Toxicity. **Plant Soil**, 274, 175–195.
- 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**.66:571-98.
- Kochian, V, L., Piñeros, A, M., Liu, J., Magalhaes, J.V (2015). Plant adaptation to acid soils: The molecular basics for crop aluminum resistance. **Annual Review of Plant Biology**. 10.1146.
- Kochian, L.V., Liao, H. (2013). Low pH, Aluminum, and Phosphorus Coordinately Regulate Malate Exudation through GmALMT1 to Improve Soybean Adaptation to Acid Soils. **Plant Physiology**, March, 161: 1347–1361.
- Koshiba, T (1993). Cytosolic Ascorbate Peroxidase in Seedling and Leave of Maize (*Zea Mays*). **Plant and Cell Physiology**. 713-721.

- Kopittke, P.M., Moore, k.L., Lombi, E., Gianoncelli, A., Ferguson, B.J., Blamey, F.P. C., Menzies, N.W., Nicholson, T.M., McKenna, B.A., Wang, P., Gresshoff, P.M., Kourousias, G., Webb, R.I., Green, K., Tollenaere, A., (2015). Identification of the Primary Lesion of Toxic Aluminum in Plant Roots. **Plant Physiology**, 167:1402–1411.
- Kopittke, M.P., Menzies, N.W., Wang, P., Blamey, F.P.C. (2016) Kinetics and nature of aluminum rhizotoxic effects: a review. **Journal of Experimental Botany**. 4451-4467.
- Khoyerdi, F.F, Shamshiri, M.H, Estaji, A. (2016). Changes in some physiological and osmotic parameters of several pistachio genotypes under drought stress. **Sci Horti** 198: 44– 51.
- Kukachka, B.F., Miller R.B. (1980). A chemical spot-test for aluminum and its value in wood identification. **IAWA Journal** 1: 104-109.
- Klug, B., Horst, W. J. (2010). Oxalate exudation in water from root tip free space provides protection against aluminum toxicity and allows aluminum accumulation in symplast in buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). **New Phytol.** 187, 380–391.
- Larsen, P.B., Degenhardt, J., Tai, C.Y Stenzler, L.M., Howell, S.H., Kochian, L.V (1998). Aluminum-resistant *Arabidopsis* mutants that exhibit altered patterns of aluminum accumulation and organic acid release from roots .**Plant Physiol.** 117:–18.
- León, P., Sheen, J. (2003). Sugar and hormone connections. **Trends Plant Sci** 8(3):110–116.
- Liang, C.Y., Piñeros, M.A., Tian, J., Yao, Z.F., Sun, L.L., Liu, J.P., Shaff, J., Coluccio, A., Kochian, L.V., Liao, H., (2013). Low pH, aluminum, and phosphorus coordinately regulate malate exudation through GmALMT1 to improve soybean adaptation to acid soils. **Plant Physiol.** 161, 1347-1361.
- Liao, H., Wan, H., Shaff, J., Wang, X., Yan, X., Kochian, L.V. 2006. Phosphorus and aluminum interactions in soybean in relation to aluminum tolerance. Exudation of specific organic acids from different regions of the intact root system. **Plant Physiology** 141:674–684.
- Lisec, I., Schauer, N., Kopka, J, Willmitzer, L., Fernie, A.R. (2006). Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. **Nature protocols**.
- Liu, J., Wang, X., Wang, N., Yang, L., Jin, T., Gai, J., Li, Y . (2021). Comparative analyses reveal peroxidases play important roles in soybean tolerance to aluminum toxicity. **Agronomy**.
- Liu, J., Magalhaes, J.V., Shaff, J, Kochian, L, V. (2009). Aluminum-activated citrate and malate transporters from the MATE and ALMT families function independently to confer *Arabidopsis* aluminum tolerance. **Plant J** 57: 389–399.

- Liu, J, Piñeros, M.A., Leon V. Kochian. (2014). The role of aluminum sensing and signalling in plant aluminum resistance. **Plant Biology**, 56(3):221-30.
- Liu, W., Xu, F., L.V, T., Zhou, W., Chen, Y., Jin, C., Lu., Lingli, Lin, X. (2018). Spatial responses of antioxidative system to aluminum stress in roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) plants. **Science of the total environment** 462-469.
- Liang, C., Piñeros, M.A., Tian, J., Yao, Z., Sun, L., Liu, J., Shaff, J., Coluccio, A., Lopez-Bucio, J, Nieto-Jacobo, M.F, Ramirez-Rodriguez, V, Herrera-Estrella, L.(2000). Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. **Plant Sci** 160:1-13.
- López-Bucio, J., de La Vega, O.M., Guevara-García, A., Herrera-Estrella, L. (2000a). Enhanced phosphorus uptake in transgenic tobacco plants that overproduce 476 citrate. **Nat. Biotechnol.** 18, 450-453. 477.
- Ma, J.F., Shen, R., Nagao, S., Tanimoto, E (2004). Aluminum targets elongating cells by reducing cell wall extensibility in Wheat roots. *Plant Cell Physiology* 45:5883-589.
- Ma, J.F, Hiradate, S, Nomoto, K, Iwashita, T., Matsumoto, H. (1997). Internal detoxification mechanism of Al in hydrangea. Identification of Al form in the leaves. **Plant Physiol** 113: 1033–1039.
- Ma, J. F., Hiradate, S., Nomato, K., Iwashita, T., Matsumoto, H. (1997). Internal Al Detoxification in Hydrangea. **Plant Physiol.** 113,1033-103.
- Ma, J.F, Hiradate, S, Matsumoto, H. (1998). High aluminum resistance in buckwheat. II. Oxalic acid detoxifies aluminum internally. **Plant Physiol** 117: 753–755.
- Ma, J.F., Ryan, P.R., Delhaize, E. (2001). Aluminum tolerance in plants and the completing role of organic acids. **Trends Plant Sci.** 6, 273-278.
- Ma, J, F. (2000). Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants. **Plant & Cell Physiology** 41:383–390.
- Ma, J.F. (2007). Síndrome de toxicidade de alumínio e diversidade de alumínio resistência mínima em plantas superiores. **Int Rev Cytol** 264: 225–252.
- Marschner, H., (2012). Mineral nutrition of higher plants, **3rd ed. Academic Press**, 509 London.
- Marschner, H., (2012). Mineral nutrition of higher plants. **Academic Press**, 509 London.
- Matsunoto, H. (1991). Biochemical mechanism of the toxicity of aluminium and the sequestration of aluminum in plant cells. **Plant soil interactions at low ph.** 825-838
- Matsumoto, H., Hirasaa, E., Morimora, S., Takahashi, E. (1976). Localization of aluminum in tea leaves. *Plant Cell Physiology*, 3:627-631.

- Matsumoto, H. (2000) Biologia celular da toxicidade e tolerância ao alumínio em plantas superiores. **Int Rev Cytol** 200: 1-46.
- Meriga, B., Reddy, K., Rao, K.R, Reddy, L.A, Kishor, P.B.K. (2004). Aluminum induced production of oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA damage in seedlings of rice (*Oryza sativa*). **J. Plant Physiol.** 161:63-68.
- Miguel, P.S.B., Gomes, F.T., Da Rocha, W.S.D., Carvalho, C.A., Oliveira, A.V (2010) Efeitos tóxicos do alumínio no crescimento das plantas: mecanismos de tolerância, sintomas, efeitos fisiológicos, bioquímicos e controles genéticos. **CES Revista**.
- Mishra P, Dubey, R.S. (2008). Effect of aluminum on metabolism of starch and sugars in growing rice seedlings. **Acta Physiol Plant** 30:265–275.
- Moriyama, U., Tomioka, R., Kojima, M., Sakakibara, H., Takenaka, C. (2016). Aluminum effect on starch, soluble sugar, and phytohormone in roots of *Quercus serrata* Thumb. Seedlings. **Trees** 30:405–413.
- Muller, B., Pantin, F., Génard, M., Turc, O., Freixes, S., Piques, M., Gibon, Y. (2011). Water deficits uncouple growth from photosynthesis, increase C content, and modify the relationships between C and growth in sink organs. **J. Exp. Bot.** 62, 1715–1729.
- Moles, T.M., Mariotti, L., De Pedro, L.F., Guglielminetti, L., Picciarelli, P., Scartazza, A. (2018). Drought induced changes of leaf-to-root relationships in two tomato genotypes, *Plant Physiology Biochemistry* 128:24-31.
- Nakana, Y., Asada, K., (1981) Hydrogen peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. **Plant e Cell Physiology**.
- Muhammad, N., Zvibgo, G, Zhang, G, P. (2019). A review: The beneficial effects and possible mechanisms of aluminum on plant growth in acidic soil. **Journal of integrative agriculture**.
- Mutava, R.N., Prince K., S.J., Syed, N.H.; Song, L., Valliyodan, B., Chen, W. and Nguyen, H. (2014) Understanding abiotic stress tolerance mechanisms in soybean: A comparative evaluation of soybean response to drought and flooding stress. **Plant Physiology and Biochemistry**.
- Nunes-Nesi, A., Brito, D.S., Inostroza-Blancheteau, C., Fernie, A.R., Araújo, W.L. (2014). The complex role of mitochondrial metabolism in plant aluminum resistance. **Trends Plant Sci** 19: 399–407.
- Neill, S., Desikan, R., Hancock, J.(2002) .Hydrogen peroxide signaling. *Curr. Opin. Plant Biology*, v.5, p.388-395.

- Nunes-Nesi, A., Carrari, Gibon, Y., Sulpice R., Lytovchenko, A., Fisahn, J., Graham, J., Ratcliffe, R.G., Sweetlove, L. J., Fernie, R. A. (2007) . Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. *Plan.J.*
- Ono, K, Yamamoto, Y., Hachiya, A., Matsumoto, H. (1995). Synergistic inhibition of growth by aluminum and iron of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cells in suspension culture. **Plant Cell Physiol.**36:115–125.
- Obata, T., Fernie, A. R. (2012). The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. **Cellular and Molecular Life Sciences** 69: 3225–3243.
- Oliveira, M.S., Rocha, S. V., Scheneider, V.K., Silva, F.H., Soares, M. R., Costa, A.S. (2021). Physiological, nutritional, and molecular responses of Brazilian sugarcane cultivars under stress by aluminum. **Plant Biology**.
- Oteiza, P, I. (1994). A mechanism for the stimulatory effect of aluminum on iron-induced lipid peroxidation. **Arch Biochem Biophys.**308:374–379.
- Panda, S.K., Baluška, F., Matsumoto, H. (2009) Aluminum stress signaling in plants, **Plant Signaling e Behavior**, 4: 592-597.
- Panda, S.K., Baluška, F., Matsumoto, H. (2009). Aluminum stress signaling in plants. *Plant Signal. Behav.* 4, 592–597.
- Pandey, P., Srivastava, R.K., Dubey, R.S. (2013). Water deficit and aluminum tolerance are associated with a high antioxidative enzyme capacity in Indica rice seedlings. *Protoplasma.* 251: 147–160.
- Pandey, P., Srivastava, R.K., Rajpoot, R., Rani, A., Pandey, K. A., Dubey, R.S. (2016) Water deficit and aluminum interactive effects on generation of reactive oxygen species and responses of antioxidative enzymes in the seedlings of two rice cultivars differing in stress tolerance. **Environ Sci Pollut Res** 23:1516–1528.
- Peixoto, C, P., Câmara, G, M, S., Martins, M.C., Marchiori, L.F.S .(2002). Efeito de épocas de semeadura e densidades de plantas de cultivares de soja no estado de São Paulo. **Revista de Agricultura**,77, 265-293.
- Pirzadah, T.B., Malik, B., Tahir, I., Rehman, R.U., Hakeem, K.R., Alharby, H.F. (2019). O estresse de alumínio os osmólitos e o sistema de defesa enzimática em espécies de *Fagopyrum*. **Plant Physiol. Biochem**, 144, 178–186.
- Pellet, D, M.; Papernik, L, A., Kochian, L., V. (1996). Multiple aluminum resistance mechanisms in wheat: roles of root apical phosphate and malate exudation. **Plant Physiol**, 112:591–597.

- Poschenrieder, C., Gunsé, B., Corrales, I., Barceló, J. (2008). A glance into aluminum toxicity and resistance in plants. **Science of Total Environment**.
- Polle, E., Konkazak C.F., Kittrick, J.A. (1978). Visual detection of aluminum tolerance leaves in wheat by hematoxylin staining of seeding roots. **Crop Science** 18: 823-827.
- Rahman, R., Udadhyaya, H. (2021). Aluminium toxicity and its tolerance in plant: Review. **Journal of Plant Biology** 64:101–121.
- Riaz, M., Yana, L., Wua, X., Hussain, S., Aziza, O and Jianga, C. (2018). Mechanisms of organic acids and boron induced tolerance of aluminum toxicity: A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 165:25–35.
- Richards, K, D., Schott, E, J., Sharma, Y, K., Devis, K,R., Gardner, R,C,. (1998) Aluminum induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiol**, 116: 409–418.
- Rincón, M., Gonzales, R.G. (1992). Aluminum partitioning intact roots of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Plant Physiology*, 3:1021- 1028.
- Rocha, Márcio. (2006). Respiração e atividade de enzimas do metabolismo antioxidativo em raízes de plântulas de milho (*Zea mays* L.) submetidas ao estresse por alumínio. **UFV**.
- Ryan, P.R., Tyeman, S.D., Sasaki, T, Yamamoto, Y, Zhang, W.H, Delhaize, E. (2011). The identification of aluminium-resistance genes provides opportunities for enhancing crop production on acid soils. **J Exp Bot**, 62:9-20.
- Sade, H., Meriga, B., Surapu, V., Gadi, J., Sunita, M, S, L., Suravajhala, P., kishor, P, B. (2016) Toxicity and tolerance of aluminum in plants: tailoring plants to suit to acid soils. **Biometals**, 29, 187–210.
- Sasaki T, Yamamoto Y, Ezaki B, Katsuhara M, Ahn SJ, Ryan PR, Delhaize E, Matsumoto H. (2004). A wheat gene encoding an aluminum- activated malate transporter. **Plant J** 37: 645–653.
- Sediyama, T., Pereira, M.G., Sediyama, C.S., J, L.L .(1985). Cultura da soja – Parte I. Viçosa, MG; **UFV**, Imp. Univ., 985:96.
- Serkedjieva, J. (2011). Antioxidant effects of plant polyphenols: a case study of a polyphenol-rich extract from *Geranium sanguineum* L. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. **Enfi eld: Science Publishers**.Chap.13, p.275-293.
- Silva, I. R. et al. (2004). Responses of eucalypt species to aluminum: the possible involvement of low molecular weight organic acids in the Al tolerance mechanism. **Tree Physiology** 24, 1267–1277.

- Silva, S., Pinto, G., Dias, M. C., Correia, C. M., Pereira-Moutinho, J., Pinto-Carnide, O., Santos, C. (2012) Aluminum long-term stress differently affects photosynthesis in rye genotypes. **Plant Physiology and Biochemistry**, 105-112.
- Silva, F. et al. Soybean Breeding. Viçosa: Springer, 2017.
- Silva, R. G., Berger, M., Bernardy, D., Tabaldi, L. A., Birck, T. P., Tarouco, C. P., Silva, O., Brito, S. B., DA Silva, A., Rosa R. V., Santos, M. F. S., Souza, A. S., Azevedo, A. A., DAL-BIANCO, M., Oliveira, J. A., Ribeiro, C. (2020). Differential accumulation of aluminum in root tips of soybean seedling. **Brazilian Journal of Botany**.
- Silva, I.R., Smyth, T.J., Raper, C.D., Carter, T.E., Rufty, T.W. (2001). Differential aluminum tolerance in soybean: an evaluation of the role of organic acids. **Physiologic Plantarum**, 112:200–210.
- Silva, S. (2012) Aluminium toxicity targets in plants. **Journal of Botany** 219462: 1–8.
- Simões, C.C., Melo, J.O., Magalhães, J.V., Guimarães, C.T. (2012). Genetic and molecular mechanisms of aluminum tolerance in plants. **Genetics and Molecular Research**, 11:1949-1957.
- Singh, D., Singh, N.P, Chauhan, S.K, Singh, P (2011) Developing aluminium- tolerant crop plants using biotechnological tools, **Curr. Sci**.
- Singh, S., Tripathi, D.K., Singh, S., Sharma, S., Dubey, N.K., Chauhan, D, K., Vaculík, M. (2017) Toxicidade do alumínio em vários níveis de células vegetais e organismo: Uma revisão. **Environ. Exp. Robô**137 , 177–193.
- Shahnawazi, M, D., Sanadhya. (2017). Aluminum induced oxidative stress antioxidants system in two barky varieties and its alleviation through ascorbic acid and salicylic acid seed priming approach. **International journal of life science & Pharma Research**.
- Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R, S., Pessarakli, M. (2010). Oxidative stress and antioxidative defense system in plants growing under abiotic stresses. In: Pessarakli M (ed) **Handbook of plant and crop stress**, 3rd edn. Taylor and Francis, USA, pp 89–138.
- Ślesak, I., Libik, M., Karpinska, B., Karpinki, S., Miszański, Z. (200). The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signaling in response to environmental stresses. **Acta Biochemistry**, v.54, p.39-50,
- Smeekeens, S. (2000). Sugar-induced signal transduction. **Annu Rev Plant Phys** 51:49–81.
- Srivastava, R.K., Dubey, R.S. (2012). Metal toxicity, production of reactive oxygen species and their consequences in plants. In: Hemantaranjan A (ed) **Advances in plant physiology**, vol 13. **Scientific Publishers**, Jodhpur, pp 415–456.

- Smith, A.M., Stitt, M. (2007). Coordination of carbon supply and plant growth. **Plant Cell Environ.** 30, 1126–1149.
- Shou-Cheng, Huang,. Shu-Juan, Chu., Yu-Min, Guo., Ya-Jing, Ji., Dong-Qing, Hu., Jing, Cheng., Gui-Hu,a Lu., Rong-Wu, Yang., Cheng-Yi, Tang., Jin-Liang, Qi., Yong- Hua, Yang. (2017). Novel mechanisms for organic acid-mediated aluminium tolerance in roots and leaves of two contrasting soybean genotypes. **AoB Plants.**
- Steiner, F., Zoz, T., Pinto-Junior, A, S., Castagnara, Dom, Lopes Dranski, J, A. (2012). Effects of aluminum on plant growth and nutrient uptake in young physic nut plants. **Ciências agrárias.**
- Sun, C., Lu, L., Liu, L., Liu, W, Yu, Y., Liu, X, Hu, Y., Jin,C,. Lin, X. (2013). Nitrate reductase-mediated early nitric oxide burst alleviates oxidative damage induced by aluminum through enhancement of antioxidant defenses in roots of wheat (*Triticum aestivum*). **New phytologist.**
- Tardieu, F., Simonneau, Y., Muller, B. (2018). The physiological basis of drought tolerance in crops plants: a scenario-dependent probabilistic approach. *Annu Rev Plant Biol* 69:733-759.
- Taylor, G,J., McDonald-Stephens, J. L., Hunter, D. B., Bertsch, P. M., Elmore, D., Rengel, Z., Reid, R,J (2000) Direct measurement of aluminum uptake and Distribution
- Tedesco, M, J, C., Gianello, C. A. Bissani, H. Bohnen, S, J., Volkeirss .(1995). Analysis of soil, Plants and other materials. Porto Alegre, Brazil: **Department of soil, University Federal do Rio Grande do Sul.**
- Thalmann, M., Santelia, D.(2017). Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress. **New Phytologist** 214, 943–951.
- Tolrà, R., Vogel-Mikus, K., Hajiboland, R., Kump, P., Pongrac, P., Kaulich, B., Gianoncelli, A., Babin, V., Barceló, J., Regvar, M., Poschenrieder, C. (2011). Location of aluminum in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) leaves using low energy X-ray fluorescence spectroscopy. **J. Plant Res.** 124, 165–172.
- Vásquez, M, D., Poschenrieder, C, Corrales, I, Barceló,J. (1999). Change in apoplastic aluminum during the initial growth response to aluminum by roots of a tolerant maize variety. **Plant Physiol.** 119-435-444.
- Velázquez-Márquez S., Conde-Martínez V., Trejo, C et al. (2015). Effects of water deficit on radicle apex elongation and solute accumulation in *Zea mays* L. **Plant Physiol Biochem** 96: 29-37.
- Vardar, F., Ünal, M. (2007). Aluminum toxicity and resistance in higher plants. **Advances in Molecular Biology** (1): 1-12.

- Velma, K, S., Muchhala, D., Panthi, S, K., Mondal , D.P. (2021). Influences of Cell Size, Cell Wall Thickness and Cell Circularity on the Compressive Responses of Closed-Cell Aluminum Foam and its FEA Analysis. **Inter Metalcast**.
- Velikova, V., Yordanov, I. Edreva, A. (2000). Oxidative Stress and Some Antioxidant Systems in Acid Rain-Treated Bean Plants: Protective Role of Exogenous Poly-amines. **Plant Science**, 151, 59-66.
- Vitorello, V.A., Capaldi, F.R., Stefanuto, V.A., (2005). Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. **Brazilian J Plant Physiol** 17: 129-143.
- Wang, L., Fan, X.W, Pan, J.L. Huang, Z.B., Li, Y.Z. (2015). Physiological characterization of maize tolerance to low dose of aluminum, highlighted by promoted leaf growth. **Plant** 242:1391-1403.
- Xu, Q., Wang, Y., Ding, Z., Song, L., Li, Y., Ma, D., Wang, Y., Shen, J., Jia, S., Sun, H., Zhang, H. (2016). Aluminum induced metabolic responses in two tea cultivars. **Plant Physiology and Biochemistry** 101:162-172.
- Yamaguchi, Y., Yamamoto, Y., Matsumoto, H. (1999). Cell death process initiated by a combination of aluminum and iron in suspension-cultured tobacco cells (*Nicotiana tabacum*): apoptosis-like cell death mediated by calcium and proteinase. **Soil Sci Plant Nutr.** 1999;45:647–657.
- Yamamoto, Y., Hachiya, H., Matsumoto, H., (1997). Oxidative damage to membranes by a combination of aluminum and iron in suspension cultured tobacco cells. **Plant Cell Physiol.** 38:1333–1339.
- Yamamoto, Y, Kobayashi, Y., Devi, S, R., Rikiishi, S., Matsumoto, H. (2002). Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells. **Plant Physiol** 128 (1): 63–72.
- Yang, J.L., Zheng, S.J., He, Y.F., Tang, C.X., Zhou, G.D. (2005). Genotypic differences among plant species in response to aluminum stress. **Journal of Plant Nutrition** 28: 949– 961.
- Yang, J.L., Zhu, X.F., Peng, Y.X., Zheng, C., Li, G.X., Liu, Y., Shi, Y.Z., Zheng, S.J. (2011a). Cell wall hemicellulose contributes significantly to aluminum adsorption and root growth in Arabidopsis. **Plant Physiology** 155: 1885–1892.
- Yang, C., Zhao, T., Yu, D., Junyi, G.J. (2011b). Mapping QTLs for Tissue Culture Response in Soybean (*Glycine max* (L.) Merr. **Molecules and Cells** 31; 32(4): 337– 342.
- Yang, L.T., Qi, Y.P.; Jiang, H.X. and Chen, L.S. (2013) Role of Organic Acid Anion Secretion in Aluminium Tolerance of Higher Plants. **BioMed Research International**.

- Yang, J.L.; Fan, W., Zheng, S.J. (2019). Mechanisms and regulation of aluminum-induced secretion of organic acid anions from plant roots. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)*, 20:513-527.
- Yemm. E. W., Cocking, E.C. (1955). The Determination of Amino-acids with Ninhydrin. **Chemistry Department University of Bristol**.
- You, J., Z. (2015). ROS regulation during abiotic stress responses in crop plants. *Front Plant Sci* 6:1092.
- Yu, Y., Zhou, W., Liang, X., Zhou, K., Lin, X. (2019). Increased bound putrescine accumulation contributes to the maintenance of antioxidant enzymes and higher aluminum tolerance in wheat. *Environmental pollution*.10.10.10106.
- Zhang, W, H., Rengel, Z. (1999). Aluminum induces an increase in cytoplasmic calcium in intact wheat root apical cells. *Australian Journal of Plant Physiology*, 26, 5, 401-409.
- Zhang, L. et al. (2016) Polyphenol-aluminum complex formation: Implications for aluminum tolerance in plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64, 3025–3033.
- Zheng, J, S., Yang, J, L., He, Y, F., Yu, X, H., Zhang, L., You, J, F., Shen, F.R., Matsumoto, H. (2005). Immobilization of Aluminum with Phosphorus in Roots is Associated with Hight Aluminum Resistance in Bucwheat. *Plant Physiology*, 297-303.
- Zhuang, J., Zhang, J., Hou, X, L., Wang, F., Ai-Sheng Xiong, A, S. (2014). Transcriptomic, Proteomic, Metabolomic and Functional Genomic Approaches for the Study of Abiotic Stress in Vegetable Crops. *Critical Reviews in Plant Sciences* 33: 2-3.

7. Conclusões gerais

No genótipo A7002 o Al não induziu danos ao sistema radicular, apresentando mecanismo de tolerância a este metal, com concentração de malato nas células das raízes numa tentativa de quelação com o Al, além da neutralização (acúmulo) do Al em células radiculares mais externas, impedindo sua interiorização para tecidos de transporte e para regiões meristemáticas e assim matando essa planta sem a presença de estresse.

Já o genótipo Suprema foi suscetível ao estresse por Al, acumulando altas concentrações deste metal em tecidos radiculares, o que resultou em danos anatômicos a este órgão, contudo com poucas alterações sobre o metabolismo.