

JAILSON SOUSA DE CASTRO

**ALUMÍNIO ALTERA A MORFOFISIOLOGIA E O METABOLISMO EM FOLHAS E
RAÍZES DE SOJA**

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
Maxmiller Dal-Bianco Lamas Costa

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

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

T

C355a De Castro, Jailson Sousa, 1996-
2021 Alumínio altera a morfofisiologia e o metabolismo em
folhas e raízes de soja / Jailson Sousa De Castro. – Viçosa, MG,
2021.

1 dissertação eletrônica (58 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Cleberson Ribeiro.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Geral, 2021.

Referências bibliográficas: f. 52-58.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2021.259>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Glycine max. 2. Plantas - Resistência a doenças e pragas.
3. Stresse (Fisiologia). I. Ribeiro, Cleberson, 1980-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Geral. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal.
III. Título.

CDD 22. ed. 633.34

Bibliotecário(a) responsável: Renata de Fátima Alves CRB6/2578

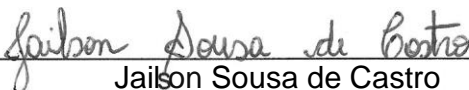
JAILSON SOUSA DE CASTRO

ALUMINIO ALTERA A MORFOFISIOLOGIA E O METABOLISMO EM FOLHAS E
RAIZES DE SOJA

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*.

APROVADA: 28 de julho de 2021.

Assentimento:



Jailson Sousa de Castro
Autor



Cleberson Ribeiro
Orientador

*Ao meu pai Jairson de Castro e minha mãe Stela Sousa,
minhas irmãs Jailza e Josy de Castro
e meus tios Eliziete Lemos e Idelfonso Santos (in memoriam),
DEDICO!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Santíssima Trindade, por me fortalecer a cada novo desafio e me dar sustento para chegar até aqui e ir além.

Aos meus pais, Jairson de Castro e Stella Sousa e minhas irmãs Josy e Jailza de Castro por todo o amor e confiança depositada, por toda ajuda, estímulo, paciência e amor durante todas as etapas da minha vida

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de realização do mestrado e estrutura disponibilizada.

Ao meu orientador Prof. Dr. Cleberson Ribeiro, por toda paciência e confiança e disposição para ensinar sempre comprometido com meu crescimento profissional.

À Dr. Danielle Santos Brito, pelos preciosos conselhos e disponibilidade em ensinar.

À minha estimada e amiga Prof. Dra. Maria Lita Padinha Côrrea Romano pela confiança, carinho e ensinamento.

À minha estimada e amiga Prof. Juliana Ponte Santos pela confiança, carinho e ensinamento.

Aos integrantes do Laboratório de Genética Molecular de Plantas por terem me recebido com carinho, em especial ao Bruno, Guilherme, Maria e Renata.

À Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA, a Universidad Talca – UTALCA-Chile e a Universidade Federal Rural do Semi-árido – UFRSA, pela oferta do Bacharelado em Agronomia.

Aos meus amigos, que me deram o suporte para este processo, especialmente Adrisson, Carla Freitas, Débora, Diego, Eduardo, Fabiana, Genaína, Isnayna, Hellen, Juliana, Leandro, Maria Isabel, Maria das Dores, Thyara, Sinthia, Rafael e Wallyson.

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

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

“You know what you gotta do when life gets you down?

JUST KEEP SWIMMING”

(Finding Dory – Lindsey Collins)

RESUMO

DE CASTRO, Jailson Sousa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2021. **Alumínio altera a morfofisiologia e o metabolismo em folhas e raízes de soja.** Orientador: Cleberson Ribeiro. Coorientadores: Danielle Santos Brito e Maxmiller Dal-Bianco Lamas Costa.

Solos ácidos apresentam alta saturação de alumínio (Al) apresentando efeitos tóxicos para as plantas, interagindo com diferentes biomoléculas e vias metabólicas e resultando em danos anatômicos e/ou morfofisiológicos, prejudicando a produção agrícola. No presente estudo, investigamos respostas morfoanatômicas e fisiológicas em plantas de soja (*Glycine max* L.) cv. EMBRAPA 48 e MONSOY 8644 cultivados em solução hidropônica sob condições controladas com três concentrações de Al (0, 100 e 300 μM de Al_3Cl_3) por 3 e 6 dias. Após o cultivo ambos cultivares apresentaram similar absorção de Al entre dias. Plantas MONSOY 8644 obtiveram maior acúmulo de Al em folhas e raízes de acordo com o aumento da disponibilidade, aumento na taxa de crescimento relativo de parte aérea, maior conteúdo de clorofilas, acúmulo de metabolitos primários e compostos fenólicos totais, maior atividade enzimática de APX e POX em folhas e CAT em raízes, e menores danos na morfologia de raízes, plantas EMBRAPA 48 mostraram maiores resultados em proteínas em altas doses de Al, aumento no conteúdo de amido em folhas, associado com a diminuição na área foliar, e menores conteúdos de H_2O_2 em folhas, ocorrendo localização de Al nas camadas superficiais dos ápices de raízes resultando em desorganização celular nas células da epiderme. Concluindo que o Al apresenta poucos danos ao crescimento dos cultivares de soja, propiciando estabilidade fotossintética o que permite a síntese e acúmulo de corpos carbônicos, tendo o cultivar MONSOY 8644 mecanismos mais apurados de resistência ao Al.

Palavras-chave: *Glycine max*. Tolerância. Estresse Abiótico.

ABSTRACT

DE CASTRO, Jailson Sousa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2021. **Aluminum alters the morphophysiology and metabolism of soybean leaves and roots.** Adviser: Cleberson Ribeiro. Co-advisors: Danielle Santos Brito and Maxmiller Dal-Bianco Lamas Costa.

Acid soils have a high aluminum saturation, presenting toxic effects for plants, interacting with different biomolecules and metabolic pathways and resulting in anatomical and/or morphophysiological damage, harming agricultural production. In the present study, we investigated morphoanatomical and physiological responses in soybean plants (*Glycine max* L.) cv. EMBRAPA 48 e MONSOY 8644 cultivated in hydroponic solution under controlled conditions with three concentrations of Al (0, 100 e 300 μM de Al_3Cl_3) for 3 e 6 days. After cultivation, both cultivars showed similar Al uptake between days. MONSOY 8644 plants had higher Al accumulation in leaves and roots as availability increased, increase in the relative growth rate of aerial part, higher chlorophyll content, accumulation of primary metabolites and total phenolic compounds, higher enzymatic activity of APX and POX in leaves and CAT in roots, and less damage to the morphology of roots, EMBRAPA 48 plants showed higher results in proteins at high doses of Al, increase in starch content in leaves, associated with decreased leaf area and lower H_2O_2 content in leaves, localization of Al occurring in the superficial layers of the apices of roots resulting in cellular disorganization in the cells of the epidermis. Concluding that Al has little damage to the growth of soybean cultivars, providing photosynthetic stability which allows for the synthesis and accumulation of carbonic bodies, the cultivar MONSOY 8644 having more refined mechanisms of resistance to Al.

Keywords: *Glycine max*. Tolerance. Abiotic Stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Plantas de dois cultivares de soja após 3 dias de tratamento com Al em solução nutritiva	15
Figura 2 - Plantas de dois cultivares de soja após 6 dias de tratamento com Al em solução nutritiva	15
Figura 3 – Teor de alumínio em folhas (A, B) e teor de alumínio em raízes (C, D) de dois cultivares de soja, após 3 e 6 dias de tratamento com Al em solução nutritiva	21
Figura 4 - Crescimento relativo de raízes (A, B), Crescimento relativo de Parte Aérea (C, D) e Área Foliar Total (E, F) de dois cultivares soja, após 3 e 6 dias de tratamento com Al em solução nutritiva.....	22
Figura 5 - Área de Raízes (A, B), Diâmetro de Raízes (C, D) e Volume de Raízes (E, F), de dois cultivares soja, após 3 e 6 dias de tratamento com Al em solução nutritiva	24
Figura 6 - Taxa Fotossintética Real (A, B), Condutância Estomática (C, D) e Índice de Transpiração (E, F), de dois cultivares soja, após 3 e 6 dias de tratamento com Al em solução nutritiva	26
Figura 7 - Clorofila a (A, B), Clorofila b (C, D) e Clorofila total (E, F), de dois cultivares soja, após 3 e 6 dias de tratamento com Al em solução nutritiva	27
Figura 8 - Glicose (A, B), Frutose (C, D), Sacarose (E, F) e Amido (G, H) em folhas de dois cultivares soja, após 3 e 6 dias de tratamento com Al em solução nutritiva	28
Figura 9 - Glicose (A, B), Frutose (C, D), Sacarose (E, F) e Amido (G, H) em raízes de dois cultivares soja, após 3 e 6 dias de tratamento com Al em solução nutritiva.	30
Figura 10 - Proteínas (A, B), Aminoácidos (C, D), Malato (E, F) e Fumarato (G, H) em folhas de dois cultivares soja, após 3 e 6 dias de tratamento com Al em solução nutritiva.....	32
Figura 11 - Proteínas (A, B), Aminoácidos (C, D), Malato (E, F) e Fumarato (G, H) em raízes, de dois cultivares soja, após 3 e 6 dias de tratamento com Al em solução nutritiva.....	34
Figura 12 - Compostos fenólicos totais em folhas (A, B) e Compostos fenólicos totais em raízes (C, D) de dois cultivares soja, após 3 e 6 dias de tratamento com Al em solução nutritiva	36
Figura 13 - Histolocalização de alumínio por chrome azulol S em raízes dias de dois cultivares soja, após 3 e 6 dias de tratamento com Al em solução nutritiva.....	37
Figura 14 - Micromorfologia por microscopia eletrônico de varredura das pontas de raízes de dois cultivares soja, após 3 dias de tratamento com Al em solução nutritiva.	38

Figura 15 - Micromorfologia por microscopia eletrônico de varredura das pontas de raízes de dois cultivares soja, após 6 dias de tratamento com Al em solução nutritiva.	39
Figura 16 - Conteúdo de MDA em folhas (A, B), Conteúdo de H ₂ O ₂ em folhas (C, D), Conteúdo de MDA em raízes (E, F) e Conteúdo de H ₂ O ₂ em raízes (G, H) de dois cultivares soja, após 3 e 6 dias de tratamento com Al em solução nutritiva.....	40
Figura 17 - Atividade de POX (A, B), Atividade de SOD (C, D), Atividade de CAT (E, F) e Atividade de APX (G, H) em folhas de dois cultivares soja, após 3 e 6 dias de tratamento com Al em solução nutritiva.....	42
Figura 18 - Atividade de POX (A, B), Atividade de SOD (C, D), Atividade de CAT (E, F) e Atividade de APX (G, H) em raízes de dois cultivares soja, após 3 e 6 dias de tratamento com Al em solução nutritiva.....	44

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
2.1. Condições de crescimento e delineamento experimental	14
2.2. Parâmetros de crescimento	16
2.3. Fluorescência da clorofila a e trocas gasosas.....	16
2.4. Avaliação dos metabólitos primários e secundários.....	16
2.5. Teor de alumínio	17
2.6. Histolocalização do alumínio.....	17
2.7. Micromorfologia e microanálise do alumínio em ápices de raízes.....	17
2.8. Peroxidação lipídica	18
2.9. Quantificação de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	18
2.10. Atividade enzimática	18
2.11. Análise Estatística.....	19
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
3.1. Teor de alumínio	21
3.2. Taxa de crescimento relativo de raízes e parte aérea e área foliar total	22
3.3. Área, diâmetro e volume de raízes.....	23
3.4. Taxa fotossintética real, condutância estomática e transpiração.....	25
3.5. Clorofilas	26
3.6. Açúcares totais e amido em folhas.....	28
3.7. Açúcares totais e amido em raízes	29
3.8. Proteínas, aminoácidos e ácidos orgânicos em folhas.....	31
3.9. Proteínas, aminoácidos e ácidos orgânicos em raízes	34
3.10. Compostos fenólicos totais.....	36
3.11. Histolocalização, micromorfologia e microanálise de alumínio em ápices de raízes	37
3.12. Peroxidação lipídica e peróxido de hidrogênio	39
3.13. Atividade enzimática	42
4. DISCUSSÕES.....	46
5. CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS	52

1. INTRODUÇÃO

A expansão da fronteira agrícola no cenário mundial é ditada pela incorporação de novas áreas agricultáveis para a produção de grãos, onde aproximadamente 40% dos solos potencialmente agricultáveis apresentam porções do sistema ácidos, no Brasil em regiões produtoras de grãos são observados solos com potencial hidrogeniônico (pH) inferior a 5,0 (CARNEIRO FILHO & COSTA, 2016; FAO, 2012; GARDI et al., 2015). O alumínio (Al) é o metal mais abundante na crosta terrestre, em um ambiente de baixo pH sua biodisponibilidade é diretamente influenciada, onde argilas de aluminossilicato e minerais de hidróxido de alumínio se dissolvem liberando cátions na forma iônica trivalente (Al^{3+}) (KOCHIAN, 1995; SILVA, 2012; PATTANAYAK & PFUKREI, 2013).

A biodisponibilidade do Al para as plantas cultivadas resulta em efeitos tóxicos, sendo a intensidade dependente de diversos fatores como concentração do metal no solo, forma química e a presença de mecanismos de tolerância ou resistência nas plantas (YANG et al., 2011; YU et al., 2011). 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 (KISNIERIENÉ & LAPEIKAITĖ, 2015; BOJÓRQUEZ-QUINTAL et al., 2017).

Diversos são os efeitos tóxicos do Al em plantas, dentre eles a inibição na absorção de água e nutrientes, inibição do crescimento radicular, inibição da divisão e respiração celular, alteração do estado redox das células, modificação no citoesqueleto, modificação no metabolismo, mobilização de proteínas e alteração na atividade fotossintética (NUNES-NESE et al., 2014; EEKHOUT et al., 2017; SENEVIRATNE et al., 2019).

O Al pode permanecer ligados à parede celular se acumulando predominantemente na zona meristemática, impedindo assim o alongamento celular causando danos estruturais e/ou fisiológicas (ČIAMPOROVÁ, 2002; AHN, & MATSUMOTO, 2006). A inibição do alongamento das raízes influencia em mudanças na arquitetura de raízes, produção de calosidade e deposição de lignina, que são fatores que reduzem a capacidade de absorção de água e nutrientes e, conseqüentemente, reduzem a expansão da foliar e o fechamento estomático limitando o desempenho fotossintético, afetando negativamente a produtividade

principalmente das safras de grãos (KOCHIAN 1995; HE et al. 2012; RYAN et al. 2011; YANG et al. 2013).

A exposição de Al afeta as vias metabólicas de fixação de carbono, alterando o armazenamento, translocação e metabolismo de carboidrato, com essas mudanças nos processos fisiológicos e bioquímicos ocorre o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) culminando na peroxidação lipídica e no acúmulo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ocasionando colapso vacuolar e perda da integridade das membranas (PANDA et al., 2009; SILVA et al., 2012; DOS REIS et al., 2018). O sistema antioxidante desempenha um papel importante na eliminação de EROs, o aumento de H_2O_2 funciona como um sinal que ativa sistemas antioxidantes atuante no estresse oxidativo, sendo observado em raízes aumento na atividade das enzimas peroxidases (POX), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e da ascorbato peroxidase (APX) afim de aliviar o dano oxidativo (LIU et al., 2017; RANJA et al., 2021).

Os organismos vegetais apresentam distintos mecanismos para lidar com a toxicidade do Al, resultando na capacidade da planta em manter seu crescimento e rendimento em solos ácidos (BRUNNER & SPERISEN, 2013; KOCHIAN et al. 2015). Os mecanismos de tolerância à toxicidade de Al em plantas são divididos em: 1) exclusão do Al das células da raiz para a solução do solo, e 2) tolerância interna, no qual o Al pode ser complexado e armazenado em regiões celulares reduzindo sua atividade (HORST et al., 2010; DASPUTE et al., 2017).

Plantas tolerantes ao Al apresentam aumento nos produtos relacionados a fotossíntese os quais podem ser utilizados para a síntese de ácidos orgânicos, como malato, citrato e oxalacetato os quais apresentam capacidade de complexar o metal Al na rizosfera evitando a absorção ou no ambiente intracelular promovendo o transporte para o vacúolo (WANG et al. 2020; NUNES-NESI et al. 2014; KOCHIAN et al. 2015). Além dos ácidos orgânicos, os produtos provenientes do metabolismo secundário também apresentam capacidade de redução dos efeitos tóxicos do Al (PEREIRA & CARDOSO, 2012).

O cultivo da soja é uma das principais atividades responsáveis pela expansão da fronteira agrícola no país, requerendo assim novas tecnologias para o manejo cultural adequado e alta qualidade fisiológica e sanitária em sementes para o estabelecimento de lavouras uniformes e com alta produção (PETTER et al., 2014; CARNEIRO FILHO & COSTA, 2016; WERNER et al., 2020). Cultivares de soja

apresentam sensibilidade ao Al (HUANG et al., 2017). Sendo as raízes o primeiro órgão em contato com o metal Al buscar o entendimento dos sítios de acúmulo e consequentemente os danos diretos impostos por esse metal a este órgão e analisar a parte aérea buscando mitigar possíveis efeitos indiretos nos parâmetros ecofisiológicos podem ajudar estudos de melhoramento da qualidade do cultivo de soja em solos ácidos com Al disponível.

Considerando a necessidade de expansão da soja em regiões produtoras com biodisponibilidade de Al, esse trabalho teve como objetivo avaliar quais os efeitos diretos e indiretos considerando os parâmetros fisiológicos, metabólicos e morfoanatômicos nos diferentes órgãos dos cultivares avaliados buscando se há um comportamento diferencial frente a concentração de Al, tempo e cultivares. Assim, hipotetizamos que cultivares de soja expostas ao Al são capazes de reexistir apresentando mecanismos internos de tolerâncias, acumulando este metal em órgãos como raízes e folhas, e consequentemente modularão as diferentes vias de metabolismo afim de resistir aos danos induzidos por esse metal.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Condições de crescimento e delineamento experimental

Sementes de soja (*Glycine max* L.) cv. EMBRAPA 48 a qual apresenta respostas contrastantes ao déficit hídrico (TEXEIRA et al., 2008) e cv. MONSOY 8644 IPRO qual apresentou alta utilização na safra 2019/2020 foram obtidas, respectivamente, do Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja (PMQS/BIOAGRO/UFV) e de sojicultores do estado do Pará. As sementes foram sanitizadas com hipoclorito de sódio 5% (NaClO) durante 5 min, e então lavadas em água destilada. Em seguida, foram germinadas em rolos de papel GERMITEST® umedecidas com 100 µM de cloreto de cálcio (CaCl₂, pH 7,0). Plântulas padronizadas foram selecionadas e aclimatadas em vasos de 1,8 L contendo solução de Clark ½ da força iônica, pH 5,5 (CLARK, 1975) com aeração contínua até o estágio vegetativo V1.

Plantas com o primeiro trifólio completamente expandido foram submetidas a solução nutritiva de Clark na força iônica total, pH 4,0 com AlCl₃ nas concentrações de 0, 100 e 300 µM durante 3 (Figura 1) e 6 dias (Figura 2), sendo observado respostas agudas devido ao crescimento exponencial da cultura. Para todo o experimento, as plantas foram mantidas em condições controladas de temperatura 25 ± 1 °C, luminosidade de 200 µmol fótons m⁻² s⁻¹, umidade relativa de 80% ± 20 e fotoperíodo de 16 h luz e 8 h escuro. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento e a unidade experimental foi constituída de quatro plantas por vaso.

Figura 1 - Plantas de dois cultivares de soja, MONSOY 8644 IPRO e EMBRAPA 48, após 3 dias de tratamento com 0 (controle), 100 e 300 μM de Al em solução nutritiva.

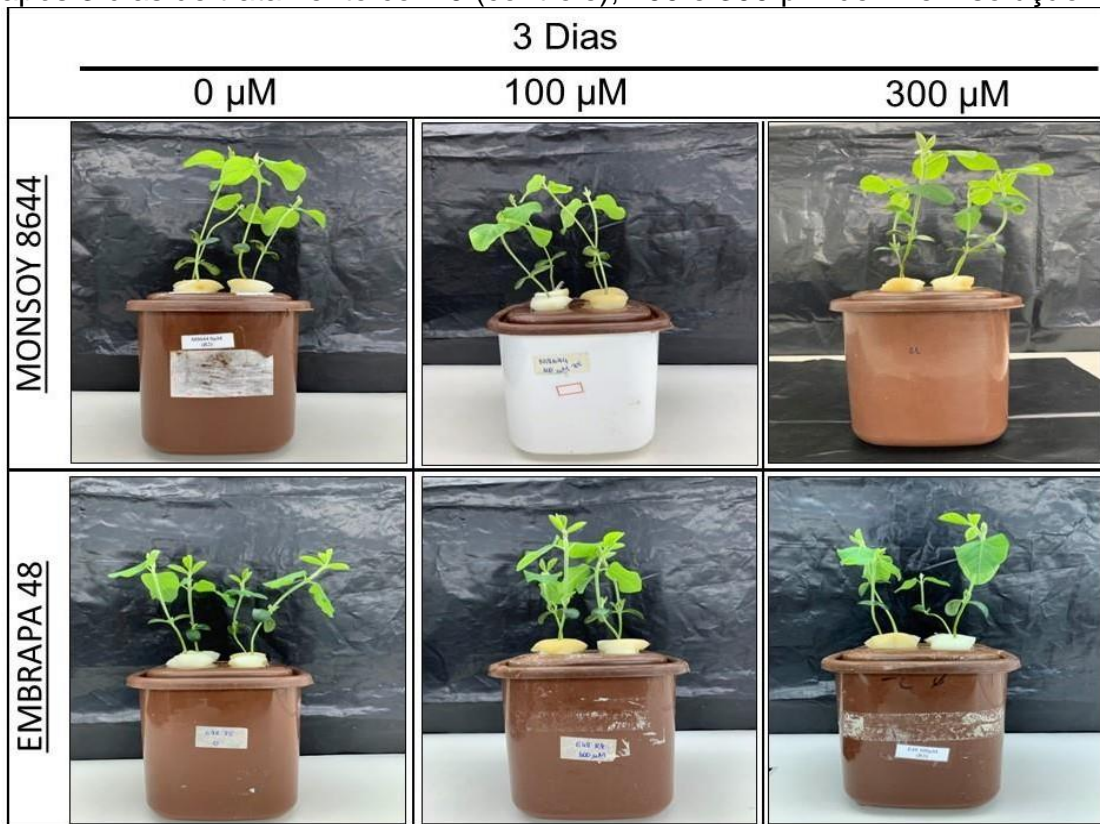
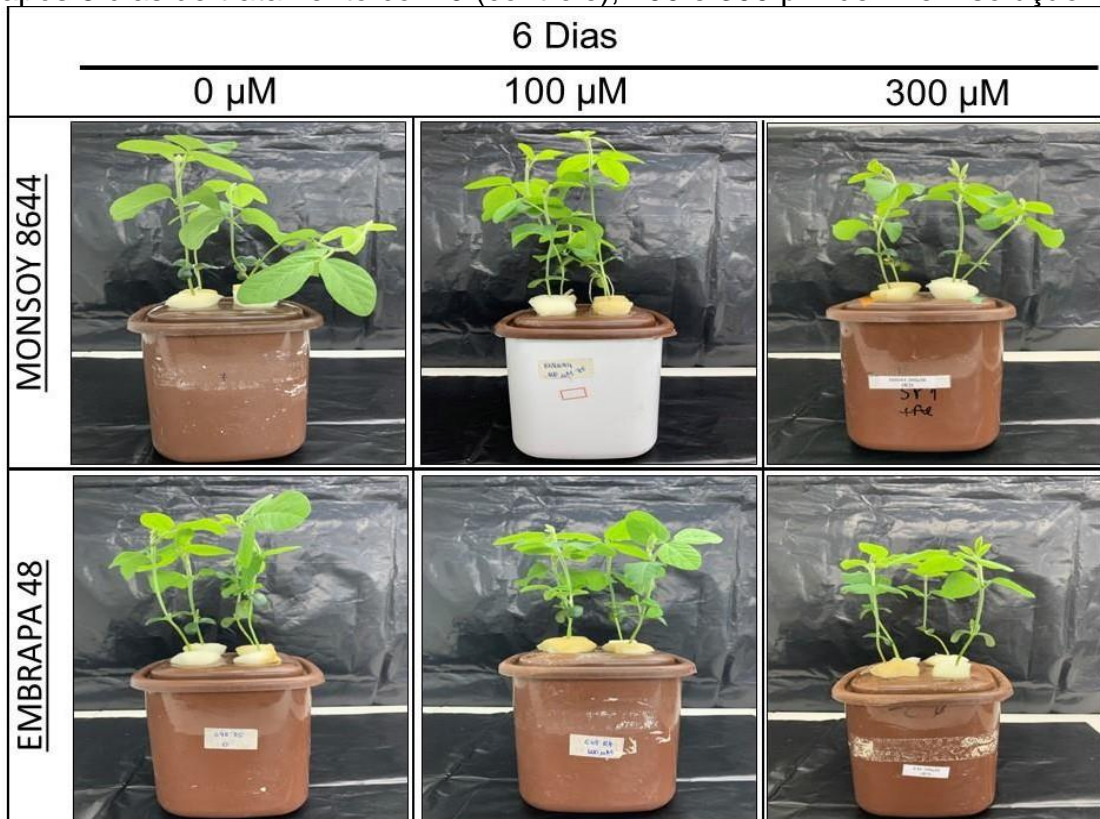


Figura 2 - Plantas de dois cultivares de soja, MONSOY 8644 IPRO e EMBRAPA 48, após 6 dias de tratamento com 0 (controle), 100 e 300 μM de Al em solução nutritiva.



2.2. Parâmetros de crescimento

O comprimento da raiz e da parte aérea foi obtido com auxílio de régua milimétrica após 3 e 6 dias de exposição ao Al. Em seguida, a taxa de crescimento relativo da raiz e da parte aérea foi obtida pela equação: (ÁVILA et al., 2007).

$$R = \frac{\ln W_2 - \ln W_1}{t_2 - t_1}$$

Onde, R = taxa de crescimento relativo; ln = logaritmo neperiano; W_1 = comprimento inicial; W_2 = comprimento final; t_1 = tempo inicial; t_2 = tempo final.

Os dados de área foliar total foram obtidos pela digitalização em scanner e análise pelo ImageJ® Software (BOITO et al., 2013). O sistema radicular foi coletado e armazenado em solução alcoólica a 30% e destinado para digitalização pelo sistema de análise de imagem WinRHIZO® Software, determinando a área da superfície da raiz, diâmetro de raízes e o volume de raízes (LI et al., 2020).

2.3. Fluorescência da clorofila a e trocas gasosas

A fluorescência da clorofila a e as trocas gasosas foram realizadas no primeiro trifólio completamente expandido utilizando o analisador de gases, (IRGA - modelo portátil LI-6400xt, LI-COR Biosciences Inc., Lincoln, Nebraska, USA). As seguintes análises foram determinadas: Taxa Fotossintética Real (A), Condutância estomática (gs) e Índice de Transpiração (E).

Estas medidas foram realizadas em sala de crescimento duas horas após ao acendimento das luzes, com temperatura constante, mantendo a concentração atmosférica de $CO_2 \pm 410$ ppm, umidade relativa 60% e incidência de luz azul de 10% maximizando a abertura estomática.

2.4. Avaliação dos metabólitos primários e secundários

Para a quantificação dos metabólitos primários foram utilizados raízes e trifólios totalmente expandidos de plantas de soja liofilizados. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas e alíquotas de aproximadamente 10 mg de material vegetal liofilizado foi submetido à extração metanólica (LISEC et al., 2006).

Após a extração, foram quantificados na fração solúvel os teores de clorofilas (SULPICE et al., 2009), glicose, frutose e sacarose (FERNIE et al., 2001), ácidos orgânicos malato e fumarato (NUNES-NESI et al., 2007) e compostos fenólicos totais (BIELESKI & TURNER, 1966) e na fração insolúvel os teores de amido (FERNIE et al., 2001) e proteínas (BRADFORD MM, 1976).

2.5. Teor de alumínio

Para quantificação do teor de alumínio amostras de raízes e de trifólio totalmente expandidos foram submetidas a secagem em estufa com ventilação de ar forçado a 70 °C até massa constante. Em seguida, foram maceradas em almofariz e submetido à digestão em solução nitroperclórica (4:1) em bloco digestor com temperatura de 200 °C, o produto da digestão foi analisado em uma espectrometria de emissão óptica de plasma indutivamente acoplado (ICP-OES, PerkinElmer Optima 3000XL, Maryland, USA) (SILVA et al., 2020).

2.6. Histolocalização do alumínio

Cortes radiais em ápices de raízes principais (1 cm da coifa) foram fixados em formaldeído, ácido acético e álcool etílico (FAA 50%), desidratados em etanol e embebidos em resina de metacrilato. Em seguida, cortes de 8 µM de espessura foram obtidos com auxílio de micrótomo rotativo (RM2155, Leica Microsystems, Inc. Deerfield, USA), com os cortes submetidos a reação com o corante Chrome azurol S 0,5% (KUKACHKA & MILLER, 1980). As fotos foram obtidas por microscópio de luz (AX70TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) equipado com um sistema de captura de imagem (Axio Vision Release 4.8.1, Carl Zeiss Vision, Alemanha).

2.7. Micromorfologia e microanálise do alumínio em ápices de raízes

Ápices de raízes principais foram coletados e fixados em 2,5% (v/v) de glutaraldeído preparado em 0,05 M de tampão cacodilato (pH 7,2) durante 2 horas em temperatura ambiente, seguida de desidratação em serie etílica (30-100%) durante 10 min/série, seco com CO₂ líquido em secador de ponto crítico (Baltec modelo CPD 030, Liechtenstein). As amostras foram revestidas no evaporador de carbono (Quorum Technologies modelo Q150T, Ashford, Kent, UK) para localização

de alumínio usando espectrometria de raios-X dispersiva de energia (EDS), enquanto para microscopia eletrônica de varredura (MEV) as amostras foram cobertas com ouro em *sputter* (FDU 010, Balzers, Liechtenstein). Realizou-se análises fotográficas com auxílio de microscópio eletrônico de varredura LEO 1430VP (Cambridge, Inglaterra) com uma tensão acelerada de 20 kV acoplados ao IXRF Iridium Ultra Eds.

2.8. Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi estimada pela concentração de malondialdeído (MDA) produzida após a reação com ácido tiobarbitúrico (TBA) (Cakmak e Horst 1991). Cerca de 35 mg de material vegetal liofilizado (raízes ou primeiro trifólio totalmente expandido) foram homogeneizados em 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 1% (p / v) e centrifugados a 12.000 g por 15 min a 4 ° C. Alíquotas de 0,5 mL de sobrenadante foram adicionadas a 1,5 mL de uma solução de 0,5% (p / v) de TBA em 10% de TCA e incubadas em banho-maria a 95 ° C. Após 30 min a absorvância da amostra foi determinada a 532 e 600 nm. A concentração do complexo MDA-TBA foi estimada usando o coeficiente de absorvância molar de 155 mM⁻¹ cm⁻¹.

2.9. Quantificação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Para a determinação da concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 35 mg de material vegetal liofilizado (raízes ou primeiro trifólio totalmente expandido) foram homogeneizados em meio de extração constituído de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% e polivinilpolipirrolidona (PVPP), e centrifugados a 12.000 g, por 15 minutos a 4 °C. Alíquotas do sobrenadante foram adicionadas em 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).

2.10. Atividade enzimática

Para determinar as atividades enzimáticas, cerca de 35 mg amostras liofilizadas de raízes e de trifólio totalmente expandidos foram homogeneizadas nos seguintes meios: tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetanossulfonilfluoreto 1 mM (PMSF) e 1% (w / v) polivinilpolipirrolidona (PVPP) para as enzimas superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1), catalase (CAT; EC 1.11.1.6), peroxidase total (POX; EC 1.11.1.7) e ascorbato peroxidase (APX; EC 1.11.1.11) (Ribeiro et al. 2012). Após filtração, os homogenatos foram centrifugados a 12.000 g por 15 min a 4 ° C, e os sobrenadantes foram utilizados como fonte de enzima.

As atividades enzimáticas foram determinadas pela adição de extrato enzimático bruto ao meio de reação que consiste em: tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H₂O₂ 12,5 mM para CAT; Tampão de fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e peróxido de hidrogênio 20 mM para POX; Tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, ascorbato 0,8 mM e peróxido de hidrogênio 1 mM para APX. As atividades enzimáticas foram estimadas medindo-se a variação da absorbância no primeiro minuto da reação, a 30°C. As atividades enzimáticas foram estimadas usando os seguintes coeficientes de extinção molar (240 nm, $\epsilon = 36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); POX (420 nm; $\epsilon = 2.47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); APX (290 nm, $\epsilon = 2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

A atividade SOD foi determinada pela adição de 20 μL de extrato enzimático bruto a um meio de reação constituído de tampão de fosfato de sódio 100 mM, pH 7,8, metionina 50 mM, cloreto de nitro azul de tetrazólio 1 mM (NBT), EDTA 5 mM e riboflavina 100 μM . A reação foi conduzida a 25 ° C em uma câmara de reação sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W. Após 5 min de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e o formazana azul produzido por fotorredução de NBT foi medido a 560 nm (Giannopolitis e Ries 1977). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a fotorredução de NBT em 50%. O teor de proteína dos extratos enzimáticos foi determinado pelo método de Bradford et al. (1951) usando Albumina de Soro Bovina (BSA) como padrão.

2.11. Análise Estatística

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial triplo (2x3x2), o fator “A” constou de dois cultivares (EMBRAPA 48 e MONSOY 8644), fator “B” as três concentrações de Al (0, 100 e 300 μM de AlCl₃) e em “C” os

períodos de exposição (3 e 6 dias), onde a unidade experimental constou de quatro plantas por vaso com cinco repetições, totalizando 20 plantas de cada genótipo.

. Os dados coletados foram submetidos a análise variância (ANOVA) pelo Software SISVAR®, e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade.

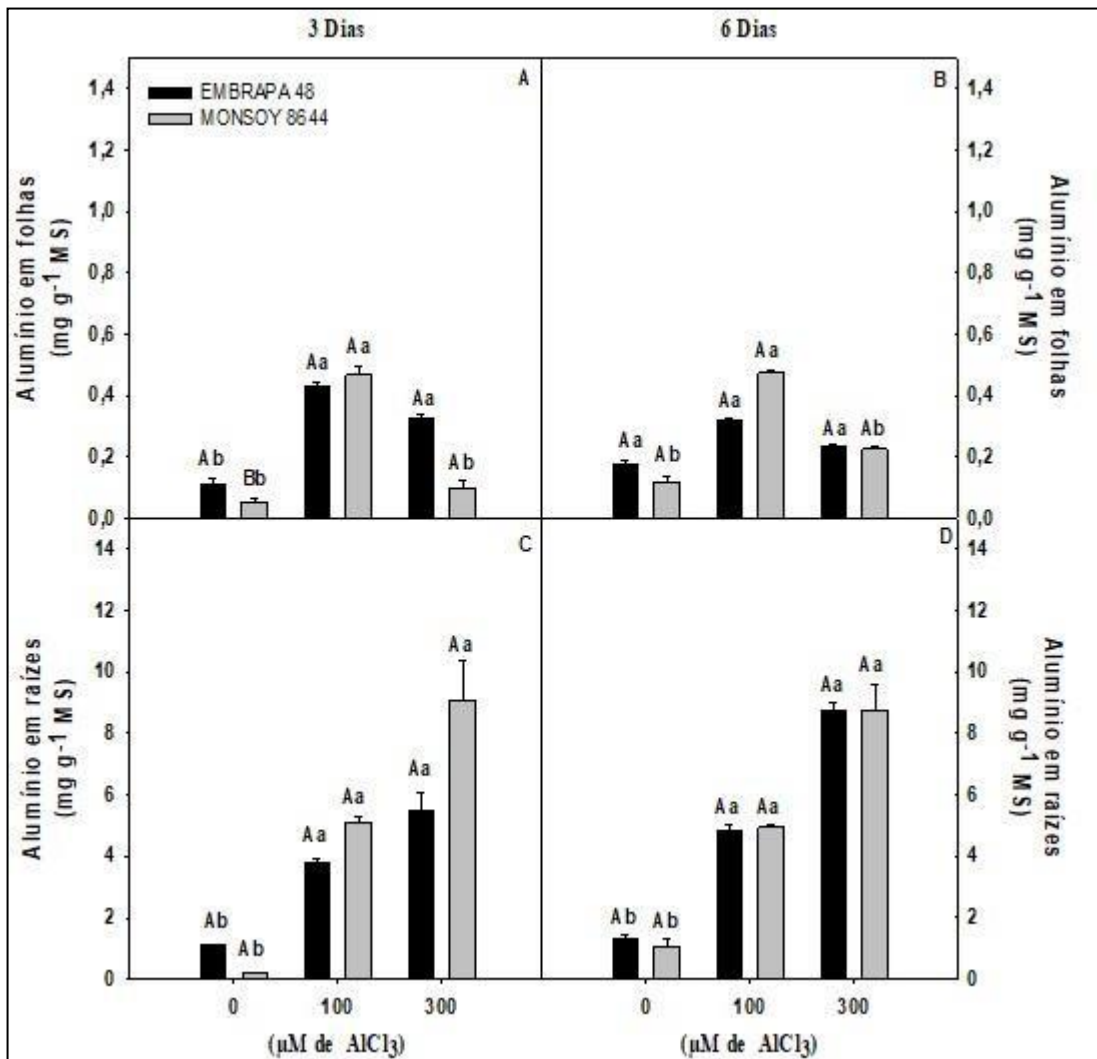
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Teor de alumínio

Para o teor de Al em ambos cultivares foi observado maior acúmulo desse metal nas raízes do que nas folhas. O teor de Al em folhas (Figura 3 A, B) aumentou aos 3 dias no cultivar EMBRAPA 48 após exposição a ambas as concentrações de Al. Já no cultivar MONSOY 8644 houve aumento apenas na concentração de 100 μM de Al. Já aos 6 dias, o teor de Al aumentou apenas nas folhas do cultivar MONSOY 8644 após tratamento com Al.

O teor de Al em raízes (Figura 3 C, D) apresentou resposta semelhante entre os cultivares, doses e dias de avaliação, sendo observado maior acúmulo em plantas submetidas a maior dosagem de Al.

Figura 3 – Teor de alumínio em folhas e teor de alumínio em raízes de dois cultivares soja, EMBRAPA 48 e MONSOY 8644 IPRO, após 3 e 6 dias de tratamento. com 0 (controle), 100 e 300 μM de Al em solução nutritiva.



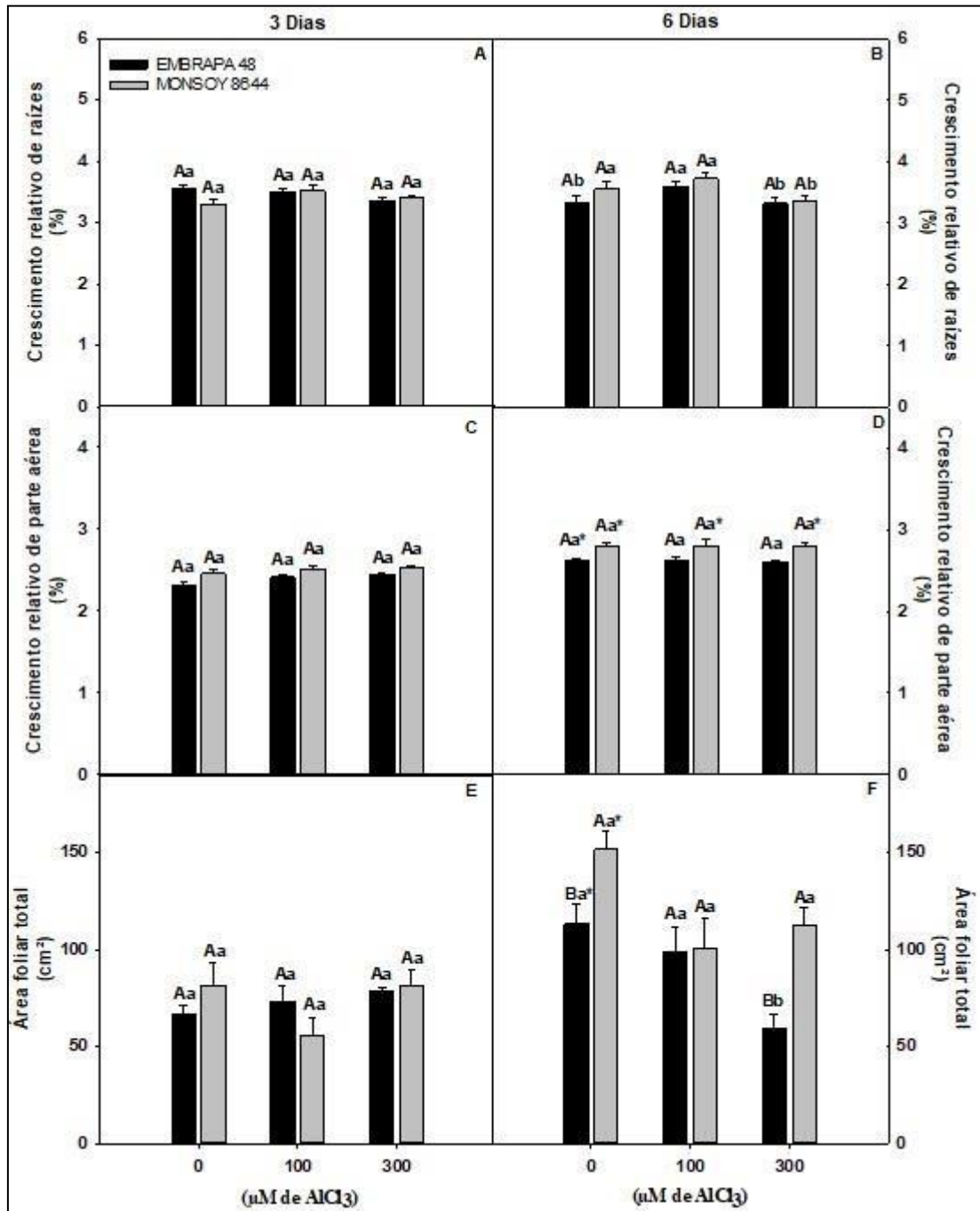
As barras representam o erro padrão entre as réplicas. As letras maiúsculas denotam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as cultivares, as minúsculas denotam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as doses de exposição e asterisco denotam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os tempos de exposição segundo teste Scott Knott.

3.2. Taxa de crescimento relativo de raízes e parte aérea e área foliar total

A taxa de crescimento relativo das raízes (Figura 4 A, B) e a taxa de crescimento relativo da parte aérea (Figura 4 C, D) não foram influenciadas pelo Al, exceto aos 6 dias a 300 μM no qual houve atraso no crescimento das raízes em ambos cultivares, com taxa de 3,3% para EMBRAPA 48 e de 3,6% para MONSOY 8644. Adicionalmente, foi observado acréscimo na taxa de crescimento da parte aérea entre os tempos para MONSOY 8644 (todas as concentrações) e EMBRAPA 48 (apenas no controle).

Não houve variação na taxa foliar total no terceiro dia de tratamento com Al em nenhuma cultivar (Figura 4 E). Contudo, no sexto dia foi observado redução na área foliar total apenas no cultivar EMBRAPA 48 após tratamento com 300 μM de Al (Figura 4 F). Adicionalmente, aos 6 dias o cultivar MONSOY 8644 apresentou maior área foliar nos tratamentos controle e após 300 μM de Al.

Figura 4 - Crescimento relativo de raízes (A, B), Crescimento relativo de Parte Aérea (C, D) e Área Foliar Total (E, F) de dois cultivares soja, EMBRAPA 48 e MONSOY 8644 IPRO, após 3 e 6 dias de tratamento com 0, 100 e 300 μM de Al em solução nutritiva.



As barras representam o erro padrão entre as réplicas. As letras maiúsculas denotam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as cultivares, as minúsculas denotam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as doses de exposição e asterisco denotam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os tempos de exposição segundo teste Scott Knott.

3.3. Área, diâmetro e volume de raízes

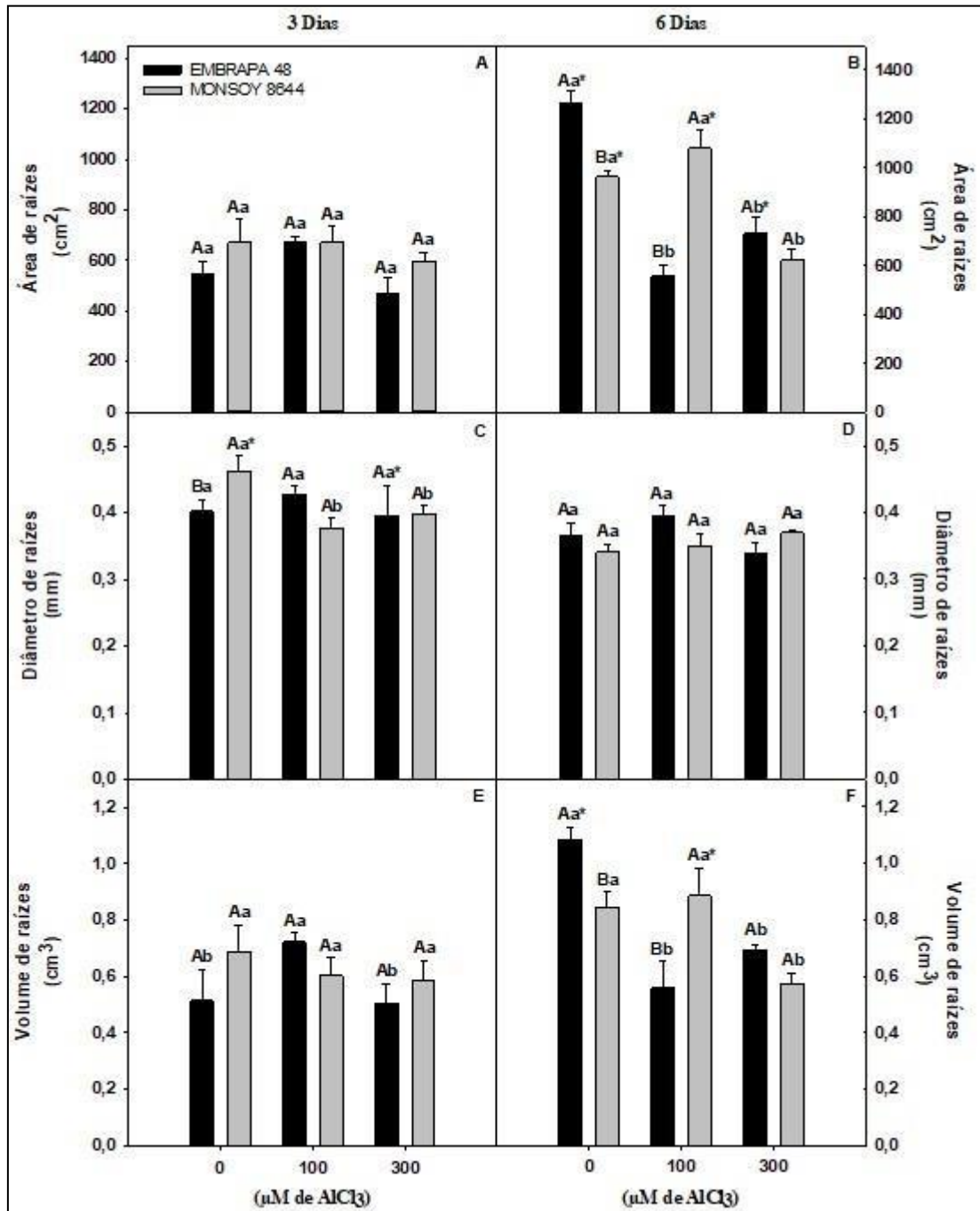
Apenas aos 6 dias houve variação na área de raízes após exposição ao Al (Figura 5 A, B). No cultivar EMBRAPA 48, houve redução na área radicular após tratamento com Al reduzindo 56 e 42,3% após 100 e 300 μM de Al. Já no cultivar MONSOY 8644 a redução ocorreu após 300 μM de Al. No controle aos 6 dias, a

aérea radicular do cultivar EMBRAPA 48 foi maior que MONSOY 8644, resultado que foi invertido no tratamento com 100 μM de Al.

Para o diâmetro de raízes (Figura 5 C, D) houve decréscimo em MONSOY 8644 no terceiro dia após a presença de Al. Para o dia 6, não houve variação nesse parâmetro.

Para o volume de raízes (Figura 5 E, F) aos 3 dias houve variação apenas para EMBRAPA 48 com maior valor para o tratamento com 100 μM de Al. Aos 6 dias, ambos cultivares reduziram esse parâmetro após tratamento com Al, EMBRAPA 48 em ambas concentrações de Al e MONSOY 8644 apenas na concentração de 300 μM . No controle aos 6 dias, o volume radicular de EMBRAPA 48 foi maior que em MONSOY 8644, resultado que foi invertido no tratamento com 100 μM de Al.

Figura 5 - Área de Raízes (A, B), Diâmetro de Raízes (C, D) e Volume de Raízes (E, F), de dois cultivares soja, EMBRAPA 48 e MONSOY 8644 IPRO, após 3 e 6 dias de tratamento com 0, 100 e 300 μM de Al em solução nutritiva.



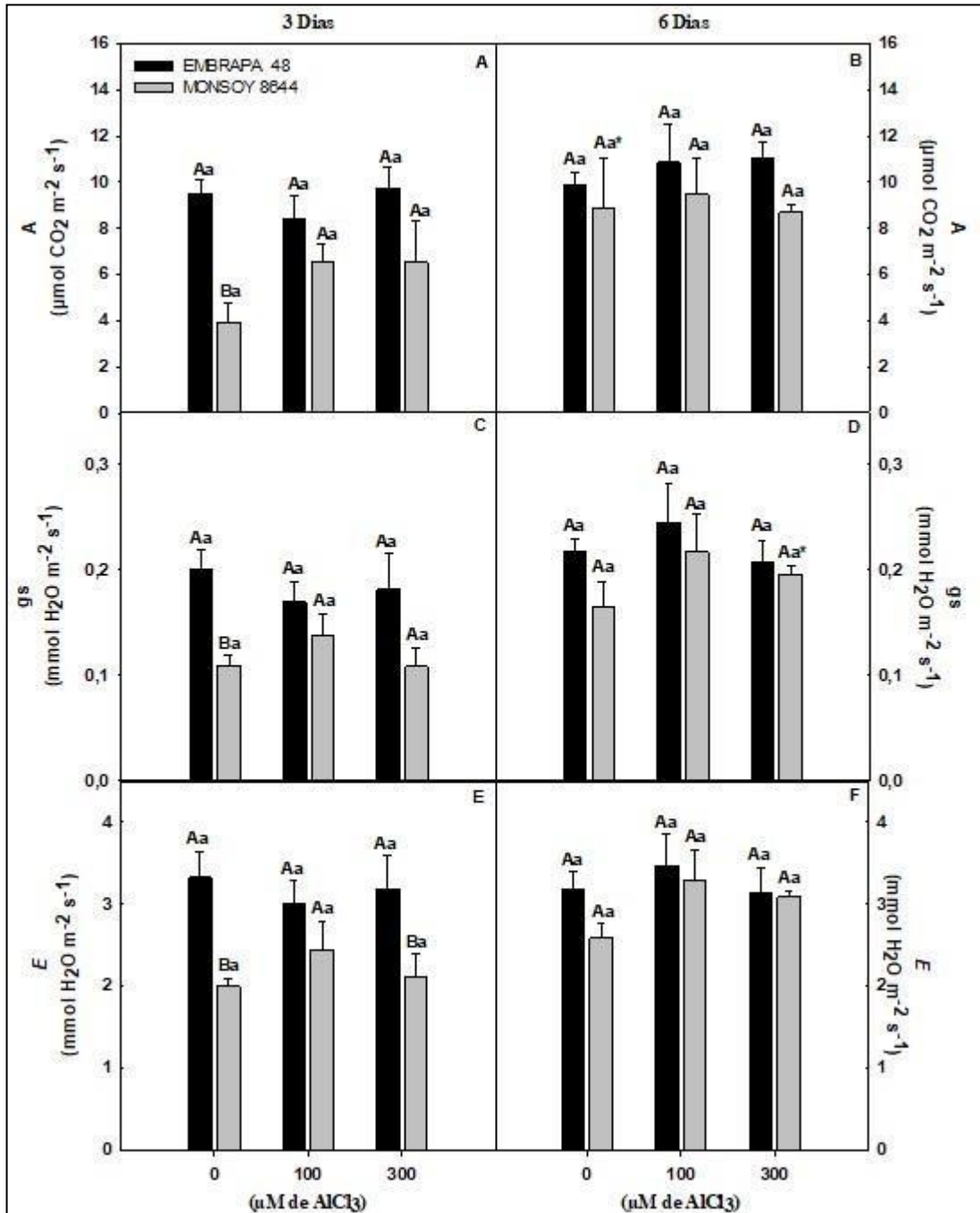
As barras representam o erro padrão entre as réplicas. As letras maiúsculas denotam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as cultivares, as minúsculas denotam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as doses de exposição e asterisco denotam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os tempos de exposição segundo teste Scott Knott.

3.4. Taxa fotossintética real, condutância estomática e transpiração

Para o cultivar EMBRAPA 48, a presença de Al não alterou os parâmetros de A taxa fotossintética real (A) (Figura 6 A, B), condutância estomática (g_s) (Figura 6 C, D) e o índice de transpiração (E) (Figura 6 E, F). Entretanto, após 3 dias de

tratamento com Al o cultivar MONSOY 8644 apresentou incrementos na atividade fotossintética, na g_s e no E , esse último apenas na concentração de 100 μM .

Figura 6 - Taxa Fotossintética Real (A, B), Condutância Estomática (C, D) e Índice de Transpiração (E, F), de dois cultivares soja, EMBRAPA 48 e MONSOY 8644 IPRO, após 3 e 6 dias de tratamento com 0, 100 e 300 μM de Al em solução nutritiva. As barras representam o erro padrão entre as réplicas. As letras maiúsculas denotam diferenças

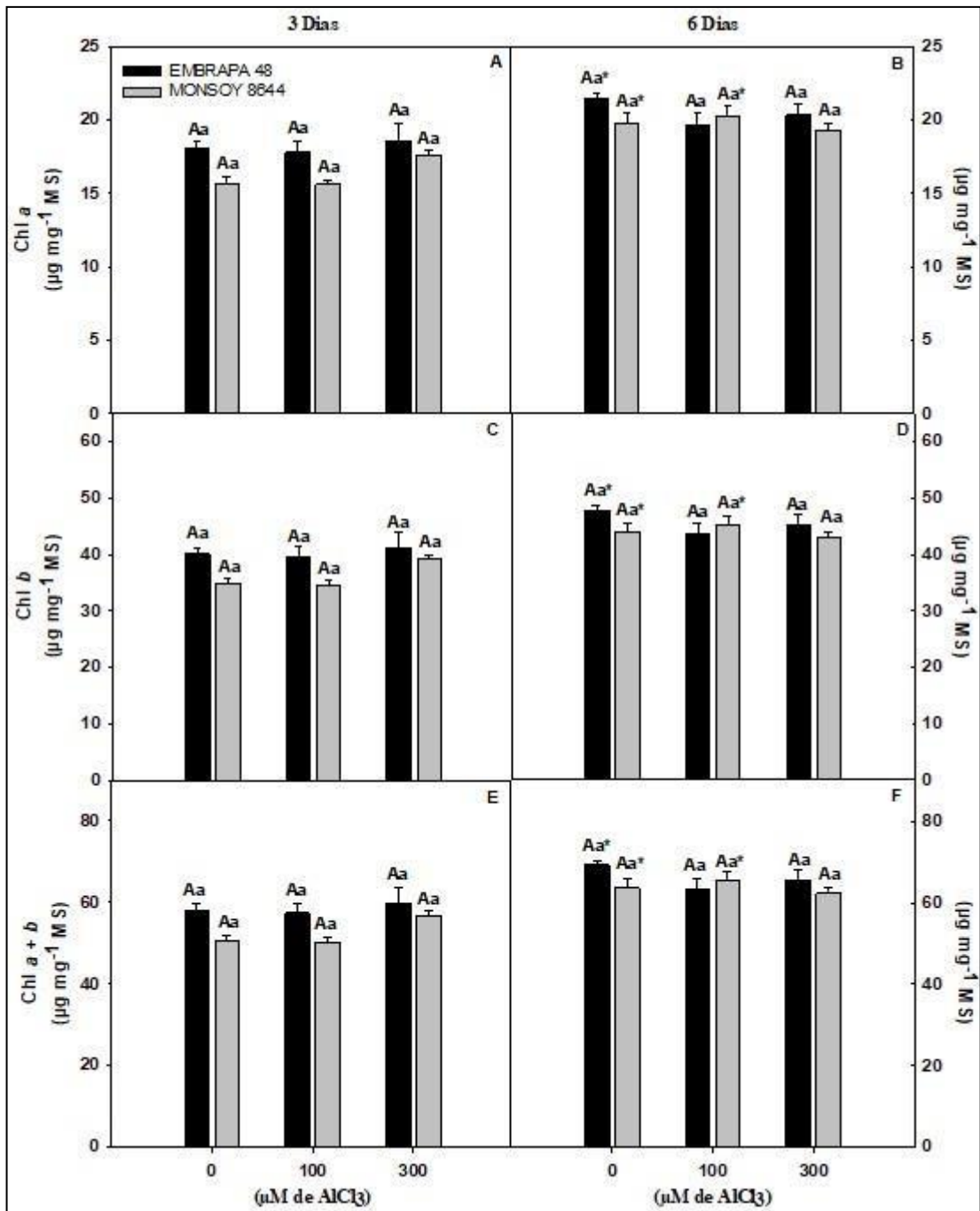


significativas ($p \leq 0,05$) entre as cultivares, as minúsculas denotam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as doses de exposição e asterisco denotam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os tempos de exposição segundo teste Scott Knott.

3.5. Clorofilas

Os teores de clorofila *a* (Figura 7 A, B) e clorofila *b* (Figura 7 C, D) e clorofila total (Figura 7 E, F) não variaram entre os cultivares e entre as concentrações de Al. Contudo, entre os tempos o cultivar MONSOY 8644 apresentou maiores teores desses pigmentos no tempo de 6 dias nos tratamentos controle e 100 μM de Al, e o cultivar EMBRAPA apenas no tratamento controle.

Figura 7 - Clorofila *a* (A, B), Clorofila *b* (C, D) e Clorofila total (E, F), de dois cultivares soja, EMBRAPA 48 e MONSOY 8644 IPRO, após 3 e 6 dias de tratamento com 0, 100 e 300 μM de Al em solução nutritiva.



As barras representam o erro padrão entre as réplicas. As letras maiúsculas denotam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as cultivares, as minúsculas denotam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as doses de exposição e asterisco denotam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os tempos de exposição segundo teste Scott Knott.

3.6. Açúcares totais e amido em folhas

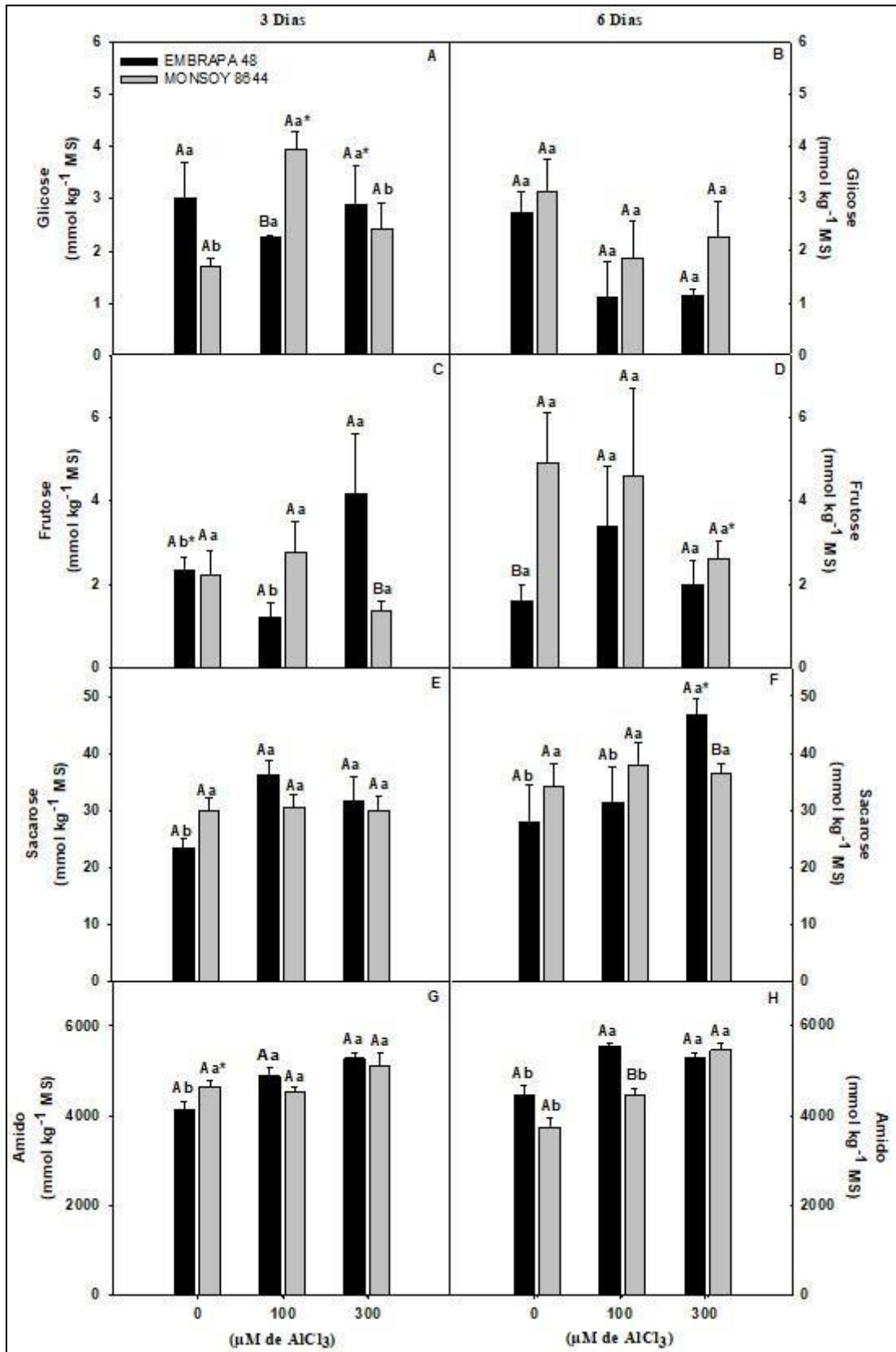
Para quantificação de açúcares redutores em folhas (Figura 8 A, B) foi observado maior síntese de glicose em plantas MONSOY 8644 quando submetidas a dosagem de 100 μM de Al no terceiro dia, obtendo valores maiores que o cultivar EMBRAPA para esse tempo e valores maior que o obtido para o tempo 6 na mesma cultivar. Já no sexto dia não houve variação nesse parâmetro.

Para a síntese de frutose (Figura 8 C, D) foi observado maior produção em plantas EMBRAPA 48 submetidas a dose de 300 μM , com valores superiores ao do cultivar MONSOY 8644. Aos 6 dias, o cultivar EMBRAPA também apresentou maiores valores de frutose após tratamento com Al. Contudo, aos 6 dias, o teor de frutose foi maior no tratamento controle para o cultivar MONSOY.

O conteúdo de sacarose em folhas (Figura 8 E, F) aumentou em EMBRAPA 48 no dia três após 100 e 300 μM , e no dia 6 após 300 μM de Al, sendo esse último tratamento obtendo os maiores teores de sacarose.

O teor de amido (Figura 8 G, H) aumentou em plantas EMBRAPA 48 com a presença de Al em ambos os dias avaliados. Já em MONSOY o aumento ocorreu apenas após 6 dias de tratamento com 300 μM de Al. E entre os cultivares, maiores de valores de amido foram obtidos para EMBRAPA aos 6 dias de tratamento com 100 μM de Al.

Figura 8 - Glicose (A, B), Frutose (C, D), Sacarose (E, F) e Amido (G, H) em folhas de dois cultivares soja, EMBRAPA 48 e MONSOY 8644 IPRO, após 3 e 6 dias de tratamento com 0, 100 e 300 μM de Al em solução nutritiva.



As barras representam o erro padrão entre as réplicas. As letras maiúsculas denotam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as cultivares, as minúsculas denotam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as doses de exposição e asterisco denotam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os tempos de exposição segundo teste Scott Knott.

3.7. Açúcares totais e amido em raízes

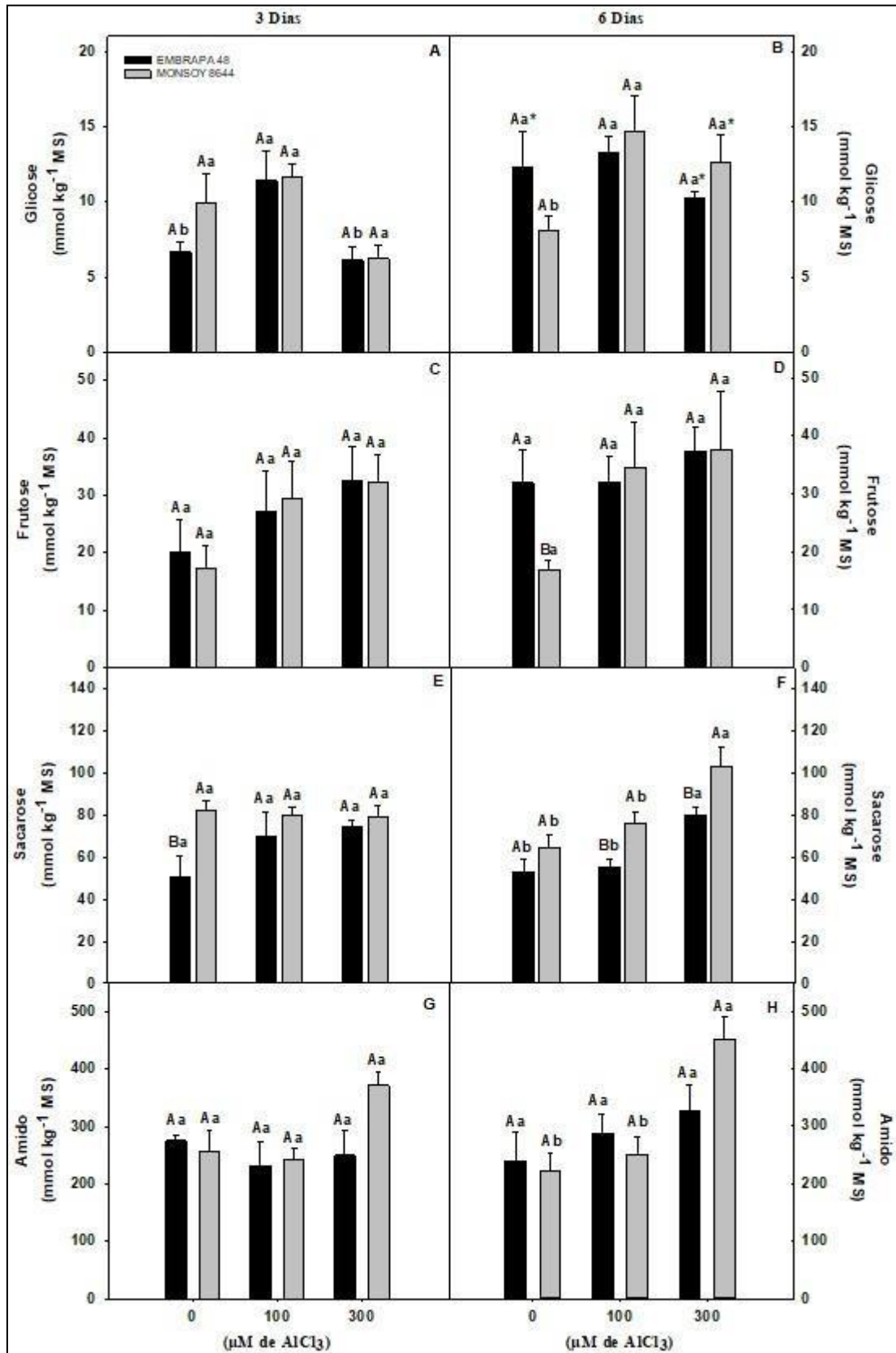
A presença de açúcares totais foram substancialmente maiores em raízes quando comparados com as folhas. Na quantificação de açúcares redutores em raízes, houve aumento na síntese de glicose (Figura 9 A, B) em plantas EMBRAPA 48 com 3 dias de tratamento a 100 μM de Al, e em MONSOY 8644 com 6 dias de tratamento em ambas concentrações de Al. Entre os tempos, o teor de glicose foi maior nas raízes de EMBRAPA 48 nos tratamentos controle e Al 300 μM .

Para frutose (Figura 9 C, D) não houve efeito do tempo e nem da concentração de Al. Contudo, aos 6 dias no tratamento controle, o teor de frutose foi maior nas raízes do cultivar EMBRAPA 48.

Para o teor de sacarose (Figura 9 E, F) não houve efeito do Al sobre a concentração desse carboidrato para o tempo de 3 dias, apenas o teor de sacarose foi maior no cultivar MONSOY 8644 no tratamento controle. Por outro lado, o teor de sacarose aumentou após 6 dias de tratamento com 300 μM de Al em ambos os cultivares, sendo os valores maiores no cultivar MONSOY 8644 após 100 e 300 μM de Al.

Para amido em raízes (Figura 9 G, H) não houve diferença no dia três de avaliação. Para o dia seis foi observado que plantas MONSOY 8644 com 300 μM de Al apresentou maior conteúdo de amido.

Figura 9 - Glicose (A, B), Frutose (C, D), Sacarose (E, F) e Amido (G, H) em raízes de dois cultivares soja, EMBRAPA 48 e MONSOY 8644 IPRO, após 3 e 6 dias de tratamento com 0, 100 e 300 μM de Al em solução nutritiva.



As barras representam o erro padrão entre as réplicas. As letras maiúsculas denotam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as cultivares, as minúsculas denotam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as doses de exposição e asterisco denotam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os tempos de exposição segundo teste Scott Knott.

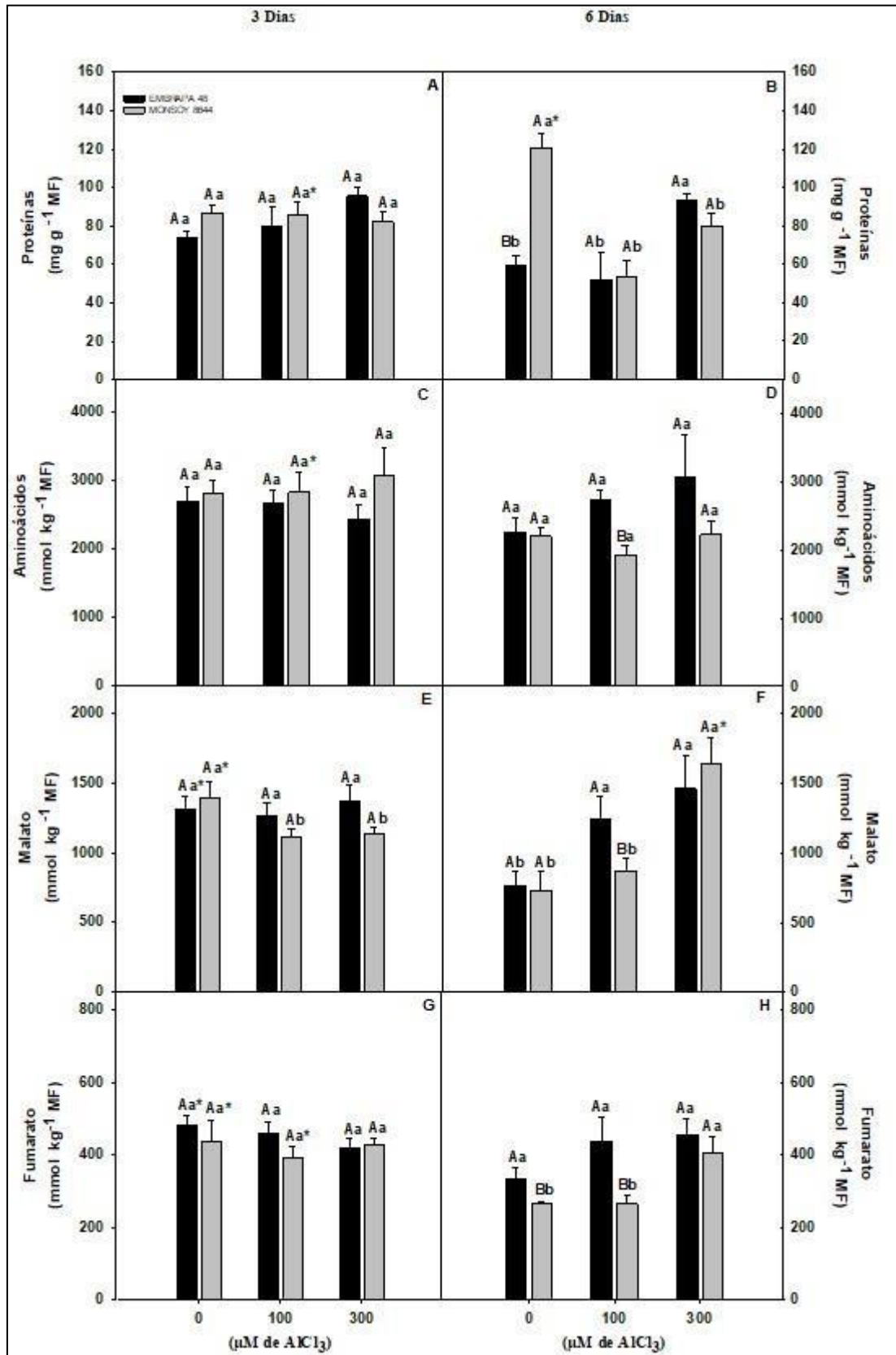
3.8. Proteínas, aminoácidos e ácidos orgânicos em folhas

Para a quantificação de proteínas em folhas (Figura 10 A, B) não houve variação para o tempo de 3 dias. Para 6 dias, o teor de proteína aumentou em folhas de EMBRAPA 48 na concentração de 300 μM de Al. Por outro lado, o teor de proteínas reduziu em folhas de MONSOY 8644 após 6 dias de tratamento com Al, contudo, no controle o teor de proteínas foi maior na MONSOY 8644 em comparação a EMBRAPA 8644.

O conteúdo de aminoácidos em folhas (Figura 10 C, D) não foi influenciado pela presença de Al, apenas o cultivar EMBRAPA 48 apresentou maior teor que o MONSOY 8644 no sexto dia após presença de Al.

Na quantificação de ácidos orgânicos, malato (Figura 10 E, F) e fumarato (Figura 10 G, H) apresentaram comportamento similar em folhas de ambas os cultivares. O teor desses metabolitos foi superior em plantas sem a presença de Al no dia 3. Por outro lado, a presença de Al reduziu o teor de malato no cultivar MONSOY 8644 após 3 dias de tratamento. Já no sexto dia, a presença de Al aumentou o teor de malato na EMBRAPA 48 após 100 e 300 μM de Al. Já na cultivar MONSOY 8644 após 300 μM de Al por 6 dias houve aumento de malato e fumarato.

Figura 10 - Proteínas (A, B), Aminoácidos (C, D), Malato (E, F) e Fumarato (G, H) em folhas de dois cultivares soja, EMBRAPA 48 e MONSOY 8644 IPRO, após 3 e 6 dias de tratamento com 0, 100 e 300 μM de Al em solução nutritiva.



As barras representam o erro padrão entre as réplicas. As letras maiúsculas denotam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as cultivares, as minúsculas denotam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as doses de exposição e asterisco denotam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os tempos de exposição segundo teste Scott Knott.

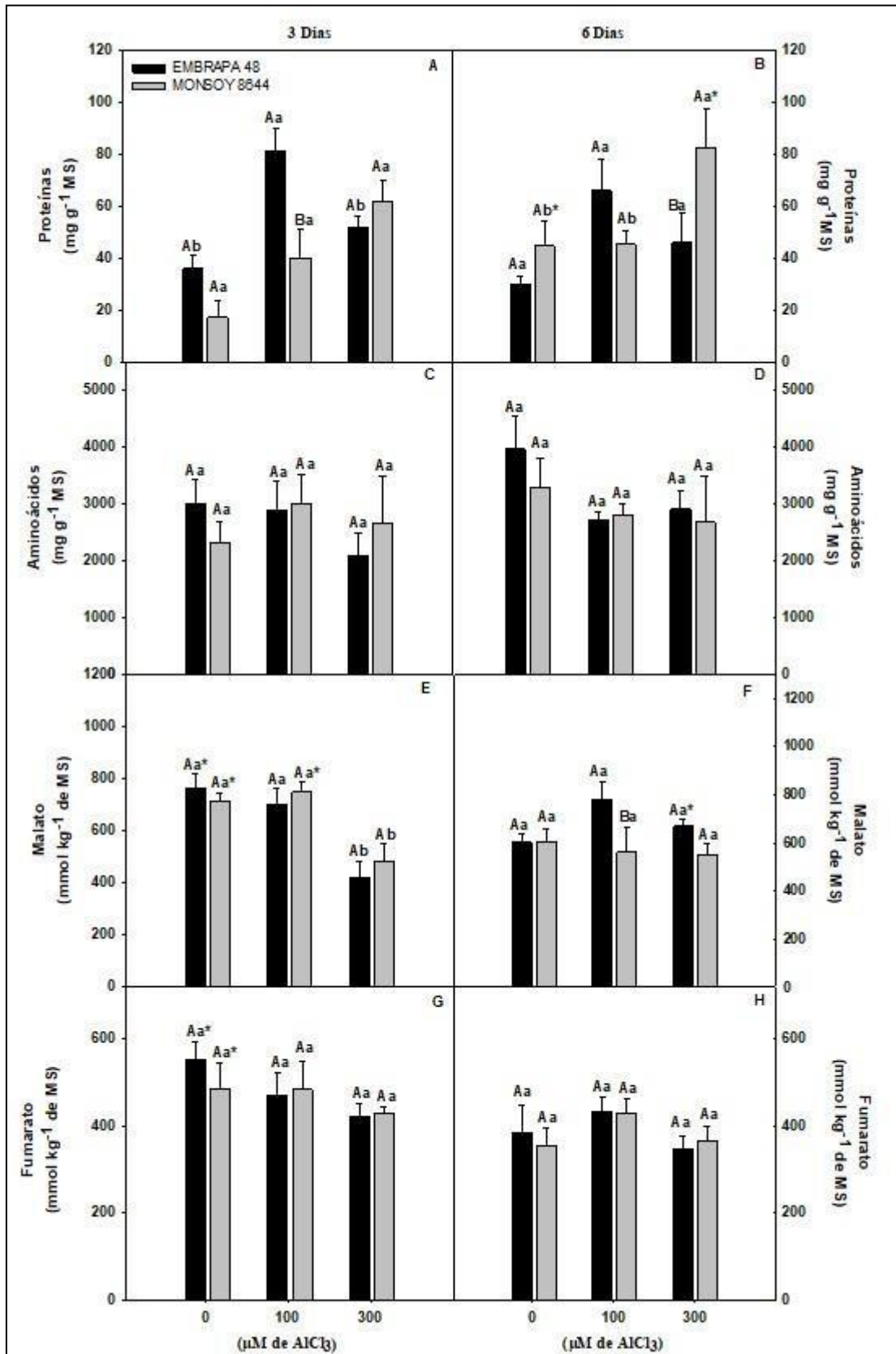
3.9. Proteínas, aminoácidos e ácidos orgânicos em raízes

Para proteínas em raízes (Figura 11 A, B) no dia três de avaliação houve maior conteúdo para EMBRAPA 48 submetidas a 100 μM de Al, resultado em valores maiores que no cultivar MONSOY 8644. Já no sexto dia, o aumento no teor de proteínas ocorreu no cultivar MONSOY 8644 após 300 μM de Al, o que resultou em valores maiores que no cultivar EMBRAPA 48.

Para o teor de aminoácidos, não houve variação após os tratamentos (Figura 11 C, D). Para ácidos orgânicos em raízes, foram observados menores teores de malato (Figura 11 E, F) aos três dias em ambos os cultivares quando submetidas a dosagem de 300 μM de Al. No sexto dia, não houve efeito do tratamento, contudo o conteúdo de malato foi maior na EMBRAPA 48 em relação a MONSOY 8644 na concentração de 100 μM de Al.

Para o teor de fumarato, não houve variação após os tratamentos, sendo os maiores valores obtidos nos tratamentos controles aos 3 dias (Figura 11 G, H).

Figura 11 - Proteínas (A, B), Aminoácidos (C, D), Malato (E, F) e Fumarato (G, H) em raízes, de dois cultivares soja, EMBRAPA 48 e MONSOY 8644 IPRO, após 3 e 6 dias de tratamento com 0, 100 e 300 μM de Al em solução nutritiva.



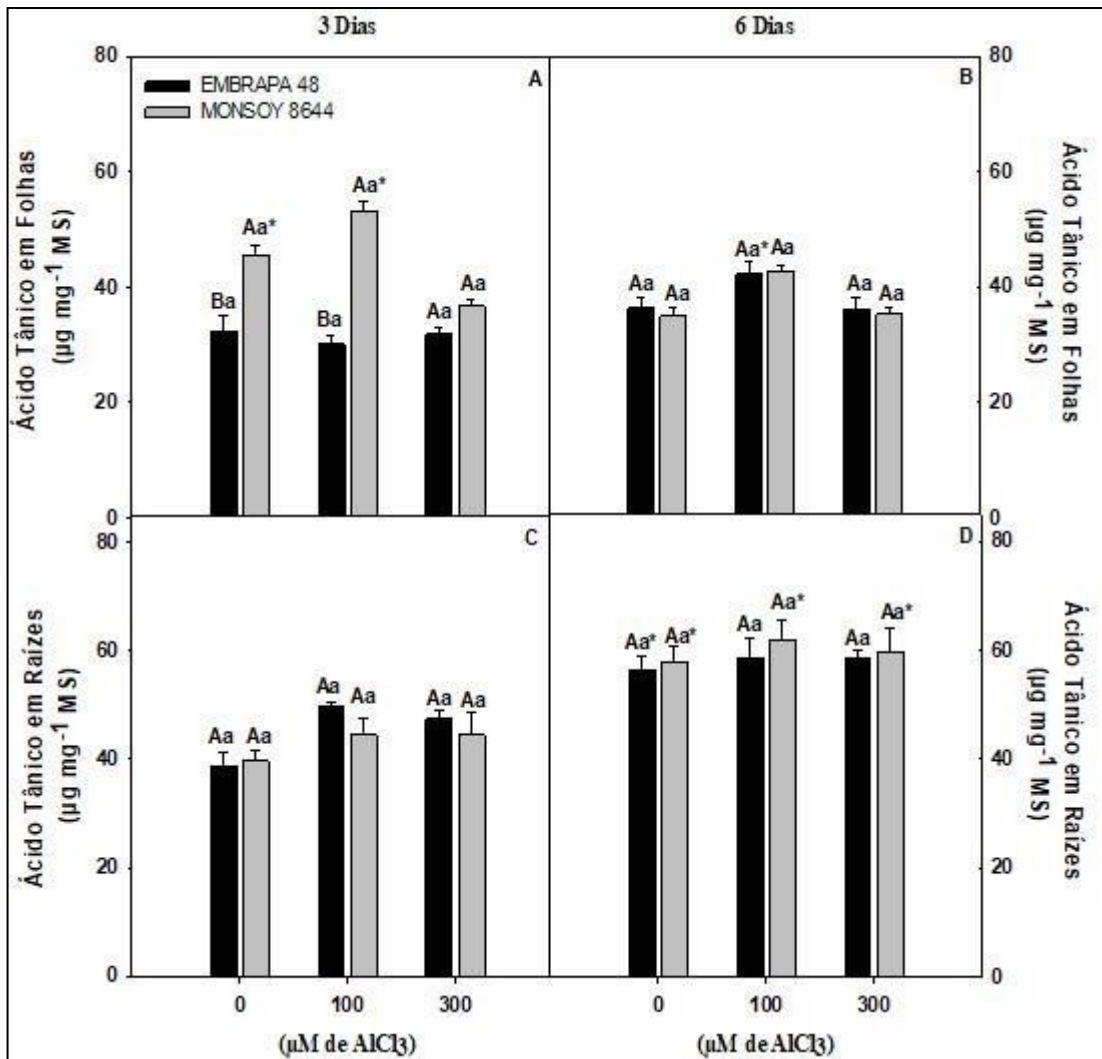
As barras representam o erro padrão entre as réplicas. As letras maiúsculas denotam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as cultivares, as minúsculas denotam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as doses de exposição e asterisco denotam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os tempos de exposição segundo teste Scott Knott.

3.10. Compostos fenólicos totais

Para quantificação de compostos fenólicos totais em folhas (Figura 12 A, B) houve maior teor em plantas MONSOY 8644 em comparação a EMBRAPA 48 no tratamento controle após exposição a 100 μM de Al por três dias. Aos 6 dias, não houve variação.

O conteúdo de compostos fenólicos totais em raízes (Figura 12 C, D) apresentou diferença no acúmulo em todos os tratamentos com aumento do tempo de cultivo para MONSOY 8644.

Figura 12 - Compostos fenólicos totais em folhas (A, B) e Compostos fenólicos totais em raízes (C, D) de dois cultivares soja, EMBRAPA 48 e MONSOY 8644 IPRO, após 3 e 6 dias de tratamento com 0, 100 e 300 μM de Al em solução nutritiva.

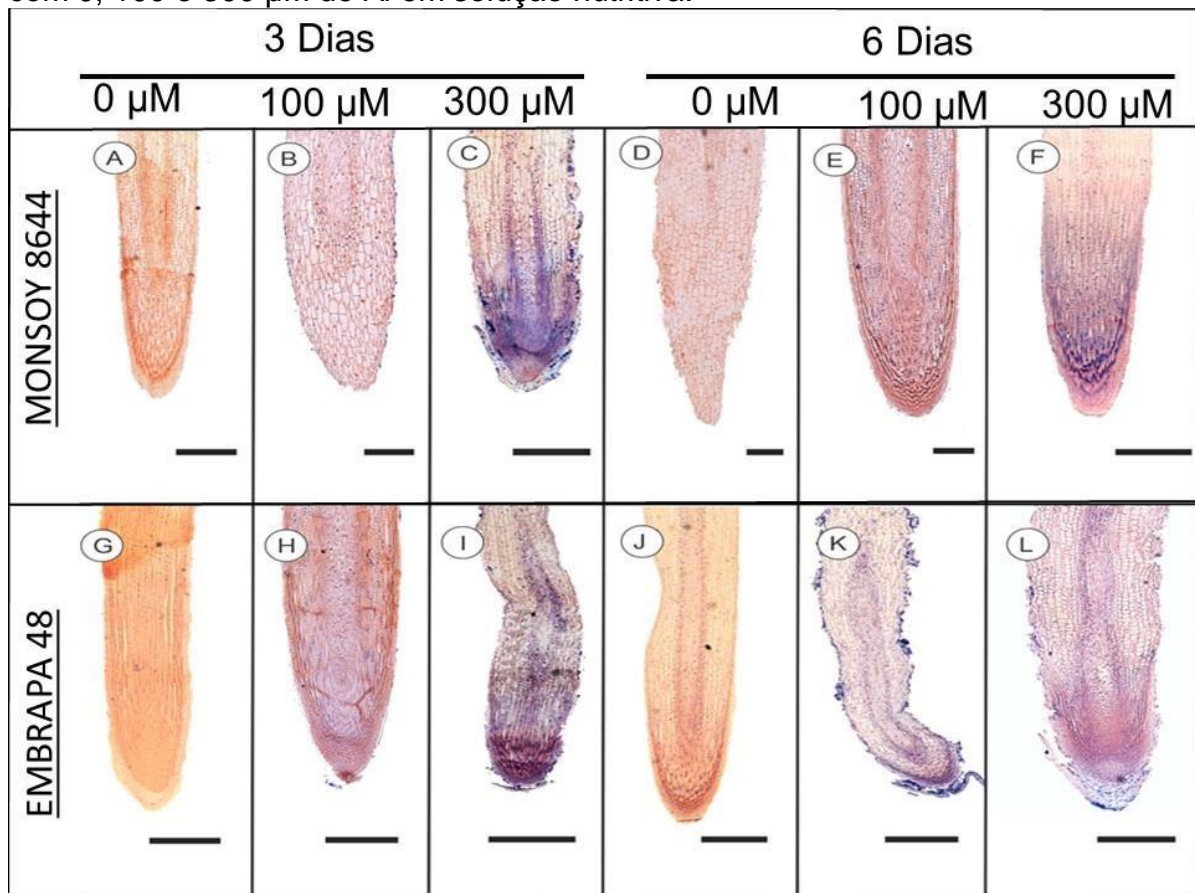


As barras representam o erro padrão entre as réplicas. As letras maiúsculas denotam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as cultivares, as minúsculas denotam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as doses de exposição e asterisco denotam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os tempos de exposição segundo teste Scott Knott.

3.11. Histolocalização, micromorfologia e microanálise de alumínio em ápices de raízes

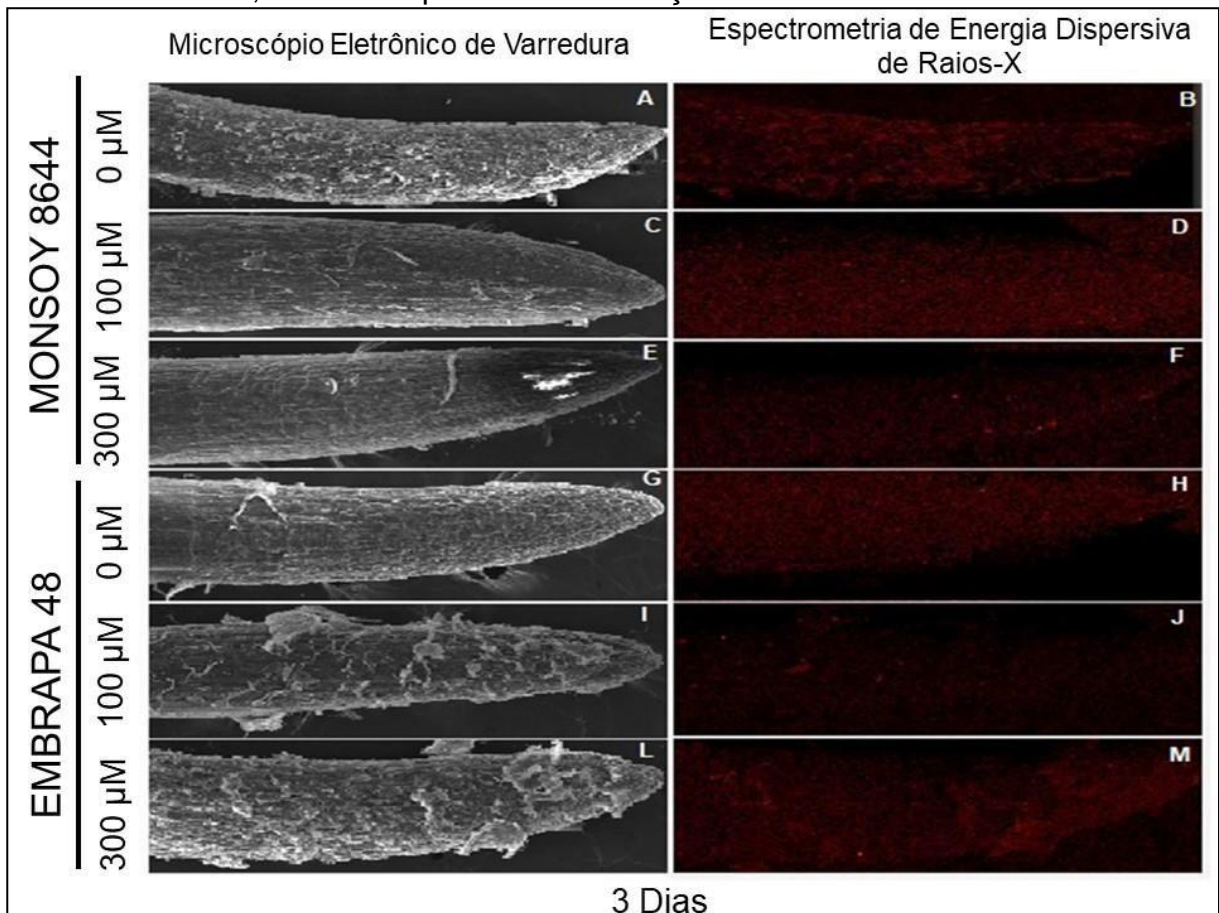
Os locais de acúmulo de Al foram identificados com reação positiva para chrome azurol S com coloração azul. Pode-se observar que no dia três de exposição (Figura 13 C, I) o Al acumulou nas raízes e o aumento da dose de cultivo levou a alterações estruturais onde a região da coifa foi altamente afetada em ambas as cultivares. No dia seis plantas MONSOY 8644 (Figura 13 E, F) com o aumento do conteúdo de Al foi observado acúmulo principalmente na parede celular das células meristemáticas, por outro lado, plantas EMBRAPA 48 em ambas as doses avaliadas no dia seis de cultivo (Figura 13 K, L) apresentaram aumento dos danos estruturais quando comparados com do dia três sendo evidente o aumento da desorganização celular afetando a zona de transição distal das raízes e sendo observado acúmulo de Al por todo ápice de raízes.

Figura 13 - Histolocalização de alumínio por chrome azurol S em raízes dias de dois cultivares soja, EMBRAPA 48 e MONSOY 8644 IPRO, após 3 e 6 dias de tratamento com 0, 100 e 300 μM de Al em solução nutritiva.



Na micromorfologia das pontas de raízes por microscopia eletrônica de varredura foi evidente o aumento da desorganização celular nas camadas externas das raízes com aumento da dose e do tempo de exposição para ambos cultivares, no dia três foi observado pequenas alterações em MONSOY 8644 na presença de Al (Figura 14 C, D), por outro lado maiores danos foram observados em EMBRAPA 48 com 100 e 300 μM (Figura 14 I, L). Nas microanálises de pontas de raízes por espectrômetro de energia dispersiva de raios-X (EDS) o mapa de distribuição radial do Al confirmou acúmulo nos tecidos externos indicado pelas pontuações vermelha, sendo observado maiores áreas de acúmulo em plantas MONSOY 8644 (Figura 14 D) e EMBRAPA 48 (Figura 14 M) com a presença de 300 μM .

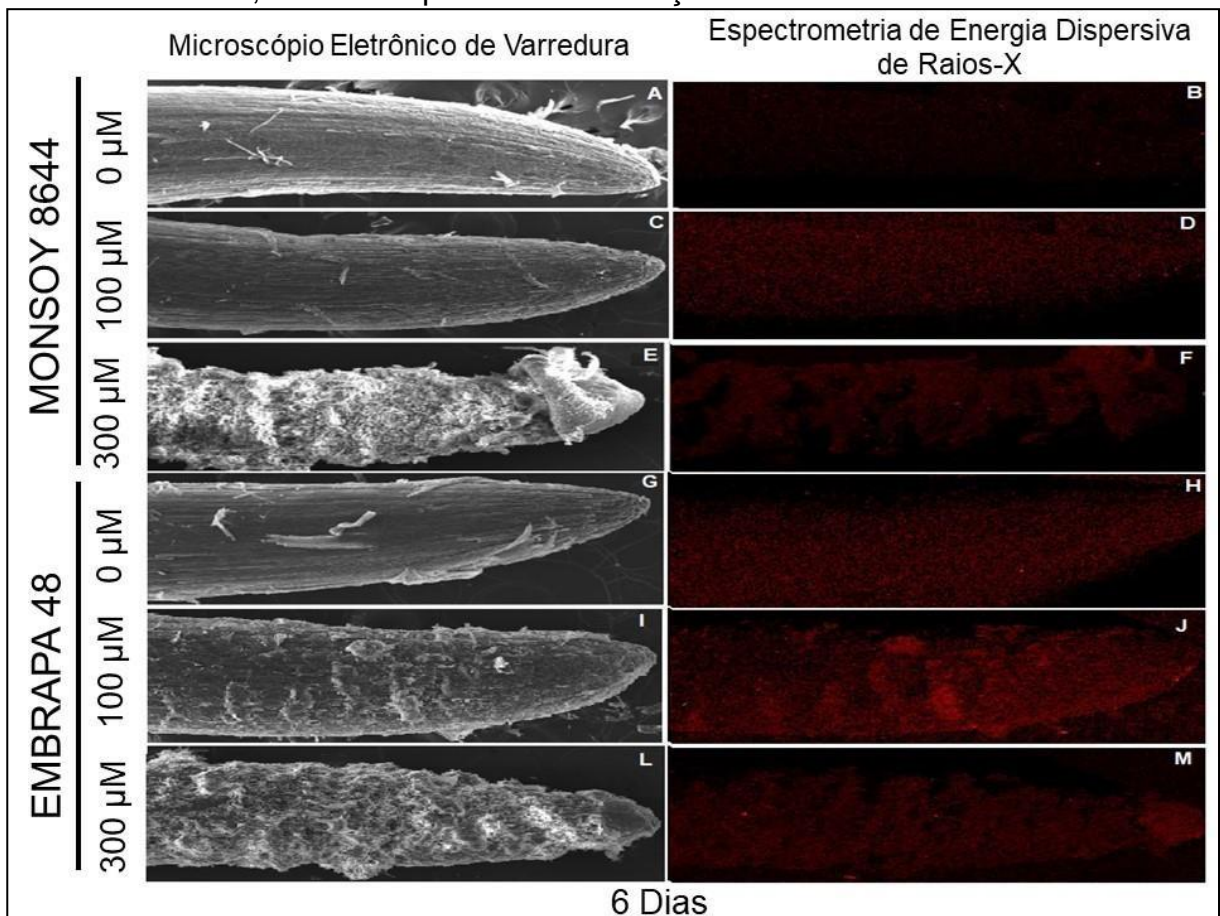
Figura 14 - Micromorfologia por microscopia eletrônico de varredura das pontas de raízes de dois cultivares soja, EMBRAPA 48 e MONSOY 8644 IPRO, após 3 dias de tratamento com 0, 100 e 300 μM de Al em solução nutritiva.



Para micromorfologia das pontas de raízes por MEV no dia seis, a desorganização celular em ambos cultivares é amplamente evidente, onde MONSOY 8644 com 100 μM (Figura 15 C) poucas e inspidas desordenes na epiderme são notadas e aumentadas quando submetidas a 300 μM (Figura 15 E), para EMBRAPA 48 com 100 μM (Figura 15 I) as desorganizações celulares foram

superiores as observadas na MONSOY 8644 e aumentadas quando submetidas a 300 μM (Figura 15 L). Para microanálises por espectrômetro de energia dispersiva de raios-X (EDS) o mapa de distribuição do Al confirmou a presença nos tecidos externos, sendo notório a alta presença de Al em raízes de EMBRAPA 48 com 100 μM (Figura 15 J).

Figura 15 - Micromorfologia por microscopia eletrônico de varredura das pontas de raízes de dois cultivares soja, EMBRAPA 48 e MONSOY 8644 IPRO, após 6 dias de tratamento com 0, 100 e 300 μM de Al em solução nutritiva.



3.12. Peroxidação lipídica e peróxido de hidrogênio

O conteúdo de MDA em folhas (Figura 16 A, B) apresentou semelhança entre os cultivares, doses de Al e tempo de exposição, apenas o grupo controle de EMBRAPA 48 apresentou diferença significativa quanto a tempo de cultivo, sendo no controle do dia 3 superior ao dia seis.

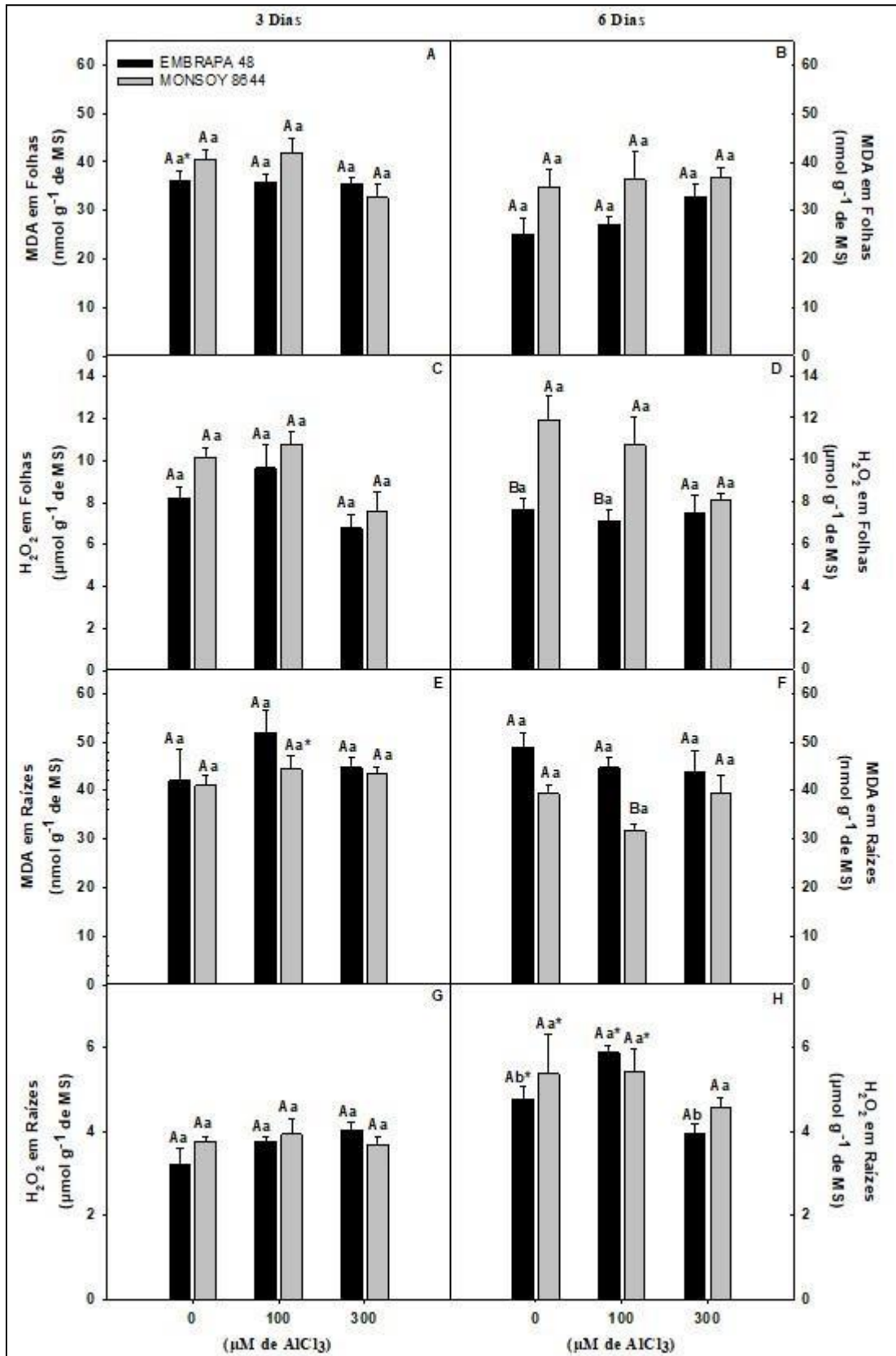
Quanto a conteúdo de H_2O_2 em folhas (Figura 16 C, D) houve semelhança entre cultivares, doses de Al no dia três de exposição, para o dia seis foi observado

diferença entre cultivares no grupo controle e na presença de 100 μM , sendo controle e com de 100 μM MONSOY 8644 superiores ao EMBRAPA 48.

Para MDA em raízes (Figura 16 E, F) notou-se similaridade no conteúdo dos cultivares e doses de Al no dia três de exposição, para o dia seis foi possível observar que plantas MONSOY 8644 quando expostas a 100 μM foram inferiores a EMBRAPA 48 na mesma condição de cultivo e inferior de plantas MONSOY 8644 com 100 μM no dia três.

O conteúdo de H_2O_2 em raízes (Figura 16 G, H) apresentou semelhança no dia três de exposição em todos os tratamentos, para o dia seis foi notório um maior conteúdo no grupo controle e com 100 μM , onde plantas controle de EMBRAPA 48 e MONSOY 8644 apresentam conteúdo superiores ao dia três, quando cultivadas com 100 μM foi observado para EMBRAPA 48 e MONSOY 8644 conteúdo superior do dia três.

Figura 16 - Conteúdo de MDA em folhas (A, B), Conteúdo de H_2O_2 em folhas (C, D), Conteúdo de MDA em raízes (E, F) e Conteúdo de H_2O_2 em raízes (G, H) de dois cultivares soja, EMBRAPA 48 e MONSOY 8644 IPRO, após 3 e 6 dias de tratamento com 0, 100 e 300 μM de Al em solução nutritiva.



As barras representam o erro padrão entre as réplicas. As letras maiúsculas denotam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as cultivares, as minúsculas denotam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as doses de exposição e asterisco denotam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os tempos de exposição segundo teste Scott Knott.

3.13. Atividade enzimática

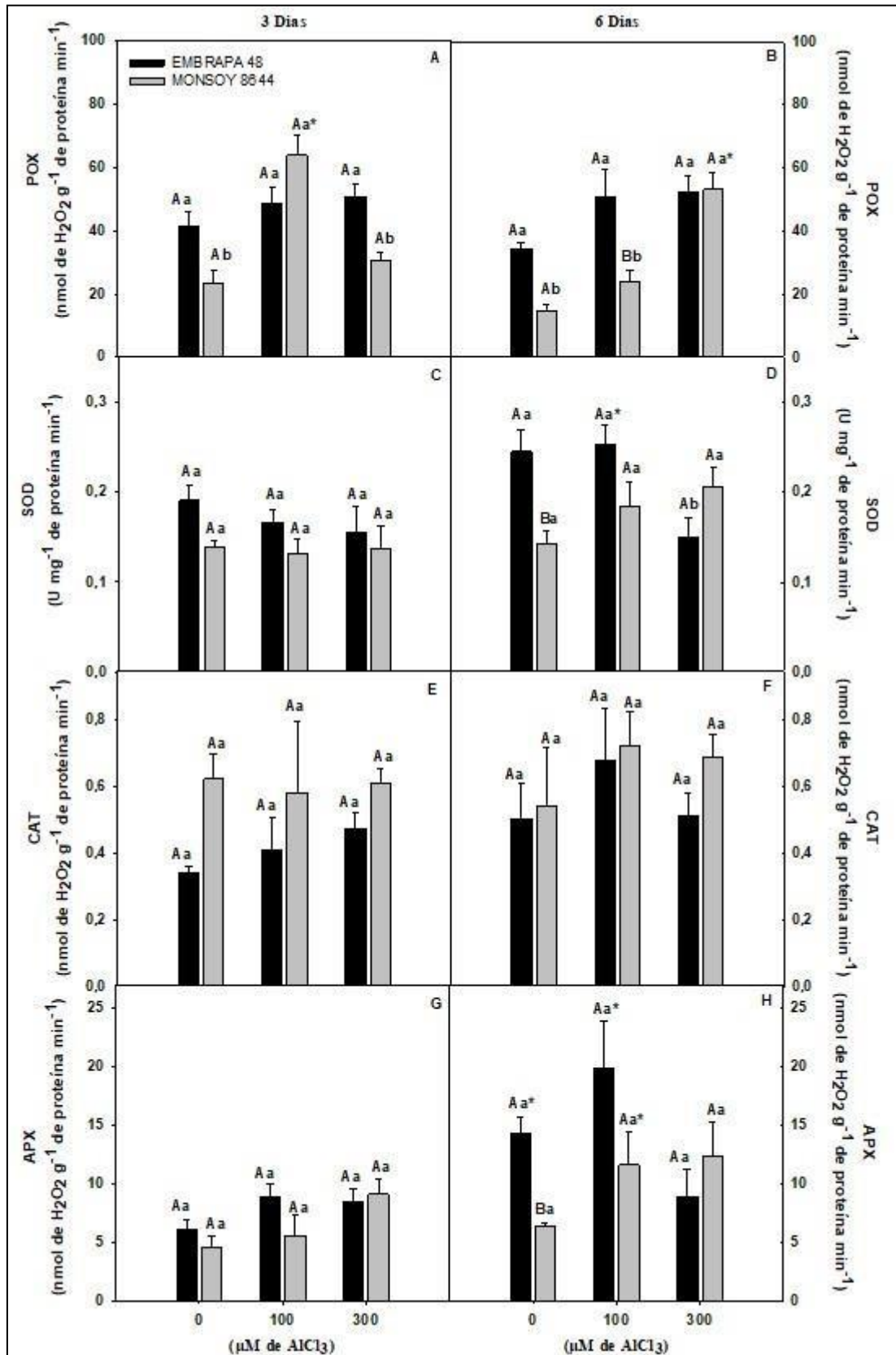
Na atividade de POX em folhas (Figura 17 A, B) plantas EMBRAPA 48 apresentaram semelhança e plantas MONSOY mostraram maior atividade no dia três de exposição sendo superior e diferente do dia seis de exposição, para o dia seis plantas MONSOY 8644 expostas a 300 μ M apresentou maior diferindo do dia três.

A atividade de SOD em folhas (Figura 17 C, D) mostrou-se semelhante entre cultivares e doses para o dia três, para o dia seis foi observado semelhança entre as doses para MONSOY 8644, plantas EMBRAPA 48 submetidas a 100 μ M mostrou maior atividade diferindo de plantas cultivadas com 300 μ M e superior de MONSOY 8644 com 100 μ M no dia três.

Para atividade de CAT em folhas (Figura 17 E, F) todos os tratamentos foram iguais sendo as maiores atividades observadas no dia seis com 100 μ M em EMBRAPA 48 e MONSOY.

Foi observado igualdade na atividade de APX em folhas (Figura 17 G, H) no dia três para ambos cultivares e doses, no o dia seis maior atividade em plantas submetidas a disponibilidade de 100 μ M, onde EMBRAPA 48 diferiu de plantas expostas por três dias, e plantas MONSOY 8644 foi superior de resultados obtidos no dia três nas mesmas condições de cultivo

Figura 17 - Atividade de POX (A, B), Atividade de SOD (C, D), Atividade de CAT (E, F) e Atividade de APX (G, H) em folhas de dois cultivares soja, EMBRAPA 48 e MONSOY 8644 IPRO, após 3 e 6 dias de tratamento com 0, 100 e 300 μ M de Al em solução nutritiva.



As barras representam o erro padrão entre as réplicas. As letras maiúsculas denotam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as cultivares, as minúsculas denotam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as doses de exposição e asterisco denotam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os tempos de exposição segundo teste Scott Knott.

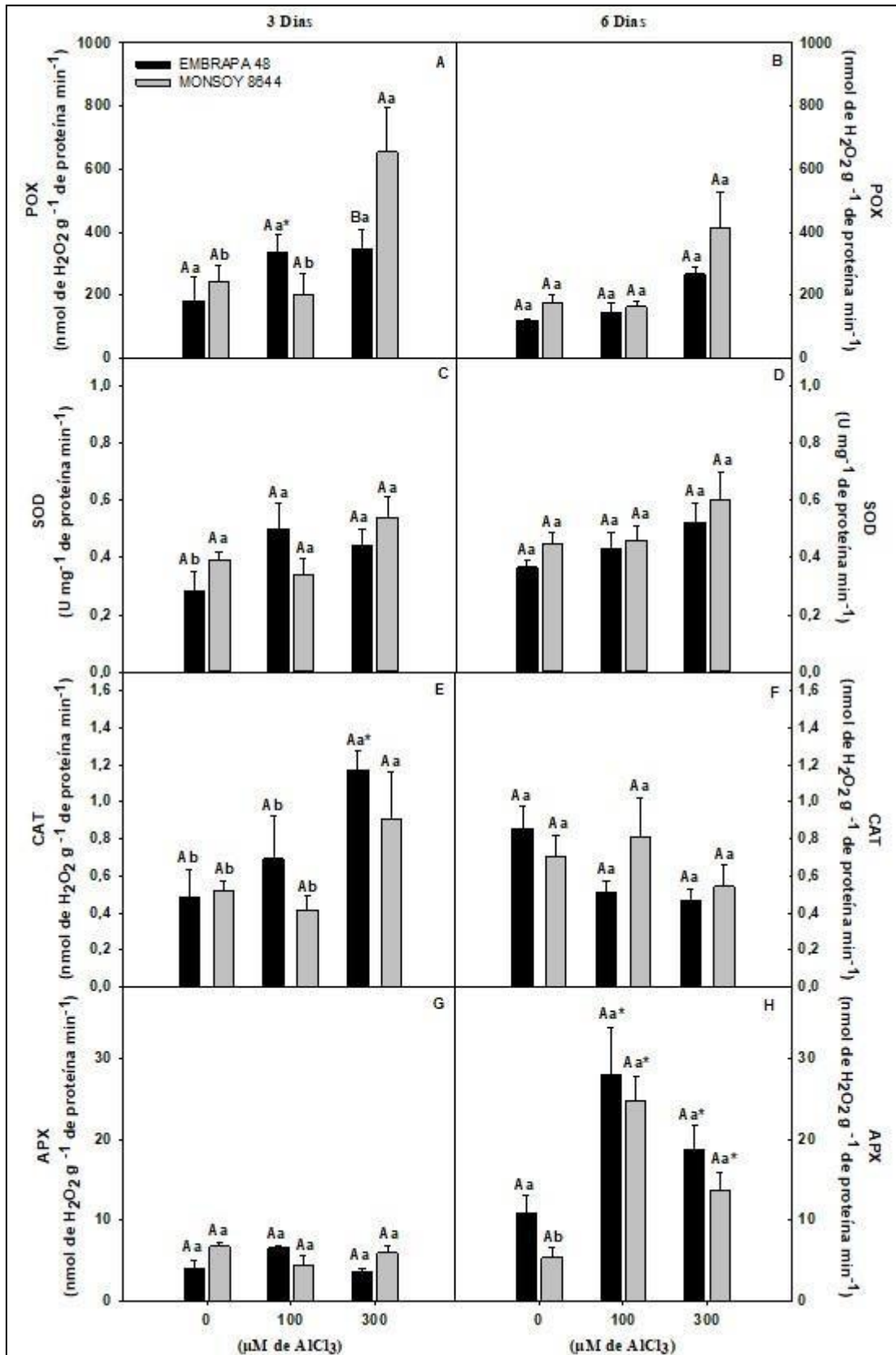
Para atividade de POX em raízes (Figura 18 A, B) no dia três plantas EMBRAPA 48 foram semelhantes e plantas MONSOY mostraram-se diferentes onde 300 μM foram superiores do grupo controle e de plantas com 100 μM . Para o dia seis foi observado semelhança estatística entre as cultivares e doses.

Em atividade de SOD em raízes (Figura 18 C, D) foram observadas respostas similares em MONSOY 8644 nas doses e dias avaliados, e plantas EMBRAPA 48 com presença de Al no dia três apresentaram maior atividade diferendo do grupo controle.

Para atividade de CAT em raízes (Figura 18 E, F), EMBRAPA 48 e MONSOY 8644 com 300 μM apresentaram atividades superiores do grupo controle, para o dia seis foram observadas respostas similares entre as cultivares e doses.

Foi observado igualdade na atividade de APX em raízes (Figura 18 G, H) no dia três para ambas as cultivares e doses, para o dia seis o Al apresentou influencia na atividade enzimática em MONSOY 8644, onde com 100 μM apresentou atividade acima do grupo controle, e com 300 μM apresentou atividade de superior controle.

Figura 18 - Atividade de POX (A, B), Atividade de SOD (C, D), Atividade de CAT (E, F) e Atividade de APX (G, H) em raízes de dois cultivares soja, EMBRAPA 48 e MONSOY 8644 IPRO, após 3 e 6 dias de tratamento com 0, 100 e 300 μM de Al em solução nutritiva.



As barras representam o erro padrão entre as réplicas. As letras maiúsculas denotam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as cultivares, as minúsculas denotam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as doses de exposição e asterisco denotam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os tempos de exposição segundo teste Scott Knott.

4. DISCUSSÕES

O cultivar MONSOY 8644 IPRO tem como mecanismos mais apurados de resistência, com a presença de Al, houve um aumento no conteúdo de alumínio em raízes no primeiro dia avaliado, maior crescimento relativo de parte aérea, aumento em área e volume de raízes em baixas doses de Al, maior conteúdo de clorofilas, amido em folhas, produtos do metabolismo primário, proteínas em raízes, acúmulo de compostos fenólicos em raízes, aumento na atividade de APX em folhas, POX e CAT em raízes, a presença de alumínio apresenta efeitos negativos sendo notados redução da área foliar, menores diâmetro de raízes no primeiro dia avaliado, menor conteúdo de proteínas em folhas, decréscimo de malato com tempo de exposição.

Os cultivares apresentaram mesma dinâmica de respostas em parâmetros fisiológicos, aminoácidos em raízes, MDA em folhas, atividade de SOD em folhas e raízes e CAT folhas, houve danos estruturais na zona meristemática em ambos cultivares visualizados a partir da desorganização celular.

Foi observado acúmulo de Al observado em folhas de ambas as cultivares expostas a 100 μM de Al em ambos os dias e para raízes o conteúdo de Al aumentou de acordo com o aumento da disponibilidade deste metal (Figura 3). Em muitas plantas tolerantes o metal pode ligar-se a ácidos orgânicos e ser transportados pelo xilema, e então ser descarregados na parte aérea e neutralizados por compartimentalização vacuolar (BOJÓRQUEZ-QUINTAL et al., 2017), o Al é movido por fluxo em massa e ocorre sua retenção nas raízes minimizando assim seu transporte para a parte aérea prevenindo os efeitos deletérios em outros órgãos, sendo um fator importante para a tolerância ao Al (STEINER et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2021).

No presente trabalho, o Al não alterou o crescimento relativo da parte aérea no cultivar MONSOY 8644, sendo observados diferenças nos dias avaliados (Figura 4), e pouca variação foi observada para o crescimento relativo das raízes. Contudo, resultados opostos já foram observados em outros trabalhos, com maiores reduções na parte aérea de *Arabidopsis thaliana* e nas raízes de soja (SIQUEIRA et al., 2021; SILVA et al., 2020). O menor crescimento de raízes após tratamento com 300 μM de Al pode estar associado com a interação desse metal junto aos alvos apoplásticos como a parede celular limitando assim a expansão na zona de meristemática (KOPITKE et al., 2015; SINGH, et al., 2017).

Para estudos de alterações de raízes (Figura 5) o Al apresentou efeito negativo para EMBRAPA 48 no maior tempo de exposição, afetando também o diâmetro de raízes de MONSOY 8644 com o tempo de exposição, resultados semelhantes foram observados em cultivares de cevada (ALI et al., 2011). Adicionalmente, para a cultivar MONSOY 8644 houve aumento em área e em volume de raízes. Modificações em raízes são justificadas pela ligação do Al a componentes químicos da parede celular e da membrana plasmática induzindo alterações nas funções destas estruturas como inibição do afrouxamento de componentes da zona de alongamento e despolarização da membrana plasmática (DOS REIS et al., 2018; RAO et al., 2016).

Parâmetros fisiológicos apresentaram similaridade entre os cultivares, doses de Al e tempo de avaliação (Figura 6). Um dos efeitos deletérios da fitotoxicidade do Al é a diminuição da eficiência do uso da água devido a mudanças estruturais no sistema radicular (FERREIRA et al., 2017). Cultivares agrícolas que apresentam eficiência na atividade fotossintética e no uso da água tendem a ser mais tolerantes ao estresse por Al apresentando maior produção de matéria seca (OLIVEIRA et al., 2021).

O conteúdo de clorofilas aumentou em MONSOY 8644 com 100 μM de Al comparando os dias avaliados (Figura 7). Zhang et al. (2007) avaliando cultivares de soja na presença de Al encontrou decréscimo no conteúdo de Chl a e Chl b à medida que a concentração de Al subia. Íons de Mg^{2+} é um constituinte essencial na molécula de clorofila e apresentam muitas funções em vias bioquímicas e fisiológicas, genótipos de plantas resistentes ao Al pode contar com a melhoria no transporte e acúmulo de Mg^{2+} (HAILES et al., 1997; BROADLEY et al., 2008; BOSE et al., 2011).

O aumento no conteúdo de metabolitos primários associados com a não redução da A reflete ao uso de compostos de carbono para o fornecimento de esqueletos de carbono e aumento de biomassa para genótipos tolerantes (SIQUEIRA et al., 2020). O aumento de amido em folhas no cultivar MONSOY 8644 expostos a 300 μM de Al no sexto dia (Figura 8, 9) pode ser explicado à baixa atividade das enzimas de degradação do amido em cultivo com Al possivelmente como mecanismo adaptativo, mantendo o potencial osmótico favorável, como observado para a cultura do arroz (MISHRA & DUBEY, 2008).

O aumento no conteúdo de malato em folhas de ambas as cultivares na presença de doses Al no sexto dia (Figura 10 F), pode estar envolvido na regulação e composição dos exsudatos radiculares ou auxiliando na sua função estomática como osmólito (FERNIE & MARTINOIA, 2009). O malato está no ponto de ramificação de muitas vias metabólicas sendo rigidamente controlado por afetar uma série de processos fisiológicos (SANTELIA & LAWSON, 2016). Zhou et al. (2018) sugerem que o acúmulo de malato equilibra a síntese e o efluxo de citrato em raízes de soja induzido pelo Al.

O conteúdo de fumarato observado em folhas de ambas as cultivares com 300 μM de Al no sexto dia (Figura 10 H) está de acordo com Naik et al. (2009), estes autores encontraram decréscimo no conteúdo de fumarato em plantas de *Populus tremuloides* e *Populus trichocarpa* com o aumento da disponibilidade de Al. Cárcamo et al. (2019) observaram baixa concentração de fumarato em folhas e raízes de cultivares de mirtilo expostas ao Al e Rangel et al. (2010) encontrando menor concentração de fumarato frente a outros ácidos orgânicos em duas cultivares de feijão, sugerindo assim baixa importância para a formação de complexos com o Al.

A similaridade entre os cultivares para o conteúdo de aminoácidos (Figura 10, 11) está acompanhado de um menor conteúdo de proteínas em plantas na cultivadas com Al (Figura 10, 11). O Al causa efeitos nocivos na absorção e atividade de enzimas-chave na assimilação de nitrogênio impactando o metabolismo como um todo (PAL'OVE-BALANG & MISTRİK, 2011). Altas concentrações de Al na solução do solo resultam em ingresso no simplasto e inibindo o transporte de nitrato, como observado em soja (LAZOF et al., 1994). O Al liga-se à superfície celular formando uma camada carregada positivamente, esse aumento na carga elétrica positiva é responsável pela inibição da captação de amônia (ZHOU et al., 2018).

Ocorreu acúmulo de compostos fenólicos totais em raízes de todos os tratamentos no sexto dia (Figura 12). A formação de complexos de Al com compostos fenólicos é um dos mecanismos atuantes na redução do efeito tóxico do Al em plantas, os quais podem adsorver partículas de Al no apoplasto ou no interior das células vegetais (TOLRÀ et al., 2005; WANG et al., 2020). MOHAMMADI & KHAVARI-NEJAD (2013) avaliando plantas de soja, encontraram aumento no conteúdo de compostos fenólicos de acordo com o aumento interno de Al. Hemada et al. (2020) observaram o aumento no conteúdo total de fenólicos em folhas e raízes de plantas de tremoço cultivadas por 21 dias em disponibilidade de Al. A

aplicação exógena de compostos fenólicos em plantas de milho diminui o conteúdo do Al em raízes através da exsudação radicular de compostos hidroxâmicos indicando resistência pelo mecanismo de exclusão (ZHAO et al., 2019).

A histolocalização de Al em raízes mostrou acúmulo principalmente na região meristemática (Figura 13). O alto teor de Al em raízes indica mobilização interna na região do apoplasto devido a interação com a parede celular (HORST et al., 2010). Essa retenção pode impedir a entrada do Al no simplasto impedindo a entrada no cilindro central e seu transporte via xilema (DOS REIS et al., 2018).

Imagens de microscopia eletrônica de varredura, demonstraram que com o aumento da disponibilidade de Al e do período de cultivo resulta em danos nas estruturas de raízes, sendo evidenciado pela desorganização celular com resultados distintos entre as cultivares (Figura 14, 15). Esta resposta, pode ser atribuída a incapacidade das paredes dos tecidos externos da zona de alongamento se desprenderem (KOPITKE et al., 2014) visto que as células internas continuam a se expandir gerando força para com capacidade de romper a camada externar (DE SOUZA et al., 2015; OSAWA et al., 2011). Essas diferenças radiculares influenciada pela fitotoxicidade do Al entre as cultivares pode explicar as diferenças de campo e as respostas da plasticidade às condições de estresse (RAO et al., 2016).

No conteúdo de MDA em raízes notou-se decréscimo entre os dias para MONSOY 8644 quando submetida a 100 μM de Al (Figura 16). A peroxidação lipídica afeta o funcionamento celular normal aumentando a fluidez e a permeabilidade da membrana, esta é intensificada nas membranas celulares e organelas quando ocorre níveis de EROs atinge acima do limite (SHARNA et al., 2012).

Foi observado acúmulo de H_2O_2 no cultivar MONSOY 8644 entre os dias avaliados no grupo controle e quando cultivadas com 100 μM de Al, sendo observado decréscimo no teor de H_2O_2 no mesmo cultivar com 300 μM (Figura 16), As EROs são continuamente produzidas oriundas de certas vias metabólicas e de sistemas específicos e são degradadas por distintos mecanismos (TAO et al., 2012). Baixos teores de EROs estão envolvidos na transmissão do sinal de estresse para ativar as vias de aclimação e defesa (MITTLER et al., 2004).

Os mecanismos antioxidantes mostraram-se eficientes em ambas as cultivares na presença de Al diminuindo os efeitos deletérios das EROs. Houve aumento das atividades no cultivar MONSOY 8644 na presença de altas doses de Al

de POX e APX no sexto dia de avaliação e CAT em raízes na presença de altas doses no dia três de exposição (Figura 17, 18) e comportamento similar entre as cultivares na atividade de SOD em folhas e raízes e CAT em folhas na presença de Al. Como já observado em plantas de soja submetidas ao Al, onde ocorreu diminuição na atividade de CAT e aumento da atividade de APX indicando que H₂O₂ consumido durante o processo oxidativo e não destinado para a peroxidação lipídica (DOS REIS et al., 2019). É observado um declínio na atividade de CAT na presença de Al, devido regulação negativa na síntese das proteínas enzimáticas causando sensibilidade desta ao metal (BERA et al., 2019).

5. CONCLUSÕES

Diante do exposto, o Al induziu pouco dano ao crescimento das plantas de soja, além de promover estabilidade fotossintética o que permitiu maior acúmulo de compostos carbônicos, afetou negativamente o metabolismo do nitrogênio, pronunciadas alterações em raízes visualizadas em altas doses no cultivo, ocorrendo também aumento na atividade enzimática principalmente em raízes minimizando o estresse oxidativo.

Com estes resultados o cultivar MONSOY 8644 apresentando maior acúmulo em raízes no dia três e em folhas no dia seis, frente isso plantas MONSOY 8644 apresentaram melhores resultados biométricos, acúmulo de clorofila associado com a estabilidade nos parâmetros fisiológicos, com aumento de metabolitos primários, menores danos na morfologia de raízes e maior atividade enzimática atuantes no estresse oxidativo de acordo com os dias de exposição ao alumínio.

Por outro lado, o cultivar EMBRAPA 48 apresentou melhores resultados em produtos provenientes do metabolismo do nitrogênio e acúmulo de amido na planta, apresentou também menores conteúdos de produtos que indicam estresse oxidativo. Concluindo que plantas MONSOY 8644 apresentam mecanismos mais apurados de resistência ao Al.

REFERÊNCIAS

- AHN, S.-J.; MATSUMOTO, H. The Role of the Plasma Membrane in the Response of Plant Roots to Aluminum Toxicity. **Plant Signaling & Behavior**, 1:2, 37-45, 2006.
- ALI, S.; ZENG, F.; QIU, L.; ZHANG, G. The effect of chromium and aluminum on growth, root morphology, photosynthetic parameters and transpiration of the two barley cultivars. **Biologia Plantarum** 55 (2): 291-296, 2011.
- ÁVILA, M. R.; BRACCINI, A. DE L.; SCAPINI, C. A.; FAGLIARI, J. L.; DOS SANTOS, J. L. Influence of manitol-induced water stress on canola seed germination and seedling growth. **Revista Brasileira de Sementes**, vol.29 no.1 Londrina Apr. 2007.
- BERA, S.; DE KUMAR, A.; ADAK, M. K. Modulation of glycine betaine accumulation with oxidative stress induced by aluminium toxicity in rice proc. **Natl Acad Sci**, India, Sect B Biol Sci 89:291–301, 2019.
- BIELESKI, R. I.; TURNER, N. A. Separation and estimation of aminoacids in crude plants extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Anal Biochemistry** 17:278–293, 1966.
- BOITO, G. T.; CRENNNA, A. C.; GIUGGIA, J. A.; GIOVANINI, D.; ODDINO, C.; GERARDO, U. A. Desarrollo y validación de una escala para evaluación de daño por orugas defoliadoras en soja (*Glycine max* L.), para el sur de la provincia de Córdoba **Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias**, vol. 45, núm. 1, pp. 91-104, 2013.
- BOJÓRQUEZ-QUINTAL, E.; ESCALANTE-MAGAÑA, C. ECHEVARRÍA-MACHADO, I.; MARTÍNEZ-ESTÉVEZ, M. Aluminum, a Friend or Foe of Higher Plants in Acid Soils. **Frontiers in Plant Science**. Vol. 8, Article 1767, Oct. 2017.
- BOSE, J.; BABOURINA, O.; RENGEL, Z. Role of magnesium in alleviation of aluminium toxicity in plants, **Journal of Experimental Botany**, Volume 62, Issue 7, April 2011.
- BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 72, 248–254, 1976.
- BROADLEY, M. R.; HAMMOND, J. P.; KING, G. J.; ASTLEY, D.; BOWEN, H. C.; MEACHAM, M. C. MEAD, A.; PINK, D. A. C.; TEAKLE, G. R.; HAYDEN, R. M. Shoot calcium and magnesium concentrations differ between subtaxa, are highly heritable, and associate with potentially pleiotropic loci in *Brassica oleracea*, **Plant Physiology**, vol. 146 pg. 1707, 2008.
- BRUNNER, I.; SPERISEN, C. Aluminum exclusion and aluminum tolerance in woody plants. **Frontiers in Plant Science**, Volume 4, Article 172, June 2013.
- CAKMAK, I.; HORST W. J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiology Plant** 83:463–468, 1991.

CÁRCAMO, M. P.; REYES-DÍAZ, M.; RENGEL, Z.; MIRENALBERDI; OMENA-GARCIA, R. P.; NUNES-NESE, A.; INOSTROZA-BLANCHETEAU, C. Aluminum stress differentially affects physiological performance and metabolic compounds in cultivars of highbush blueberry. **Scientific Reports** 9:11275, 2019.

CARNEIRO FILHO, A.; COSTA, K. A expansão da soja no Cerrado - Caminhos para a ocupação territorial, uso do solo e produção sustentável. São Paulo, **Agroicone**, p 1-30, 2016.

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

CLARK, R.B. Characterization of phosphatase of intact maize roots. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, vol.23, p. 458-460, 1975.

DASPUTE, A. A.; SADHUKHAN, A.; TOKIZAWA, M.; KOBAYASHI, Y.; PANDA S. K.; KOYAMA H. Transcriptional Regulation of Aluminum-Tolerance Genes in Higher Plants: Clarifying the Underlying Molecular Mechanisms. **Frontiers in Plant Science**, volume 8, pag. 1358, 2017.

DE SOUZA, L. T.; CAMBRAIA, J.; RIBEIRO, C.; DE OLIVEIRA, J. A.; DA SILVA, L. C. Effects of aluminum on the elongation and external morphology of root tips in two maize genotypes. **Bragantia** 75 (1), Jan-Mar 2016.

DOS REIS, A. R.; LISBOA, L. A. M.; REIS, H. P. G.; BARCELOS, J. P, DE Q.; SANTOS, E. F.; SANTINI, J. M. K.; MEYER-SAND, B. R. V.; PUTTI, F. F.; GALINDO, F. S.; KANEKO, F. H.; BARBOSA, J. Z.; PAIXÃO, A. P.; JUNIOR, E. F.; DE FIGUEIREDO, P. A. M.; LAVRES, J. Depicting the physiological and ultrastructural responses of soybean plants to Al stress conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**, Volume 130, Pages 377-390, 2018.

DOS REIS, A.; LISBOA, L. A. M.; REIS, H. P. G.; BARCELOS, J. P.; SANTOS, E. F. SANTINI, J. M. K.; MEYER-SAND, B. R. V.; PUTTIA, F. F. KANEKOE, F. H.; BARBOSAF, J. Z.; PAIXÃO, A. P. JUNIOR. F.; DE FIGUEIREDO, P. A. .M; LAVRES, J. Depicting the physiological and ultrastructural responses of soybean plants to Al stress conditions. **Plant Physiology and Biochemistry** 130 377–390, 2018.

EEKHOUT, T.; LARSEN, P.; DE VEYLDER, L. Modification of DNA Checkpoints to Confer Aluminum Tolerance. **Trends in Plant Science**, Vol. 22, No. 2, February 2017.

FAO/IIASA/ISRIC/ISSCAS/JRC. Harmonized World Soil Database (version 1.2). FAO, Rome, Italy and IIASA, Laxenburg, 2012.

FERNIE, A. R.; MARTINOIA, E. Malate. Jack of all trades or master of a few?. **Phytochemistry**, Volume 70, Issue 7, Pag. 828-832, 2009.

FERNIE, A. R.; ROSCHER, A.; RATCLIFFE, R. G.; KRUGER, N. J. Fructose 2,6-biphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotranferase and increase triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. **Plants**, v.212, n. 2, p. 250-263, 2001.

GARDI, C.; ANGELINI, M.; BARCELO, S.; COMERMA, J.; CRUZ GAISTARDO, C.; ENCINA ROJAS, A.; JONES, A.; KRASILNIKOV, P.; MENDONCA-SANTOS, M.L.; MONTANARELLA, L.; MUNIZ UGARTE, O.; SCHAD, P.; VARA RODRIGUEZ, M.I.; VARGAS, R.; RAVINA DA SILVA, M. Atlas de Solos de América Latina e do Caribe, Comissão Europeia – Serviço de Publicações da União Europeia, L-2995 Luxembourg, 176 pp, 2015.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: Occurrence in higher plants. **Plant Physiology** 59:309–314, 1977.

HE, H.; ZHAN, J.; HE, L.; GU, M. Nitric oxide signaling in aluminum stress in plants. **Protoplasma** 249, 483–492, 2012.

HORST, W. J.; WANG, Y.; ETICHA, D. The role of the root apoplast in aluminium-induced inhibition of root elongation and in aluminium resistance of plants: a review, **Annals of Botany**, Volume 106, Issue 1, Pages 185–197, 2010.

HUANG, S-C.; CHU, S-J.; GUO, Y-M.; JI, Y-J.; HU, D-Q.; CHENG, J.; LU, G-H.; YANG, R-W.; TANG, C-Y.; QI, J-L.; YANG, Y-H. Novel mechanisms for organic acid-mediated aluminium tolerance in roots and leaves of two contrasting soybean genotypes, **PLANTS**, Volume 9, Issue 6, November, plx064, 2017.

KISNIERIENĖ, V.; LAPEIKAITĖ, I. When chemistry meets biology: the case of aluminium – a review. **CHEMIJA**, vol. 26. No. 3. P. 148–158, 2015.

KOCHIAN, L. V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annal Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**. 46:237-60, 1995.

KOCHIAN, L. V.; PIÑEROS, M. A.; LIU, J.; MAGALHAES, J. V. Plant Adaptation to Acid Soils: The Molecular Basis for Crop Aluminum Resistance. **Annual Review Plant Biology**. 66:571–98, 2015.

KOPITTKKE, P. M.; MOORE, K.L., LOMBI, E. Identification of the primary lesion of toxic aluminum in plant roots. **Plant Physiology** 167:1402–1411, 2015.

KUKACHKA, B. F.; MILLER, R. B. A chemical spot-test for aluminum and its value in wood identification. **IAWA Bull** 1:104– 109, 1980.

LAZOF, D .B.; RINCÓN, M.; RUFTY, T. W. Aluminum accumulation and associated effects on $^{15}\text{NO}_3^-$ influx in roots of two soybean genotypes differing in Al tolerance. **Plant Soil An Int J Plant-Soil Relationships** 164:291–297, 1994.

LI, Q.; WANG, M.; FU, Q.; LI, T.; LIU, D.; HOU, R.; LI, H.; CUI, S.; JI, Y. Short-term influence of biochar on soil temperature, liquid moisture content and soybean growth in a seasonal frozen soil area. **Journal of Environmental Management**, Volume 266, 110609, 2020.

LISEC, J.; SCHAUER, N.; KOPKA, J.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A. R. Gas chromatography mass spectrometry–based metabolite profiling in plants. **Nature Protocols**, 1, 387–396, 2006.

LIU, N.; SONG, F.; ZHU, X.; YOU, J.; YANG, Z.; LI, X. Salicylic Acid Alleviates Aluminum Toxicity in Soybean Roots through Modulation of Reactive Oxygen Species Metabolism. **Frontiers in Chemistry**, volume 5, Pag. 96, 2017.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; BREUSEGEM, F. V. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science**, Volume 9, Issue 10, Pages 490-498, 2004.

MOHAMMADI F.; KHAVARI-NEJAD, R. A. Effect of indoleacetic acid on growth and antioxidant properties in glycine max seedlings exposed to aluminium toxicity. **Genetics and Plant Physiology**, Volume 3 (3–4), pp. 179–190, 2013.

NAIK, D.; SMITH, E.; CUMMING, J. R. Rhizosphere carbon deposition, oxidative stress and nutritional changes in two poplar species exposed to aluminum, **Tree Physiology**, Volume 29, Issue 3, Pag. 423–436, 2009.

NUNES-NESE, A.; BRITO, D. S.; INOSTROZA-BLANCHETEAU, C.; FERNIE, A. R.; ARAÚJO, W. L. The complex role of mitochondrial metabolism in plant aluminum resistance. **Trends in Plant Science**, Vol. 19, No. 6, June 2014.

NUNES-NESE, A.; CARRARI, F.; GIBON, Y.; SULPICE, R.; LYTOVCHENKO, A.; FISAHN, J.; GRAHAM, J.; RATCLIFFE, R. G.; SWEETLOVE, L. J.; FERNIE, A. R. Deficiency of mitochondrial fumarate activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. **The Plant Journal** 50, 1093-1106, 2007.

OLIVEIRA, M. D. S.; ROCHA, S. V.; SCHNEIDER, V. K.; HENRIQUE-SILVA, F.; SOARES, M. R.; SOARES-COSTA, A. Physiological, nutritional, and molecular responses of Brazilian sugarcane cultivars under stress by aluminum. **PeerJ** 9:e11461, 2021.

OSAWA, H.; ENDO, I.; HARA, Y.; MATSUSHIMA, Y.; TANGE, T. Transient Proliferation of Proanthocyanidin-Accumulating Cells on the Epidermal Apex Contributes to Highly Aluminum-Resistant Root Elongation in Camphor Tree. **Plant Physiology**, Volume 155, Issue 1, Pag. 433–446, 2011.

PAL'OVE-BALANG, P.; MISTRÍK, I. Effect of aluminium on nitrogen assimilation in roots of *Lotus japonicus*, **Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, 145:3, 527-531, 2011.

PANDA, S. K. MATSUMOTO, H. Molecular physiology of aluminum toxicity and tolerance in plants. **Botanic Review** 73:326–347, 2009.

PATTANAYAK, A.; PFUKREI, K. Aluminium toxicity tolerance in crop plants: Present status of research. **African Journal of Biotechnology**. Vol. 12(24), pp. 3752-3757, Jun. 2013.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. DAS G.; Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Vol. 3, N. 4: pp. 146-152, November 2012.

PETTER, F. A.; ALVES, A. U.; SILVA, J. A. da; CARDOSO, E. de A.; ALIXANDRE, T. F.; ALMEIDA, F. A. de; PACHECO, L. P. Produtividade e qualidade de sementes

de soja em função de doses e épocas de aplicação de potássio. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n.1, p. 89 -100, 2014.

RANGEL, A. F.; RAO, I. M.; BRAUN, H.-P.; HORST, W. J. Aluminum resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris*) involves induction and maintenance of citrate exudation from root apices. **Physiologia Plantarum**, 138: 176-190, 2010.

RANJAN, A.; SINHA, R.; SHARMA, T. R.; PATTANAYAK, A.; SINGH, A. K. Alleviating aluminum toxicity in plants: Implications of reactive oxygen species signaling and crosstalk with other signaling pathways. **Physiologia Plantarum**. 173: 1765- 1784, 2021.

RAO, I. M.; MILES, J. W.; BEEBE, S. E.; HORST, W. J. Root adaptations to soils with low fertility and aluminium toxicity, **Annals of Botany**, Volume 118, Issue 4, Pages 593–605, 2016.

RIBEIRO, C.; CAMBRAIA, J.; PEIXOTO, P. H. P.; FONSECA-JU´NIOR, E. M. Antioxidant system response induced by aluminum in two rice cultivars. **Brazilian Journal Plant Physiology**, 24:107–116, 2012.

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

SANTELIA, D.; LAWSON, T. Rethinking Guard Cell Metabolism. **Plant Physiology**, Volume 172, Issue 3, Pages 1371–1392, 2016.

SENEVIRATNE, M.; RAJAKARUNA, N.; RIZWAN, M.; MADAWALA, H. M. S. P.; OK, H. M. S. P.; VITHANAGE, M. Heavy metal-induced oxidative stress on seed germination and seedling development: a critical review. **Environmental Geochemistry and Health**, volume 41, pages1813–1831, 2019.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany**, Volume 2012, Article ID 217037, 26 pages, 2012.

SILVA, C. O.; BRITO, D. S.; DA SILVA, A. A.; ROSA, V. R.; SANTOS, M. F. S.; SOUZA, G. A.; AZEVEDO, A. A.; DAL-BIANCO, M.; OLIVEIRA, J. A.; RIBEIRO, C. Differential accumulation of aluminum in root tips of soybean seedlings. **Brazilian Journal Botany**, 43:99–107, 2020.

SILVA, S. Aluminium toxicity targets in plants. **Journal of Botany**. Vol. 2012, Article ID 219462, 8 pages, 2012.

SINGH, S.; TRIPATHI, D. K.; SINGH, S.; SHARMA, S.; DUBEY, N. K.; CHAUHAN, D. K.; VACULÍK, M. Toxicity of aluminium on various levels of plant cells and organism: A review, **Environmental and Experimental Botany**, Vol. 137, Pag. 177- 193, 2017.

SIQUEIRA, J. A.; BARROS, J. A. S.; DAL-BIANCO, M.; MARTINS, S. C. V.; MAGALHÃES, P.; RIBEIRO, D. M.; DAMATTA, F. M.; ARAÚJO, W. L.; RIBEIRO, C. Metabolic and physiological adjustments of maize leaves in response to aluminum stress. **Theory Experimental Plant Physiology**. 32:133–145, 2020.

SIQUEIRA, J. A.; WAKIN, T.; BATISTA-SILVA, W. SILVA, J. C. F.; VICENTE, M. H.; SILVA, J. C.; CLARINDO, W. R. ZSÖGÖN, A. PERES, L.E. P. DE VEYLDER, L.; FERNIE, A. R.; NUNES-NESE, A.; ARAÚJO, W. L. Photoperiod shapes aluminium tolerance in plants. **bioRxiv**, 430934, 2021.

STEINER, F.; ZOZ, T.; PINTO J. A. S.; CASTAGNARA, D. D.; LOPES D., J. A. Effects of aluminum on plant growth and nutrient uptake in young physic nut plants **Semina: Ciências Agrárias**, vol. 33, núm. 5, septiembre-octubre, pp. 1779-1788, 2012.

SULPICE, R.; PYL, E. ISHIHARA, H.; TRENKAMP, S.; STEINFATH, M.; WITUCKA-WALL, H.; GIBON, Y.; USADEL, B.; POREE, F.; PIQUES, M. C.; KORFF, M. V.; STEINHAUSER, M. C.; KEURENTJES, J. J. B.; GUENTHER, M.; HOEHNE, M.; SELBIG, J.; FERNIE, A. R.; ALTMANN, T.; Starch as a major integrator in the regulation of plant growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, V. 106, N. 25, p. 10348-10353, 2009.

TEXEIRA, L. R.; BRACCINI, A. DE L. E; SPERANDIO, D.; SCAPIM, C. A.; SCHUSTER, I.; VIGANÓ, J. Avaliação de cultivares de soja quanto à tolerância ao estresse hídrico em substrato contendo polietileno glicol. **Acta Scientiarum. Agronomy**, 30(2), 217-223, 2008.

THALMANN, M.; PAZMINO, D.; SEUNG, D.; HORRER, D.; NIGRO, A.; MEIER, T.; KÖLLING, K.; PFEIFHOFER, H. W.; ZEEMAN, S. C.; SANTELIA, D. Regulation of Leaf Starch Degradation by Abscisic Acid Is Important for Osmotic Stress Tolerance in Plants, **The Plant Cell**, Volume 28, Issue 8, Pages 1860–1878, 2016.

TOLRÀ, R. P.; POSCHENRIEDER, C.; LUPPI, B.; BARCELÓ, J. Aluminium-induced changes in the profiles of both organic acids and phenolic substances underlie Al tolerance in *Rumex acetosa* L., **Environmental and Experimental Botany**, Volume 54, Issue 3, 2005.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative Stress and Some Antioxidant Systems in Acid Rain-treated Bean Plants Protective Role of Exogenous Polyamines. **Plant Science**, 151: 59–66, 2000.

WANG, B.; XU, B.; WANG, Y.; PARKER, T.; WANG, Q. Using soybean isoflavone to prevent hydrogen production reaction of aluminium dust and water in wet dust removal systems. **Journal of Loss Prevention in the Process Industries**, 67, 104233, 2020.

WERNER, C. J.; PETER, M.; BALEM, E. M.; BELLÉ, C.; CEOLIN, E. L.; ZANATTA, T. P. AUMONDE, T. Z.; PEDÓ, T. Phosphate fertilization in soybean: seed productivity and physiological quality. **Brazilian Journal of Development**. Curitiba, v. 6, n.6, p.36157-36177 jun. 2020.

YANG, J. Y.; ZHU, X. F.; PENG, Y. X.; ZHENG, C.; LI, G. X.; LIU, Y.; SHI, Y. Z.; ZHENG, S. J. Cell Wall Hemicellulose Contributes Significantly to Aluminum Adsorption and Root Growth in Arabidopsis. **Plant Physiology**, 155 (4) 1885-1892, 2011.

YANG, Z. B.; RAO, I. M.; HORST, W. J. Interaction of aluminium and drought stress on root growth and crop yield on acid soils. **Plant Soil** 372:3–25, 2013.

YU, H. N.; LIU, P.; WANG, Z. Y.; CHEN, W. R.; XU, G. D. 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, 2011.

ZHANG, X. B.; LIU, P. YANG, Y. S.; XU, G. D. Effect of Al in soil on photosynthesis and related morphological and physiological characteristics of two soybean genotypes. **Botanical Studies** (2007) 48: 435-444.

ZHAO, Z.; GAO, X.; KE, Y.; CHANG, M.; XIE, L.; LI, X.; GU, M.; LIU, J.; TANG, X. A unique aluminum resistance mechanism conferred by aluminum and salicylic-acid-activated root efflux of benzoxazinoids in maize. **Plant Soil**, 437:273–289, 2019.

ZHOU, Y.; YANG, Z. XU, Y. Soybean NADP-malic enzyme functions in malate and citrate metabolism and contributes to their efflux under Al Stress. **Front Plant Science** 8:2246, 2018.