

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

Alumínio altera parâmetros morfofisiológicos durante a germinação e crescimento inicial de plântulas de soja (*Glycine max*)

Bruno Guilherme Gonçalves
Doctor Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

BRUNO GUILHERME GONÇALVES

Alumínio altera parâmetros morfofisiológicos durante a germinação e crescimento inicial de plântulas de soja (*Glycine max*)

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

Orientador: Cleberson Ribeiro

Coorientadores: Laercio Junio da Silva
Maximiller D. B. L. Costa

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

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

T

G635a
2023
Gonçalves, Bruno Guilherme, 1993-
Alumínio altera parâmetros morfofisiológicos durante a
germinação e crescimento inicial de plântulas de soja (*Glycine
max*) / Bruno Guilherme Gonçalves. – Viçosa, MG, 2023.
1 tese eletrônica (129 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndices.

Orientador: Cleberson Ribeiro.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Vegetal, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.059>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Soja - Efeito do alumínio. 2. Soja - Efeito do silício.
3. Soja - Fisiologia. 4. Germinação. 5. Estresse oxidativo.
I. Ribeiro, Cleberson, 1980-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Vegetal. Doutorado em Fisiologia
Vegetal. III. Título.

CDD 22. ed. 632.1

BRUNO GUILHERME GONÇALVES

Alumínio altera parâmetros morfofisiológicos durante a germinação e crescimento inicial de plântulas de soja (*Glycine max*)

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

APROVADA: 13 de dezembro de 2023.

Assentimento:

Bruno Guilherme Gonçalves
Autor

Cleberon Ribeiro
Orientador

Essa tese foi assinada digitalmente pelo autor em 13/02/2025 às 23:36:17 e pelo orientador em 14/02/2025 às 11:12:34. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **SREX.GIT2.HKKM** e clique no botão 'Validar documento'.

*Aos meus pais, irmãos e familiares, que sempre torcem por mim.
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por ter me iluminado e ter me concedido coragem, força e determinação na conclusão deste ciclo em minha vida.

Aos meus pais (Juscelino e Maria Aparecida), irmãos (Letícia, Kele, Luis Felipe), avós (Samuel e Tereza), tias (Marilda e Marli) e demais familiares, que sempre me apoiaram nas minhas escolhas e a todo tempo torcem pelo meu sucesso.

À dona Zezé e família, que se tornaram minha nova família em Viçosa.

À Jéssica Ribeiro, que prontamente me acolheu e me aconselhou durante meu tempo em Viçosa, além da sua ótima amizade.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), ao Departamento de Biologia Vegetal – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal (PPG-FV), pela oportunidade de realizar esse curso e ao Departamento de Biologia Geral, por todo suporte oferecido. Agradeço especialmente à secretária do PPG-FV Luciene, pelo seu profissionalismo e eficiência.

Ao Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária (BIOAGRO), ao Laboratório de Genética Molecular de Plantas (LGMP), à Casa de Apoio do LGMP (na pessoa do Carlos Alberto), por todo suporte fornecido durante o andamento do curso.

Ao professor e amigo, Cleberson Ribeiro, pela orientação, dedicação e amizade no decorrer do curso.

Aos meus coorientadores, professores Laércio Silva e Maximiller Costa que tanto contribuíram na orientação desta pesquisa.

Aos professores da pós-graduação, pelo conhecimento compartilhado.

Aos amigos e colegas da pós-graduação que tanto me auxiliaram na condução dos experimentos e pelos momentos de descontração: Allan Lapaz, Bianca Oliveira, Camila Yoshida, Carla Borges, Daniela Fernandes, Débora Alice, Hugo Humberto, Genaína, Jéssica Nayara, João Siqueira, Luciano, Marina, Matheus Ribeiro, Pedro Augusto, Pedro Queiroz, Quézia, Roberto, Thais Vida, Teresinha Souza e Victor Scutari. Agradeço também aos alunos de Iniciação Científica Jr: Diego Mello e Maria Luíza.

Agradeço especialmente aos amigos: Danielle Brito, Renata Andrade, Maria Helena, Jailson Castro, Pedro Oliveira, Elen Ximenes e Clayton Ferreira.

Ao Laboratório de Sementes do Departamento de Agronomia da UFV, na pessoa do Técnico Wander Pereira e Nayara Capobiango; ao Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal, na pessoa da professora Aristéa Azevedo; ao Laboratório de Campo Experimental de Genética e Melhoramento de Milho, na pessoa do técnico Antônio Leonardo; ao Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da UFV,

na pessoa da técnica Karla Ribeiro; à Unidade de Crescimento de Plantas (UCP), na pessoa de Dora Martins; ao Laboratório de Biofísica Ambiental, na pessoa do professor Juraci Oliveira; ao Laboratório de Cultura de Tecidos, na pessoa do professor Wagner Otoni; ao Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, na pessoa de Sâmara Breves; por todo o suporte fornecido. Sem vocês esse trabalho não aconteceria.

À banca examinadora, pelas valiosas contribuições para a construção de um trabalho de qualidade e excelência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão de bolsa de estudos e suporte financeiro, essenciais para a conclusão do curso.

Todos vocês fazem parte da minha história!

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

"Tudo posso, naquele que me fortalece".
(Filipenses 4,13)

"Totus tuus Mariae"!

RESUMO

GONÇALVES, Bruno Guilherme, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2023. **Alumínio altera parâmetros morfofisiológicos durante a germinação e crescimento inicial de plântulas de soja (*Glycine max*)**. Orientador: Cleberson Ribeiro. Coorientadores: Laercio Junio da Silva e Maximiller Dal Bianco Lamas Costa.

O estresse por alumínio (Al) é intensificado em solos ácidos, principalmente devido a sua ionização em cátion trivalente, que é considerada a forma mais tóxica para as plantas. O cultivo da soja (*Glycine max* L. Merrill) é amplamente difundido em áreas onde predominam solos ácidos. A germinação e o estabelecimento da plântula são fases sensíveis do ciclo de vida da planta. Contudo, apesar da relevância dessas fases para o estabelecimento das lavouras, o efeito do Al na germinação de espécies cultivadas ainda é pouco explorado. Algumas estratégias podem ser utilizadas para atenuar a toxidez por Al nessa condição, inclusive o uso do silício (Si). Nesse sentido este trabalho consistiu em: i) avaliar os efeitos do Al sobre a germinação e parâmetros de desempenho de plântulas de 65 cultivares comerciais de soja; ii) avaliar os parâmetros fisiológicos e metabólicos das plântulas de dois cultivares (tolerante e sensível) selecionados no item i); iii) no cultivar tolerante, avaliado o papel do Si (1 mM) e células de borda da raiz (CBRs) na mitigação do estresse por Al (100 e 300 μ M) em plântulas de soja. Na presença de Al, os parâmetros biométricos radiculares foram as características que demonstraram maior importância para diferenciar o desempenho dos cultivares. Estes foram alocados em quatro grupos, aos quais o comportamento diferencial sob estresse por Al pode ser atribuído à maior (Grupos I e II) e menor sensibilidade a este elemento (Grupos III e IV). Dois cultivares com respostas contrastantes ao Al foram selecionados: tolerante (50152RSF IPRO) e sensível (NA5909 RG). Na presença de Al no cultivar tolerante houve a formação de CBRs e a ativação de um sistema antioxidante robusto, contribuindo para minimizar os efeitos do estresse oxidativo ocasionado pelo Al. Em relação ao metabolismo primário, o teor dos açúcares solúveis aumentou e o malato reduziu em ambos os cultivares. Na ausência de Si, o estresse por Al inibiu o crescimento radicular devido ao elevado acúmulo deste elemento nos ápices radiculares que resultou em estresse oxidativo e morte celular. Por outro lado, a adição de Si aumentou a síntese de mucilagem e a presença de CBRs, que reduziu o acúmulo de Al e impediu a ocorrência de estresse oxidativo e danos de membrana nos ápices radiculares, melhorando a performance das plântulas. Nesta terceira etapa foi demonstrado o potencial do Si em atenuar os efeitos tóxicos do Al em soja, atuando como elemento benéfico

para melhorar o desenvolvimento de plantas cultivadas em solos ácidos.

Palavras-chave: células da borda da raiz; estresse oxidativo; metabolismo primário; silício; tolerância ao alumínio

ABSTRACT

GONÇALVES, Bruno Guilherme, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2023. **Aluminum changes morphophysiological parameters in the germination and initial growth of soybean (*Glycine max*) seedlings.** Adviser: Cleberson Ribeiro. Co-advisers: Laercio Junio da Silva and Maximiller Dal Bianco Lamas Costa.

Aluminum (Al) stress is intensified in acidic soils, mainly due to its ionization in trivalent cation, which is considered the most toxic form for plants. Soybean (*Glycine max* L. Merrill) cultivation is widespread in areas where acidic soils predominate. Germination and seedling establishment are sensitive phases of the plant life cycle. Although these phases are significant for crop establishment, the Al effects on the germination of cultivated species is limited and have not been thoroughly explored. Some strategies can be used to mitigate Al toxicity in this condition, including the use of silicon (Si). In this context, this work had the following objectives: i) to evaluate the Al effects on seed germination and performance parameters of seedlings of 65 commercial soybean cultivars; ii) to evaluate the physiological and metabolic parameters of two cultivars seedlings (tolerant and sensitive) selected in item i) and, iii) in the tolerant cultivar, to evaluate the Si role (1 mM) and root border cells (RBCs) in mitigating Al stress (100 and 300 μM) in soybean seedlings. In the presence of Al, the root biometric parameters were the characteristics that demonstrated the greatest importance in differentiating the performance of the cultivars. These were allocated into four groups, to which the differential behavior under Al stress can be attributed to greater (Groups I and II) and lesser sensitivity to this element (Groups III and IV). Two cultivars with contrasting responses to Al were selected: tolerant (50152RSF IPRO) and sensitive (NA5909 RG). In the presence of Al in the tolerant cultivar, RBCs were formed and a robust antioxidant system was activated, contributing to minimizing the effects of oxidative stress caused by Al. To concern primary metabolism, the content of soluble sugars increased and malate reduced in both cultivars. We also observed an increase in the proline content and a reduction of phenols in the tolerant cultivar. In the absence of Si, Al stress inhibited root growth due to the high accumulation of this element in the root tips, resulting in oxidative stress and cell death. On the other hand, Si seems to increase mucilage synthesis and the presence of RBCs, which reduced Al accumulation and prevented oxidative stress and membrane damage in the root tips, improving seedling development. In this third stage, the potential of Si to attenuate the toxic effects of Al in soybeans was demonstrated, acting as a beneficial element to improve the development of plants grown in acidic

soils.

Keywords: root border cells; oxidative stress; primary metabolism; silicon; aluminum tolerance

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	14
REFERÊNCIAS	16
CAPÍTULO 1: Efeito do alumínio sobre a germinação e o desempenho de plântulas de soja	18
Resumo	18
Abstract	19
1 INTRODUÇÃO	20
2 MATERIAL E MÉTODOS	21
2.1 <i>Material vegetal e condições de cultivo</i>	21
2.2 <i>Coleta de dados</i>	22
2.3 <i>Cálculo dos índices de tolerância</i>	23
2.4 <i>Delineamento experimental e análise estatística</i>	24
2.5 <i>Histolocalização do Al</i>	24
3 RESULTADOS	25
3.1 <i>Efeito do Al no desempenho de plântulas</i>	25
3.2 <i>Variabilidade dos cultivares de soja em função da exposição ao Al</i>	26
3.3 <i>Alterações induzidas pelo Al nos índices de tolerância ao estresse</i>	28
4 DISCUSSÃO	28
4.1 <i>Efeitos do Al na germinação de sementes de soja</i>	29
4.2 <i>O Al alterou a morfologia e crescimento de plântulas de soja</i>	30
4.3 <i>Índices de tolerância são estimadores eficientes na fenotipagem de plântulas sob estresse por Al</i>	32
5 CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS	34
APÊNDICE A – Tabela 1	42
APÊNDICE B – Tabela 2	43
APÊNDICE C – Figura 1	44
APÊNDICE D - Figura 2	45
APÊNDICE E - Figura 3	46
APÊNDICE F - Figura 4	47
APÊNDICE G - Figura 5	48
APÊNDICE H - Figura 6	49
APÊNDICE I - Figura 7	50
APÊNDICE J - Figura 8	51

APÊNDICE K (Dados Suplementares) - Figura S1	52
APÊNDICE L (Dados Suplementares) - Figura S2.....	53
APÊNDICE M (Dados Suplementares) - Figura S3.....	54
APÊNDICE N (Dados Suplementares) - Figura S4	55
APÊNDICE O (Dados Suplementares) - Figura S5	56
APÊNDICE P (Dados Suplementares) - Figura S6.....	57
CAPÍTULO 2: Germinando sob estresse: alumínio modula a morfoanatomia e o metabolismo o em ápices radiculares de plântulas de soja.....	58
Resumo.....	58
Abstract.....	59
1 INTRODUÇÃO.....	60
2 MATERIAL E MÉTODOS	62
<i>2.1 Material vegetal e condições de cultivo</i>	<i>62</i>
<i>2.2 Avaliações biométricas.....</i>	<i>63</i>
<i>2.3 Concentração e localização do Al</i>	<i>63</i>
<i>2.4 Localização do Al em ápices radiculares por microscopia confocal.....</i>	<i>63</i>
<i>2.5 Microanálise dos ápices radiculares por microscopia eletrônica de varredura</i>	<i>64</i>
<i>2.6 Quantificação e localização do radical ânion superóxido (O₂⁻).....</i>	<i>64</i>
<i>2.7 Quantificação e localização do peróxido de hidrogênio (H₂O₂)</i>	<i>64</i>
<i>2.8 Quantificação de malondialdeído (MDA) e determinação da viabilidade celular pelo corante Evans blue</i>	<i>65</i>
<i>2.9 Quantificação da atividade das enzimas do sistema antioxidante.....</i>	<i>65</i>
<i>2.10 Análises bioquímicas</i>	<i>66</i>
<i>2.11 Análise estatística</i>	<i>66</i>
3 RESULTADOS	67
4 DISCUSSÃO.....	76
<i>4.1 O Al não alterou a germinação, mas induziu modulação diferencial no desempenho das plântulas</i>	<i>76</i>
<i>4.2 Células de Borda da Raiz protegem os ápices radiculares do Al tóxico.....</i>	<i>78</i>
<i>4.3 Acúmulo de EROs e atividade de enzimas antioxidantes diferenciam os cultivares de soja quanto a sua sensibilidade ao Al.....</i>	<i>78</i>
<i>4.4 A modulação do metabolismo primário reforça respostas de tolerância ao Al em soja</i>	<i>80</i>
5 CONCLUSÃO	82
REFERÊNCIAS.....	83
CAPÍTULO 3: Silício e células da borda da raiz na mitigação do estresse por alumínio em soja: uma parceria que pode dar certo.....	94

Resumo	94
Abstract	95
1 INTRODUÇÃO	96
2 MATERIAL E MÉTODOS	98
2.1 <i>Material vegetal e condições de cultivo</i>	98
2.2 <i>Avaliações biométricas</i>	98
2.3 <i>Quantificação e histolocalização de Al</i>	98
2.4 <i>Localização do alumínio por microscopia confocal</i>	99
2.5 <i>Microanálise de ápices radiculares por espectrômetro de energia dispersiva de raio-X (EDS) acoplado com microscópio eletrônico de varredura (MEV)</i>	99
2.6 <i>Avaliação da viabilidade de CBRs</i>	100
2.7 <i>Visualização da camada de mucilagem de CBRs</i>	100
2.8 <i>Atividade da enzima galacturonase (EC 3.2.1.15)</i>	100
2.9 <i>Quantificação de espécies reativas de oxigênio</i>	100
2.10 <i>Quantificação de malondialdeído (MDA) e determinação da viabilidade celular pelo corante Evans blue</i>	101
2.11 <i>Quantificação da atividade das enzimas do sistema antioxidante</i>	102
2.12 <i>Análises bioquímicas</i>	102
2.13 <i>Delineamento experimental e análise estatística</i>	102
3 RESULTADOS	103
4 DISCUSSÃO	113
5 CONCLUSÃO	117
REFERÊNCIAS	118
APÊNDICE A (Dados Suplementares) - Tabela S1	126
APÊNDICE B (Dados Suplementares) - Figura S1	127
APÊNDICE C (Dados Suplementares) - Figura S2	128
CONCLUSÃO GERAL	129

INTRODUÇÃO GERAL

O alumínio (Al) é o terceiro elemento e o metal mais abundante da crosta terrestre. Entretanto, ele é prejudicial para as plantas em solos ácidos ($\text{pH} < 5,5$) (Kochian *et al.*, 2015), pois nessa condição sua solubilização resulta na forma trivalente (Al^{3+}) que é uma das formas mais tóxicas para as plantas (Singh *et al.*, 2017). A toxidez por Al é um dos principais fatores que limitam a produtividade agrícola (Rasheed *et al.*, 2023). Cerca de 50% dos solos agricultáveis do mundo são ácidos e mais de 60% deles se localizam nos trópicos e subtropicais, onde se situam muitos países em desenvolvimento, configurando-o como um problema de segurança alimentar (Kochian *et al.*, 2015). Embora a prática da calagem seja recomendada, com um dos intuitos de neutralizar a acidez do solo, essa prática não é suficiente para eliminar o efeito da toxidez por Al além de ser economicamente inviável para alguns países (Silva *et al.*, 2012).

O principal sintoma de toxidez por Al é a inibição do crescimento radicular (Rahman; Upadhyaya, 2021). A alta concentração de Al no solo pode restringir o desenvolvimento radicular e conseqüentemente a produtividade das plantas, pois a absorção de água e nutrientes pode ficar comprometida, culminando em estresse hídrico e o nutricional (Nunes-Nesi *et al.*, 2014). Em resposta ao estresse por Al dois mecanismos têm sido sugeridos: mecanismo de exclusão (resistência) e mecanismos de tolerância. As raízes de plantas secretam íons orgânicos como citrato, malato ou oxalato, através de canais na membrana plasmática, que quelam os íons de Al^{3+} presentes na rizosfera impedindo assim que sejam absorvidos pelas plantas (Ofoe *et al.*, 2023). As plantas podem desenvolver mecanismos de tolerância quando este se encontra no simplasto, tornando-o menos prejudicial. Os íons de Al, quando presentes no simplasto, podem ser quelados e compartimentalizados no vacúolo, de modo que não afetam o metabolismo vegetal (Kochian *et al.*, 2015). O estresse oxidativo é um dos principais efeitos ocasionados pelo Al tóxico. As espécies reativas de oxigênio (EROs) podem ocasionar a peroxidação lipídica e comprometer a integridade de membranas (Singh *et al.*, 2017). Em resposta ao estresse oxidativo, sistema antioxidante enzimático produz enzimas antioxidantes tais como catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POX) e ascorbato peroxidase (APX) que atuam removendo as EROs (Rahman; Upadhyaya, 2021).

A soja (*Glycine max* L.) é uma leguminosa de grande importância sócioeconômica, sobretudo na agropecuária brasileira, cujo cultivo é difundido em solos do Cerrado, portanto em condições ideais para a manifestação da toxidez por Al (Malta *et al.*, 2016). Como muitos estudos têm sido conduzidos com o estresse por Al na fase vegetativa, a influência do estresse

por Al na germinação de soja, fase mais sensível do ciclo de vida das plantas, ainda é pouco compreendida (Custódio *et al.*, 2002; Steiner *et al.*, 2021; Suthipradit; Alva, 1986). O estresse por Al pode prejudicar os eventos iniciais da germinação, como absorção de água, expressão gênica, síntese proteica e mobilização de reservas (Silva *et al.*, 2014; Silva e Matos *et al.*, 2016). Com isso, as sementes tendem a perder viabilidade e vigor, culminando na emergência de plântulas frágeis, pouco tolerantes a múltiplos estresses com redução da produtividade (Rodrigues *et al.*, 2019; Steiner *et al.*, 2021).

Neste trabalho nós buscamos investigar o efeito do estresse por Al na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de soja. Os experimentos foram conduzidos em três etapas. Inicialmente foi realizado um *screening* com 65 cultivares de soja que foram classificados quanto a sua sensibilidade ao estresse por Al durante a germinação. Para tal, analisamos treze parâmetros de desempenho, obtidos por meio de análise de imagens de plântulas e raízes, além de massas fresca e seca. No segundo momento, nós escolhemos dois cultivares com desempenho contrastante ao estresse por Al: 50I52RSF IPRO (tolerante) e NA5909 RG (sensível) e avaliamos a resposta diferencial desses cultivares investigando alterações morfológicas, fisiológicas e metabólicas durante a germinação. Na terceira etapa investigamos o efeito do silício (Si) na mitigação do estresse por Al vinculado ao papel das células de borda da raiz (CBRs), no cultivar tolerante. Nesta etapa os experimentos foram conduzidos em solução hidropônica onde os tratamentos consistiram na aplicação combinada de Al e Si; também investigando alterações morfológicas, fisiológicas e metabólicas nos ápices radiculares de soja.

REFERÊNCIAS

- CUSTÓDIO, C. C. *et al.* Estresse por alumínio e por acidez em genótipos de soja. **Scientia Agricola**, Piracicaba, SP, v. 59, n. 1, p. 145-153, Jan./Mar.2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-90162002000100021>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sa/a/6Gmgmg6vWkZ3f44yTPKWvwx/?lang=pt>. Acesso em: 15 dez. 2024.
- KOCHIAN, L.V. *et al.* Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum resistance. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, CA, v. 66, p. 571-598, Abr. 2015. DOI: 10.1146/annurev-arplant-043014-114822. Disponível em: https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev-arplant-043014-114822#abstract_content. Acesso em: 15 dez. 2024.
- MALTA, P. G. *et al.* *Rudgea viburnoides* (Rubiaceae) overcomes the low soil fertility of the Brazilian Cerrado and hyperaccumulates aluminum in cell walls and chloroplasts. **Plant and Soil**, Dordrecht, Netherlands, v. 408, pg. 369–384, Jun. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-016-2926-x>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-016-2926-x#citeas>. Acesso em: 15 dez. 2024.
- NUNES-NESI A. *et al.* The complex role of mitochondrial metabolism in plant aluminum resistance. **Trends in Plant Science**, Cambridge, MA, v. 19, n. 6, p. 399-407, Jun. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.12.006>. Disponível em: [https://www.cell.com/trends/plant-science/abstract/S1360-1385\(13\)00283-5?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1360138513002835%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/trends/plant-science/abstract/S1360-1385(13)00283-5?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1360138513002835%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 15 dez. 2024.
- OFOE, R. *et al.* Aluminum in plant: Benefits, toxicity and tolerance mechanisms. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, Switzerland, v. 13, p. 1-24, Jan. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1085998>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2022.1085998/full>. Acesso em: 15 dez. 2024.
- PIRES, A. R. P.; SILVA, B. (org.). **Normalização de trabalhos acadêmicos**: atualizada conforme ABNTs NBR 14724/2011, NBR 6023/2018 e NBR 10520/2023. Viçosa, MG: UFV, Biblioteca Central, 2024. 147 p. Disponível em: <https://www.bbt.ufv.br/manual-de-normalizacao-de-trabalhos-academicos/>. Acesso em: 11 de dez. de 2024.
- RAHMAN, R.; UPADHYAYA, H. Aluminium toxicity and its tolerance in plant: a Review. **Journal of Plant Biology**, Heidelberg, Germany, v. 64, p. 101–121, Abr. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12374-020-09280-4>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12374-020-09280-4#citeas>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.
- RASHEED, A. *et al.* Development of aluminium (Al)-tolerant soybean using molecular tools: limitations and future directions. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, NY, v. 42, p. 7403-7417, Jun. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00344-023-11051-7>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00344-023-11051-7#citeas>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

RODRIGUES, A. A. *et al.* Tolerance of *Eugenia dysenterica* to aluminum: germination and plant growth. **Plants**, Basel, Switzerland, v. 8, n. 9, p. 1-15, Ago. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants8090317>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2223-7747/8/9/317>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

SILVA, S. Aluminium toxicity targets in plants. **Journal of Botany**, New York, NY, v. 2012, n.1, p. 1-8, Jul. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1155/2012/219462>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2012/219462>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

SILVA, G. E. A. *et al.* Seeds' physicochemical traits and mucilage protection against aluminum effect during germination and root elongation as important factors in a biofuel seed crop (*Ricinus communis*). **Environmental Science and Pollution Research**, Heidelberg, Germany, v. 21, p. 11572-11579, Jun. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3147-6>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-014-3147-6>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

SILVA, P.; MATOS, M. Assessment of the impact of aluminum on germination, early growth and free proline content in *Lactuca sativa* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, CA, v. 131, p. 151-156, Set. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.05.014>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0147651316301762>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

SINGH, S. *et al.* Toxicity of aluminium on various levels of plant cells and organism: a review. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, England, v. 137, p. 177-193, Maio 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.01.005>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0098847217300059>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

STEINER, F. *et al.* Multivariate adaptability and stability of soya bean genotypes for abiotic stresses. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Hoboken, NJ, v. 207, n. 2, p. 354–361. Out. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/jac.12446>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jac.12446>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

SUTHIPRADIT, S.; ALVA, A. K. Aluminum and pH limitations for germination and radicle growth of soybean. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, PA, v. 9, n. 1, p. 67-73, 1986. DOI: <https://doi.org/10.1080/01904168609363424>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01904168609363424>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

CAPÍTULO 1: Efeito do alumínio sobre a germinação e o desempenho de plântulas de soja

Resumo

O estresse por alumínio (Al) é intensificado em solos ácidos, principalmente devido a sua ionização em cátion trivalente, que é considerado a forma mais tóxica para as plantas. O cultivo da soja (*Glycine max* L. Merrill) é amplamente difundido em áreas onde predominam solos ácidos. A germinação e o estabelecimento da plântula são fases sensíveis do ciclo de vida da planta. Contudo, apesar da relevância dessas fases para o estabelecimento das lavouras o efeito do Al na germinação de espécies cultivadas ainda é pouco explorado. Neste trabalho objetivamos avaliar os efeitos do Al sobre a germinação e parâmetros de desempenho de plântulas de 65 cultivares comerciais de soja e classificá-los quanto ao nível de tolerância a este metal. As sementes foram submetidas a três concentrações de AlCl_3 : 0; 1,5 e 3,0 mM em pH 4,0. Após 72 horas foi avaliada a porcentagem de germinação das sementes e mensurados os parâmetros biométricos nas raízes. Adicionalmente, foram calculados indicadores de desempenho e índices de tolerância das plântulas, com base no percentual de germinação e índice de vigor. Os dados foram submetidos à análise de correlação linear, componentes principais e de agrupamento e os cultivares foram classificados quanto à tolerância ao estresse por Al. Na presença de Al, o índice de crescimento, comprimento de raiz e comprimento total foram os parâmetros que apresentaram maior redução. Na presença de Al (1,5 e 3,0 mM) de Al as características de massa fresca, massa seca, comprimento total, índice de crescimento e vigor, comprimento, área e volume de raiz apresentaram maior importância para diferenciar o desempenho dos cultivares. Os cultivares foram alocados em quatro grupos, aos quais pode-se atribuir o comportamento diferencial sob estresse por Al em maior (Grupos I e II) e menor sensibilidade a este elemento (Grupos III e IV). O índice de tolerância ao estresse (ITE), índice de tolerância (ITol), índice de sensibilidade ao estresse (ISE) e tolerância (TOL) foram eficientes para diferenciar os cultivares quanto à sua tolerância ao Al. Por fim, destacamos dois cultivares contrastantes ao estresse por Al: tolerante (50152RSF IPRO) e sensível (NA5909 RG).

Palavras-chave: alumínio trivalente; desempenho de plântulas; índices de tolerância; solos ácidos.

Abstract

Aluminum (Al) stress is intensified in acidic soils, mainly due to its ionization in trivalent cation, which is considered the most toxic form for plants. Soybean (*Glycine max* L. Merrill) cultivation is widespread in areas where acidic soils predominate. Germination and seedling establishment are sensitive phases of the plant life cycle. Although these phases are significant for crop establishment, the Al effects on the germination of cultivated species is limited and have not been thoroughly explored. In this study, we evaluated the Al effects on seed germination and seedlings development of 65 commercial soybean cultivars, and classify them according to the tolerance level to this metal. The seeds were germinated in three AlCl₃ concentrations: 0, 1.5, and 3.0 mM at pH 4.0. After 72 hours, seed germination percentage was evaluated, and the biometric parameters of the roots were measured. Furthermore, performance indicators and tolerance indices were determined using the germination percentage and vigor index as parameters. The data were analyzed using linear correlation, principal component analysis, and cluster analysis, and the cultivars were subsequently classified based on their tolerance to aluminum stress. In the presence of Al, the growth index, root length, and total length were the parameters that showed the greatest reduction. In the presence of Al (1.5 and 3.0 mM), the characteristics of fresh mass, dry mass, total length, growth index and vigor, length, area, and volume root were more important to differentiate the performance of the cultivars. The cultivars were allocated into four groups, to which the differential behavior under Al stress can be attributed to greater (Groups I and II) and lesser sensitivity to this element (Groups III and IV). The stress tolerance index (STI), tolerance index (ITol), stress sensitivity index (SSI), and tolerance (TOL) were efficient in differentiating cultivars regarding their tolerance to Al. Finally, we highlighted two contrasting cultivars to Al stress: tolerant (50152RSF IPRO) and sensitive (NA5909 RG).

Keywords: trivalent aluminum; seedling performance; tolerance indices; acid soils.

1 INTRODUÇÃO

O alumínio (Al) é o terceiro elemento mais abundante na crosta terrestre e em solos ácidos ($\text{pH} \leq 5,5$) se torna solúvel ao ser convertido em Al^{3+} , sua forma mais tóxica para as plantas (Ofoe *et al.*, 2023; Rahman; Upadhyaya, 2021). Cerca de 50% dos solos agricultáveis do mundo são ácidos e mais de 60% deles estão localizados nos trópicos e subtropicais, regiões estratégicas para a produção de alimentos (Kochian *et al.*, 2015). O Al^{3+} é um dos agentes abióticos que contribuem para a redução da produtividade agrícola em solos ácidos (Kundu; Ganesan *et al.*, 2023), pois limita o crescimento radicular e o desenvolvimento das plantas (Hu *et al.*, 2020; Kochian *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2017).

A soja (*Glycine max* L. Merrill) é uma leguminosa de grande relevância para a segurança alimentar. A crescente demanda do mercado mundial por essa leguminosa transformou-a em uma importante cultura agrícola em regiões de clima tropical e subtropical. Nessas áreas, as condições edafoclimáticas favoráveis potencializam o rendimento das lavouras, porém favorecem a acidificação dos solos em associação com o uso intensivo de fertilizantes. Dessa forma, as plantas cultivadas são submetidas ao estresse por Al (Steiner *et al.*, 2021) e com potencial para reduções na produtividade (Jahan *et al.*, 2021; Rasheed *et al.*, 2023). Os estudos envolvendo o estresse por Al em soja normalmente são realizados durante a fase vegetativa, onde as sementes germinam em condições ótimas e o Al é aplicado a partir do estágio vegetativo (Baquy *et al.*, 2018; Lan *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2020). Contudo, as sementes no campo são expostas ao Al presente no solo tão logo são semeadas, o que pode afetar sua germinação e o crescimento das plântulas. Porém, os efeitos do estresse por Al na germinação de sementes de soja ainda são pouco compreendidos (Custódio *et al.*, 2002; Steiner *et al.*, 2021; Suthipradit; Alva, 1986).

A germinação da semente e o estabelecimento das plântulas são as fases mais sensíveis do ciclo de vida das plantas (Kouki *et al.*, 2021; Steiner *et al.*, 2021), sobretudo na presença de metais pesados (Seneviratne *et al.*, 2019; Talebi *et al.*, 2014). Durante a embebição das sementes em solos ácidos pode ocorrer a assimilação do Al^{3+} e, conseqüentemente, comprometer o desempenho das plântulas no campo (Rajjou *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2019). O ápice da radícula é a região mais afetada pelo Al, com maior sensibilidade após a germinação (Marciano *et al.*, 2010). A afinidade da parede, membrana e núcleo celulares pelo Al favorece o seu acúmulo nos tecidos vegetais, prejudicando a divisão e expansão celular. Dessa forma, a arquitetura, morfologia e função das raízes podem ser comprometidas pelo Al, culminando na inibição do crescimento radicular (Brito *et al.*, 2020; Ribeiro *et al.*, 2022; Yoshida *et al.*, 2023). Plântulas com sistemas radiculares danificados apresentam eficiência

reduzida na absorção de água e nutrientes. Portanto, o estresse por Al pode resultar na emergência e estabelecimento de plântulas frágeis, pouco tolerantes a múltiplos estresses e culminar em baixas produtividades (Hu *et al.*, 2020; Kochian *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2017).

A exposição de sementes de vários cultivares de uma mesma espécie a uma condição de estresse, conjugada a coleta de indicadores biométricos e análise multivariada dos dados, permitem ranqueá-los quanto a sensibilidade ou tolerância a essa condição. A fenotipagem durante a etapa germinativa pode ser um forte aliado na seleção de cultivares mais resistentes a uma condição de estresse (Steiner *et al.*, 2021). A análise computadorizada de imagens pode potencializar estudos de fenotipagem de plântulas, pois elimina a subjetividade e otimiza os resultados (Castan *et al.*, 2018; Gomes-Júnior *et al.*, 2014; Hoffmaster *et al.*, 2005).

Os objetivos desse trabalho foram avaliar os efeitos do Al sobre a germinação e os indicadores biométricos de plântulas de 65 cultivares de soja e classificá-los quanto ao nível de tolerância a este metal. Além disso, procurou-se responder à questão: quais indicadores biométricos são mais eficientes para discriminar o desempenho dos cultivares de soja expostas ao Al na fase de plântulas? Nós hipotetizamos que os 65 cultivares se comportam diferencialmente em resposta ao Al durante a germinação, possibilitando classificá-los quanto a tolerância ao Al; e que os cultivares mais resistentes podem apresentar alta performance no campo, culminando no seu máximo potencial produtivo na presença de Al. Os cultivares tolerantes selecionados podem ser usados em pesquisas futuras sobre o efeito do Al no desempenho de plântulas de soja nas fases iniciais de desenvolvimento da planta. Os resultados desse trabalho também podem subsidiar o trabalho dos melhoristas na prospecção de genes de resistência ao estresse por Al em soja.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e condições de cultivo

Sementes de 65 cultivares de soja (Tabela 1) foram produzidas no campo experimental Diogo Alves de Melo do Departamento de Agronomia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil (20°45'14"S, 42°52'54"W, 650 m de altitude). Inicialmente determinou-se o grau de umidade das sementes (Brasil, 2009) e lotes cujas sementes apresentaram grau de umidade inferior a 12% foram submetidas à pré-embebição antes da montagem do experimento, para evitar danos por embebição. A assepsia das sementes foi realizada por imersão em hipoclorito de sódio (NaOCl) 2,5% durante dois minutos, seguido de tríplice lavagem em água destilada. Para o teste de germinação foram utilizadas quatro repetições com 20 sementes semeadas em rolos de papel de germinação (Germitest®)

umedecidos com volume de solução (água ou Al) igual a 2,5 vezes o peso seco do papel. Os tratamentos avaliados foram ausência de Al (controle, água pH 4,0); e soluções de 1,5 ou 3,0 mM de Al na forma de AlCl₃ com pH ajustado para 4,0. As sementes foram mantidas durante três dias em germinador do tipo Mangelsdorf, sob fotoperíodo de 8/16 horas de luz/escuro, (200 μmol de fótons m⁻²s⁻¹) a 25 °C (±1) e umidade controlada (90% UR) (Brasil, 2009).

2.2 Coleta de dados

Decorridos três dias, as plântulas foram avaliadas quanto ao crescimento por meio do software Vigor-S[®] (Castan *et al.*, 2018). As plântulas foram transferidas para uma folha azul (30 cm x 20 cm) de Etileno Acetato de Vinila (EVA) para a digitalização em escâner HP Scanjet 200, instalado em posição invertida no interior de uma caixa (60 x 50 x 12 cm), acoplado a um computador; com resolução da imagem ajustada para 300 dpi. Foram obtidos o comprimento hipocótilo (CHIP), o comprimento total da plântula (CTP), o índice de crescimento (Icresc), índice de vigor (Ivigor) e índice de uniformidade (Iunif). O número de sementes germinadas foi contabilizado, calculando-se o percentual de germinação (Ger). O critério adotado para considerar a semente como germinada foi a protrusão radicular (comprimento da raiz ≥ 10 mm) (Steiner *et al.*, 2021). Com o software WinRHIZO[®] (Regent Instruments, Québec, Canada) acoplado a um escâner profissional EPSON Perfection 10000XL (Epson, Nagano, Japão) foram obtidos os parâmetros de crescimento radicular: comprimento total da raiz (CTR), área superficial da raiz (ASR), diâmetro médio da raiz (DMR) e volume da raiz (VR). Por fim, foi determinado a massa fresca (MFR) e seca (MSR) das raízes das plântulas pelo método da estufa (65 °C até atingir massa constante) e teor de água da raiz em base seca (TAR).

Para cada cultivar avaliado sob Al (1,5 e 3,0 mM) foi calculado o Índice Biométrico (IB), conforme equação 1:

$$IB = IB_s/IB_c \quad (1)$$

onde: IB_s é o valor obtido no estresse e IB_c é o valor obtido no controle, para cada característica biométrica avaliada. Portanto foram obtidos: índice do hipocótilo (IH), índice do comprimento total da plântula (ICT), índice de vigor (IV), índice de crescimento (IC), índice de uniformidade (IU), índice de germinação (IG), índice de massa fresca da raiz (IMF), índice de massa seca da raiz (IMS), índice do teor de água da raiz (ITA), índice do comprimento total da raiz (ICR), índice de área superficial da raiz (IASR), índice do diâmetro médio da raiz (IDMR) e índice do

volume da raiz (IVR). Com o somatório de todos os índices biométricos (IBs) de um cultivar foi calculado o seu índice de tolerância (ITol,) conforme equação:

$$ITol = IH + ICT + IV + IC + IU + IG + IMF + IMS + ITA + ICR + IASR + IDMR + IVR \quad (2)$$

2.3 Cálculo dos índices de tolerância

Dois parâmetros germinativos foram escolhidos para calcular os índices de tolerância ao estresse: o Ivigor (Sako *et al.*, 2001) e o Ger. O Ivigor é um índice calculado a partir do Icrec e Iunif. O Icrec é calculado por meio do comprimento da raiz (peso de 90%) e hipocótilo (peso de 10%) (Castan *et al.*, 2018). Como os demais IBs são mensurações da raiz, o Ivigor representa todas as características biométricas obtidas. O Ivigor de plântulas na ausência de Al ou controle (IV_c) e o Ivigor das plântulas na presença de Al (1,5 ou 3,0 mM) ou estresse (IV_s), respectivamente, foram calculados utilizando as equações:

$$IV_c = (\text{Ivigor} \times \text{Ger}) / 100 \quad (3)$$

$$IV_s = (\text{Ivigor} \times \text{Ger}) / 100 \quad (4)$$

Esses índices de vigor foram utilizados para calcular os demais índices por meio das equações a seguir:

$$\text{Índice Médio do Vigor (IMV)} = (IV_c + IV_s) / 2 \quad (5)$$

$$\text{Intensidade do Estresse (IE)} = 1 - (\overline{IV_s} / \overline{IV_c}) \quad (6)$$

Onde $\overline{IV_c}$ é o índice de vigor médio das plântulas de todos os cultivares na ausência de Al e $\overline{IV_s}$ é o índice de vigor médio das plântulas de todos os cultivares sob Al (1,5 ou 3,0 mM). Quanto maior IE maior será a intensidade do estresse, cujo valor varia de 0 a 1.

$$\text{Tolerância (TOL)} = (IV_c - IV_s) \quad (7)$$

O cálculo de tolerância (TOL) se baseia na diferença de performance do cultivar em condições ideais (IV_c) e condições de estresse (IV_s). Maior valor de TOL significa maior sensibilidade ao estresse.

$$\text{Produtividade Média Geométrica (PMG)} = \sqrt{\overline{IV_s} \times \overline{IV_c}} \quad (8)$$

Maior valor de PMG indica maior tolerância ao estresse.

$$\text{Índice de Sensibilidade ao Estresse (ISE)} = (1 - (IV_s / IV_c)) / IE \quad (9)$$

Maior valor do Índice de Sensibilidade ao Estresse (ISE) indica maior sensibilidade ou menor tolerância ao estresse. ISE menor que 1 é indicativo de tolerância do cultivar, pois a redução no desempenho sob estresse é menor do que a redução média de todos os cultivares sob estresse (Hosseini *et al.*, 2012).

$$\text{Índice de Tolerância ao Estresse (ITE)} = (IV_s \times IV_c) / (IV_c)^2 \quad (10)$$

Quanto maior o valor do Índice de tolerância ao estresse (ITE) maior a tolerância ao estresse e seu potencial de desempenho tanto em condições ideais quanto em condições de estresse (Fernandez, 1992).

2.4 Delineamento experimental e análise estatística

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições e três tratamentos: 0; 1,5 e 3,0 mM de Al. Cada parcela foi composta por 20 sementes. Todas as características biométricas coletadas foram utilizadas na análise descritiva (Tabela 2) e distributiva (box plot, Fig. 1). Os IBs e os índices de tolerância calculados foram submetidos a análise de correlação linear de Pearson r , cuja significância foi determinada pelo Teste t ($p < 0,05$). Com esses índices realizou-se a análise de componentes principais (ACP). Com o método de Mojena (1977) foram estimados o número ótimo de *clusters* e, a partir das variáveis quantitativas de medidas de dissimilaridade dos cultivares realizou-se o agrupamento de cultivares, sucedendo com a estimativa da distância Euclidiana entre os grupos. O *heatmap* foi construído com o pacote ‘pheatmap’. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software R x 64 4.0.5 (R Core Team, 2021).

2.5 Histolocalização do Al

A intensidade de acúmulo de Al foi avaliada em ápices radiculares através da coloração com hematoxilina férrica em dois cultivares: 50I52RSF IPRO (tolerante) e NA5909 RG (sensível), parte II do projeto. As raízes foram destacadas e lavadas em água destilada e imersas em solução de hematoxilina férrica 0.2% (p/v) em KIO₃ 0,02% (p/v) por 15 min (Polle *et al.*, 1978). O excesso do corante foi removido com nova lavagem em água destilada. Amostras de ápices radiculares com 2 cm de comprimento a partir do ápice, foram fotografados em estereomicroscópio (Zeiss Stemi 305, modelo DV4, Alemanha). A reação positiva da

hematoxilina com o Al é caracterizada pela cor púrpura, cuja intensidade de coloração se correlaciona com a concentração do Al presente no tecido.

3 RESULTADOS

3.1 Efeito do Al no desempenho de plântulas

A Tabela 2 contém a estatística descritiva dos parâmetros biométricos avaliados nos três tratamentos (0; 1,5 e 3,0 mM de AlCl_3), que demonstra as alterações no desempenho das plântulas de soja induzidas pela exposição ao Al. No tratamento 1,5 mM de Al as maiores reduções ocorreram nos parâmetros Icresc, CTR e CTP (17,8%; 17,1% e 10,8%, respectivamente) em relação ao controle. Também foram observadas reduções nos parâmetros Ivigor (11,0%), CHIP (9,2%) e ASR (8,4%). De igual forma, sob Al 3,0 mM de Al o Icresc, CTR e CTP também foram os parâmetros biométricos que apresentaram as maiores reduções 35,8; 30,2% e 24,7%, respectivamente. Ainda neste tratamento houve reduções no Ivigor (22,1%), ASR (19,2%), CHIP (17,3%) e MFR (15,6%). Ao comparar os valores médios dos parâmetros obtidos nas duas concentrações de Al, o Icresc foi o que mostrou maior redução (21,9%), seguido pelo CTP (18,1%) e CTR (15,7%). A germinação das sementes e a uniformidade das plântulas expostas ao Al apresentaram pequenas reduções: 2,2% e 2,8% sob 1,5 mM e 5% e 5,5% sob 3,0 mM, respectivamente, em relação ao controle (Tabela 2). O VR (14,7%) e DMR (10,7%) reduziram com maior magnitude no tratamento 3 mM e o DMR foi o único parâmetro que aumentou com a exposição ao Al nas concentrações de 1,5 e 3,0 mM (2,4 e 6%, respectivamente). Devido a magnitude gradativa na qual os parâmetros biométricos foram alterados nós classificamos o tratamento de 1,5 mM como estresse moderado (EM) e o tratamento de 3,0 mM como estresse severo (ES).

A Figura 1 demonstra o box plot das características avaliadas em todos os cultivares para cada tratamento, cujo comportamento para cada característica avaliada se assemelha aos dados apresentados na Tabela 2. O Ger e Iunif (Fig. 1A e G) foram as características menos afetadas. Os parâmetros CHIP, CTR, CTP, Ivigor, Icresc e ASR (Fig. 1B, C, D, E, F e K) sofreram redução gradativa com o aumento da concentração de Al. Os valores de MFR, MSR, TAR e VR (Fig. 1H, I, J e M) sob EM foram similares ao controle e reduziram mais intensamente sob ES. Apenas o DMR (Fig. 1L) aumentou na presença de Al.

3.2 Variabilidade dos cultivares de soja em função da exposição ao Al

Com os 13 IBs obtidos para cada cultivar foram calculados os coeficientes de correlação, gerado a ACP e os cultivares foram agrupados. A correlação para a maioria dos IBs foi significativa para aquelas plântulas oriundas de sementes germinadas sob EM (Fig. 2). Aqui consideramos como correlação forte a relação entre os parâmetros que apresentaram coeficiente igual ou superior a 0,7. Destacamos a correlação positiva e forte entre IH e ICT; ICR e IASR; IV e ICT, IV e IC; ICT e IC; IMF e IMS; IASR e IVR. A correlação positiva mais forte obtida foi entre ICT e IC (0,90), seguido por IMF e IMS (0,86), IASR e IVR (0,83) e ICR e IASR (0,81). Por outro lado, houve correlação negativa moderada envolvendo o IDMR com o ICR, IV, ICT e IC

A correlação para a maioria dos indicadores biométricos também foi significativa para as plântulas oriundas de sementes germinadas na presença de Al 3,0 mM (Fig. 3). Destacamos a forte correlação positiva entre ICR e IASR, ICT, IC; IASR e ICT, ICR, IMF; IV e ICT, IC; ICT e IC, IH; IVR e IMF, IMS; IMF e IMS. Entre as concentrações de 1,5 e 3,0 mM de Al, respectivamente, houve semelhança entre as correlações mais fortes: ICT e IC (0,95) seguido por IMF e IMS (0,9 e 0,93); ICR e IASR (0,81 e 0,87); IASR e IVR (0,83 e 0,86); IV e IC (0,84 e 0,85); IV e ICT (0,84 e 0,83). Semelhantemente ao verificado no estresse por 1,5 mM e Al o IDMR foi o único indicador que apresentou correlação linear negativa significativa, porém moderada com o ICR, IV, ICT e IC.

A APC demonstra a variação no desempenho dos 65 cultivares de soja sob EM e ES, imposto pela toxicidade do Al. Na APC para as sementes germinadas sob 1,5 mM de Al (Fig. 4), os dois primeiros componentes principais (CP1 e CP2) explicaram 61,2% da variabilidade total dos dados. Cada componente explicou individualmente 46,0 e 15,2%, respectivamente. Com exceção do IDMR todos os IBs avaliados ajudam a explicar a separação dos cultivares tolerantes ao Al, tendo os os vetores IMF, IMS, IASR, ICT, IV e IC apresentado maior importância para diferenciar o desempenho dos cultivares sob EM. Na APC com os IBs para os cultivares sob ES (Fig. 5), os dois primeiros componentes principais (CP1 e CP2) explicaram 68,7% da variabilidade total dos dados. Cada componente explicou individualmente 53,5% e 15,2%, respectivamente. Nesta APC, assim como sob a concentração de 1,5 mM de Al, os vetores IMF, IMS, IVR, ICT, IC, IV e ICR apresentaram maior importância para diferenciar o desempenho das cultivares tolerantes sob 3,0 mM de Al. Destaca-se que o IDMR foi o único IB que contribuiu para explicar a separação dos cultivares sensíveis.

A variabilidade dos cultivares de soja sob exposição ao Al possibilitou a formação de quatro grupos, tanto sob EM (Fig. 6) quanto sob ES (Fig. 7), permitindo assim, uma clara

distinção do desempenho das plântulas sob exposição ao Al: Grupo I (cultivares moderadamente sensíveis), Grupo II (cultivares sensíveis), Grupo III (cultivares moderadamente tolerantes) e Grupo IV (cultivares tolerantes). O grupo I (ITol = 11,8) foi formado pela maioria dos cultivares, 35,38%. No grupo II estão 13,84% dos cultivares, que apresentaram menor tolerância sob ES (ITol = 10,61), portanto são os mais sensíveis a este elemento. Este grupo contém os cultivares que apresentaram as menores médias para os IBs: IH (0,81), ICR (0,71), ICT (0,67), IC (0,62), IV (0,75), IMF (0,75), IMS (0,81), IASR (0,76) e IVR (0,82); e maior IB para IDMR (1,07). O grupo III (ITol = 12,68) foi composto por 23,07% dos cultivares e o grupo IV é composto pelos cultivares que apresentaram maior tolerância ao Al sob EM (ITol = 13,5). Nesse grupo foram alocados 27,69% dos cultivares, que apresentaram os maiores IBs para IV (1,00), IU (1,06), IMF (1,17), IMS (1,18), ITA (1,00), IASR (1,03) e IVR (1,08).

Já no ES o grupo I (ITol 11,01) abrangeu 16,92% dos cultivares. Assim como no EM, no grupo II (ITol 9,81) estão os menores IBs relacionados ao crescimento, que refletem maior sensibilidade dos cultivares ao Al: IH (0,68), ICR (0,67), ICT (0,56), IC (0,50), IV (0,68), IMF (0,69), IMF (0,78), IASR (0,71) e IVR (0,77), além do maior IB para IDMR (1,09). Este grupo (ITol = 12,93) é composto por 43,07% dos cultivares avaliados. O grupo III (ITol = 11,86) compreendeu 15,38% dos cultivares e o grupo IV, composto pelos cultivares que apresentaram maior tolerância sob ES (ITol = 13,21), se destacaram pelos maiores IH (1,04), ICT (0,98), IU (1,07), IMF (1,05), IMS (1,12), ICR (1,95) e IASR (0,99). Nesse grupo foram alocados 24,61% dos cultivares. Quando a intensidade do estresse foi aumentada (ES = 0,23) foi observado uma modificação na distribuição dos cultivares entre os grupos. Nos grupos I, III e IV o percentual de cultivares reduziu em 18,46; 7,69 e 3,08%, respectivamente; enquanto o número de cultivares aumentou em 29,23% no grupo II. Isso sugere que o aumento da intensidade do estresse aumentou a frequência de cultivares no grupo mais sensível ao Al.

Dentre os 65 cultivares avaliados destacamos dois cultivares contrastantes quando submetidos ao estresse por Al: 50I52RSF IPRO (tolerante) e NA5909 RG (sensível). O cultivar 50I52RSF IPRO foi classificado no grupo IV (Fig. 6 e 7) enquanto que o cultivar NA5909 RG foi classificado no grupo II, tanto sob EM quanto sob ES (Fig. 6 e 7). O cultivar tolerante apresentou performance superior ao sensível sob estresse por Al (Fig. 8A), cujos parâmetros de crescimento reduziram sob exposição ao Al, principalmente o CTR e CTP (Fig. 8A).

Por meio do teste de hematoxilina, nos ápices radiculares observamos acúmulo de Al nos cultivares sensível e tolerante na concentração de 3.0 mM (Fig. 8B), cuja intensidade de coloração foi maior para o cultivar sensível. O Al também foi histolocalizado com o

Cromoazurol em células meristemáticas de ápices radiculares, que revelou acúmulo de Al no núcleo das células de ambos os cultivares na concentração de 3,0 mM (resultados não mostrados).

3.3 Alterações induzidas pelo Al nos índices de tolerância ao estresse

A intensidade do estresse (IE) foi calculada nas concentrações de 1,5 e 3,0 mM de Al com base no percentual de germinação e índice de vigor médio das plântulas de 65 cultivares de soja. Os valores obtidos de IE foram de 0,10 e 0,23 para EM e ES, respectivamente evidenciando aumento na intensidade do estresse ao duplicar a concentração de Al no meio de germinação. Neste estudo, o ITE e ISE foram eficientes na distinção do desempenho dos cultivares na presença de Al e estes índices se correlacionaram negativa e significativamente. O ITol se correlacionou positiva e significativamente com o ITE, enquanto o TOL se correlacionou positiva e significativamente com o ISE (Figura S1, S2). Dessa forma, os estimadores ITE, ISE, TOL e ITol são os índices que foram mais eficientes para explicar a maior variação dos cultivares sob EM e ES por Al (Fig. S3, S4). Com esses dados os cultivares foram reunidos em quatro grupos. Aqueles mais tolerantes segundo essa classificação apresentaram os menores valores de TOL e ISE e os cultivares mais sensíveis apresentaram os menores valores de ITE e ITol (Fig. S5, S6). Sob EM e ES dentre os cultivares mais tolerantes destacamos C5, C9 e C11. Dentre os cultivares mais sensíveis destacamos C10, C16, C24 (Fig. S5, S6). Os índices IVs, índice médio do vigor (IMV) e PMG estão diretamente associados com o desempenho do lote de cada cultivar, por isso não foram eficientes em discriminar os cultivares quanto a sensibilidade ao Al.

4 DISCUSSÃO

Neste trabalho nós mostramos o desempenho diferencial de 65 cultivares de soja (Tabela 1) submetidos à duas concentrações de Al (1,5 e 3,0 mM) durante o processo de germinação. Ao final, esses cultivares foram distribuídos em quatro grupos (Fig. 6 e 7) frente a sua tolerância a este metal. As informações obtidas nesse trabalho contribuem na definição de características biométricas de maior relevância no desempenho de plântulas de soja cultivadas na presença de Al, inclusive índices de tolerância que têm sido empregados na seleção de cultivares tolerantes ao estresse abiótico (Capobiango *et al.*, 2023). O estudo do desempenho de plântulas na presença de Al em condições controladas fornece *insights* do comportamento das plântulas no campo, otimizando o trabalho dos melhoristas (Custódio *et al.*, 2002; Steiner *et al.*, 2021).

Os IBs obtidos para as concentrações de Al demonstram a variabilidade dos cultivares de soja em resposta ao estresse, apesar do curto tempo de exposição (Fig. 4 e 5). Os cultivares que apresentaram alto desempenho sob estresse por Al resultaram em maiores valores de IMF, IMS, ICT, IC, ICR e IVR (Fig. 4 e 5). Os cultivares que apresentaram desempenho inferior, por outro lado, mostraram menores valores para estas características. Assim, os cultivares responderam diferencialmente ao estresse por Al (Rasheed *et al.*, 2023; Steiner *et al.*, 2021) e essa variabilidade pode ser explicada pelos vários mecanismos de tolerância presentes nas plantas: modificação do pH da rizosfera (Riaz *et al.*, 2018); exsudação de ácidos orgânicos (Nunes-Nesi *et al.*, 2014); imobilização do Al em tecidos externos (Andrade *et al.*, 2023; Silva *et al.*, 2020), modulação do sistema antioxidante enzimático (Ribeiro *et al.*, 2022; Yoshida *et al.*, 2023) e modulação do metabolismo primário (Andrade *et al.*, 2023; Silva *et al.*, 2023). A eficiência de um ou mais destes mecanismos pode influenciar na resposta diferencial à presença do Al em diferentes cultivares de uma mesma espécie (Rasheed *et al.*, 2023).

Como diferentes cultivares respondem diferencialmente aos estresses abióticos é possível agrupá-los quanto ao nível de tolerância (Steiner, *et al.* 2021). Nas duas concentrações avaliadas os cultivares foram alocados em quatro grupos que se diferiram quanto a tolerância ao Al, nas condições em que os ensaios foram desenvolvidos (Fig. 6 e 7). Com o aumento da intensidade do estresse houve uma redistribuição dos cultivares entre os grupos, com redução no percentual de cultivares alocados nos grupos I, III e IV e aumento expressivo do percentual de cultivares no grupo II (maior sensibilidade). Isso indica a transição de cultivares que antes estavam em grupos de maior tolerância para grupos de menor tolerância ao Al.

4.1 Efeitos do Al na germinação de sementes de soja

Apesar de alguns autores relatarem redução no percentual de germinação para *Cajanus cajan* (Madhan *et al.*, 2014), *Ricinus communis* (Silva *et al.*, 2014), *Oryza sativa* (Qianqian *et al.*, 2023; Xu *et al.*, 2017) e *Helianthus annuus* L. (Cai *et al.*, 2022), neste trabalho a redução da germinação foi 2,2 e 5% sob EM e ES, respectivamente (Tabela 2, Fig. 1A). O IG não foi decisivo na diferenciação entre cultivares (Fig. 4 e 5), embora esse índice reduziu entre os grupos IV (tolerante) e II (sensível) nas duas condições de estresse avaliadas. Custódio *et al.* (2002) também não observaram redução da germinação das sementes de soja ocasionada pelo Al, assim como Silva e Matos (2016) em *Lactuca sativa*, Delavar *et al.* (2017) em *Zea mays* e Kouki *et al.* (2021) em *Cucumis sativus*. Os testes de histolocalização do Al com hematoxilina revelaram Al apenas no ápice da raiz (Fig. 8B), mas não foi detectado nos cotilédones e eixo

embrionário (dados não mostrados). Assim, ou o tegumento impediu a difusão do Al para os cotilédones ou este elemento encontrou resistência à difusão nos cotilédones (Silva *et al.*, 2014). O tegumento da semente atua como barreira protetora e pode restringir a absorção de metais pesados (Kranner; Colville, 2011). Além disso, as plântulas com três dias pós-germinação não apresentam corrente transpiratória efetiva, sobretudo sob alta umidade relativa (90%), impedindo o transporte do Al absorvido nas raízes para regiões superiores das plântulas por fluxo de massa. Sem um contato direto das estruturas vivas da semente com o Al, principalmente o eixo embrionário, o seu efeito na germinação não foi proeminente.

4.2 O Al alterou a morfologia e crescimento de plântulas de soja

O Al tende a se acumular em ápices radiculares (Fig. 8B), que são os sítios de percepção da toxidez desse elemento (Kouki *et al.*, 2021; Wen *et al.*, 2021). Geralmente cultivares sensíveis acumulam mais Al em relação aos tolerantes (Rahim *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2020; Souza *et al.*, 2016), por isso eles normalmente apresentam redução das características de crescimento sob estresse por Al (Cai *et al.*, 2019; Ding *et al.*, 2022). Cultivares tolerantes ao Al, por outro lado, podem manter o crescimento da raiz mesmo após exposição ao Al (Brito *et al.*, 2020). No ensaio de histolocalização de Al tanto o cultivar tolerante (50I52RSF IPRO) quanto o cultivar sensível (NA5909 RG) acumularam Al no ápice radicular. Entretanto, no cultivar NA5909 RG foi registrado uma coloração púrpura mais intensa (Fig. 8B). Isso pode explicar o seu menor desempenho após exposição ao Al quando comparado com o cultivar 50I52RSF IPRO (Fig. 8A), cujo comportamento pode se reproduzir nos cultivares sensíveis (grupos I, II) e tolerantes (grupos III, IV) e explicar o desempenho diferencial das plântulas. O acúmulo de Al no ápice radicular aumenta a rigidez da parede celular, reduzindo a expansão celular (Čiamporová, 2002; Singh *et al.*, 2017), resultando em diferentes respostas de crescimento entre cultivares (Brito *et al.*, 2020; Ribeiro *et al.*, 2022; Yoshida *et al.*, 2023).

A redução nos parâmetros de crescimento de plântulas como raiz, parte aérea e biomassa são reportados em experimentos conduzidos sob estresse por Al (Alves *et al.*, 2022; Hassanein *et al.*, 2020; Kundu; Ganesan *et al.*, 2023); com foco principal no sistema radicular (Čiamporová, 2002). Nesse estudo nós identificamos mudanças na morfologia e redução em parâmetros de crescimento de raízes, que se acentuaram sob ES (Fig. 8A, Tabela 2) e se reproduziram também nos IBs. A raiz é o alvo primário da toxidez por Al, portanto seus efeitos primários se manifestam na inibição do crescimento radicular (Cai *et al.*, 2019; Rasheed *et al.*, 2023; Wen *et al.*, 2021), conforme observamos no cultivar sensível (Fig. 8A). O CTR foi uma

das características que mais reduziu com o estresse por Al no EM e ES (Fig. 1C) e o ICR foi um dos índices que mais contribuiu na diferenciação dos cultivares quanto a tolerância a este elemento. O ICR foi maior nos cultivares do grupo IV (mais tolerante), e menor no grupo II (menos tolerante) tanto no EM quanto no ES. Entretanto, o aumento na intensidade do estresse reduziu o ICR em todos os grupos.

A presença do Al no meio de crescimento converge para a redução do comprimento radicular, como foi verificado em *Vicia faba* (Hassanein *et al.*, 2020), *Glycine max* (Steiner *et al.*, 2021), *Gossypium hirsutum* (Kundu; Ganesan *et al.*, 2023) e *Zea mays* (Alves *et al.*, 2022) e esse comportamento se reproduz nas características correlacionadas com o CTR, como o CTP, Ivigor, Icrec, MFR, MSR, ASR e VR. O Al reduziu o CHIP, apesar desse elemento não ter se acumulado no hipocótilo (Fig. 1B, Fig. 8B), o que pode explicar uma menor influência do IH para discriminar os cultivares (Fig. 4 e 5). A redução do CHIP e CTR resultaram na redução do CTP das plântulas em até 30% sob ES (Tabela 2, Fig. 1D). Custódio *et al.* (2002) também registraram reduções no comprimento do hipocótilo e da raiz de plântulas de soja sob estresse por Al. A redução no Icrec e Ivigor na presença do Al é explicada pelo efeito desse elemento na redução do CHIP, CTR e CTP. No cálculo do Ivigor são considerados a influência exercida pelo Icrec e Iunif de plântulas (Castan *et al.*, 2018), atributos inerentes ao conceito de vigor de sementes (Finch-Savage; Bassel, 2016). Apesar da importância do Iunif para definir um alto desempenho de plântulas, a redução desse parâmetro foi de apenas 5,5% sob ES (Tabela 2, Fig. 1G). Contudo, os grupos III e IV apresentaram IU superior aos cultivares dos grupos I e II. Os IBs ICT, IC e IV são características altamente correlacionadas (Fig. 2 e 3) e exerceram forte influência na distinção entre os cultivares do grupo II e IV (Fig. 4 e 5). Redução de vigor de plântulas de sementes germinadas sob presença de Al também foi registrado em *Glycine max* (Custódio, 2002) e *Zea mays* (Delavar *et al.*, 2017).

Nesse trabalho observamos uma redução na MFR, MSR e TAR nas plântulas de soja expostas ao Al (Tabela 2, Fig. 1H-J). Geralmente os trabalhos com Al em plântulas apontam para redução de massas fresca e seca e volume de raízes (Ding *et al.*, 2022; Hassanein *et al.*, 2020; Steiner *et al.*, 2021). Essa redução no acúmulo de biomassa pode estar vinculada a dificuldades na mobilização de reservas dos cotilédones à plântula em crescimento. A germinação de sementes e emergência de plântulas são estágios metabolicamente ativos, com alta demanda de carboidratos e proteínas (Bewley *et al.*, 2013). A presença de íons tóxicos pode afetar a atividade hidrolítica das enzimas, reduzindo a mobilização de reservas e suprimento metabólico para as plântulas em crescimento (Seneviratne *et al.*, 2019), traduzindo em menor acúmulo de biomassa (Tabela 2, Fig. 1I). Além disso, a presença de íons tóxicos pode reduzir

a absorção de água pelas sementes (Seneviratne *et al.*, 2019). A diminuição do TAR com a exposição ao Al pode ser uma evidência da redução do fluxo de água nas sementes (Sade *et al.*, 2016), com prejuízo à translocação de reservas dos cotilédones para a raiz (Seneviratne *et al.*, 2019).

O efeito do Al foi refletido na redução da ASR e VR (Tabela 2, Fig. 1K e M) e no IASR e IVR que foram menores nos grupos dos cultivares mais sensíveis ao Al e altamente correlacionados em ambos os tratamentos (Fig. 2 e 3). Redução de área e volume de raízes de soja em função do Al também foram relatadas por Wen *et al.* (2021). O DMR da raiz aumentou sob estresse por Al (Tabela 2, Fig. 1L) tendo o grupo dos cultivares sensíveis apresentando os maiores valores; único vetor manifestado nos escores negativos, onde majoritariamente estão os cultivares que foram mais sensíveis ao Al (Fig. 4 e 5). O aumento do DMR implica em engrossamento das raízes, comportamento clássico em raízes de plantas cultivadas na presença de Al (Ding *et al.*, 2022; Kopittke *et al.*, 2015; Sade *et al.*, 2016). O Al induz alterações morfológicas em raízes, como o seu engrossamento (Čiamporová, 2002) e o IDMR se correlacionou negativa e significativamente com o ICR, ICT, IC e IV tanto no EM (Fig. 2) quanto no ES (Fig. 3). Isso nos permite inferir que o aumento no diâmetro se associou com a redução no comprimento das raízes, e consequentemente contribuiu na redução da ASR e VR. O aumento do diâmetro radicular em resposta ao Al está associado à redução do funcionamento das raízes, que pode se expressar em menor área superficial e volume de raízes para explorar os recursos disponíveis no solo. Plântulas cujas raízes apresentam área superficial e volume reduzidos podem apresentar maior dificuldade no estabelecimento, momento em que as plântulas passam para uma condição autotrófica e que exige das raízes a absorção de água e nutrientes do solo.

4.3 Índices de tolerância são estimadores eficientes na fenotipagem de plântulas sob estresse por Al

Nesse trabalho abordamos vários índices comumente empregados na prospecção de cultivares tolerantes ao estresse abiótico (Ekbic *et al.*, 2017; Porch *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2015). Os índices ISE e TOL; ITE e ITol corroboraram com o agrupamento dos cultivares para ambas as concentrações (Fig. S5 e S6), pois aqueles que apresentaram os maiores valores de ITE e ITol foram classificados nos grupos daqueles mais tolerantes, ao passo que aqueles que apresentaram os maiores valores de ISE e TOL estão nos grupos dos cultivares mais sensíveis. Em *screenings* que se empregam índices de tolerância ao estresse o PMG e ITE sempre são os mais recomendados, pois se correlacionam positivamente com o desempenho do cultivar na

ausência e presença do agente estressante (Ekbic *et al.*, 2017; Krishnamurthy *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2015). Entretanto o PMG é muito influenciado pelo desempenho potencial dos cultivares. Dessa forma, cultivares mais sensíveis podem apresentar alto PMG até mesmo sob estresse. O ITE além de considerar o desempenho das plântulas na ausência e presença de estresse seleciona cultivares com alto desempenho e tolerância ao estresse, o que explica sua abordagem recorrente em trabalhos correlatos (Fernandez, 1992; Krishnamurthy *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019).

5 CONCLUSÃO

O Al não reduziu significativamente a germinação das sementes, mas alterou diferencialmente o desempenho de plântulas dos 65 cultivares de soja avaliados. Os parâmetros CTP, Icresc, Ivigor, CTR, MFR, MSR, ASR e VR reduziram com a exposição ao Al, enquanto o DMR aumentou. Estes parâmetros, juntamente com os índices ITE, ITol, ISE e TOL podem ser utilizados em estudos de fenotipagem e seleção precoce de cultivares tolerantes ao estresse por Al. Nesse *screening* destacamos dois cultivares contrastantes na tolerância diferencial ao Al: 50I52RSF IPRO (tolerante) e NA5909 RG (sensível). Por meio de testes histoquímicos reportamos o acúmulo de Al no ápice radicular e no núcleo de células meristemáticas. Por fim, os cultivares que apresentaram desempenho superior sob estresse podem ser estudados na prospecção de genes de tolerância ao Al em soja.

REFERÊNCIAS

- ALVES, R. M. *et al.* Aluminium toxicity: oxidative stress during germination and early development in purple maize. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, CE, v. 53, e20207676, p. 1-7. 2022. DOI: 10.5935/1806-6690.20220039. Disponível em: <http://periodicos.ufc.br/revistacienciaagronomica/article/view/88936>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.
- ANDRADE, R. *et al.* Malate and cell wall aluminum immobilization act as resistance mechanisms in soybean roots. **Bragantia**, Campinas, SP, v. 82, p. 1-12, Out. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4499.20230120>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/brag/a/TpYNBwXgYPVTgVLyFJ76jWr/?lang=en>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.
- BAQUY, M. A. *et al.* Higher cation exchange capacity determined lower critical soil pH and higher Al concentration for soybean. **Environmental Science and Pollution Research**, Heidelberg, Germany, v. 25, p. 6980–6989, Mar. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-017-1014-y>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-017-1014-y>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.
- BEWLEY, J. D. *et al.* **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. 3. ed. New York, NY: Springer, 2013. 392 p. Inclui índice. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4693-4>.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento /ACS, 2009. 399 p.
- BRITO, D. S. *et al.* Effects of aluminum on the external morphology of root tips in rice. **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo, SP, v. 43, p. 413–418, Set. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40415-020-00620-9>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40415-020-00620-9#citeas>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.
- CAI, Z. *et al.* Fine-mapping QTLs and the validation of candidate genes for Aluminum tolerance using a high-density genetic map. **Plant and Soil**, Dordrecht, Netherlands, v. 444, p.119-137, Nov. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04261-0>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-019-04261-0#citeas>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.
- CAI, S. *et al.* DA-6 improves sunflower seed vigor under Al³⁺ stress by regulating Al³⁺ balance and ethylene metabolic. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, CA, v. 229, p. 113048, Jan. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.113048>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014765132101160X>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.
- CAPOBIANGO, N. P. *et al.* Evaluation of soybean genotypes grown under soil compaction. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Hoboken, NJ, v. 209, n. 4, p. 517–531, Ago. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1111/jac.12635>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jac.12635>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

CASTAN, D. O. C.; GOMES-JUNIOR, F. G.; MARCOS-FILHO, J. Vigor-S, a new system for evaluating the physiological potential of maize seeds. **Scientia Agricola**, Piracicaba, SP, v. 75, n. 2, p. 167–172, Mar./Abr.2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-992X-2016-0401>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sa/a/knF5sH3qfDm6KZb8R5cTySF/?lang=en>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

ČIAMPOROVÁ, M. Morphological and structural responses of plant roots to aluminium at organ, tissue, and cellular levels. **Biologia Plantarum**, Praha, Czech Republic, v. 45, n. 2, p.161-171, Jun. 2002. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1015159601881>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1015159601881>. Acesso em: 15 dez. 2024.

CUSTÓDIO, C. C. *et al.* Estresse por alumínio e por acidez em genótipos de soja. **Scientia Agricola**, Piracicaba, SP, v. 59, n. 1, p. 145-153 ,Jan./Mar.2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-90162002000100021> . Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sa/a/6Gmgmg6vWkZ3f44yTPKWvwx/?lang=pt>. Acesso em: 15 dez. 2024.

DELAVAR, K. *et al.* Effects of silicon on the growth of maize seedlings under normal, aluminum, and salinity stress conditions. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, PA, v. 40, n. 10, p. 1475-1484, Jun. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1080/01904167.2016.1269344>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01904167.2016.1269344>. Acesso em: 15 dez. 2024.

DING, J. *et al.* Large-scale evaluation of aluminum tolerance in maize (*Zea mays* L.) accessions. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, Campinas, SP, v. 34, n. 2, p. 155-169, Jun. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40626-022-00238-0>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40626-022-00238-0#citeas>. Acesso em: 15 dez. 2024.

EKBIC, E. *et al.* Assessment of watermelon accessions for salt tolerance using stress tolerance indices. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, MG, v. 41, n. 6, p. 616-625, Nov./Dez. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/1413-70542017416013017>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cagro/a/8j9HMq4scGSXBDkhJhNZ5jB/?lang=en>. Acesso em: 15 dez. 2024.

FERNANDEZ, G. C. J. Effective selection criteria for assessing stress tolerance. In: KUO, C. G. (ed.). **Proceedings of the International Symposium on Adaptation of Vegetables and Other Food Crops in Temperature and Water Stress**, Tainan, Taiwan, 1992. p.257-270. DOI: <https://doi.org/10.22001/wvc.72511>. Disponível em: <https://worldveg.tind.io/record/72511?v=pdf>. Acesso em: 15 dez. 2024.

FINCH-SAVAGE, W. E.; BASSEL, G. W. Seed vigour and crop establishment: extending performance beyond adaptation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, England, v. 67, n. 3, p. 567-591, Fev. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/erv490>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jxb/article/67/3/567/2893341>. Acesso em: 15 dez. 2024.

GOMES JUNIOR, F. G.; CHAMMA, H. M. C. P.; CICERO, S. M. Automated image analysis of seedlings for vigor evaluation of common bean seeds. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, PR, v. 36, n. 2, p. 195-200, Abr./Jun. 2014. DOI: <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v36i2.21957>. Disponível em: <https://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAgron/article/view/21957>. Acesso em: 15 dez. 2024.

HASSANEIN, A. M. *et al.* Seed germination, seedling growth, protein expression and chromosomal abnormalities in relation to aluminum tolerance of faba bean (*Vicia faba*) cultivars. **Phyton -Annales Rei Botanicae**, Horn, Austria, v. 60, n.2, p. 49–60, Dez. 2020. DOI: DOI: 10.12905/0380.phyton60-2020-0049. Disponível em: <https://www.verlag-berger.at/detailview?no=2897>. Acesso em: 15 dez. 2024.

HOFFMASTER, A. F. *et al.* The Ohio State University Seed Vigor Imaging System (SVIS) for Soybean and Corn Seedlings. **Seed Technology**, Lawrence, KS, v. 27, n. 1, p. 7–24, 2005. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/23433211>. Acesso em: 15 dez. 2024.

HOSSEINI, S. J.; SARVESTANI, Z. T.; PIRDASHTI, H. Analysis of tolerance indices in some rice (*Oryza sativa* L.) genotypes at salt stress condition. **International Research Journal of Applied and Basic Sciences**, Iran, v. 3, n. 1, p. 1-10.2012. Disponível em: [https://www.semanticscholar.org/paper/Analysis-of-Tolerance-Indices-in-Some-Rice-\(Oryza-Hosseini-Sarvestani/f7de72d5353eddca3e5d5e0f9ea5d0e961242206#citing-papers](https://www.semanticscholar.org/paper/Analysis-of-Tolerance-Indices-in-Some-Rice-(Oryza-Hosseini-Sarvestani/f7de72d5353eddca3e5d5e0f9ea5d0e961242206#citing-papers). Acesso em: 15 dez. 2024.

HU, B. *et al.* Evolution of abscisic acid signaling for stress responses to toxic metals and metalloids. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, Switzerland, v. 11, p. 1-16, Jul. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00909>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2020.00909/full>. Acesso em: 15 dez. 2024.

JAHAN, N. *et al.* Genetic architecture of Al³⁺ toxicity tolerance in rice F2: 3 populations determined through QTL mapping. **Ecotoxicology**, Dordrecht, Netherlands, v. 30, p. 794-805, Jul. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10646-021-02413-6>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10646-021-02413-6#citeas>. Acesso em: 15 dez. 2024.

KOCHIAN, L.V. *et al.* Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum resistance. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, CA, v. 66, p. 571-598, Abr. 2015. DOI: 10.1146/annurev-arplant-043014-114822. Disponível em: https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev-arplant-043014-114822#abstract_content. Acesso em: 15 dez. 2024.

KOPITTKE, P. M. *et al.* Identification of the primary lesion of toxic aluminum in plant roots. **Plant Physiology**, Cary, NC, v. 167, n. 4, p. 1402-1411, Abr. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.114.253229>. Disponível em: <https://academic.oup.com/plphys/article/167/4/1402/6113677>. Acesso em: 15 dez. 2024.

- KOUKI, R. *et al.* Behavior of *Cucumis sativus* L. in presence of aluminum stress: germination, plant growth, and antioxidant enzymes. **Food Science & Nutrition**, Hoboken, NJ, v. 9, n. 6, p. 3280-3288, Maio. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/fsn3.2294>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/fsn3.2294>. Acesso em: 15 dez. 2024.
- KRANNER, I.; COLVILLE, L. Metals and seeds: biochemical and molecular implications and their significance for seed germination. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, England, v. 72, n. 1, p. 93-105, Ago. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.05.005>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0098847210001164>. Acesso em: 15 dez. 2024.
- KRISHNAMURTHY, S. L. *et al.* Effect of different salt stresses on agro-morphological traits and utilisation of salt stress indices for reproductive stage salt tolerance in rice. **Field Crops Research**, Amsterdam, Netherlands, v. 190, p. 26-33, Abr. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2016.02.018>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378429016300442>. Acesso em: 15 dez. 2024.
- KUNDU, A.; GANESAN, M. Low pH stress activates several genes for lateral root formation and detoxification of aluminum ions in cotton plants. **Plant Stress**, Amsterdam, Netherlands, v. 9, p. 1-18, Set. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100188>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2667064X23000556>. Acesso em: 15 dez. 2024.
- LAN, T. *et al.* The interaction of salicylic acid and Ca²⁺ alleviates aluminum toxicity in soybean (*Glycine max* L.). **Plant Physiology and Biochemistry**, Issy-Les-Moulineaux, France, v. 98, p. 146-154, Jan. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.11.019>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0981942815301741>. Acesso em: 15 dez. 2024.
- LI, W. *et al.* Transcriptome analysis of two soybean cultivars identifies an aluminum responsive antioxidant enzyme GmCAT1. **Bioscience, Biotechnology & Biochemistry**, Oxford, England, v. 84, n. 7, p. 1394-1400, Jul. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/09168451.2020.1740970>. Disponível em: <https://academic.oup.com/bbb/article/84/7/1394/5937580>. Acesso em: 15 dez. 2024.
- MADHAN, M.; MAKESH, K.; RAO, S. R. Effect of 24-epibrassinolide on aluminium stress induced inhibition of seed germination and seedling growth of *Cajanus cajan* (L.) Millsp. **International Journal of Multidisciplinary and Current Research**, [s. l.], v. 2, p. 286-290, Mar./Abr. 2014. Disponível em: <http://ijmcr.com/effect-of-24-epibrassinolide-on-aluminium-stress-induced-inhibition-of-seed-germination-and-seedling-growth-of-cajanus-cajan-l-millsp/>. Acesso em: 15 dez. 2024.
- MARCIANO, D. P. R. O. *et al.* Nitric oxide reduces the stress effects of aluminum on the process of germination and early root growth of rice. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, Germany, v. 173, n. 6, p. 885-891, Out. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1002/jpln.200900312>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jpln.200900312>. Acesso em: 15 dez. 2024.

MOJENA, R. Hierarchical grouping methods and stopping rules: an evaluation. **The Computer Journal**, Oxford, England, v. 20, n. 4, p. 359-363, Jan. 1977. DOI: <https://doi.org/10.1093/comjnl/20.4.359>. Disponível em: <https://academic.oup.com/comjnl/article/20/4/359/393930>. Acesso em: 15 dez. 2024.

NUNES-NESI A. *et al.* The complex role of mitochondrial metabolism in plant aluminum resistance. **Trends in Plant Science**, Cambridge, MA, v. 19, n. 6, p. 399-407, Jun. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.12.006>. Disponível em: [https://www.cell.com/trends/plant-science/abstract/S1360-1385\(13\)00283-5?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1360138513002835%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/trends/plant-science/abstract/S1360-1385(13)00283-5?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1360138513002835%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 15 dez. 2024.

OFOE, R. *et al.* Aluminum in plant: benefits, toxicity and tolerance mechanisms. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, Switzerland, v. 13, p. 1-24, Jan. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1085998>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2022.1085998/full>. Acesso em: 15 dez. 2024.

PIRES, A. R. P.; SILVA, B. (org.). **Normalização de trabalhos acadêmicos**: atualizada conforme ABNTs NBR 14724/2011, NBR 6023/2018 e NBR 10520/2023. Viçosa, MG: UFV, Biblioteca Central, 2024. 147 p. Disponível em: <https://www.bbt.ufv.br/manual-de-normalizacao-de-trabalhos-academicos/>. Acesso em: 11 de dez. de 2024.

POLLE, E.; KONZAK, C. F.; KATTRICK, J. A. Visual detection of aluminum tolerance levels in wheat by hematoxylin staining of seedling roots. **Crop Science**, Hoboken, NJ, v. 18, n. 5, p. 823-827, Set. 1978. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci1978.0011183X001800050035x>. Disponível em: <https://acess.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2135/cropsci1978.0011183X001800050035x>. Acesso em: 15 dez. 2024.

PORCH, T. G. (2006). Application of stress indices for heat tolerance screening of common bean. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Hoboken, NJ, v. 192, n.5, p. 390-394, Set. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2006.00229.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1439-037X.2006.00229.x>. Acesso em: 15 dez. 2024.

QIANQIAN, W. *et al.* Hydrogen sulfide improves rice seed germination by regulating aluminum absorption, internal antioxidant enzyme system and osmotic balance under aluminum toxicity conditions. **Rice Science**, Amsterdam, Netherlands, v. 30, n. 4, p. 271-275, Jul. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2023.05.001>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1672630823000409?via%3Dihub>. Acesso em: 15 dez. 2024.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Versão 4.0.5 (2021-03-31). R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2021. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 22 ago. 2021.

RAHIM, F. *et al.* Identification of contrasting tropical popcorn inbreds for studying aluminum toxicity tolerance inheritance. **Euphytica**, Dordrecht, Netherlands, v. 215, n. 47, p. 1-12, Fev. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10681-019-2372-y>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10681-019-2372-y#citeas>. Acesso em: 15 dez. 2024.

RAHMAN, R.; UPADHYAYA, H. Aluminium toxicity and its tolerance in plant: a Review. **Journal of Plant Biology**, Heidelberg, Germany, v. 64, p. 101–121, Abr. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12374-020-09280-4>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12374-020-09280-4#citeas>. Acesso em: 11 de dez. de 2024.

RAJJOU, L. *et al.* Seed germination and vigor. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, CA, v. 63, p. 507-533, Jun. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105550>. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev-arplant-042811-105550>. Acesso em: 11 de dez. de 2024.

RASHEED, A. *et al.* Development of aluminium (Al)-tolerant soybean using molecular tools: limitations and future directions. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, NY, v. 42, p. 7403-7417, Jun. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00344-023-11051-7>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00344-023-11051-7#citeas>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

RIAZ, M. *et al.* Mechanisms of organic acids and boron induced tolerance of aluminum toxicity: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, CA, v. 165, p. 25-35, Dez. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.08.087>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0147651318308248>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

RIBEIRO, C. *et al.* Aluminum promotes changes in rice root structure and ascorbate and glutathione metabolism. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, New York, NY, v. 28, p. 2085-2098, Dez. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12298-022-01262-9>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12298-022-01262-9#citeas>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

RODRIGUES, A. A. *et al.* Tolerance of *Eugenia dysenterica* to aluminum: germination and plant growth. **Plants**, Basel, Switzerland, v. 8, n. 9, p. 1-15, Ago. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants8090317>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2223-7747/8/9/317>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

SADE, H. *et al.* Toxicity and tolerance of aluminum in plants: tailoring plants to suit to acid soils. **BioMetals**, Dordrecht, Netherlands, v. 29, p. 187–210, Abr. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10534-016-9910-z>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10534-016-9910-z#citeas>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

SAKO, Y. *et al.* A system for automated seed vigor assessment. **Seed Science and Technology**, Bassersdorf, Switzerland, v. 29, n. 3, p. 625-636, Jan. 2001. Disponível em: <https://www.eurofinsus.com/media/162083/seed-vigor-imaging-system.pdf>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

SENEVIRATNE, M. *et al.* Heavy metal-induced oxidative stress on seed germination and seedling development: a critical review. **Environmental Geochemistry and Health**, Dordrecht, Netherlands, v. 41, n. 4, p.1813-1831, Ago. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10653-017-0005-8>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10653-017-0005-8#citeas>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

SILVA, G. E. A. *et al.* Seeds' physicochemical traits and mucilage protection against aluminum effect during germination and root elongation as important factors in a biofuel seed crop (*Ricinus communis*). **Environmental Science and Pollution Research**, Heidelberg, Germany, v. 21, p. 11572-11579, Jun. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3147-6>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-014-3147-6>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

SILVA, P.; MATOS, M. Assessment of the impact of aluminum on germination, early growth and free proline content in *Lactuca sativa* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, CA, v. 131, p. 151-156, Set. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.05.014>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0147651316301762>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

SILVA, C. O. *et al.* Differential accumulation of aluminum in root tips of soybean seedlings. **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo, SP, v. 43, p. 99-107, Mar. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40415-020-00593-9>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40415-020-00593-9#citeas>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

SILVA, C. O. *et al.* Modulation of the antioxidant system and primary metabolism confers aluminum stress tolerance in soybean. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, Germany, v. 45, n.77, p. 1-13, Maio. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11738-023-03559-y>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11738-023-03559-y#citeas>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

SINGH, S. *et al.* Assessment of multiple tolerance indices for salinity stress in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal of Agricultural Science**, Ontario, Canadá, v. 7, n. 3, p. 49-57, Fev. 2015. DOI: 10.5539/jas.v7n3p49. Disponível em: <https://www.ccsenet.org/journal/index.php/jas/article/view/42380>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

SINGH, S. *et al.* Toxicity of aluminium on various levels of plant cells and organism: a review. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, England, v. 137, p. 177-193, Maio 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.01.005>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0098847217300059>. . Acesso em: 15 de dez. de 2024.

SOUZA, L. T. *et al.* Effects of aluminum on the elongation and external morphology of root tips in two maize genotypes. **Bragantia**, Campinas, SP, v. 75, n. 1, p. 19-25, Jan./Mar. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4499.142>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/brag/a/5wNBHLkJbBgfJjvgyKQLXph/?lang=en>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

STEINER, F. *et al.* Multivariate adaptability and stability of soya bean genotypes for abiotic stresses. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Hoboken, NJ, v. 207, n. 2, p. 354–361. Out. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/jac.12446>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jac.12446>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

SUTHIPRADIT, S.; ALVA, A. K. Aluminum and pH limitations for germination and radicle growth of soybean. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, PA, v. 9, n. 1, p. 67-73, 1986. DOI: <https://doi.org/10.1080/01904168609363424>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01904168609363424>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

TALEBI, S.; NABAVI KALAT, S. M.; SOHANI DARBAN, A. L. The study effects of heavy metals on germination characteristics and proline content of Triticale (*Triticoseale Wittmack*). **International Journal of Farming and Allied Science**, [s. l.], v. 3, n. 10, p. 1080-1087, Out. 2014. Disponível em: <http://ijfas.com/2014-3-10/>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

WEN, K. *et al.* Identification of an ATP-binding cassette transporter implicated in aluminum tolerance in wild soybean (*Glycine soja*). **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, Switzerland, v. 22, n. 24, p. 1-17, Dez. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms222413264>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/24/13264>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

XU, D. *et al.* Linking hydrogen-enhanced rice aluminum tolerance with the reestablishment of GA/ABA balance and miRNA-modulated gene expression: a case study on germination. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, CA, v. 145, p. 303-312, Nov. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.07.055>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0147651317304657>. Acesso em: 15 de dez. de 2024

YOSHIDA, C. H. P. *et al.* Tolerance mechanisms to aluminum in popcorn inbred lines involving aluminum compartmentalization and ascorbate–glutathione redox pathway. **Planta**, New York, NY, v. 257, n. 28, p. 1-18, Jan. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00425-022-04062-3>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00425-022-04062-3#citeas>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

ZHANG, C. *et al.* Evaluation of the low-temperature tolerance of rapeseed genotypes at the germination and seedling emergence stages. **Crop Science**, Hoboken, NJ, v. 59, n. 4, p. 1709-1717, Jul. 2019. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci2019.03.0160>. Disponível em: <https://acess.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2135/cropsci2019.03.0160>. Acesso em: 15 de dez. de 2024

APÊNDICE A – Tabela 1

Lista dos 65 cultivares de soja (*Glycine max*) avaliados

ID	Cultivar	ID	Cultivar	ID	Cultivar
C1	64I61RSF IPRO	C23	M5947 IPRO	C45	DM75I74RSF IPRO
C2	NEO530 IPRO	C24	NA5909 RG	C46	75I77RSF IPRO
C3	68I70RSF IPRO	C25	M6210 IPRO	C47	77I79RSF IPRO
C4	DM 66I68RSF	C26	NS6700 IPRO	C48	M7739 IPRO
C5	NEO610 IPRO	C27	NS5445 IPRO	C49	DM79I81RSF IPRO
C6	NEO660 IPRO	C28	AS3680 IPRO	C50	8579RSF IPRO
C7	DM53I54RSF IPRO	C29	AS3730 IPRO	C51	NS7901 RR
C8	65I65RSF IPRO	C30	M8644 IPRO	C52	NEO790 IPRO
C9	DM 6563RSF IPRO	C31	DM60I63RSF IPRO	C53	DM80I79RSF IPRO
C10	DM5958RSF IPRO	C32	61I63RSF IPRO	C54	FT®4280 IPRO
C11	50I52RSF IPRO	C33	DM64I63RSF IPRO	C55	80HO109 IPRO
C12	58I60RSF IPRO	C34	NEO 650 IPRO	C56	80I82RSF IPRO
C13	59I60RSF IPRO	C35	FLX6263RSF IPRO	C57	81I81RSF IPRO
C14	55I57RSF	C36	68I68 RSF IPRO (ÚNICA)	C58	DM82I78RSF IPRO
C15	57I52RSF	C37	DM68I69 RSF IPRO	C59	CZ58B28 IPRO
C16	63I64RSF IPRO	C38	NS6990 IPRO	C60	83I85RSF IPRO
C17	BS2606 IPRO	C39	TEC7022 IPRO	C61	M8372 IPRO
C18	M6410 IPRO	C40	NEO710 IPRO	C62	TMG2383 IPRO
C19	M5917 IPRO	C41	74I77 RSFIPRO	C63	84I86RSF IPRO
C20	TMG7063	C42	DM73I75RSF IPRO	C64	84I85RSF IPRO
C21	M5838 IPRO	C43	8473RSF RR	C65	SYN1687 IPRO
C22	NS6601 IPRO	C44	NEO740 IPRO		

Abreviação: ID, identificação.

APÊNDICE B – Tabela 2

Estatística descritiva de características biométricas de plântulas de 65 cultivares de soja três dias após a germinação na ausência e presença de alumínio (1,5 ou 3,0 mM).

Trat		Ger (%)	CHIP (cm)	CTR (cm)	CTP (cm)	Ivigor	Icresc	Iunif
Control (0 Al)	Min.	41,25	0,42	1,46	0,84	155,78	42,93	301,63
	Max.	100,00	2,99	8,51	10,64	854,55	884,10	841,33
	Med.	88,01	1,39	3,94	4,20	401,27	313,58	605,88
	Desv. P	11,53	0,67	1,25	2,21	154,41	176,17	129,34
1.5 mM AlCl ₃	Min.	46,25	0,30	1,50	0,87	150,95	52,53	354,03
	Max.	100,00	2,87	6,24	8,02	635,63	581,88	804,58
	Med.	86,10	1,26	3,52	3,58	357,05	257,70	588,84
	Desv. P	15,39	0,67	1,11	1,91	140,44	144,70	152,58
3 mM AlCl ₃	Min.	50,00	0,23	1,31	0,62	103,28	36,95	258,00
	Max.	100,00	2,76	5,24	7,14	594,93	529,95	787,53
	Med.	83,60	1,15	2,97	2,93	312,67	201,37	572,38
	Desv. P	16,63	0,64	0,91	1,66	123,06	121,00	157,61

Trat		MFR (g)	MSR (mg)	TAR (g H ₂ O g ⁻¹ MS)	ASR (cm ²)	DMR (mm)	VR (mm ³)
Control (0 Al)	Min.	0,27	18,50	12,84	0,68	1,14	25,50
	Max.	2,08	104,00	21,88	3,22	1,68	110,00
	Med.	0,90	48,70	17,10	1,54	1,33	49,99
	Desv. P	0,41	19,21	2,24	0,47	0,11	16,98
1.5 mM AlCl ₃	Min.	0,29	20,25	11,09	0,67	1,14	25,00
	Max.	1,81	90,75	20,74	2,32	1,63	80,25
	Med.	0,85	47,57	16,21	1,41	1,36	46,22
	Desv. P	0,35	18,54	2,72	0,38	0,12	14,15
3 mM AlCl ₃	Min.	0,23	13,50	11,08	0,59	1,19	22,00
	Max.	2,09	107,25	19,76	2,17	1,75	90,25
	Med.	0,76	43,47	15,40	1,25	1,41	42,62
	Desv. P	0,38	19,81	2,83	0,37	0,13	15,35

Abreviações: Germinação (Ger); comprimento do hipocótilo (CHIP); comprimento total da raiz (CTR); comprimento total da plântula (CTP); índice de vigor (Ivigor); índice de crescimento (Icresc); índice de uniformidade (Iunif); massa fresca da raiz (MFR); massa seca da raiz (MSR); teor de água da raiz em base seca (TAR); área superficial da raiz (ASR); diâmetro médio da raiz (DMR) e volume da raiz (VR); mínimo (Min); máximo (Max); média (Med); desvio padrão (Desv. P).

APÊNDICE C – Figura 1

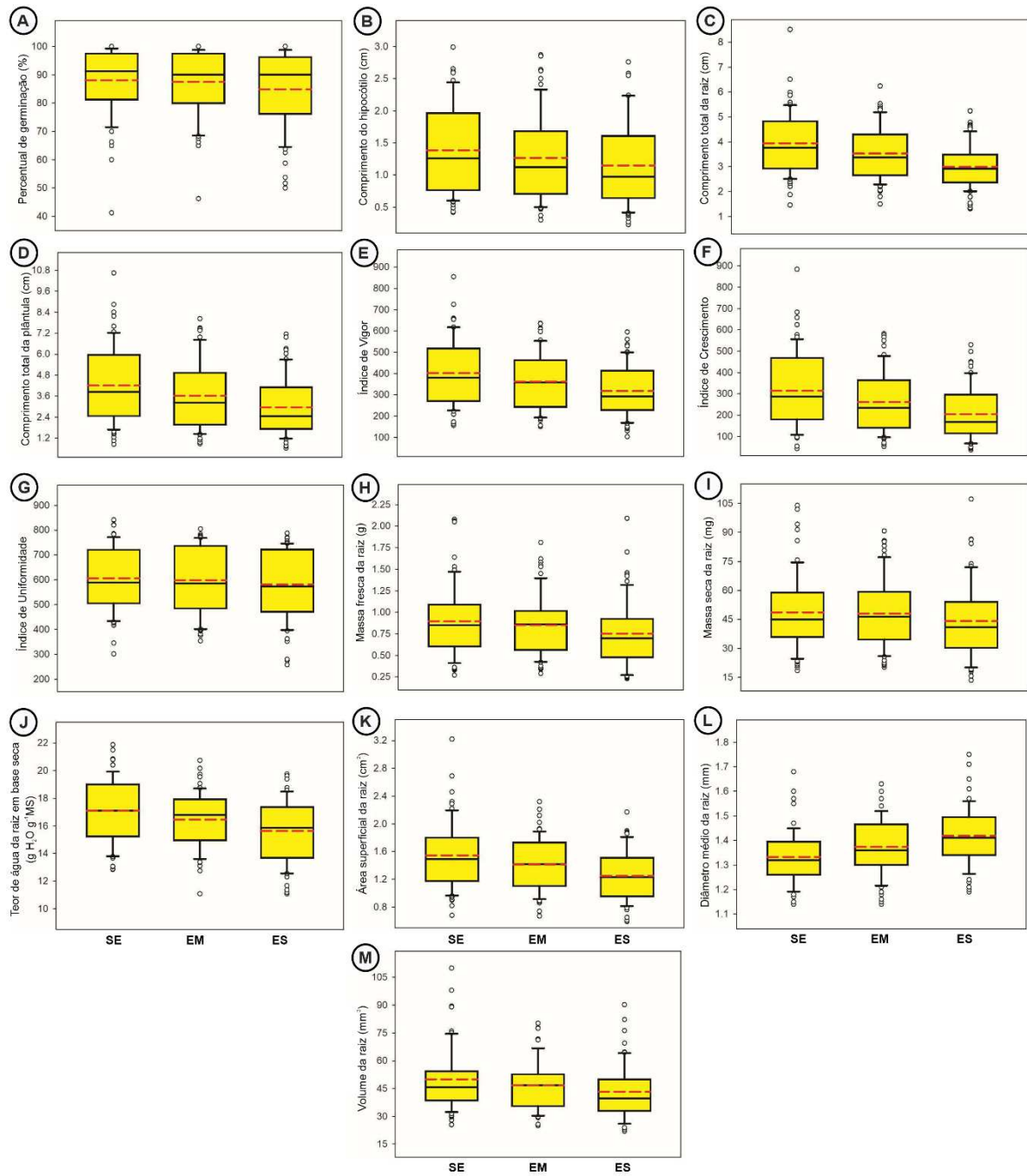


Figura 1. Box plot das características biométricas de plântulas de 65 cultivares de soja três dias após a germinação na ausência ou presença de alumínio (1,5 ou 3,0 mM). Percentual de germinação (Ger) (A); comprimento do hipocótilo (CHIP) (B); comprimento total da raiz (CTR) (C); comprimento total da plântula (CTP) (D); índice de vigor (Ivigor) (E); índice de crescimento (Icresc) (F); índice de uniformidade (Iunif) (G); massa fresca da raiz (MFR) (H); massa seca da raiz (MSR) (I); teor de água da raiz em base seca (TAR) (J); área superficial da raiz (ASR) (K); diâmetro médio da raiz (DMR) (L) e volume da raiz (VR). A linha pontilhada vermelha indica o valor médio dos cultivares para cada condição de estresse. SE: sem estresse; EM: estresse moderado; ES: estresse severo.

APÊNDICE D - Figura 2

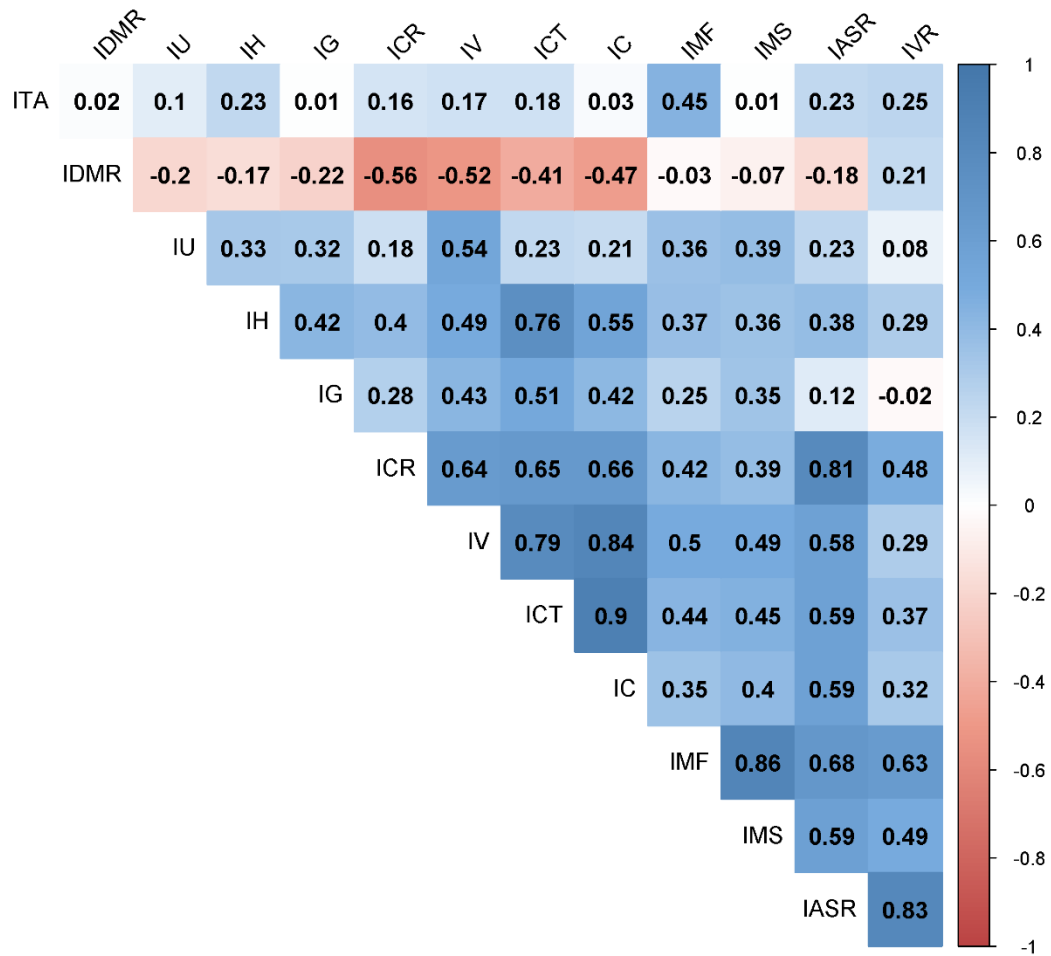


Figura 2. Matriz de correlação linear de Pearson ($p < 0,05$ pelo Teste t) obtida a partir de IBs de plântulas de 65 cultivares de soja após exposição ao Al 1,5 mM durante o processo de germinação. Índice do teor de água da raiz (ITA), índice de diâmetro médio da raiz (IDMR), índice de uniformidade (IU), índice do hipocótilo (IH), índice de germinação (IG), índice do comprimento total da raiz (ICR), índice de vigor (IV), índice do comprimento total da plântula (ICT), índice de crescimento (IC), índice de massa fresca da raiz (IMF), índice de massa seca da raiz (IMS), índice de área superficial da raiz (IASR), índice do volume da raiz (IVR).

APÊNDICE E - Figura 3

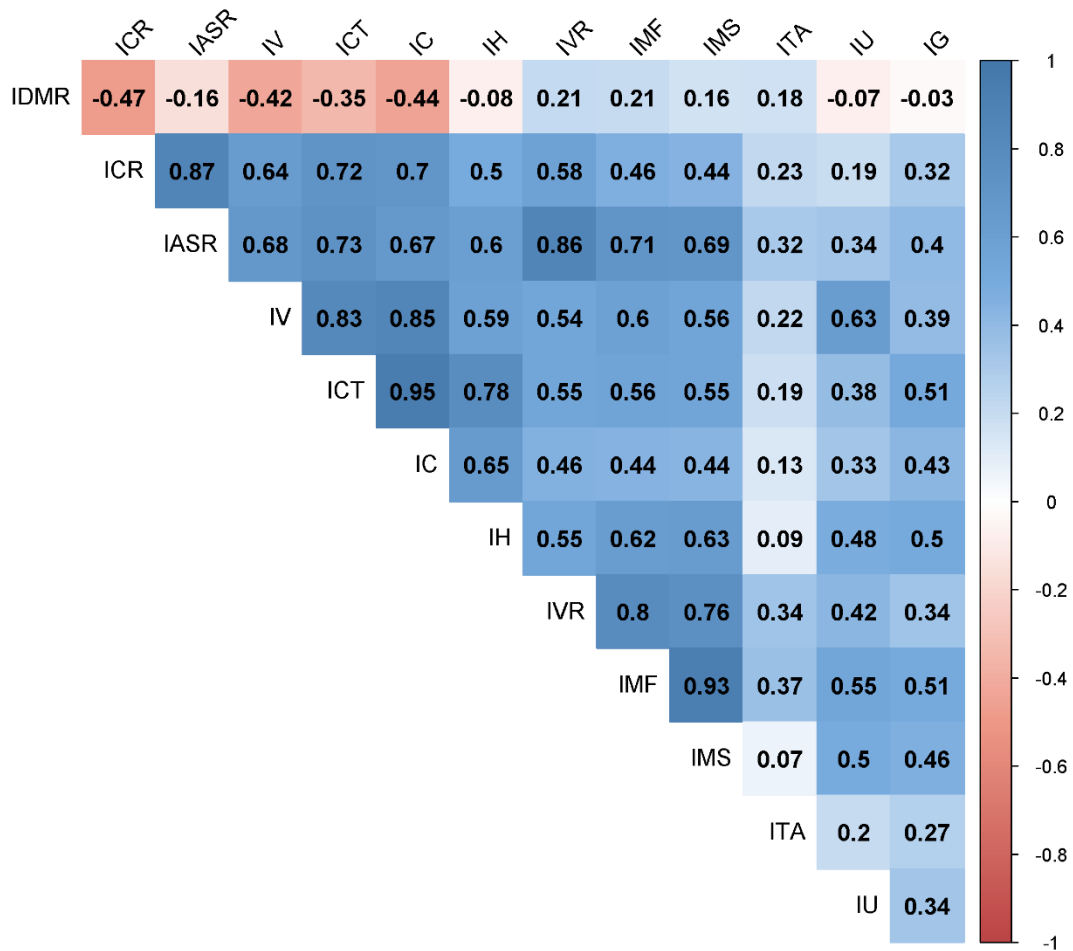


Figura 3. Matriz de correlação linear de Pearson ($p < 0,05$ pelo Teste t) obtida a partir de indicadores biométricos de plântulas de 65 cultivares de soja após exposição ao Al 3,0 mM durante o processo de germinação. Índice de diâmetro médio da raiz (IDMR), índice do comprimento total da raiz (ICR), índice de área superficial da raiz (IASR), índice de vigor (IV), índice do comprimento total da plântula (ICT), índice de crescimento (IC), índice do hipocótilo (IH), índice do volume de raiz (IVR), índice de massa fresca da raiz (IMF), índice massa seca da raiz (IMS), índice do teor de água da raiz (ITA), índice de uniformidade (IU), índice de germinação (IG).

APÊNDICE F - Figura 4

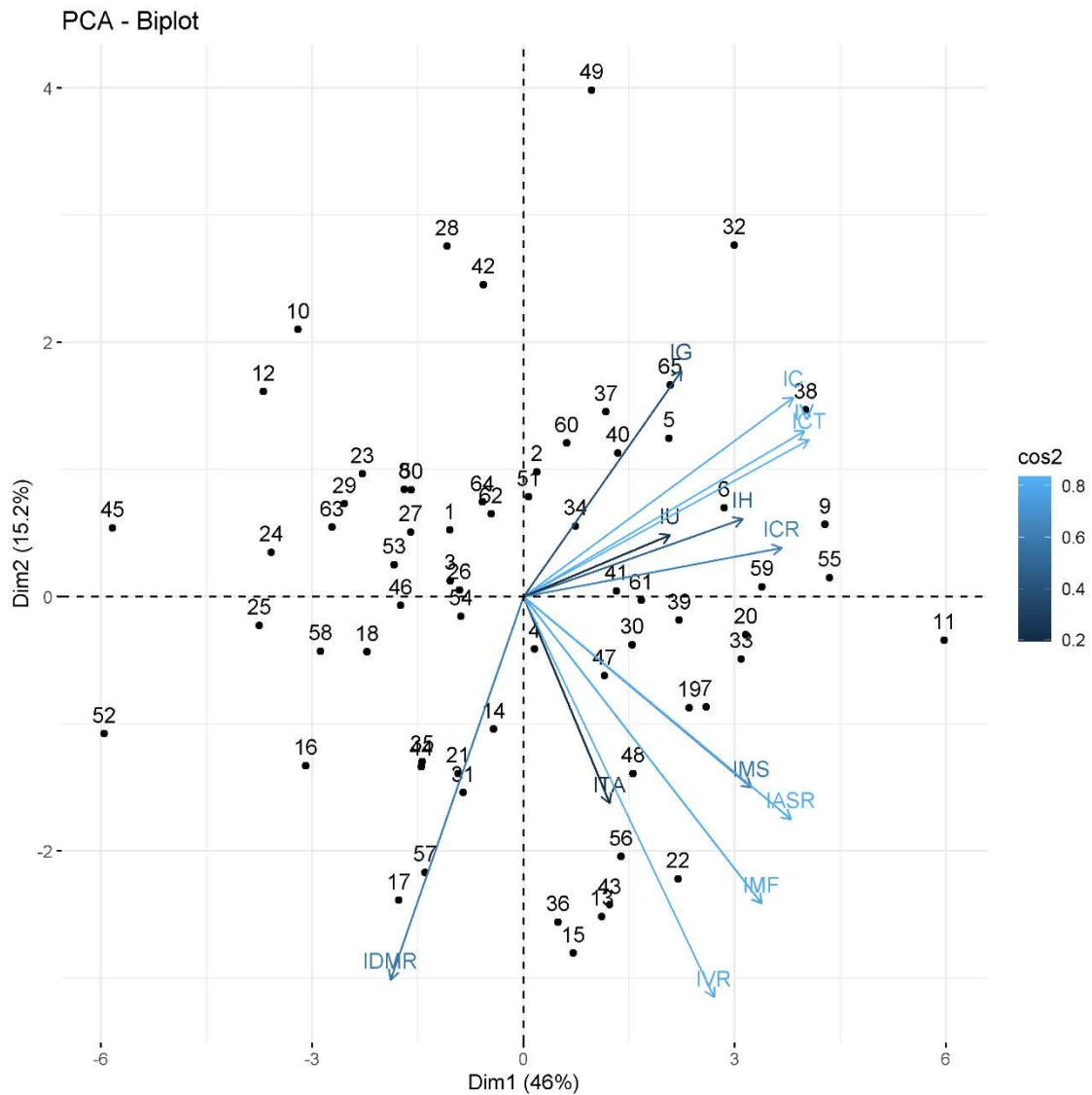


Figura 4. Biplot da análise de componentes principais (ACP) obtida por meio da combinação linear dos índices biométricos de plântulas de 65 cultivares de soja submetidas a 1,5 mM de Al durante o processo de germinação. Índice do teor de água da raiz (ITA), índice de diâmetro médio da raiz (IDMR), índice de uniformidade (IU), índice do hipocótilo (IH), índice de germinação (IG), índice do comprimento total da raiz (ICR), índice de vigor (IV), índice do comprimento total da plântula (ICT), índice de crescimento (IC), índice de massa fresca da raiz (IMF), índice de massa seca da raiz (IMS), índice de área superficial da raiz (IASR), índice do volume da raiz (IVR).

APÊNDICE G - Figura 5

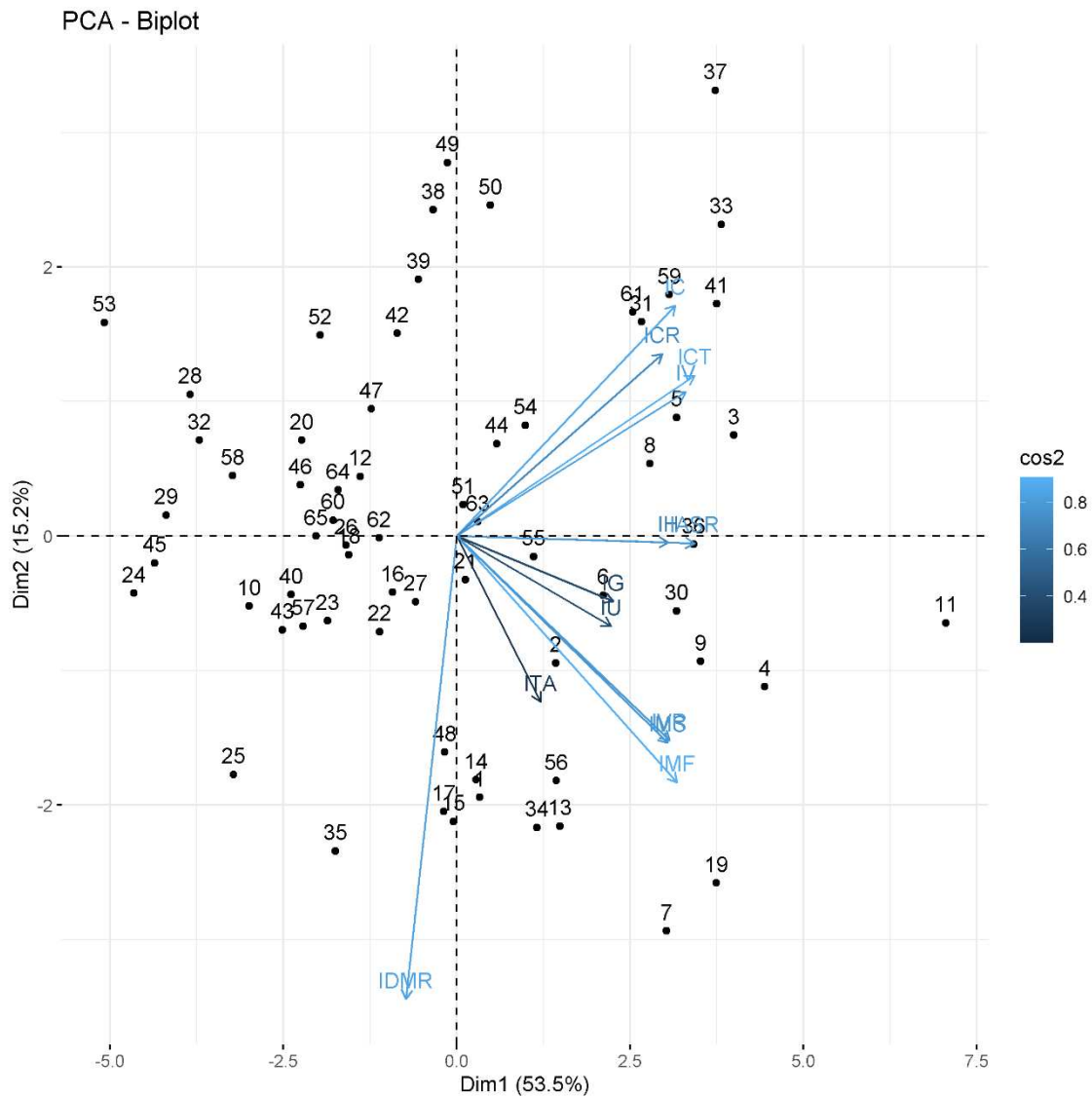


Figura 5. Biplot da análise de componentes principais (ACP) obtida por meio da combinação linear dos índices biométricos de plântulas de 65 cultivares de soja submetidas a 3,0 mM de Al durante o processo de germinação. Índice do teor de água da raiz (ITA), índice de diâmetro médio da raiz (IDMR), índice de uniformidade (IU), índice do hipocótilo (IH), índice de germinação (IG), índice do comprimento total da raiz (ICR), índice de vigor (IV), índice do comprimento total da plântula (ICT), índice de crescimento (IC), índice de massa fresca da raiz (IMF), índice de massa seca da raiz (IMS), índice de área superficial da raiz (IASR), índice do volume da raiz (IVR).

APÊNDICE H - Figura 6

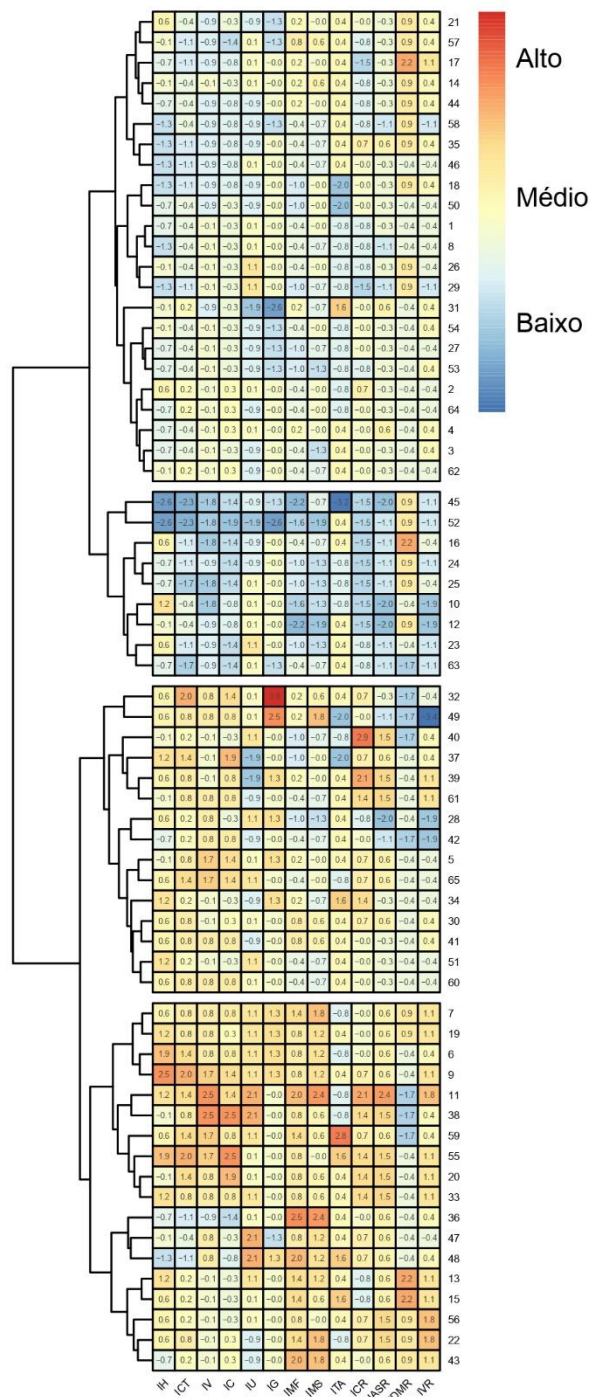


Figura 6. Heat map para os índices biométricos de plântulas de 65 cultivares de soja submetidas a 1,5 mM de Al durante o processo de germinação. Índice do teor de água da raiz (ITA), índice de diâmetro médio da raiz (IDMR), índice de uniformidade (IU), índice do hipocótilo (IH), índice de germinação (IG), índice do comprimento total da raiz (ICR), índice de vigor (IV), índice do comprimento total da plântula (ICT), índice de crescimento (IC), índice de massa fresca da raiz (IMF), índice de massa seca da raiz (IMS), índice de área superficial da raiz (IASR), índice de volume da raiz (IVR).

APÊNDICE I - Figura 7

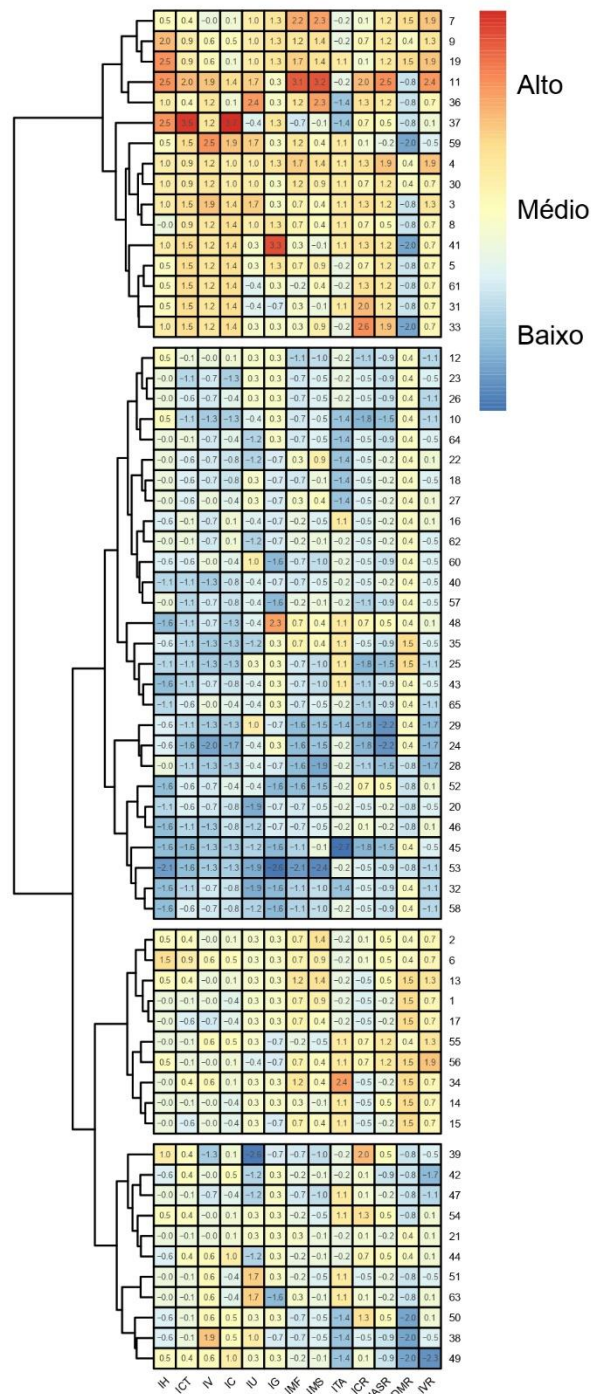


Figura 7. Heat map para os índices biométricos de plântulas de 65 cultivares de soja submetidas a 3,0 mM de Al durante o processo de germinação. Índice do teor de água da raiz (ITA), índice de diâmetro médio da raiz (IDMR), índice de uniformidade (IU), índice do hipocótilo (IH), índice de germinação (IG), índice do comprimento total da raiz (ICR), índice de vigor (IV), índice do comprimento total da plântula (ICT), índice de crescimento (IC), índice de massa fresca da raiz (IMF), índice de massa seca da raiz (IMS), índice de área superficial da raiz (IASR), índice do volume da raiz (IVR).

APÊNDICE J - Figura 8

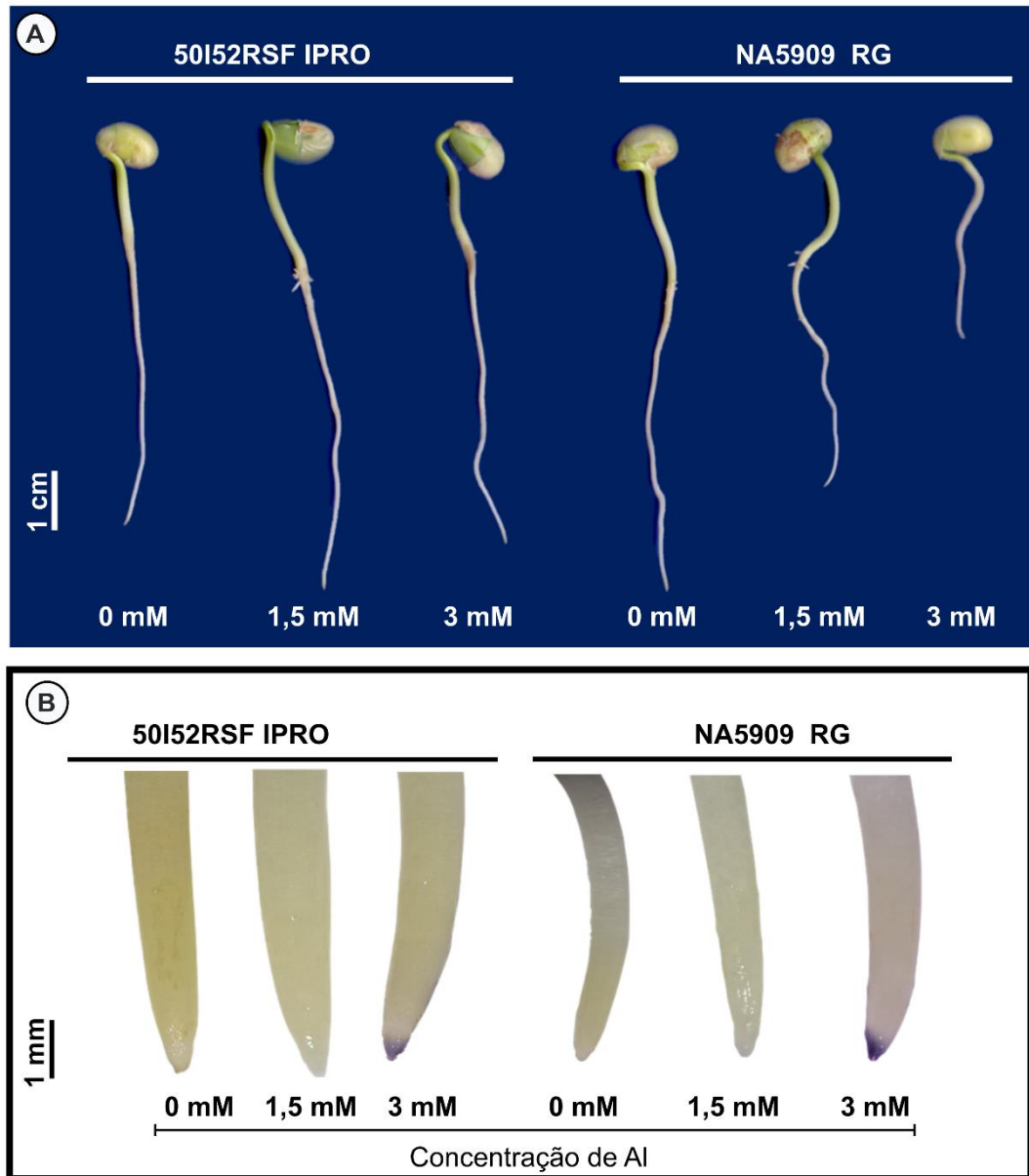


Figura 8. Efeito do Al sobre o crescimento e desenvolvimento de plântulas de soja (A) e histolocalização do Al em ápices radiculares de plântulas de soja, após coloração com hematoxilina (identificado pela coloração púrpura) (B). As sementes de dois cultivares de soja, 50I52RSF IPRO (tolerante) e NA5909 RG (sensível) foram germinadas durante três dias sob ausência (0 mM) ou presença de Al (1,5 ou 3,0 mM).

APÊNDICE K (Dados Suplementares) - Figura S1

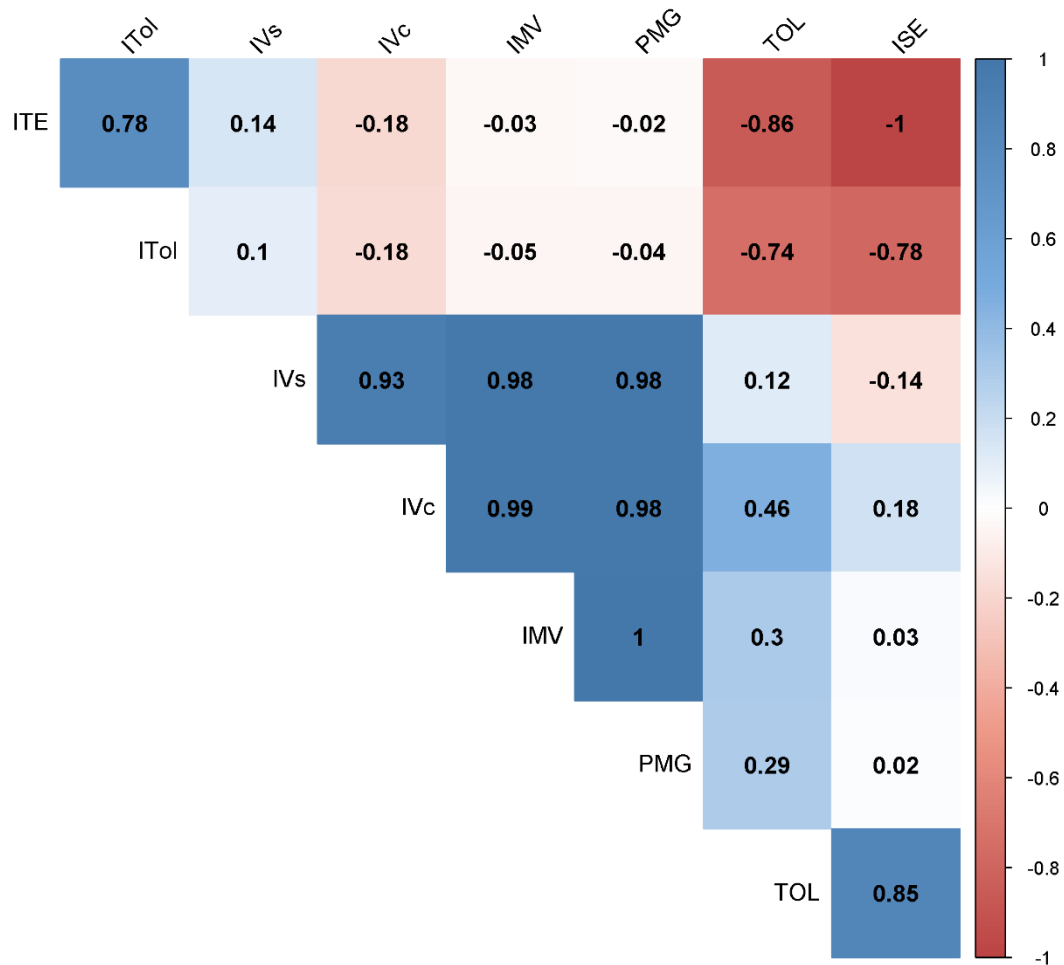


Figura S1. Matriz de correlação linear de Pearson obtida a partir dos índices de tolerância de plântulas de 65 cultivares de soja após exposição ao Al 1,5 mM durante o processo de germinação. Índice de Vigor do controle (IVc), Índice de Vigor do estresse (IVs), Índice Médio do Vigor (IMV), tolerância (TOL), Produtividade Média Geométrica (PMG), Índice de Sensibilidade ao Estresse (ISE), Índice de Tolerância ao estresse (ITE), Índice de Tolerância (ITol). As células coloridas indicam correlação significativa ($p < 0,05$ pelo Teste t).

APÊNDICE L (Dados Suplementares) - Figura S2

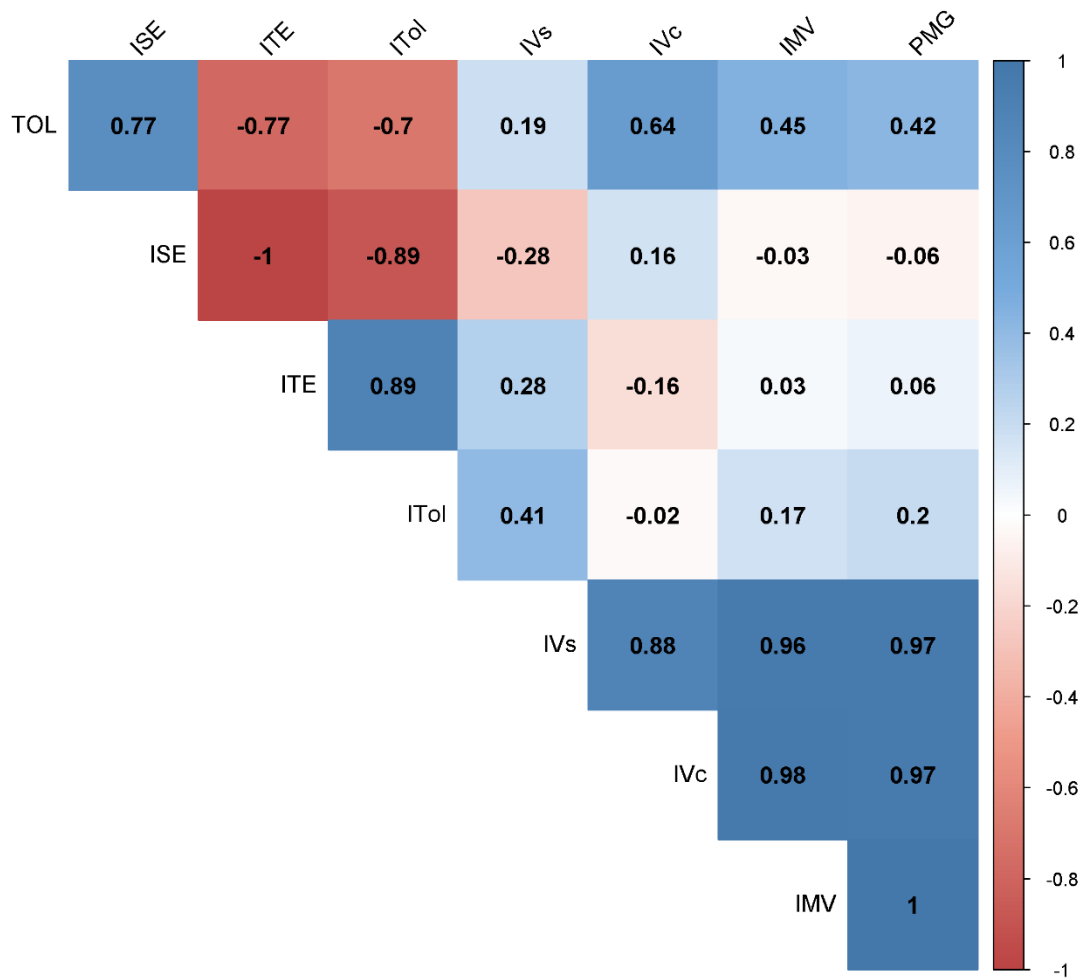


Figura S2. Matriz de correlação linear de Pearson obtida a partir dos índices de tolerância de plântulas de 65 cultivares de soja após exposição ao Al 3,0 mM durante o processo de germinação. Índice de Vigor do controle (IVc), Índice de Vigor do estresse (IVs), Índice Médio do Vigor (IMV), tolerância (TOL), Produtividade Média Geométrica (PMG), Índice de Sensibilidade ao Estresse (ISE), Índice de Tolerância ao estresse (ITE), Índice de Tolerância (ITol). As células coloridas indicam correlação significativa ($p < 0,05$ pelo Teste t).

APÊNDICE M (Dados Suplementares) - Figura S3

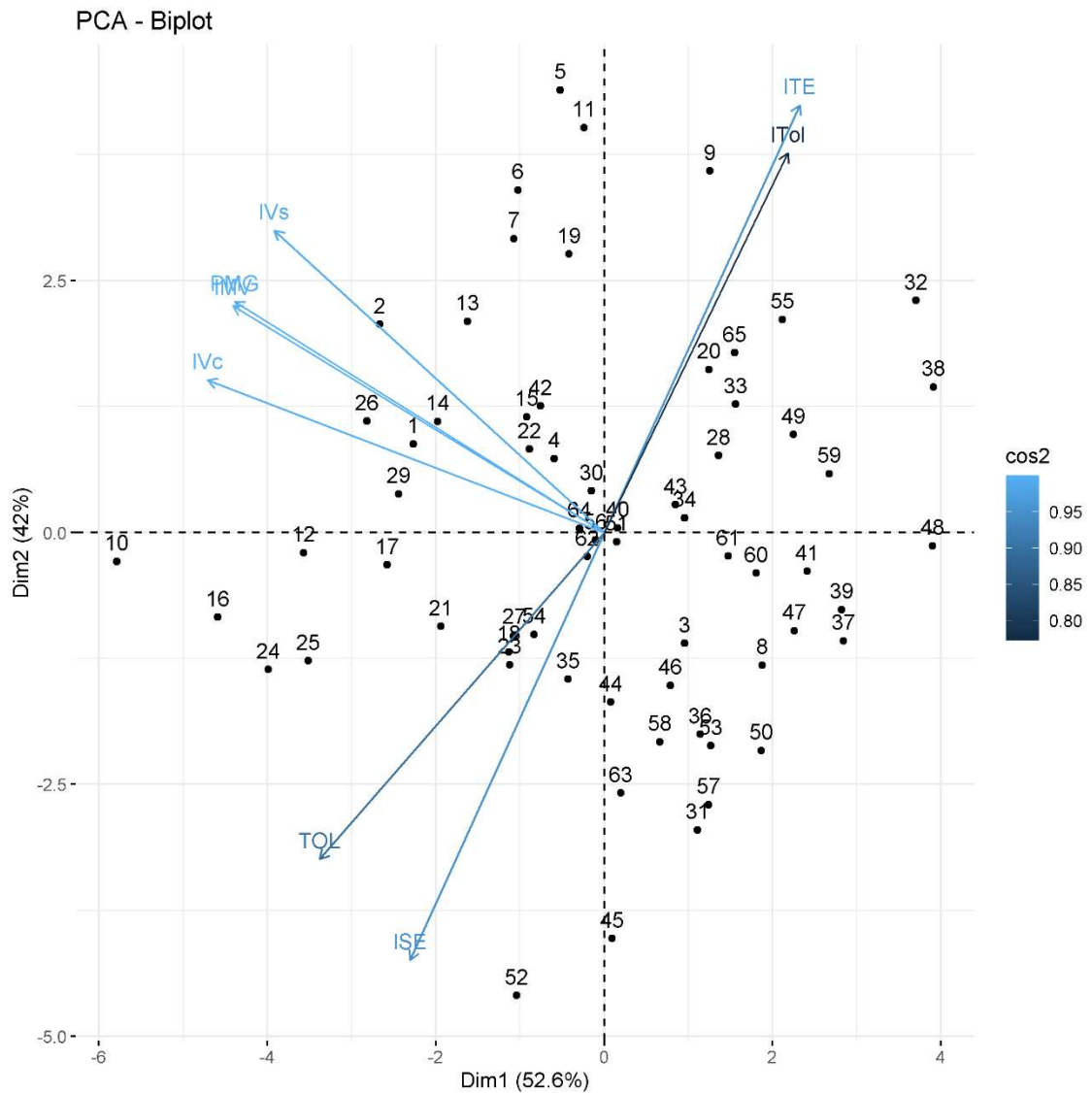


Figura S3. Biplot da Análise de Componentes Principais (PCA) obtida por meio da combinação linear dos índices biométricos de plântulas de 65 cultivares de soja sob Al 1,5 mM durante o processo de germinação. Índice de Vigor do controle (IVc), Índice de Vigor do estresse (IVs), Índice Médio do Vigor (IMV), tolerância (TOL), Produtividade Média Geométrica (PMG), Índice de Sensibilidade ao Estresse (ISE), Índice de Tolerância ao estresse (ITE), Índice de Tolerância (ITol).

APÊNDICE N (Dados Suplementares) - Figura S4

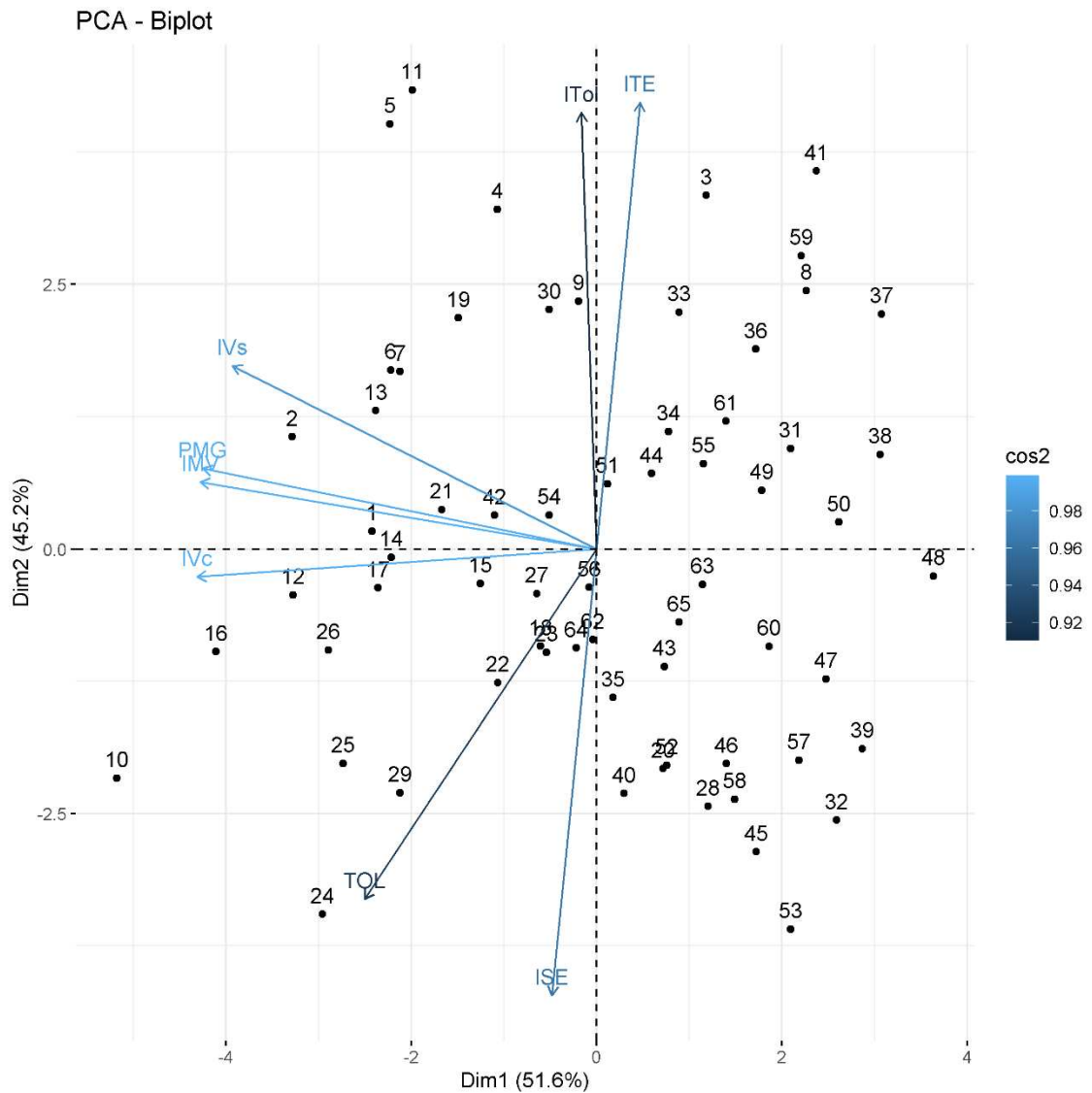


Figura S4. Biplot da Análise de Componentes Principais (PCA) obtida por meio da combinação linear dos índices biométricos de plântulas de 65 cultivares de soja sob Al 3,0 mM durante o processo de germinação. Índice de Vigor do controle (IV_c), Índice de Vigor do estresse (IV_s), Índice Médio do Vigor (IMV), tolerância (TOL), Produtividade Média Geométrica (PMG), Índice de Sensibilidade ao Estresse (ISE), Índice de Tolerância ao estresse (ITE), Índice de Tolerância (ITol).

APÊNDICE O (Dados Suplementares) - Figura S5

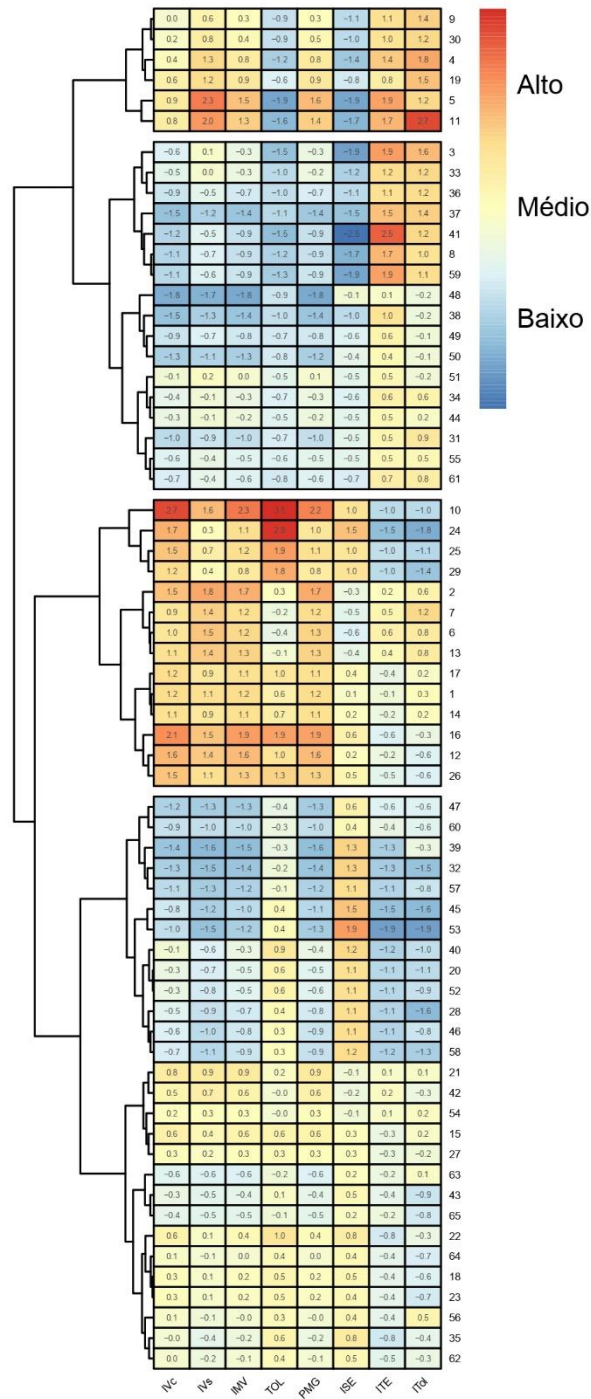


Figura S5. Heat map para os índices de tolerância de plântulas de 65 cultivares de soja sob Al 1,5 mM durante o processo de germinação. Índice de Vigor do controle (IV_c), Índice de Vigor do estresse (IV_s), Índice Médio do Vigor (IMV), tolerância (TOL), Produtividade Média Geométrica (PMG), Índice de Sensibilidade ao Estresse (ISE), Índice de Tolerância ao estresse (ITE), Índice de Tolerância (ITol).

APÊNDICE P (Dados Suplementares) - Figura S6

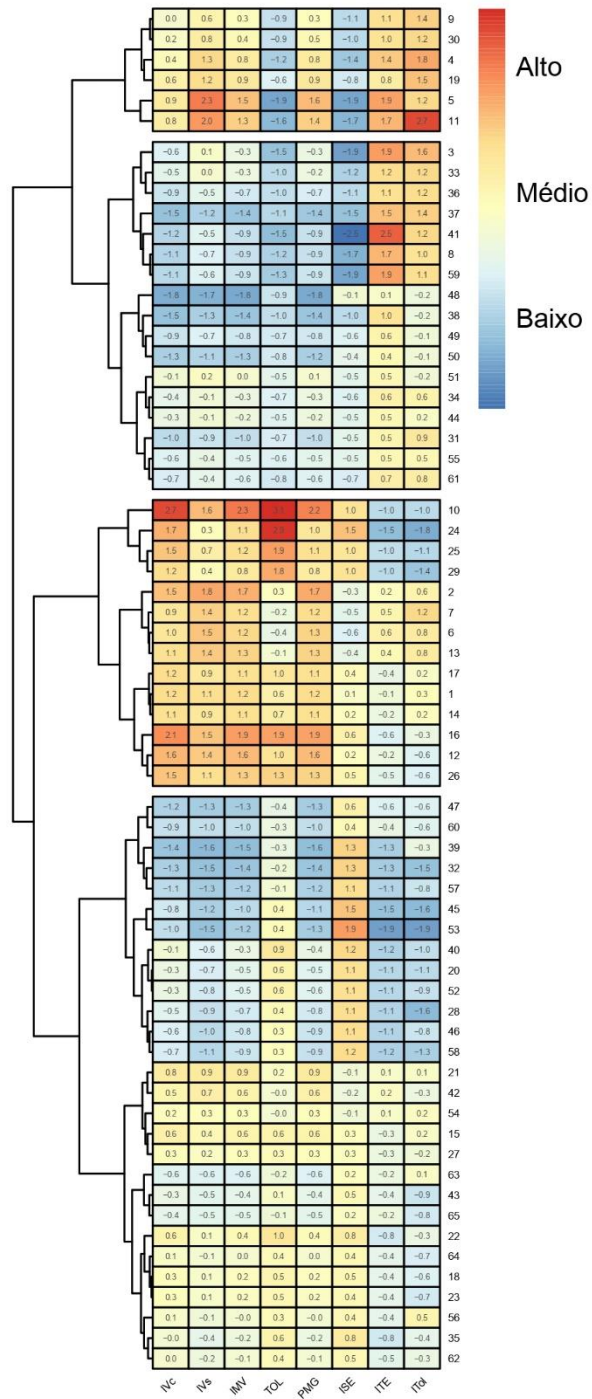


Figura S6. Heat map para os índices de tolerância de plântulas de 65 cultivares de soja sob Al 3,0 mM durante o processo de germinação. Índice de Vigor do controle (IVc), Índice de Vigor do estresse (IVs), Índice Médio do Vigor (IMV), tolerância (TOL), Produtividade Média Geométrica (PMG), Índice de Sensibilidade ao Estresse (ISE), Índice de Tolerância ao estresse (ITE), Índice de Tolerância (ITol).

CAPÍTULO 2: Germinando sob estresse: alumínio modula a morfoanatomia e o metabolismo o em ápices radiculares de plântulas de soja

Resumo

O alumínio (Al) pode ocasionar distúrbios metabólicos que se refletem em menor performance das plântulas. A germinação das sementes, o desempenho das plântulas, acúmulo de Al, a concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e aspectos fisiológicos e metabólicos foram avaliados em ápices radiculares de soja de dois cultivares com tolerância diferencial ao Al: 50I52RSF IPRO (tolerante) e NA5909 RG (sensível). As sementes foram semeadas em papel Germitest® na ausência (0 mM) e presença (1,5 mM) de Al e no terceiro dia foram mensurados: a taxa de germinação, o comprimento total de plântulas e índice de vigor, índice de crescimento, comprimento total das raízes, volume das raízes e diâmetro médio das raízes. Teor, sítios de acúmulo de Al e micromorfologia de ápices radiculares foram analisados. Nos ápices radiculares foram quantificados marcadores do estresse oxidativo ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e MDA), atividades de enzimas antioxidantes (SOD, CAT, POX, APX, GPX, GR e DHAR) e compostos relacionados ao metabolismo primário (aminoácidos, prolina, proteínas, amido, glicose, frutose, sacarose, malato, fumarato, fenóis, nitrato e ureídeos). Na presença de Al o índice de crescimento, comprimento da raiz e total foram os parâmetros que apresentaram maior redução no cultivar sensível, além disso houve engrossamento nas raízes desse cultivar. Nos dois cultivares foi detectado Al no ápice das raízes pela reação positiva com o corante hematoxilina e pelo fluoróforo lumogallion na microscopia confocal, inclusive nas células da borda. Danos micromorfológicos não foram observados nos ápices radiculares, entretanto o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica aumentaram no cultivar sensível exposto ao Al. No cultivar tolerante houve a formação de células de borda e a ativação de um sistema antioxidante robusto, contribuindo para minimizar os efeitos do estresse oxidativo ocasionado pelo Al. O metabolismo primário foi modulado, com destaque para o aumento nos teores dos açúcares solúveis e redução de malato nos dois cultivares e aumento do teor de prolina e redução de fenóis no cultivar tolerante.

Palavras-chave: *Glycine max* (L) Merrill; células da borda; acúmulo de Al; desempenho de plântulas; estresse oxidativo; metabolismo primário.

Abstract

Aluminum (Al) can cause metabolic disorders that reflected in reduced seedling performance. Seed germination, seedling performance, Al accumulation, reactive oxygen species (ROS) concentration, and physiological and metabolic aspects were evaluated in soybean root tips of two cultivars with differential tolerance to Al: 50I52RSF IPRO (tolerant) and NA5909 RG (sensitive). The seeds were sown on Germitest® paper in the absence (0 mM) and presence (1.5 mM) of Al, and on the third day, the germination rate, total seedling length and vigor index, growth index, total root length, root volume, and average root diameter were measured. Al content, Al accumulation sites, and root tip micromorphology were analyzed. Oxidative stress markers ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , and MDA), antioxidant enzyme activities (SOD, CAT, POX, APX, GPX, GR, and DHAR), and compounds related to primary metabolism (amino acids, proline, proteins, starch, glucose, fructose, sucrose, malate, fumarate, phenols, nitrate, and ureides) were quantified in the root tips. In the presence of Al, the growth index, root length, and total length were the parameters that showed the greatest reduction in the sensitive cultivar, in addition to thickening in the roots of this cultivar. In both cultivars, Al was detected in the root tips by the positive reaction with the hematoxylin dye and by the lumogallion fluorophore in confocal microscopy, including in the edge cells. Micromorphological damage was not observed in the root tips, however, oxidative stress and lipid peroxidation increased in the sensitive cultivar exposed to Al. In the tolerant cultivar, there was the formation of border cells and the activation of a robust antioxidant system, contributing to minimizing the effects of oxidative stress caused by Al. Primary metabolism was modulated, with emphasis on the increase in soluble sugar levels and reduction of malate in both cultivars and an increase in proline level and reduction of phenols in the tolerant cultivar.

Keywords: *Glycine max* (L) Merrill; border cells; Al accumulation; seedling performance; oxidative stress; primary metabolism.

1 INTRODUÇÃO

A biodisponibilidade do alumínio (Al) em solos ácidos ($\text{pH} \leq 5,5$) é um dos principais fatores que contribuem para a redução da produtividade agrícola nos trópicos, onde se localizam regiões estratégicas para a produção de alimentos (Kochian *et al.*, 2015; Rao *et al.*, 2016). Dessa forma, o estresse por Al se configura como problema crônico para a produção de alimentos, sob um contexto de preocupação com a segurança alimentar e a sustentabilidade ambiental (Rasheed *et al.*, 2023; Riaz *et al.*, 2018). Ainda mais com a acidificação do solo se intensificando com o uso de fertilizantes e absorção de nutrientes catiônicos pelas plantas (Zhang *et al.*, 2020).

A afinidade do Al pelos grupos carboxílicos com cargas negativas presentes na matriz péctica da parede celular favorece seu acúmulo nos ápices radiculares (Ofoe *et al.*, 2023), como pode ser observado em pontas de raízes de arroz (Brito *et al.*, 2020; Ribeiro *et al.*, 2022), soja (Andrade *et al.*, 2023; Silva *et al.*, 2020) e milho pipoca (Yoshida *et al.*, 2023) através de testes de histolocalização e uso de microscopia de luz e eletrônica. O Al induz alterações fisiológicas (Silva *et al.*, 2023) e morfológicas nas raízes (Ciamporová, 2002; Riaz *et al.*, 2018), culminando na inibição do crescimento radicular (Kochian *et al.*, 2015; Ofoe *et al.*, 2023). O acúmulo de Al também compromete a absorção de água e nutrientes, conferindo susceptibilidade às plantas submetidas à estresses por seca e distúrbios fisiológicos em função da deficiência nutricional (Rao *et al.*, 2016).

A ocorrência de estresses abióticos, como o ocasionado pelo Al, nas fases sensíveis do ciclo de vida das plantas (germinação e emergência), pode comprometer o seu desempenho no campo e refletir em redução na produtividade (Rao *et al.*, 2016; Steiner *et al.*, 2021). Entretanto, estudos mais frequentes visando avaliar os efeitos do Al em plantas cultivadas são conduzidos nos estágios mais avançados de desenvolvimento (Andrade *et al.*, 2023; Silva *et al.*, 2020, 2023). Dessa forma, surgem questionamentos sobre a influência do Al nas fases iniciais do ciclo de vida das plantas. Alguns autores avaliaram o efeito do Al na germinação de espécies cultivadas e constataram que o estresse por Al reduziu a germinação de sementes e os parâmetros biométricos de plântulas, como o comprimento do hipocótilo e da raiz (Cai *et al.*, 2022; Custódio *et al.*, 2002; Steiner *et al.*, 2021). Entretanto, estudos sobre o acúmulo de Al e os mecanismos de tolerância a este metal em estágios germinativo e pós-germinativo são pouco explorados (Wang *et al.*, 2019).

O acúmulo de Al nas raízes pode ocasionar o estresse oxidativo, em função do desbalanço na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) nos compartimentos celulares, como radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Gill; Tuteja, 2010; Sharma et al., 2012). Apesar da síntese de EROs pertencer ao metabolismo constitutivo das plantas, atuando na sinalização molecular (Appel; Hirt, 2004), inclusive modulando eventos germinativos (Bailly, 2004; Bailly *et al.*, 2008; Farooq *et al.*, 2021), seu acúmulo induz modificações no status de oxido-redução de células e estresse oxidativo; danificando biomoléculas como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, que resulta na peroxidação lipídica e morte celular (Mittler, 2002).

As enzimas antioxidantes são a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo provocado pela exposição ao Al (Gupta *et al.*, 2013), que pode induzir a síntese e/ou a ativação das enzimas do sistema antioxidante: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX), ascorbato peroxidase (APX) e glutathiona peroxidase (GPX), reduzindo para níveis toleráveis a concentração de EROs (Appel; Hirt, 2004; Bailly, 2004). Dessa forma, a maquinaria antioxidante atua para mitigar o estresse oxidativo ocasionado pelo Al (Ribeiro *et al.*, 2012, 2022; Yoshida *et al.*, 2023). Outras respostas metabólicas podem ser moduladas pela exposição ao Al tóxico, desde as alterações na concentração de açúcares solúveis e compostos nitrogenados, até a síntese de ácidos orgânicos e compostos fenólicos (Rahman; Upadhyaya, 2021; Ofoe *et al.*, 2023). As alterações na síntese de compostos oriundos do metabolismo central em condição de estresse por Al podem consistir em respostas de tolerância, e a quantificação desses metabólitos pode ajudar na elucidação desses mecanismos (Andrade *et al.*, 2023; Silva *et al.*, 2023; Siqueira *et al.*, 2020).

A soja (*Glycine max* L. Merrill) é uma cultura anual de grande importância para a segurança alimentar (Rasheed *et al.*, 2023). No Brasil, seu cultivo ocorre em regiões onde os solos são naturalmente ácidos e propensos a exposição ao Al tóxico desde as fases iniciais do ciclo da cultura. Dessa forma, o desenvolvimento de cultivares com alta performance nessa condição de cultivo é essencial (Rao *et al.*, 2016). Nesse trabalho nós utilizamos dois cultivares com tolerância diferencial ao Al: 50I52RSF IPRO (tolerante) e NA5909 RG (sensível), com base em experimentos preliminares. Nosso objetivo foi avaliar o desempenho de ambos os cultivares sob a exposição ao Al durante a germinação; mapear sítios de acúmulo de Al nos tecidos radiculares e investigar a contribuição do sistema antioxidante enzimático e compostos do metabolismo central na resposta diferencial ao Al. Dessa forma, hipotetizamos que o cultivar tolerante acumule menos Al e que o metabolismo do carbono seja modulado no sentido de conferir maior tolerância, bem como um melhor mecanismo de defesa antioxidante que permite

menores danos oxidativo através de um menor acúmulo de EROs. Para atingir nossos objetivos, analisamos o desempenho de plântulas através de parâmetros biométricos, técnicas de histolocalização de Al, quantificação de compostos do metabolismo do carbono, estresse oxidativo e atividades de enzima do sistema antioxidante. A integração entre fenotipagem, histoquímica e bioquímica fornece uma visão holística das alterações fisiológicas induzidas pelo Al e melhor compreensão dos mecanismos de tolerância associados a esse agente estressor. Nossos resultados mostram um menor acúmulo de Al nos ápices radiculares, modulação do metabolismo primário e um papel crucial do sistema antioxidante enzimático na melhor performance e desenvolvimento inicial de plântulas do cultivar tolerante.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e condições de cultivo

Para análises dos parâmetros biométricos, morfológicos, fisiológicos e metabólicos foram utilizadas sementes de dois cultivares de soja 50I52RSF IPRO e NA5909 RG, tolerante e sensível ao Al respectivamente. As sementes foram desinfestadas em NaOCl 2,5% (v/v) durante dois minutos e lavadas três vezes com água destilada. Em seguida, elas foram semeadas em caixas gerbox entre duas camadas de folhas duplas de papel Germitest® umedecidos com as soluções: ausência de Al (controle) e presença de Al (1,5 mM na forma de $AlCl_3$), ambas em pH 4,0. O volume da solução foi equivalente a 2,5 vezes a massa seca do papel. As caixas gerbox foram embaladas em saco plástico e dispostas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16/8 h luz/escuro ($200 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$), temperatura controlada de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (± 2) e umidade relativa do ar de 60% durante três dias. No final do experimento as plântulas foram coletadas para as análises biométricas. Ápices radiculares com 2 cm de comprimento foram congelados em N_2 líquido e armazenados a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ para as análises fisiológicas e metabólicas. As análises histoquímicas e morfológicas foram realizadas a fresco em pontas de raízes com 0,5 cm de comprimento. Para as análises biométricas foram utilizadas cinco repetições por cultivar com a unidade experimental constituída por 20 sementes por caixa gerbox. Para quantificar o Al foram utilizadas 12 sementes por caixa gerbox com 100 replicatas por repetição e para as análises fisiológicas e bioquímicas foram utilizadas 12 sementes por caixa gerbox com 10 replicatas por repetição.

2.2 Avaliações biométricas

Para avaliar o desempenho dos cultivares de soja na presença do Al foi utilizado o software Vigor-S[®] para a análise das imagens das plântulas e o software WinRHIZO[®] para as análises das raízes. As plântulas foram transferidas para uma folha de Etileno Acetato de Vinila (EVA) de coloração azul e digitalizadas com uma resolução de 300 dpi por um escâner HP Scanjet 200, acoplado a um computador. Em seguida, pelo software Vigor-S[®] foram obtidos os valores médios dos índices de crescimento (iCresc) e vigor (iVigor) das plântulas em uma escala de 0 a 1000 e o comprimento total das plântulas (cTotal) (Castan *et al.*, 2018). Com o software WinRHIZO[®] (Regent Instruments, Québec, Canada) acoplado a um escâner EPSON Perfection 10000XL (Epson, Nagano, Japão) foram obtidos o comprimento total da raiz (cRaiz), volume da raiz (volRaiz) e diâmetro médio da raiz (diamRaiz). Para registrar a performance de crescimento as plântulas foram fotografadas com câmera fotográfica (Nikon, Coolpix P510).

2.3 Concentração e localização do Al

Ápices radiculares (2 cm) foram secos em estufa a 70 °C até peso constante e moídos em moinho de bolas. Amostras de 200 mg de ponta de raiz seca foram digeridas com solução nitroperclórica (3:1) e analisadas em espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES, Optima 8300 DV, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) para determinação da concentração de Al (Silva *et al.*, 2020).

Para a histolocalização do Al, raízes intactas frescas foram mergulhadas em hematoxilina férrica 0,2% (p/v) contendo 0,02% KIO₃ (p/v) por 15 min (Polle *et al.* 1978). Posteriormente, as amostras foram lavadas em água deionizada por 10 min para remover o excesso de corante. As pontas das raízes com 2,0 cm de comprimento foram seccionadas e fotografadas em estereomicroscópio (Zeiss, Stemi DV4, Alemanha).

2.4 Localização do Al em ápices radiculares por microscopia confocal

Amostras frescas de ápices radiculares com 0,5 cm de comprimento foram imersos no fluoróforo lumogallion (10 µM em tampão acetato 0,1 M pH 5,2) por 60 min sob temperatura de 50 °C (Silva *et al.*, 2020). As amostras foram lavadas três vezes em tampão acetato e a emissão de fluorescência observada em microscópio confocal de varredura a laser (LSM510 META, Carl Zeiss MicroImaging, Thornwod, NY, USA). Adicionalmente, para histolocalizar células mortas, os ápices radiculares foram corados com iodeto de propídio (IP) na concentração de 10 µM, diluído em tampão acetato (Jones; Senft, 1985, com adaptações). Dois conjuntos de

filtro (ELFP) foram utilizados para excitação e emissão (488 nm e 520 nm, respectivamente) (Ribeiro *et al.*, 2022).

2.5 Microanálise dos ápices radiculares por microscopia eletrônica de varredura

Ápices radiculares com 0,5 cm de comprimento foram fixados em 2,5% (v/v) de glutaraldeído. Em seguida as amostras foram desidratadas em série etílica (30-100%) durante 10 min em cada álcool; secas com CO₂ em secador de ponto crítico (Balzers, CPD 030, Balzers, Liechtenstein, Alemanha) e afixados com fita dupla face em superfície metálica e revestidas com ouro no evaporador de carbono (Quorum Technologies, Q150T Ashford, Kent, UK). Em microscópio eletrônico de varredura (Zeiss, LEO, 1430VP, Cambridge, UK) sob tensão de aceleração de 12 kV, foi realizado a documentação fotográfica (Silva *et al.*, 2020).

2.6 Quantificação e localização do radical ânion superóxido (O₂^{•-})

O O₂^{•-} foi quantificado em 80 mg de ápices radiculares macerados em N₂ líquido e incubados em meio de reação composto por sal dissódico e ácido etilenodiamino tetra-acético (Na₂EDTA) 100 mM, NADH 20 mM e tampão fosfato de sódio a 20 mM, pH 7,8 (Mohammadi; Karr, 2001). A reação iniciou pela adição de 100 µL de epinefrina 1,2 mM dissolvida em HCl 0,1 N. As amostras foram incubadas a 28 °C durante 5 minutos, sob agitação e a absorvância lida a 480 nm (Boveris *et al.*, 2002; Misra; Fridovich, 1971). A produção do O₂^{•-} foi avaliada através do adenocromo acumulado, utilizando o coeficiente de absorvidade molar de 4,0 x 10³ M⁻¹ (Boveris *et al.*, 2002).

A histolocalização do O₂^{•-} foi realizada pelo azul de nitrotetrazólio (NBT) conforme Shi *et al.* (2010), com modificações. Para a detecção de O₂^{•-}, ápices radiculares frescos foram fragmentados a 2 cm a partir do ápice e imersos em solução de 1 mg mL⁻¹ de NBT dissolvido em 10 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,8). As amostras foram iluminadas durante 5 minutos, lavadas em álcool 70% e fotografadas por câmera digital em microscópio trinocular (Olympus, SZX7, Tokyo).

2.7 Quantificação e localização do peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

O H₂O₂ foi quantificado em 150 mg de ápices radiculares macerados em N₂ líquido. As amostras foram homogeneizadas em 1 mL do meio de extração composto por 50 mM de tampão fosfato de potássio, pH 6,5, contendo 1 mM de hidroxilamina. O macerado foi centrifugado a 10.000 x g, durante 15 min a 4 °C (Kuo; Kao, 2003). Em seguida, 20 mL do sobrenadante foram

adicionados ao meio de reação, composto por 250 mM de $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)$ dissolvido em 25 mM de H_2SO_4 ; 250 mM de laranja de xilenol e 100 mM de sorbitol (Gay; Gebicki, 2000). Durante 30 min as amostras foram incubadas no escuro e a leitura da absorbância realizada a 560 nm. A concentração de H_2O_2 foi determinada por curva padrão com padrões autênticos de H_2O_2 .

A histolocalização do H_2O_2 foi realizada utilizando o reagente 3'3 - diaminobenzidina (DAB), conforme proposto por Shi *et al.* (2010), com modificações. As raízes foram fragmentadas a 2 cm a partir do ápice e imersas em solução de 1 mg mL^{-1} de DAB preparado a fresco e em água ultrapura (pH 3,8), incubados sob iluminação por 90 min. Os ápices radiculares foram lavados em álcool 70% e fotografados em microscópio trinocular (Olympus, SZX7, Tokyo).

2.8 Quantificação de malondialdeído (MDA) e determinação da viabilidade celular pelo corante Evans blue

Ápices radiculares de 150 mg foram macerados em N_2 líquido e homogeneizados em 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 1% (p/v), seguido de centrifugação a 12,000 x g durante 15 min a 4 °C. Alíquotas de 500 μL dos sobrenadantes foram adicionadas em 1,5 mL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5 % (p/v) em TCA 20% (p/v). Em seguida, as amostras foram incubadas a 95 °C sob agitação em termomisturador por 30 minutos. A reação foi interrompida em banho de gelo e as amostras centrifugadas a 10.000 x g por 10 min, a 4 °C. A absorbância do sobrenadante foi lida em leitor de microplacas (Infinite M200 PRO, RChisto, Grödig, Áustria) em dois comprimentos de onda: 532 e 600 nm, respectivamente, sendo que esta última corresponde a absorbância inespecífica, cujos valores foram subtraídos das amostras. A concentração do complexo aldeído malônico-TBA foi obtido pelo coeficiente de absorvidade molar de 155 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Heath; Packer, 1968).

Para a detecção da viabilidade celular, raízes intactas foram mergulhadas em 0,1% de azul de Evans (p/v) por 40 min (Kato *et al.*, 2007). Posteriormente, as amostras foram lavadas em água deionizada por 10 min para remover o excesso de corante. As pontas das raízes (2,0 cm) foram seccionadas e fotografadas em estereomicroscópio (Zeiss, Stemi DV4, Alemanha).

2.9 Quantificação da atividade das enzimas do sistema antioxidante

Ápices radiculares de 150 mg foram macerados em N_2 líquido para obter extratos brutos para quantificar atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1), catalase (CAT) (EC 1.11.1.6), peroxidase total (POX) (EC 1.11.1.7), peroxidase do ascorbato (APX) (EC 1.11.1.11), redutase do deidroascorbato (DHAR) (EC 1.8.5.1), redutase da glutatona (GR)

(EC 1.8.1.7) e peroxidase da glutathiona (GPX) (EC 1.11.1.9). As avaliações enzimáticas seguiram protocolos de Ribeiro *et al.* (2022).

A concentração de proteínas nas amostras foi quantificada seguindo o protocolo proposto por Bradford (1976), utilizando BSA como padrão e absorvância de 595 nm. Todas as leituras de absorvância foram realizadas em leitor de microplacas (Infinite M200 PRO, RChisto, Grödigg, Áustria).

2.10 Análises bioquímicas

Ápices radiculares, armazenados a -80 °C foram liofilizados a -51 °C. Alíquotas de 10 mg do material liofilizado foram submetidas a extração metanólica (Lisec *et al.*, 2006; com modificações). Posteriormente, foram quantificados os teores de glicose, frutose, sacarose, fumarato, malato, prolina, fenois totais, nitrato, ureídeos totais, alantoato e alantoína a partir da fração solúvel, enquanto os teores de amido e proteínas solúveis totais foram quantificados a partir da fração insolúvel. A quantificação de proteínas solúveis totais foi realizada conforme protocolo de Bradford (1976). Os aminoácidos totais foram quantificados pelo método colorimétrico (Yemm *et al.*, 1955). A concentração de amido, glicose, frutose e sacarose foi quantificada conforme protocolo proposto por Fernie *et al.* (2001). O teor de prolina foi quantificado seguindo recomendações de Carillo e Gibon (2011).

A concentração de nitrato foi quantificada conforme métodos descritos em APHA (2005). Alíquotas de 5 µL de extrato metanólico foram completadas para 300 µL com H₂O ultrapura e lidas em triplicatas nos comprimentos de onda de 210, 220 e 230 nm. Com as OD obtidas, calculou-se a segunda derivada $OD = ((OD_{210nm} - OD_{220nm}) - (OD_{220nm} - OD_{230nm}))$ e as absorvâncias comparadas à curva-padrão de KNO₃. A concentração de ureídeos totais foi quantificada de acordo com Vogels e Drift *et al.* (1970). O conteúdo de alantoato foi quantificado omitindo a etapa inicial de hidrólise alcalina e a alantoína foi calculada por diferença, em relação à concentração de ureídeos totais, que foi quantificada utilizando curva de calibração contendo alantoína como padrão. Os ácidos orgânicos malato e fumarato foram quantificados seguindo metodologia de Nunes-Nesi *et al.* (2007) e compostos fenólicos totais conforme (Sun *et al.*, 2007).

2.11 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de homogeneidade de variâncias (Bartlett, $p \leq 0,05$) e normalidade dos resíduos (Shapiro-Wilk, $p \leq 0,05$) e à análise de variância e

os valores médios dos tratamentos, quando significativos, comparados pelo Teste Duncan ($p \leq 0,05$) usando o software R x 64 4.0.5 (R Core Team, 2019).

3 RESULTADOS

O Al não alterou a taxa de germinação em nenhum dos cultivares avaliados (dados não mostrados), mas reduziu o iCresc, o iVigor, cTotal e o cRaiz apenas para o cultivar NA5909 RG em 37, 25, 32 e 28%, respectivamente (Fig 1A-D). Na presença de Al, o cultivar tolerante 50I52RSF IPRO apresentou maior iCresc, iVigor, cTotal e cRaiz em relação ao cultivar sensível. Adicionalmente, na presença de Al houve redução no volRaiz e acréscimo no diamRaiz apenas para o cultivar NA5909 RG, com variação de 16% e 9%, respectivamente (Fig. 1E e F). O Al não alterou nenhum parâmetro de crescimento para o cultivar 50I52RSF IPRO, além disso, na presença de Al, esse cultivar mostrou performance superior ao cultivar NA5909 RG (Fig. 1G).

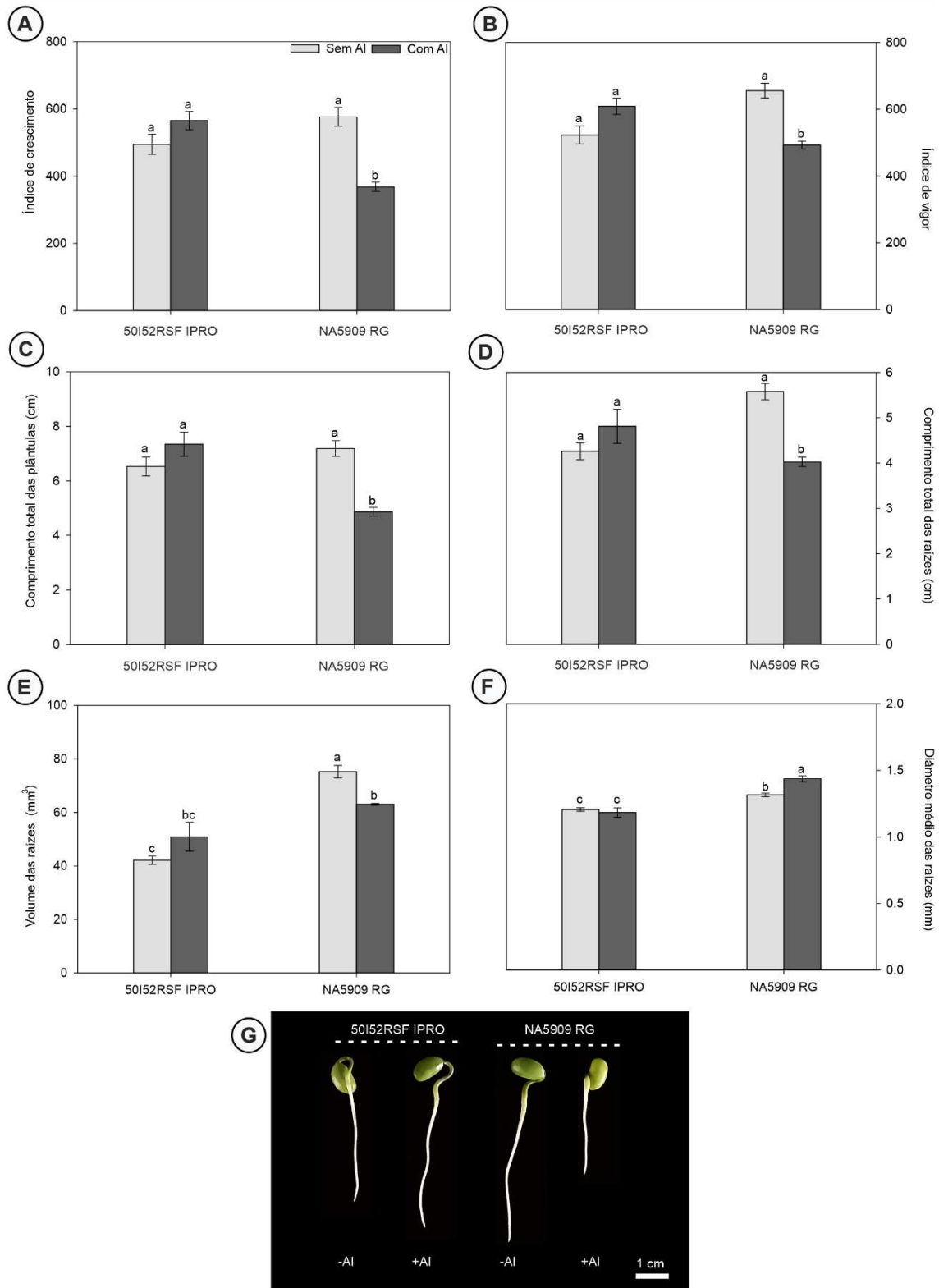


Figura 1. Índice de crescimento (A), índice de vigor (B), comprimento total das plântulas (C), comprimento total das raízes (D), volume das raízes (E), diâmetro médio das raízes (F) e performance das plântulas (G) de dois cultivares de soja, 72 horas após a semeadura na ausência e presença de alumínio (Al). Valores médios seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Duncan ($p \leq 0,05$). As barras representam os valores médios ($n=5$). \pm erro padrão.

A concentração de Al aumentou 73% no cultivar tolerante e 330% no cultivar sensível em relação aos seus respectivos controles, e no sensível a concentração desse metal foi 70% maior quando comparado ao cultivar tolerante (Fig. 2A). Apenas as raízes expostas ao Al apresentaram reação positiva com o corante hematoxilina (coloração púrpura), sendo essa coloração concentrada na extremidade dos ápices radiculares (Fig. 2B). O cultivar sensível apresentou maior intensidade de coloração em relação ao tolerante após exposição ao Al, corroborando com os dados encontrados na quantificação do Al.

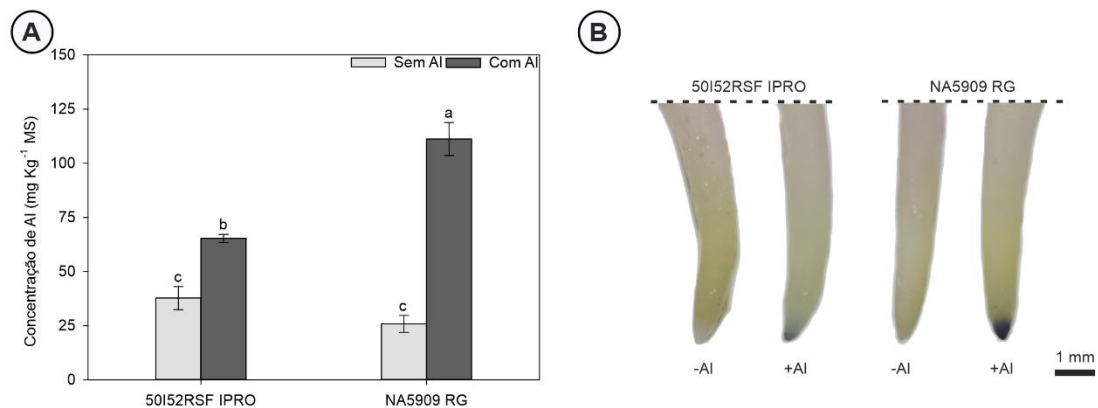


Figura 2. Concentração de Al (A) e localização de Al pelo corante hematoxilina (B) em ápices radiculares de plântulas de dois cultivares de soja, 50I52RSF IPRO e NA5909 RG, 72 horas após a semeadura sob ausência e presença de Al. Reação positiva com hematoxilina: coloração púrpura. Valores médios seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Duncan ($p \leq 0,05$). As barras representam os valores médios ($n=5$) \pm erro padrão.

A intensidade da fluorescência, pelo fluoróforo lumogalion (cor verde), aumentou nos ápices radiculares de ambos os cultivares após exposição ao Al, com maior intensidade para o cultivar sensível (Fig. 3E) no qual a fluorescência ficou concentrada na região mais externa da raiz. Já no cultivar tolerante a intensidade de fluorescência foi maior na região da coifa e em células da borda da raiz (CBRs) (Fig. 3C). Adicionalmente, foi avaliado a ocorrência de morte celular (Jones; Senft, 1985), através da intensidade de fluorescência emitida pelo fluoróforo iodeto de propídio (cor vermelha), a qual foi observada em CBRs do cultivar tolerantes (Fig. 3C, seta vermelha). Neste cultivar foi observado a sobreposição dos fluoróforos lumogalion (núcleo das CBRs - verde) e iodeto de propídio (parede celular das CBRs - vermelho) (Fig. 3C, setas amarelas).

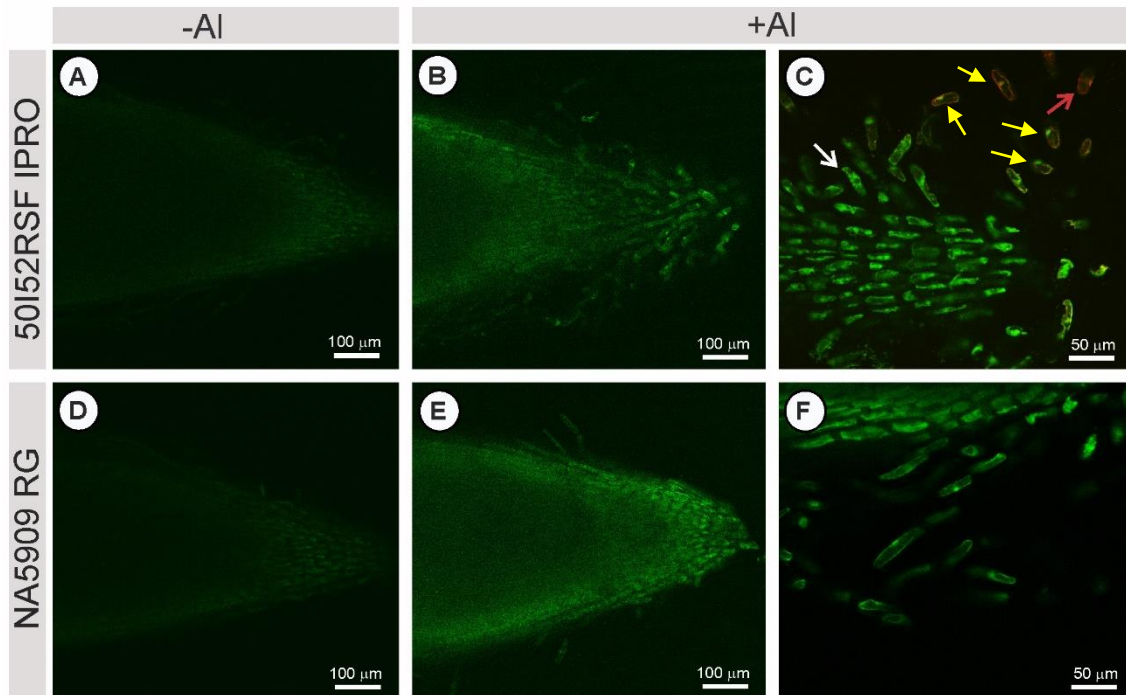


Figura 3. Localização de Al por microscopia confocal através do fluoróforo lumogalion em ápices radiculares de plântulas de dois cultivares de soja, 50I52RSF IPRO (A – C) e NA5909 RG (D – F), 72 horas após a semeadura sob ausência (A e D) e presença de Al (B, C, E e F). Cor verde representa reação positiva com o lumogalion (presença de Al). Cor vermelha representa reação positiva com o iodeto de propídio (presença de morte celular). Setas: presença de células da borda na ponta da raiz. Seta branca: células da borda com fluorescência pelo fluoróforo lumogalion. Seta vermelha: células da borda com fluorescência pelo fluoróforo iodeto de propídio. Setas amarelas: células da borda com sobreposição de fluorescência pelos fluoróforos iodeto de propídio (parede celular) e lumogalion (núcleo da célula).

A micromorfologia dos ápices radiculares evidenciou que após a exposição ao Al não houve danos estruturais nas raízes de ambos os cultivares de soja (Fig. 4). Contudo, na presença de Al houve formação de CBRs nos ápices radiculares de ambos os cultivares (Fig. 4B, D). Adicionalmente, no cultivar tolerante 50I52RSF IPRO foi observado maior frequência de CBRs na extremidade apical da raiz, agregadas por mucilagem (Fig. 4B).

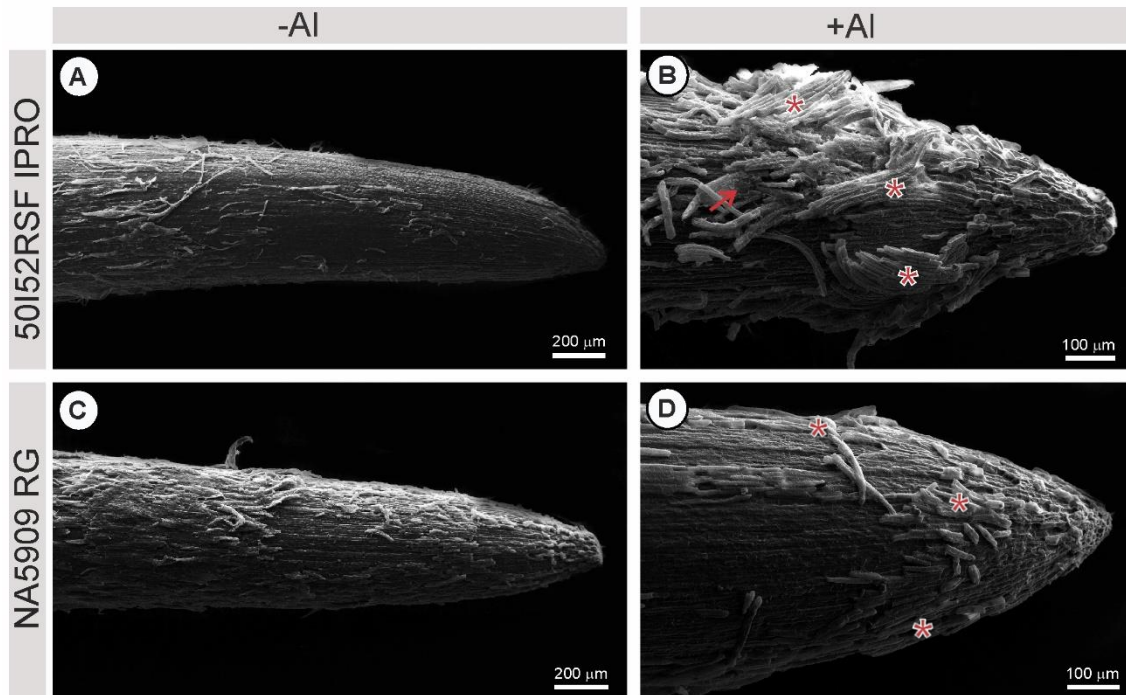


Figura 4. Micromorfologia de ápices radiculares por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de plântulas de dois cultivares de soja, 50I52RSF IPRO (A e B) e NA5909 RG (C e D), 72 horas após a semeadura sob ausência (A e C) e presença de Al (B e D). Células da borda da raiz (asteriscos) aderidas na mucilagem (seta vermelha).

A exposição ao Al não aumentou a concentração de $O_2^{\cdot-}$ em ambos os cultivares (Fig. 5A) e não houve diferença na intensidade de coloração pelo corante NBT entre os cultivares após exposição ao Al (Fig. 5D). Por outro lado, as concentrações de H_2O_2 e MDA aumentaram sob exposição ao Al apenas no cultivar NA5909 RG em 44% e 99%, respectivamente, em relação ao seu controle (Fig. 5B-C). A histolocalização do H_2O_2 e de morte celular foi mais pronunciada no cultivar sensível após exposição ao Al (Fig. 5E-F).

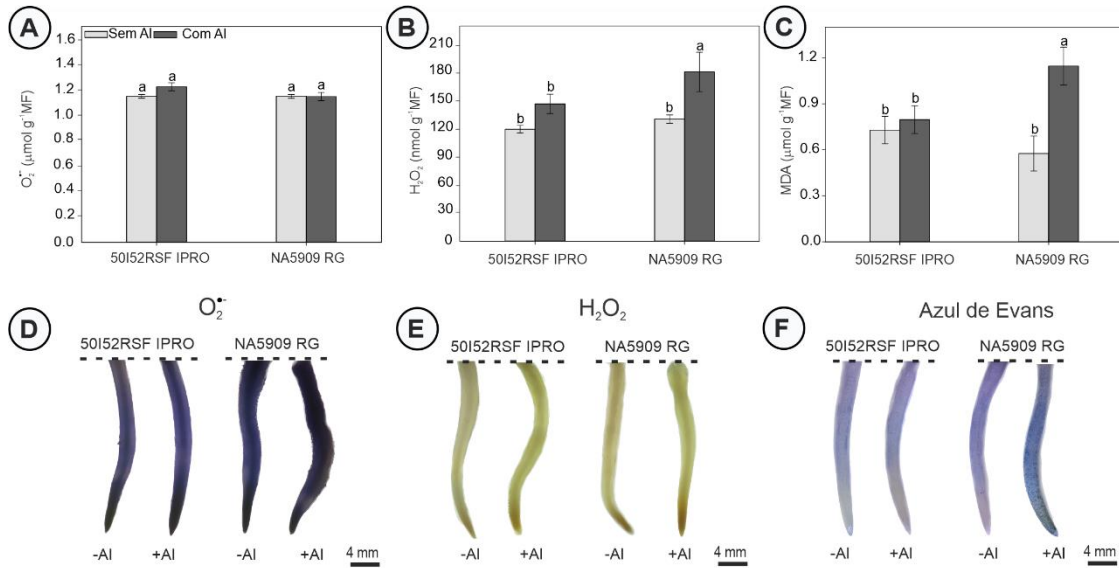


Figura 5. Concentração do radical ânion superóxido - $O_2^{\cdot-}$ (A), peróxido de hidrogênio - H_2O_2 (B) e peroxidação lipídica - MDA (C), histolocalização do $O_2^{\cdot-}$ pelo corante NBT (D) e do H_2O_2 pelo corante DAB (E) e avaliação da viabilidade de células pelo corante Azul de Evans (F) em ápices radiculares de plântulas de dois cultivares de soja, 50I52RSF IPRO e NA5909 RG, 72 horas após a semeadura na ausência e presença de Al. Reação positiva com NBT: coloração púrpura. Reação positiva com DAB: coloração marrom. Reação positiva com Azul de Evans: coloração azulada. Valores médios seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Duncan ($p \leq 0,05$). As barras representam os valores médios ($n=5$) \pm erro padrão.

A atividade de todas as enzimas avaliadas aumentou após a exposição do cultivar 50I52RSF IPRO ao Al em relação ao seu controle, e em relação ao cultivar NA5909 RG para a maioria das enzimas (Fig. 6). Contudo, não houve diferenças entre os cultivares, na presença de Al, para a atividade da GR (Fig. 6F). Destaca-se que, para o cultivar NA5909 RG não houve qualquer modulação na atividade das enzimas do sistema antioxidante das plântulas após exposição ao Al.

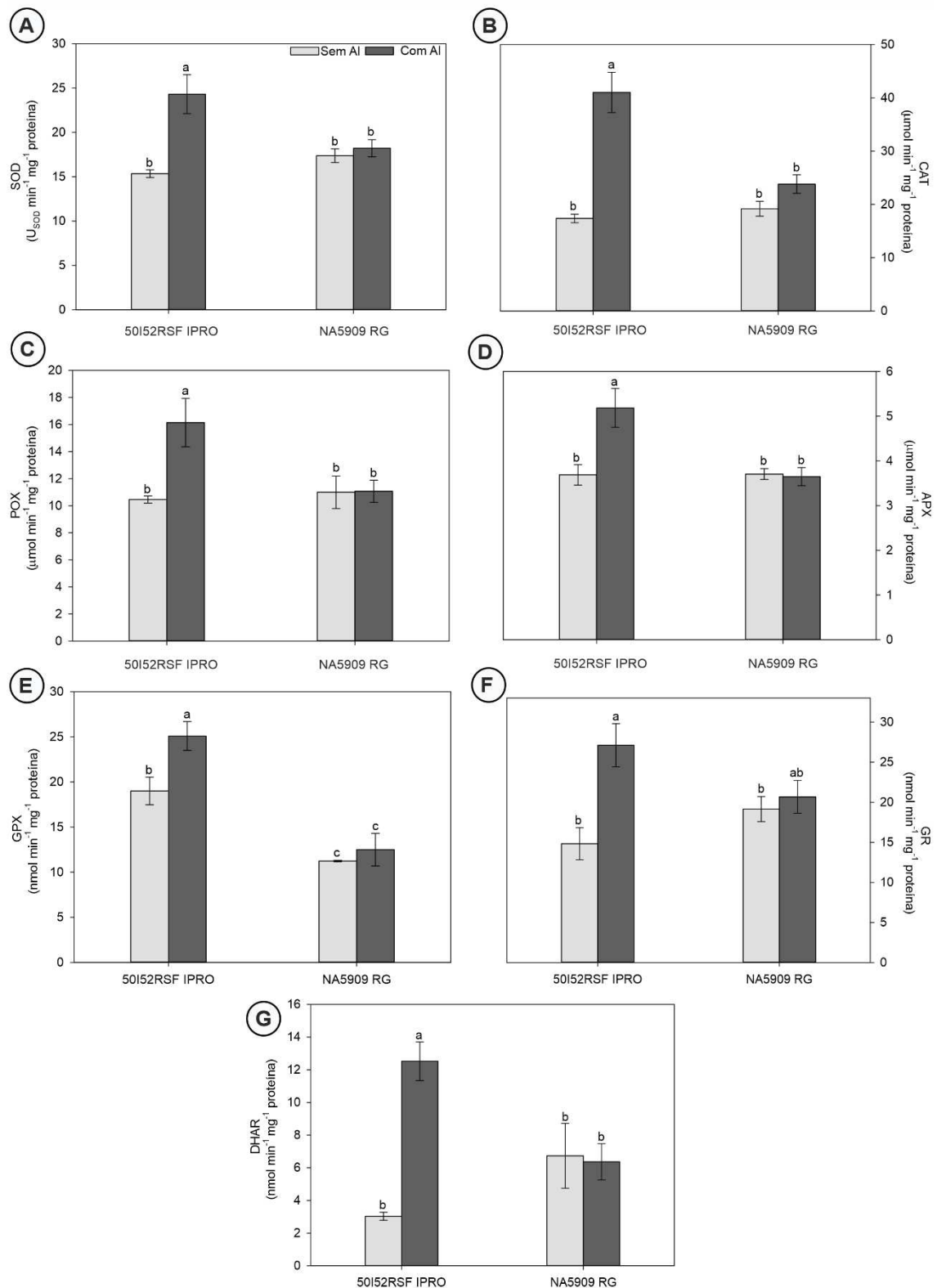


Figura 6. Atividade das enzimas superóxido dismutase - SOD (A), catalase - CAT (B), peroxidase total - POX (C), peroxidase do ascorbato - APX (D), peroxidase da glutaciona - GPX (E), glutaciona redutase - GR (F) e dehidroascorbato redutase DHAR (G) em ápices radiculares de plântulas de dois cultivares de soja, 50I52RSF IPRO e NA5909 RG, 72 horas após a semeadura sob ausência e presença de AI. Valores médios seguidos pela mesma letra não se diferem estatisticamente pelo Teste de Duncan ($p \leq 0,05$). As barras representam os valores médios ($n=5$) \pm erro padrão.

A presença do Al não alterou a concentração de aminoácidos livres (Fig. 7A) e proteínas solúveis totais (Fig. 7C) nos dois cultivares. Entretanto, a concentração do aminoácido prolina aumentou expressivamente (101,55%) no cultivar 50I52RSF IPRO sob Al (Fig. 7B). A exposição ao Al aumentou a concentração de nitrato no cultivar tolerante, mas reduziu a concentração desse composto no cultivar sensível (Fig. 7D). A concentração de ureídeos totais (Fig. 7E) e alantoatos (Fig. 7F) não foi modificada nos dois cultivares após exposição ao Al. Contudo, tanto na ausência quanto na presença de Al o cultivar 50I52RSF IPRO apresentou maior concentração dessas moléculas em relação ao cultivar NA5909 RG.

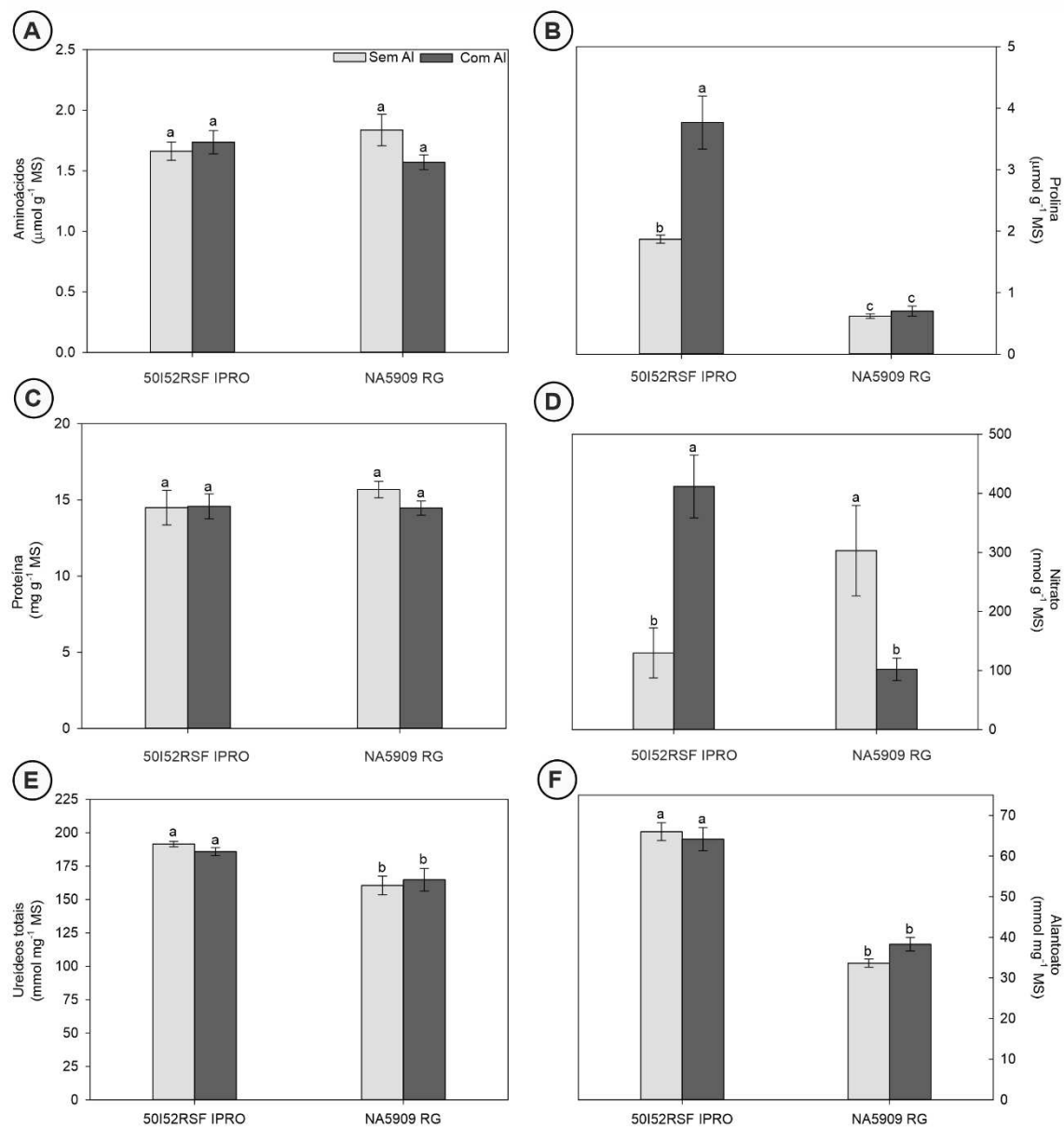


Figura 7. Concentração de aminoácidos total (A), prolina (B), proteínas totais (C), nitrato (D), ureídeos totais (E) e alantoato (F) em ápices radiculares de plântulas de dois cultivares de soja, 50I52RSF IPRO e NA5909 RG, 72 horas após a semeadura sob ausência e presença de Al. Valores médios seguidos pela mesma letra não se diferem estatisticamente pelo Teste de Duncan ($p \leq 0,05$). As barras representam os valores médios ($n=5$) \pm erro padrão.

A exposição ao Al modulou a síntese de carboidratos tanto no cultivar 50I52RSF IPRO quanto no cultivar NA5909 RG (Fig. 8). A concentração de amido não diferiu entre os tratamentos para o mesmo cultivar (Fig. 8A), porém o Al promoveu maior acúmulo de amido no cultivar NA5909 RG em relação ao cultivar 50I52RSF IPRO. A presença do Al aumentou a concentração de glicose e frutose nos dois cultivares de soja (Fig. 8B e C). Nessa condição, a concentração de glicose e frutose aumentou 81 e 20%, no cultivar 50I52RSF IPRO, e 20 e 17% no cultivar NA5909 RG, respectivamente. A exposição ao Al resultou em maior acúmulo de sacarose (37%) apenas no cultivar 50I52RSF IPRO (Fig. 8D).

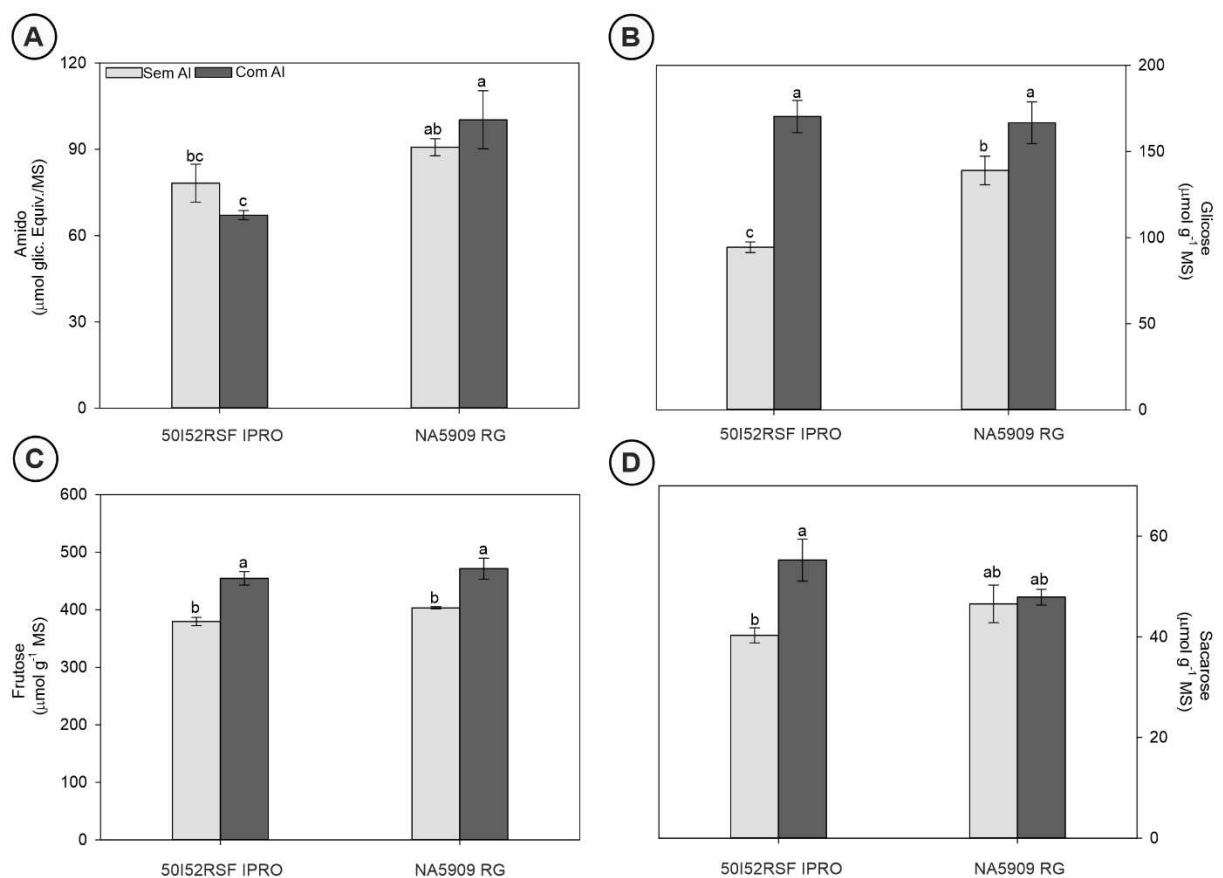


Figura 8. Concentração de amido (A), glicose (B), frutose (C) e sacarose (D) em ápices radiculares de plântulas de dois cultivares de soja, 50I52RSF IPRO e NA5909 RG, 72 horas após a semeadura sob ausência ou presença de Al. Valores médios seguidos pela mesma letra não se diferem estatisticamente pelo Teste de Duncan ($p \leq 0,05$). As barras representam o erro padrão dos valores médios ($n=5$). As barras representam os valores médios ($n=5$) \pm erro padrão.

A concentração de malato em ápices radiculares reduziu sob exposição ao Al tanto no cultivar 50I52RSF IPRO (7,21%) quanto no cultivar NA5909 RG (18,7%) (Fig. 9A). Os níveis de fumarato não diferiram entre os cultivares de soja sob presença de Al (Fig. 9B). No cultivar 50I52RSF IPRO o Al reduziu a concentração de fenóis totais (15,37%), resposta não observada no cultivar NA5909 RG (Fig. 9C).

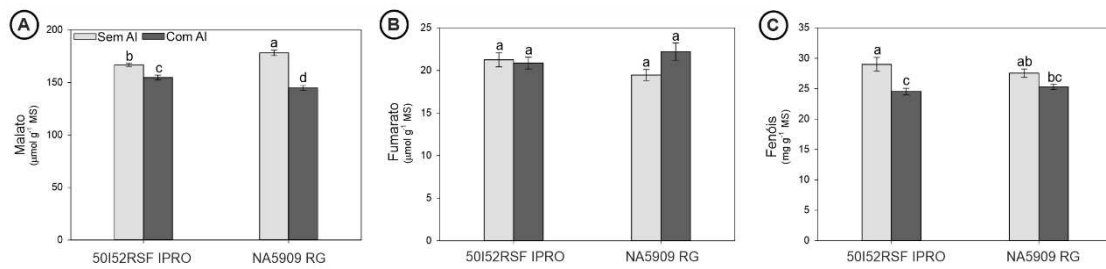


Figura 9. Concentração de malato (A), fumarato (B) e compostos fenólicos totais (C) em ápices radiculares de plântulas de dois cultivares de soja, 50I52RSF IPRO e NA5909 RG, 72 horas após a semeadura sob ausência e presença de Al. Valores médios seguidos pela mesma letra não se diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$). As barras representam os valores médios ($n=5$) \pm erro padrão.

4 DISCUSSÃO

A toxidez por Al é um problema crônico em solos ácidos, portanto a elucidação de mecanismos de tolerância em resposta a este tipo de estresse é fundamental para o desenvolvimento de cultivares tolerantes adaptados a essa condição (Riaz *et al.*, 2018; Rao *et al.*, 2016). Nesse trabalho avaliamos a modulação do acúmulo do Al sobre a germinação e o desempenho das plântulas, síntese de metabólitos e marcadores do estresse oxidativo e observamos respostas diferenciais a este metal entre os dois cultivares de soja, 50I52RSF IPRO (tolerante) e NA5909 RG (sensível).

4.1 O Al não alterou a germinação, mas induziu modulação diferencial no desempenho das plântulas

Embora a presença de íons tóxicos possa prejudicar a germinação, que é a fase mais sensível do ciclo de vida das plantas (El Moukhtari *et al.*, 2019), o Al não alterou a taxa da germinação nos cultivares de soja, sensível e tolerante a este metal, analisados. Essa mesma resposta foi observada em outros cultivares de *Glycine max* (Custódio, 2002), em *Nicotiana tabacum* (Burklew *et al.*, 2012) e *Zea mays* (Delavar *et al.*, 2017). A redução da germinação de sementes expostas ao Al foi reportada em *Oryza sativa* (Qianqian *et al.*, 2023; Xu *et al.*, 2017), *Triticum aestivum* (Zhang *et al.*, 2010), *Eugenia dysenterica* (Rodrigues *et al.*, 2019) e *Helianthus annuus* (Cai *et al.*, 2022). O tegumento da semente pode ter limitado a absorção de Al, uma vez que em sementes maduras sua presença restringe a absorção de metais pesados (Kranner; Colville, 2011) e sua permeabilidade varia em função da sua composição química (Silva *et al.*, 2021). Dessa forma, a composição química dos tecidos que envolvem o embrião pode restringir ou não a absorção de Al, reproduzindo respostas germinativas diversas em sementes de diferentes espécies após contato com este metal.

Apesar de não haver alteração na germinação, o desempenho das plântulas do cultivar NA5909 RG reduziu após a exposição ao Al (Fig. 1), em função do maior acúmulo desse elemento nos ápices radiculares (Fig. 2). O estresse por Al afeta o desempenho de plântulas, pois inibe o crescimento radicular, sintoma primário da toxidez ao Al, e frequentemente utilizado para diferenciar cultivares quanto à sua tolerância (Kochian *et al.*, 2015). Neste trabalho o Al inibiu o crescimento radicular do cultivar NA5909 RG (Fig. 1D), o que confirma a maior tolerância do cultivar 50I52RSF IPRO frente a este metal uma vez que o comprimento e volume das raízes desse cultivar não foram reduzidos (Fig. 1D, E). A manutenção do crescimento radicular sob exposição ao Al é considerada como uma resposta de tolerância ao metal (Ofoe *et al.*, 2023) e tem sido reportado em espécies cultivadas como soja (Silva *et al.*, 2020, 2023), arroz (Brito *et al.*, 2020; Ribeiro *et al.*, 2023) e milho pipoca (Yoshida *et al.*, 2023). A redução no comprimento das raízes no cultivar NA5909 RG (Fig. 1D) está correlacionada com redução no cTotal (Fig. 1C), iVigor (Fig. 1B), iCresc (Fig. 1A) e volRaiz (Fig. 1E).

Adicionalmente, a exposição ao Al normalmente aumenta a espessura das raízes, sobretudo em cultivares mais sensíveis, como foi observado nesse trabalho para o cultivar NA5909 RG (Fig. 1F). As raízes das plântulas do cultivar tolerante não apresentaram alteração no diâmetro sob Al, confirmando sua capacidade de crescimento nessa condição (Yoshida *et al.*, 2023). Esses resultados apontam para uma menor performance das plântulas do cultivar NA5909 RG (Fig. 1G) sob exposição ao Al. As plântulas de sementes germinadas sob exposição ao Al tendem a apresentar redução dos parâmetros de crescimento como inibição do comprimento de raiz (Steiner *et al.*, 2021), inibição do comprimento de plântulas (Zhang *et al.*, 2010), redução do índice de vigor das plântulas (Delavar *et al.*, 2017) e formação de plântulas anormais (Custódio *et al.*, 2002). Dessa forma, parâmetros biométricos de raízes podem ser empregados como marcadores fenotípicos de tolerância ao Al.

A toxidez do Al no cultivar sensível pode ser atribuída ao acúmulo desse elemento nos ápices radiculares (Fig. 2A), evidenciado também pela intensidade na coloração com hematoxilina (Fig. 2B) e fluorescência com o lumogallion (Fig. 3). A maior sensibilidade das raízes ao Al está associada ao maior acúmulo desse elemento no ápice radicular (Ribeiro *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2020; Yoshida *et al.*, 2023), que é o sítio de percepção e expressão da toxidez por Al (Kopittke *et al.* 2015; Ofoe *et al.*, 2023). O Al pode ser depositado na parede celular e modificar suas propriedades mecânicas, dificultando a expansão radicular (Čiamporová, 2002). Em cultivares tolerantes essa deposição resulta em imobilização do Al, reduzindo seus efeitos tóxicos em regiões do simplasto. Imobilização do Al na parede celular e nos tecidos externos

da soja foi relatado por Silva *et al.* (2020) e Andrade *et al.* (2023). O cultivar tolerante acumulou menos Al em relação ao cultivar sensível (Fig. 2) nos ápices radiculares (Fig. 3), o que explica sua melhor performance sob exposição ao Al. Resultados semelhantes também foram reportados em soja (Silva *et al.*, 2020), arroz (Ribeiro *et al.*, 2022) e milho pipoca (Yoshida *et al.*, 2023).

4.2 Células de Borda da Raiz protegem os ápices radiculares do Al tóxico

Através da microscopia eletrônica de varredura visualizamos um aglomerado de células, principalmente em ápices radiculares do cultivar 50I52RSF IPRO após a exposição ao Al (Fig. 4B). Essas células são classificadas com CBRs e estão aderidas a mucilagem secretadas pelo próprio ápice radicular (Fig. 4B). Nesse mesmo cultivar, pela microscopia confocal, foi detectado uma grande presença de Al em CBRs com tendência de morte celular (Fig. 3C). Estas CBRs atuam na linha de frente, protegendo o centro meristemático dos ápices radiculares do contato direto com o Al. Aquelas células mais externas ao ápice radicular podem acumular o Al e sofrer morte celular programada após um certo tempo de exposição a este metal, enquanto mais CBRs são formadas. Possivelmente o cultivar 50I52RSF IPRO apresenta um grande *turnover* de produção de CBRs. Estes resultados demonstram um potencial mecanismo de resistência do cultivar 50I52RSF IPRO frente a este agente estressor. Alguns relatos na literatura associam a presença de CBRs com a mitigação do estresse por Al, cuja remoção intensifica os efeitos tóxicos desse elemento nas raízes (Cai *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2016). Essas células secretam mucilagem que interagem com Al e reduz sua biodisponibilidade nas raízes (Driouich *et al.*, 2013). Ainda há poucos relatos na literatura sobre o papel desempenhado pelas CBRs na tolerância ao Al em soja (Cai *et al.*, 2013). Apesar do escasso número de trabalhos para a cultura da soja, há outros trabalhos para outras culturas como *Pisum sativum* (Yang *et al.*, 2016) e *Oryza sativa* (Xiao; Liang, 2022). Estudos futuros com o cultivar 50I52RSF IPRO podem ser desenvolvidos para investigar a função das CBRs na tolerância ao Al em plântulas de soja.

4.3 Acúmulo de EROs e atividade de enzimas antioxidantes diferenciam os cultivares de soja quanto a sua sensibilidade ao Al

O acúmulo de Al no cultivar sensível ocasionou estresse oxidativo nos ápices radiculares (Fig. 5), em função do desbalanço entre a formação e a remoção de EROs (Fig. 6), o que culminou no aumento da peroxidação lipídica e morte celular (Fig. 5C e F) e redução do

desempenho das plântulas do cultivar sensível (Fig. 1G). A concentração de H_2O_2 no cultivar NA5909 RG aumentou (Fig. 5B), corroborando com a histolocalização, nos ápices radiculares, dessa ERO através do DAB (Fig. 5E). O mesmo comportamento já foi observado para cultivares sensíveis de *Oryza sativa* (Ma *et al.*, 2007; Qianqian *et al.*, 2023; Xu *et al.*, 2017), *Triticum aestivum* L. (Xu *et al.*, 2011) e *Hordeum vulgare* L. (Tamás *et al.*, 2004). A exposição ao Al também aumentou o teor de MDA no cultivar NA5909 RG (Fig. 5C), um metabólito indicador de peroxidação lipídica cujo acúmulo está vinculado à perda de integridade das membranas celulares (Tistama *et al.*, 2012). Nesse trabalho, apesar de maior taxa de peroxidação lipídica (Fig. 5C) e morte celular (Fig. 5F) no cultivar sensível, não detectamos danos na micromorfologia das raízes (Fig. 4C, D), possivelmente pelo tempo relativamente curto de exposição ao estresse e idade das plântulas. A alteração na micromorfologia de raízes pode ser resultado do estresse oxidativo, que provoca danos na epiderme, ruptura e desorganização celular e até descamação, mesmo em cultivares mais tolerantes, em função do acúmulo mais externo do Al (Brito *et al.*, 2020; Ribeiro *et al.*, 2022; Souza *et al.*, 2016; Yoshida *et al.*, 2023).

No cultivar 50I52RSF IPRO não houve aumento na concentração de H_2O_2 e MDA em raízes expostas ao Al (Fig. 5B, C), pois a atuação robusta do sistema antioxidante evitou danos por estresse oxidativo (Fig. 6) e resultou em melhor performance das plântulas (Fig. 1). Um sistema antioxidante robusto impede que o nível de EROs atinja concentrações prejudiciais, mantendo em equilíbrio a produção e a capacidade de remoção dessas moléculas. Em cultivares em que essa capacidade é comprometida, os níveis de EROs aumentam, resultam em peroxidação lipídica, perda de função das membranas celulares e redução do potencial de crescimento (Mittler, 2002). Dessa forma, estabelecemos aqui uma relação entre acúmulo de EROs e peroxidação lipídica no cultivar NA5909 RG, que apresentou desempenho inferior ao cultivar 50I52RSF IPRO (Fig. 1G). Esse comportamento é o esperado entre cultivares que se diferem quanto a sensibilidade ao estresse por Al, como pôde ser observado em *Oryza sativa* (Ma *et al.*, 2007; Qianqian *et al.*, 2023; Xu *et al.*, 2017) e *Triticum aestivum* L. (Xu *et al.*, 2011).

A atividade de enzimas do sistema antioxidante constitui importante mecanismo de defesa contra o estresse por Al (Ofue *et al.*, 2023). A SOD atua na linha de frente contra o estresse oxidativo, dismutando o $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 (Gill *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2021). Neste estudo não foi detectado aumento na produção de $O_2^{\cdot-}$ para ambos os cultivares (Fig. 5A), nem foi possível observar um padrão de coloração diferencial em resposta ao Al através do corante NBT (Fig. 5D). O H_2O_2 pode ser removido pelas enzimas peroxidases e catalase (Appel; Hirt, 2004). Nos ápices radiculares que cresceram sob exposição ao Al a atividade da CAT (Fig. 6B), POX (Fig. 6C), APX (Fig. 6D) e GPX (Fig. 6E) aumentaram para o cultivar 50I52RSF IPRO.

Como elas atuam na remoção do H_2O_2 , isso justifica menor acúmulo dessa molécula, peroxidação lipídica e morte celular no cultivar 50I52RSF IPRO (Fig. 5B, C, F) (Zhou *et al.*, 2021). Já no cultivar NA5909 RG a exposição ao Al não aumentou a atividade das enzimas removedoras de H_2O_2 , resultando em seu acúmulo (Fig. 5B, E) e conseqüentemente alterações no conteúdo de MDA.

A APX e a DHAR fazem parte do ciclo do ascorbato. A APX catalisa a conversão do H_2O_2 em monodesidroascorbato (MDHA) e água, utilizando o ascorbato como doador de elétrons, que é regenerado pela enzima DHAR (Mittler, 2002). As enzimas GPX e GR estão vinculadas ao ciclo da glutatona. A GPX catalisa a formação de glutatona oxidada (GSSG), através da reação entre glutatona reduzida (GSH) e H_2O_2 . A regeneração de GSH é catalisada pela GR a partir da GSSG (Mittler, 2002). Nesse estudo a atividade de APX (Fig. 6D), GPX (Fig. 6E), GR (Fig. 6F) e DHAR (Fig. 6G) aumentaram no cultivar 50I52RSF IPRO exposto ao Al. Isso sinaliza uma importante atuação de metabólitos antioxidantes no ciclo ascorbato-glutatona na tolerância ao estresse por Al no cultivar 50I52RSF IPRO. Possivelmente a reação catalisada pela GR promove aumentos na concentração de GSH, culminando no aumento da atividade da GPX (Xu *et al.*, 2011). A atuação de ambas as enzimas também é importante para controlar o nível de H_2O_2 , impedindo o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica no cultivar tolerante. Uma atuação significativa do metabolismo antioxidante enzimático em resposta ao estresse por Al também foi reportada em arroz (Ribeiro *et al.*, 2012, 2022), soja (Silva *et al.*, 2023) e milho pipoca (Yoshida *et al.*, 2023).

4.4 A modulação do metabolismo primário reforça respostas de tolerância ao Al em soja

O metabolismo primário nas raízes também contribui para respostas diferenciais ao estresse por Al (Rahman; Upadhyaya, 2021; Silva *et al.*, 2023). Este trabalho mostra uma modulação das repostas do metabolismo primário, como o aumento na síntese de açúcares solúveis (Fig. 8B-D), comportamento observado em plântulas de soja (Andrade *et al.*, 2023; Silva *et al.*, 2023) e *Citrus sinensis* (Yang *et al.*, 2020) sob estresse por Al. As plântulas deste estudo encontram-se em fase pós-germinativa e dependem dos nutrientes armazenados nos cotilédones que são mobilizados para as raízes em crescimento (Zhou *et al.*, 2009). Nesse estágio a glicose é formada via ciclo do glioxilato, cuja atividade aumenta sob estresse por Al, no qual os ácidos graxos passam pela β -oxidação para produzir ácidos graxos livres que são convertidos em glicose (Zhou *et al.*, 2009). Nesse estudo, possivelmente essa rota metabólica foi modulada nas plântulas de soja para aumentar o fornecimento de açúcares solúveis à raiz

em crescimento para combater o estresse, principalmente no cultivar tolerante; atuando na osmoregulação (Giannakoula *et al.* 2008, 2010; Tabuchi *et al.* 2004) e proteção de membranas (Ofoe *et al.*, 2023; Silva *et al.*, 2023). O cultivar sensível exposto ao Al mobilizou menos amido, em relação ao cultivar tolerante (Fig. 8A). O Al pode inativar a α -amilase, enzima hidrolítica necessária para a mobilização de reservas em sementes durante a germinação (Muralikrishna; Nirmala, 2005; Xu *et al.*, 2017). Possivelmente o Al reduziu a atividade das enzimas que hidrolisam o amido em função do estresse por Al, resultando em menor suprimento energético para as plântulas, refletindo na redução do seu crescimento (Fig. 1).

Os ácidos orgânicos atuam na detoxificação do Al, tanto pela sua exclusão, quanto pela sua compartimentalização no simplasto (Kochian *et al.*, 2015; Ofoe *et al.*, 2023). O aumento na concentração de ácidos orgânicos geralmente está associado com a tolerância ao Al tóxico (Andrade *et al.*, 2023; Zhou *et al.*, 2018). Neste trabalho, a concentração de malato reduziu em ambos os cultivares, sobretudo no cultivar NA5909 RG (Fig. 9A), enquanto a concentração de fumarato não alterou (Fig. 9B). Isso sugere uma possível exsudação do malato para quelar o Al externamente. Além disso é possível que o malato seja utilizado no ciclo do ácido tricarboxílico para formar outros ácidos orgânicos, como o citrato, cujo acúmulo é registrado como resposta de tolerância em cultivares de soja expostas ao Al (Nian *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2018) ou 2-oxoglutarato, empregado na biossíntese de prolina, aminoácido cujo aumento foi reportado no cultivar tolerante exposto ao Al (Fig 7B).

Sob estresse a síntese de aminoácidos pode aumentar, pois essas moléculas podem ser intermediárias na formação de outros metabólitos (Hildebrandt *et al.*, 2015). Neste estudo a concentração de aminoácidos totais e proteínas não foi modificada (Fig. 7A, C). Entretanto, no cultivar 50I52RSF IPRO foi registrado um *pool* na concentração de prolina (Fig. 7B). O acúmulo de osmólitos ou solutos compatíveis, como a prolina, está relacionado a respostas de tolerância ao Al, pois ela é utilizada para síntese de proteínas, osmorregulação, manutenção do balanço redox, sinalização do desenvolvimento vegetal modulando funções mitocondriais, remoção de EROs e estabilização de enzimas antioxidantes (Ofoe *et al.*, 2023; Rahman; Upadhyaya, 2021; Szabados; Savouré, 2010). Pirzadah *et al.* (2019) reportaram o acúmulo de prolina em resposta ao Al tanto no cultivar sensível quanto no cultivar tolerante do gênero *Fagopyrum*.

Os compostos fenólicos também estão vinculados a respostas de tolerância ao estresse por Al por meio da complexação e remoção de EROs, reduzindo os danos por estresse oxidativo (Kochian *et al.*, 2015; Maejima *et al.*, 2016; Ofoe *et al.*, 2023; Rahman; Upadhyaya, 2021). Neste estudo a concentração de compostos fenólicos reduziu no cultivar tolerante (Fig. 9C). Em

raízes de plântulas de *Lactuca sativa* o acúmulo de compostos fenólicos foi associado com resposta de tolerância ao estresse por Al (Chen *et al.*, 2020). Possivelmente os compostos fenólicos foram exsudados ou utilizados para combater estresse oxidativo, reduzindo sua concentração celular. Este é um indicativo de que o metabolismo secundário de alguma forma também pode conferir tolerância ao Al tóxico em plântulas de soja. Dessa forma, o conteúdo de prolina e compostos fenólicos totais podem ser biomarcadores de tolerância ao Al no cultivar 50I52RSF IPRO.

5 CONCLUSÃO

A exposição ao Al não alterou a taxa de germinação das sementes, mas plântulas de soja do cultivar 50I52RSF IPRO apresentaram performance superior em relação ao cultivar NA5909 RG. A resposta de tolerância ao Al no cultivar 50I52RSF IPRO pode ser atribuída ao menor acúmulo de Al, remoção de ERO por mecanismos enzimáticos e presença de CBRs. A modulação de compostos do metabolismo do carbono também aponta para respostas de tolerância ao Al no cultivar 50I52RSF IPRO, como o aumento na concentração de açúcares solúveis e prolina e redução de malato e compostos fenólicos.

REFERÊNCIAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21. ed. Washington, DC: American Public Health Association. 2005. 1288 p. ISBN 0875530478, 9780875530475. Disponível em: https://books.google.com.br/books/about/Standard_Methods_for_the_Examination_of.html?id=buTn1rmfSI4C&redir_esc=y. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

ANDRADE, R. *et al.* Malate and cell wall aluminum immobilization act as resistance mechanisms in soybean roots. **Bragantia**, Campinas, SP, v. 82, p. 1-12, Out. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4499.20230120>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/brag/a/TpYNBwXgYPVTgVLyFJ76jWr/?lang=en>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

APPEL, K. HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, CA, v. 55, p. 373–399, Jun. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, Cambridge, England, v.14, n. 2, p. 93–107, Maio. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1079/SSR2004159>. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/seed-science-research/article/abs/active-oxygen-species-and-antioxidants-in-seed-biology/5B6F78DF50B59FAEC17E35D968E546E5>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

BAILLY, C.; EL-MAAROUF-BOUATEAU, H.; CORBINEAU, F. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, France, v. 331, n. 10, p. 806-814, Out. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.crv.2008.07.022>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1631069108002023>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

BOVERIS, A. *et al.* Measurement of superoxide radical and hydrogen peroxide production in isolated cells and subcellular organelles. **Methods in Enzymology**, London, England, v. 349, p. 280-287, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)49342-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)49342-1). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0076687902493421>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, CA, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, Maio. 1976. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0003269776905273>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

BRITO, D. S. *et al.* Effects of aluminum on the external morphology of root tips in rice. **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo, SP, v. 43, p. 413–418, Set. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40415-020-00620-9>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40415-020-00620-9#citeas>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

BURKLEW, C. E. *et al.* Effects of aluminum oxide nanoparticles on the growth, development, and microRNA expression of tobacco (*Nicotiana tabacum*). **PloS one**, San Francisco, CA, v. 7, n. 5, p.1-9, Maio, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034783>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0034783>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

CAI, M. *et al.* Developmental characteristics and aluminum resistance of root border cells in rice seedlings. **Plant Science**, Clare, Ireland, v. 180, n. 5, 702–708, Maio, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.01.017>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168945211000367>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

CAI, M. *et al.* Immobilization of aluminum with mucilage secreted by root cap and root border cells is related to aluminum resistance in *Glycine max* L. **Environmental Science and Pollution Research**, Heidelberg, Germany, v. 20, p. 8924-8933, Jun. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1815-6>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-013-1815-6#citeas>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

CAI, S. *et al.* DA-6 improves sunflower seed vigor under Al³⁺ stress by regulating Al³⁺ balance and ethylene metabolic. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, CA, v. 229, p. 113048, Jan. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.113048>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014765132101160X>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

CARILLO, P.; GIBON, Y. Protocol: extraction and determination of proline. **Prometheus: Protocols in Ecological and Environmental Science**, p. 1-5, 2011. Disponível em: <https://prometheusprotocols.net/function/tissue-chemistry/primary-metabolites/extraction-and-determination-of-proline/>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

CASTAN, D. O. C.; GOMES-JUNIOR, F. G.; MARCOS-FILHO, J. Vigor-S, a new system for evaluating the physiological potential of maize seeds. **Scientia Agricola**, Piracicaba, SP, v. 75, n. 2, p. 167–172, Mar./Abr.2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-992X-2016-0401>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sa/a/knF5sH3qfDm6KZb8R5cTySF/?lang=en>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

CHEN, Y. *et al.* Enhancement of polyphenolic metabolism as an adaptive response of lettuce (*Lactuca sativa*) roots to aluminum stress. **Environmental Pollution**, London, England, v. 261, p.1-8, Jun. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114230>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0269749120302906>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

ČIAMPOROVÁ, M. Morphological and structural responses of plant roots to aluminium at organ, tissue, and cellular levels. **Biologia Plantarum**, Praha, Czech Republic, v. 45, n. 2, p.161-171, Jun. 2002. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1015159601881>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1015159601881>. Acesso em: 15 dez. 2024.

CUSTÓDIO, C. C. *et al.* Estresse por alumínio e por acidez em genótipos de soja. **Scientia Agricola**, Piracicaba, SP, v. 59, n. 1, p. 145-153, Jan./Mar.2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-90162002000100021>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sa/a/6Gmgmg6vWkZ3f44yTPKWvwx/?lang=pt>. Acesso em: 15 dez. 2024.

DELAVAR, K. *et al.* Effects of silicon on the growth of maize seedlings under normal, aluminum, and salinity stress conditions. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, PA, v. 40, n. 10, p. 1475-1484, Jun. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1080/01904167.2016.1269344>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01904167.2016.1269344>. Acesso em: 15 dez. 2024.

DRIOUICH, A. *et al.* Root border cells and secretions as critical elements in plant host defense. **Current Opinion in Plant Biology**, London, England, v. 16, n.4, p. 489-495, Ago. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.06.010>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369526613000939>. Acesso em: 15 dez. 2024.

EL MOUKHTARI, A. *et al.* How silicon alleviates the effect of abiotic stresses during seed germination: a review. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, NY, v. 42, p. 3323-3341, Jun. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00344-022-10794-z>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00344-022-10794-z>. Acesso em: 15 dez. 2024.

FAROOQ, M. A. *et al.* Roles of reactive oxygen species and mitochondria in seed germination. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, Switzerland, v.12, p. 1-11, Dez. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.781734>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2021.781734/full>. Acesso em: 15 dez. 2024.

FERNIE, A.R., *et al.* Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. **Planta**, New York, NY, v. 212, p. 250-263, Jan. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1007/s004250000386>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s004250000386#citeas>. Acesso em: 15 dez. 2024.

GAY, C.; GEBICKI, J. M. A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xyleneol orange hydroperoxide assay. **Analytical Biochemistry**, San Diego, CA, v. 284, n.2, p. 217-220, Set. 2000. DOI: <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4696>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003269700946967>. Acesso em: 15 dez. 2024.

GIANNAKOULA, A. *et al.* 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 of Plant Physiology**, Munich, Germany, v. 165, n. 4, p. 385-396, Mar. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.01.014>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0176161707001137>. Acesso em: 15 dez. 2024.

GIANNAKOULA, A. *et al.* Aluminum stress induces up-regulation of an efficient antioxidant system in the Al-tolerant maize line but not in the Al-sensitive line. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, England, v. 67, n. 3, p. 487-494, Jan. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.07.010>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S009884720900152X>. Acesso em: 15 dez. 2024.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidante machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Issy-Les-Moulineaux, France, v. 48, n. 12, p. 909–930, Dez. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0981942810001798>. Acesso em: 15 dez. 2024.

GILL, S. S. *et al.* Superoxide dismutase—mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. **Environmental Science and Pollution Research**, Heidelberg, Germany, v. 22, p.10375-10394, Abr. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4532-5>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-015-4532-5#citeas>. Acesso em: 15 dez. 2024.

GUPTA, N.; GAURAV, S. S.; KUMAR, A. Molecular basis of aluminium toxicity in plants: a review. **American Journal of Plant Sciences**, [s. l.], v. 4, n. 12C, p. 21-37, Dez. 2013. DOI: 10.4236/ajps.2013.412A3004. Disponível: <https://www.scirp.org/journal/paperinformation?paperid=41018>. Acesso em: 15 dez. 2024.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, NY, v. 125, n.1, p.189-198, Abr. 1968. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0003986168906541>. Acesso em: 15 dez. 2024

HILDEBRANDT, T. M. *et al.* Amino acid catabolism in plants. **Molecular Plant**, Cambridge, MA, v. 8, n. 11, p. 1563–1579, Nov.2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.09.005>. Disponível: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1674205215003664>. Acesso em: 15 dez. 2024.

JONES, K.H.; SENFT, J.A. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, London, England, v. 33, n. 1, p.77–79, Ago. 1985. DOI: <https://doi.org/10.1177/33.1.2578146>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/33.1.2578146>. Acesso em: 15 dez. 2024.

KATO Y. *et al.* White leaf sectors in yellow variegated are formed by viable cells with undifferentiated plastids. **Plant Physiology**, Cary, NC, v. 144, n. 2, p. 952–960, Jun. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.107.099002>. Disponível em: <https://academic.oup.com/plphys/article/144/2/952/6106975>. Acesso em: 15 dez. 2024.

KOCHIAN, L.V. *et al.* Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum resistance. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, CA, v. 66, p. 571-598, Abr. 2015. DOI: [10.1146/annurev-arplant-043014-114822](https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-114822). Disponível em: https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev-arplant-043014-114822#abstract_content. Acesso em: 15 dez. 2024.

KOPITTKE, P. M. *et al.* Identification of the primary lesion of toxic aluminum in plant roots. **Plant Physiology**, Cary, NC, v. 167, n. 4, p. 1402-1411, Abr. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.114.253229>. Disponível em: <https://academic.oup.com/plphys/article/167/4/1402/6113677>. Acesso em: 15 dez. 2024.

KRANNER, I.; COLVILLE, L. Metals and seeds: biochemical and molecular implications and their significance for seed germination. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, England, v. 72, n. 1, p. 93-105, Ago. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.05.005>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0098847210001164>. Acesso em: 15 dez. 2024.

KUO, M. C.; KAO, C. H. Aluminum effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. **Biologia Plantarum**, Praha, Czech Republic, v. 46, p. 149-152, Mar. 2003. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1022356322373>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1022356322373#citeas>. Acesso em: 15 dez. 2024.

LISEC, J. *et al.* Gas chromatography mass spectrometry–based metabolite profiling in plants. **Nature Protocols**, Berlin, Germany, v. 1, p. 387–396, Jun. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.59>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nprot.2006.59#citeas>. Acesso em: 15 dez. 2024.

MA, B.; WAN, J.; SHEN, Z. H₂O₂ production and antioxidant responses in seeds and early seedlings of two different rice varieties exposed to aluminum. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, Netherlands, v. 52, p. 91-100, Abr. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10725-007-9183-1>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10725-007-9183-1#citeas>. Acesso em: 15 dez. 2024.

MAEJIMA, E. *et al.* Contribution of constitutive characteristics of lipids and phenolics in roots of tree species in Myrtales to aluminum tolerance. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, NJ, v. 160, p. 11-20, Nov. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppl.12527>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ppl.12527>. Acesso em: 15 dez. 2024.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The generation of superoxide radical during the autoxidation of ferredoxins. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 246, n.22, p. 6886-6890, Nov.1971. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)45929-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)45929-2). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925819459292>. Acesso em: 15 dez. 2024.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Cambridge, MA, v. 7, n. 9, p. 405-410, Set. 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1360138502023129>. Acesso em: 15 dez. 2024.

MOHAMMADI, M., KARR, A. L. Superoxide anion generation in effective and ineffective soybean root nodules. **Journal of Plant Physiology**, Munich, Germany, v. 158, n. 8, p. 1023-1029, Mar. 2001. DOI: [https://doi.org/10.1078/S0176-1617\(04\)70126-1](https://doi.org/10.1078/S0176-1617(04)70126-1). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0176161704701261>. Acesso em: 15 dez. 2024.

MURALIKRISHNA, G.; NIRMALA, M. Cereal α -amylases—an overview. **Carbohydrate Polymers**, London, England, v. 60, n. 2, p. 163–173, Maio, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.12.002>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S014486170400462X>. Acesso em: 15 dez. 2024.

NIAN, H. *et al.* Citrate secretion induced by aluminum stress may not be a key mechanism responsible for differential aluminum tolerance of some soybean genotypes. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, PA, v. 27, n. 11, p. 2047-2066, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1081/PLN-200030112>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/PLN-200030112>. Acesso em: 15 dez. 2024.

NUNES-NESE, A. *et al.* Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. **The Plant Journal**, Hoboken, NJ, v. 50, n. 6, p.1093–1106, Maio, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03115.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-313X.2007.03115.x>. Acesso em: 15 dez. 2024.

OFOE, R. *et al.* Aluminum in plant: Benefits, toxicity and tolerance mechanisms. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, Switzerland, v. 13, p. 1-24, Jan. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1085998>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2022.1085998/full>. Acesso em: 15 dez. 2024.

PIRES, A. R. P.; SILVA, B. (org.). **Normalização de trabalhos acadêmicos**: atualizada conforme ABNTs NBR 14724/2011, NBR 6023/2018 e NBR 10520/2023. Viçosa, MG: UFV, Biblioteca Central, 2024. 147 p. Disponível em: <https://www.bbt.ufv.br/manual-de-normalizacao-de-trabalhos-academicos/>. Acesso em: 11 de dez. de 2024.

PIRZADAH, T. B. *et al.* Aluminium stress modulates the osmolytes and enzyme defense system in *Fagopyrum* species. **Plant Physiology and Biochemistry**, Issy-Les-Moulineaux, France, v. 144, p. 178-186, Nov. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.09.033>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0981942819303778>. Acesso em: 15 dez. 2024.

POLLE, E.; KONZAK, C. F.; KATTRICK, J. A. Visual detection of aluminum tolerance levels in wheat by hematoxylin staining of seedling roots. **Crop Science**, Hoboken, NJ, v. 18, n. 5, p. 823-827, Set. 1978. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci1978.0011183X001800050035x>. Disponível em: <https://access.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2135/cropsci1978.0011183X001800050035x>. Acesso em: 15 dez. 2024.

QIANQIAN, W. *et al.* Hydrogen sulfide improves rice seed germination by regulating aluminum absorption, internal antioxidant enzyme system and osmotic balance under aluminum toxicity conditions. **Rice Science**, Amsterdam, Netherlands, v. 30, n. 4, p. 271-275, Jul. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2023.05.001>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1672630823000409?via%3Dihub>. Acesso em: 15 dez. 2024.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Versão 4.0.5 (2021-03-31). R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2021. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 22 ago. 2021.

RAHMAN, R.; UPADHYAYA, H. Aluminium toxicity and its tolerance in plant: a review. **Journal of Plant Biology**, Heidelberg, Germany, v. 64, p. 101–121, Abr. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12374-020-09280-4>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12374-020-09280-4#citeas>. Acesso em: 11 de dez. de 2024.

RAO, I. M. *et al.* Root adaptations to soils with low fertility and aluminium toxicity. **Annals of Botany**, Oxford, England, v. 118, n. 4, p. 593-605, Jun. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcw073>. Disponível em: <https://academic.oup.com/aob/article/118/4/593/2196176>. Acesso em: 11 de dez. de 2024.

RASHEED, A. *et al.* Development of aluminium (Al)-tolerant soybean using molecular tools: limitations and future directions. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, NY, v. 42, p. 7403-7417, Jun. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00344-023-11051-7>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00344-023-11051-7#citeas>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

RIAZ, M. *et al.* Mechanisms of organic acids and boron induced tolerance of aluminum toxicity: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, CA, v. 165, p. 25-35, Dez. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.08.087>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0147651318308248>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

RIBEIRO, C. *et al.* Antioxidant system response induced by aluminum in two rice genotypes. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campos dos Goytacazes, RJ, v. 24, n. 2, p. 107-116, Jun. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1677-04202012000200004>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjpp/a/NVQGV5FSgcmkCw7smCbn8Qv/?lang=en>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

RIBEIRO, C. *et al.* Aluminum promotes changes in rice root structure and ascorbate and glutathione metabolism. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, New York, NY, v. 28, p. 2085-2098, Dez. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12298-022-01262-9>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12298-022-01262-9#citeas>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

RODRIGUES, A. A. *et al.* Tolerance of *Eugenia dysenterica* to aluminum: germination and plant growth. **Plants**, Basel, Switzerland, v. 8, n. 9, p. 1-15, Ago. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants8090317>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2223-7747/8/9/317>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

SHARMA, P. *et al.* Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, New York, NY, v. 2012, p.1–26, Abr. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1155/2012/217037>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2012/217037>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

SHI, J. *et al.* Spermine pretreatment confers dehydration tolerance of citrus in vitro plants via modulation of antioxidative capacity and stomatal response. **Tree Physiology**, Oxford, England, v. 30, n. 7, p. 914-922, Jul. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1093/treephys/tpq030>. Disponível em: <https://academic.oup.com/treephys/article-abstract/30/7/914/1701527?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

SILVA, I. R. *et al.* Differential aluminum tolerance in soybean: an evaluation of the role of organic acids. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, NJ, v. 112, n. 2, p. 200-210, Dez. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1120208.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1034/j.1399-3054.2001.1120208.x>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

SILVA, C. O. *et al.* Differential accumulation of aluminum in root tips of soybean seedlings. **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo, SP, v. 43, p. 99-107, Mar. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40415-020-00593-9>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40415-020-00593-9#citeas>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

SILVA, N. D. G. *et al.* Seed coat suberin forms a barrier against chromium (Cr³⁺) during early seed germination in *Arabidopsis thaliana*. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, England, v. 191, p. 1-13, Nov. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104632>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0098847221002628>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

SILVA, C. O. *et al.* Modulation of the antioxidant system and primary metabolism confers aluminum stress tolerance in soybean. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, Germany, v. 45, n.77, p. 1-13, Maio. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11738-023-03559-y>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11738-023-03559-y#citeas>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

SIQUEIRA, J. A. *et al.* Metabolic and physiological adjustments of maize leaves in response to aluminum stress. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, Campinas, SP, v. 32, p.133-145, Maio, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40626-020-00175-w>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40626-020-00175-w#citeas>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

SOUZA, L. T. *et al.* Effects of aluminum on the elongation and external morphology of root tips in two maize genotypes. **Bragantia**, Campinas, SP, v. 75, n. 1, p. 19-25, Jan./Mar. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4499.142>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/brag/a/5wNBHLkJbBgfJjvgyKQLXph/?lang=en>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

STEINER, F. *et al.* Multivariate adaptability and stability of soya bean genotypes for abiotic stresses. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Hoboken, NJ, v. 207, n. 2, p. 354–361. Out. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/jac.12446>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jac.12446>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

SUN, T. *et al.* Antioxidant activities of different colored sweet bell peppers (*Capsicum annuum* L.). **Journal of Food Science**, HOBOKEN, NJ, v. 72, n. 2, p. S98-S102, Mar. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00245.x>. Disponível em: <https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1750-3841.2006.00245.x>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

SZABADOS, L.; SAVOURÉ, A. Proline: a multifunctional amino acid. **Trends in Plant Science**, Cambridge, MA, v. 15, n. 2, p. 89-97, Fev. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.11.009>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1360138509002982>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

TABUCHI, A.; KIKUI, S.; MATSUMOTO, H. Differential effects of aluminium on osmotic potential and sugar accumulation in the root cells of Al-resistant and Al-sensitive wheat. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, NJ, v. 120, n. 1; p. 106-112, Jan. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.0031-9317.2004.0206.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.0031-9317.2004.0206.x>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

TAMÁS, L. *et al.* Aluminium stimulated hydrogen peroxide production of germinating barley seeds. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, England, v. 5, n. 3, p. 281-288, Jun. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2003.11.007>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0098847203001047>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

TISTAMA, R. *et al.* Physiological and biochemical responses to aluminum stress in the root of a biodiesel plant *Jatropha curcas* L. **HAYATI Journal of Biosciences**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 37-43, Mar. 2012. DOI: <https://doi.org/10.4308/hjb.19.1.37>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1978301916301309>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

VOGELS, G. D.; VAN DER DRIFT, C. Differential analyses of glyoxylate derivatives. **Analytical Biochemistry**, San Diego, CA, v. 33, n.1, p. 143–157, Jan. 1970. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(70\)90448-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(70)90448-3). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0003269770904483>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

WANG, H. *et al.* Interactions between hydrogen sulphide and nitric oxide regulate two soybean citrate transporters during the alleviation of aluminium toxicity. **Plant, Cell & Environment**, Hoboken, NJ, v. 42, n. 8, p. 2340-2356, Abr. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/pce.13555>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/pce.13555>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

XIAO, Z.; LIANG, Y. Silicon prevents aluminum from entering root tip by promoting formation of root border cells in rice. **Plant Physiology and Biochemistry**, Issy-Les-Moulineaux, France, v. 175, n. 15, p. 12–22, Mar. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.02.003>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0981942822000614#:~:text=Si%20improved%20the%20viability%20of,Al%20from%20entering%20root%20tip>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

XU, F. J. *et al.* Pretreatment with H₂O₂ alleviates aluminum-induced oxidative stress in wheat seedlings. **Journal of Integrative Plant Biology**, Hoboken, NJ, v. 53, n. 1, p. 44-53, Jan. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.01008.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1744-7909.2010.01008.x>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

XU, D. *et al.* Linking hydrogen-enhanced rice aluminum tolerance with the reestablishment of GA/ABA balance and miRNA-modulated gene expression: A case study on germination. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, CA, v. 145, p. 303-312, Nov. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.07.055>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0147651317304657>. Acesso em: 15 de dez. de 2024

YANG, Z. M. *et al.* Aluminium tolerance is achieved by exudation of citric acid from roots of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, Hoboken, NJ, v. 110, n. 1, p. 72-77, Dez. 2000. DOI: <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2000.110110.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1034/j.1399-3054.2000.110110.x>. Acesso em: 15 de dez. de 2024

YANG, J. *et al.* Alkali-soluble pectin is the primary target of aluminum immobilization in root border cells of pea (*Pisum sativum*). **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, Switzerland, v. 7, p. 1-7, Set. 2016. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01297>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2016.01297/full>. Acesso em: 15 de dez. de 2024

YANG, T. Y. *et al.* Interactive effects of pH and aluminum on the secretion of organic acid anions by roots and related metabolic factors in *Citrus sinensis* roots and leaves. **Environmental Pollution**, London, England, v. 262, p. 1-10, Jul. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114303>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0269749119353023>. Acesso em: 15 de dez. de 2024

YEMM, E. W.; COCKING, E. C.; RICKETTS, R. E. The determination of amino-acids with ninhydrin. **Analyst**, Cambridge, England, v. 80, n. 948, p. 209-214, Mar. 1955. DOI: <https://doi.org/10.1039/AN9558000209>. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/1955/an/an9558000209>. Acesso em: 15 de dez. de 2024

YOSHIDA, C. H. P. *et al.* Tolerance mechanisms to aluminum in popcorn inbred lines involving aluminum compartmentalization and ascorbate–glutathione redox pathway. **Planta**, New York, NY, v. 257, n. 28, p. 1-18, Jan. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00425-022-04062-3>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00425-022-04062-3#citeas>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

ZHANG, H. *et al.* Hydrogen sulfide alleviates aluminum toxicity in germinating wheat seedlings. **Journal of Integrative Plant Biology**, Hoboken, NJ, v. 52, n. 6, p. 556-567, Jun. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00946.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1744-7909.2010.00946.x>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

ZHANG, H. Q. *et al.* Improved root growth by liming aluminum-sensitive rice cultivar or cultivating an aluminum-tolerant one does not enhance fertilizer nitrogen recovery efficiency in an acid paddy soil. **Plants**, Basel, Switzerland, v. 9, n. 6, p. 1-14, Jun. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants9060765>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2223-7747/9/6/765>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

ZHOU, S.; SAUVÉ, R.; THANNHAUSER, T. W. Proteome changes induced by aluminum stress in tomato roots. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, England, v. 60, n. 6, p. 1849–1857, Abr. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/erp065>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jxb/article/60/6/1849/518880?login=false>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

ZHOU, Y. *et al.* Soybean NADP-malic enzyme functions in malate and citrate metabolism and contributes to their efflux under Al stress. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, Switzerland, v. 8, p. 1-11, Jan. 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02246>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2017.02246/full>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

ZHOU, F. *et al.* Genome-wide analysis of MDHAR gene family in four cotton species provides insights into fiber development via regulating AsA redox homeostasis. **Plants**, Basel, Switzerland, v. 10, n. 2, p. 1-20, Jan. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants10020227>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2223-7747/10/2/227>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

CAPÍTULO 3: Silício e células da borda da raiz na mitigação do estresse por alumínio em soja: uma parceria que pode dar certo

Resumo

Altas concentrações de Al são encontradas em solos ácidos, condição desfavorável para que as culturas agrícolas expressem seu máximo potencial produtivo. Algumas estratégias podem ser utilizadas para atenuar a toxidez por Al nessa condição, incluindo o uso de silício (Si). Neste trabalho objetivamos avaliar o papel do Si e células de borda da raiz (CBRs) na mitigação do estresse por Al em plântulas de soja. Os tratamentos consistiram na combinação entre ausência e presença de Si (1 mM) e três concentrações de Al (0, 100, 300 μM). A concentração de 100 μM não afetou significativamente o crescimento das plântulas, porém sob 300 μM este parâmetro reduziu e o crescimento radicular foi inibido devido ao elevado acúmulo de Al nos ápices radiculares que resultou em estresse oxidativo e morte celular. Por outro lado, a adição de Si aumentou a síntese de mucilagem e a presença de CBRs, que reduziu o acúmulo de Al e impediu a ocorrência de estresse oxidativo e danos de membrana nos ápices radiculares, melhorando a performance das plântulas. A síntese de prolina, compostos fenólicos e malato estão vinculadas as respostas de tolerância ao Al (100 μM) e sob estresse mais severo as raízes tendem a acumular amido e glicose. Assim, este trabalho demonstrou que o Si atenua os efeitos tóxicos do Al em plântulas de soja, atuando como elemento benéfico para melhorar o desenvolvimento de plantas cultivadas em solos ácidos.

Palavras-chave: desempenho de plântulas; mucilagem; microscopia; estresse oxidativo; metabolismo primário; elemento benéfico.

Abstract

High concentrations of Al are found in acidic soils, an unfavorable condition for crops to express their maximum productive potential. Some strategies can be used to mitigate Al toxicity in this condition, including the use of silicon (Si). In this study, we aimed to evaluate the role of Si and root border cells (RBCs) in mitigating Al stress in soybean seedlings. The treatments consisted of a combination of absence and presence of Si (1 mM) and three Al concentrations (0, 100, 300 μ M). The 100 μ M concentration had no significant effect on seedling growth; however, at 300 μ M, growth parameters were adversely affected, with root growth being inhibited due to the high accumulation of aluminum in the root tips. This accumulation induced oxidative stress and ultimately led to cell death. On the other hand, Si addition increased mucilage synthesis and the presence of RBCs, which reduced Al accumulation and prevented oxidative stress and membrane damage in root tips, improving seedling performance. The synthesis of proline, phenolic compounds, and malate is associated with aluminum tolerance responses at 100 μ M. Under more severe stress conditions, roots exhibit an increased accumulation of starch and glucose. Thus, this study demonstrated that Si attenuates the toxic effects of Al in soybean seedlings, acting as a beneficial element to enhance plant development in acidic soils.

Keywords: seedling performance; mucilage; microscopy; oxidative stress; primary metabolism; beneficial element.

1 INTRODUÇÃO

A acidez do solo é um grave problema para a produção de alimentos, pois nessa condição o alumínio (Al) do solo se solubiliza liberando íons Al^{3+} , sua forma mais tóxica para as plantas (Kochian *et al.*, 2015). O Al absorvido acumula preferencialmente no ápice radicular, região onde ocorrem os sintomas primários de toxicidade desse metal, como a inibição do crescimento radicular (Ofoe *et al.*, 2023). Isso pode ocorrer em função do acúmulo do Al no apoplasto, alterando as funções da parede celular e reduzindo o alongamento celular (Yoshida *et al.*, 2023). Sítios de acúmulo de Al podem ser investigados utilizando técnicas de microscopia ótica, eletrônica, fluorescência e espectroscopia de raio-X e seu mapeamento pode ajudar na elucidação de respostas de sensibilidade e mecanismos de tolerância a esse tipo de estresse (Andrade *et al.*, 2023; Ribeiro *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2020). Os efeitos tóxicos do Al modificam a arquitetura e a morfologia radicular, reduzindo a eficiência na absorção de água e nutrientes e, conseqüentemente reduzindo o potencial das plantas em atingir sua máxima produtividade (Bojorquez-Quintal *et al.*, 2017). Dessa forma, é imperativo a elucidação de mecanismos de tolerância ao Al para o desenvolvimento de cultivares tolerantes; permitindo assim que as plantas cultivadas aumentem seu potencial produtivo, mesmo em solos ácidos (Rasheed *et al.*, 2023).

O estresse por Al induz a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) que resultam em disfunções metabólicas, sobretudo em genótipos sensíveis. Geralmente os genótipos tolerantes ao Al aumentam a atividade de enzimas antioxidantes para lidar com a formação de EROs (Ribeiro *et al.*, 2022; Yoshida *et al.*, 2023). Além disso, o metabolismo do carbono pode ser modulado, culminando na síntese de ácidos orgânicos como o malato (Andrade *et al.*, 2023; Silva *et al.*, 2023) e outras moléculas que auxiliam na detoxificação como a prolina (Chowra *et al.*, 2017; Pirzadah *et al.*, 2019) e compostos fenólicos (Chen *et al.*, 2020). Outro mecanismo envolvido com a resistência da planta ao Al consiste na detoxificação externa desempenhada pelas células da borda da raiz (CBRs) associadas a mucilagem. As CBRs são um grupo de células viáveis separadas da coifa que envolvem os ápices radiculares, formando uma camada de proteção entre a superfície da raiz e o solo (Hawes *et al.*, 2000) cuja formação requer a participação da enzima poligalacturonase (PG) (Driouich *et al.*, 2007). Essas células secretam mucilagem, um polissacarídeo gelatinoso de elevado peso molecular (Xiao; Liang, 2022), envolvido na complexação do Al tóxico (Cai *et al.*, 2013; Miyasaka; Hawes, 2001). As CBRs são as primeiras células radiculares a entrarem em contato direto com o Al biodisponível, que se acumula em maior proporção nas suas paredes celulares (Tamás *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2016). Isso pode culminar na formação de EROs nas CBRs e induzir a

morte celular programada (Xiao; Liang, 2022). A mucilagem associada às CBRs dificulta a difusão do Al em direção aos ápices radiculares, constituindo assim um mecanismo de proteção à sua toxicidade (Hawes *et al.*, 2016; Ropitiaux *et al.*, 2020; Weiller *et al.*, 2017).

O silício (Si) atua como elemento benéfico para a maioria das plantas contribuindo na defesa contra patógenos e estresses abióticos (Hodson; Evans, 2020), como o estresse por Al (Pontigo *et al.*, 2017; Xiao *et al.*, 2021). A formação do complexo Si-Al reduz a toxidez por Al em plantas, ao diminuir a ligação deste metal com a parede celular, cuja interação resulta na redução do alongamento radicular (Hodson; Evans, 2020; Kopittke *et al.*, 2017). A interação Si-Al gera hidroxialuminossilicatos no apoplasto dos ápices radiculares, forma de Al não tóxica aos ápices radiculares, reduzindo assim a sua mobilidade (Wang *et al.*, 2004). A aplicação exógena de Si pode estar vinculada a formação de CBRs e mucilagem (Xiao; Liang, 2022).

A cultura da soja (*Glycine max* L. Merrill) é de grande importância para a segurança alimentar mundial, cujo cultivo no Brasil é amplamente difundido no bioma Cerrado, caracterizado pela presença de solos ácidos, pouco férteis e com alta saturação por Al (Furley; Ratter, 1988; Oliveira-Filho; Ratter, 2002; Pennington *et al.*, 2006). Alguns trabalhos já evidenciaram a importância das CBRs em ápices radiculares de soja (Cai *et al.*, 2011), contudo há pouca informação sobre o aumento da resistência induzido pelas CBRs sobre o Al, ao evitar sua absorção pelas células radiculares (Cai *et al.*, 2011). Por outro lado, não há nenhum trabalho sobre CBRs e Si na mitigação do estresse por Al para a cultura da soja.

Neste trabalho objetivamos avaliar o papel sinérgico das CBRs e do Si na tolerância ao Al em plântulas de soja e buscamos responder aos questionamentos: I) A presença de CBRs pode atenuar a toxicidade do Al em plântulas de soja? II) A presença de Si no meio de cultivo confere maior tolerância ao estresse por Al em plântulas? III) Si e CBRs podem atuar sinérgicamente conferindo maior tolerância a plântulas de soja ao Al? Nós hipotetizamos que a presença de CBRs e Si atenua os efeitos tóxicos do Al ao evitar sua entrada nas células radiculares, resultando na redução dos danos. Nesse contexto avaliamos o possível efeito mitigador do Si aplicado em solução nutritiva no desempenho de plântulas de soja, acúmulo de Al pela histolocalização e quantificação química desse metal, mapeamento de sítios de acúmulo de ambos elementos (Al e Si) por espectrometria dispersiva de energia (EDS), avaliação da viabilidade de CBRs e histolocalização de celulose e mucilagem, acúmulo de EROs, micromorfologia de ápices radiculares, atividade de enzimas antioxidantes e síntese de substâncias vinculadas ao metabolismo do carbono (aminoácidos, proteínas, açúcares, ácidos orgânicos e compostos fenólicos) em raízes de plântulas de soja cultivadas em solução nutritiva com ausência ou presença de Si e Al.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 *Material vegetal e condições de cultivo*

Sementes de soja, cultivar 50I52RSF IPRO, foram higienizadas com NaOCl 2,5% (v/v) durante dois minutos e lavadas três vezes com água destilada. Em seguida, elas foram semeadas em rolos de papel Germitest[®] umedecidos em solução de CaCl₂ (100 µM, pH 7,0) e incubadas em sala de crescimento a 25 °C (±1) durante três dias no escuro e dois dias sob iluminação com fotoperíodo de 16/8 h luz/escuro (200 µmol de fótons m⁻²s⁻¹), 60% de umidade relativa e aeração constante.

No quinto dia as plântulas foram padronizadas conforme o vigor e homogeneidade, e divididas em dois grupos: ausência (0 mM) e presença (1,0 mM) de Si e aclimatadas em solução de Clark (1975) meia-força (pH 4,5). O Si foi fornecido na forma de ácido monosalicílico (H₄SiO₄) cuja solução foi preparada utilizando o K₂SiO₃ em uma coluna preenchida com resina de troca catiônica (Amberlit IR-120, H⁺ form; Sigma). No sexto dia as plântulas foram submetidas a três concentrações de Al na forma de AlCl₃: 0, 100 e 300 µM, associado com a ausência ou presença de Si (1,0 mM) em solução de Clark (1975) meia força (pH 4,5). As plântulas foram cultivadas nessas soluções por 48 hs e a unidade experimental consistiu em um vaso com seis plântulas. No final do experimento as raízes inteiras foram coletadas para as análises biométricas e quantificação de Al e Si. Ápices radiculares de 0,5 cm foram coletados para as análises histoquímicas e morfológicas, e 5 cm da raiz principal (a partir do ápice) foram congeladas em N₂ líquido e armazenadas a -80 °C para as análises fisiológicas e bioquímicas.

2.2 *Avaliações biométricas*

Com uma régua milimetrada foi mensurado o comprimento final da raiz principal (CFR) de cada plântula nos tempos 0 e 48 horas e por diferença foi obtido o crescimento líquido das raízes (CLR). As raízes foram coletadas, armazenadas em álcool 30% e com o sistema WinRHIZO[®] (Regent Instruments, Québec, Canadá) acoplado a um escâner profissional foram obtidos parâmetros radiculares: comprimento total da raiz (CTR), volume de raiz (VR) e diâmetro médio de raiz (DMR). As raízes foram secas em estufa a 65 °C até atingirem peso constante e o peso seco da raiz (PSR) foi mensurado utilizando balança analítica de precisão.

2.3 *Quantificação e histolocalização de Al*

O Al foi quantificado em raízes inteiras secas em estufa a 65 °C até atingir massa constante. As raízes foram trituradas em moinho de bolas, e 200 mg de pó foi submetido à

digestão em solução nitroperclórica (3:1) em bloco digestor com controle de temperatura. As amostras foram analisadas em espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES, PerkinElmer Optima 3000XL, Maryland, USA) (Silva *et al.*, 2020).

Para a histolocalização do Al, ápices radiculares com 0,5 cm de comprimento foram lavados em água destilada e posteriormente imersos em solução de hematoxilina (0,2% de hematoxilina e 0,02% de KIO₃, p/v) por 1 min. O Al foi detectado conforme método proposto por Polle *et al.* (1978), com modificações. Os ápices radiculares corados foram novamente lavados e fotografados em microscópio trinocular (Olympus, SZX7, Tokyo).

2.4 Localização do alumínio por microscopia confocal

Ápices radiculares foram lavados com tampão acetato e imersos em solução de lumogallion (10 µM em tampão acetato 0,1 M pH 5,2) por 1 h a 50° C. As amostras foram lavadas três vezes em tampão e a fluorescência observada em microscópio confocal de varredura a laser (LSM510 META, Carl Zeiss MicroImaging, Thornwood, NY, USA). Para excitação e emissão, comprimentos de onda de 488 nm e 520 nm foram utilizados em dois conjuntos de filtro ELFP, respectivamente (Ribeiro *et al.*, 2022). As imagens foram obtidas em sequência por Z-stacks em intervalos de 11 µm.

2.5 Microanálise de ápices radiculares por espectrômetro de energia dispersiva de raio-X (EDS) acoplado com microscópio eletrônico de varredura (MEV)

Ápices radiculares (0,5 cm) foram coletados e fixados em 2,5% (v/v) de glutaraldeído preparado em 0,05 M de tampão cacodilato (pH 7,2). As amostras foram desidratadas em série etílica (30-100%) permanecendo por 10 min em cada série; secas com CO₂ em secador de ponto crítico (CPD 030, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein) montadas em superfície metálica. As amostras foram revestidas com ouro no metalizador (FDU 010, Balzers, Liechtenstein) para avaliação no MEV (LEO 1430 VP, Zeiss, Cambridge, UK), ao passo que para o EDS as amostras foram revestidas com carbono (Quorum Q150 T, East Grinstead, West Sussex, UK) analisadas com o uso de uma sonda de raio-X (X-EDS, IXRF systems, Houston, TX, USA) sob tensão de aceleração de 20 kV. Microanálise de Al e Si foi realizada em MEV-EDS utilizando um mapa de distribuição e intensidade desses elementos nos ápices radiculares (Ribeiro *et al.*, 2022).

2.6 Avaliação da viabilidade de CBRs

Ápices radiculares (0,5 cm) foram inicialmente lavados em água destilada e posteriormente imersos em solução de azul de tripan (0,5%) durante 10 minutos (Xiao; Liang, 2022; com modificações). Os ápices radiculares corados foram novamente lavados e fotografados em microscópio trinocular (Olympus, SZX7, Tokyo).

2.7 Visualização da camada de mucilagem de CBRs

Ápices radiculares (0,5 cm) foram inicialmente lavados em água destilada, e posteriormente imersos em solução de vermelho neutro (0,01%) durante 30 segundos e observados em microscópio de luz (Cai *et al.*, 2013; com modificações). Para visualizar a presença de celulose, ápices radiculares foram lavados e incubados em solução de vermelho direto 23 (0,1 mg mL⁻¹) durante 10 min no escuro e observados em microscópio de luz (Ropitiaux *et al.*, 2020; com modificações). Os ápices radiculares corados foram novamente lavados e fotografados em microscópio trinocular (Olympus, SZX7, Tokyo).

2.8 Atividade da enzima galacturonase (EC 3.2.1.15)

Ápices radiculares (100 mg) foram macerados em N₂ líquido, lavados durante 10 minutos em etanol 95% e 80% com cada lavagem sucedida por centrifugação a 10,000 xg durante 20 minutos a 4 °C. O pelet foi solubilizado em 500 µL de solução de 1,8 M de NaCl em tampão ácido acético-acetato de sódio (50 mM, pH 5,5). As amostras foram incubadas a 4 °C durante 20 minutos e centrifugadas a 10,000 xg a 4 °C durante 20 minutos. Uma alíquota de 50 µL de extrato enzimático bruto foi adicionada ao meio de reação composto por 50 µL de ácido poligalacturônico (5 mg/mL) e 100 µL de tampão ácido acético. O meio de reação foi incubado a 37 °C durante 1 h em banho maria. O ácido galacturônico, produto da reação foi quantificado pelo ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959), cuja absorbância foi lida a 540 nm em leitor de microplacas (Infinite M200 PRO, RChisto, Grödig, Áustria), utilizando como padrão o reagente ácido D-galacturônico (Xiao; Liang, 2022).

2.9 Quantificação de espécies reativas de oxigênio

O radical ânion superóxido (O₂^{•-}) foi quantificado em 80 mg de ápices radiculares macerados em N₂ líquido e incubados em meio de reação composto por 100 µM de sal dissódico e ácido etilenodiamino tetra-acético (Na₂EDTA) 100 µM, 20 µM de NADH e tampão fosfato de sódio a 20 mM, pH 7,8 (Mohammadi; Karr, 2001). A reação se iniciou pela adição de 100

μL de epinefrina 1,2 mM dissolvida em HCl 0,1 N. As amostras foram incubadas a 28 °C, sob agitação por cinco minutos e a absorbância lida a 480 nm (Boveris *et al.*, 2002; Misra; Fridovich, 1971). A produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$ foi avaliada através do adenocromo acumulado, utilizando o coeficiente de absorvidade molar de $4,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (Boveris *et al.*, 2002).

O H_2O_2 foi quantificado em 150 mg de ápices radiculares macerados em N_2 líquido e 1 mL do meio de extração composto por 50 mM de tampão fosfato de potássio, pH 6,5, contendo 1 mM de hidroxilamina. O extrato bruto foi centrifugado a 10.000 x g, durante 15 min, 4 °C (Kuo; Kao, 2003). Ao meio de reação, composto por 250 μM de $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)$ dissolvido em 25 mM de H_2SO_4 ; 250 μM de laranja de xilenol e 100 mM de sorbitol (Gay; Gebicki, 2000), foi aliquotado 20 μL do sobrenadante. Durante 30 min as amostras foram incubadas no escuro e a leitura da absorbância realizada a 560 nm. A concentração de H_2O_2 foi expressa em $\mu\text{mol g}^{-1}$ de massa fresca a partir de uma curva padrão pré-definida.

2.10 Quantificação de malondialdeído (MDA) e determinação da viabilidade celular pelo corante Evans blue

O MDA foi quantificado em 150 mg de ápices radiculares macerados em N_2 líquido e homogeneizados em 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 1% (p/v), seguido de centrifugação a 12.000 x g durante 15 min a 4 °C. Aliquotas de 500 μL dos sobrenadantes foram pipetadas em 1,5 mL de solução de tiobarbitúrico (TBA) 0,5 % (p/v) em TCA 20% (p/v), e posteriormente incubados a 95 °C sob agitação durante 30 minutos. A reação foi interrompida em banho de gelo durante 40 minutos e as amostras centrifugadas a 10.000 x g por 10 min, 4 °C. A absorbância do sobrenadante foi lida em dois comprimentos de onda: 532 e 600 nm, respectivamente, sendo que esta última corresponde à absorbância inespecífica, cujos valores foram subtraídos àqueles das amostras. Através do coeficiente de absorvidade molar de $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ foi calculado a concentração do complexo aldeído malônico-TBA (Heath; Packer, 1968).

Para a detecção da viabilidade celular, raízes intactas foram mergulhadas em 0,1% de azul de Evans (p/v) por 10 min (Kato *et al.*, 2007). Posteriormente, as amostras foram lavadas em água deionizada por 10 min para remover o excesso de corante. Os ápices radiculares foram cortados e novamente lavados e fotografados em microscópio trinocular (Olympus, SZX7, Tokyo).

2.11 Quantificação da atividade das enzimas do sistema antioxidante

O extrato enzimático bruto foi obtido a partir da maceração de 150 mg de ápices radiculares em N₂ líquido, para quantificar atividade das enzimas SOD (EC 1.15.1.1), CAT (EC 1.11.1.6), POX (EC 1.11.1.7) e APX (EC 1.11.1.11). As avaliações enzimáticas foram realizadas conforme previamente descrito por Ribeiro *et al.* (2022).

A concentração de proteínas nas amostras foi quantificada seguindo protocolo proposto por Bradford (1976), utilizando BSA como padrão e absorvância de 595 nm. Todas as leituras de absorvância foram realizadas em leitor de placas de microplacas (Infinite M200 PRO, RChisto, Grödig, Áustria).

2.12 Análises bioquímicas

Ápices radiculares foram coletados e armazenados a -80 °C e liofilizados a -51 °C. Amostras de 10 mg do material liofilizado foram submetidas a extração metanólica (Lisec *et al.*, 2006 com modificações). Com o extrato bruto foram quantificados os teores de glicose, frutose, sacarose, fumarato, malato, prolina e compostos fenólicos totais a partir da fração solúvel, enquanto os teores de amido e proteínas solúveis totais foram quantificados a partir da fração insolúvel. As proteínas solúveis totais foram quantificadas pelo método de Bradford (1976) e os aminoácidos totais foram quantificados pelo método colorimétrico (Yemm *et al.*, 1955). A concentração de amido, glicose, frutose e sacarose foi quantificada conforme protocolo proposto por Fernie *et al.* (2001). O teor de prolina foi quantificado seguindo recomendações de Carillo e Gibon (2011). Os ácidos orgânicos malato e fumarato foram quantificados seguindo metodologia de Nunes-Nesi *et al.* (2007) e compostos fenólicos totais conforme (Sun *et al.*, 2007).

2.13 Delineamento experimental e análise estatística

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado e os tratamentos foram arrançados em esquema fatorial 2 x 3 compreendendo o suprimento de Si: ausência ou presença, submetidos a três concentrações de Al: 0, 100 e 300 µM de Al. Nos experimentos foram empregadas cinco repetições com seis plântulas por vaso.

Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de homogeneidade de variâncias (Bartlett, $p \leq 0,05$) e normalidade dos resíduos (Shapiro-Wilk, $p \leq 0,05$) e à análise de variância (ANOVA) e os valores médios dos tratamentos, quando significativos, comparados pelo Teste Duncan ($p \leq 0,05$) usando o software R x 64 4.0.5 (R Core Team, 2019).

3 RESULTADOS

A concentração de 300 μM de Al na ausência de Si resultou em efeitos negativos nos parâmetros fenotípicos das raízes (Fig. 1). Nessa concentração, o CLR, CFR, CTR, VR e PSR (Fig. 1A-D, F) reduziram em 72%, 21%, 65%, 42% e 16%, respectivamente, em relação ao controle. Já sob 100 μM de Al o CTR (Fig. 1C) e VR (Fig. 1D) reduziram 27% e 21%, respectivamente, em relação ao controle. A adição de Si na ausência de Al aumentou apenas o parâmetro de biomassa das raízes (Fig. 1F). Após o fornecimento de Si no tratamento com Al (100 μM) houve aumento no CTR (49%) (Fig. 1C) e no VR (29%) (Fig. 1D) em comparação ao tratamento 100 μM de Al sem Si. O mesmo ocorreu na presença de Si com 300 μM de Al, o qual aumentou todos os parâmetros biométricos avaliados em relação a mesma concentração de Al sem Si: CLR (275%), CFR (25%), CTR (183%), VR (54%) e PSR (19%) (Fig. 1A-D, F). O diâmetro das raízes foi o único parâmetro que reduziu com a adição de Si na concentração de 100 μM (8%) e de 300 μM (35%) de Al (Fig. 1E). A exposição a 300 μM de Al reduziu a performance das plântulas de soja cujo sistema radicular apresentou menor densidade de raízes laterais e efeitos negativos na parte aérea, contudo a adição de Si atenuou esses efeitos (Fig. 1G).

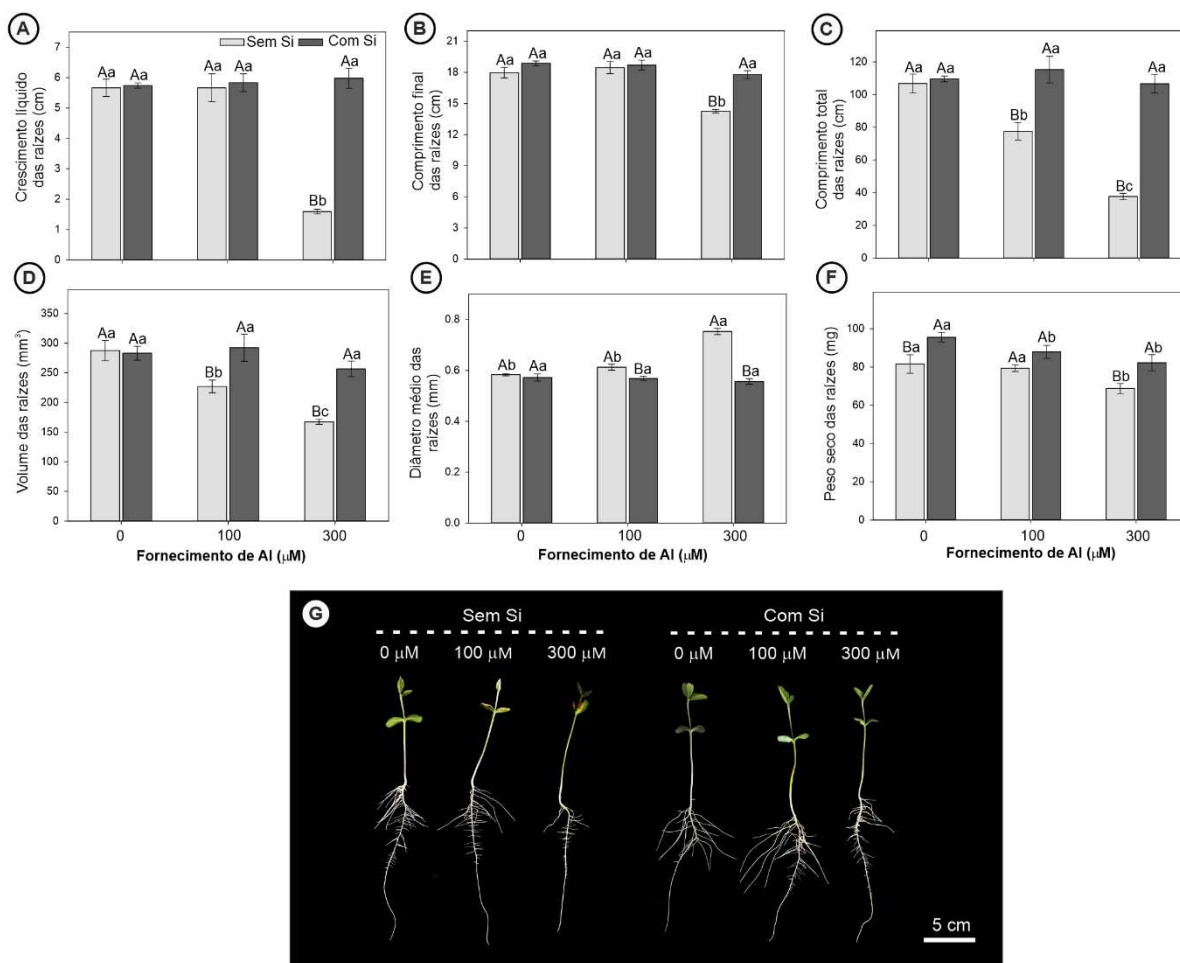


Figura 1. Comprimento líquido de raízes (CRL) (A), comprimento final das raízes (CFR) (B), comprimento total das raízes (CTR) (C), volume das raízes (VR) (D), diâmetro médio das raízes (DMR) (E), peso seco das raízes (PSR) (F) e performance (G) de plântulas de soja cultivar 50I52RSF IPRO após 48 horas de exposição a solução nutritiva na ausência (0 mM) e presença de silício (1mM), associado com a ausência (0 μM) e presença de Al (100 ou 300 μM) durante 72 horas. Valores médios seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ($p \leq 0.05$). Letras maiúsculas comparam o efeito da aplicação do Si na mesma concentração de Al, enquanto letras minúsculas comparam o efeito de diferentes concentrações de Al na mesma concentração de Si. As barras representam os valores médios ($n = 5$ plantas) \pm erro padrão.

Na ausência de Si, a concentração de Al nos ápices radiculares aumentou com as doses crescentes de Al: 145 vezes a 100 μM e 224 vezes a 300 μM , em relação ao controle, e 54% na concentração de 300 μM em relação a 100 μM (Fig. 2A). Entretanto, a adição de Si reduziu o acúmulo de Al nos ápices radiculares em 65% e 40% sob 100 e 300 μM de Al, respectivamente.

As raízes expostas ao Al exibiram reação positiva (coloração púrpura) ao corante hematoxilina, sendo a coloração mais intensa observada na concentração de 300 μM de Al na ausência de Si. Com a adição de Si, a marcação do Al como corante foi reduzida em ambas as concentrações desse metal (Fig. 2B).

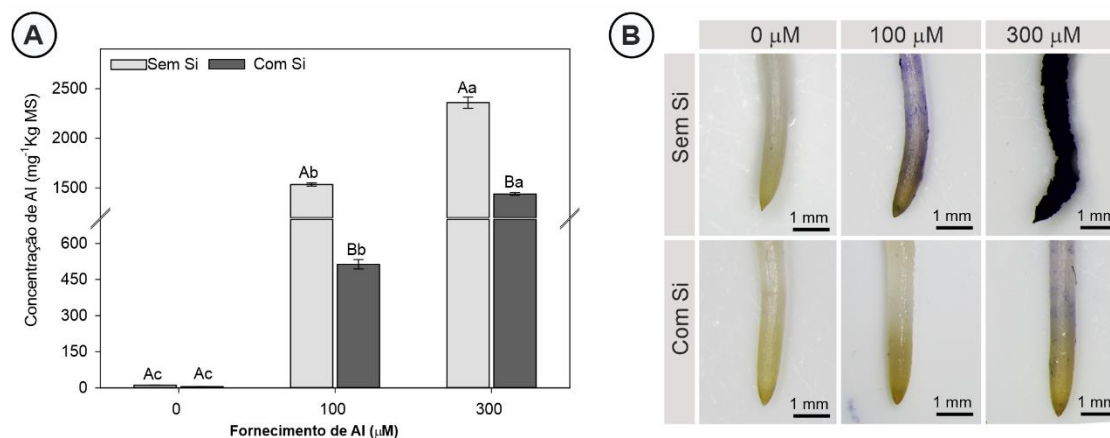


Fig. 2 Concentração do Al (A) e histolocalização de Al pelo corante hematoxilina (B) em ápices radiculares de plântulas de soja cultivar 50I52RSF IPRO após 48 horas de exposição a solução nutritiva na ausência (0 mM) e presença de silício (1mM), associado com a ausência (0 μM) e presença de Al (100 ou 300 μM) durante 72 horas. Valores médios seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Duncan ($p \leq 0,05$). Letras maiúsculas comparam o efeito da aplicação do Si na mesma concentração de Al, enquanto letras minúsculas comparam o efeito de diferentes concentrações de Al na mesma concentração de Si. As barras representam os valores médios ($n = 5$ plantas) \pm erro padrão.

As raízes expostas à concentração de 300 μM de Al (-Si) apresentaram maior intensidade de fluorescência na coifa e na região da epiderme (Fig. 3C), mas que reduziu com a presença de Si (Fig. 3F). A adição de Si resultou na formação de CBRs envolvidas por uma densa camada de mucilagem nas raízes expostas ao Al (Fig. 3E e F e Fig. S2A e E). Essas células apresentam formato alongado e com alta intensidade de fluorescência, principalmente na região da parede celular e do núcleo celular (Fig. S2F), revelando acúmulo de Al nessas estruturas. As CBRs do tratamento 300 μM na presença de Si também foram marcadas com o fluoróforo iodeto de propídeo. As CBRs mais externas ao ápice radicular emitiram fluorescência vermelha (Fig. S2G e H), que indica a ocorrência de morte celular (Jones e Senft, 1985). Sob 300 μM de Al a distribuição da fluorescência do complexo Al – lumogallion foi forte e difusa acima da camada de 44 μm, abrangendo a região externa dos ápices radiculares, principalmente as células da epiderme e da coifa (Fig. S1A-H). Na camada de 66-77 μm a fluorescência ficou mais restrita à coifa (Fig. S1G-H). Nesse mesmo tratamento (300 μM de Al) na presença de Si, a intensidade do complexo Al – lumogallion foi menor em relação a ausência desse elemento e reduziu à medida que se aumentou a profundidade (Fig. 3F, S1I-N).

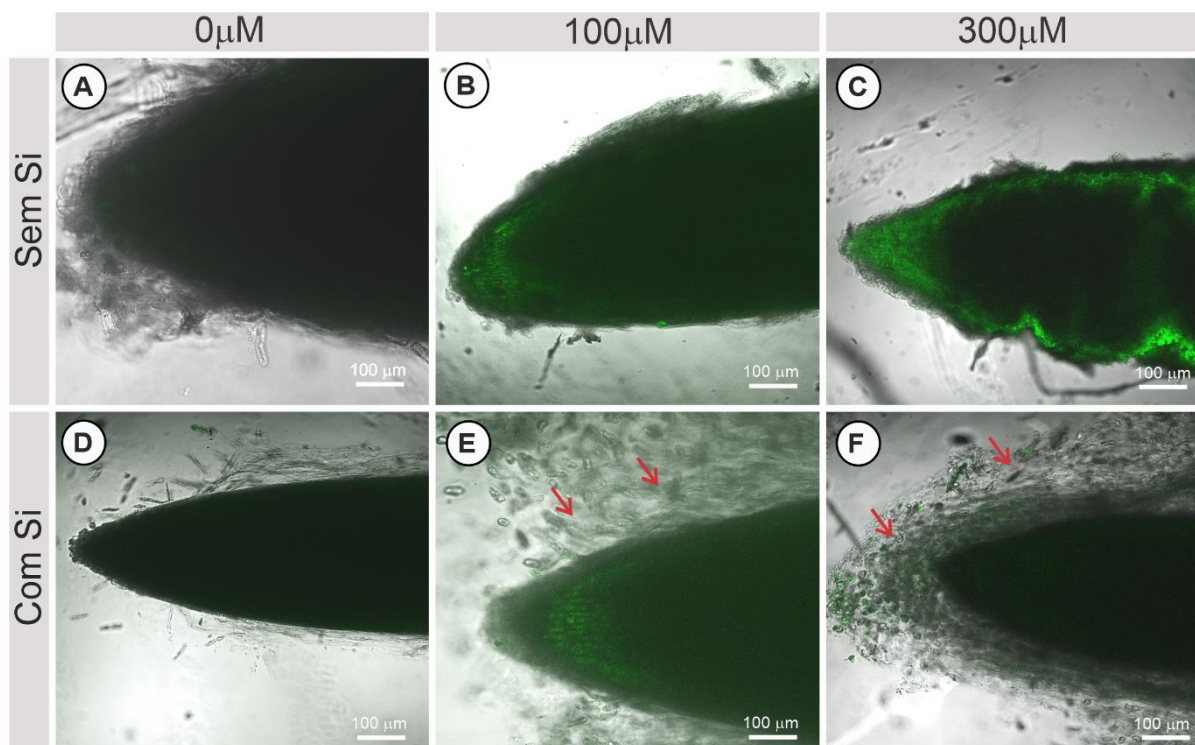


Fig. 3 Localização do Al por microscopia confocal utilizando o fluoróforo lumogallion na superfície de ápices radiculares de soja cultivar 50I52RSF IPRO após 48 horas de exposição à solução nutritiva na ausência (0 mM) (A-C) ou presença de silício (1mM) (D-F) associado com a ausência (0 μ M) (A, D) ou presença de Al na concentração de 100 μ M (B, E) ou 300 μ M (C, F) durante 72 horas. A cor verde mostra emissão de fluorescência do Al ao reagir com o fluoróforo lumogallion. Setas vermelhas: presença de CBRs imersas em densa camada de mucilagem.

Após exposição as concentrações de 0 e 100 μ M de Al foi possível observar pelas micrografias de MEV que não houveram danos estruturais nos ápices radiculares, os quais estavam íntegros e com a presença de mucilagem (Fig. 4A e B). Por outro lado, sob 300 μ M de Al a superfície da raiz apresentou formação de fissuras transversas, descamação e ausência de mucilagem (Fig. 4C). Com a adição de Si, a presença de mucilagem foi intensificada, principalmente na presença de Al (Fig. 4E e F), e os danos na micromorfologia das raízes foi revertido na concentração de 300 μ M (Fig. 4F). A combinação de 100 μ M de Al e Si resultou em uma camada de mucilagem mais espessa, em comparação aos demais tratamentos (Fig. 4E).

Nos tratamentos expostos ao Al a distribuição desse elemento foi difusa, principalmente na dose de 300 μ M, tanto na ausência (Fig. 4I) quanto na presença de Si (Fig. 4L). A exposição a 300 μ M de Al resultou em maior intensidade de acúmulo desse elemento em relação aos demais tratamentos, que foi menor com a adição de Si (Fig. 4S). O MEV-EDS também revelou uma distribuição difusa (Fig. 4P e R) e alta intensidade de Si (Fig. 4T) naqueles tratamentos em que esse elemento foi adicionado. A aplicação de Al combinado ao fornecimento de Si resultou na forte marcação do Si na mucilagem, principalmente na concentração de 300 μ M (Fig. 4R).

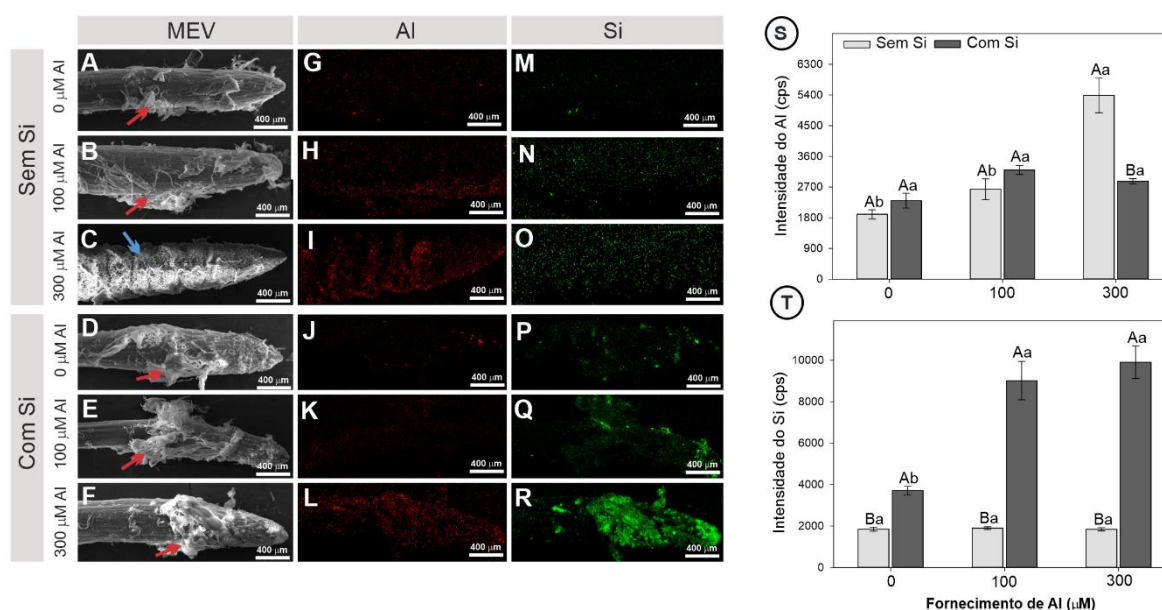


Fig. 4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV, A-F) e microscopia eletrônica de varredura acoplada a uma sonda de raio-X (G-R) em mapas com sítios de acúmulo de Al na cor vermelha (G-L) e Si na cor verde (M-R) na superfície de ápices radiculares de soja cultivar 50I52RSF IPRO após 48 horas de exposição a solução nutritiva na ausência (0 mM) e presença de silício (1mM), associado com a ausência (0 µM) e presença de Al (100 ou 300 µM) durante 72 horas. O brilho de cada pixel é uma indicação direta da abundância relativa dos elementos representados pela intensidade (contagens por segundo – CPS) de Al (S) e Si (T). Setas vermelhas: camada de mucilagem. Seta azul: danos na micromorfologia das raízes (fissuras transversais). Valores médios seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Duncan ($p \leq 0,05$). Letras maiúsculas comparam o efeito da aplicação do Si na mesma concentração de Al, enquanto letras minúsculas comparam o efeito de diferentes concentrações de Al na mesma concentração de Si. As barras representam os valores médios ($n = 5$ plantas) \pm erro padrão.

A viabilidade das CBRs foi avaliada pela reação do corante azul de tripan, cuja coloração azulada detecta células inviáveis. Raízes expostas ao Al na ausência de Si apresentaram maior incidência de CBRs inviáveis, detectadas pela maior intensidade da coloração azulada (Fig. 5A). Nos tratamentos 0 e 100 µM de Al, apenas as CBRs foram marcadas por esse corante, enquanto que sob 300 µM esse dano se estendeu também às células do ápice radicular. Entretanto, a adição de Si aumentou a viabilidade das CBRs e dos ápices radiculares, tanto na ausência quanto na presença de Al. A presença de Al com a ausência de Si aumentou o teor de celulose nas CBRs, enquanto que a presença de Si reduziu o teor desse polissacarídeo (Fig. 5B). Na ausência de Si, a intensificação do estresse (300 µM de Al) reduziu a síntese de mucilagem nos ápices radiculares (Fig. 5C). Entretanto, com a adição de Si os ápices radiculares apresentaram uma camada mais espessa de mucilagem, em relação a ausência desse elemento, inclusive a 300 µM de Al. Na ausência de Si, a atividade da PG teve aumentos de 116% e 83%, respectivamente, nas concentrações de 100 e 300 µM de Al. Já com a adição de Si, houve aumento na atividade da enzima no controle (83%) mantendo igual ao tratamento 300 µM, mas reduziu 46% na concentração de 100 µM de Al (Fig. 5D).

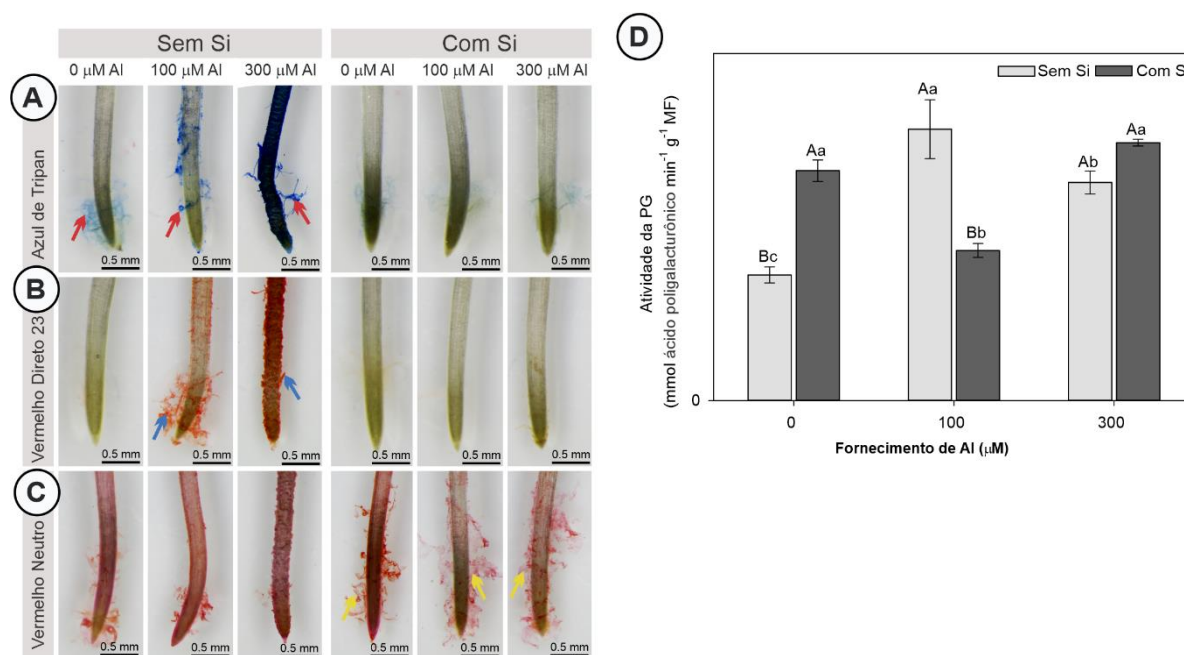


Fig. 5 Histocalização de CBRs inviáveis com Azul de Tripian (A), presença de celulose com a sonda Direct Red 23 (B), presença de mucilagem com o corante Vermelho Neutro (C) e atividade da enzima poligalacturonase (D) em ápices radiculares de soja cultivar 50I52RSF IPRO após 48 horas de exposição a solução nutritiva na ausência (0 mM) e presença de silício (1mM), associado com a ausência (0 μM) e presença de Al (100 ou 300 μM) durante 72 horas. Seta vermelha: células de borda da raiz inviáveis. Setas azuis: presença de celulose em células de borda da raiz. Setas amarelas: presença de camada de mucilagem. Valores médios seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Duncan ($p \leq 0.05$). Letras maiúsculas comparam o efeito da aplicação do Si na mesma concentração de Al, enquanto letras minúsculas comparam o efeito de diferentes concentrações de Al na mesma concentração de Si. As barras representam os valores médios ($n = 5$ plantas) \pm erro padrão.

A concentração de $\text{O}_2^{\cdot-}$ aumentou no tratamento 300 μM de Al, tanto na ausência (82%), quanto na presença de Si (78%) (Fig. 6A). A adição de Si reduziu a concentração dessa EROs sob 0 μM (29%), 100 μM (25%) e 300 μM (24%). A concentração de H_2O_2 aumentou com a exposição ao Al nas concentrações de 100 μM (36%) e 300 μM (104%) (Fig. 6B). Mesmo com a adição de Si a síntese dessa EROs foi superior na concentração de 300 μM (70%) em relação ao controle. Mas a presença do Si reduziu a concentração de H_2O_2 nas raízes expostas ao Al nas concentrações de 100 μM (36%) e 300 μM (17%). O teor de MDA aumentou com o incremento da concentração de Al, sendo mais acentuada nas raízes expostas a 300 μM de Al (47%) (Fig. 6C). Nas raízes expostas ao Al e na presença de Si a taxa de peroxidação lipídica foi 27 e 29% menor nas concentrações de 100 e 300 μM de Al, respectivamente. A reação com o corante Azul de Evans revelou morte celular nos ápices radiculares expostos nas duas concentrações de Al, com maior intensidade a 300 μM , cujos ápices radiculares apresentaram danos perceptíveis na integridade das raízes (Fig. 6D). Por outro lado, o efeito de morte celular foi revertido com a adição de Si em todos os tratamentos.

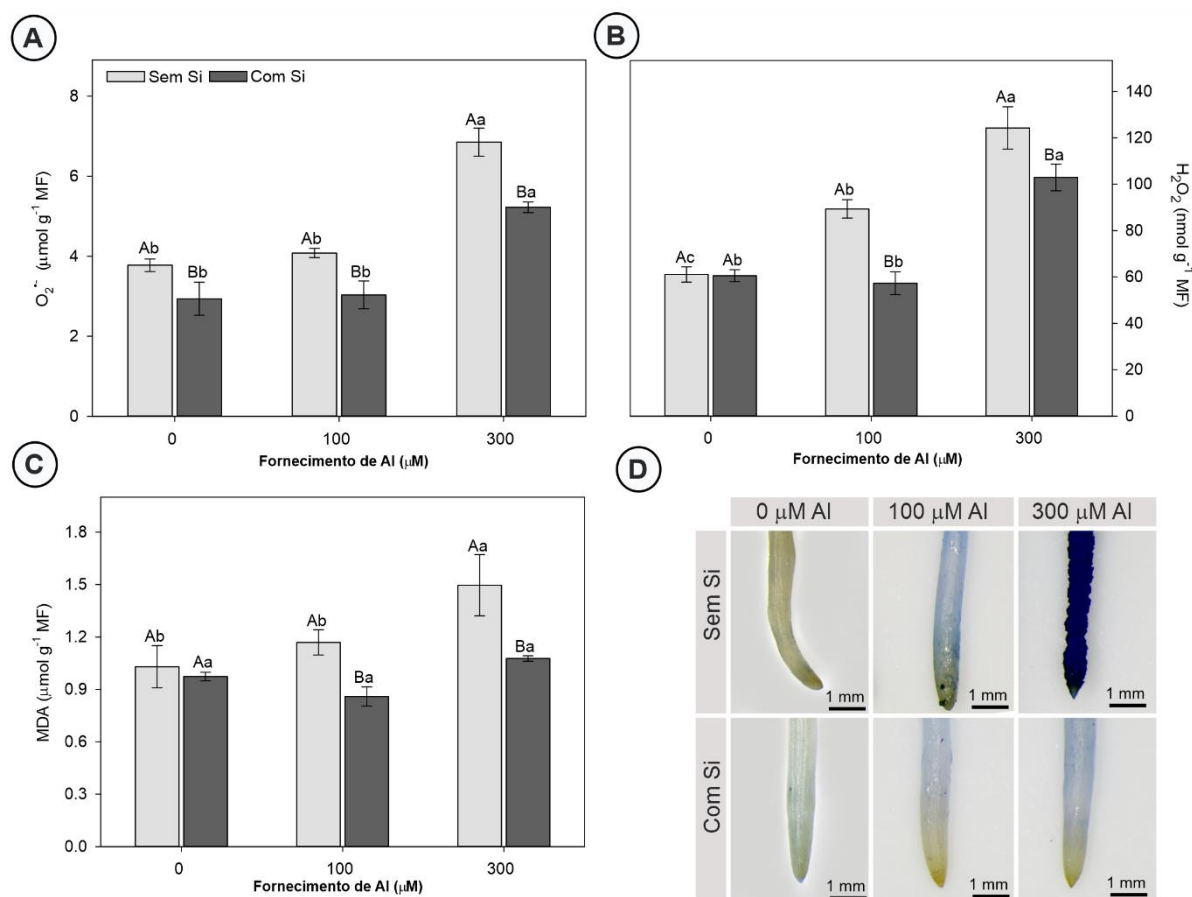


Fig. 6 Concentração do radical ânion superóxido - $O_2^{\cdot-}$ (A), peróxido de hidrogênio - H_2O_2 (B) e malondialdeído - MDA (C) e avaliação da viabilidade de células radiculares pelo corante Azul de Evans (D) em ápices radiculares de soja cultivar 50I52RSF IPRO após 48 horas de exposição a solução nutritiva na ausência (0 mM) e presença de silício (1mM), associado com a ausência (0 μM) e presença de Al (100 ou 300 μM) durante 72 horas. Valores médios seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Duncan ($p \leq 0.05$). Letras maiúsculas comparam o efeito da aplicação do Si na mesma concentração de Al, enquanto letras minúsculas comparam o efeito de diferentes concentrações de Al na mesma concentração de Si. As barras representam os valores médios ($n = 5$ plantas) \pm erro padrão.

A atividade da SOD e CAT reduziu 32% sob 100 μM de Al, mas não alterou sob 300 μM de Al, em relação ao controle (Fig. 7A-B). Com a aplicação de Si a atividade dessas enzimas foi maior no controle, reduzindo com a exposição ao Al. Nas concentrações 0 e 100 μM de Al com a adição de Si, a atividade da SOD e CAT foi maior que na ausência desse elemento. A atividade de POX duplicou nas raízes expostas a 300 μM de Al na ausência de Si (Fig. 7C). Entretanto, a adição de Si, reduziu em 26% a atividade dessa enzima sob 300 μM de Al. A aplicação de Al não alterou a atividade da APX, mas a combinação desse elemento com Si reduziu a atividade dessa enzima sob 100 (31%) e 300 μM de Al (10%) em relação ao controle com Si (Fig. 7D). Mesmo assim, a atividade da APX foi maior nas raízes expostas ao Si nos tratamentos 0 e 300 μM de Al.

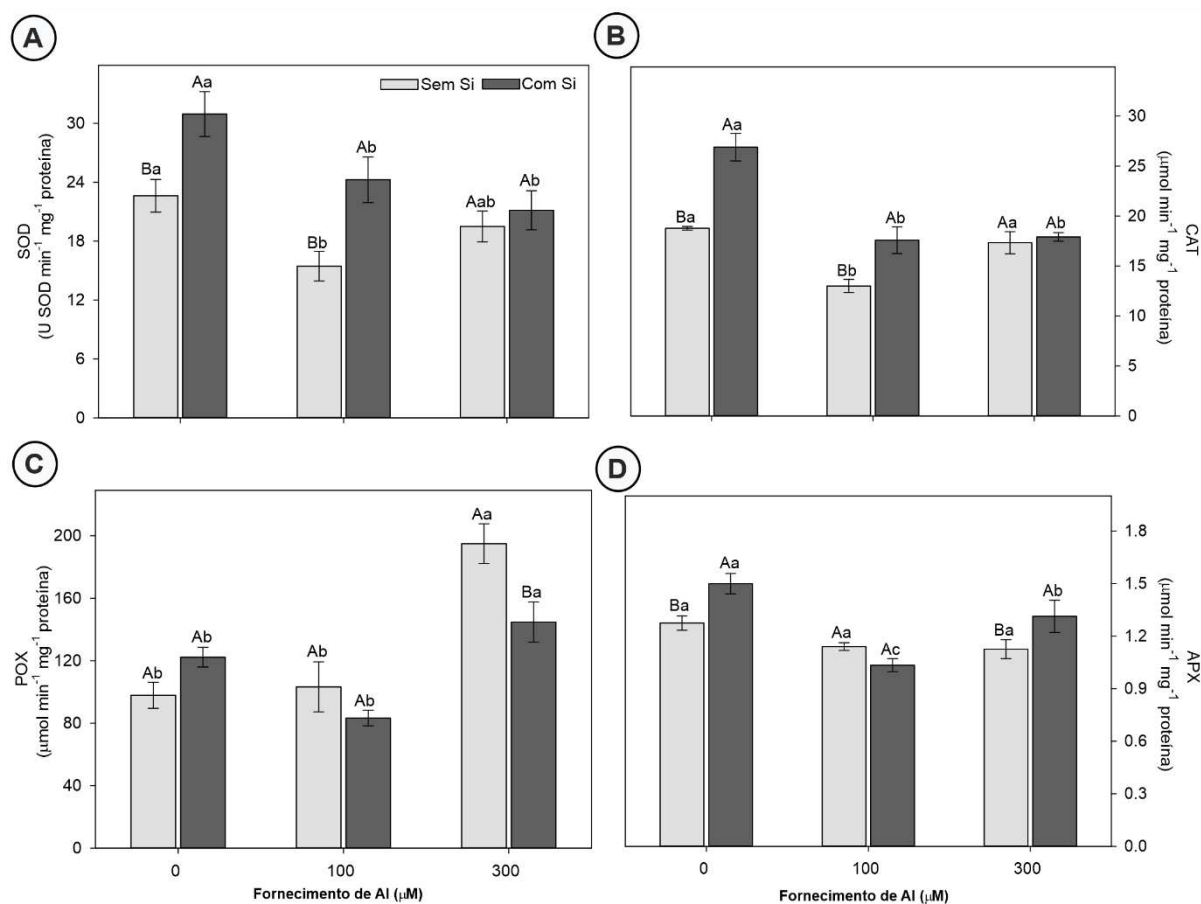


Fig. 7 Atividade das enzimas superóxido dismutase - SOD (A), catalase - CAT (B), peroxidase total - POX (C) e peroxidase do ascorbato - APX (D) em ápices radiculares de soja cultivar 50I52RSF IPRO após 48 horas de exposição a solução nutritiva na ausência (0 mM) e presença de silício (1mM), associado com a ausência (0 μM) e presença de Al (100 ou 300 μM) durante 72 horas. Valores médios seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Duncan ($p \leq 0.05$). Letras maiúsculas comparam o efeito da aplicação do Si na mesma concentração de Al, enquanto letras minúsculas comparam o efeito de diferentes concentrações de Al na mesma concentração de Si. As barras representam os valores médios ($n = 5$ plantas) \pm erro padrão.

A exposição ao Al na presença de Si modulou o metabolismo primário em ápices radiculares de soja (Fig. 8). A concentração de aminoácidos reduziu 42% sob 300 μM de Al e ausência de Si, no entanto, foram observados aumentos nas concentrações de 100 (66%) e 300 μM (49%) de Al combinadas com Si em relação ao controle (Fig. 8A). A exposição ao Al aumentou a concentração de prolina tanto na ausência (100 μM, 320%) quanto na presença de Si (100 μM, 456%) (Fig. 8B). Sob 300 μM a síntese dessa biomolécula foi 2,2 vezes maior em relação ao controle na ausência e presença de Si, mas foi inferior à concentração de 100 μM de Al. A concentração de proteínas não foi alterada pela exposição ao Al e pela aplicação de Si, mas a combinação desses elementos resultou em maior concentração de proteínas no tratamento de 300 μM em relação a 100 μM de Al (Fig. 8C). O Al induziu maior acúmulo de compostos fenólicos no tratamento de 100 μM (59%) e 300 μM (40%) (Fig. 8D). Com a adição de Si essa resposta foi observada apenas na concentração 100 μM (45%) com redução de 28% sob 300

μM de Al. O maior teor de fumarato (Fig. 8E) foi observado na presença de Si no controle e sob $300 \mu\text{M}$ de Al (40% e 35%, respectivamente). Por outro lado, a exposição a $100 \mu\text{M}$ resultou em maior acúmulo de malato (113%), e a $300 \mu\text{M}$ o acúmulo desse ácido orgânico reduziu (30%) em relação ao controle (Fig. 8F). Com a adição de Si as raízes acumularam mais malato à medida que se aumentou a concentração de Al no meio de cultivo. A adição de Si reduziu o acúmulo desse ácido orgânico a $100 \mu\text{M}$ (38%), mas aumentou a $300 \mu\text{M}$ (140%).

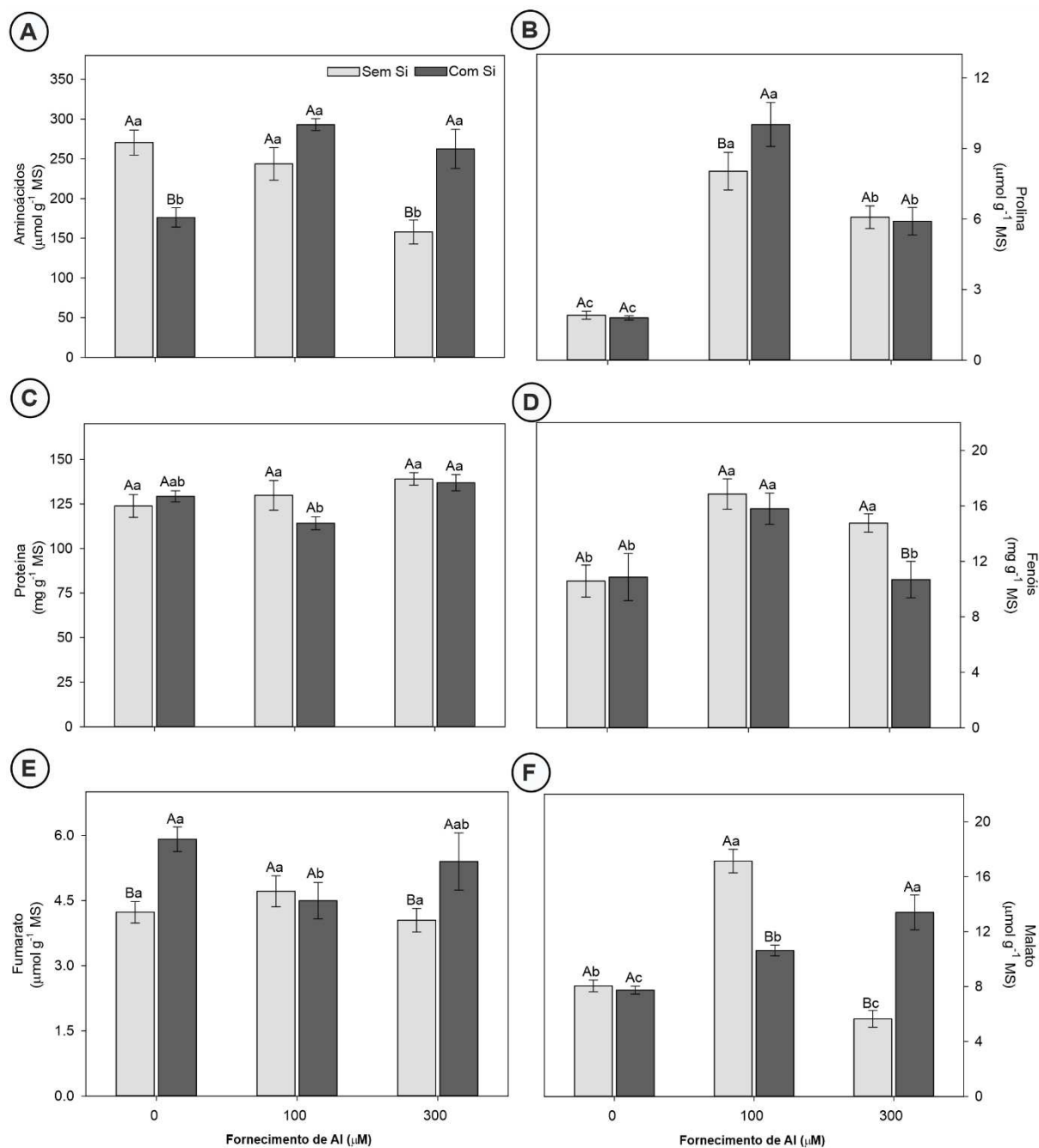


Fig. 8 Concentração de aminoácidos totais (A), prolina (B), proteínas (C) compostos fenólicos totais (D), fumarato (E) e malato (F) em ápices radiculares de soja cultivar 50I52RSF IPRO após 48 horas de exposição a solução nutritiva na ausência (0 mM) e presença de silício (1mM), associado com a ausência (0 μM) e presença de Al (100 ou $300 \mu\text{M}$) durante 72 horas. Valores médios seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Duncan ($p \leq 0.05$). Letras maiúsculas comparam o efeito da aplicação do Si na mesma concentração de Al,

enquanto letras minúsculas comparam o efeito de diferentes concentrações de Al na mesma concentração de Si. As barras representam os valores médios ($n = 5$ plantas) \pm erro padrão.

As raízes expostas a 300 μM de Al apresentaram maior acúmulo de amido em relação ao controle (24%) e ao tratamento com 100 μM de Al (Fig. 9A), ambos na ausência de Si, também se mostrou maior quando comparado à presença de Si. No entanto, na presença de Si os níveis dessa biomolécula foram iguais em todos os tratamentos. Comportamento semelhante ao do amido foi verificado para os teores de glicose na ausência de Si nas diferentes dosagens de Al (Fig. 9B). Já na presença de Si e combinada com a presença de Al, verificou-se drástica redução do teor de glicose, redução esta de 55% e 40% sob 100 e 300 μM , respectivamente. O acúmulo de frutose reduziu a 100 μM de Al tanto na ausência (20%), quanto na presença de Si (70%) em relação ao controle e ao tratamento com 300 μM de Al, este que por sua vez não apresentou quaisquer diferenças em relação ao controle (Fig. 9C). Por outro lado, a adição de Si aumentou o acúmulo de sacarose na concentração de 100 μM de Al (71%), em relação ao controle e 300 μM de Al (Fig. 9D), efeito contrário ao encontrado nos teores de glicose e frutose, porém sem quaisquer alterações nas demais combinações de tratamentos.

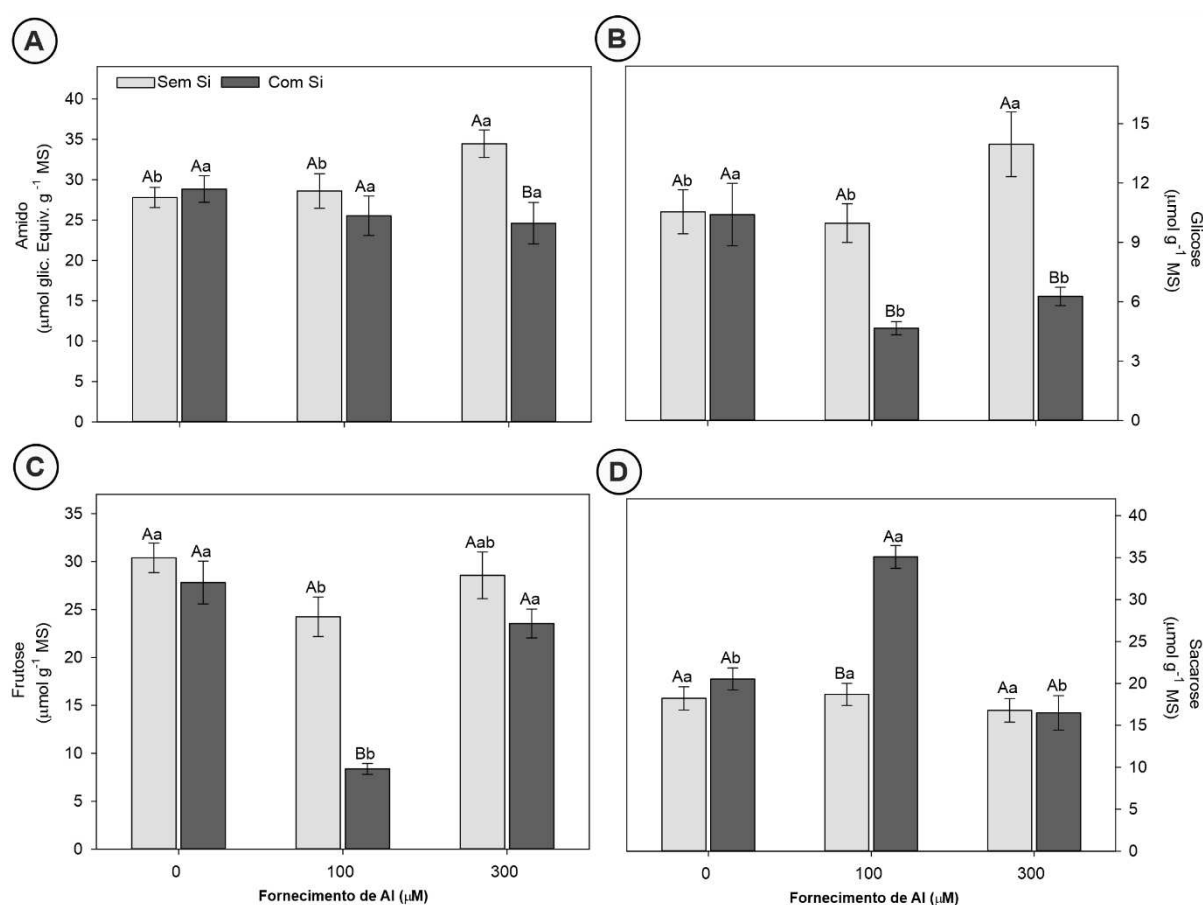


Fig. 9 Concentração de amido (A), glicose (B), frutose (C) e sacarose (D) em ápices radiculares de soja cultivar 50152RSF IPRO após 48 horas de exposição a solução nutritiva na ausência (0 mM) e presença de silício (1mM),

associado com a ausência (0 μM) e presença de Al (100 ou 300 μM) durante 72 horas. Valores médios seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Duncan ($p \leq 0.05$). Letras maiúsculas comparam o efeito da aplicação do Si na mesma concentração de Al, enquanto letras minúsculas comparam o efeito de diferentes concentrações de Al na mesma concentração de Si. As barras representam os valores médios ($n = 5$ plantas) \pm erro padrão.

4 DISCUSSÃO

A presença de Al tóxico nos solos agricultáveis é uma preocupação para o crescimento e desenvolvimento de plantas cultivadas, assim a identificação de mecanismos de resistência a este metal pode selecionar cultivares mais resistentes a esse agente estressor (Rasheed *et al.*, 2023). Adicionalmente, tem-se enfatizado a experimentação com aplicação de compostos com potencial de mitigar o estresse abiótico em cultivos agrícolas, como o elemento Si (Coskun *et al.*, 2019). Neste trabalho nós demonstramos o efeito mitigador da aplicação do Si em condições de estresse por Al em plântulas de soja.

A aplicação de 300 μM de Al inibiu o crescimento das raízes (Fig. 1A-C), resultando em um sistema radicular pouco ramificado e com baixa densidade de raízes laterais (Fig. 1D) e redução da biomassa (Fig. 1F), culminando em danos severos no desempenho das plântulas (Fig. 1G). Efeitos tóxicos do Al no crescimento radicular sempre são relatados em plantas cultivadas com sensibilidade a este metal (Brito *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2020). Apesar de 100 μM de Al causar fitotoxidez em raízes de algumas plantas cultivadas (Andrade *et al.*, 2023; Silva *et al.*, 2020; 2023), neste trabalho essa concentração resultou apenas na redução do CTR (Fig. 1C) e VR (Fig. 1D), o que indica que este não foi um tratamento que causou estresse às plântulas cuja performance foi semelhante a ausência desse elemento (Fig. 1G). Além disso, neste tratamento os ápices radiculares acumularam menos Al em relação a 300 μM de Al (Fig. 2A).

Além do maior teor de Al sob 300 μM , os ápices radiculares foram mais intensamente corados pela hematoxilina (Fig. 2B), com distribuição por todo o ápice radicular (Fig. 4I) e aumento da intensidade desse elemento (Fig. 4S). Os ápices radiculares também apresentaram uma alta fluorescência pelo fluoróforo lumogallion na epiderme e na coifa da raiz (Fig. 3C). Por outro lado, sob 100 μM de Al os ápices radiculares foram fracamente corados com hematoxilina (Fig. 2B), pois a intensidade de coloração varia com a concentração absorvida desse elemento (Radmer *et al.*, 2012), corroborando com os resultados do MEV-EDS (Fig. 4H) e de fluorescência, que revelou a presença do complexo Al – lumogallion apenas na coifa da raiz (Fig. 3B). O maior acúmulo de Al sob 300 μM explica os danos na micromorfologia dos ápices radiculares que apresentaram fissuras transversas na epiderme da raiz (Fig. 4C), enquanto sob 100 μM de Al as raízes se mantiveram íntegras e com presença de mucilagem

(Fig. 4B). Danos estruturais no ápice radicular em função do estresse por Al também foi relatado em *Glycine max* (Silva *et al.*, 2020) e *Oryza sativa* (Brito *et al.*, 2020), que culminam com a morte celular em tecidos radiculares em função do estresse oxidativo (Ribeiro *et al.*, 2022; Yoshida *et al.* 2023).

Após adição de 300 μM de Al combinado com a presença de Si, esse elemento mitigou o estresse provocado pelo Al, em função da redução do teor desse metal nos ápices radiculares (Fig. 2). A adição de Si aumentou a presença (Fig. 3E e F) e viabilidade de CBRs (Fig. 5A) e a síntese de mucilagem (Fig. 4E e F; Fig. 5C) nas duas concentrações de Al, o que sustenta nossa hipótese inicial de que esse elemento promove a síntese de mucilagem e CBRs. Dessa forma, a combinação de Si, mucilagem e CBRs resultou em menores danos na raiz quando na presença de Al (Fig. 4F; Fig. 6D), pois a camada de mucilagem age como barreira para a difusão de Al aos ápices radiculares, reduzindo seu acúmulo e toxicidade, principalmente nas células meristemáticas do ápice radicular (Cai *et al.*, 2013; Miyasaka; Hawes, 2001). Resposta de tolerância ao Al devido a presença de mucilagem foi reportada por Cai *et al.* (2013), que demonstraram a imobilização do Al por mucilagem secretada pelas CBRs. Os mecanismos pelos quais a mucilagem se liga ao Al pode estar relacionada a sua composição, como a presença de ácido urônico, que apresenta alta afinidade por cátions, e grau de metilação (Watanabe *et al.*, 2008). Além disso, o acúmulo de H^+ dos ácidos orgânicos (Cai *et al.*, 2013) e presença de agentes quelantes na mucilagem, como os compostos fenólicos (Cai *et al.*, 2013; Watanabe *et al.*, 2008), podem se ligar ao Al reduzindo sua biodisponibilidade.

A atividade da PG aumentou nas raízes expostas ao Al, mas a adição de Si reduziu a atividade dessa enzima na concentração de 100 μM de Al (Fig. 5D). Isso demonstra a capacidade que o Al tem de manter as CBRs separadas, mantendo-as dispersas e reduzindo sua população próximo ao ápice radicular. Entretanto, a aplicação de Si ao reduzir a atividade da PG, manteve as CBRs agregadas e próximas ao ápice da raiz, permitindo maior síntese de mucilagem e aumento da tolerância ao Al, corroborando com os resultados de encontrados por Xiao e Liang *et al.*, (2022). A presença de celulose na mucilagem não pode ser considerada como resposta de tolerância ao Al, visto que este elemento não se fixa na celulose, cujo teor reduziu com a aplicação de Si em todos os tratamentos, (Xiao; Liang, 2022). Possivelmente a aplicação de Si alterou a composição da parede celular das CBRs, reduzindo o teor de celulose e aumentando o teor de pectina, que apresenta maior afinidade de ligação ao Al.

Sob 300 μM o acúmulo de Al nos ápices radiculares resultou em alta concentração de $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Fig. 6A) e H_2O_2 (Fig. 6B), desencadeando estresse oxidativo e peroxidação lipídica (Fig. 6C). Alta concentração de EROs em plântulas expostas ao Al também foi relatado em plântulas

de *O. sativa* (Ribeiro *et al.*, 2022), *Zea mays* (Yoshida *et al.*, 2023) e *G. max* (Silva *et al.*, 2023). O aumento na taxa de peroxidação lipídica é um marcador do estresse oxidativo, indicando baixa remoção de EROs, cujo acúmulo resulta em reações com biomoléculas, comprometendo a integridade das membranas celulares (Mittler, 2002). Esses resultados culminam para a ocorrência de morte celular da raiz, em função da perda da integridade da membrana celular (Fig. 6D). A severidade do estresse (300 μM de Al) impediu o aumento na atividade das enzimas envolvidas na remoção de EROs, resultando assim no seu acúmulo. Apenas a POX aumentou sua atividade sob 300 μM de Al (Fig. 7C).

O incremento no teor de H_2O_2 (Fig. 6B) sob 100 μM de Al nos ápices radiculares não se configurou no desenvolvimento de estresse oxidativo, pois a taxa de peroxidação lipídica não aumentou (Fig. 6C), e as raízes se mantiveram vivas e sem danos aparentes (Fig. 6D). Além disso, a atividade de SOD e CAT, enzimas fundamentais na remoção de EROs, reduziram quando comparadas ao controle sem Si (Fig. 7A e B). O aumento na produção de EROs não traduz a ocorrência do estresse, pois isso pode ser sinal de intensa atividade metabólica, sobretudo em tecidos em crescimento. Além disso, comparando a ausência ou presença de Si sob 100 μM de Al vemos que com Si a concentração de $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e MDA reduziram e o teste com azul de Evans revelou menor incidência de morte celular nessas raízes (Fig. 6). Também foi observado um aumento na atividade de SOD e CAT, que pode explicar a redução de $\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , apesar de não ter ocorrido estresse oxidativo na ausência desse elemento.

Tanto sob a ausência quanto presença de Si o metabolismo primário foi alterado em ápices radiculares expostos a 100 μM de Al, o que pode explicar o melhor desempenho das plântulas em ambos os tratamentos. A adição resultou em acúmulo de aminoácidos livres, prolina, compostos fenólicos, malato e sacarose e redução de fumarato, glicose e frutose (Fig. 8 e 9). A exposição a 300 μM de Al também resultou em acúmulo de prolina, compostos fenólicos, amido e glicose, porém os teores de aminoácidos (Fig. 8A) e malato (Fig. 8F) reduziram. O acúmulo de prolina e compostos fenólicos estão vinculados a respostas de tolerância ao Al tóxico agindo na remoção de EROs (Ofoe *et al.*, 2023; Rahman; Upadhyaya, 2021). O acúmulo de prolina sempre é relatado em plantas expostas ao Al (Chowra *et al.*, 2017, Pirzadah *et al.*, 2019) e pode ser empregada na remoção de EROs, assim como os compostos fenólicos (Kochian *et al.*, 2015; Maejima *et al.*, 2016), na síntese proteica e osmorregulação (Ofoe *et al.*, 2023; Rahman; Upadhyaya, 2021). O malato ao ser exsudado dos ápices radiculares quebra e indisponibiliza o Al, reduzindo sua toxidez. Seu acúmulo sempre é reportado como resposta de tolerância ao Al (Andrade *et al.*, 2023; Radmer *et al.*, 2012). Por outro lado,

a redução do acúmulo de malato sob 300 μM de Al pode indicar o seu emprego na síntese de outros compostos originados do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, ou devido ao processo de exsudação pelas raízes.

Sabe-se que a toxidez por Al pode prejudicar a atividade das enzimas amilolíticas (Xu *et al.*, 2017), o que pode explicar o alto teor de amido sob 300 μM de Al. Sob estresse por Al, as raízes podem acumular glicose que atua como agente osmoregulador (Giannakoula *et al.* 2008; 2010), evitando a desidratação da raiz ou estabilizador de membranas (Ofoe *et al.*, 2023; Silva *et al.*, 2023) ou ainda contribuir na síntese de moléculas utilizadas na mitigação do estresse como prolina e compostos fenólicos, cujo aumento foi reportado neste trabalho (Fig. 8B, D). Os aminoácidos podem ser utilizados como compostos intermediários na síntese de outras moléculas, o que explica sua redução sob 300 μM de Al (Hildebrandt *et al.*, 2015).

Neste trabalho nós observamos um acúmulo de fumarato e malato sob 300 μM de Al com a adição de Si e redução na concentração de compostos fenólicos com a aplicação deste elemento. Possivelmente a presença de prótons dos ácidos orgânicos na mucilagem tenha contribuído para quelar o Al tóxico (Cai *et al.*, 2013). Por não se configurar com uma situação de estresse, possivelmente a síntese de fenólicos foi reduzida. Ainda nesse tratamento observamos uma redução no acúmulo de amido e glicose 300 μM combinado com Si. A síntese de mucilagem e CBRs demanda glicose, oriunda inclusive da degradação do amido, o que pode explicar a redução na concentração de ambos compostos. Comparando a ausência e presença de Si sob 300 μM vemos que a adição de Si aumentou a concentração de aminoácidos (Fig. 8A), prolina (Fig. 8B) e malato (Fig. 8F). Por outro lado, vemos uma redução no acúmulo de amido (Fig. 9A) e glicose (Fig. 9B). Como a síntese de mucilagem e CBRs requer a presença de açúcares, possivelmente o amido pode estar sendo convertido em glicose, que está sendo empregada na síntese de mucilagem e CBRs.

Além da mucilagem, as CBRs, que são a primeira camada da raiz em contato direto com o Al, desempenham um papel importante na tolerância ao Al em plântulas de soja, cuja remoção inibiu alongamento radicular nessa espécie (Cai *et al.*, 2013). A exposição ao Al pode induzir a produção de mucilagem por CBRs, fornecendo mais sítios de absorção ao Al e diminuindo o seu contato com a raiz e a inibição do crescimento radicular (Cai *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2016). Neste estudo nós registramos um acúmulo de Al na parede e núcleo celular das CBRs (Fig. S2D e F) resultando em sua morte (Fig. S2G e H). Apesar do Si reduzir o acúmulo de EROs nos ápices radiculares, na concentração de 300 μM a produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 foi superior ao controle com Si, apesar de não ocorrer aumento da taxa de peroxidação lipídica e morte celular.

Quando comparamos a ausência ou presença de Si sob 300 μM de Al observamos que a adição de Si resultou na redução do acúmulo de EROs (Fig. 6A e B), menor taxa de peroxidação lipídica (Fig. 6C) e morte celular (Fig. 6D) nos ápices radiculares. Nessa condição registramos uma redução na atividade da SOD (Fig. 7A), CAT (Fig. 7B), POX (Fig. 7C) um leve aumento na atividade de APX (Fig. 7D). Esses resultados sinalizam que esse aumento de EROs não se configura como estresse oxidativo. Possivelmente o acúmulo de EROs aumentou nas CBRs induzido a morte celular programada dessas células. Entretanto, mais estudos devem ser conduzidos para melhor compreendermos o mecanismo pelo qual isso ocorre.

5 CONCLUSÃO

O acúmulo de Al em ápices radiculares de soja ocasiona estresse oxidativo e danos de membrana, culminando na redução do desempenho das plântulas. Entretanto, a presença de Si no meio de cultivo minimiza drasticamente o efeito da toxidez por Al, pois aumenta a viabilidade das CBRs que sintetizam mais mucilagem, responsável por mantê-las em volta das raízes. A presença de mucilagem e CBRs reduzem o contato e conseqüentemente o acúmulo de Al nas raízes, permitindo o crescimento das plântulas de soja, apesar de concentrações de Al em doses fitotóxicas.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, R. *et al.* Malate and cell wall aluminum immobilization act as resistance mechanisms in soybean roots. **Bragantia**, Campinas, SP, v. 82, p. 1-12, Out. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4499.20230120>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/brag/a/TpYNBwXgYPVTgVLyFJ76jWr/?lang=en>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.
- BOJORQUEZ-QUINTAL, E. *et al.* Aluminum, a friend or foe of higher plants in acid soils. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, Switzerland, v. 8, p. 1-18, Out. 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01767>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2017.01767/full>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.
- BOVERIS, A. *et al.* Measurement of superoxide radical and hydrogen peroxide production in isolated cells and subcellular organelles. **Methods in Enzymology**, London, England, v. 349, p. 280-287, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)49342-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)49342-1). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0076687902493421>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, CA, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, Maio. 1976. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0003269776905273>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.
- BRITO, D. S. *et al.* Effects of aluminum on the external morphology of root tips in rice. **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo, SP, v. 43, p. 413–418, Set. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40415-020-00620-9>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40415-020-00620-9#citeas>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.
- CAI, M. *et al.* Developmental characteristics and aluminum resistance of root border cells in rice seedlings. **Plant Science**, Clare, Ireland, v. 180, n. 5, 702–708, Maio, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.01.017>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168945211000367>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.
- CAI, M. *et al.* Immobilization of aluminum with mucilage secreted by root cap and root border cells is related to aluminum resistance in *Glycine max* L. **Environmental Science and Pollution Research**, Heidelberg, Germany, v. 20, p. 8924-8933, Jun. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1815-6>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-013-1815-6#citeas>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.
- CARILLO, P.; GIBON, Y. Protocol: extraction and determination of proline. **Prometheus: Protocols in Ecological and Environmental Science**, p. 1-5, 2011. Disponível em: <https://prometheusprotocols.net/function/tissue-chemistry/primary-metabolites/extraction-and-determination-of-proline/>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

CHEN, Y. *et al.* Enhancement of polyphenolic metabolism as an adaptive response of lettuce (*Lactuca sativa*) roots to aluminum stress. **Environmental Pollution**, London, England, v. 261, p.1-8, Jun. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114230>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0269749120302906>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

CHOWRA, U. *et al.* Aluminium-induced excessive ROS causes cellular damage and metabolic shifts in black gram *Vigna mungo* (L.) Hepper. **Protoplasma**, Vienna, Austria, v. 254, p. 293-302, Jan. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00709-016-0943-5>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00709-016-0943-5#citeas>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

CLARK, R. B. Characterization of phosphatase of intact maize roots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 23, n. 3, p. 458-460, Maio, 1975. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf60199a002>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf60199a002>. Acesso em: 15 dez. 2024.

COSKUN, D.*et al.* The controversies of silicon's role in plant biology. **New Phytologist**, Hoboken, NJ, v. 221, n.1, p. 67-85, Jan. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.15343>. Disponível em: <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/nph.15343>. Acesso em: 15 dez. 2024.

DRIOUICH, A.; DURAND, C.; VICRÉ-GIBOUIN, M. Formation and separation of root border cells. **Trends in Plant Science**, Cambridge, MA, v. 12, n.1, p.14-19, Jan. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.11.003>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1360138506003116>. Acesso em: 15 dez. 2024

FERNIE, A.R., *et al.* Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. **Planta**, New York, NY, v. 212, p. 250–263, Jan. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1007/s004250000386>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s004250000386#citeas>. Acesso em: 15 dez. 2024.

FURLEY, P. A.; RATTER, J. A. Soil resources and plant communities of the central Brazilian cerrado and their development. **Journal of Biogeography**, Hoboken, NJ, v.15, n. 1, p. 97-108 , Jan. 1988. DOI: <https://doi.org/10.2307/2845050>. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/2845050>. Acesso em: 15 dez. 2024.

GAY, C.; GEBICKI, J. M. A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric–xylenol orange hydroperoxide assay. **Analytical Biochemistry**, San Diego, CA, v. 284, n.2, p. 217-220, Set. 2000. DOI: <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4696>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003269700946967>. Acesso em: 15 dez. 2024.

GIANNAKOULA, A. *et al.* 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 of Plant Physiology**, Munich, Germany, v. 165, n. 4, p. 385-396, Mar. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.01.014>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0176161707001137>. Acesso em: 15 dez. 2024.

GIANNAKOULA, A. *et al.* Aluminum stress induces up-regulation of an efficient antioxidant system in the Al-tolerant maize line but not in the Al-sensitive line. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, England, v. 67, n. 3, p. 487-494, Jan. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.07.010>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S009884720900152X>. Acesso em: 15 dez. 2024.

HAWES, M. C. *et al.* The role of root border cells in plant defense. **Trends in Plant Science**, Cambridge, MA, v. 5, n. 3, p. 128-133, Mar. 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01556-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01556-9). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1360138500015569>. Acesso em: 15 dez. 2024.

HAWES, M. C. *et al.* Extracellular trapping of soil contaminants by root border cells: new insights into plant defense. **Agronomy**, Basel, Switzerland, v. 6, n.1, p. 1-9, Jan. 2016. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy6010005>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4395/6/1/5>. Acesso em: 15 dez. 2024.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, NY, v. 125, n.1, p.189-198, Abr. 1968. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0003986168906541>. Acesso em: 15 dez. 2024

HILDEBRANDT, T. M. *et al.* Amino acid catabolism in plants. **Molecular Plant**, Cambridge, MA, v. 8, n. 11, p. 1563–1579, Nov.2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.09.005>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1674205215003664>. Acesso em: 15 dez. 2024.

HODSON, M. J.; EVANS, D. E. Aluminium–silicon interactions in higher plants: an update. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, England, v. 71, n. 21, 6719-6729, Dez. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa024>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jxb/article/71/21/6719/5707562>. Acesso em: 15 dez. 2024.

JONES, K.H.; SENFT, J.A. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, London, England, v. 33, n. 1, p.77–79, Ago. 1985. DOI: <https://doi.org/10.1177/33.1.2578146>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/33.1.2578146>. Acesso em: 15 dez. 2024.

KATO Y. *et al.* White leaf sectors in yellow variegated are formed by viable cells with undifferentiated plastids. **Plant Physiology**, Cary, NC, v. 144, n. 2, p. 952–960, Jun. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.107.099002>. Disponível em: <https://academic.oup.com/plphys/article/144/2/952/6106975>. Acesso em: 15 dez. 2024.

KOCHIAN, L.V. *et al.* Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum resistance. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, CA, v. 66, p. 571-598, Abr. 2015. DOI: 10.1146/annurev-arplant-043014-114822. Disponível em: https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev-arplant-043014-114822#abstract_content. Acesso em: 15 dez. 2024.

KOPITTKÉ, P. M. *et al.* Alleviation of Al toxicity by Si is associated with the formation of Al–Si complexes in root tissues of sorghum. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, Switzerland, v. 8, p. 1-9, Dez. 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02189>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2017.02189/full>. Acesso em: 15 dez. 2024.

KUO, M. C.; KAO, C. H. Aluminum effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. **Biologia Plantarum**, Praha, Czech Republic, v. 46, p. 149-152, Mar. 2003. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1022356322373>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1022356322373#citeas>. Acesso em: 15 dez. 2024.

LISEC, J. *et al.* Gas chromatography mass spectrometry–based metabolite profiling in plants. **Nature Protocols**, Berlin, Germany, v. 1, p. 387–396, Jun. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.59>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nprot.2006.59#citeas>. Acesso em: 15 dez. 2024.

MAEJIMA, E. *et al.* Contribution of constitutive characteristics of lipids and phenolics in roots of tree species in Myrtales to aluminum tolerance. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, NJ, v. 160, p. 11-20, Nov. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppl.12527>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ppl.12527>. Acesso em: 15 dez. 2024.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 31, n. 3, p. 426–428, Mar. 1959. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60147a030>. Acesso em: 15 dez. 2024.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The generation of superoxide radical during the autoxidation of ferredoxins. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 246, n.22, p. 6886-6890, Nov.1971. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)45929-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)45929-2). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925819459292>. Acesso em: 15 dez. 2024.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Cambridge, MA, v. 7, n. 9, p. 405-410, Set. 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1360138502023129>. Acesso em: 15 dez. 2024.

MIYASAKA, S. C.; HAWES, M. C. Possible role of root border cells in detection and avoidance of aluminum toxicity. **Plant Physiology**, Cary, NC, v. 125, n. 4, p. 1978-1987, Abr. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.125.4.1978>. Disponível em: <https://academic.oup.com/plphys/article-abstract/125/4/1978/6097787?redirectedFrom=fulltext&login=false>. Acesso em: 15 dez. 2024.

MOHAMMADI, M., KARR, A. L. Superoxide anion generation in effective and ineffective soybean root nodules. **Journal of Plant Physiology**, Munich, Germany, v. 158, n. 8, p. 1023-1029, Mar. 2001. DOI: [https://doi.org/10.1078/S0176-1617\(04\)70126-1](https://doi.org/10.1078/S0176-1617(04)70126-1). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0176161704701261>. Acesso em: 15 dez. 2024.

NUNES-NESE, A. *et al.* Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. **The Plant Journal**, Hoboken, NJ, v. 50, n. 6, p.1093–1106, Maio, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03115.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-313X.2007.03115.x>. Acesso em: 15 dez. 2024.

OFOE, R. *et al.* Aluminum in plant: Benefits, toxicity and tolerance mechanisms. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, Switzerland, v. 13, p. 1-24, Jan. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1085998>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2022.1085998/full>. Acesso em: 15 dez. 2024.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; RATTER, J. A. Vegetation physiognomies and woody flora of the Cerrado biome. In: OLIVEIRA, P. S.; MARQUIS, R. J. (eds.) **The Cerrados of Brazil: ecology and natural history of a Neotropical Savanna**. New York: Columbia University Press, 2002. p. 91-120. DOI: <https://doi.org/10.7312/oliv12042-005>. Disponível em: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.7312/oliv12042-005/html>. Acesso em: 15 dez. 2024.

PENNINGTON, R. T.; LEWIS, G. P.; RATTER, J. A. An overview of the plant diversity, biogeography and conservation of neotropical savannas and seasonally dry forests. In: PENNINGTON, R. T.; LEWIS, G. P.; RATTER, J. A. (eds). **Neotropical Savannas and the seasonally dry forests**. Boca Raton: CRC Press, 2006. p. 1-29. DOI: <https://doi.org/10.1201/9781420004496>. Disponível em: <https://www.taylorfrancis.com/chapters/edit/10.1201/9781420004496-1/overview-plant-diversity-biogeography-conservation-neotropical-savannas-seasonally-dry-forests-toby-pennington-gwilym-lewis-james-ratter?context=ubx&refId=5dc9d498-91ba-4093-b64d-1711a6437073>. Acesso em: 15 dez. 2024.

PIRES, A. R. P.; SILVA, B. (org.). **Normalização de trabalhos acadêmicos**: atualizada conforme ABNTs NBR 14724/2011, NBR 6023/2018 e NBR 10520/2023. Viçosa, MG: UFV, Biblioteca Central, 2024. 147 p. Disponível em: <https://www.bbt.ufv.br/manual-de-normalizacao-de-trabalhos-academicos/>. Acesso em: 11 de dez. de 2024.

PIRZADAH, T. B. *et al.* Aluminium stress modulates the osmolytes and enzyme defense system in Fagopyrum species. **Plant Physiology and Biochemistry**, Issy-Les-Moulineaux, France, v. 144, p. 178-186, Nov. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.09.033>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0981942819303778>. Acesso em: 15 dez. 2024.

POLLE, E.; KONZAK, C. F.; KATTRICK, J. A. Visual detection of aluminum tolerance levels in wheat by hematoxylin staining of seedling roots. **Crop Science**, Hoboken, NJ, v. 18, n. 5, p. 823-827, Set. 1978. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci1978.0011183X001800050035x>. Disponível em: <https://access.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2135/cropsci1978.0011183X001800050035x>. Acesso em: 15 dez. 2024.

PONTIGO, S. *et al.* Silicon-mediated alleviation of aluminum toxicity by modulation of Al/Si uptake and antioxidant performance in ryegrass plants. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, Switzerland, v. 8, n. 642, p. 1-15, Abr. 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00642>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2017.00642/full>. Acesso em: 15 dez. 2024

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Versão 4.0.5 (2021-03-31). R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2021. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 22 ago. 2021.

RADMER, L. *et al.* Aluminum resistance mechanisms in oat (*Avena sativa* L.). **Plant and Soil**, Dordrecht, Netherlands, v. 351, p. 121-134, Fev. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-011-0937-1>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-011-0937-1#citeas>. Acesso em: 15 dez. 2024.

RAHMAN, R.; UPADHYAYA, H. Aluminium toxicity and its tolerance in plant: a review. **Journal of Plant Biology**, Heidelberg, Germany, v. 64, p. 101-121, Abr. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12374-020-09280-4>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12374-020-09280-4#citeas>. Acesso em: 11 de dez. de 2024.

RASHEED, A. *et al.* Development of aluminium (Al)-tolerant soybean using molecular tools: limitations and future directions. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, NY, v. 42, p. 7403-7417, Jun. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00344-023-11051-7>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00344-023-11051-7#citeas>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

RIBEIRO, C. *et al.* Aluminum promotes changes in rice root structure and ascorbate and glutathione metabolism. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, New York, NY, v. 28, p. 2085-2098, Dez. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12298-022-01262-9>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12298-022-01262-9#citeas>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

ROPITAUX, M. *et al.* Root border cells and mucilage secretions of soybean, *Glycine Max* (Merr) L.: characterization and role in interactions with the Oomycete *Phytophthora parasitica*. **Cells**, Basel, Switzerland, v. 9, n. 10, p. 1-22, Set. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells9102215>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/10/2215>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

SILVA, C. O. *et al.* Differential accumulation of aluminum in root tips of soybean seedlings. **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo, SP, v. 43, p. 99-107, Mar. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40415-020-00593-9>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40415-020-00593-9#citeas>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

SILVA, C. O. *et al.* Modulation of the antioxidant system and primary metabolism confers aluminum stress tolerance in soybean. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, Germany, v. 45, n.77, p. 1-13, Maio. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11738-023-03559-y>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11738-023-03559-y#citeas>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

SUN, T. *et al.* Antioxidant activities of different colored sweet bell peppers (*Capsicum annuum* L.). **Journal of Food Science**, Hoboken, NJ, v. 72, n. 2, p. S98-S102, Mar. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00245.x>. Disponível em: <https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1750-3841.2006.00245.x>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

TAMÁS, L. *et al.* Aluminum-induced cell death of barley-root border cells is correlated with peroxidase-and oxalate oxidase-mediated hydrogen peroxide production. **Plant Cell Reports**, New York, NY, v. 24, p. 189-194, Mar. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0939-7>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00299-005-0939-7#citeas>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

WANG, Y.; STASS, A.; HORST, W. J. Apoplastic binding of aluminum is involved in silicon-induced amelioration of aluminum toxicity in maize. **Plant Physiology**, Cary, NC, v. 136, n. 3, p. 3762-3770, Nov. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.104.045005>. Disponível em: <https://academic.oup.com/plphys/article-abstract/136/3/3762/6112479?redirectedFrom=fulltext&login=false>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

WATANABE, T. *et al.* Characterization of root mucilage from *Melastoma malabathricum*, with emphasis on its roles in aluminum accumulation. **New Phytologist**, Hoboken, NJ, v. 178, n. 3, p. 581-589, Maio, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02397.x>. Disponível em: <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-8137.2008.02397.x>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

WEILLER, F. *et al.* The Brassicaceae species *Heliophila coronopifolia* produces root border-like cells that protect the root tip and secrete defensin peptides. **Annals of Botany**, Oxford, England, v. 119, n. 5, p. 803-813, Mar. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcw141>. Disponível em: <https://academic.oup.com/aob/article-abstract/119/5/803/2669372?redirectedFrom=fulltext&login=false>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

XIAO, Z. *et al.* Silicon relieves aluminum-induced inhibition of cell elongation in rice root apex by reducing the deposition of aluminum in the cell wall. **Plant and Soil**, Dordrecht, Netherlands, v. 462, p. 189-205, Fev. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-021-04850-y>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-021-04850-y#citeas>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

XIAO, Z.; LIANG, Y. Silicon prevents aluminum from entering root tip by promoting formation of root border cells in rice. **Plant Physiology and Biochemistry**, Issy-Les-Moulineaux, France, v. 175, n. 15, p. 12–22, Mar. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.02.003>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0981942822000614#:~:text=Si%20improved%20the%20viability%20of,A1%20from%20entering%20root%20tip>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

XU, D. *et al.* Linking hydrogen enhanced rice aluminum tolerance with the reestablishment of GA/ABA balance and miRNA-modulated gene expression: a case study on germination. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, CA, v. 145, p. 303-312, Nov. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.07.055>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0147651317304657>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

YANG, J. L. *et al.* Cell wall hemicellulose contributes significantly to aluminum adsorption and root growth in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Cary, NC, v. 155, n. 4, p. 1885-1892, Abr. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.111.172221>. Disponível em: <https://academic.oup.com/plphys/article/155/4/1885/6108843>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

YANG, J. *et al.* Alkali-soluble pectin is the primary target of aluminum immobilization in root border cells of pea (*Pisum sativum*). **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, Switzerland, v. 7, p. 1-7, Set. 2016. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01297>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2016.01297/full>. Acesso em: 15 de dez. de 2024

YEMM, E. W.; COCKING, E. C.; RICKETTS, R. E. The determination of amino-acids with ninhydrin. **Analyst**, Cambridge, England, v. 80, n. 948, p. 209-214, Mar. 1955. DOI: <https://doi.org/10.1039/AN9558000209>. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/1955/an/an9558000209>. Acesso em: 15 de dez. de 2024

YOSHIDA, C. H. P. *et al.* Tolerance mechanisms to aluminum in popcorn inbred lines involving aluminum compartmentalization and ascorbate–glutathione redox pathway. **Planta**, New York, NY, v. 257, n. 28, p. 1-18, Jan. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00425-022-04062-3>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00425-022-04062-3#citeas>. Acesso em: 15 de dez. de 2024.

APÊNDICE A (Dados Suplementares) - Tabela S1

Resultados (significância) da ANOVA para os efeitos simples do fornecimento de silício (Si), alumínio (Al) e sua interação (Si x Al) para todos os parâmetros quantificados em raízes de soja cultivar 50I52RSF IPRO após 48 horas de exposição à solução nutritiva na ausência (0 mM) e presença de silício (1mM), associado com a ausência (0 μ M) e presença de Al (100 ou 300 μ M) durante 72 horas.

Parâmetro	Si	Al	Si x Al
Comprimento líquido de raízes	<0.0010*	<0.0010*	<0.0010*
Comprimento da raiz	<0.0010*	<0.0010*	0.0015*
Comprimento total da raiz	<0.0010*	<0.0010*	<0.0010*
Volume da raiz	<0.0010*	<0.0010*	0.0098*
Diâmetro médio da raiz	<0.0010*	<0.0010*	<0.0010*
Massa seca da raiz	<0.0010*	0.0028*	0.6763
Teor de Al	<0.0010*	<0.0010*	<0.0010*
Intensidade de Al	<0.0010*	0.0465*	<0.0010*
Intensidade de Si	<0.0010*	0.0466*	<0.0010*
Atividade da PG	0.5853	0.0115*	<0.0010*
O ₂ ⁻	<0.0010*	<0.0010*	0.3649
H ₂ O ₂	<0.0010*	<0.0010*	0.0264*
MDA	0.0035*	0.0122*	0.1711
SOD	<0.0010*	<0.0002*	0.1360
CAT	<0.0010*	<0.0010*	0.0039*
POX	0.1008	<0.0010*	0.0084*
APX	0.0368*	<0.0010*	0.0148*
Aminoácidos	0.1656	0.0074*	<0.0010*
Proline	0.2583	<0.0010*	0.1475
Proteína	0.3500	0.0201*	0.1595
Compostos fenólicos	0.1224	<0.0010*	0.2135
Fumarato	0.0082*	0.4912	0.0575
Malato	0.6005	<0.0010*	<0.0010*
Amido	0.0269*	0.4855	0.0441*
Glicose	<0.0010*	0.0234*	0.0113*
Frutose	<0.0010*	<0.0010*	0.0043*
Sacarose	<0.0010*	<0.0010*	<0.0010*

Nível de significância: *: 5%.

APÊNDICE B (Dados Suplementares) - Figura S1

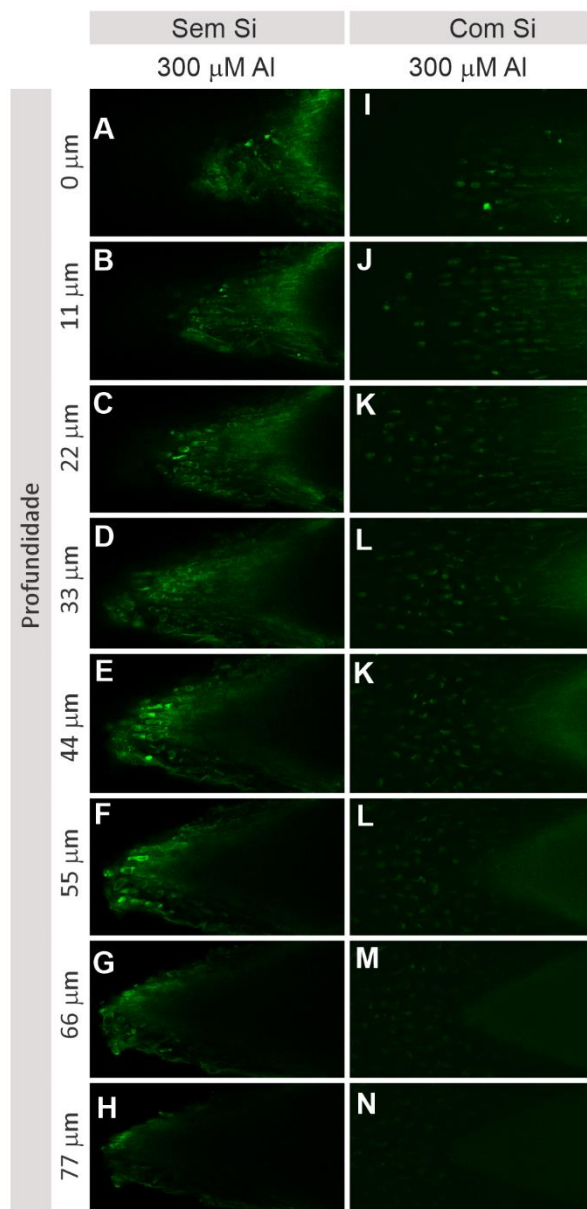


Figura S1 Localização do Al por microscopia confocal de varredura a laser na superfície em ápices radiculares de soja cultivar 50I52RSF IPRO após 48 horas de exposição à solução nutritiva contendo 300 μ M de Al na ausência de Si (**A-H**) ou na presença de silício (1mM) (**I-N**) durante 72 horas. A cor verde evidencia a emissão de fluorescência do fluoróforo lumogallion. As imagens foram obtidas em diferentes profundidades em ápices radiculares usando a técnica “Z stacks”, com intervalo de 11 μ m.

APÊNDICE C (Dados Suplementares) - Figura S2

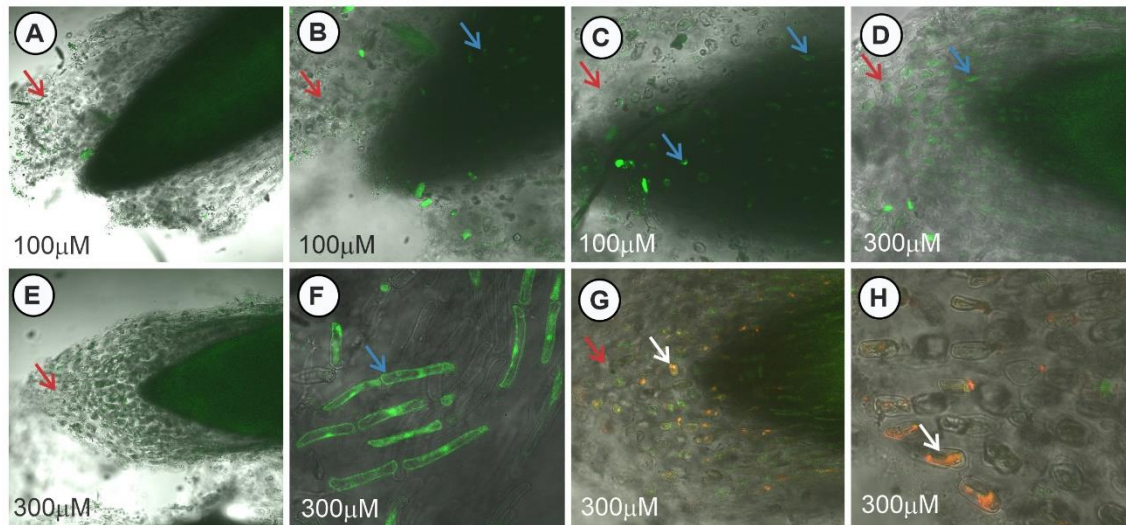


Figura S2 Localização do Al por microscopia confocal de varredura a laser na superfície em ápices radiculares de soja cultivar 50I52RSF IPRO após 48 horas de exposição à solução nutritiva na presença de silício (1mM) associado com a presença de 100 μM de Al (A - C) e 300 μM de Al (D - H) após 72 horas. A cor verde mostra emissão de fluorescência do Al ao reagir com o fluoróforo lumogallion e a cor vermelha mostra emissão de fluorescência de células mortas ao reagir com o fluoróforo iodeto de propídio. Setas azuis: células de borda da raiz imersas em densa camada de mucilagem. Seta branca: células de borda mortas.

CONCLUSÃO GERAL

Os cultivares de soja respondem diferencialmente ao Al tóxico e este comportamento permitiu classificá-los quanto a sensibilidade ao estresse exercido por este metal. Apesar do Al não influenciar a taxa de germinação, o desempenho de plântulas foi comprometido, principalmente nos cultivares sensíveis. Esse comportamento está vinculado ao acúmulo de Al que resulta em danos na micromorfologia das raízes e estresse oxidativo. As respostas de tolerância ao Al em soja podem ser associadas principalmente a atuação das enzimas antioxidantes, acúmulo de metabólitos (prolina, compostos fenólicos, açúcares e ácidos orgânicos) e atuação de CBRs nas raízes na síntese de mucilagem, que pode ser potencializada com a aplicação de Si.