

DALTON DIAS DA SILVA JUNIOR

**GERMINAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA EM GENÓTIPOS DE SOJA
SOB EFEITO DO ALUMÍNIO**

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

Orientador: Laércio Junio da Silva

Coorientadores: Auxiliadora Oliveira Martins
Cléberson Ribeiro

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2020

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S586g
2020

Silva Junior, Dalton Dias da, 1987-

Germinação e caracterização bioquímica em genótipos de
soja sob efeito do alumínio / Dalton Dias da Silva Junior. –
Viçosa, MG, 2020.

73f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Laércio Junio da Silva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 61-73.

1. *Glycine max*. 2. Soja - Crescimento - Efeito do alumínio.
3. Alumínio - Metabolismo. 4. Antioxidantes. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Agronomia. Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 633.343

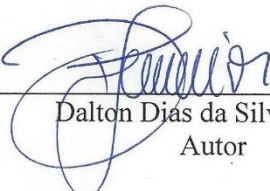
DALTON DIAS DA SILVA JUNIOR

**GERMINAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA EM GENÓTIPOS DE SOJA
SOB EFEITO DO ALUMÍNIO**

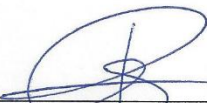
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia para a obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 12 de março de 2020.

Assentimento:



Dalton Dias da Silva Junior
Autor



Laércio Júnio da Silva
Orientador

Dedico está tese aos meus pais, irmãos e amigos que sempre acreditaram e me apoiaram a alcançar os meus objetivos.

“Ando devagar porque já tive pressa, e levo esse sorriso, porque já chorei de mais, hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe, só levo a certeza de que muito pouco eu sei, ou nada sei...” (Almir Sater e Renato Teixeira)

AGRADECIMENTOS

À Nossa Senhora de Nazaré e a Deus por me proporcionarem a vida e a perseverança de enfrentar novos desafios todos os dias.

Ao meu pai, Dalton Dias da Silva (*in memoriam*) e a minha mãe, Maria Margarida da Silva Dias por sempre acreditarem nos meus sonhos e por sempre estarem ao meu lado, agradeço do fundo do meu coração.

Aos meus irmãos, Alessandra Silva, Fábio Silva e Natasha Costa por todo o carinho e motivação ao longo desses anos de estudos, amo vocês.

À Simone Costa por todo carinho e motivação para alcançar as etapas árduas vividas durante a minha infância e durante a carreira acadêmica, muito obrigado.

Ao meu grande amigo e colega de profissão, Professor Adalcir Araújo Feitosa Júnior por realizar a permuta no plano de capacitação e por me oportunizar a cursar doutorado. Demonstração verdadeira de empatia e, incontestável ato de boa-fé, sou eternamente grato.

Aos amigos e colegas de profissão, Luciano Augusto Rohleder, Carlos Alexandre Querino, Julianne Querino, Wanderlei Mendes, Marcos André Braz e Laura Miranda por tornarem o ambiente de trabalho e os momentos particulares agradáveis e de elevada estima.

A Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e ao Instituto de Educação, Agricultura e Ambiente (IEAA) pelo incentivo em cursar o doutorado.

Ao Prof. Laércio Junio da Silva por toda dedicação, orientação, motivação e amizade para realização da tese.

À Dr^a Auxiliadora Oliveira Martins por aceitar a coorientação dessa tese, por sugestões sempre pertinentes para o desenvolvimento do trabalho, muito obrigado.

Ao Prof. Cléberson Ribeiro por aceitar a coorientação, por toda motivação, pelo incentivo, pelas contribuições significativas, na participação da banca de exame de qualificação e no exame de defesa da tese, muito obrigado.

À Prof^a Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias pelo exemplo de docente, pelo incentivo, pelas contribuições, significativas, na participação da banca de exame de qualificação e no exame de defesa da tese, muito obrigado.

À Dr^a Ariadne Morbeck Santos Oliveira por toda motivação, incentivo, na participação da banca de exame de qualificação e no exame de defesa da tese, muito obrigado.

À Dr^a Carla do Carmo Milagres por toda motivação, incentivo, na participação da banca do exame de defesa da tese, muito obrigado.

Aos Profs Wagner Araújo e Adriano Nunes-Nesi pela motivação e por disponibilizar a utilização do laboratório pertencente à Unidade de Crescimento de Plantas do Departamento de Biologia Vegetal da UFV para realização das análises bioquímicas, muito obrigado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia por todo o apoio durante o período do doutorado.

Ao Prof. Carlos Eduardo Magalhães por todo apoio, compreensão e orientações durante o doutoramento, obrigado.

Aos amigos e colegas da pós-graduação por todo o carinho e companheirismo durante as disciplinas e eventuais ajudas na condução de experimentos.

Ao Prof. Hugo Pinheiro (UFRA) por ter me orientado durante a iniciação científica, a qual devo ensinamentos fundamentais e, principalmente, pela amizade, obrigado.

A Prof^a. Gisele Barata da Silva (UFRA) por ter estabelecido parceira para o desenvolvimento de projetos voltados à área de Fitopatologia, a qual devo ensinamentos fundamentais e, principalmente, pela amizade, obrigado.

À Dr^a Fabrícia Kelly (UFRA) por todos os ensinamentos, compreensão e amizade durante o período de iniciação científica e carreira profissional, muito obrigado.

A todos os meus amigos que acompanharam a minha trajetória pessoal e profissional, obrigado.

Aos meus amigos do futebol “*Las Peladas G.O*” pelos momentos descontraídos, pela amizade e por aceitarem que sou um zagueiro excelente, obrigado a todos.

Em memória, ao meu amigo e colega de profissão, Alessandro Machado da Silva. Discente do curso de Doutorado em Fitopatologia da UFV, que nos deixou no dia 02/02/2020. Que o Senhor tenha o recebido na sua glória. Será lembrado pela sua dedicação e esperança em tornar-se um profissional melhor e, que sempre lutou pelos seus sonhos. Obrigado pelo convívio, simplicidade e amizade. Grande abraço para onde você estiver.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pela concessão da bolsa de estudo durante o doutorado (Edital nº 01/2019 – ME/DO).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (CAPES BRASIL) pelo incentivo da bolsa de doutorado que garantiu a realização do trabalho.

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

BIOGRAFIA

Dalton Dias da Silva Junior, filho de Maria Margarida da Silva Dias e Dalton Dias da Silva, nasceu no dia 9 de fevereiro de 1987, na cidade de Ananindeua, estado do Pará.

Em 2008, iniciou o curso de graduação em Agronomia pela Universidade Federal Rural da Amazônia (Belém, Pará), graduando-se em julho de 2012. Em novembro desse mesmo ano, iniciou o curso de mestrado em Ciências Agrárias (Fisiologia Vegetal) na Universidade Federal de Viçosa, concluindo-o em novembro de 2014.

No ano de 2015 foi professor horista na Universidade Federal Rural da Amazônia, ministrando disciplinas para o curso de Engenharia Florestal e Engenharia da Produção no Campus de Parauapebas e, posteriormente, foi professor substituto na Universidade Federal do Sul e do Sudeste do Pará, na cidade de Marabá, sendo lotado do Instituto de Estudos em Desenvolvimento Agrário e Regional, ministrando aula para o curso de Agronomia, ambas universidades localizadas no estado do Pará. No ano de 2016, foi aprovado no concurso para professor efetivo na Universidade Federal do Amazonas, sendo lotado no Instituto de Educação, Agricultura e Ambiente pertencente ao Campus do Vale do Rio Madeira, localizado na cidade de Humaitá, estado do Amazonas. Sendo professor do quadro efetivo do curso de Agronomia.

Após quatro anos de carreira como professor do magistério superior, retornou à Universidade Federal de Viçosa no ano de 2018 para iniciar o doutoramento no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, na área de Sementes e Propagação Vegetativa. No dia 12 de março de 2020, obteve o título de doutor em Fitotecnia

RESUMO

SILVA JUNIOR, Dalton Dias, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2020.
Germinação e caracterização bioquímica em genótipos de soja sob efeito do alumínio.
Orientador: Laércio Júnio da Silva. Coorientadores: Auxiliadora Oliveira Martins e Cléberson Ribeiro.

A acidez encontrada no solo da região do cerrado brasileiro é um fator limitante para produção agrícola. Em solos ácidos, com pH menor que 5,0, a toxicidade por alumínio (Al) resulta em redução do crescimento e desenvolvimento de plantas que não são adaptadas a essa condição de acidez. O cátion Al^{3+} , formado devido ao pH ácido, em contato com a célula vegetal, resulta em interações complexas com a parede celular e o citoplasma favorecendo a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). As respostas bioquímicas e fisiológicas das plantas sob efeito fitotóxico do Al, são descritas no estágio pós-germinativo. Para cultura da soja faltam informações a respeito das alterações bioquímicas que podem ocorrer durante a germinação e o estabelecimento da plântula sob efeito desse metal pesado. O principal objetivo desta pesquisa é identificar a sensibilidade ao Al em 29 genótipos comerciais da soja e, avaliar quais alterações bioquímicas ocorrem no estágio germinativo e no estabelecimento da plântula. Os 29 genótipos avaliados apresentam redução na germinação, no crescimento da radícula e do hipocótilo sob efeito do Al. Dentre esses, é possível identificar genótipos mais sensíveis a presença do Al. Devido a diversidade apresentada dos genótipos estudados, foi realizado a seleção de cinco genótipos que apresentaram diferença na sensibilidade ao Al. As alterações bioquímicas demonstram que o metabolismo de carboidrato foi reduzido e o conteúdo de prolina e nitrato aumentou sob efeito do Al. O conteúdo de ácidos orgânicos, fumarato e malato, aumentou em todos os genótipos avaliados. O conteúdo de MDA foi maior em comparação ao tratamento controle. As enzimas do metabolismo antioxidativo obtiveram maior ação catalítica para promover a detoxificação das EROs. O aumento na concentração de malato indica que o mecanismo de tolerância ao Al existente na cultura da soja promove a formação de complexo com o Al. O aumento no conteúdo de prolina e na atividade catalítica da CAT e POX são traços bioquímicos responsivos a presença do Al durante a germinação da soja. As alterações bioquímicas observadas são de fundamental importância para o melhoramento da cultura da soja em ambientes que apresente elevada concentração de Al.

Palavras-chave: *Glycine max*, metabolismo, estresse oxidativo.

ABSTRACT

SILVA JUNIOR, Dalton Dias, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2020. **Germination and biochemical characterization in soybean genotypes under the effect of aluminum.** Advisor: Laércio Junio da Silva. Co-advisors: Auxiliadora Oliveira Martins and Cléberon Ribeiro.

The acidity found in the soil of the Brazilian cerrado region is a limiting factor for agricultural production. In acid soils, with a pH lower than 5.0, the toxicity by aluminum (Al) results in reduced growth and development of plants that are not adapted to this acidity condition. Al^{3+} cation, formed due to acid pH in contact with the plant cell, results in complex interactions with the cell wall and cytoplasm favoring the formation of reactive oxygen species (ROS). The biochemical and physiological responses of plants under the phytotoxic effect of Al are described in the post-germinative stage. For soybean culture there is a lack of information on the biochemical changes that may occur during germination and establishment of the seedling under the effect of this heavy metal. The main objective of this research is to identify the sensitivity to Al in 29 commercial soybean genotypes and to assess which biochemical changes occur at the germination stage and establishment of the seedling. The 29 genotypes evaluated show a reduction in germination, root growth and hypocotyl under the effect of Al. Among these, it is possible to identify genotypes more sensitive to the presence of Al. Due to the diversity of the genotypes studied, we selected five genotypes that showed difference in sensitivity to Al. The biochemical alterations show that the carbohydrate metabolism was reduced and the content of proline and nitrate increased under the effect of Al. The content of organic acids, fumarate and malate, increased in all genotypes evaluated. The MDA content was higher compared to the control treatment. The enzymes of the antioxidative metabolism obtained greater catalytic action to promote detoxification of EROs. The increase in malate concentration indicates that the Al tolerance mechanism in soybean culture promotes the formation of Al complex. The increase in proline content and catalytic activity of CAT and POX are biochemical traits responsive to the presence of Al during soybean germination. The biochemical changes observed are of fundamental importance for the improvement of soybean culture in environments with a high concentration of Al.

Keywords: *Glycine max*, metabolism, oxidative stress.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	12
Capítulo 1: Germinação, Crescimento de plântulas e seleção de genótipos de soja sob efeito de alumínio.....	14
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. MATERIAL E MÉTODOS	19
2.1. Definição e aplicação dos tratamentos utilizados	20
2.2. Avaliação do desempenho das sementes por análise de imagem – Vigor S.....	20
2.3. Obtenção dos índices	21
2.4. Análise estatística.....	21
3. RESULTADOS.....	23
4. DISCUSSÃO	30
5. CONCLUSÕES	32
Capítulo 2: Efeitos do alumínio na germinação, no crescimento e no metabolismo de plântulas de soja.....	33
RESUMO.....	34
ABSTRACT.....	35
1. INTRODUÇÃO	36
2. MATERIAL E MÉTODOS	37
2.1. Teste de germinação sob efeito do Al.....	38
2.2. Avaliação do desempenho das sementes por análise de imagem – Vigor S.....	38
2.3. Coleta do material e análise bioquímica	39
2.3.1. Quantificação de glicose, frutose e sacarose.....	39
2.3.2. Quantificação de amido	40
2.3.3. Quantificação de fumarato e malato	41
2.3.4. Quantificação de aminoácidos solúveis	41
2.3.5. Quantificação de nitrato.....	41
2.3.6. Quantificação de prolina	42
2.3.7. Quantificação de proteínas solúveis.....	42

2.3.8. Quantificação de aldeído malônico (MDA).....	42
2.4. Extração e ensaios enzimáticos.....	43
2.4.1. Atividade dismutase do superóxido (SOD)	43
2.4.2. Atividade peroxidase do ascorbato (APX), catalase (CAT) e peroxidase (POX)	43
2.5. Delineamento experimental e análise estatística.....	44
3. RESULTADOS.....	45
4. DISCUSSÃO	54
5. CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS.....	62

INTRODUÇÃO GERAL

Embora existam estudos sobre as respostas das plantas sob efeito fitotóxico do Al, a maioria deles é focada no estágio pós-germinativo, com o uso de plantas já estabelecidas ou populações de crescimento mais avançadas nas análises realizadas (Mossor-Pietraszewska, 2001; Cárcamo et al., 2019). Além disso, faltam informações relacionadas aos efeitos que o Al pode causar no metabolismo, no crescimento e, consequente estabelecimento das plântulas e quais estratégias fisiológicas e/ou bioquímica estão envolvidas na tolerância a esse metal pesado (Nunes-nesi et al., 2014; Moreno-Alvarado et al., 2017).

Em solos ácidos ($\text{pH} \leq 5,0$), a toxicidade do Al ocorre devido a formação do íon Al^{3+} . Esse é um dos principais fatores que contribui para a redução da produtividade das espécies agrícolas (e.g. soja, milho e sorgo) e florestais (e.g. *Acacia mangium* e *Enteroobium contortisiliquum*) (Peixoto et al., 2007; Bojórquez-Quintal et al., 2017; Presotto et al., 2018). Ressalta-se que mais de 40% das áreas agricultáveis do mundo estão em condições ácidas e a toxicidade desse metal provoca problemas não apenas para o setor agrícola, mas também é uma questão ambiental, já que pode ocorrer contaminação de corpo d'água e pode provocar contaminação aos animais (Iqbal and Shafiq, 2003; Silva and Matos, 2016; Rodrigues et al., 2017). Os teores de Al (em KCl) nos solos brasileiros são elevados, podendo alcançar 10 cmolc kg^{-1} (aproximadamente 11 ppm) (Cunha et al., 2015).

Dentre as regiões agrícolas do Brasil, a região do cerrado era considerada como uma área de baixa fertilidade natural, baixo valor econômico e com baixa aptidão agrícola nos meados de 1970 (Brannstrom *et al.*, 2008), devido a sua elevada acidez característica e, consequente concentração de alumínio (Al). No entanto, atualmente o Brasil se destaca na produção de grãos mundial, graças a essa região devido à introdução de tecnologia e, principalmente, devido ao melhoramento da soja, a principal cultura produzida na região (Trabaquini *et al.*, 2017). A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é considerada uma *commodity* agrícola, responsável por grande parte do produto interno bruto brasileiro (PIB) agrícola (Santos Silva *et al.*, 2017) e, é uma cultura altamente sensível a elevados teores de Al.

O potencial de toxicidade do Al, uma vez em contato com a célula, principalmente da raiz, resulta em interações complexas com a parede celular, membrana plasmática e com o citosol, que irá promover a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Kochian *et al.*, 2015). As plantas desenvolveram alguns mecanismos de tolerância que são capazes de mitigar os efeitos provocados por sua presença. A desintoxicação do Al ocorre através da formação do complexo Al-ácido orgânico (Al-AO), a partir da interação do íon Al^{3+} na presença de um ácido orgânico (e.g. malato e/ou citrato) ou esse íon pode ser

compartimentalizado no vacúolo. Outra estratégia que as plantas podem apresentar é a exclusão do complexo Al-AO anteriormente formado para região da rizosfera. Além de existir mecanismo capaz de exsudar malato e citrato para a região da rizosfera e, conseqüentemente, ocorrer a formação do complexo Al-AO na região extracelular (Nunes-nesi *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2018).

Para maioria das espécies agrícolas ou florestais, o Al atua como inibidor do crescimento radicular e, em alguns casos, pode comprometer as funções fisiológicas da parte aérea das plantas, como: aumento das taxas de resistência à difusão de CO₂, redução na abertura estomática e consequente declínio da atividade fotossintética, resultando em clorose e alterações estruturais das folhas, redução do número e tamanho das folhas (Mossor-Pietraszewska, 2001; Cárcamo *et al.*, 2019). O Al também reduz a germinação das sementes e o crescimento das plantas de soja, milho (*Zea mays*) e trigo (*Triticum aestivum*) (Fageria, 2001; Custódio *et al.*, 2002; Sarker *et al.*, 2019). Algumas espécies podem apresentar tolerância a esse metal pesado, alfafa (*Medicago sativa*) (Ma *et al.*, 2017) e canola (*Brassica napus*) (Tan *et al.*, 2017).

Por fim, é de extrema importância o conhecimento da estratégia bioquímica que um determinado grupo de genótipos de soja podem apresentar sob o efeito do Al no estágio germinativo e no estabelecimento da plântula. Essas informações podem subsidiar um programa de melhoramento genético que objetive introduzir os caracteres que conferem tolerância em genótipos produtivos. Portanto, o objetivo dessa pesquisa avaliar o efeito do Al na germinação e no crescimento das plântulas de soja. Além de realizar a caracterização bioquímica desses processos através do estudo de diferentes genótipos de soja que apresentem sensibilidade ao Al.

DALTON DIAS DA SILVA JUNIOR

Capítulo 1: Germinação, Crescimento de plântulas e seleção de genótipos de soja sob efeito de alumínio

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2020**

RESUMO

SILVA JUNIOR, Dalton Dias, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2020. **Germinação, crescimento de plântulas e seleção de genótipos de soja sob efeito de alumínio.** Orientador: Laércio Junio da Silva. Coorientadores: Auxiliadora Oliveira Martins e Cléberon Ribeiro.

A expansão da fronteira agrícola para os solos do cerrado brasileiro através do cultivo da soja, vem aumentando o seu rendimento anual em comparação com regiões do sul e sudeste do país. Devido à característica dos solos do cerrado apresentarem $\text{pH} \leq 5,0$, a solubilidade do alumínio (Al) é favorecida e, conseqüentemente, ocorre a formação do cátion trivalente (Al^{3+}). Os efeitos fitotóxicos do Al podem provocar alterações bioquímicas na maquinaria celular, afetar a germinação, e comprometer o crescimento da radícula da plântula. O objetivo desta pesquisa, foi avaliar e identificar alterações na germinação e no crescimento de plântulas de 29 genótipos de soja sob efeito do Al. Sementes dos genótipos foram colocadas para germinar em rolos de papel para germinação, utilizando-se solução de AlCl_3 na concentração de 1 mmol L^{-1} para umedecer o papel. Após três dias, foram obtidas imagens das plântulas de todos os genótipos, via *software Vigor-S*. As variáveis obtidas foram percentuais de germinação, massa fresca de plântula, uniformidade, comprimento de radícula, comprimento de hipocótilo, comprimento total de plântula, índice de crescimento e índice de vigor das plântulas. A dose de Al utilizada promoveu redução na germinação e no crescimento da plântula da soja. Foi obtida correlação significativa para todos os parâmetros de crescimento quando avaliado sob o efeito do Al. Os genótipos foram alocados em cinco grupos distintos entre eles quanto às respostas das sementes e das plântulas ao efeito do Al. O genótipo M5917I apresentou menor tolerância ao Al e o NEO610 foi o genótipo que apresentou maior tolerância ao Al. O Al promove redução na germinação e no crescimento de plântula de soja. Além disso, foi identificado genótipos sensíveis à presença do Al de acordo com os índices Iger, TPI, Iuni, IRZ, IHP, Icrs, Icompt e IIV utilizados. Foi possível identificar e selecionar genótipos com diferentes níveis de sensibilidade, sendo o M5917I mais sensível, BS2606, 58I60RSF, AS3680 e o NEO610 menos sensível.

Palavras-chave: estresse abiótico, acidez do solo, crescimento da radícula, agrupamento.

ABSTRACT

SILVA JUNIOR, Dalton Dias, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2020. **Evaluation of germination, seedling growth and selection of soybean genotypes under aluminum effect.** Advisor: Laércio Junio da Silva. Co-advisors: Auxiliadora Oliveira Martins and Cléberon Ribeiro.

The expansion of the agricultural frontier to the soils of the Brazilian cerrado through the cultivation of soy has increased its annual yield compared to regions in the south and southeast of the country. Due to the characteristic of the cerrado soils have a $\text{pH} \leq 5.0$, the solubility of aluminum (Al) is favored and, consequently, the formation of trivalent cation (Al^{3+}) occurs. The phytotoxic effects of Al can cause biochemical alterations in the cellular machinery, affect germination, and compromise the growth of the seedling radicle. The objective of this research was to evaluate and identify alterations in the germination and growth of seedlings of 29 soybean genotypes under the effect of Al. Seeds of the genotypes were placed to germinate in paper rolls for germination, using AlCl_3 solution at a concentration of 1 mmol L^{-1} to moisten the paper. After three days, images of the seedlings of all genotypes were obtained via Vigor-S software. The variables obtained were germination percentage, fresh seedling mass, uniformity, radicle length, hypocotyl length, total seedling length, growth index and seedling vigor index. The Al dose used promoted a reduction in germination and growth of the soya seedling. A significant correlation was obtained for all growth parameters when evaluated under the effect of Al. Genotypes were allocated to five distinct groups among them regarding seed and seedling responses to Al. The M5917I genotype showed lower tolerance to Al and NEO610 was the genotype with the highest tolerance to Al. Al promotes reduction in germination and growth of soybean seedlings. In addition, Al sensitive genotypes were identified according to the Iger, TPI, Iuni, IRZ, IHP, Icre, Icompt and IIV indices used. It was possible to identify and select genotypes with different levels of sensitivity, being the M5917I more sensitive, BS2606, 58I60RSF, AS3680 and the NEO610 less sensitive.

Keywords: abiotic stress, soil acidity, radicle growth, clustering.

1. INTRODUÇÃO

A existência de metais pesados pode ocorrer de forma natural ou ser intensificada por práticas agrícolas (*e.g.* uso exaustivo do solo e utilização de fertilizantes com base em NPK são as principais práticas que contribuem para aumentar a acidez do solo), pela mineração e devido ao descarte de resíduos (Echart and Cavalli-Molina, 2001). Entre estes metais, destaca-se o alumínio (Al) como sendo um dos mais tóxicos em áreas agrícolas (Zagatto Paterniani and Furlani, 2002).

O Al é considerado o terceiro elemento mais abundante na crosta terrestre, sendo responsável por 8% da massa total de minerais presentes no globo. Ocorre predominantemente em formas não prejudiciais aos vegetais, ou seja, óxidos e silicatos de alumínio (Silva and Matos, 2016; Rodrigues *et al.*, 2017). O potencial hidrogeniônico (pH) $\leq 5,0$ proporciona maior solubilidade do Al, sendo que com a redução desse potencial ocorre a formação do cátion trivalente (Al^{3+}) originado a partir de hidróxido de alumínio [$\text{Al}(\text{OH})_3$] (Echart and Cavalli-Molina, 2001).

Ao longo do tempo, surgiram evidências de que o Al tem efeitos tóxicos no crescimento das plantas, provocando alterações bioquímicas (*e.g.* exsudação de metabólitos, alteração da composição da parede celular, compartimentalização celular etc.), morfológicos (*e.g.* alteração do crescimento da radícula, alteração no comprimento e espessura da radícula), alteração no pH da rizosfera; microbiota do solo e heterogeneidade dos componentes do sistema do solo de formar a mitigar os efeitos causados por esse metal (Ma and Furukawa, 2003; Mariano *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2015; Lan *et al.*, 2019).

Algumas dessas evidências podem ser observadas devido à alteração do protoplasma celular, pois o Al desestabiliza o potencial de membrana celular e aumentar a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), precipitação de fosfato no interior da parede celular do tecido vegetal e na restrição do fluxo de cátions de cálcio (Ca^{2+}), potássio(K^+) e amônio (NH_4^+) (Moreno-Alvarado *et al.*, 2017). Ademais, podemos utilizar os aspectos visuais característicos da fitotoxicidade observados na redução do crescimento da radícula, espessamento das raízes, nanismo, clorose e necrose tecidual, essencialmente identificados nas raízes das plantas (Iqbal and Shafiq, 2003; Kikui *et al.*, 2005).

Todos esses fatores contribuem para a redução do rendimento das culturas agrícolas, principalmente para o cultivo da soja, que é extremamente exigente em solos com alta saturação de base, maior que 60% (Fageria, 2001). O estabelecimento da cultura da soja é relacionado diretamente com a qualidade da semente utilizada (Tavares *et al.*, 2016). Em

condição de estresse abiótico, no caso a presença do Al, pode ocorrer alteração na germinação e no crescimento de plântulas de soja (Custódio *et al.*, 2002).

A avaliação dos mecanismos de tolerância permite identificar quais estratégias estão sendo utilizadas para que as plantas mitiguem a interferência metabólica causada pela presença do Al e, posteriormente, permite identificar quais linhagens e cultivares apresentam maior tolerância (Foy, 1984; Kikui *et al.*, 2005; Magalhaes *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2018; de Castro *et al.*, 2019). Devido aos fatos mencionados, o melhoramento genético das espécies agrícolas é uma estratégia efetiva para produção de culturas tolerantes ao Al em solos ácidos. Vale ressaltar que as plantas possuem variações em sua capacidade de mitigar a toxicidade ao Al, sendo uma característica interessante para seleção de cultivares tolerantes e consequente redução da prática de calagem no ambiente agrícola.

Algumas pesquisas realizadas no estágio germinativo permitem identificar características dos mecanismos de tolerância e resistência que uma cultura pode apresentar a uma determinada condição de estresse abiótico. Para alfafa (*Medicago sativa*), utilizando a indução por cloreto de sódio (NaCl) e polietileno glicol (PEG) a estresse salino e seca, respectivamente, foi possível identificar resposta de defesa no estágio germinativo da espécie. Além de alteração no metabolismo de carboidratos e estresse oxidativo nos diferentes genótipos avaliados (Ma *et al.*, 2017). Tan *et al* (2017) relatam que em canola (*Brassica napus*), foi possível identificar genes que conferem resistência ao estresse salino e seca de forma precoce, avaliando as características da germinação.

Para cultura do milho (*Zea mays*) foi estudo à resistência a seca por meio de indução de cultivares de milho durante o estágio germinativo. Foi descoberto que a correlação negativa da expressão de um gene localizado no retículo endoplasmático foi capaz de identificar genótipos de milho tolerante a essa condição (Xiang *et al.*, 2017). Estudos voltados para a avaliação da diversidade genética, distinção e agrupamento de diferentes genótipos de soja e feijão como sensível e tolerante ao estresse hídrico permitiram identificar as principais respostas fenotípicas quando esses foram submetidos a condição do estresse durante a germinação (Dantas *et al.*, 2017a; Gonçalves *et al.*, 2019).

Para cultura da soja, existem poucas informações a respeito da indução de estresse por Al durante o estágio de germinação e de crescimento da plântula. Diante do exposto, este trabalho objetivou avaliar o efeito do Al na germinação e no crescimento das plântulas de soja e, posteriormente, selecionar genótipos que apresentem sensibilidade a esse metal pesado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de 29 genótipos de soja (*Glycine max*) foram obtidas junto a produtores de sementes comerciais, produzidas na safra 2018-2019, descritos na tabela 1. As análises para caracterização fisiológica dos diferentes genótipos foram realizadas no Laboratório de Análises de Sementes, do Departamento de Agronomia da Universidade Federal de Viçosa.

Para a determinação do grau de umidade das sementes foi utilizado o método da estufa, conforme descrito nas Regras para Análise de Semente - RAS (Brasil, 2009). As sementes foram pesadas (10 gramas de sementes) e acondicionadas em sacos de papel e posteriormente colocadas em estufa, a 105 °C (± 3) por 24 horas, utilizando-se quatro repetições por genótipo.

Tabela 1. Identificação numérica (ID), genótipos, grupo de maturação, hábito de crescimento e ano de registro dos cultivares de soja utilizados no experimento.

ID	GENÓTIPO	GRUPO DE MATUREÇÃO	HÁBITO DE CRESCIMENTO	REGISTRO (ano)
1	64I61RSF	6,4	INDET	2018
2	NEO530	5,3	INDET	2018
3	68I70RSF	6,8	INDET	2015
4	66I68RSF	6,6	INDET	2017
5	NEO610	6,1	INDET	2019
6	NEO660	6,6	INDET	2019
7	53I54RSF	5,4	INDET	2016
8	65I65RSF	6,5	INDET	2017
9	6563RSF	6,3	INDET	2012
10	5958RSF	5,8	INDET	2012
11	50I52RSF	5,0	INDET	2016
12	58I60RSF	5,6	DETER	2015
13	59I60RSF	5,9	INDET	2017
14	55I57RSF	5,5	INDET	2017
15	57I52RSF	5,7	INDET	2018
16	63I64RSF	6,3	INDET	2015
17	BS2606	6,0	INDET	2013
18	M6410I	6,4	INDET	2011
19	M5947I	5,9	INDET	2013
20	TMG7063	6,6	INDET	2016
21	M5838I	5,8	INDET	2016
22	NS6601	6,6	INDET	2015
23	M5917I	5,9	INDET	2012
24	NA5909	6,2	INDET	2008
25	M6210I	6,2	INDET	2011
26	NS6700	6,7	INDET	2013
27	NS5445	5,4	INDET	2012

28	AS3680	6,8	INDET	2014
29	AS3730	7,3	INDET	2011

2.1. Definição e aplicação dos tratamentos utilizados

Nakagawa (1999), descreve e ilustra como foram distribuídas as 20 sementes de 5 repetições para genótipos avaliados. Foram confeccionados rolos de papel para germinação, umedecidos com a quantidade de água deionizada equivalente a 2,5 vezes a massa do papel seco, sendo caracterizado como tratamento controle. A quantidade de água equivalente para umedecer o papel seco foi estimada de acordo com a RAS (Brasil, 2009).

Para o tratamento em presença de alumínio (Al) foi utilizada a solução de cloreto de alumínio - AlCl_3 (Sigma Aldrich – 06220). A concentração de 1 mmol L^{-1} (pH 4,0) foi escolhida a partir de uma sondagem prévia de concentrações (0, 1, 5, 10, 15, 20, 30 e 40 mmol L^{-1}) que não causaram efeitos drásticos na germinação e no crescimento da radícula. A quantidade de água equivalente a 2,5 vezes a massa do papel seco foi substituída pela solução de AlCl_3 à 1 mmol L^{-1} (pH 4,0) e, posteriormente os rolos de papel, tanto para o tratamento controle quanto para o tratamento em presença de Al, foram distribuídos aleatoriamente em germinador do tipo Mangelsdorf, a temperatura de 25°C .

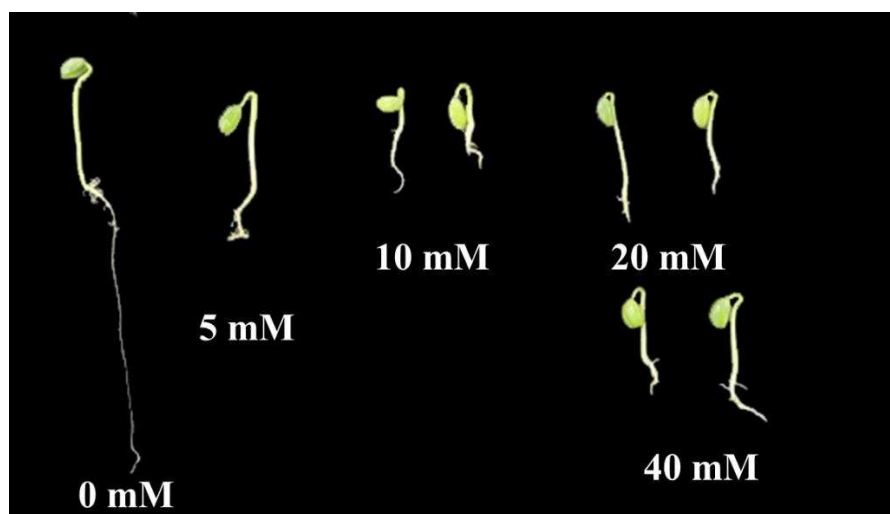


Imagem 1: Aplicação de diferentes doses de Al para realizar a escolha da dose que causou redução nos genótipos da soja. A dose escolhida foi de 1 mmol L^{-1} , pois não apresentou efeitos drásticos na redução do crescimento da radícula (Fonte particular).

2.2. Avaliação do desempenho das sementes por análise de imagem – Vigor S

Para todos os dois tratamentos, os rolos foram mantidos no germinador a 25°C durante três dias para posterior avaliação das plântulas no software *Vigor-S* (Castan *et al.*, 2018). As plântulas de cada repetição foram transferidas do rolo de papel para germinação para uma folha de etil vinil acetato (EVA) de coloração azul, com dimensões de $30 \text{ cm} \times 20$

cm, que corresponde a área útil do escâner, para que fosse possível gerar contraste necessário para análise no software. Em sequência, foram obtidas as digitalizações das imagens das plântulas por repetição, utilizando um escâner HP *Scanjet* 200, instalado em posição invertida no interior de uma caixa (60 x 50 x 12 cm), acoplado a um notebook Core i5 (2.3 GHz, 8 GB de memória RAM, HD de 1 TB). A resolução da imagem foi ajustada para 300 dpi. Assim, foi possível estimar os valores médios do índice de vigor e uniformidade de plântulas, que compreende valores de 0 a 1000, comprimento médio do hipocótilo, raiz e total de plântula, sendo o vigor das sementes diretamente proporcional a esses valores e o percentual de sementes germinadas (Hoffmaster *et al.*, 2005).

2.3. Obtenção dos índices

A estimativa do índice de germinação (Iger), índice de tolerância de plântula (TPI), índice de uniformidade (Iuni), índice de crescimento da radícula (IRZ), índice de crescimento do hipocótilo (IHP), índice de crescimento (Icres), índice de comprimento total (Icomp) e índice de vigor (IIV) foram obtidos a partir das relações entre o percentual de germinação das sementes, massa fresca, uniformidade, crescimento da radícula, crescimento do hipocótilo, crescimento, comprimento total e índice de vigor das plântulas que foram semeadas na presença de Al com as mesmas características avaliadas para às plântulas submetidas ao tratamento controle. Os valores dos índices variam de 0 a 1. Na fórmula abaixo podemos observar como foi obtido o IRZ.

$$IRZ = \frac{Cm\ Al}{Cm\ Control}$$

Em que:

IRZ: índice de crescimento da radícula

Cm Al: comprimento da radícula das plântulas semeadas na presença de AL,

Cm Control: comprimento da radícula das plântulas semeadas em água deionizada.

Para estimativa dos valores absolutos das características de germinação, comprimento da radícula, crescimento do hipocótilo, comprimento total, crescimento e vigor foram obtidos através da metodologia descrita por Hoffmaster *et al* (2005) e, a massa fresca, foi estimada utilizando-se uma balança analítica de precisão.

2.4. Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e, posteriormente,

transformados em índices, que levam em consideração a relação do parâmetro obtido na presença de alumínio com o tratamento controle. Posteriormente, os índices obtidos no item 2.3 das sementes de soja foram submetidos à análise de correlação linear de Pearson (r), a significância dos valores de r foi determinada pelo teste t ($P \leq 0,05$). A análise de componentes principais foi realizada utilizando-se todas as variáveis. Para estimativa do número ótimo de *clusters* foi utilizado o método de Mojena (1977) e análise de agrupamento foi realizada a partir de variáveis quantitativas de medidas de dissimilaridade dos genótipos avaliados para posteriormente estimar a distância Euclidiana entre os grupos. Para realização de todas as análises estatísticas foi utilizado o *software* R x 64 3.5.3 (R Core Team, 2019) e os dados foram padronizados de acordo com a relação obtida no item 2.3.

3. RESULTADOS

O grau de umidade média das sementes dos 29 genótipos avaliados foi de aproximadamente 12,5%. Ressalta-se que nenhum dos genótipos descritos na Tabela 1 apresentou desvio padrão significativo em relação à média para os valores de umidade (dados não apresentados).

Os valores médios e o desvio padrão de todas as características avaliadas encontram-se na tabela 2. Todos os genótipos avaliados apresentaram percentual germinativo maior que 80% para o tratamento na ausência do Al (Tabela 2). Ao analisarmos o efeito do Al na germinação houve redução na germinação e no crescimento das plântulas. Realizando a mesma comparação para o comprimento do hipocótilo e da radícula, foram observadas reduções quando os genótipos foram submetidos ao efeito do Al durante a germinação e crescimento inicial da plântula. O comprimento total, índice de vigor, crescimento, uniformidade e a massa seca, também foram alterados.

Tabela 2: Valores médios e desvio padrão dos dados de germinação, comprimento de hipocótilo, comprimento de radícula, comprimento total, índice de vigor, crescimento, uniformidade e massa seca de plântulas de 29 genótipos de soja avaliados na ausência (-) e na presença (+) de alumínio. Valores em negritos demonstram interação significativa entre os tratamentos. As médias foram comparadas para cada genótipo pelo teste t de *Student* a 5%.

ID	GENÓTIPO	GERMINAÇÃO (%)				HIPOCÓTILO (cm plântula ⁻¹)				RADÍCULA (cm plântula ⁻¹)				COMPRIMENTO TOTAL (cm plântula ⁻¹)			
		- Al	DP ±	+ Al	DP ±	- Al	DP ±	+ Al	DP ±	- Al	DP ±	+ Al	DP ±	- Al	DP ±	+ Al	DP ±
1	64I61RSF	86	1,60	68	1,85	2,21	0,23	1,94	0,14	3,51	0,56	3,12	0,45	5,72	0,70	5,06	0,41
2	NEO530	87	0,80	75	1,55	2,15	0,07	1,94	0,10	4,34	0,41	3,80	0,29	6,49	0,38	5,74	0,37
3	68I70RSF	76	0,40	61	1,17	1,80	0,15	1,63	0,16	3,39	0,25	2,83	0,15	5,20	0,36	4,45	0,29
4	66I68RSF	85	1,10	74	0,98	2,03	0,10	1,79	0,05	4,97	0,32	4,32	0,39	6,99	0,23	6,11	0,41
5	NEO610	91	0,40	82	1,20	2,40	0,13	2,14	0,15	4,59	0,23	4,15	0,30	6,99	0,14	6,29	0,28
6	NEO660	94	0,40	83	1,50	2,23	0,18	2,00	0,16	5,39	0,23	4,32	0,44	7,62	0,29	6,32	0,30
7	53I54RSF	92	0,49	78	0,80	2,14	0,25	1,76	0,27	5,03	0,69	4,16	0,61	7,17	0,86	5,93	0,63
8	65I65RSF	68	1,36	54	1,47	1,87	0,21	1,56	0,14	2,87	0,33	2,50	0,41	4,74	0,25	4,06	0,42
9	6563RSF	83	0,80	68	0,49	1,88	0,30	1,49	0,14	3,05	0,27	2,55	0,12	4,93	0,54	4,05	0,15
10	5958RSF	88	1,20	80	0,00	2,04	0,19	1,61	0,14	4,06	0,16	3,83	0,10	6,10	0,16	5,43	0,18
11	50I52RSF	84	0,75	69	0,40	2,13	0,13	1,91	0,17	4,16	0,30	3,44	0,39	6,30	0,23	5,35	0,43
12	58I60RSF	92	1,02	72	0,80	1,98	0,20	1,72	0,12	5,17	0,56	4,77	0,46	7,15	0,73	6,49	0,57
13	59I60RSF	89	0,40	62	0,49	1,94	0,19	1,59	0,09	3,93	0,29	3,52	0,11	5,87	0,47	5,12	0,17
14	55I57RSF	89	0,98	67	0,80	1,70	0,21	1,51	0,19	3,43	0,51	3,03	0,37	5,13	0,40	4,54	0,27
15	57I52RSF	89	0,40	72	0,80	2,09	0,19	1,70	0,07	3,78	0,16	3,07	0,47	5,87	0,24	4,77	0,52
16	63I64RSF	94	0,40	82	0,49	1,74	0,13	1,60	0,14	4,04	0,42	3,66	0,25	5,78	0,41	5,26	0,26
17	BS2606	88	0,80	75	1,10	1,99	0,15	1,74	0,08	4,06	0,49	2,96	0,23	6,04	0,64	4,70	0,25
18	M6410I	94	0,75	83	0,49	2,10	0,14	1,94	0,11	3,84	0,34	3,58	0,16	5,94	0,33	5,53	0,24
19	M5947I	92	0,49	79	0,40	1,91	0,07	1,77	0,09	4,06	0,28	3,42	0,25	5,97	0,33	5,18	0,29
20	TMG7063	90	0,89	78	0,49	2,10	0,20	1,83	0,17	3,88	0,61	3,28	0,42	5,98	0,69	5,11	0,54
21	M5838I	94	0,75	85	0,00	2,17	0,15	1,81	0,08	4,87	0,10	3,42	0,25	7,03	0,24	5,22	0,29
22	NS6601	94	0,40	88	0,49	2,08	0,19	1,63	0,15	5,17	0,29	3,61	0,28	7,26	0,38	5,24	0,33
23	M5917I	94	0,74	87	0,77	2,35	0,06	1,87	0,05	3,76	0,22	2,69	0,39	6,11	0,23	4,56	0,37
24	NA5909	92	0,49	83	0,49	2,08	0,20	1,64	0,12	4,53	0,32	4,05	0,53	6,61	0,46	5,69	0,59
25	M6210I	94	0,40	86	1,17	1,89	0,08	1,67	0,10	4,64	0,46	3,96	0,38	6,53	0,49	5,63	0,43
26	NS6700	97	0,49	78	1,36	2,49	0,35	1,87	0,09	3,82	0,44	2,93	0,48	6,31	0,52	4,80	0,52
27	NS5445	95	0,63	87	0,80	2,24	0,26	1,89	0,19	3,76	0,50	3,12	0,19	6,01	0,62	5,00	0,21
28	AS3680	90	0,89	64	1,60	2,03	0,17	1,87	0,25	4,06	0,27	2,87	0,43	6,09	0,25	4,73	0,53
29	AS3730	85	0,63	66	2,23	2,36	0,51	1,66	0,39	4,63	0,99	2,79	1,12	6,99	1,50	4,46	1,47

Tabela 2. (continuação)

ID	GENÓTIPO	ÍNDICE DE VIGOR				CRESCIMENTO				UNIFORMIDADE				MASSA FRESCA (g plântula ⁻¹)			
		- AI	DP ±	+ AI	DP ±	- AI	DP ±	+ AI	DP ±	- AI	DP ±	+ AI	DP ±	- AI	DP ±	+ AI	DP ±
1	64I61RSF	414,80	15,29	322,78	47,98	324,56	9,68	242,37	42,14	662,91	15,98	539,59	67,36	6,11	0,47	4,39	1,02
2	NEO530	488,38	26,71	436,25	16,94	399,10	40,02	338,95	32,82	722,24	14,48	625,04	89,86	9,29	0,51	7,93	0,92
3	68I70RSF	376,15	37,78	300,03	17,19	277,69	32,07	193,39	15,24	612,92	49,22	541,78	62,30	7,68	0,41	4,44	0,22
4	66I68RSF	511,80	36,34	448,26	34,57	454,50	43,09	372,25	42,50	667,24	30,64	603,96	37,00	10,41	0,72	8,95	0,55
5	NEO610	517,92	26,74	459,16	61,70	449,21	18,59	382,67	68,45	682,69	45,73	633,04	49,92	8,44	0,60	7,08	1,31
6	NEO660	620,86	26,01	471,72	69,14	558,87	27,14	393,54	60,88	765,48	25,36	654,17	110,43	8,99	0,29	7,91	1,07
7	53I54RSF	567,02	47,61	452,66	46,92	505,86	61,09	362,35	56,69	709,63	17,44	663,40	24,53	10,97	0,36	9,00	0,74
8	65I65RSF	321,58	33,94	252,40	46,33	217,36	32,33	163,52	45,60	564,70	52,20	457,10	49,65	6,65	0,63	5,30	0,80
9	6563RSF	397,33	13,74	325,60	27,33	272,33	8,51	205,55	11,93	694,91	18,35	599,92	59,65	7,24	0,29	6,04	0,25
10	5958RSF	526,51	29,34	467,07	17,23	421,08	30,48	356,30	10,79	786,38	29,57	709,40	40,21	7,03	0,47	5,42	0,25
11	50I52RSF	472,10	36,85	382,96	30,28	383,96	32,40	286,89	43,14	687,13	53,22	603,10	30,24	8,65	0,38	6,14	0,17
12	58I60RSF	569,82	44,06	458,73	42,48	492,23	47,66	382,02	46,79	750,87	37,59	637,71	46,69	9,04	0,71	7,17	0,51
13	59I60RSF	506,47	20,85	441,82	45,40	420,18	29,66	335,53	39,26	732,87	22,22	664,89	51,28	7,69	0,28	5,15	0,41
14	55I57RSF	446,18	46,30	355,30	15,30	340,48	50,25	237,45	15,95	689,81	40,16	621,37	20,42	10,76	0,49	7,44	0,34
15	57I52RSF	475,11	21,56	384,44	45,44	365,37	22,90	267,16	48,17	732,96	33,50	650,20	62,64	6,90	0,33	4,59	0,21
16	63I64RSF	500,89	41,51	461,92	19,32	398,27	49,87	360,01	20,38	755,49	26,75	689,09	44,72	9,45	0,35	6,81	0,25
17	BS2606	493,05	19,05	369,80	31,86	392,30	25,85	255,20	32,33	728,10	7,30	637,10	38,84	7,69	0,28	6,47	0,68
18	M6410I	451,59	11,41	387,61	51,40	349,93	16,89	302,56	44,69	688,80	7,38	586,09	75,61	12,88	0,26	9,87	0,07
19	M5947I	493,42	19,82	419,40	18,13	391,23	27,07	310,66	23,65	731,87	29,07	673,02	16,19	13,16	0,49	10,77	0,38
20	TMG7063	461,90	49,52	405,92	32,69	368,02	62,98	319,99	46,04	681,70	36,39	627,01	35,06	11,85	0,25	10,65	0,24
21	M5838I	564,04	18,94	419,40	18,13	496,48	18,39	310,66	23,65	721,61	21,36	673,02	16,19	11,08	0,03	10,44	0,31
22	NS6601	593,94	15,01	419,08	18,53	532,36	21,39	311,04	24,32	737,55	6,06	671,16	17,65	12,36	0,62	11,49	0,35
23	M5917I	472,51	12,26	205,85	16,62	423,89	52,71	362,99	22,51	710,33	12,07	521,16	39,44	9,59	0,41	8,62	0,33
24	NA5909	544,94	39,73	487,91	45,35	459,85	51,73	413,53	52,43	754,13	23,20	668,98	50,95	8,43	0,44	6,97	0,23
25	M6210I	550,70	38,27	466,88	24,70	462,69	41,73	380,26	18,47	766,03	30,05	671,82	81,14	6,68	0,16	5,95	0,20
26	NS6700	503,94	43,51	385,65	32,12	410,23	53,53	269,33	41,31	722,67	28,99	657,09	42,35	9,10	0,29	7,41	0,60
27	NS5445	481,32	51,99	417,03	26,33	388,03	69,77	321,82	35,51	719,72	18,70	674,46	21,17	9,33	0,70	7,46	0,67
28	AS3680	483,33	58,18	302,83	46,81	367,35	52,00	210,53	46,27	687,33	54,88	518,23	58,09	7,23	0,43	5,20	0,41
29	AS3730	515,49	62,01	277,02	37,79	423,72	74,55	221,08	114,41	729,63	38,70	520,90	58,79	7,58	0,96	5,50	1,01

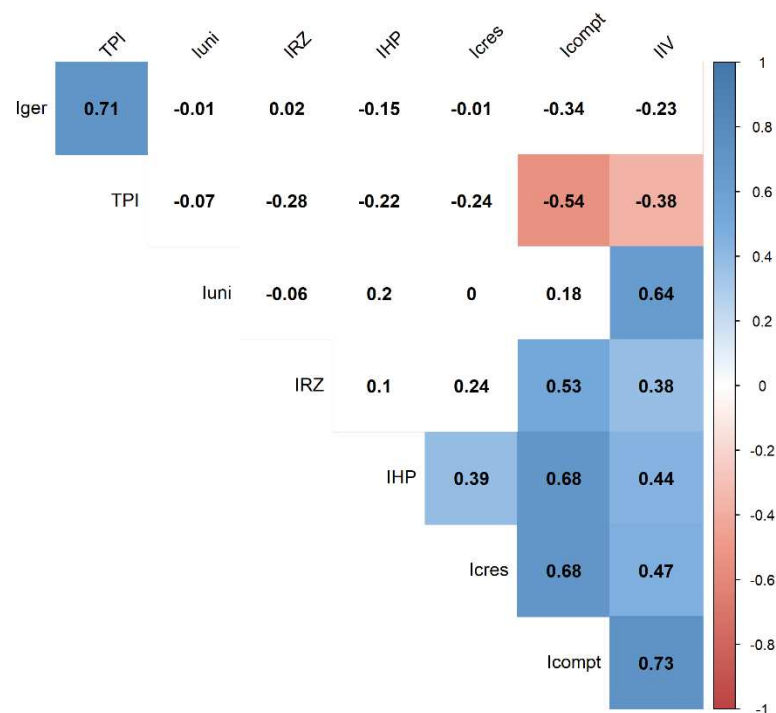


Figura 1. Matriz de correlação obtida a partir das características de germinação, crescimento e massa de plântula, índice de vigor e uniformidade dos diferentes genótipos de soja em presença de Al. Índice de germinação (Iger), índice de tolerância de plântula (TPI), índice de uniformidade (Iuni), índice de crescimento da radícula (IRZ), índice de crescimento do hipocótilo (IHP), índice de crescimento (I cres), índice de comprimento total (Icompt) e índice de vigor (IIV), obtidos por meio da relação entre os valores brutos observados com o tratamento em presença de Al com os valores brutos do tratamento controle. Células coloridas indicam correlação significativa ($P < 0,05$ pelo teste t).

Os índices de germinação (Iger) e de tolerância de plântulas (TPI) apresentaram correlação positiva entre si (Figura 1). O índice de comprimento total (Icompt) e o índice de vigor (IIV) apresentaram correlação positiva e com valor maior que 0,7. O índice de crescimento (I cres) e o índice de crescimento do hipocótilo (IHP) apresentam correlação positiva com o Icompt. As alterações no crescimento da plântula estão associadas com os efeitos provocados pela presença do Al nesse estágio. O TPI, o índice de comprimento (Icompt) e de vigor (IIV) apresentaram correlações negativas, porém significativas. Assim, os genótipos menos sensíveis ao estresse por Al, podem apresentar menor crescimento de plântula para análise realizada ao terceiro dia pós protrusão da radícula.

A fim de avaliar os dados de todos os genótipos em conjunto, foi obtida a análise multivariada de componentes principais (PCA), utilizando-se os índices avaliados nas sementes e plântulas de 29 genótipos sob o efeito do Al (Figura 2). Podemos observar que os dois primeiros componentes principais (*Dim 1* e *Dim 2*) explicam 60,70% da variabilidade total dos dados, sendo que cada componente contribui 43,0% e 17,70%, respectivamente.

Observa-se que os vetores e os glifos são representados pelas variáveis e genótipos avaliados, respectivamente.

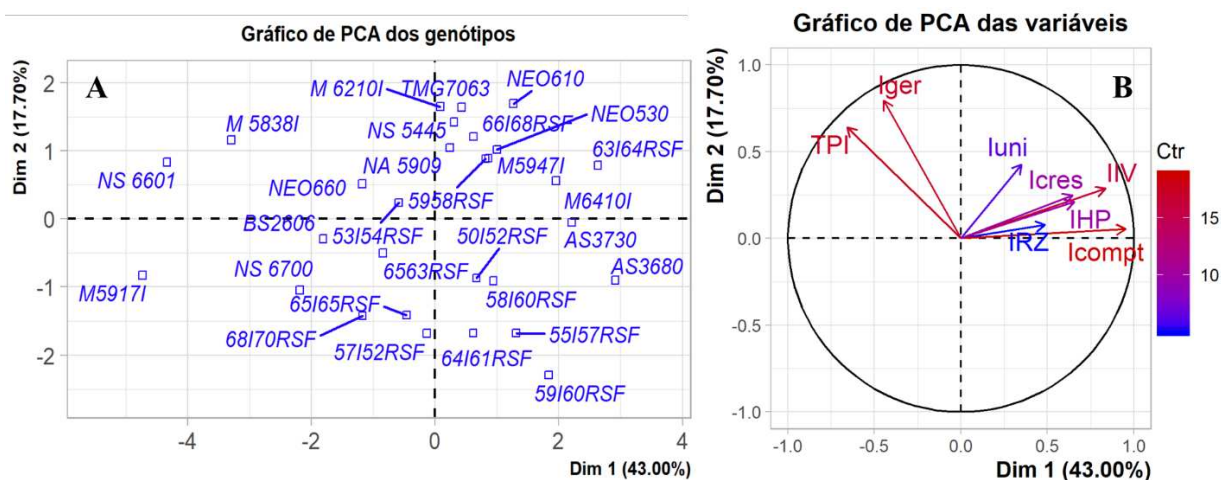


Figura 2. Análise de componentes principais (PCA) obtido por meio da combinação linear das variáveis relacionadas às características de germinação, crescimento e massa de plântula, índice de vigor e uniformidade dos diferentes genótipos de soja em presença de Al. Em A, gráfico de PCA dos genótipos. Em B, gráfico das variáveis, Índice de germinação (Iger), índice de tolerância de plântula (TPI), índice de uniformidade (Iuni), índice de crescimento da raiz primária (IRZ), índice de crescimento do hipocótilo (IHP), índice de crescimento (I cres), índice de comprimento total (Icompt) e índice de vigor (IIV), obtidos através da relação entre os valores brutos observados com o tratamento em presença de Al com os valores brutos do tratamento controle.

Na PCA é possível observar a projeção de traços individuais dos genótipos com vetores no plano dos dois eixos, sendo dada pela diagramação de ordenada central, em que os vetores em azul representam os índices estudados. O primeiro eixo e, o principal, é coordenado pelo I cres que explica 43,0% das combinações. Já o segundo eixo, é coordenado pelo TPI que explica 17,70% das combinações avaliadas.

Na região em que os valores para os dois componentes são máximos (+, +; 1ºquadrante), podemos observar a dispersão de nove genótipos, M62101, NA5909, NEO610, NEO530, 66170RSF, 5958RSF, M64101, 63I64RSF e M5917I (Figura 2). Esses estão mais correlacionados com o I cres (primeiro componente), IRZ, IHP, Icom, IIV e Iuni. No segundo quadrante, onde apenas o valor do segundo componente é máximo, observamos a distribuição de três genótipos, sendo eles, o M5947I, M5838I e NEO660. No terceiro quadrante, os dois componentes principais são negativos e, apresenta seis genótipos no seu quadrante, o 6563RSF, 53I54RSF, 68170RSF, 65I65RSF, BS2606 e 57I52RSF. No último quadrante, observamos que apenas o segundo componente apresenta valores negativos e, apresenta sete genótipos dispersos, sendo eles, o AS3680, 58I60RSF, AS3670, 50I52RSF, 64I61RSF, 55I57RSF e 59I60RSF.

Devido à quantidade de genótipos avaliados no presente estudo, foi necessário realizar o agrupamento dos genótipos de soja submetidos à condição de estresse por Al para posterior caracterização bioquímica das marcas metabólicas que conferem maior ou menor tolerância aos genótipos de soja. Na Figura 3.A e 3.B, é possível identificar cinco grupos distintos (I, II, III, IV e V), onde dentro de cada grupo os genótipos são semelhantes entre si e diferem dos genótipos dentro dos outros grupos.

Para a formação dos grupos, inicialmente foi determinado o número ótimo de grupos pelo método de Mojena (1977). Para análise em questão foram definidos cinco grupos distintos (Figura 3. A). Por meio da distância euclidiana, uma medida de dissimilaridade, podemos observar na Figura 3 B que o grupo V contém 11 dos 29 genótipos avaliados, sendo o maior grupo encontrado. Os grupos II e III são intermediários, pois possuem oito e sete genótipos, respectivamente. Os menores grupos são formados pelos genótipos M5917I, pertencente ao grupo I e, AS3680 e AS3670 pertencente ao grupo IV.

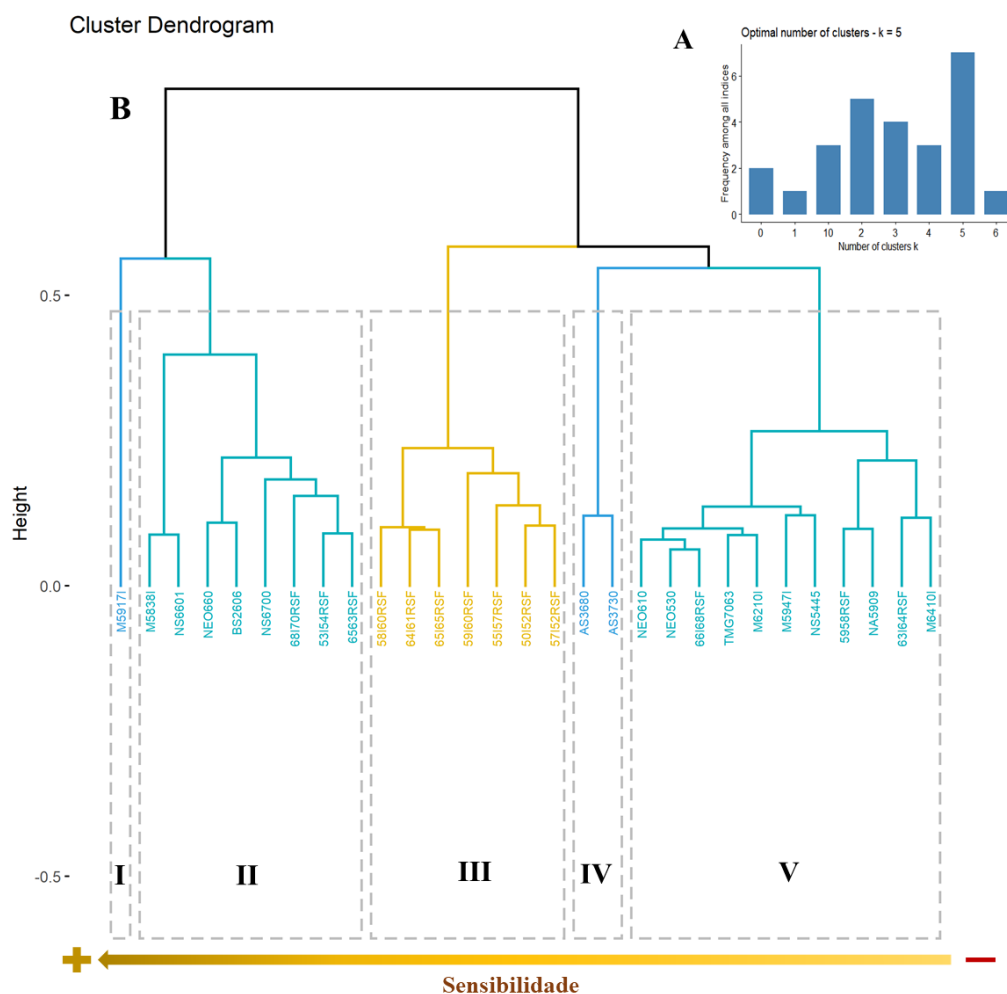


Figura 3. Análise de agrupamento realizada a partir dos índices relacionadas às características de germinação, crescimento e massa da plântula, índice de vigor e uniformidade dos diferentes genótipos de soja (*G. max*) em presença de Al. Em **A**, o número ótimo de grupos estabelecidos pela metodologia de Mojena (1977) e, em **B**, dendrograma obtido por meio da distância Euclidiana, apresentando a divisão dos 29 genótipos avaliados em cinco grupos distintos (Grupos I, II, III, IV e V) de acordo com as características avaliadas. A seta, em destaque, indica dos genótipos menos sensíveis e mais sensíveis a presença do Al.

4. DISCUSSÃO

Embora alguns efeitos do Al sobre a germinação e o estabelecimento da plântula tenham sido observados em maçaranduba (*Erythrina speciosa*), grumixama (*Eugenia brasiliensis*) e pepino (*Cucumis sativus*) (Koszo *et al.*, 2007) e também para milho (Mazzocato *et al.*, 2002), é necessário aprofundar os conhecimentos a respeito dos impactos que o Al pode causar no processo de germinação e, como os diferentes genótipos se comportam na presença desse metal pesado. Os 29 genótipos de soja estudados nessa pesquisa apresentaram evidências na redução do crescimento, germinação e nos parâmetros avaliados para o estabelecimento da plântula sob efeito do Al (Figuras 1, 2 e 3.B).

O efeito do Al foi observado mediante correlações positivas obtidas entre o IRZ, o Icompt e o IIV (Figura 1). Todos os índices, nos quais foram avaliados o padrão de crescimento das plântulas, apresentaram correlação significativa com o IIV. Estes resultados evidenciam a redução do crescimento da radícula e vigor das plântulas quando as sementes de soja foram submetidas à concentração de Al maior que $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (Custódio *et al.*, 2002). Essas informações são necessárias para subsidiar decisões em um programa de melhoramento genético, bem como, identificar características morfológicas que caracterizem diferentes genótipos em um banco de germoplasma (Ryan *et al.*, 1993).

Para abreviar o tempo no processo de seleção de um indivíduo tolerante por indução a condição de estresse abiótico, é necessário utilizar ferramentas de avaliação que reduzam esse período, bem como, avaliar de forma precoce um determinado traço fenotípico indicador. Já que o teste de germinação e de comprimento de plântulas são utilizados em avaliação precoce de genótipos de plantas, as empresas de melhoramento conseguiram estabelecer estratégias viáveis na seleção e caracterização dos genótipos (Sartain and Kamprath, 1977; Menosso *et al.*, 2000; Dantas *et al.*, 2017b). Não obstante, essas metodologias podem apresentar tempo elevado para cultura como o café que demora 30 dias para ocorrer a germinação, para o fornecimento dos resultados, erros relacionados à subjetividade das avaliações, bem como apresentam caráter destrutivo das sementes avaliadas nos testes (Huang *et al.*, 2015; Rahman and Cho, 2016).

Para sementes de soja são necessários até oito dias para avaliação do teste de germinação de acordo com as RAS (Brasil, 2009). Abud *et al.* (2017) propôs para plântulas de brócolis (*Brassica oleracea*) a avaliação da germinação, do vigor e dos demais índices no terceiro dia após a semeadura. Para acelerar as avaliações e eliminar a subjetividade costuma-se utilizar software de avaliação de desempenho de sementes por meio da análise de imagem de plântula (Medeiros *et al.*, 2019).

Na Figura 2, podemos observar a dispersão dos 29 genótipos nos quatro quadrantes da PCA e o comportamento dos oitos vetores. Para cada eixo, os maiores valores indicam a variável mais representativa, para o Dim 1 observamos aumento para o Icrs e IRZ, já para o Dim 2 é observado a importância do TPI e do Iger. A análise de componentes principais facilita a interpretação de variáveis relacionadas à manifestação das características a partir dos tratamentos utilizados (Silva *et al.*, 2019). No nosso estudo, as características que promoveram a dispersão dos 29 genótipos são o Icrs e o TPI. Este resultado evidencia a variabilidade genética dos genótipos avaliados quanto à tolerância ao estresse por Al durante o processo de germinação das sementes.

Com a utilização do número ótimo de *clusters* (Figura 3. A), foi possível identificar cinco grupos contrastantes quanto às características de germinação e crescimento de plântula avaliadas nos 29 genótipos de soja (Figura 3. B). Houve a formação de cinco grupos (Figura 3. B), que apresentam menor e maior tolerância sob influência do alumínio a partir da relação do Iger, IRZ e o IIV. O grupo I é considerado menos tolerante ao Al com apenas um genótipo, o grupo II possui oito genótipos, sendo que o genótipo M5917I é o representante que apresenta maior contraste em relação ao grupo de maior tolerância, o NEO610, pertencente ao grupo V.

Os grupos III e IV apresentam sete e dois genótipos, respectivamente. São considerados como os grupos que apresentam tolerância intermediária e os indivíduos que os representam são 58I60RSF e AS3680, respectivamente. O grupo V é o grupo que apresenta maior tolerância ao Al de acordo com as características avaliadas, onde os onze indivíduos que o compõe apresentaram comportamento similar de Iuni, IRZ, IHP, Icrs, Icomp, IIV. Os valores médios e o desvio padrão para cada índice avaliado estão descritos na tabela 2.

A técnica de fenotipagem utilizada demonstra ser promissora, no que tange à seleção de genótipos de soja sob o efeito do alumínio para programa de melhoramento genético, uma vez que, é possível observar a formação de grupos que possuem características semelhantes e permite analisar características distintas entre os grupos, tais grupos são observados na Figura 3 B. A utilização de análise de agrupamento é uma ferramenta prática e eficiente que permite reunir as variáveis em um grupo, de forma que exista homogeneidade dentro do grupo e heterogeneidade máxima entre os grupos (Karasawa *et al.*, 2005; Bertan *et al.*, 2014; Torres *et al.*, 2015).

5. CONCLUSÕES

O Al promove redução na germinação, no crescimento do hipocótilo, no crescimento da radícula e no comprimento total de plântula dos genótipos avaliados na concentração de 1 mmol L⁻¹. A partir dessas informações, foi possível identificar genótipos sensíveis a presença do Al de acordo com os índices Iger, TPI, Iuni, IRZ, IHP, Ices, Icompt e IIV. Em ordem crescente, o número de grupos formados, está de acordo com a sensibilidade avaliada, sendo o genótipo M5917I pertencente ao grupo I o que apresentou maior sensibilidade ao efeito do Al. Os genótipos M5838I, NS6601, NEO660, BS2606, NS6700, 68I70RSF, 53I54RSF e 6563RSF pertencente ao grupo II. O grupo III (genótipos 58I6RSF, 64I61RSF, 65I65RSF, 59I60RSF, 55I57RSF, 50I52RSF e 57I52RSF) e o grupo IV (AS3680 e AS3730) apresentaram genótipos intermediários para sensibilidade ao Al. No grupo V foi identificado genótipos menos sensível ao Al, NEO610, NEO530, 66I68RSF, TMG7063, M6210I, M5947I, NS5445, 5958RSF, NA5909, 63I64RSF e M6410I.

DALTON DIAS DA SILVA JUNIOR

Capítulo 2: Efeitos do alumínio na germinação, no crescimento e no metabolismo de plântulas de soja.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2020**

RESUMO

SILVA JUNIOR, Dalton Dias, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2020. **Efeitos do alumínio na germinação, no crescimento e no metabolismo de plântulas de soja.** Orientador: Laércio Junio da Silva. Coorientadores: Auxiliadora Oliveira Martins e Cléberson Ribeiro.

O solo do cerrado é caracterizado por apresentar elevada acidez que facilita a fitotoxicidade por alumínio (Al) e consequentemente reduz o crescimento e desenvolvimento dessa leguminosa. Esse fato pode contribuir para redução da produtividade agrícola nessa região. No entanto, o melhoramento genético objetiva selecionar cultivares que possuam a característica de tolerar essas condições sem que ocorra um comprometimento da produtividade e consequentemente redução no uso de corretivos agrícolas. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do Al na germinação, no crescimento inicial de plântulas e as alterações metabólicas em plântulas de cinco genótipos de soja contrastantes quanto à tolerância a este metal. Para tanto, sementes dos genótipos foram colocadas para germinar na presença de AlCl_3 , nas concentrações de 0 e 1mmol L^{-1} . Aos três dias após a semeadura, as plântulas foram avaliadas quanto ao crescimento e no oitavo dia foi avaliada a porcentagem de germinação das sementes. Amostras de plântulas de todos os genótipos foram submetidas à quantificação de metabólitos primários, atividade de enzimas antioxidativas e conteúdo de MDA. Nossos resultados indicam que a germinação, o crescimento de plântulas, o metabolismo de carboidratos e de ácidos orgânicos são alterados quando os genótipos de soja são submetidos à condição de estresse por Al. Foi possível observar que sob efeito do Al aumentou o conteúdo de proteínas, prolina e nitrato. O Al promoveu redução na germinação e no crescimento total. A redução no conteúdo de amido e sacarose são traços importantes para compreensão do mecanismo instalado nas sementes de soja. O conteúdo de malato é um forte indicador de sensibilidade à plântulas de soja sob efeito desse metal pesado. O conteúdo de MDA aumentou e a ação da CAT e POX promovem a remoção de radicais livre presente na célula. Os genótipos avaliados apresentam diferentes níveis de sensibilidade ao Al.

Palavras-chave: açúcares solúveis, amido, prolina, peroxidase e nitrato.

ABSTRACT

SILVA JUNIOR, Dalton Dias, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2020. **Effects of aluminium on germination, growth and metabolism of soybean seedlings.** Advisor: Laércio Júnio da Silva. Co-advisors: Auxiliadora Oliveira Martins and Cléberon Ribeiro.

The soil of the cerrado is characterized by high acidity which facilitates the phytotoxicity by aluminium (Al) and consequently reduces the growth and development of this legume. This fact can contribute to the reduction of agricultural productivity in this region. However, the genetic improvement aims to select cultivars that have the characteristic of tolerating these conditions without compromising productivity and consequently reducing the use of agricultural correctives. In view of the above, the objective of this study was to evaluate the effects of Al on germination, initial growth of seedlings and metabolic changes in seedlings of five contrasting soybean genotypes regarding tolerance to this metal. For this purpose, seeds of the genotypes were placed to germinate in the presence of AlCl_3 , in concentrations of 0 and 1mmol L^{-1} . At three days after sowing, the seedlings were evaluated for growth and on the eighth day the percentage of germination of the seeds was evaluated. Samples of seedlings of all genotypes were submitted to the quantification of primary metabolites, activity of antioxidative enzymes and MDA content. Our results indicate that germination, growth of seedlings, metabolism of carbohydrates and organic acids are altered when soybean genotypes are subjected to Al stress condition. It was possible to observe that under the effect of Al increased protein, proline and nitrate content. Al promoted a reduction in germination and total growth. The reduction in starch and sucrose content are important traits for understanding the mechanism installed in soybeans. The malate content is a strong indicator of sensitivity to soybean seedlings under the effect of this heavy metal. The MDA content has increased, and the action of CAT and POX promote the removal of free radicals present in the cell. The genotypes evaluated have different levels of sensitivity to Al.

Keywords: sugars, starch, proline, peroxidase and nitrate.

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max*) possui elevado teor de proteína e é um dos principais alimentos utilizados na dieta animal e uma das culturas leguminosas mais importantes do mundo, com quase 118 milhões de hectares cultivados (Santos Silva *et al.*, 2017). O Brasil deve ser o maior produtor de soja na safra 2019/2020, com estimativa de produção de 125 milhões de t (Kenner and Hui Jiang, 2020). Parte desse aumento se deve à expansão agrícola em área de cultivo não tradicional, como a região do cerrado que é predominante de solos ácidos.

Em condições de solos ácidos, a toxicidade do alumínio (Al) representa um problema grave para produção agrícola (Trabaquini *et al.*, 2017). O pH do solo é fortemente relacionado aos níveis de Al disponível que compromete o crescimento das espécies cultivadas (Moir and Moot, 2010). A solubilização do Al é facilitada em pH baixo, menor que 5.0, formando o cátion trivalente Al^{3+} , que pode interferir em processos físicos e celulares da planta como, redução e inibição do crescimento radicular, que consequentemente irá comprometer a absorção de água e nutrientes afetando assim o rendimento das culturas (Vendrame *et al.*, 2010; Rodrigues *et al.*, 2017).

Rodrigues *et al* (2017) relatam que plantas cultivadas em solos ácidos, devido a presença de Al, resulta na diminuição do crescimento radicular. Ressalta-se que o crescimento da parte aérea pode ser afetado negativamente, quando a planta cresce em ambiente rico em Al. Além de apresentar redução do tamanho e quantidade das folhas e meristemas florais e redução da biomassa (Ma and Furukawa, 2003; Li and Xing, 2011; Mattiello *et al.*, 2014). A toxicidade do Al pode resultar em alterações complexas do protoplasma, através de interações com a parede celular, membrana plasmática e o citoplasma (Illés *et al.*, 2006). Dependendo da concentração de Al presente no meio, as alterações do processo metabólico podem resultar em danos irreversíveis, promovendo alterações estruturais do DNA e posteriormente comprometer a divisão celular que resulta na interrupção do crescimento da radícula, uma vez que afeta a diferenciação das células presentes nesse meristema (Illés *et al.*, 2006; Panda *et al.*, 2009).

Os mecanismos de resistência e tolerância vêm sendo desenvolvidos ao longo do processo evolutivo das plantas, de forma a mitigar os danos causados pelo Al. A tolerância e desintoxicação ao Al é um mecanismo de resistência em que os íons Al^{3+} são complexados com ácidos orgânicos - AOs (*e.g.* malato e citrato) ou podem ser compartimentalizados nos vacúolos e até mesmo serem transportados para parte aérea da planta (Kochian *et al.*, 2015). Para o mecanismo de exclusão do Al, pode ocorrer com a exsudação de AO para região da rizosfera, através de proteínas específicas de membrana (Nunes-nesi *et al.*, 2014) e,

posteriormente, ocorrer à formação do complexo Al-AO ou o Al pode ser exsudado na forma de Al-composto orgânico (*e.g.* ácidos orgânicos, compostos fenólicos), do citoplasma para região da rizosfera. Esses processos impedem a entrada do íon Al^{3+} nas células da raiz. Os AOs exsudados possuem alta afinidade de ligação com o Al^{3+} da região do apoplasto ou da rizosfera (Kochian *et al.*, 2004; Hartwig *et al.*, 2007).

As plantas apresentam variados mecanismos de exsudação de outros compostos que estão relacionados à resistência ao Al, por exemplo, o catecol, a catequina e quercetina (Winkel-Shirley, 2002; Peixoto *et al.*, 2007). Plantas de *Triticum aestivum* (trigo) e *Arabidopsis thaliana* apresentam o malato como principal AO usado para quelar o Al, envolvendo transportadores iônicos de TaALMT1 e AtALMT1, respectivamente. *Sorghum bicolor* e *Zea mays* exsudam citrato como agente quelante (Magalhaes *et al.*, 2007; Maron *et al.*, 2010). Para *Glycine max*, Zhou *et al.* (2018a) revelaram que o gene GmME1, que codifica uma enzima málica dependente de NADP^+ (ME-NADP), promove o aumento na síntese de malato e citrato devido a presença do Al no citoplasma.

Durante a seleção realizada pelos programas de melhoramento genético vegetal na cultura da soja, podemos observar que o principal objetivo não foi o desenvolvimento de cultivares tolerantes à presença de Al no ambiente cultivado, fato atribuído à exigência de solos com $\text{pH} > 5,5$ que promovem assim o rendimento ideal e esperado pela cultura. A indução e seleção de plantas que apresentam os mecanismos de tolerância a determinado tipo de estresse abiótico é uma técnica utilizada para reduzir o tempo de identificação de um genótipo promissor para o início de um programa de melhoramento de plantas (Giroto *et al.*, 2012).

Existem poucas informações relacionadas com os efeitos do Al no metabolismo e crescimento de plantas de soja e, como esse metal pesado pode interferir nos processos bioquímicos da espécie em estudo. Sendo assim, o objetivo dessa pesquisa foi realizar a caracterização bioquímica do processo de germinação e do crescimento inicial de plântulas de soja com diferente sensibilidade ao Al.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de cinco genótipos de soja (*Glycine max*) foram selecionados em ensaios preliminares quanto à tolerância aos efeitos do Al durante o processo de germinação e crescimento inicial das plântulas (capítulo 1), sendo eles: M5917I, BS2606, 58I60RSF, AS3680 e NEO610. As análises para caracterização da germinação e do crescimento da plântula foram realizadas no Laboratório de Análises de Sementes, localizado no

Departamento de Agronomia. A caracterização bioquímica foi realizada na Unidade de Crescimento de Plantas pertencente ao Departamento de Biologia Vegetal. Os dois laboratórios pertencem a Universidade Federal de Viçosa.

2.1. Teste de germinação sob efeito do Al

O teste de germinação foi realizado de acordo com a metodologia descrita nas Regras para Análises de Sementes (Brasil, 2009). Foram utilizadas cinco repetições de 50 sementes para cada genótipo. Foram confeccionados rolos de papel para germinação, umedecidos com a quantidade de água deionizada equivalente a 2,5 vezes a massa do papel seco, sendo caracterizado como tratamento controle. A quantidade de água equivalente para umedecer o papel seco foi estimada de acordo com a RAS (Brasil, 2009).

Para o tratamento em presença de Al foi utilizada a solução de cloreto de alumínio - AlCl_3 (Sigma Aldrich – 06220), na concentração de 1 mmol L^{-1} (pH 4,0). A quantidade de água equivalente a 2,5 vezes a massa do papel seco foi substituída pela solução de AlCl_3 à 1 mmol L^{-1} (pH 4,0) e, posteriormente os rolos de papel, tanto para o tratamento controle quanto para o tratamento em presença de Al, foram distribuídos aleatoriamente em germinador do tipo Mangelsdorf, a 25°C .

A porcentagem de germinação (%G) foi obtida até o oitavo dia de semeadura e posteriormente os resultados do percentual foram estimados para cada repetição.

2.2. Avaliação do desempenho das sementes por análise de imagem – Vigor S

Foi realizada com cinco repetições de 20 sementes para cada genótipo, seguindo a metodologia descrita para o teste de germinação. As sementes foram distribuídas em duas fileiras, alternando-se as 20 sementes, no terço superior, sobre duas folhas de papel para germinação e cobertas com uma terceira folha. Foram confeccionados rolos de papel para germinação, umedecidos com a quantidade de água deionizada, ou solução de AlCl_3 , equivalente a 2,5 vezes a massa do papel seco.

Os rolos contendo as sementes dos diferentes genótipos de soja submetidos à condição controle (H_2O) e, em presença de Al foram mantidos no germinador a 25°C durante três dias para posterior avaliação das plântulas no software *Vigor-S*. As plântulas de cada repetição foram transferidas do rolo de papel para germinação para uma folha de etil vinil acetato (EVA) de coloração azul, com dimensões de $30 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$, que corresponde a área útil do escâner, para que fosse possível gerar contraste necessário para análise no software. Em sequência, foram obtidas as digitalizações das imagens das plântulas por repetição,

utilizando um escâner HP *Scanjet* 200, instalado em posição invertida no interior de uma caixa (60 x 50 x 12 cm), acoplado a um notebook Core i5 (2.3 GHz, 8 GB de memória RAM, HD de 1 TB). A resolução da imagem foi ajustada para 300 dpi. Assim, foi possível estimar os valores médios do índice de vigor e uniformidade de plântulas, que compreende valores de 0 a 1000, comprimento médio do hipocótilo, raiz e total de plântula, sendo o vigor das sementes diretamente proporcional a esses valores e o percentual de sementes germinadas (Hoffmaster *et al.*, 2005).

2.3. Coleta do material e análise bioquímica

Para avaliar se o Al promoveu alterações no metabolismo primário, as plântulas foram embaladas em papel alumínio, imediatamente mergulhadas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer, -80 °C, até análise. O material foi liofilizado a - 20 °C por 3 dias e, posteriormente, o eixo embrionário da plântula foi separado do cotilédone.

Alíquotas de aproximadamente 10 mg de material liofilizado do eixo embrionário das plântulas de soja, foram extraídos em 700 µL metanol e agitados em vórtex por 10 segundos. Posteriormente, foram agitados em 750 rpm, por 20 minutos a 80 °C e centrifugados logo em seguida em 13.300 rpm por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e transferido para um microtubo de 2 mL. Posteriormente, foram adicionados 375 µL de clorofórmio (CHCl₃) e 750 µL de H₂O ultrapura ao sobrenadante e agitado em vórtex por 10 segundos. Em seguida, foram centrifugados a 13.300 rpm por 10 minutos a 4 °C. A fase superior (polar e transparente) foi recolhida para um novo microtubo e armazenada a - 20 °C para posterior quantificação de: açúcares solúveis (glicose, frutose e sacarose), ácidos orgânicos (fumarato e malato), aminoácidos solúveis totais, prolina e nitrato. O precipitado (*pellet*), formado a partir da extração em metanol, foi lavado com 1000 µL de etanol 70% para posterior quantificação de proteínas solúveis e amido como descrito por Lisec (2006) e algumas modificações descritas.

2.3.1. Quantificação de glicose, frutose e sacarose

Glicose, frutose e sacarose foram estimadas usando o ensaio de substrato enzimático contínuo, como descrito por Fernie (2001), a partir de alíquota de 5 µL do extrato metanólico obtido anteriormente, foi adicionado em meio de reação de 205 µL [150 µL de tampão HEPES (KOH 0,1 M + 3 mM MgCl₂ em pH 7,0); 4,65 µL de ATP 109 mM (60 mg mL⁻¹); 4,65 µL de NADP⁺ 48,4 mM (36 mg mL⁻¹); 0,77 µL de Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH – 700 U mL⁻¹) e 45 µL de H₂O ultra pura] em microplaca por poço. Foi realizada a

leitura das amostras em um leitor de microplaca (Molecular Devices, Sunny Valle, EUA) em comprimento de onda de 340 nm. A cinética foi avaliada por meio da formação NADPH, devido a adição de 1,5 U de Hexocinase (1,5 U em 5 µL), sendo possível estimar a quantidade de glicose presente no extrato. Após a estabilização da reação, foi adicionado 0,7 U de Phosphoglucose isomerase (PGI – 0,7 U em 5 µL), formando novamente NADPH, permitindo estimar agora o teor de frutose nas amostras. Por fim, após a estabilização da reação foi adicionado na reação 5 U de Invertase (5 U em 5 µL) para que a quantidade de sacarose fosse estimada, a partir da sua isomerização e posteriormente oxidação da glicose e frutose com a formação de NADPH. Todos os cálculos foram baseados na equação:

$$\mu\text{mol de NADPH} = \frac{\Delta OD}{(2,85 \times 6,22)}$$

Os valores foram corrigidos de acordo com a massa inicial das amostras e os resultados expressos em mmol de glicose, frutose e sacarose kg⁻¹ massa seca (MS).

2.3.2. Quantificação de amido

Para a determinação de amido, o precipitado (*pellet*) da extração metanólica foi solubilizado por aquecimento a 95 °C, em 400 µL NaOH (0,1 M). Em seguida, 61,25 µL de solução de ácido acético (1 M) foram adicionados às amostras para neutralização e posterior degradação do amido. A degradação do amido, ocorreu a partir da adição de 40 µL do extrato neutralizado adicionado a 60 µL do mix de degradação [59 µL de tampão acetato de sódio (50 mM, pH 4,9) + 1 µL de amilo glucosidase (170 U mL⁻¹) + 0,012 µL de α-amilase (325 U mL⁻¹)]. A reação de degradação ocorreu em *overnight* a 37 °C.

Após a etapa de degradação e a formação de resíduos de glicose a partir de amido presente nas amostras, 10 µL do extrato obtido da degradação foi adicionado em meio de reação de 200 µL [150 µL de tampão HEPES (KOH 1 M + 30 mM MgCl₂ em pH 7,0); 4,65 µL de ATP 109 mM (60 mg mL⁻¹); 4,65 µL de NADP⁺ 48,4 mM (36 mg mL⁻¹); 0,77 µL de Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH – 700 U mL⁻¹) e 40µL de H₂O ultra pura] em microplaca de 96 poços. Foi realizada a leitura das amostras em comprimento de onda de 340 nm. A cinética foi avaliada por meio da formação NADPH, devido a adição de 2 U de Hexocinase (2 U em 5 µL), sendo possível estimar o conteúdo de amido determinado como equivalentes de glicose (Hendriks *et al.*, 2003), conforme a fórmula abaixo:

$$\mu\text{mol de NADPH} = \frac{\Delta OD}{(2,85 \times 6,22)}$$

Os valores foram corrigidos de acordo com a massa inicial das amostras e os resultados expressos em mmol de equivalente glicose kg^{-1} massa seca (MS).

2.3.3. Quantificação de fumarato e malato

A concentração de fumarato e malato foi determinada em alíquotas de 10 μL do extrato metanólico que foram pipetados em microplaca contendo 80 μL do meio de reação composto por: 50 μL de tampão Tricine [10 mM] em KOH 0,2 M MgCl_2 , pH 9.0; 10 μL de brometo de metil tiazolil difenil tetrazólio (MTT) [10 mM], 2 μL de etossulfato fenazina (PES) [20 mM]; 10 μL de Triton [10%]; 10 μL dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NAD^+) [30 mM] e 3 μL de água ultrapura. Após, foi realizada a leitura da absorbância a 570 nm por 5 minutos. Posteriormente foi adicionado 1 U de malato desidrogenase (5 μL) e a absorbância foi lida até a cinética se tornar estável. Subsequente, foram adicionados 0,1 U de fumarase (5 μL) e absorbância foi lida até a estabilidade. Para a determinação de fumarato e malato foi feito uma curva de calibração utilizando fumarato e malato como padrão, em concentrações que variaram de 0 a 20 mM (Nunes-Nesi *et al.*, 2007)

2.3.4. Quantificação de aminoácidos solúveis

O conteúdo de aminoácidos solúveis totais foi realizado de acordo com Yemm et al (1955). Em uma microplaca adicionou-se 10 μL do extrato metanólico obtido + 40 μL de H_2O ultra pura, 50 μL de tampão citrato [1M] a pH 5,2 acrescidos de ácido ascórbico 0,2% (p/v) e 100 μL de ninhidrina 1% (p/v) em metanol 70% (v/v), em cada poço. As amostras foram incubadas no escuro por 20 minutos a 95 °C e, em seguida a reação foi paralisada em banho de gelo. Posteriormente, foi realizada a leitura da placa no comprimento de onda de 570 nm. Para a determinação de aminoácidos totais fez-se a curva de calibração utilizando leucina como padrão, nas concentrações de 0, 4, 8, 16, 24, 32 e 40 mM. Os resultados foram expressos $\mu\text{mol aa g}^{-1}$ de massa seca (MS).

2.3.5. Quantificação de nitrato

A determinação da concentração de nitrato (NO_3^-) foi realizada de acordo com a metodologia descrita em (Baird *et al.*, 2019). Alíquotas de 5 μL de extrato metanólico foram adicionadas em 295 μL com H_2O ultrapura e posteriormente lidas em triplicatas nos comprimentos de onda de 210, 220 e 230 nm. A partir das absorbâncias obtidas, foi calculada a segunda derivada: $[(\text{ABS}_{210} - \text{ABS}_{220}) - (\text{ABS}_{220} - \text{ABS}_{230})]$. As absorbâncias foram

comparadas à curva padrão de nitrato de potássio (KNO_3) e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ de massa seca (MS).

2.3.6. Quantificação de prolina

A determinação da concentração de prolina foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Shabnam et al (2016). Aproximadamente, 50 μL de extrato metanólico foram adicionados à 100 μL de solução ácida de ninhidrina (1,25 g de ninhidrina; 30 mL de ácido acético 17 glacial; 20 mL de ácido fosfórico 6M). As amostras foram incubadas por 60 minutos, a 95 °C e, em seguida a reação foi paralisada em banho de gelo. As amostras foram lidas no comprimento de onda de 520 nm e as absorbâncias comparadas à curva padrão de prolina (1 mM). Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ de massa seca (MS).

2.3.7. Quantificação de proteínas solúveis

Utilizou-se a técnica de Bradford (1976) para determinação dos teores de proteínas nos extratos precipitados e neutralizados com 400 μL NaOH (0,1 M). Ocorreu diluição para quantificação 1:10 do extrato bruto obtido. Foram adicionados 5 μL do extrato diluído em 45 μL de NaOH (0,1 M) e 250 μL de reagente de Bradford. Uma série de solução de albumina soro bovina (BSA) diluída com o mesmo tampão de extração serviu como padrão para quantificação das proteínas. A quantificação das proteínas foi conduzida em microplacas, em leitor (Molecular Devices, Sunny Valle, EUA) a 595 nm.

2.3.8. Quantificação de aldeído malônico (MDA)

A quantificação da peroxidação de lipídios foi estimada pela concentração de aldeído malônico (MDA), por meio de teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), segundo Heath e Packer (1968). Foram utilizados aproximadamente 30 mg de material liofilizado do eixo embrionário das sementes de soja. Extraídas com 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% p/v e centrifugadas a 13.300 rpm por 15 minutos, a 4 °C. Posteriormente o sobrenadante foi recolhido e transferido para outro microtubo. Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi adicionada em meio de reação contendo 1,5 mL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% p/v em TCA 20% p/v. Após, os tubos contendo as amostras e o meio de reação foram fechados e incubados a 95 °C por 25 minutos. Transcorrido o tempo, a reação foi paralisada em banho de gelo por 5 minutos e, em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13.300 g por 10 minutos a 4 °C. A absorbância do sobrenadante foi determinada no comprimento de ondas de 532 nm. A absorbância inespecífica foi obtida em

600 e 400 nm e subtraída das leituras a 532 nm. A concentração do complexo aldeído malônico-TBA foram calculadas utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar de 155 mM⁻¹ cm⁻¹ (Hodges *et al.*, 1999), sendo os resultados expressos em nmol MDA mg⁻¹ de massa seca (MS).

2.4. Extração e ensaios enzimáticos

Alíquotas de aproximadamente 20 mg para o ensaio da SOD e 40 mg para o ensaio da CAT, APX e POX de material liofilizado do eixo embrionário das sementes de soja.

2.4.1. Atividade dismutase do superóxido (SOD)

A extração da dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1) foi realizada a partir de 20 mg de material liofilizado do eixo embrionário das sementes de soja e homogeneizados em 200 µL do meio de reação contendo 100 mM de tampão fosfato de potássio (TFK; pH 7,8); 0,1 mM de EDTA; 0,1% (v/v) 10 mg de polivinil pirrolidona (PVP) e 20 mM de ascorbato. Após centrifugação a 13.300 rpm, por 15 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi coletado para as análises posteriores.

A atividade da SOD foi determinada segundo Giannopolitis e Ries (1977). O meio de reação foi constituído de: 52,5 mM de TFK (pH 7,8); 0,1 µM de EDTA; 13 mM de metionina (pH 7,8); 2 µM de riboflavina; 0,075 mM de azul de nitro tetrazólio (NBT) e uma alíquota de 15 µL do extrato enzimático. A produção de formazana azul proveniente da redução do NBT em presença de luz é máxima na ausência da enzima e foi acompanhada em um espectrofotômetro, monitorando-se o incremento na ABS a 560 nm. A atividade da SOD está relacionada à capacidade da enzima presente no extrato em inibir a produção de formazana azul. Os resultados foram expressos em unidades de SOD mg⁻¹ proteína, considerando-se que uma unidade de SOD é a quantidade de enzima requerida capaz de reduzir em 50% a produção de formazana azul.

2.4.2. Atividade peroxidase do ascorbato (APX), catalase (CAT) e peroxidase (POX)

A peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11), catalase (CAT, EC 1.11.1.6) e peroxidase (POX, 1.11.1.7) foram extraídas a partir de 40 mg de material liofilizado do eixo embrionário das plântulas de soja e homogeneizadas com 1000 µL do meio de extração contendo 50 mM de tampão fosfato de potássio - TFK (pH 7,0); 2 mM de EDTA; 20 mM de ascorbato e 30 mg de PVP. Após centrifugação a 13.300 rpm, por 15 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi coletado para as análises enzimáticas.

A atividade da APX foi acompanhada pelo decréscimo da ABS a 290 nm em meio de reação contendo TFK 50 mM (pH 7,0); 0,1 mM de H₂O₂; 0,5 mM de ascorbato e 50 µL do extrato enzimático (Nakano and Asada, 1981). Para os cálculos, 1 unidade de APX é a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 µmol de ascorbato min⁻¹.

O meio de reação da CAT foi com 50 mM de TFK (pH 7,0) e H₂O₂ 12,5 mM; e a reação foi iniciada pela adição de 30 µL de extrato. A atividade da CAT foi determinada pelo monitoramento do decréscimo da ABS a 240 nm (Havir and McHale, 1987) e para os cálculos foi considerado que 1 unidade de CAT é a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 µmol de H₂O₂ min⁻¹.

A atividade da POX foi estimada a partir da adição de 50 µL do extrato enzimático bruto, a meio de reação contendo TFK 25 mM (pH 6,8), 20 mM de pirogalol e 20 mM de H₂O₂. A atividade catalítica da enzima foi observada pela produção de purpurogalina e através do aumento da absorbância a 420 nm a 25 °C. O coeficiente de extinção molar de 2,47 M⁻¹ cm⁻¹ foi utilizado para estimar a atividade e o resultado expresso foi em unidade de POX mg⁻¹ de proteína (Kar and Mishra, 1976; Maehly, 2006). A determinação de proteínas utilizadas para estimativa da atividade enzimática da APX, CAT e POX foi realizada de acordo com Bradford (1976).

2.5. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado no experimento foi o inteiramente casualizado. A unidade experimental dos experimentos de germinação, metabólitos primários e atividade enzimática foram compostas por cinco repetições com 50 sementes para cada genótipo e tratamento. Para avaliação de desempenho das sementes via análise de imagens foram utilizadas cinco repetições com 20 semente para cada genótipo. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e posteriormente as diferenças entre as médias foram examinadas pelo teste *t*. Todos os dados foram analisados no *software* R x 64 3.5.3 (R Core Team, 2019).

3. RESULTADOS

O AI reduziu a germinação das sementes e o índice de vigor das plântulas de soja em todos os genótipos avaliados (Figura 1. A, B). O efeito máximo observado na inibição da germinação das sementes foi no genótipo AS3680, que apresentou redução significativa de 90% para 64%, diminuição de 37,5%, em comparação aos tratamentos controle e presença de AI (Figura 1. A). Além de apresentar significativa redução para o índice de vigor, variando de 483 para 303 (Figura 1. B). O NEO610 apresentou redução de 91% para 82% quando exposto ao AI (Figura 1. A) e valor não significativo para o índice de vigor (Figura 1. B), sendo o genótipo que apresentou menor para redução dos parâmetros avaliados na presença do AI.

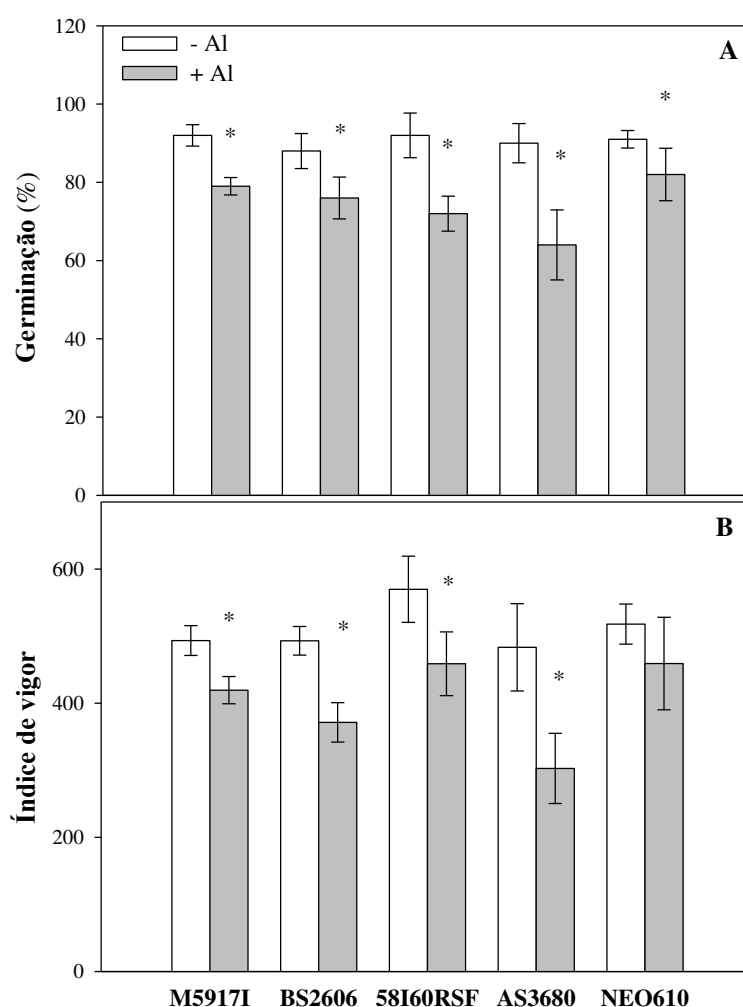


Figura 1: Efeito do AI na germinação de sementes (A) e no índice de vigor (B) de plântulas de soja. O asterisco representa diferença estatística entre os tratamentos para cada genótipo, em nível de 5% pelo teste t de *Student*. Médias de 5 repetições e desvio padrão.

Como consequência da exposição ao AI, é possível observar variação significativa no crescimento e estabelecimento das plântulas de soja (Figura 2. A-D). Na figura 2 A e 2D, os

genótipos BS2606 e AS3680, apresentam redução no crescimento da radícula e no crescimento total.

Nas figuras 2 B, 2 C e 2 D podemos observar redução no comprimento do hipocótilo, da radícula e no comprimento total das plântulas dos genótipos M5917I, BS2606, 58I60RSF, AS3680 e NEO610. Por sua vez, o Al também reduziu significativamente a biomassa, o crescimento e uniformidade das plântulas durante o processo de germinação (Figura 2. E-G). Na figura 2 E podemos observar redução na massa fresca de quase todos os genótipos de soja sob condições de estresse. Somente o genótipo NEO610 não apresentou variação. O mesmo fato é observado nas figuras 2 F e 2 G para o crescimento e uniformidade das plântulas avaliadas.

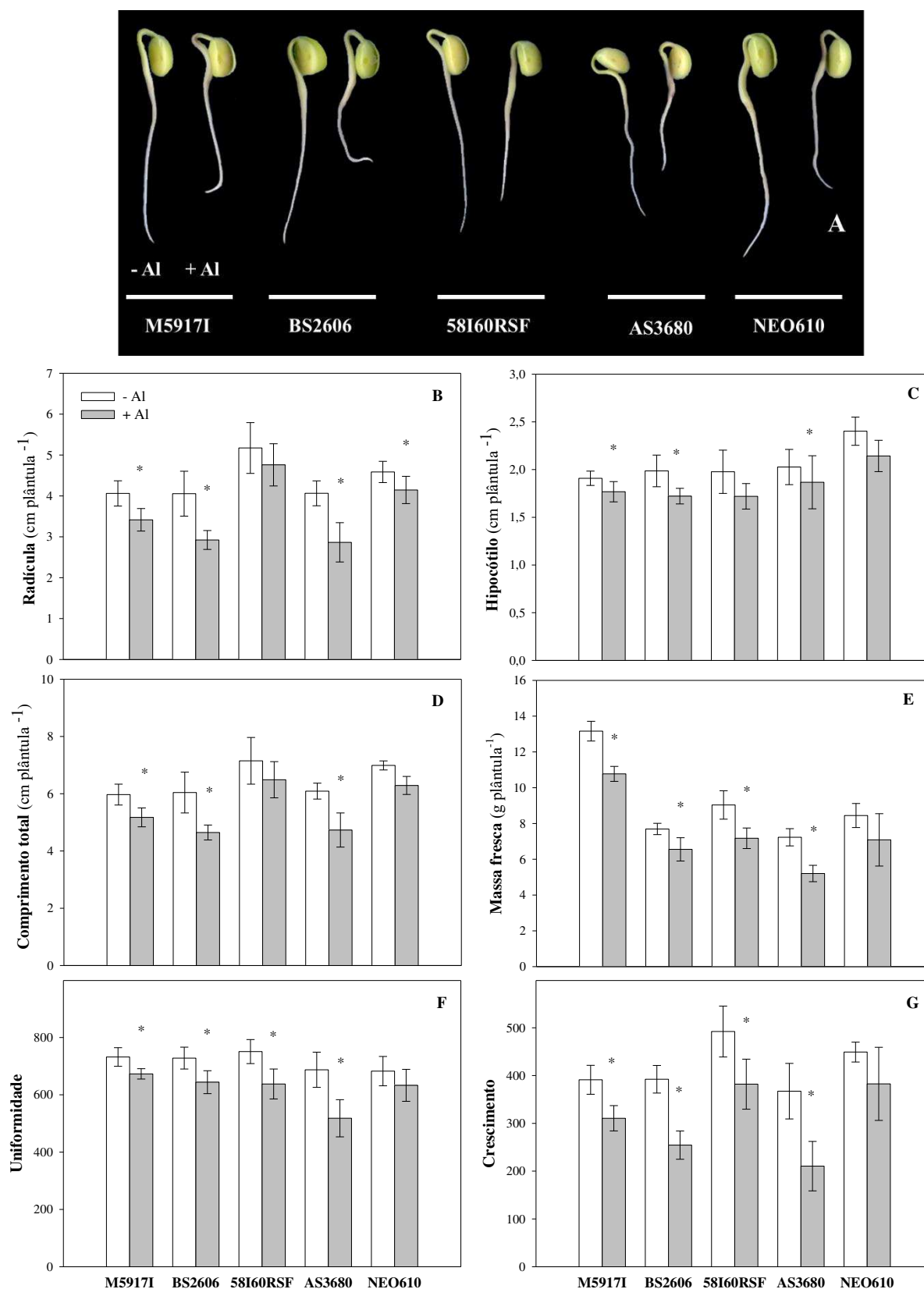


Figura 2: Análise de crescimento de plântulas dos cinco genótipos de soja. Alterações fenotípicas de plântulas sob efeito do Al (A), comprimento da radícula (B), comprimento do hipocótilo (C), comprimento total (D), massa fresca de plântulas (g plântula⁻¹) (E), uniformidade (F) e crescimento (G). As médias de 100 plântulas avaliadas no terceiro dia após a germinação. O asterisco representa diferença estatística entre os tratamentos para cada genótipo, em nível de 5% pelo teste t de *Student*. Médias de 5 repetições e desvio padrão.

O crescimento (Figura 2. G) e a uniformidade (Figura 2. F) inicial das plântulas foram comprometidos quando as sementes dos diferentes genótipos foram semeadas em ambiente desfavorável ao processo germinativo, na presença do Al. Neste argumento, foram observadas variações no conteúdo de carboidratos e amido do eixo embrionário das plântulas em resposta ao Al (Figura 3).

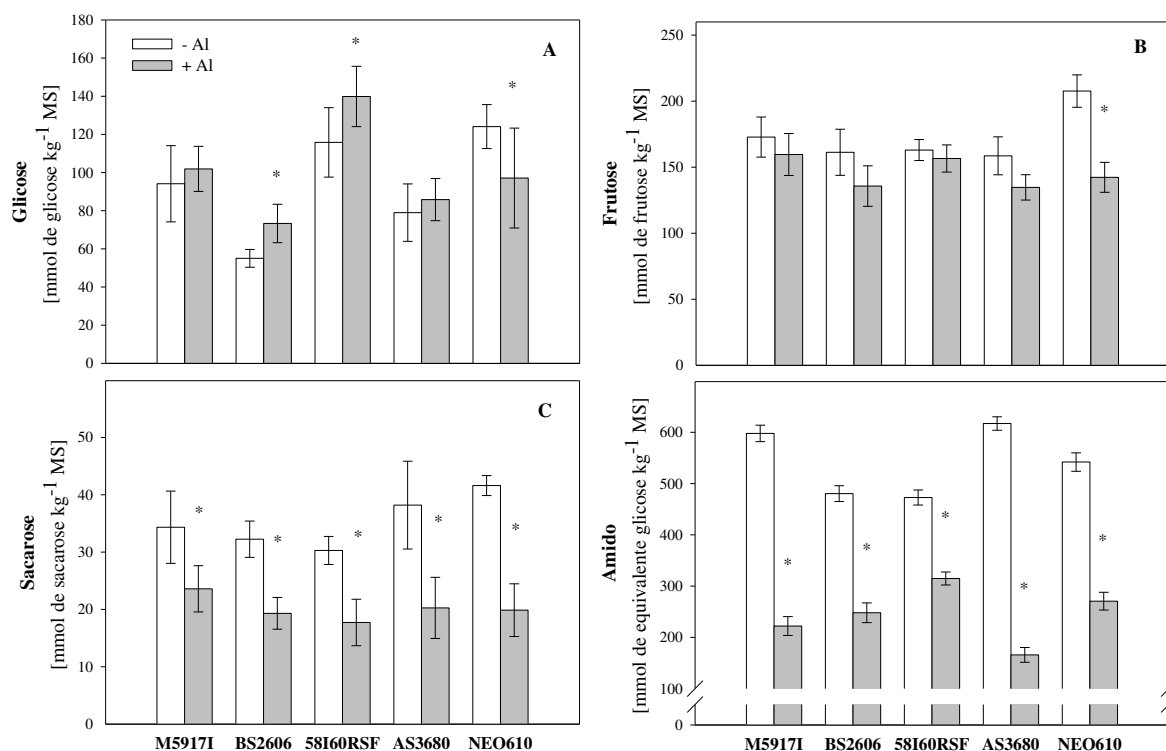


Figura 3: Alteração no conteúdo de carboidratos e amido em plântulas de soja sob efeito do Al. Glicose (A), frutose (B), sacarose (C) e amido (D). O asterisco representa diferença estatística entre os tratamentos para cada genótipo, em nível de 5% pelo teste t de *Student*. Médias de 5 repetições e desvio padrão.

Os conteúdos de glicose, frutose, sacarose e amido (Figura 3. A-D) reduziram no genótipo NEO610 tratado com Al, porém não ocorreu redução nas características de plântulas avaliadas anteriormente (Figuras 1 e 2,). Ao observar os genótipos 58I60RSF e BS2606 com aumento, respectivo, de 20,79% e 33,21% do teor de glicose dos eixos embrionário das plântulas quando tratadas com Al em relação ao controle. Na figura 3 B, podemos observar redução significativa no teor de frutose apenas para o genótipo NEO610. O teor de sacarose e amido reduziu para todos os genótipos semeados na presença do Al (Figura 3. C e 3. D). A redução no teor de sacarose e amido, respectivamente, para cada genótipo avaliado foi de aproximadamente 31,3% e 62,9% para M5917I , 40,1% e 48,4% para BS2606, 41,5% e

33,42% para 58I60RSF, 47% e 73,13% para AS3680 e 52,23% e 50,1% para o genótipo NEO610.

Para compreender melhor as respostas do Al na interferência do processo germinativo dos diferentes genótipos de soja e o papel dos ácidos orgânicos como “complexadores” de Al, foi necessária investigar as influências do Al no metabolismo dos ácidos orgânicos (Figura 4). Devido às alterações no conteúdo de açúcares (Figura 3), decidiu-se estimar e analisar dois importantes ácidos orgânicos (AO) centrais para o metabolismo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), fumarato e malato (Figura 4. A e 4. B).

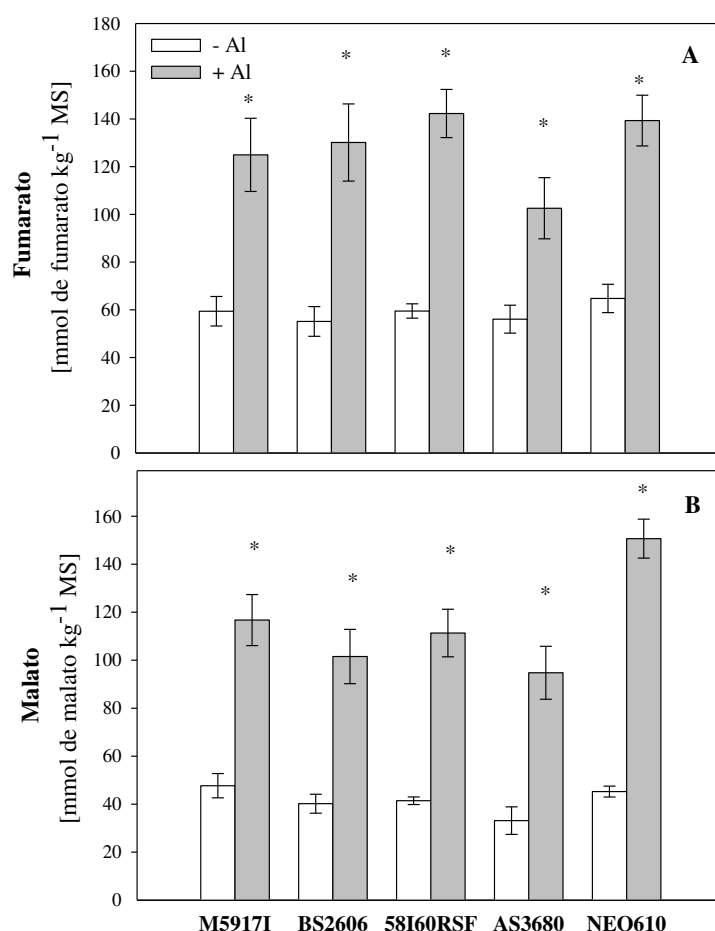


Figura 4: Conteúdo de ácidos orgânicos (AOs) em plântulas de soja sob efeito do Al. Concentração de fumarato (A) e malato (B). O asterisco representa diferença estatística entre os tratamentos para cada genótipo, em nível de 5% pelo teste t de *Student*. Médias de 5 repetições e desvio padrão.

Como observado na figura 4 A, todos os cinco genótipos evidenciaram aumento nos níveis de fumarato (Figura 4. A). Notavelmente, os genótipos BS2606 e 58I60RSF na presença do Al apresentaram aumento significativo no conteúdo de fumarato de 136% e 139%, respectivamente, em comparação ao tratamento sem a presença de Al. Seguindo o

mesmo comportamento, em condições de estresse por Al, os genótipos M5917I e NEO610 apresentaram valores duas vezes maiores que o conteúdo de fumarato das plântulas controle. AS3680 foi o genótipo que apresentou menor valor para o aumento no conteúdo de fumarato, porém o valor obtido de 82,9% no teor de fumarato em relação ao controle foi significativo. O aumento significativo no teor de malato para os genótipos submetidos ao Al também é observado na figura 4 B. Contudo, os níveis elevados de malato, três vezes maior do que a concentração das plântulas no tratamento controle, indicam que o alumínio afeta exponencialmente o metabolismo desses ácidos orgânicos nos diferentes genótipos de soja estudados.

Os metabólitos que apresentam nitrogênio na sua constituição, como proteínas solúveis totais, aminoácidos totais, prolina e o íon nitrato, foram estimados nas plântulas de soja (Figura 5). O estresse por Al alterou o conteúdo de proteína de todos os genótipos avaliados (Figura 5. A) sendo que o genótipo 58160RSF apresentou aumento de 29%, seguido de 26% do BS2606, 24,6% do AS3680, 21% do NEO610 e por fim aumento de 15% no teor de proteína para o genótipo M5917I. Além disso, houve alteração no conteúdo de aminoácidos totais (Figura 5. B) para os genótipos M5917I e 58160RSF avaliados sob efeito do alumínio.

Na exposição ao Al, todos os genótipos apresentaram aumento significativo na concentração de prolina (Figura 5. C), em comparação ao observado para as plântulas do tratamento controle. Os valores observados sob efeito do Al ultrapassam o dobro da quantidade de prolina no tratamento controle. O teor de nitrato teve comportamento parecido ao conteúdo de prolina (Figura 5. D). No entanto, apenas o genótipo NEO610 apresentou aumento no teor do nitrato das plântulas tratadas com Al e as plântulas do controle. O efeito da toxicidade do Al, causou aumento na concentração de prolina e de nitrato do genótipo 58160RSF, aumentando em média 2,51 μmol prolina g^{-1} de massa seca e 0,5513 μmol nitrato g^{-1} de massa seca em relação à média obtida no tratamento controle, respectivamente.

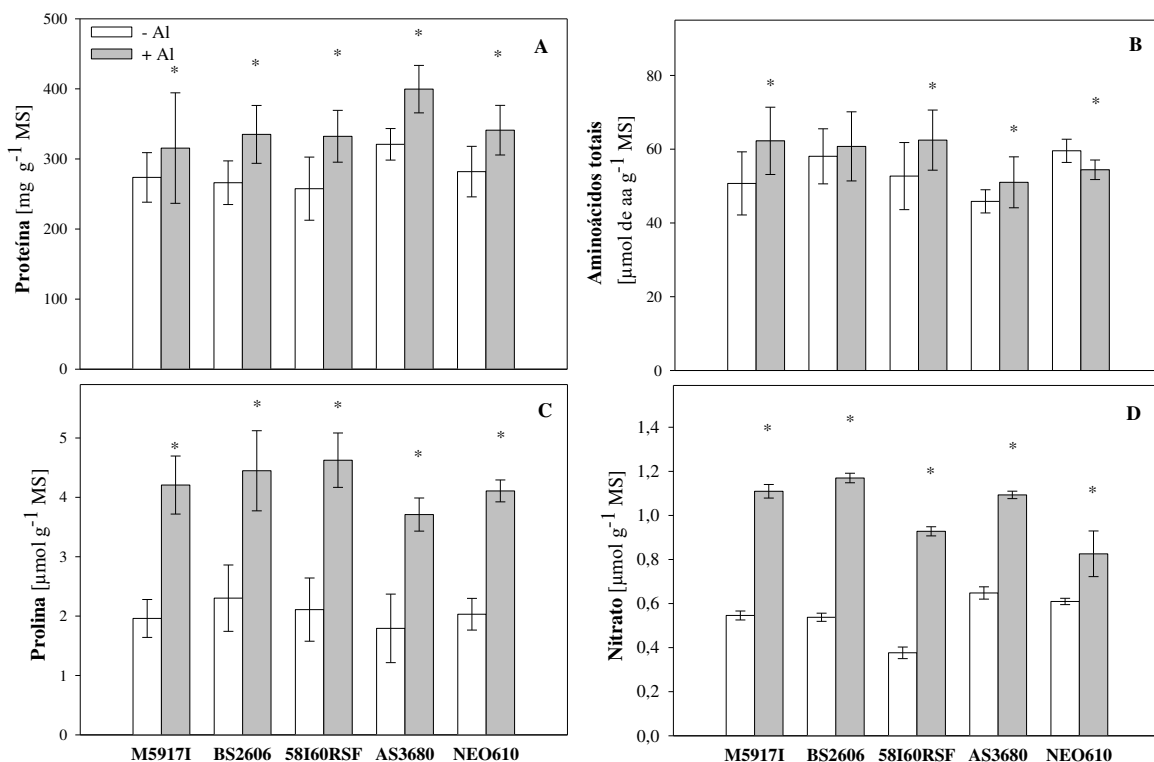


Figura 5: Proteína (A), aminoácidos totais (B), prolina (C) e nitrato (D) em plântulas de *soja* sob efeito do Al. O asterisco representa diferença estatística entre os tratamentos para cada genótipo, em nível de 5% pelo teste t de *Student*. Médias de 5 repetições e desvio padrão.

A oxidação das membranas e compostos celulares, bem como, reprogramação do metabolismo é uma importante ação para mitigar o efeito deletério causado pelo Al, sendo necessário estimar a quantidade de um dos subprodutos da peroxidação de lipídios, o aldeído malônico (MDA), além de estimar a atividade enzimática do sistema antioxidativo celular, tais como: dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e peroxidase (POX) (Figura 6).

Aparentemente existe pouca variação na concentração de aldeído malônico (MDA) nas plântulas controle dos diferentes genótipos (Figura 6. A). No entanto, ao comparar cada genótipo em relação aos tratamentos utilizados, observa-se que o Al provocou danos devido ao aumento dos compostos lipídicos de membrana celulares dos genótipos, com exceção do genótipo AS3680. A saber, os genótipos 58I60RSF e NEO610 aumentaram em 25,8% e 28%, respectivamente, o conteúdo de MDA no eixo embrionário das plântulas que foram submetidas ao tratamento em presença do Al. Os genótipos M5917I e BS2606 obtiveram valores acima da média quando comparados com o tratameto controle para cada genótipo de 16% e 15,5%, respectivamente.

Houve aumento significativo para atividade da SOD (Figura 6. B) apenas no genótipo AS3680, quando as sementes destes foram submetidas ao processo de germinação na presença de Al, o aumento foi de 22% em relação a condição controle. A atividade catalítica da CAT (Figura 6. C) foi estimulada positivamente devido ao tratamento com Al apenas para os genótipos M5917I, 58I60RSF e NEO610, com aumento de 11,7 U, 12,33 U e 19 U mg⁻¹ de proteína, respectivamente, em relação ao tratamento controle.

Na figura 6 D, é possível observar a redução na atividade catalítica da APX devido ao tratamento com Al. Foram obtidas diferenças significativas na redução da atividade para os genótipos M5917I, BS2606, AS3680 e o NEO610. No entanto, para atividade da peroxidase (POX), observa-se aumento significativo na sua atuação para todos os genótipos avaliados sob Al (Figura 6. E). O genótipo sob efeito do Al que apresentou aumento na atividade catalítica da POX foi o BS2606, de 156, 74 U de POX mg⁻¹ proteína em relação ao tratamento controle (Figura 6. E). O genótipo NEO610, também sob efeito do Al, apresentou aumento de apenas 62,53 U de POX mg⁻¹ proteína. Os demais genótipos tiveram alteração na atividade da POX, porém os valores da atividade catalítica foram intermediários aos genótipos BS2606 e NEO610.

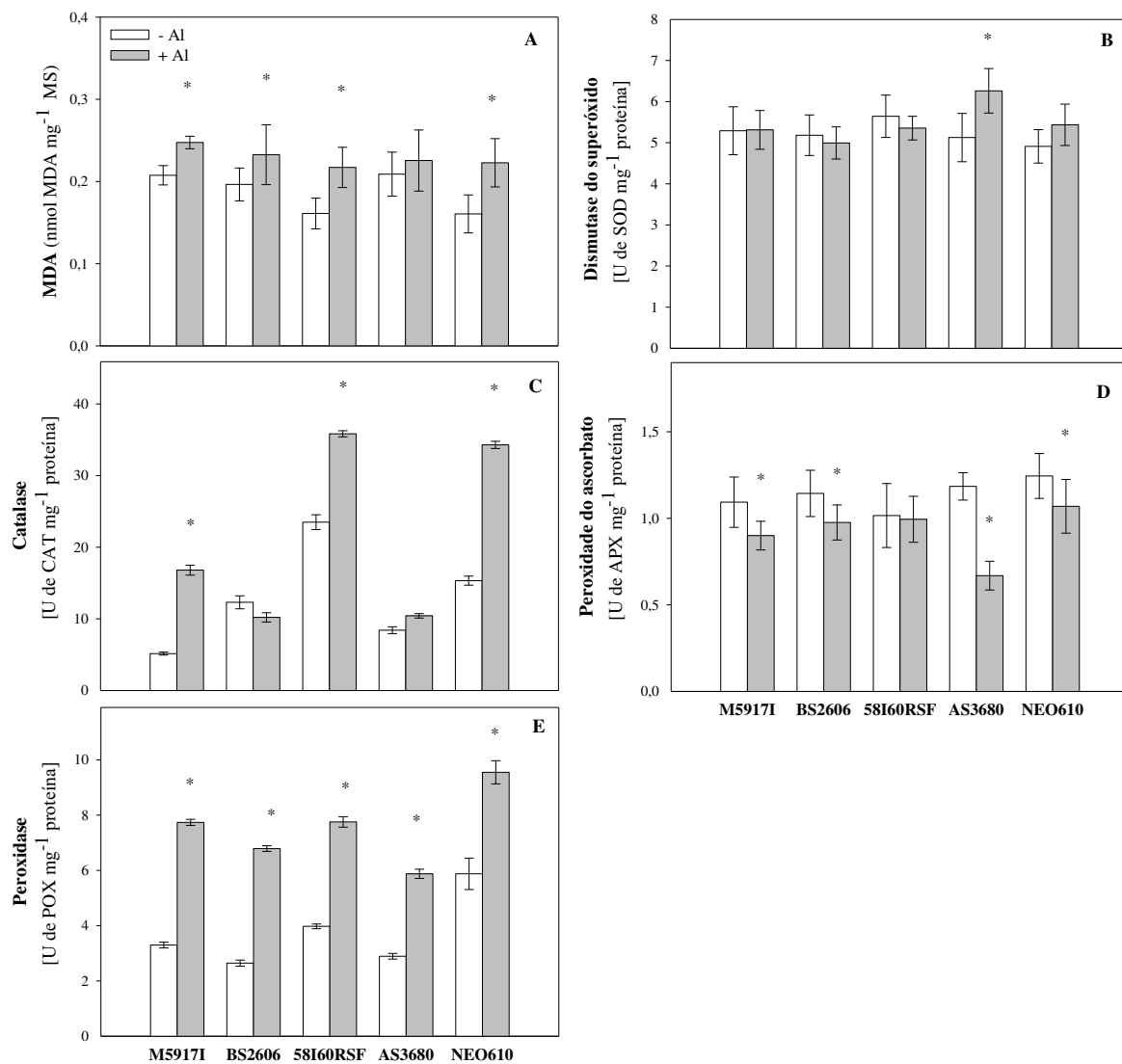


Figura 6. Concentração de MDA (A), atividade enzimática da SOD (B), CAT (C), APX (D) e POX (E) em plântulas de soja sob efeito do Al. O asterisco representa diferença estatística entre os tratamentos para cada genótipo, em nível de 5% pelo teste t de *Student*. Médias de 5 repetições e desvio padrão.

4. DISCUSSÃO

A fitotoxicidade provocada pela presença do Al reduziu a germinação e comprometeu o crescimento da plântula (Figura 1), provocando redução no crescimento da radícula (Figura 2. A) e do hipocótilo (Figura 2. B). O efeito do alumínio foi capaz de provocar redução da biomassa e do estabelecimento da plântula (Figura 2. E, F e G). Todos os genótipos utilizados apresentaram valores de germinação acima de 80% no tratamento controle, o que atende o padrão para comercialização de sementes no Brasil. No entanto, ao avaliar os genótipos submetidos à condição de estresse por Al, identificamos redução significativa da germinação e no crescimento da plântula (Figura 1. A e B).

Acredita-se que o Al seja um dos principais fatores limitantes para produção agrícola nacional. Em média, o prejuízo causado pelo estresse provocado pelo Al é de 5 % da produção (Bojórquez-Quintal *et al.*, 2017). Ressalta-se que existem cultivares de soja que são sensíveis e tolerantes a condição de estresse por Al, além de demonstrar alterações fenotípicas e metabólicas completamente distintas (Menosso *et al.*, 2001). Sob elevadas concentrações de Al, o processo germinativo fica comprometido e, conseqüentemente, o crescimento e desenvolvimento das plântulas, como observado para *Glycine max* (Custódio *et al.*, 2002), *Oryza sativa* (Kazue Silva, 2007), *Jatropha curcas* (Gordin *et al.*, 2013), *Conyza canadenses* e *Conyza bonariensis* (Yamashita *et al.*, 2011).

Na presença do Al, a germinação, o crescimento inicial e o crescimento da radícula das plântulas foram afetados (Figura 2. B, C e D). Os genótipos M5917I, BS2606 e AS3680 apresentaram reduções significativas no comprimento do hipocótilo e da radícula, devido aos efeitos do Al que age na inibição do crescimento radicular e impede a absorção da água no substrato utilizado. Outros mecanismos importantes são descritos como o efeito do Al na parede celular, comprometimento da divisão celular e no alongamento das células da radícula (Kochian *et al.*, 2004).

Elevadas concentrações de Al, além de promoverem a fitotoxidez, para maioria das plantas, afetam a absorção e transporte de água e nutrientes essenciais (quando a planta é fotossinteticamente independente) gerando severas alterações celulares. O processo de divisão celular, bem como o alongamento das células da raiz resultam em menor crescimento que podem ser influenciadas por outros tipos de estresse, como a deficiência hídrica, afetando significativamente a produtividade das plantas em solos ácidos, inviabilizando o cultivo nessas áreas (Mascarenhas *et al.*, 1984; Hartwig *et al.*, 2007).

A quantidade de biomassa dos genótipos avaliados foi reduzida na presença do Al (Figura 2. E). A expressiva redução da biomassa dos genótipos de soja está associada a

redução nos conteúdos de sacarose e amido (Figura 3). Além disso, a presença do Al provocou aumento dos níveis de fumarato e malato (Figura 4), aumento no conteúdo de proteína, aminoácidos totais, prolina e nitrato (Figura 5). Aparentemente esses resultados demonstram que o Al é capaz de desacoplar o metabolismo primário durante o processo de germinação e crescimento das plântulas como uma forma de mitigar os efeitos deletérios do Al. A ocorrência de estresse abiótico promove alteração no processo de germinação, bem como no metabolismo inicial do crescimento da planta (Obata and Fernie, 2012; de Oliveira Pires *et al.*, 2016), conforme observado no presente trabalho.

Os açúcares solúveis, principais metabólitos que atuam no suprimento de carboidratos para o crescimento (Rosa *et al.*, 2009; Gangola and Ramadoss, 2018), são altamente sensíveis ao estresse abiótico. Nesse estudo, os genótipos na presença de Al apresentaram variação no conteúdo de glicose, com redução de 22,1% para o genótipo NEO610 e aumento de 12,3% para o genótipo 58I60RSF em relação ao controle. O consumo elevado do sacarose (Figura 3. C) e da amido (Figura 3. D) para formação de glicose e frutose estão ocorrendo, provavelmente, devido a atividade respiratória da via glicolítica para formação de piruvato e, consequente, manutenção do TCA, conforme observado no aumento no conteúdo de malato e fumarato (Figura 3). De maneira indiferente, o conteúdo de frutose foi afetado negativamente apenas no genótipo NEO610 em resposta ao tratamento com Al. O conteúdo de sacarose foi reduzido em resposta ao Al para todos os genótipos avaliados.

Moreno-Alvarado *et al* (2017) propôs que os açúcares solúveis podem ser uma possível resposta à tolerância ao Al em *Oryza sativa*. O conteúdo de frutose parece não está associado a uma possível resposta ao estresse por Al, uma vez que, foi encontrada apenas variação significativa para o NEO610 (Figura 4. B). Sulpice (2009) observou em *Arabidopsis* que existe estreita relação com a redução do uso de carbono com o acúmulo de amido e consequente ganho de biomassa, mas o fenômeno foi observado em plantas fotossinteticamente ativas e os nossos resultados na figura 2 E, para massa fresca, apresenta redução na massa das plântulas.

Foram observados aumentos no conteúdo dos AO em plântulas de soja devido ao tratamento com Al (Figura 4). O nível de fumarato (Figura 5. A) foi maior quando os diferentes genótipos foram submetidos aos estresse por Al, variando de 82,9 a 139,05 mmol de fumarato kg⁻¹ de massa seca em relação ao tratamento controle. O aumento na concentração de malato durante a germinação das sementes semeadas em meio contendo Al (Figura 5. B) pode ser explicado por um possível aumento da operação do ciclo dos ácidos

tricarboxílicos (TCA) ou de reações biossintéticas dos amianoácidos (Ishizaki *et al.*, 2006; Araújo *et al.*, 2010).

Zhou (2018b) destaca que muitos desses exsudados constituintes são essenciais para manutenção do potencial osmótico interno, um dos principais fatores responsável pela absorção de água pelas sementes. Ainda, pela manutenção do turgor celular necessário para protrusão da raiz primária e a liberação de exsudados para o meio externo, que contribui para complexar os íons tóxicos, no caso o Al é quelatado pela exsudação de ácidos orgânicos (*e.g.* malato e fumarato). Neste sentido, foram observados em sementes de *Erythrina speciosa* e *Eugenia brasiliensis* efeitos tóxicos do Al no processo de germinação. As sementes foram embebidas com solução de cloreto de alumínio (AlCl_3 a partir de pH 3,5), sendo possível evidenciar que os efeitos fitotóxicos do Al ocorrem a partir de pH 3,5, além de destacar que os efeitos a esse metal pesado ocorrem durante a fase de embebição do processo germinativo (Koszo *et al.*, 2007).

Embora ocorram diferenças significativas nos níveis de aminoácidos totais (Figura 6. B) para os genótipos BS2606 e 58I60RSF, os níveis de sacarose e amido foram reduzidos, o que pode está diretamente relacionado com o aumento de fumarato e malato desses genótipos sob efeito do Al. A variação nos níveis de fumarato e malato estão diretamente relacionados a resposta do metabolismo dos genótipos de soja devido a presença do Al. À exsudação ou a complexação no citoplasma de AOs com Al, como mecanismo de tolerância, representa um gasto significativo de compostos de carbono para mitigar os impactos deletérios do estresse provocado pelo Al na rizosfera ou no interior das células da raiz (Ma *et al.*, 2001; Kochian *et al.*, 2015). Além disso, novas evidências foram adicionadas de que o GmME1 pode funcionar em vias anapleróticas para suprir o ciclo do TCA, fato esse ocorreu em *G. max* sob efeito do Al (Zhou *et al.*, 2018a).

Em resposta ao Al, foi possível observar um padrão claro das alterações dos compostos nitrogenados (N), incluindo proteínas totais, aminoácidos totais, conteúdo de prolina e de nitrato (Figura 5). Podemos afirmar que a concentração de Al utilizado neste estudo é capaz de promover aumento no conteúdo de proteínas totais (Figura 5. A). No entanto, não é possível observar um aumento significativo dos aminoácidos totais para todos os genótipos sob efeito do Al. Apenas os genótipos M5917I e 5858I60RSF apresentaram aumento no conteúdo de aminoácidos (Figura 5. B). O aumento observado de aminoácidos não parece está associado a maior degradação de proteínas, pois essa associação parece estar relacionada a uma interconversão de aminoácidos induzido pela presença de Al, agindo provavelmente como um sinal de inanição por carboidratos (Hildebrandt, 2018).

Vários estudos relacionam o aumento de carboidratos e/ou de aminoácidos nas raízes como mecanismo fisiológico inespecífico ligado à provável tolerância ao Al em *Oryza sativa*, *Zea mays* e *Sorghum bicolor* (Cambria *et al.*, 1983; Khan *et al.*, 2000; Moreno-Alvarado *et al.*, 2017). Em parte, não se pode relacionar com os estudos anteriores realizados com os níveis metabólicos encontrados para os diferentes genótipos soja nesse estudo, uma vez que, os diferentes genótipos de soja apresentam redução para os carboidratos solúveis (glicose, frutose, sacarose) e amido, apresentando aumento somente para o teor de aminoácidos totais (Figura 5. B). Os resultados até aqui apresentados evidenciam que é necessário um trabalho minucioso para alcançar o entendimento mecanístico da tolerância ao Al em plantas de soja.

Para concentração de prolina, observou-se aumento significativo no presente estudo (Figura 6. C). Devido à presença de Al, os genótipos M5917I, BS2606, 58I60RSF, AS3680 e NEO610 apresentaram aumento de 114,5%; 93,17%; 119,22%; 106,86% e 102,19%, respectivamente, em relação às plântulas do tratamento controle. O aumento de prolina livre foi relacionado à tolerância ao Al em plantas de *Zea mays* (Khan *et al.*, 2000; Giannakoula *et al.*, 2008) e *Lactuca sativa* (Silva and Matos, 2016). O aumento no conteúdo de prolina pode sugerir que o mecanismo responsivo ao efeito do Al nos genótipos de soja pode ser eficiente em controlar as alterações metabólicas sob o estresse (Talebi *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2015), além da função osmoreguladora, também é relacionada a proteção das estruturas celulares (Silva e Matos, 2016). Na figura 3 D, podemos observar aumento significativo para quase todos os genótipos. Apenas o genótipo NEO610 não apresentou diferenças significativas. Em situação de estresse abiótico, o NO_3^- desenvolveu alteração no metabolismo do nitrogênio e no metabolismo iônico de *Oryza sativa* (Wang *et al.*, 2012b).

O estresse abiótico, na sua grande maioria, induz danos oxidativos e, consequentemente, perda de vigor da semente devido à associação direta com aumento da produção de EROs (Bailly, 2004; Deng *et al.*, 2017). Na figura 6 A, podemos observar variação na concentração de MDA, um produto secundário da peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados (Ilangoan *et al.*, 2006) devido à oxidação dos lipídios de membrana pelas EROs. Nesse caso, a peroxidação lipídica induz o aumento da permeabilidade das membranas, acarretando perda de eletrólitos e funções celulares.

As plântulas sob efeito do Al dos diferentes genótipos apresentaram aumento no conteúdo de MDA comparado com o tratamento controle (Figura 6. A). Isso indica que sob influência do Al ocorre aumento na concentração de MDA, pois em contato com interior da célula, o Al compromete a atividade das membranas celulares das organelas (*e.g.* mitocôndria e vacúolo) (Parkhey *et al.*, 2012). Quando ocorre alteração na função da membrana celular

promovida na presença do Al, há extravasamento do conteúdo intracelular (Hernández-Barrera *et al.*, 2015).

O efeito do Al avaliado em plântulas de soja provocou alteração na atividade catalítica das enzimas antioxidantes (SOD, CAT, APX e POX, Figura 6. B, 6. C, 6. D, 6. E, respectivamente). Para atividade da dismutase do superóxido (SOD), apenas o genótipo AS3680 apresentou aumento devido a presença de Al (Figura 7. B). A SOD é considerada por muitos autores como a primeira linha defensiva contra EROS, originadas de situações de estresse (Carvalho *et al.*, 2013; Gill *et al.*, 2015). O aumento da atividade da SOD está associado a “dismutação” do radical superóxido ($^{\bullet}\text{O}_2^-$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o que previne o conteúdo celular de oxidação intensa provocada por EROs (Cheng and Song, 2008; Sahu *et al.*, 2017a).

A atividade catalítica da catalase (CAT, figura 6 C), converte o H_2O_2 em H_2O e O_2 , prevenindo a possível interferência do peróxido de hidrogênio no conteúdo celular (Muniz *et al.*, 2007). Os genótipos M5917I, 58I60RSF e NEO610 tiveram aumento de 126%, 52% e 123%, respectivamente, na atividade da CAT. Foi observado por Sharma (2018) que a atividade da SOD e CAT diminui em sementes de *Vigna radiata* em condições de deterioração controlada, quando há formação de EROs. Para atividade da ascorbato peroxidase (APX, figura 6. D), houve redução significativa em todos os genótipos submetidos à presença de Al, principalmente no genótipo AS3680 que foi de 5,15 U de APX mg^{-1} de proteína em relação ao controle. A APX catalisa o H_2O_2 formando H_2O e, é considerada como promotora da homeostase celular reduzindo a concentração de H_2O_2 e apresenta ação sinalizadora (Asada, 1992; Bailly, 2004).

Na figura 6 E podemos observar aumento significativo na atividade da peroxidase (POX) em plântulas de soja sob efeito de Al. O genótipo que apresentou maior atividade da POX foi o BS2606, aumento de 156% em relação ao controle. A POX, assim como APX, pertencem ao grupo de enzimas peroxidases que atuam na neutralização do H_2O_2 , o qual participa de vários processos fisiológicos (Smirnoff, 2018). Essas enzimas utilizam o H_2O_2 como receptores de elétrons e competem pelo mesmo sítio catalítico, o que demonstra que possuem ação conjunta (Bae *et al.*, 2016; Smirnoff, 2018). As EROs são presentes no metabolismo celular, mas quando estão em desequilíbrio por fatores endógenos ou exógenos podem provocar redução da germinação, vigor e o estabelecimento da plântula (Kibinza *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012a; Sahu *et al.*, 2017b).

De maneira geral, é possível observar que existe o estresse oxidativo instalado nas plântulas sob efeito do Al, devido a alteração no conteúdo de MDA (Figura 6. A), alteração

na atividade de enzimas antioxidativas (Figura 6. C, 6. D e 6. E). Sementes de *G. max* e outras oleaginosas quando submetidas a estresse abiótico apresentam acúmulo de H_2O_2 , resultando na perda da viabilidade e do vigor (Sharma *et al.*, 2018). Entre os principais efeitos deletérios provocados pelo excesso de EROs, devido à presença de Al, em sementes, podemos destacar a oxidação de lipídios de membrana, carboidrato, proteínas e ácidos nucleicos (Yin *et al.*, 2015; Chmielowska-Bąk *et al.*, 2015; Bojórquez-Quintal *et al.*, 2017), os quais corroboram com os resultados encontrados na nossa pesquisa, já que ocorreu redução da biomassa (Figura 2. E) e alteração no conteúdo dos açúcares solúveis e amido (Figura 3).

Kranner *et al* (2010) avaliaram as características do aumento de EROS na germinação e desenvolvimento de plântulas de *Pisum sativum*, os resultados observados foram a redução do alongamento radicular, bem como, o aumento da concentração de EROS. Este último pode se relacionar com o aumento da atividade das peroxidases apresentado nos genótipos de soja avaliado, embora o Al tenha estimulado efeitos na atividade da SOD, CAT, APX e POX, essas variações não foram eficientes em controlar as EROs intracelulares, o que possibilitou aumento na concentração de MDA.

Do exposto, a seleção de genótipos com características bioquímicas necessárias para suportarem o efeito deletério causado pelo Al ao metabolismo celular vem sendo considerada uma promotora alternativa. Com isso, pode haver aumento da produção e expansão da fronteira agrícola em solos ácidos que apresente elevadas concentrações de Al. As práticas agrícolas envolvendo diferentes métodos estão sendo empregadas no manejo cultural, em solução nutritiva e na seleção de sementes e plântulas que apresente as características desejadas (Sánchez-Chacón *et al.*, 2000). Tais estratégias são consideradas indispensáveis para programas de melhoramento genético que objetivem a identificação de plantas mais produtivas e com maior adaptabilidade a condição de estresse. Ressalta-se que, as constituições genotípicas superiores proporcionam melhor ajuste a condições nutricionais diversas que podem mitigar os problemas da produtividade em solos ácidos devido à presença de Al (Sánchez-Chacón *et al.*, 2000; De Freitas *et al.*, 2006).

As 23 características avaliadas nos cinco genótipos estudados, podemos destacar a importância do aumento do conteúdo dos ácidos orgânicos (fumarato e malato), redução do conteúdo de amido, sacarose e, consequente, redução do crescimento total das plântulas de soja sob efeito do Al. O aumento no conteúdo de prolina e do nitrato para os indica importante regulação no metabolismo do nitrogênio. O aumento da concentração de MDA e da atividade catalítica da CAT e POX que sob efeito do Al, ocorre estresse oxidativo, bem

como, a regulação dessas enzimas para mitigar o efeito deletério causado por esse metal pesado. Devido à proximidade genética dos genótipos, é possível inferir que este grupo apresenta nível de sensibilidade à exposição por Al, sendo o mais sensível AS3680, com sensibilidade intermediária: M59I7I, BS2606 e menos sensível os genótipos 58I60RSF e NEO610.

5. CONCLUSÕES

O Al promoveu redução na germinação, massa fresca, uniformidade e no crescimento total (radícula e hipocótilo) de plântulas de soja. Ocorreu redução na concentração de amido e sacarose e, aumento na concentração de fumarato, malato, prolina e nitrato nas plântulas sob efeito do Al. O aumento no conteúdo de MDA e a ação coordenada do aumento da atividade catalítica da CAT e POX mitigaram o efeito do Al no metabolismo das plântulas de soja.

A identificação dos principais metabólitos e enzimas envolvidas na promoção de tolerância e sensibilidade ao Al em plântulas de soja permite selecionar genótipos nos estádios iniciais da germinação até o estabelecimento das plântulas sob efeito desse metal pesado para fins de melhoramento da cultura.

Identificamos diferentes níveis de sensibilidade nos cinco genótipos estudados, sendo que, o genótipo AS3680 mais sensível à presença do Al. O genótipo M59I7I e BS2606 são intermediários a condição de estresse e os genótipos 58I60RSF e NEO610 são menos sensíveis a presença do Al.

REFERÊNCIAS

- Abud, H. F., Cicero, S. M. and Gomes Junior, F. G.** (2017) Análise computadorizada de imagens de plântulas na avaliação do vigor de sementes de brócolis. *Journal of Seed Science* **39**, 303–310. doi:10.1590/2317-1545v39n3174582.
- Araújo, W. L., Ishizaki, K., Nunes-Nesi, A., Larson, T. R., Tohge, T., Krahmert, I., Witt, S., Obata, T., Schauer, N., Graham, I. A., Leaver, C. J. and Fernie, A. R.** (2010) Identification of the 2-hydroxyglutarate and isovaleryl-CoA dehydrogenases as alternative electron donors linking lysine catabolism to the electron transport chain of *Arabidopsis* mitochondria. *Plant Cell* **22**, 1549–1563. doi:10.1105/tpc.110.075630.
- Asada, K.** (1992) Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum* **85**, 235–241. doi:10.1111/j.1399-3054.1992.tb04728.x.
- Bae, J., Benoit, D. L. and Watson, A. K.** (2016) Effect of heavy metals on seed germination and seedling growth of common ragweed and roadside ground cover legumes. *Environmental Pollution* **213**, 112–118. doi:10.1016/j.envpol.2015.11.041.
- Bailly, C.** (2004) Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research* **14**, 93–107. doi:10.1079/ssr2004159.
- Baird, R., Eaton, A. D., Rice, E. W., Bridgewater, L., American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation** (2019) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*.
- Bertan, I., Carvalho, F. I. F. de, Oliveira, A. C. de, Vieira, E. A., Hartwig, I., Silva, J. A. G. da, Shimidt, D. A. M., Valério, I. P., Busato, C. C. and Ribeiro, G.** (2014) Current Agricultural Science and Technology. *Current Agricultural Science and Technology* **12**, 279–286.
- Bojórquez-Quintal, E., Escalante-Magaña, C., Echevarría-Machado, I. and Martínez-Estévez, M.** (2017) Aluminum, a friend or foe of higher plants in acid soils. *Frontiers in Plant Science* **8**,. doi:10.3389/fpls.2017.01767.
- Bradford, M. M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Brannstrom, C., Jepson, W., Filippi, A. M., Redo, D., Xu, Z. and Ganesh, S.** (2008) Land change in the Brazilian Savanna (Cerrado), 1986-2002: Comparative analysis and implications for land-use policy. *Land Use Policy* **25**, 579–595. doi:10.1016/j.landusepol.2007.11.008.
- Brasil** (2009) Regras para Análise de Sementes. *MINISTÉRIO DA AGRICULTURA*

- Cambria, J., Galvani, F. R., Estevao, M. M. and Sant'Anna, R.** (1983) Effects of Aluminum on Organic Acid, Sugar and Amino Acid Composition of the Root System of Sorghum (*Sorghum Bicolor* L. Moench). *Journal of Plant Nutrition* **6**, 313–322. doi:10.1080/01904168309363092.
- Cárcamo, M. P., Reyes-Díaz, M., Rengel, Z., Alberdi, M., Omena-Garcia, R. P., Nunes-Nesi, A. and Inostroza-Blancheteau, C.** (2019) Aluminum stress differentially affects physiological performance and metabolic compounds in cultivars of highbush blueberry. *Scientific reports* **9**, 11275. doi:10.1038/s41598-019-47569-8.
- Carvalho, K. da S., Pinheiro, H. A., Festucci-Buselli, R. A., da Silva Júnior, D. D., de Castro, G. L. S., Cruz, F. J. R. and Fujiyama, B. S.** (2013) Diurnal changes in leaflet gas exchange, water status and antioxidant responses in *Carapa guianensis* plants under water-deficit conditions. *Acta Physiologiae Plantarum* **35**, 13–21. doi:10.1007/s11738-012-1043-6.
- Castan, D. O. C., Gomes-Junior, F. G. and Marcos-Filho, J.** (2018) Vigor-S, a new system for evaluating the physiological potential of maize seeds. *Scientia Agricola* **75**, 167–172. doi:10.1590/1678-992x-2016-0401.
- Cheng, H. Y. and Song, S. Q.** (2008) Possible involvement of reactive oxygen species scavenging enzymes in desiccation sensitivity of *Antiaris toxicaria* seeds and axes. *Journal of Integrative Plant Biology* **50**, 1549–1556. doi:10.1111/j.1744-7909.2008.00723.x.
- Chmielowska-Bąk, J., Izbiańska, K. and Deckert, J.** (2015) Products of lipid, protein and RNA oxidation as signals and regulators of gene expression in plants. *Frontiers in Plant Science* **6**,. doi:10.3389/fpls.2015.00405.
- Cunha, G. O. de M., de Almeida, J. A., Testoni, S. A. and Barboza, B. B.** (2015) Formas de alumínio em solos Ácidos Brasileiros com teores excepcionalmente altos de Al³⁺ extraível com KCl. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo* **39**, 1362–1377. doi:10.1590/01000683rbcs20150017.
- Custódio, C. C., Bomfim, D. C., Saturnino, S. M. and Machado Neto, N. B.** (2002) Estresse por alumínio e por acidez em cultivares de soja. *Scientia Agricola* **59**, 145–153. doi:10.1590/S0103-90162002000100021.
- Dantas, S. A. G., Silva, F. C. S., Silva, L. J. and Silva, F. L.** (2017a) Strategy for selection of soybean genotypes tolerant to drought during germination. *Genetics and Molecular*

- Research* **16**,. doi:10.4238/gmr16029654.
- Dantas, S. A. G., Silva, F. C. S., Silva, L. J., Silva, F. L. and Mol, G.** (2017b) Strategy for selection of soybean genotypes tolerant to drought during germination. *Genetics and Molecular Research* **16**, 16029654. doi:10.4238/gmr16029654.
- de Castro, G. L. S., da Silva Júnior, D. D., Viana, R. G., Rêgo, M. C. F. and da Silva, G. B.** (2019) Photosynthetic apparatus protection and drought effect mitigation in açaí palm seedlings by rhizobacteria. *Acta Physiologiae Plantarum* **41**, 163. doi:10.1007/s11738-019-2952-4.
- De Freitas, F. A., Kopp, M. M., De Sousa, R. O., Zimmer, P. D., Félix De Carvalho, F. I. and De Oliveira, A. C.** (2006) Absorção de P, Mg, Ca e K e tolerância de genótipos de arroz submetidos a estresse por alumínio em sistemas hidropônicos. *Ciencia Rural* **36**, 72–79. doi:10.1590/s0103-84782006000100011.
- de Oliveira Pires, R. M., de Souza, G. A., dos Santos Dias, D. C. F., Oliveira, L. A. and de Lima e Borges, E. E.** (2016) Ação protetora do óxido nítrico em sementes de gergelim submetidas ao estresse hídrico. *Journal of Seed Science* **38**, 350–357. doi:10.1590/2317-1545v38n4166972.
- Deng, B., Yang, K., Zhang, Y. and Li, Z.** (2017) Can antioxidant's reactive oxygen species (ROS) scavenging capacity contribute to aged seed recovery? Contrasting effect of melatonin, ascorbate and glutathione on germination ability of aged maize seeds. *Free Radical Research* **51**, 765–771. doi:10.1080/10715762.2017.1375099.
- Echart, C. L. and Cavalli-Molina, S.** (2001) Fitotoxicidade do alumínio: efeitos, mecanismo de tolerância e seu controle genético. *Ciência Rural* **31**, 531–541. doi:10.1590/s0103-84782001000300030.
- Fageria, N. K.** (2001) Resposta de arroz de terras altas, feijão, milho e soja à saturação por base em solo de cerrado. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* **5**, 416–424. doi:10.1590/s1415-43662001000300009.
- Fernie, A. R., Roscher, A., Ratcliffe, R. G. and Kruger, N. J.** (2001) Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta* **212**, 250–63. doi:10.1007/s004250000386.
- Foy, C. E.** (1984) Molecular aspects of aluminum toxicity. *Critical Reviews in Plant Sciences* **1**, 345–373. doi:10.1080/07352688409382184.
- Gangola, M. P. and Ramadoss, B. R.** (2018) *Sugars Play a Critical Role in Abiotic Stress Tolerance in Plants*. doi:10.1016/B978-0-12-813066-7.00002-4.

- Giannakoula, A., Moustakas, M., Mylona, P., Papadakis, I. and Yupsanis, T. (2008)** Aluminum tolerance in maize is correlated with increased levels of mineral nutrients, carbohydrates and proline, and decreased levels of lipid peroxidation and Al accumulation. *Journal of Plant Physiology* **165**, 385–396. doi:10.1016/j.jplph.2007.01.014.
- Giannopolitis, C. and Ries, S. (1977)** Superoxide Dismutases: I. Occurrence in Higher Plants. *Plant Physiology* **59**, 309–314. doi:10.1104/pp.59.2.309.
- Gill, S. S., Anjum, N. A., Gill, R., Yadav, S., Hasanuzzaman, M., Fujita, M., Mishra, P., Sabat, S. C. and Tuteja, N. (2015)** Superoxide dismutase—mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. *Environmental Science and Pollution Research* **22**, 10375–10394. doi:10.1007/s11356-015-4532-5.
- Giroto, L., Alves, J. D., Deuner, S., Albuquerque, A. C. S. and Tomazoni, A. P. (2012)** Tolerância à seca de genótipos de trigo utilizando agentes indutores de estresse no processo de seleção. *Revista Ceres* **59**, 192–199. doi:10.1590/S0034-737X2012000200007.
- Gonçalves, J. G. R., de Andrade, E. R., da Silva, D. A., de Fátima Esteves, J. A., Chiorato, A. F. and Carbonell, S. A. M. (2019)** Drought tolerance evaluated in common bean genotypes. *Ciencia e Agrotecnologia* **43**,. doi:10.1590/1413-7054201943001719.
- Gordin, C. R. B., Marques, R. F., Rosa, R. J. M., Dos Santos, A. M. and De Paula Quintão Scalon, S. (2013)** Emergência de plântulas e crescimento inicial do pinhão manso exposto a alumínio. *Semina: Ciências Agrárias* **34**, 147–156. doi:10.5433/1679-0359.2013v34n1p147.
- Hartwig, I., Oliveira, A. C. de, Carvalho, F. I. F. de, Bertan, I., Silva, J. A. G. da, Schmidt, D. A. M., Valério, I. P., Maia, L. C., Fonseca, D. A. R. and Reis, C. E. S. dos (2007)** Mecanismos associados à tolerância ao alumínio em plantas. *Semina: Ciências Agrárias* **28**, 219. doi:10.5433/1679-0359.2007v28n2p219.
- Havir, E. A. and McHale, N. A. (1987)** Biochemical and Developmental Characterization of Multiple Forms of Catalase in Tobacco Leaves. *Plant Physiology* **84**, 450–455. doi:10.1104/pp.84.2.450.
- Heath, R. L. and Packer, L. (1968)** Photoperoxidation in isolated chloroplasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **125**, 189–198. doi:10.1016/0003-9861(68)90654-1.
- Hendriks, J. H. M., Kolbe, A., Gibon, Y., Stitt, M. and Geigenberger, P. (2003)** ADP-Glucose Pyrophosphorylase Is Activated by Posttranslational Redox-Modification in

- Response to Light and to Sugars in Leaves of Arabidopsis and Other Plant Species. *Plant Physiology* **133**, 838–849. doi:10.1104/pp.103.024513.
- Hernández-Barrera, A., Velarde-Buendía, A., Zepeda, I., Sanchez, F., Quinto, C., Sánchez-Lopez, R., Cheung, A. Y., Wu, H. M. and Cardenas, L.** (2015) Hyper, a hydrogen peroxide sensor, indicates the sensitivity of the Arabidopsis root elongation zone to aluminum treatment. *Sensors (Switzerland)* **15**, 855–867. doi:10.3390/s150100855.
- Hildebrandt, T. M.** (2018) Synthesis versus degradation: directions of amino acid metabolism during Arabidopsis abiotic stress response. *Plant Molecular Biology* **98**, 121–135. doi:10.1007/s11103-018-0767-0.
- Hodges, D. M., DeLong, J. M., Forney, C. F. and Prange, R. K.** (1999) Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* **207**, 604–611. doi:10.1007/s004250050524.
- Hoffmaster, A. F., Xu, L., Fujimura, K., Bennett, M. A., McDonald, A. F. E. and M. B. and Jr.** (2005) The Ohio State University Seed Vigor Imaging System (SVIS) for Soybean and Corn Seedlings. *Seed Technology* **27**, 7–24. doi:10.2307/23433211.
- Huang, M., Wang, Q. G., Zhu, Q. B., Qin, J. W. and Huang, G.** (2015) Review of seed quality and safety tests using optical sensing technologies. *Seed Science and Technology* **43**, 337–366. doi:10.15258/sst.2015.43.3.16.
- Ilangovan, G., Venkatakrishnan, C. D., Bratasz, A., Osinbowale, S., Cardounel, A. J., Zweier, J. L. and Kuppusamy, P.** (2006) Heat shock-induced attenuation of hydroxyl radical generation and mitochondrial aconitase activity in cardiac H9c2 cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **290**, C313–C324. doi:10.1152/ajpcell.00362.2005.
- Illés, P., Schlicht, M., Pavlovkin, J., Lichtscheidl, I., Baluška, F. and Ovečka, M.** (2006) Aluminium toxicity in plants: Internalization of aluminium into cells of the transition zone in Arabidopsis root apices related to changes in plasma membrane potential, endosomal behaviour, and nitric oxide production. *Journal of Experimental Botany* **57**, 4201–4213. doi:10.1093/jxb/erl197.
- Iqbal, M. Z. and Shafiq, M.** (2003) Effects of aluminium on germination and growth of two different wheat cultivars. *Acta Botanica Hungarica* **45**, 315–321. doi:10.1556/ABot.45.2003.3-4.6.
- Ishizaki, K., Schauer, N., Larson, T. R., Graham, I. A., Fernie, A. R. and Leaver, C. J.**

- (2006) The mitochondrial electron transfer flavoprotein complex is essential for survival of *Arabidopsis* in extended darkness. *Plant Journal* **47**, 751–760. doi:10.1111/j.1365-3113.2006.02826.x.
- Kar, M. and Mishra, D.** (1976) Catalase, Peroxidase, and Polyphenoloxidase Activities during Rice Leaf Senescence. *Plant Physiology* **57**, 315–319. doi:10.1104/pp.57.2.315.
- Karasawa, M., Rodrigues, R., Sudré, C. P., Silva, M. P. da, Riva, E. M. and Amaral Júnior, A. T. do** (2005) Aplicação de métodos de agrupamento na quantificação da divergência genética entre acessos de tomateiro. *Horticultura Brasileira* **23**, 1000–1005. doi:10.1590/s0102-05362005000400028.
- Kazue Silva, T.** (2007) Ação citoprotetora do óxido nítrico na germinação de arroz (*Oryza sativa* L.) e soja (*Glycine max* (L.) Merril) submetidas a estresse de alumínio.
- Kenner, B. and Hui Jiang, coordinator** (2020) *Outlook for U.S. Agricultural Trade Situation and Outlook Report Economic Research Service and Foreign Agricultural Service Situation and Outlook Report*.
- Khan, A. A., McNeilly, T. and Collins, J. C.** (2000) Accumulation of amino acids, proline, and carbohydrates in response to aluminum and manganese stress in maize. *Journal of Plant Nutrition* **23**, 1303–1314. doi:10.1080/01904160009382101.
- Kibinza, S., Bazin, J., Bailly, C., Farrant, J. M., Corbineau, F. and El-Maarouf-Bouteau, H.** (2011) Catalase is a key enzyme in seed recovery from ageing during priming. *Plant Science* **181**, 309–315. doi:10.1016/j.plantsci.2011.06.003.
- Kikui, S., Sasaki, T., Maekawa, M., Miyao, A., Hirochika, H., Matsumoto, H. and Yamamoto, Y.** (2005) Physiological and genetic analyses of aluminium tolerance in rice, focusing on root growth during germination, pp. 1837–1844 in *Journal of Inorganic Biochemistry*. Elsevier Inc. doi:10.1016/j.jinorgbio.2005.06.031.
- Kochian, L. V., Hoekenga, O. A. and Piñeros, M. A.** (2004) HOW DO CROP PLANTS TOLERATE ACID SOILS? MECHANISMS OF ALUMINUM TOLERANCE AND PHOSPHOROUS EFFICIENCY. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 459–493. doi:10.1146/annurev.arplant.55.031903.141655.
- Kochian, L. V., Piñeros, M. A., Liu, J. and Magalhaes, J. V.** (2015) Plant Adaptation to Acid Soils: The Molecular Basis for Crop Aluminum Resistance. *Annual Review of Plant Biology* **66**, 571–598. doi:10.1146/annurev-arplant-043014-114822.
- Koszo, C. R. R., Rinaldi, M. C. S. and Barbedo, C. J.** (2007) Germinação de sementes de *Erythrina speciosa* Andr., *Eugenia brasiliensis* Lam. e *Cucumis sativus* L. em meio ácido. *Hoehnea* **34**, 271–282. doi:10.1590/s2236-89062007000300002.

- Kranner, I., Roach, T., Beckett, R. P., Whitaker, C. and Minibayeva, F. V.** (2010) Extracellular production of reactive oxygen species during seed germination and early seedling growth in *Pisum sativum*. *Journal of Plant Physiology* **167**, 805–811. doi:10.1016/j.jplph.2010.01.019.
- Lan, C., Lin, K., Huang, W. and Chen, C.** (2019) Protective Effects of Selenium on Wheat Seedlings under Salt Stress. 1–14.
- Li, Z. and Xing, D.** (2011) Mechanistic study of mitochondria-dependent programmed cell death induced by aluminium phytotoxicity using fluorescence techniques. *Journal of Experimental Botany* **62**, 331–343. doi:10.1093/jxb/erq279.
- Li, X., Zhang, X., Zhao, J., Xing, H., Liu, Z., Wang, H., Guo, N., Qiu, L., Xue, D., Huang, J. and Bu, Y.** (2018) Genome-Wide Association Studies of Soybean Seed Hardness in the Chinese Mini Core Collection. *Plant Molecular Biology Reporter* **36**, 605–617. doi:10.1007/s11105-018-1102-2.
- Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L. and Fernie, A. R.** (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature protocols* **1**, 387–96. doi:10.1038/nprot.2006.59.
- Liu, M. Y., Lou, H. Q., Chen, W. W., Piñeros, M. A., Xu, J. M., Fan, W., Kochian, L. V., Zheng, S. J. and Yang, J. L.** (2018) Two citrate transporters coordinately regulate citrate secretion from rice bean root tip under aluminum stress. *Plant Cell and Environment* **41**, 809–822. doi:10.1111/pce.13150.
- Ma, J. F. and Furukawa, J.** (2003) Recent progress in the research of external Al detoxification in higher plants: a minireview. *Journal of inorganic biochemistry* **97**, 46–51. doi:10.1016/s0162-0134(03)00245-9.
- Ma, Q., Kang, J., Long, R., Zhang, T., Xiong, J., Zhang, K., Wang, T., Yang, Q. and Sun, Y.** (2017) Comparative proteomic analysis of alfalfa revealed new salt and drought stress-related factors involved in seed germination. *Molecular Biology Reports* **44**, 261–272. doi:10.1007/s11033-017-4104-5.
- Maehly, A. C.** (2006) The Assay of Catalases and Peroxidases, pp. 357–424 in *Methods of biochemical analysis*. John Wiley & Sons, Ltd doi:10.1002/9780470110171.ch14.
- Magalhaes, J. V., Liu, J., Guimarães, C. T., Lana, U. G. P., Alves, V. M. C., Wang, Y. H., Schaffert, R. E., Hoekenga, O. A., Piñeros, M. A., Shaff, J. E., Klein, P. E., Carneiro, N. P., Coelho, C. M., Trick, H. N. and Kochian, L. V.** (2007) A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. *Nature Genetics* **39**, 1156–1161. doi:10.1038/ng2074.

- Mariano, E. D., Jorge, R. A., Keltjens, W. G. and Menossi, M.** (2005) Metabolism and root exudation of organic acid anions under aluminium stress. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **17**, 157–172. doi:10.1590/s1677-04202005000100013.
- Maron, L. G., Piñeros, M. A., Guimarães, C. T., Magalhaes, J. V., Pleiman, J. K., Mao, C., Shaff, J., Belicuas, S. N. J. and Kochian, L. V.** (2010) Two functionally distinct members of the MATE (multi-drug and toxic compound extrusion) family of transporters potentially underlie two major aluminum tolerance QTLs in maize. *Plant Journal* **61**, 728–740. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.04103.x.
- Mascarenhas, H. A. A., Camargo, C. E. de O. and Falivene, S. M. P.** (1984) Efeito do alumínio sobre o crescimento de raízes, peso seco da parte aérea e raízes de diferentes cultivares de soja. *Bragantia* **43**, 191–200. doi:10.1590/s0006-87051984000100015.
- Mattiello, L., Begcy, K., da Silva, F. R., Jorge, R. A. and Menossi, M.** (2014) Transcriptome analysis highlights changes in the leaves of maize plants cultivated in acidic soil containing toxic levels of Al³⁺. *Molecular Biology Reports* **41**, 8107–8116. doi:10.1007/s11033-014-3709-1.
- Mazzocato, A. C., Rocha, P. S. G. da, Sereno, M. J. C. de M., Bohnen, H., Grongo, V. and Neto, J. F. B.** (2002) Tolerância Ao Alumínio Em Plântulas De Milho. *Ciência Rural* **32**, 19–24. doi:10.1590/s0103-84782002000100004.
- Medeiros, A. D. de, Silva, L. J. da, Capobianco, N. P., Fialho, C. A. and Dias, D. C. F. dos S.** (2019) Assessing the physiological quality of common bean seeds using the Vigor-S® system and its relation to the accelerated aging test. *Journal of Seed Science* **41**, 187–195. doi:10.1590/2317-1545v41n2211401.
- Menosso, O. G., Costa, J. A., Anghinoni, I. and Bohnen, H.** (2000) Tolerância de genótipos de soja ao alumínio em solução. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* **35**, 2157–2166. doi:10.1590/s0100-204x2000001100006.
- Menosso, O. G., Costa, J. A., Anghinoni, I. and Bohnen, H.** (2001) Crescimento radicular e produção de ácidos orgânicos em cultivares de soja com diferentes tolerâncias ao alumínio. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* **36**, 1339–1345. doi:10.1590/s0100-204x2001001100003.
- Moir, J. L. and Moot, D. J.** (2010) *Soil pH, exchangeable aluminium and lucerne yield responses to lime in a South Island high country soil*. New Zealand Grassland Association.
- Mojena, R.** (1977) Hierarchical grouping methods and stopping rules: an evaluation. *The Computer Journal* **20**, 359–363. doi:10.1093/comjnl/20.4.359.

- Moreno-Alvarado, M., García-Morales, S., Trejo-Téllez, L. I., Hidalgo-Contreras, J. V. and Gómez-Merino, F. C.** (2017) Aluminum enhances growth and sugar concentration, alters macronutrient status and regulates the expression of NAC transcription factors in rice. *Frontiers in Plant Science* **8**,. doi:10.3389/fpls.2017.00073.
- Mossor-Pietraszewska, T.** (2001) Effect of aluminium on plant growth and metabolism. *Acta Biochimica Polonica* **48**, 673–686.
- Muniz, F. R., Cardoso, M. D. G., Von Pinho, É. V. R. and Vilela, M.** (2007) Qualidade fisiológica de sementes de milho, feijão, soja e alface na presença de extrato de tiririca. *Revista Brasileira de Sementes* **29**, 195–204. doi:10.1590/S0101-31222007000200026.
- Nakagawa, J.** (1999) Testes de vigor baseados no desempenho de plântulas, pp. 1–24 in KRZYŻANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R. D. . and FRANÇA NETO, J. B. (Eds.) *Vigor de sementes: conceitos e testes*. Londrina, ABRATES.
- Nakano, Y. and Asada, K.** (1981) Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* **22**, 867–880. doi:10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232.
- Nunes-nesi, A., Brito, D. S. and Inostroza-blancheteau, C.** (2014) The complex role of mitochondrial metabolism in plant aluminum resistance. **19**, 399–407. doi:10.1016/j.tplants.2013.12.006.
- Nunes-Nesi, A., Carrari, F., Gibon, Y., Sulpice, R., Lytovchenko, A., Fisahn, J., Graham, J., Ratcliffe, R. G., Sweetlove, L. J. and Fernie, A. R.** (2007) Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. *Plant Journal* **50**, 1093–1106. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03115.x.
- Obata, T. and Fernie, A. R.** (2012) The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. *Cellular and Molecular Life Sciences* **69**, 3225–3243. doi:10.1007/s00018-012-1091-5.
- Panda, S. K., Baluska, F. and Matsumoto, H.** (2009) Aluminum stress signaling in plants. *Plant Signaling and Behavior* **4**, 592–597. doi:10.4161/psb.4.7.8903.
- Parkhey, S., Naithani, S. C. and Keshavkant, S.** (2012) ROS production and lipid catabolism in desiccating *Shorea robusta* seeds during aging. *Plant Physiology and Biochemistry* **57**, 261–267. doi:10.1016/j.plaphy.2012.06.008.
- Peixoto, P. H. P., Pimenta, D. S. and Cambraia, J.** (2007) Alterações morfológicas e acúmulo de compostos fenólicos em plantas de sorgo sob estresse de alumínio. *Bragantia* **66**, 17–25. doi:10.1590/s0006-87052007000100003.

- Presotto, R. A., Pereira, M. G., Zonta, E. and Mattiello, E. M.** (2018) Influência do Al³⁺ em solução nutritiva no crescimento de três espécies florestais utilizadas na recuperação de áreas degradadas. *Ciencia Florestal* **28**, 384–392. doi:10.5902/1980509831610.
- R Core Team** (2019) R: A language and environment for statistical computing.
- Rahman, A. and Cho, B. K.** (2016) Assessment of seed quality using non-destructive measurement techniques: A review. *Seed Science Research* **26**, 285–305. doi:10.1017/S0960258516000234.
- Rodrigues, A. A., Vasconcelos-Filho, S. C., Rodrigues, C. L., Rodrigues, D. A., Silva, G. P., De Fátima Sales, J., Nascimento, K. J. T., Teles, E. M. G. and Rehn, L. S.** (2017) Aluminum influence on *Hancornia speciosa* seedling emergence, nutrient accumulation, growth and root anatomy. *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* **236–237**, 9–14. doi:10.1016/j.flora.2017.09.008.
- Rosa, M., Prado, C., Podazza, G., Interdonato, R., González, J. A., Hilal, M. and Prado, F. E.** (2009) Soluble sugars-metabolism, sensing and abiotic stress a complex network in the life of plants. *Plant Signaling and Behavior* **4**, 388–393. doi:10.4161/psb.4.5.8294.
- Ryan, P. R., Ditomasso, J. M. and Kochian, L. V.** (1993) Aluminium toxicity in roots: An investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. *Journal of Experimental Botany* **44**, 437–446. doi:10.1093/jxb/44.2.437.
- Sahu, B., Sahu, A. K., Chennareddy, S. R., Soni, A. and Naithani, S. C.** (2017a) Insights on germinability and desiccation tolerance in developing neem seeds (*Azadirachta indica*): Role of AOS, antioxidative enzymes and dehydrin-like protein. *Plant Physiology and Biochemistry* **112**, 64–73. doi:10.1016/j.plaphy.2016.12.022.
- Sahu, B., Sahu, A. K., Thomas, V. and Naithani, S. C.** (2017b) Reactive oxygen species, lipid peroxidation, protein oxidation and antioxidative enzymes in dehydrating Karanj (*Pongamia pinnata*) seeds during storage. *South African Journal of Botany* **112**, 383–390. doi:10.1016/j.sajb.2017.06.030.
- Sánchez-Chacón, C. D., Federizzi, L. C., Milach, S. C. K. and Pacheco, M. T.** (2000) Variabilidade genética e herança da tolerância à toxicidade do alumínio em aveia. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **35**, 1797–1808. doi:10.1590/s0100-204x2000000900012.
- Santos Silva, F. C., Sediya, T., de Cássia, R. T. O., Borém, A., da Silva, F. L., Bezerra, A. R. G. and da Silva, A. F.** (2017) Economic importance and evolution of breeding. *Soybean Breeding* 1–16. doi:10.1007/978-3-319-57433-2_1.

- Sarker, S., Ghosh, S., Hossain, M., Ghosh, R., Razia, S., Sushmoy, D. and Noor, M.** (2019) Impact of aluminium (Al^{3+}) stress on germination and seedling growth of five wheat genotypes. *SAARC Journal of Agriculture* **17**, 65–76. doi:10.3329/sja.v17i1.42762.
- Sartain, J. B. and Kamprath, E. J.** (1977) Culture Compared with Growth in Acid Soil.
- Shabnam, N., Tripathi, I., Sharmila, P. and Pardha-Saradhi, P.** (2016) A rapid, ideal, and eco-friendlier protocol for quantifying proline. *Protoplasma* **253**, 1577–1582. doi:10.1007/s00709-015-0910-6.
- Sharma, S. N., Maheshwari, A., Sharma, C. and Shukla, N.** (2018) Gene expression patterns regulating the seed metabolism in relation to deterioration/ageing of primed mung bean (*Vigna radiata* L.) seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* **124**, 40–49. doi:10.1016/j.plaphy.2017.12.036.
- Silva, P. and Matos, M.** (2016) Assessment of the impact of Aluminum on germination, early growth and free proline content in *Lactuca sativa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **131**, 151–156. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.05.014.
- Silva, J., Saccini, V. A. V. and Dos Santos, D. M. M.** (2015) Estresse térmico no acúmulo de prolina livre de plântulas de guandu oriundas de sementes tratadas com poliaminas. *Semina: Ciências Agrárias* **36**, 103–122. doi:10.5433/1679-0359.2015v36n1p103.
- Silva, J. A. da, Medeiros, A. D. de, Pinheiro, D. T., Pereira, M. D., Silva, L. J. da, Ribeiro, J. P., Ferreira, K. C. and Gomes, I. R. F.** (2019) Semi-automated Phenotyping of Soybean Seedlings and Its Relation With Physiological Seed Quality. *Journal of Agricultural Science* **11**, 1. doi:10.5539/jas.v11n1p1.
- Smirnoff, N.** (2018) Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals. *Free Radical Biology and Medicine* **122**, 116–129. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.033.
- Sulpice, R., Pyl, E. T., Ishihara, H., Trenkamp, S., Steinfath, M., Witucka-Wall, H., Gibon, Y., Usadel, B., Poree, F., Piques, M. C., Von Korff, M., Steinhauser, M. C., Keurentjes, J. J. B., Guenther, M., Hoehne, M., Selbig, J., Fernie, A. R., Altmann, T. and Stitt, M.** (2009) Starch as a major integrator in the regulation of plant growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 10348–10353. doi:10.1073/pnas.0903478106.
- Talebi, S., Kalat, S. M. N. and Darban, A. L. S.** (2014) The Study Effects of Heavy Metals on Germination Characteristics and Proline Content of Triticale (*Triticoseale* Wittmack). *International Journal of Farming and Allied Sciences* **3**, 1080–1087.

- Tan, M., Liao, F., Hou, L., Wang, J., Wei, L., Jian, H., Xu, X., Li, J. and Liu, L.** (2017) Genome-wide association analysis of seed germination percentage and germination index in *Brassica napus* L. under salt and drought stresses. *Euphytica* **213**, 40. doi:10.1007/s10681-016-1832-x.
- Tavares, L. C., Mendonça, A. O. de, Gadotti, G. I. and Villela, F. A.** (2016) Estratégias de marketing na área de sementes. *Arquivos do Instituto Biológico* **83**,. doi:10.1590/1808-1657000882014.
- Torres, F. E., David, G. V, Teodoro, P. E., Ribeiro, L. P., Correa, C. G. and Júnior, A. L.** (2015) Desempenho agronômico e dissimilaridade genética entre genótipos de soja Agronomic performance and genetic dissimilarity between soybean genotypes. **38**, 111–117.
- Trabaquini, K., Galvão, L. S., Formaggio, A. R. and de Aragão, L. E. O. e. C.** (2017) Soil, land use time, and sustainable intensification of agriculture in the Brazilian Cerrado region. *Environmental Monitoring and Assessment* **189**, 1–15. doi:10.1007/s10661-017-5787-8.
- Vendrame, P. R. S., Brito, O. R., Guimarães, M. F., Martins, É. S. and Becquer, T.** (2010) Fertility and acidity status of latossolos (oxisols) under pasture in the Brazilian Cerrado. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* **82**, 1085–1094. doi:10.1590/S0001-37652010000400026.
- Wang, L., Ma, H., Song, L., Shu, Y. and Gu, W.** (2012a) Comparative proteomics analysis reveals the mechanism of pre-harvest seed deterioration of soybean under high temperature and humidity stress. *Journal of Proteomics* **75**, 2109–2127. doi:10.1016/j.jprot.2012.01.007.
- Wang, H., Zhang, M., Guo, R., Shi, D., Liu, B., Lin, X. and Yang, C.** (2012b) Effects of salt stress on ion balance and nitrogen metabolism of old and young leaves in rice (*Oryza sativa* L.). *BMC Plant Biology* **12**, 194. doi:10.1186/1471-2229-12-194.
- Wang, Y.-H., Klein, P. E., Morris, G. P., Burrell, A. M., Sastry, D. V. S. S. R., Klein, R. R., Dwivedi, S. L., Prasad, P. V. V. and Upadhyaya, H. D.** (2015) Association mapping of germinability and seedling vigor in sorghum under controlled low-temperature conditions. *Genome* **59**, 137–145. doi:10.1139/gen-2015-0122.
- Winkel-Shirley, B.** (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 218–223. doi:10.1016/S1369-5266(02)00256-X.
- Xiang, Y., Sun, X., Gao, S., Qin, F. and Dai, M.** (2017) Deletion of an Endoplasmic Reticulum Stress Response Element in a ZmPP2C-A Gene Facilitates Drought

- Tolerance of Maize Seedlings. *Molecular Plant* **10**, 456–469. doi:10.1016/j.molp.2016.10.003.
- Yamashita, O. M., Guimarães, S. C. and Cavenaghi, A. L.** (2011) Germinação Das Sementes De Conyza Canadensis E Conyza Bonariensis Em Função Da Qualidade De Luz. *Planta Daninha* **29**, 737–743. doi:10.1590/S0100-83582011000400003.
- Yemm, E. W., Cocking, E. C. and Ricketts, R. E.** (1955) The determination of amino-acids with ninhydrin. *The Analyst* **80**, 209–214. doi:10.1039/AN9558000209.
- Yin, X., He, D., Gupta, R. and Yang, P.** (2015) Physiological and proteomic analyses on artificially aged Brassica napus seed. *Frontiers in Plant Science* **6**, 112. doi:10.3389/fpls.2015.00112.
- Zagatto Paterniani, M. E. A. G. and Furlani, P. R.** (2002) Tolerância à toxicidade de alumínio de linhagens e híbridos de milho em solução nutritiva. *Bragantia* **61**, 11–16. doi:10.1590/s0006-87052002000100003.
- Zhou, Y., Yang, Z., Xu, Y., Sun, H., Sun, Z., Lin, B., Sun, W. and You, J.** (2018a) Soybean NADP-malic enzyme functions in malate and citrate metabolism and contributes to their efflux under Al stress. *Frontiers in Plant Science* **8**, 1–11. doi:10.3389/fpls.2017.02246.
- Zhou, Y., Tang, N., Huang, L., Zhao, Y., Tang, X. and Wang, K.** (2018b) Effects of salt stress on plant growth, antioxidant capacity, glandular trichome density, and volatile exudates of schizonepeta tenuifolia briq. *International Journal of Molecular Sciences* **19**,. doi:10.3390/ijms19010252.