

CÍNTIA OLIVEIRA SILVA

**EFEITOS DO ALUMÍNIO EM RAÍZES DE SOJA:
ALTERAÇÕES MORFOANATÔMICAS, FISIOLÓGICAS
E METABÓLICAS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2018

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

T

S586e
2018

Silva, Cíntia Oliveira, 1986-

Efeitos do alumínio em raízes de soja : alterações
morfoanatômicas, fisiológicas e metabólicas / Cíntia Oliveira
Silva. – Viçosa, MG, 2018.

x, 77f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Cleberson Ribeiro.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Soja - Anatomia. 2. Plantas - Efeito do alumínio.
3. Raízes (Botânica). 4. Antioxidantes. 5. Ácidos orgânicos.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Geral. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal.
II. Título.

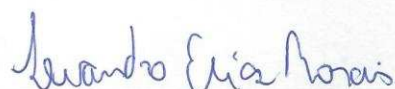
CDD 22. ed. 633.34

CÍNTIA OLIVEIRA SILVA

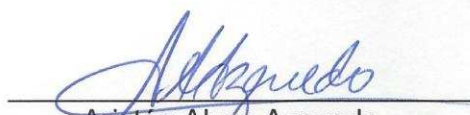
**EFEITOS DO ALUMÍNIO EM RAÍZES DE SOJA:
ALTERAÇÕES MORFOANATÔMICAS,
FISIOLÓGICAS E METABÓLICAS**

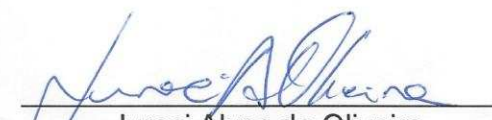
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 20 de março de 2018.


Leandro Elias Moraes


Diego Silva Batista


Aristêa Alves Azevedo
(Coorientadora)


Juraci Alves de Oliveira
(Coorientador)


Cleberson Ribeiro
(Orientador)

A Deus, Senhor de toda força e poder.

À minha família.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela dádiva da vida.

À Universidade Federal de Viçosa, por proporcionar meios de estudos e desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação em Fisiologia Vegetal, em especial aos professores e funcionários, essenciais para o bom êxito desse trabalho.

À Capes e Fapemig, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao meu orientador Cleberson Ribeiro, pela orientação e ensinamentos.

Aos meus coorientadores Juraci e Aristeia por toda atenção despendida.

Aos funcionários do Bioagro, pela ajuda e boa convivência. Especialmente ao José Carlos, pela obtenção das sementes e ao Sr. Paulo, pela agradável receptividade de todos os dias.

Aos laboratórios LCTII e Fisiologia de Micro-organismos, pela ajuda técnica, em especial aos professores Wagner Otoni e Wendel Batista.

Aos laboratórios de Anatomia Vegetal e Núcleo de Microscopia e Microanálise, pela ajuda técnica e por todos os ensinamentos.

Ao Adinan e à Vanessa, por toda ajuda na realização desse trabalho e pelos momentos de amizade e boas risadas.

A todos os estagiários do laboratório, em especial ao Michel e à Bianca, juntos aprendemos e ensinamos.

Aos amigos Fernanda, Helen, Tássia e Júnior pela amizade, pelos momentos de estudos e desesperos compartilhados.

À Ediane, pela amizade, boa convivência, risadas, receitas novas e principalmente, por permitir que uma república de estudantes fosse chamada de lar.

Ao David, por toda paciência, compreensão e companheirismo.

À minha família, minha mãe Vera, meu pai José e meu irmão Cristóvão, por todas as orações e por se fazerem sempre presentes, mesmo distantes.

Ainda que eu falasse as línguas do homem, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine. E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria. Agora, pois, permanecem a fé, a esperança e o amor, estes três, mas o maior destes é o amor.

1 Coríntios 13; 1-2, 13.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO GERAL	11
OBJETIVOS	15
OBJETIVO GERAL	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16

CAPÍTULO 1 - Efeitos tóxicos do alumínio em raízes de soja (<i>Glycine max</i> (L.) Merrill): uma abordagem fisiológica e morfoanatômica	
	21
RESUMO	21
INTRODUÇÃO	23
MATERIAIS E MÉTODOS	25
RESULTADOS	29
DISCUSSÃO	36
CONCLUSÕES	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

CAPÍTULO 2 - Respostas antioxidantes e ajustes metabólicos em raízes de soja (<i>Glycine Max</i> (L.) Merr.) após exposição ao alumínio	
	49
RESUMO	49
INTRODUÇÃO	50
MATERIAIS E MÉTODOS	53
RESULTADOS	62
DISCUSSÃO	71
CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
CONCLUSÕES GERAIS	87

RESUMO

SILVA, Cíntia Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2018.
Efeitos do alumínio em raízes de soja: alterações morfoanatômicas, fisiológicas e metabólicas. Orientador: Cleberson Ribeiro. Coorientadores: Aristéa Alves Azevedo e Juraci Alves de Oliveira.

Em solos ácidos o alumínio (Al) é a principal limitação da produtividade das culturas em todo o mundo. A acidificação do solo ($\text{pH} < 5$) solubiliza as formas tóxicas de Al e concentrações micromolares são capazes de inibir o crescimento das raízes e causar prejuízos fisiológicos e nas funções metabólicas das plantas. Aproximadamente 30% de toda a terra agricultável do mundo é constituída por solos ácidos e com a presença de Al tóxico. O Brasil é o segundo maior produtor de soja do mundo, sendo que a maior região produtora de soja do Brasil é a Centro-Oeste. Seus solos são distróficos, ácidos e com alto teor de Al disponível. O presente estudo teve como objetivos avaliar os danos causados pelo Al em raízes de soja. Para tanto, plântulas de soja foram cultivadas em sala de crescimento com solução de Clark contendo 0 e 100 μM de AlCl_3 , sob pH 4,0, e aeração constante. Os tempos experimentais foram de 24, 48 e 72 horas. Dois cultivares com resistência diferenciada ao Al foram utilizados, P98Y70 e Conquista. Foram avaliados os danos causados no alongamento da raiz, na morfologia e na anatomia radicular. O estado nutricional das plantas e o teor relativo de Al no ápice da raiz. Investigamos a presença de células em processo de morte celular, e a detecção histoquímica de Al. Também abordamos as respostas antioxidantes da soja ao estresse por Al, bem como moléculas indicadoras de estresses, como ROS e MDA. Os ajustes metabólicos que as plantas puderam fazer frente ao estresse por Al também foram investigados. O crescimento da raiz foi intensamente prejudicado no cultivar P98Y70 após exposição ao Al. As raízes dos dois cultivares apresentaram danos morfológicos após os três tempos de exposição ao Al. O acúmulo de Al nas raízes não diferiu entre os dois cultivares. O cultivar P98Y70 apresentou as menores concentrações de K, além disso, as concentrações de Ca e Mg reduziram em ambos os cultivares. A concentração de P não foi afetada pela presença de Al. P98Y70 apresentou maior porcentagem relativa de Al na coifa e na zona meristemática, enquanto o cultivar Conquista apresentou maiores porcentagens na zona meristemática e de alongamento. Ambos os cultivares apresentaram processos de morte celular no ápice radicular. O cultivar P98Y70 também apresentou coloração

mais intensa no teste de detecção de Al por hematoxilina. No resultado positivo do corante Chrome Azurol'S foi possível observar acúmulo de Al nas células da coifa e nas células da epiderme. Entretanto, no cultivar P98Y70 foi possível detectar a presença de Al nas células meristemáticas. O cultivar P98Y70 apresentou maiores concentrações de ROS, maiores níveis de peroxidação lipídica e menor eficiência no uso de enzimas antioxidantes. Diferentemente, o cultivar Conquista apresentou aumentos significativos no uso das enzimas antioxidantes, e consequentemente, menores concentrações de ROS. Além disso, o cultivar Conquista apresentou maiores teores de citrato, responsável pela quelação e anulação dos efeitos do Al na rizosfera e no meio intracelular. Com base em nossos resultados e de acordo com os mecanismos já mencionados na literatura, acerca da defesa das plantas contra o estresse por Al, sugerimos que o cultivar Conquista apresenta mecanismos de tolerância mais eficientes, pois manteve o crescimento da raiz, o equilíbrio entre a produção de ROS e a defesa antioxidante a fim de manter a integridade celular, e principalmente, manteve os níveis de ácidos orgânicos suficientes para atuarem na principal forma de defesa das plantas, já descrita atualmente, contra a toxicidade do Al. Dessa forma, esse cultivar passa a ser mais bem adaptado e recomendado para crescer em solos ácidos e com presença tóxica de Al.

ABSTRACT

SILVA, Cíntia Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2018. **Effects of aluminum on soybean roots: morphological, physiological and metabolic changes.** Adviser: Cleberson Ribeiro. Co-advisers: Aristéa Alves Azevedo and Juraci Alves de Oliveira.

In acid soils aluminium (Al) is the main limitation of crop productivity worldwide. Soil acidification (pH <5) solubilizes toxic forms of Al and micromolar concentrations are able to inhibit root growth and cause physiological damage and metabolic functions of plants. Approximately 30% of all the world's arable land consists of acid soils and the presence of Al toxic. Brazil is the second largest soybean producer in the world, with the largest soybean producing region in Brazil being the Midwest. Their soils are dystrophic, acid and with high Al content available. The present study had as objectives to evaluate the damage caused by Al in soybean roots. For this purpose, soybean seedlings were cultured in a growth room with Clark solution containing 0 and 100 μM AlCl_3 , at pH 4.0, and constant aeration. Experimental times were 24, 48 and 72 hours. Two cultivars with differentiated resistance to Al were used, P98Y70 and Conquista. The damage caused by root lengthening, root morphology and anatomy were evaluated. The nutritional status of the plants and the relative content of Al at the root apex. We investigated the presence of cells in the process of cell death, and the histochemical detection of Al. We also addressed the antioxidant responses of soy to Al stress, as well as molecules that indicate stresses, such as ROS and MDA. The metabolic adjustments that plants could make in face of Al stress were also investigated. Root growth was strongly impaired in the P98Y70 cultivar after exposure to Al. The roots of the two cultivars presented morphological damage after the three exposure times to Al. The accumulation of Al in the roots did not differ between the two cultivars. The cultivar P98Y70 presented the lowest concentrations of K, in addition, the concentrations of Ca and Mg reduced in both cultivars. The concentration of P was not affected by the presence of Al. P98Y70 showed a higher relative percentage of Al in the coil and in the meristematic zone, while the cultivar Conquista had higher percentages in the meristematic zone and of elongation. Both cultivars presented cell death processes at the root apex. The cultivar P98Y70 also showed more intense staining in the hematoxylin detection test of Al. In the positive result of the Azurol'S Chrome dye, it was possible to observe accumulation of Al in the cells of the hood and in the cells of the epidermis. However,

in the P98Y70 cultivar, it was possible to detect the presence of Al in the meristematic cells. The cultivar P98Y70 had higher concentrations of ROS, higher levels of lipid peroxidation and lower efficiency in the use of antioxidant enzymes. Differently, the cultivar Conquista presented significant increases in the use of antioxidant enzymes, and consequently, lower concentrations of ROS. In addition, the cultivar Conquista showed higher levels of citrate, responsible for the chelation and nullification of the effects of Al in the rhizosphere and in the intracellular environment. Based on our results and according to the mechanisms already mentioned in the literature on the defense of plants in face of Al stress, we suggest that the cultivar Conquista presents more efficient tolerance mechanisms, since it maintained the root growth, the balance between the ROS production and antioxidant defense in order to maintain the cellular integrity and, above all, maintained the levels of organic acids sufficient to act in the main form of defense of the plants, already described nowadays, in face of the toxicity of Al. Thus, this cultivar is better adapted and recommended to grow in acid soils and with a toxic presence of Al.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A acidificação do solo é um fenômeno natural, além disso, existe vários outros fatores que podem acelerar a acidificação do solo, como agricultura intensiva, lixiviação acentuada de cátions básicos, como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , chuvas ácidas, etc (Guo et al., 2010). A diminuição do pH do solo pode ser prejudicial a diversas culturas de plantas, uma vez que este fenômeno está diretamente relacionado ao aumento da solubilidade do alumínio (Al) (Lin e Wu, 1994).

O alumínio é o terceiro elemento mais abundante na crosta terrestre, ficando atrás apenas do oxigênio e silício. No entanto, sua função biológica específica ainda não é inteiramente conhecida (Schmitt et al., 2016). O alumínio é um constituinte natural do solo, e geralmente apresenta-se na forma precipitada, como aluminossilicatos não fitotóxicos. Durante o processo de acidificação do solo (pH <5,0) inicia-se a solubilização do Al, que culmina em formas fitotóxicas, principalmente Al^{3+} monomérico, considerada a forma mais tóxica (Kochian 1995; Silva, 2012; Schmitt et al., 2016).

A toxicidade do alumínio em solo ácido é uma das principais restrições para a produção de culturas em todo o mundo (Ryan e Kochian, 1993; Kochian, 1995; Nunes-Nesi et al., 2014). Várias espécies de plantas são susceptíveis à concentrações micromolares de Al, e a inibição do crescimento radicular é, certamente, a característica mais facilmente reconhecida como consequência da toxicidade do Al (Gupta et al., 2013; Schmitt et al., 2016).

A toxicidade do alumínio está relacionada com alterações na morfologia da raiz (Ciamporová, 2002; Kopittke et al., 2015). Diversos estudos já exploraram a ligação entre a toxicidade do Al e a inibição do crescimento radicular em plantas superiores (Matsumoto, 2000; Simonovicova et al., 2004; Tamás et al., 2005; Tamas et al., 2006; Silva, 2012; Gupta et al., 2013; Kopittke et al., 2015). O dano radicular causado durante a exposição prolongada ao Al, leva a subseqüentes deficiências na absorção de água e minerais e, eventualmente, influencia no crescimento e produtividade da planta (Jones e Kochian, 1995; Barceló e Poschenrieder, 2002). Grande parte do Al absorvido do solo, penetra através do ápice da raiz, e pode chegar à epiderme e ao córtex e causar danos nesses locais (Silva, 2012; Kopittke et al., 2015).

Durante as últimas décadas os pesquisadores desenvolveram pesquisas afim de localizar o mecanismo pelo qual ocorre a rápida redução do crescimento da raiz após a exposição ao Al. Segundo esses estudos, a exposição ao Al interrompe a expansão celular através da desorganização de microtúbulos e microfilamentos nas células radiculares (Wallace e Andersen, 1984; Frantzios et al., 2001; Alessa e Oliveira, 2001). Ademais, o Al leva à redução da divisão celular e ao bloqueio da ação do citoesqueleto (Ciamporová, 2002; Panda et al., 2009; Silva, 2012). Grabski e Schindler (1995) também relataram o aumento significativo na tensão dos filamentos de actina durante a exposição prolongada ao Al em células de soja. Em raízes de plantas submetidas ao estresse por Al, as deformações morfológicas e estruturais podem ser facilmente manifestadas (Kopittke et al., 2015).

Além disso, a toxicidade do Al pode resultar em interações complexas do Al com elementos apoplásticos e simplásticos (Kochian et al., 2005). Sendo assim, a interação do Al com esses elementos pode interferir na absorção de Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ e NH_4^+ e outros cátions, estresse oxidativo, dinâmica do citoesqueleto, modificação da parede celular, interrupção das vias de sinalização, despolarização da membrana plasmática, interrupção nos processos de transporte celular, danos ao DNA, entre outros (Ryan e Kochian, 1993; Blancaflor et al., 1998; Sivaguru et al., 1999; Liu e Luan, 2001; Boscolo et al., 2003; Yamamoto et al., 2003; Tamas et al., 2004; Kochian et al., 2005; Ílles et al., 2006; Gupta et al., 2013).

A parede celular foi identificada como o alvo principal da toxicidade do alumínio. O alumínio é predominantemente acumulado na região apoplástica da raiz, que abrange, aproximadamente, 30% a 90% do Al acumulado nas células periféricas na planta (Doncheva et al. 2005 e Frantzios et al. 2005). Além de regular o crescimento e desenvolvimento da planta, a parede celular desempenha um papel importante na percepção e expressão da toxicidade de Al (Yang et al., 2011). O Al adsorvido nas células liga-se, principalmente, à matriz de pectina da parede celular, mais especificamente, nos grupos carboxílicos carregados negativamente (Chang et al., 1999). Dessa forma, a ligação forte e rápida do Al desintegra as propriedades estruturais e mecânicas da parede celular levando à diminuição da extensibilidade da parede (Kochian et al., 2005).

Devido às suas propriedades físico-químicas o Al apresenta uma forte interação com a superfície da membrana plasmática carregada negativamente e,

portanto, serve como primeiro alvo potencial para a toxicidade do Al^{3+} dentro do simplasma (Ishikawa e Wagatsuma, 1998). Após a ligação do Al, a estrutura e a função da membrana ficam comprometidos, resultando em susceptibilidade a oxidação e alteração do fluxo de íons (Kochian et al., 2015).

A exposição das plantas ao estresse por Al provoca a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos (Kochian et al., 2004) que podem causar danos oxidativos aos componentes celulares se a maquinaria antioxidante estiver sobrecarregada (Sivaguru et al., 2013). O desequilíbrio na produção de ROS, induzido por alumínio, e a alteração nas propriedades da parede celular, foram propostos como os dois fatores intrínsecos responsáveis pela toxicidade do Al em plantas. O próprio alumínio não é um elemento de transição, mas atua como catalisador na geração de ROS, que conduzem ao estresse oxidativo em plantas (Gupta et al., 2013).

As várias formas de ROS geradas nas células, induzem a peroxidação lipídica, danos ao DNA, desnaturação de proteínas, comprometimento da atividade enzimática, oxidação de carboidratos, e tudo isso pode resultar em morte celular programada. Apesar disso, as ROS atuam, principalmente, como moléculas de sinalização, regulando o crescimento, o desenvolvimento e os sistemas de defesa das plantas, mas o desequilíbrio na sua produção pode afetar o metabolismo celular como um todo (Noctor e Foyer, 1998; Gupta et al., 2013).

Para desintoxicar as células, as plantas empregam um complexo sistema antioxidante, enzimático e não enzimático. Os antioxidantes enzimáticos são a superóxido dismutase, catalase, peroxidases e enzimas do ciclo do ascorbato e glutationa. Do sistema antioxidante não enzimático, as plantas contam com a atuação do ascorbato, da glutationa, compostos fenólicos e carotenóides (Silva et al., 2000).

Em condições de estresse, as plantas podem modificar a síntese de seus metabólitos para conseguir se adaptar e sobreviver às pressões do ambiente (Arbona et al., 2013). Abordagens metabolômicas, que visam identificar alterações na síntese de carboidratos, intermediários do Ciclo do Ácido Tricarboxílico, aminoácidos e compostos do metabolismo secundário, são cada vez mais utilizadas para estudar estresses abióticos, incluindo tensões por íons (Obata e Fernie 2012; Arbona et al., 2013; Zhuang et al., 2014). Diversos metabólitos de baixo peso molecular, necessários ao crescimento e desenvolvimento das plantas, têm sido

relacionados às estratégias de tolerância das plantas aos estresses (Singh, et al., 2016).

Sob estresse por Al, a exsudação de ácidos orgânicos, tais como malato, citrato e oxalato, é um mecanismo importante de resistência das plantas à toxicidade desse metal (Kochian et al., 2015). Os ácidos orgânicos são exsudados a partir das raízes para a rizosfera e são capazes de fazer a quelação com as moléculas de Al livre (Al^{3+}). Essa quelação substitui o Al tóxico por moléculas estáveis e não fitotóxicas e é documentada como um dos mecanismos de resistência das plantas ao Al, ou seja, o mecanismo de exclusão. O mecanismo de exclusão é considerado o melhor mecanismo empregado pelas plantas contra o estresse por Al (Kochian et al., 2005).

Outro mecanismo de resistência das plantas ao Al é o mecanismo de tolerância. Esses mecanismos atuam na desintoxicação interna de Al e inclui, principalmente, a formação de complexos de Al com ácidos orgânicos e compostos fenólicos e seu sequestro em vacúolos, afim manter o baixo nível de Al livre no citosol e impedir a sua ação fitotóxica (Kochian et al., 2005).

Especialmente em soja, o citrato é o ácido orgânico melhor documentado para conferir resistência ao estresse por Al (Lu Zheng et al., 2014). Em raízes de plântulas de soja também pode ocorrer um espessamento de camadas de células da coifa, com secreção de mucilagem, na qual o Al se liga, o que reduz a sua entrada nas células, conferindo proteção contra a ação tóxica desse metal (Cai et al., 2011).

Dessa forma, a toxicidade do Al e a resistência em plantas cultivadas impulsiona inúmeras pesquisas envolvendo mecanismos morfológicos, fisiológicos e moleculares. Pesquisas sob condições controladas em espécies cultivadas são necessárias para caracterizar melhor os sítios de acúmulo e os processos envolvidos na resistência ao Al (Kochian, 2004).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Comparar os sítios de acúmulo do metal, possíveis danos estruturais e ultraestruturais, respostas bioquímicas, fisiológicas e metabólicas em raízes de dois cultivares de soja (sensível e tolerante), de modo a contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos na resistência ao Al nessa espécie.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos do Al sobre o crescimento de duas variedades de soja (Conquista e P98Y70);
- Determinar o acúmulo de Al e o estado nutricional das plantas nos diferentes tratamentos;
- Avaliar a anatomia e a ultraestrutura dos órgãos vegetativos e determinar possíveis sintomas de fitotoxidez e os sítios de acúmulo de Al;
- Avaliar o teor de peroxidação lipídica;
- Avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio;
- Avaliar a atividade de enzimas antioxidativas;
- Avaliar os teores de ascorbato e glutathionas;
- Avaliar os efeitos do Al sobre o perfil metabólico das duas variedades.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alessa L, Oliveira, L, (2001) Aluminum toxicity studies in *Vaucheria longicaulis* var. *Macounii* (Xanthophyta Tribophyceae) II. Effects on the F-Actin array. *Environmental and Experimental Botany* 45: 223–237.

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

Barceló J, Poschenrieder C (2002) Fast root growth responses, root exudates and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminum toxicity and resistance: a review. *Environmental and Experimental Botany* 48: 75–92.

Blancaflor EB, Jones DL, Gilroy S (1998) Alterations in the cytoskeleton accompany aluminum-induced growth inhibition and morphological changes in primary roots of maize. *Plant Physiology* 118: 159–172.

Boscolo PRS, Menossi M, Jorge RA (2003). Aluminum-induced oxidative stress in maize. *Phytochemistry* 6: 181–189.

Cai MZ, Wang FM, Li RF, Zhang S, Wang N, Xu G (2011) Response and tolerance of root border cells to aluminum toxicity in soybean seedlings. *Journal of Inorganic Biochemistry* 105: 966–971.

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

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

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

Frantzios G, Galati B, Apostolakos P (2005) Aluminum causes variable responses in actin filament cytoskeleton of the root tip cell of *Triticum furgidum*. *Protoplasma* 225: 129–140.

Frantzios G, Galatis B, Apostolakos P (2001). Aluminum effects on microtubule organization in dividing root tip cells of *Triticum turgidum*. II. Cytokinetic cells. *Journal of Plant Research* 114: 157–170.

Grabski S, Schindler M (1995) Aluminum induces rigor within the actin network of soybean cells. *Plant Physiology* 108(3): 897–901.

Guo JH, Liu XJ, Zhang Y, Shen JL, Han WX, Zhang WF, Zhang FS (2010) Significant acidification in major Chinese croplands. *Science* 327(5968): 1008–1010.

Gupta N, Gaurav SS, Kumar A (2013). Molecular basis of aluminium toxicity in plants: a Review. *Am. J. Plant Science* 4: 21–37.

Ílles P, Schlicht M, Pavlovkin J, Lichtscheidl I, Baluška F, Ovecka 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.

Ishikawa S, Wagatsuma T (1998) Plasma membrane permeability of root-tip cells following temporary exposure to Al ions is a rapid measure of Al tolerance among plant species. *Plant & Cell Physiology* 39: 516–525.

Jones D, Kochian, L (1995). Aluminum inhibition of the inositol 1,4,5-triphosphate signal transduction pathway in wheat roots; a role in aluminum toxicity? *Plant & Cell Physiology* 7: 1913–1922.

Kochian LV (1995) Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Plant & Cell Physiology* 46: 237–260.

Kochian LV, Hoekenga OA, Pineros MA (2004) How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annu. Rev. Plant Biology* 55: 459–493.

Kochian LV, Piñeros MA, Hoekenga, OA (2005) The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminium resistance and toxicity. *Plant and Soil* 274: 175–195.

Kochian LV, Piñeros MA, Liu J, Magalhães JV (2015) Plant Adaptation to Acid Soils: The Molecular Basis for Crop Aluminum Resistance. *Annual Review of Plant Biology* 66: 571-98.

Kopittke PM, Moore KL, Lombi E, Gianoncelli A, Ferguson BJ, Blamey F.P, Menzies NW, Nicholson TM, McKenna BA, Wang P, Gresshoff PM (2015) Identification of the primary lesion of toxic aluminum in plant roots. *Plant Physiology* 167: 1402–1411.

Lin SL, Wu L, (1994) Effects of copper concentration on mineral nutrient uptake and copper accumulation in protein of copper-tolerant and nontolerant *Lotus purshianus* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 29 (2): 214–228.

Liu K, Luan S (2001) Internal aluminum block of plant inward K⁺ channels. *Plant Cell* 13: 1453–1465.

Matsumoto H (2000) Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. *International Review of Cytology* 200: 1–46.

Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 249–279.

Nunes-Nesi A, Brito DS, Inostroza-Blancheteau C, Fernie AR, Araújo WL (2014) The complex role of mitochondrial metabolism in plant aluminum resistance. *Trends in Plant Science* 19: 399–407.

Obata T, Fernie AR (2012) The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. *Cellular and Molecular Life Sciences* 69: 3225–3243.

Panda, S.K., Baluška, F., Matsumoto, H., 2009. Aluminum stress signalling in plants. *Plant Signaling & Behavior* 4: 592–597.

Rengel Z, Reid RJ (1997) Uptake of Al across the plasma membrane of plant cells. *Plant and Soil* 192: 31–35.

Ryan PR, Kochian LV (1993) The interaction between aluminum toxicity and calcium uptake at the root apex in near-isogenic lines of wheat (*Triticum aestivum* L.) differing in aluminum tolerance. *Plant Physiology* 102: 975–982.

Schmitt M, Watanabe T, Jansen S (2016). The effects of aluminium on plant growth in a temperate and deciduous aluminium accumulating species. *AoB Plants* 8: plw065.

Silva S (2012) Aluminium toxicity targets in plants. *Journal of Botany* 219462: 1–8.

Simonovicova M, Tamas L, Huttova J, Mistrik I (2004) Effect of aluminium on oxidative stress related enzymes activities in barley roots. *Biologia Plantarum* 48: 261–266.

Singh S, Parihar P, Singh R, Singh VP, Prasad SM (2016) Heavy Metal Tolerance in Plants: Role of Transcriptomics, Proteomics, Metabolomics, and Ionomics. *Plant Science* 6: 1143.

Sivaguru M, Liu J, Kochian LV (2013) Targeted expression of SbMATE in the root distal transition zone is responsible for sorghum aluminum resistance. *The Plant Journal* 76: 297–307.

Sivaguru M, Baluška F, Volkmann D, Felle HH, Horst WJ (1999) Impacts of aluminum on the cytoskeleton of the maize root apex. Short-term effects on the distal part of the transition zone. *Plant Physiology* 119 (3): 1073–1082.

Tamás L, Budíková S, Huttová J, Mistrik I, Šimonovicová M, Šíroká B (2005) Aluminum-induced cell death of barley-root border cells is correlated with peroxidase-and oxalate oxidase-mediated hydrogen peroxide production. *Plant cell reports* 24 (3): 189–194.

Wallace SU, Andersen IC (1984) Aluminum toxicity and DNA synthesis in wheat roots. *Agronomy journal American Society of Agronomy* 76: 5–8.

Yamamoto Y, Kobayashi Y, Devi SR, Rikiishi S, Matsumoto H (2003) Oxidative stress triggered by aluminum in plant roots. *Plant and Soil* 255: 239–243.

Yang JL, Zhu XF, Peng YX, Zheng C, Li GX, Liu Y, Shi YZ, Zheng SJ (2011) Cell wall hemicellulose contributes significantly to aluminum adsorption and root growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 155: 1885–1892.

Zhuang J, Zhang J, Hou XL, Wang F, Ai-Sheng Xiong AS (2014) Transcriptomic, Proteomic, Metabolomic and Functional Genomic Approaches for the Study of Abiotic Stress in Vegetable Crops. *Critical Reviews in Plant Sciences* 33: 2-3.

Capítulo 1

Efeitos tóxicos do alumínio em raízes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill): uma abordagem fisiológica e morfoanatômica

Resumo

SILVA, Cíntia Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2018. Efeitos do alumínio em raízes de soja: alterações morfoanatômicas, fisiológicas e metabólicas. Orientador: Cleberson Ribeiro

O primeiro sintoma detectável em plantas expostas a concentrações tóxicas de Al é a diminuição do alongamento radicular. Embora esse sintoma seja amplamente estudado em diversas culturas, as razões subjacentes aos seus efeitos tóxicos ainda são evasivas. O presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos tóxicos do Al sobre o crescimento, a morfologia, o estado nutricional e os sítios de acúmulo em raízes de dois cultivares de soja, P98Y70 e Conquista. O tempo experimental foi composto de 24, 48 e 72h. As plântulas foram mantidas em tratamentos contendo solução de Clark, com 0 e 100µM de Al (AlCl₃), pH 4,0 e aeração constante. A fim de alcançar os nossos objetivos, foram avaliados o alongamento relativo da raiz, diagnose visual, concentrações de K, Ca, Mg e P, teor relativo de Al no ápice da raiz, detecção de células em processo de morte celular, detecção histoquímica de Al e análise dos danos estruturais externos nas raízes. O alongamento relativo foi maior no cultivar Conquista ao longo dos três tempos de exposição ao Al. As raízes apresentaram alterações morfológicas, como engrossamento e curvatura do ápice, para ambos os cultivares e tempos de tratamento. O acúmulo de Al não diferiu entre os cultivares e os tempos de tratamento. O Al afetou as concentrações de K, sobretudo para o cultivar P98Y70. As concentrações de Ca e Mg reduziram nos dois cultivares após os três tempos de exposição ao Al. O Al não alterou a concentração de P em nenhum cultivar de soja. P98Y70 apresentou maior porcentagem relativa de Al na coifa e na zona meristemática, enquanto o cultivar Conquista apresentou maiores porcentagens na zona de alongamento. Ambos os cultivares apresentaram processos de morte celular no ápice radicular. Entretanto, para o cultivar P98Y70, esse processo mostrou-se mais difuso e recorrente. Para o teste de detecção de Al com hematoxilina, em 24 horas o cultivar P98Y70 apresentou coloração mais

intensa no ápice. No resultado positivo do corante Chrome Azurol'S foi possível observar acúmulo de Al nas células da coifa e nas células da epiderme. Nessas células o Al se aderiu principalmente à parede celular. No Cultivar P98Y70 foi observado a presença de Al na região do meristema apical, mostrando a interiorização desse elemento nos tecidos radiculares. Após os três tempos de tratamento com Al foi possível observar, em ambos cultivares, o aparecimento de danos estruturais na coifa e rupturas nas células epidérmicas da raiz. No cultivar Conquista foi detectada a presença de mucilagem. P98Y70 apresentou maior sensibilidade ao Al, uma vez que o acúmulo desse elemento nas raízes provocou alterações anatômicas, morfológicas e fisiológicas que contribuíram para a inibição do alongamento radicular. Por outro lado, Conquista mostrou-se mais tolerante à presença tóxica do Al.

Palavras-chave: Alumínio, Alongamento radicular, Coifa, Sítios de acúmulo.

1. INTRODUÇÃO

Os solos ácidos constituídos por elevadas concentrações de alumínio (Al) solúvel compreendem 40% das terras agricultáveis do mundo (Eswaran et al., 1997). O Brasil é o segundo maior produtor de soja (*Glycine max* (L.) Merrill), sendo o Centro-Oeste a maior região produtora no país. A estimativa para a safra de 2017/2018 é de 107 milhões de toneladas, ficando atrás apenas dos EUA, com 115 milhões de toneladas produzidas (CONAB, 2017). A região Centro-Oeste abriga o segundo maior bioma brasileiro e a maior fronteira agrícola do país, apresentando solos ácidos com alto teor de Al disponível (Furley e Ratter, 1998; Oliveira-Filho e Ratter, 2002). A toxicidade desse metal é uma das principais restrições no campo para a produtividade agrícola, ficando atrás apenas das restrições impostas pelo déficit hídrico (Singh et al., 2011).

O Al no solo pode ser absorvido/adsorvido pelas raízes afetando diversos processos biológicos e físicos que, conseqüentemente irão resultar na inibição do crescimento da raiz (Famoso et al., 2010; Gupta, Gaurav e Kumar, 2013). Na célula, o Al pode interagir com diferentes regiões, tais como paredes, membranas plasmáticas, mitocôndrias, cloroplastos e núcleo. Essa interação pode resultar em danos estruturais e alterações funcionais que irão afetar diversas rotas do metabolismo das plantas (Kochian et al., 2015). Os mecanismos envolvidos na inibição do crescimento da raiz ainda não são inteiramente compreendidos, e continua incerto se os danos causados pelo Al ocorrem no apoplasto e/ou no simplasto (Horst et al. 2010).

Um dos primeiros sintomas detectáveis da toxicidade do Al é a inibição do crescimento radicular (Horst et al. 1992; Delhaize e Ryan, 1995), resultando em um sistema radicular danificado que irá limitar a absorção de água e nutrientes (Kochian et al., 2004). A rapidez dessa resposta indica uma inibição inicial na expansão e no alongamento, e posteriormente na divisão celular (Kochian, 1995). A inibição da expansão e do alongamento celular induzida pelo Al, está relacionada com a via apoplástica (Host et., 2010; Kariya et al., 2017; Zhu et., 2017). Essa via é considerada a principal rota de acúmulo de Al nas raízes (30 a 80% de todo o Al absorvido), na qual estão as ligações de todas as paredes celulares e espaços intercelulares. Dessa forma, a inibição do crescimento radicular em plantas sensíveis ao Al pode ocorrer minutos ou horas após a exposição à baixas concentrações

desse metal, e geralmente, aceita-se que a parede celular seja o alvo principal da toxicidade do Al (Safari et al., 2017).

O acúmulo de Al no apoplasto ocorre, principalmente, devido à sua ligação com as cargas negativas dos grupamentos carboxílicos das pectinas (^-COOH) (Gao et al., 2014; Sun et al., 2016). Como forma de diminuir as cargas negativas livres, as pectinas podem ser metiladas por enzimas metil-transferases, resultando na redução da capacidade de ligação do Al (Zhang e Yang 2005, Li et al., 2017). A capacidade das células em alterar o grau de metilação das pectinas, caracteriza-se como uma das principais estratégias de tolerância ao estresse, e a principal causa das diferenças genotípicas encontradas entre as espécies (Kochian et al., 2015).

A interação do Al com os componentes químicos da parede celular pode ocasionar mudanças nas suas propriedades, como redução na plasticidade e alterações na atividade das proteínas expansinas. Dependendo do tempo de exposição e da concentração, o Al pode aumentar a rigidez da parede e conseqüentemente, induzir rupturas nas células da epiderme e do córtex, contribuindo para a redução do alongamento radicular (Kochian et al., 2015).

A inibição do alongamento radicular causada pelo Al também pode estar relacionada com o processo de morte celular, que está intimamente ligado à perda de integridade da membrana (Sanjib e Frantis, 2015). Recentemente, Kariya et al. (2017) correlacionaram a inibição do alongamento radicular com o aumento nas taxas de morte celular em raízes de tabaco expostas ao Al.

A absorção de nutrientes essenciais do solo e seu transporte na planta também é afetada em presença de Al, com destaque para a inibição da absorção de alguns cátions como Ca^{2+} (62%), NH_4^{+} (40%), Mg^{2+} (13%), e aumento no influxo de ânions como NO_3^- (44%) e PO_4^{3-} (17%) (Gupta, Gaurav e Kumar, 2013). Esse desbalanço nutricional afeta diversas etapas do desenvolvimento da planta, como: redução do processo de divisão celular no ápice da raiz e nas raízes laterais, redução da taxa de respiração radicular, redução da taxa de replicação do DNA e aumento da rigidez da dupla hélice, aumento da rigidez da parede celular por ligações cruzadas de pectina e interferência na atividade enzimática de fosforilação (Gupta, Gaurav e Kumar, 2013).

Embora exista variações para a resistência ao Al em genótipos de soja (Menosso et al., 2000; Silva et al., 2000), a espécie é relativamente sensível à acidez do solo em comparação com outras culturas (Yang et al., 2011). A identificação de

sítios de acúmulo e de mecanismos envolvidos na resistência ao Al nessas plantas constitui um avanço no conhecimento científico, que pode ser usado como fonte de subsídios para o melhoramento genético, viabilizando o cultivo em solos ácidos e com elevada concentração de Al.

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivos avaliar os efeitos do alumínio sobre o crescimento, a morfologia e o estado nutricional de raízes de dois cultivares de soja, e identificar os diferentes sítios de acúmulo desse metal nos tecidos radiculares.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO

A escolha dos cultivares a serem utilizados no presente trabalho, deu-se através de experimentos prévios que objetivaram classificar esses cultivares de acordo com o nível de tolerância ao Al. Nesse contexto, por meio de análises de alongamento radicular, dois cultivares se destacaram como resistente e sensível, foram eles, Conquista e P98Y70, respectivamente. Sementes dos dois cultivares de soja (Conquista e P98Y70) foram adquiridas através do Banco de Sementes do Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja do Bioagro na UFV. As sementes foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 5% durante 5 minutos, sendo em seguida lavadas em água destilada. Posteriormente, as sementes foram germinadas em rolos de papel germitest umedecidos com solução de germinação ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}/100 \mu\text{M}$) pH 7,0 e mantidas em sala de crescimento com temperatura e umidade controladas. Após três dias no escuro, os rolos foram expostos à luz e permaneceram por mais três dias em sala de crescimento. No sétimo dia as plântulas foram transferidas para solução de Clark (1975), pH 4,0, para aclimação por 24 horas, e mantidas em fotoperíodo de 16/8h, sob aeração constante e temperatura controlada de 25°C (± 2).

2.2 IMPLEMENTAÇÃO DOS EXPERIMENTOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Após a aclimação as plantas saudáveis e padronizadas quanto ao tamanho e forma, foram selecionadas e transferidas para os tratamentos. As plantas foram cultivadas em solução de Clark (1975), pH 4,0, sob aeração constante em vasos com capacidade para 2L, sob fotoperíodo de 16/8h e temperatura controlada de 25°C (± 2). O experimento foi composto por 2 tratamentos (0 e 100 µM de Al, na forma de AlCl₃), 3 períodos experimentais (24, 48 e 72 horas) e 5 repetições (4 plantas por repetição) dispostas em delineamento inteiramente casualizado. O pH foi ajustado diariamente para 4,0.

2.3 ALONGAMENTO RELATIVO DA RAIZ

O alongamento da raiz foi avaliado com régua graduada no início e ao final de cada tempo. A medição do comprimento da raiz foi realizada do hipocótilo até o ápice da raiz principal. As taxas de alongamento relativo (AR) foram calculadas por meio da equação:

$$AR = \frac{\text{alongamento final (+Al)} - \text{alongamento inicial (+Al)}}{\text{alongamento final (controle)} - \text{alongamento inicial (controle)}} * 100$$

2.4 DIAGNOSE VISUAL

Durante o período experimental foram realizadas observações diárias das plantas com o intuito de caracterizar possíveis alterações visuais nas raízes, causadas pela exposição ao Al. Ao final de cada tempo experimental, os sintomas de fitotoxidez foram documentados com auxílio de câmera digital (Nikon colpix P510).

2.5 ACÚMULO DE AL E ESTADO NUTRICIONAL

As raízes foram coletadas, lavadas e secas em estufa de ventilação forçada à 70°C e moídas em moinho de facas. Amostras de 0,1g foram digeridas em solução nitroperclórica (2:1) em bloco digestor com temperatura controlada em torno de 100 a 120 °C até a completa oxidação do material vegetal (Marin et al., 1993). As concentrações de Alumínio (Al), Cálcio (Ca), Potássio (K), Magnésio (Mg) e Fósforo (P), foram determinadas por espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (Perkin Elmer, Shelton, CT, EUA).

2.6 AVALIAÇÃO DO TEOR RELATIVO DE AL NOS ÁPICES RADICULARES POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA COM ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS-X ACOPLADA (MEV-EDS)

Ápices radiculares, de aproximadamente 0.5 cm, foram obtidos a partir das raízes principais, coletados e fixados em glutaraldeído 2,5%. Em seguida, foram desidratados em série etílica, secos com CO₂ em equipamento de ponto crítico (CPD 030, Baltec, Liechtenstein), fixados em suporte de alumínio e cobertos com carbono no evaporador de carbono (Q150T, Quorum Technologies, Ashford, Kent, UK). O material, após observação em microscópio eletrônico de varredura (Leo 1430VP, Cambridge, Inglaterra), foi analisado por sonda de raios-X acoplada, para avaliação da distribuição e do teor relativo do Al, P, K, S, Ca, Fe. Para essa avaliação, foram analisadas três regiões: ápice, zona meristemática e zona de alongamento.

2.7 ANÁLISES ANATÔMICAS E TESTES HISTOQUÍMICOS

2.7.1 DETECÇÃO DE CÉLULAS EM PROCESSO DE MORTE CELULAR

Para avaliar a morte celular foi realizado o teste com Azul de Evans em amostras de ápices radiculares de aproximadamente 1cm, após o término de cada período experimental. Os ápices radiculares foram imersos por 40 minutos em solução de Azul de Evans 0,1%, seguido de lavagem em água destilada (Kato et al., 2007). As células mortas foram coradas em azul, com variação entre azul claro (menor degradação da membrana celular) e azul escuro (maior degradação da membrana celular) (Faoro e Iriti, 2005).

2.7.2 COLORAÇÃO DOS ÁPICES RADICULARES POR HEMATOXILINA

O acúmulo de Al nos ápices radiculares foi analisado pela coloração com hematoxilina férrica (Polle et al., 1978). Após exposição das plantas aos tratamentos controle e Al, as raízes foram mergulhadas em solução de hematoxilina férrica 0,2% (p/v) em NaIO₃ 0,02% (p/v), durante 15 minutos. Para eliminar o excesso de corante, as raízes foram transferidas para recipientes contendo água deionizada e lavadas por 30min. Finalmente, as raízes foram coletadas e fotografadas em

estereomicroscópio. A reação positiva da hematoxilina com o Al é comprovada pela coloração arroxeada.

2.7.3 COLORAÇÃO DOS ÁPICES RADICULARES COM CHROME AZUROL'S

Ápices radiculares de 0,5cm foram coletados e fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2 (Karnovsky, 1965 modificado). Posteriormente, as amostras foram desidratadas em série etílica e incluídas em metacrilato (Historesin, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha). Secções longitudinais com 5 µm de espessura foram obtidas com auxílio de micrótomo rotativo de avanço automático (RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, EUA) e submetidas à coloração com Chrome Azurol'S 0,5% (Kukachka e Miller, 1980). Após 1 hora as secções foram lavadas em água destilada e montadas em Permount. Os cortes foram avaliados e fotografados em microscópio de luz (Olympus AX70TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) equipados com câmera fotográfica (Axio Vision Release 4.8.1, Carl Zeiss Vision, Alemanha).

2.8 ANÁLISE DA MICROMORFOLOGIA DOS ÁPICES RADICULARES EM MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA (MEV)

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

2.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram submetidos à análise de variância ANOVA, sendo as médias comparadas com o Teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas utilizando o software RBIO (Biometria no R) (Bhering 2017).

3. RESULTADOS

Na presença de Al houve redução no alongamento radicular (AR) do cultivar P98Y70, sendo sempre menor que 80%, independente do tempo de avaliação. Por outro lado, o cultivar Conquista apresentou acréscimo no AR após exposição ao Al, sendo superior ao cultivar P98Y70 em todos os tempos de exposição ao Al (Figura 1). Assim, em comparação com o cultivar Conquista, o cultivar P98Y70 mostrou-se mais sensível ao tratamento com Al.

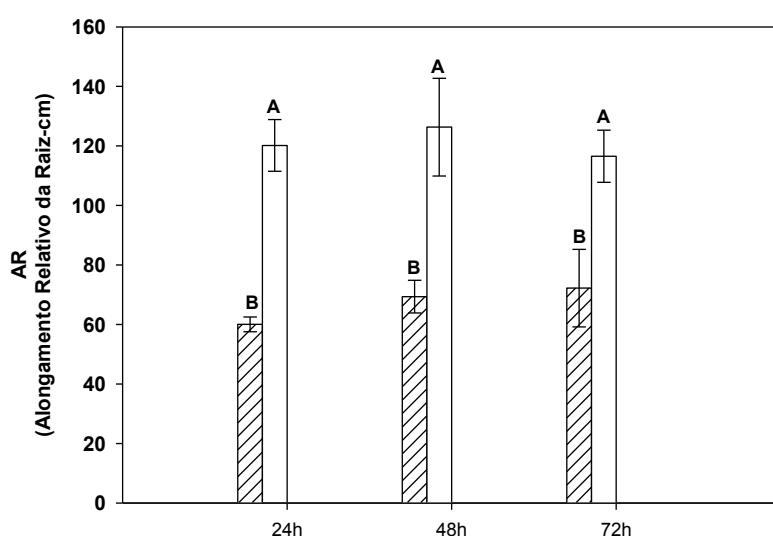


Figura 1: Efeito do Al sobre o alongamento relativo da raiz em dois cultivares de soja P98Y70 (▨) e Conquista (□) após 24, 48 e 72 horas de exposição aos tratamentos controle (0 μ M) e Al (100 μ M). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre os cultivares, dentro do mesmo tempo, não diferem pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade. As barras representam o erro padrão.

Após exposição ao Al, as raízes apresentaram alterações morfológicas, como engrossamento e curvatura do ápice, para ambos os cultivares e tempos de tratamento. O cultivar Conquista apresentou melhor desempenho visual, pois possui maior número de raízes secundárias em comparação ao cultivar P98Y70, além de maior alongamento radicular (Figura 2).



Figura 2: Alterações morfológicas em raízes de dois cultivares de soja P98Y70 e Conquista, após 24, 48 e 72 horas de exposição ao tratamento com Al (100 μ M).

Independentemente do tempo de avaliação, a concentração de Al aumentou cerca de 15 a 30 vezes em ambos cultivares após exposição ao Al. O acúmulo de Al nos tecidos radiculares não diferiu entre os cultivares após tratamento com Al em nenhum dos tempos avaliados (Figura 3).

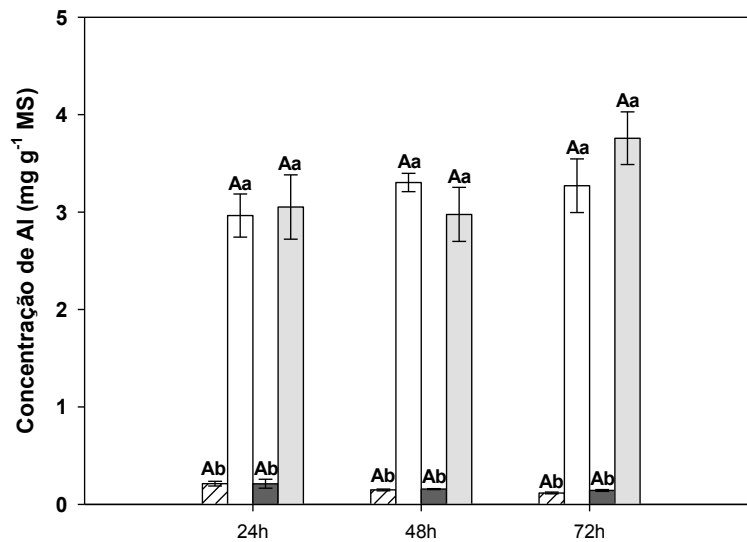


Figura 3: Concentração de Alumínio (Al), em raízes de dois cultivares de soja, P98Y70-controle (▨), P98Y70-100μM Al (□), Conquista-controle (■), Conquista-100μM Al (▩). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, entre cultivares para um mesmo tratamento e pela mesma letra minúscula, entre tratamentos para um mesmo cultivar, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão da média.

Independente da presença de Al, a concentração de K foi sempre maior no cultivar Conquista após 24 horas de tratamento. Após 72 horas de tratamento com Al, o cultivar P98Y70 apresentou redução na concentração de K, ficando 33% menor em relação ao mesmo tratamento para o cultivar Conquista (Figura 4A). A concentração de Ca reduziu nos dois cultivares de soja após 24, 48 e 72 horas de exposição ao Al. No tempo de 24 horas, independente da presença de Al, a concentração de Ca foi sempre maior no cultivar Conquista (Figura 4B). A concentração de Mg também reduziu nos dois cultivares de soja após 24, 48 e 72 horas de exposição ao Al. Na ausência de Al, a concentração de Mg foi maior no cultivar Conquista para os tempos de 24 e 48 horas (Figura 4C). O Al não alterou a concentração de P em nenhum cultivar de soja. Entretanto, a concentração deste elemento foi maior no tratamento controle e com Al do cultivar Conquista após 24h de avaliação (Figura 4D).

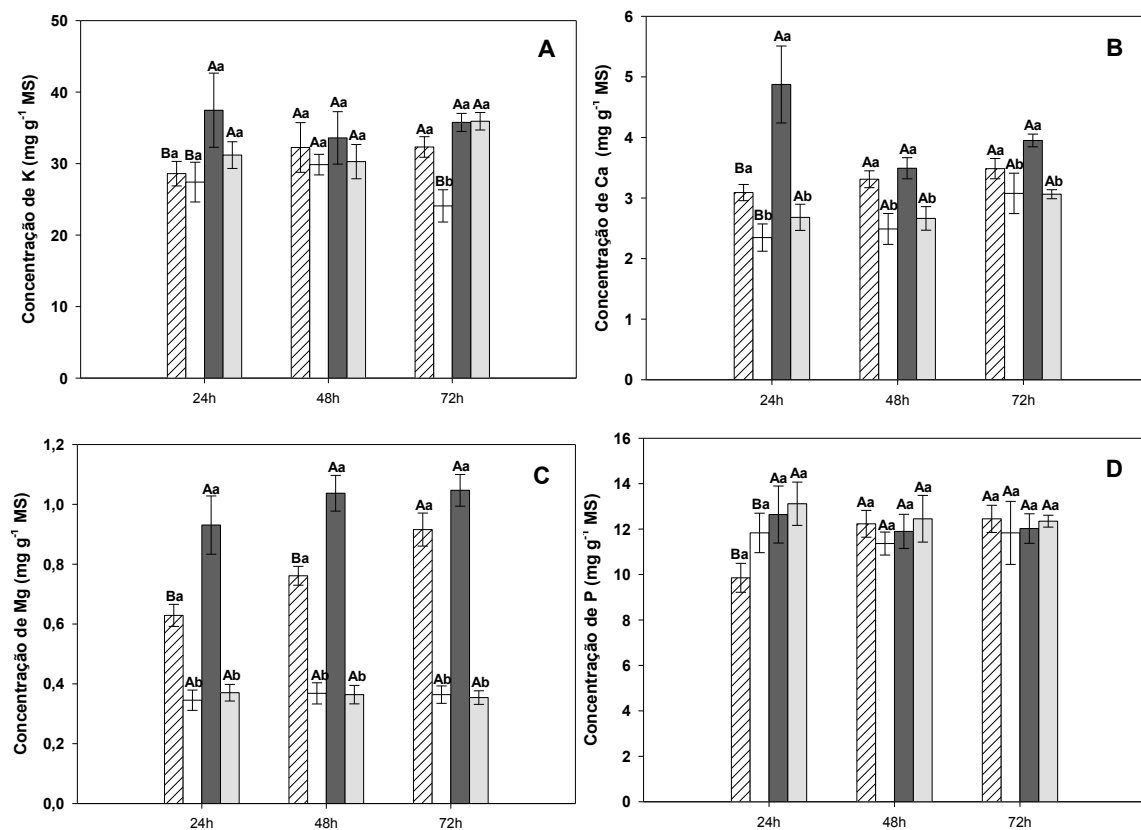


Figura 4: Concentração de potássio (A), cálcio (B), magnésio (C) e fósforo (D) em raízes de dois cultivares de soja, P98Y70 e Conquista, após 24, 48 e 72 horas de exposição aos tratamentos controle e alumínio (100 µM). P98Y70-controle (▨), P98Y70-100µM Al (□), Conquista-controle (■), Conquista-100µM Al (▤). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, entre cultivares para um mesmo tratamento e pela mesma letra minúscula, entre tratamentos para um mesmo cultivar, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão da média.

Os resultados da microanálise de raio-x acoplada à microscopia eletrônica de varredura evidenciaram a porcentagem de Al em relação aos outros elementos químicos analisados, P, K, S, Ca, Fe (resultados aqui não demonstrados). De modo geral, os resultados demonstraram, para ambos cultivares, aumento no teor relativo (%) de Al nas três diferentes regiões da raiz: coifa, zona meristemática e zona de alongamento após tratamento com 100 µM desse metal. Os controles de ambos os cultivares apresentaram baixa porcentagem de Al para as três regiões analisadas (Tabela 1).

Após 24 horas de exposição ao Al, o cultivar P98Y70 apresentou maior porcentagem de Al na coifa (15,81%), quando comparado ao cultivar Conquista (9,16%) (Tabela 1). Na zona meristemática, os cultivares expostos ao Al apresentaram porcentagens iguais, não havendo diferenças entre eles. Ainda para o tempo de 24 horas, na zona de alongamento, o cultivar Conquista apresentou a

maior porcentagem (8,42%), e o cultivar P98Y70, apresentou menor taxa relativa de Al (6,29%) (Tabela 1).

Após 48 horas de exposição ao metal, as porcentagens de Al na coifa dos dois cultivares não diferiram. Entretanto, P98Y70 apresentou maior porcentagem de Al na zona meristemática (11,24%). As porcentagens de Al não diferiram na zona de alongamento após 48 horas de exposição ao metal (Tabela 1).

As porcentagens de Al não diferiram na região da coifa para ambos os cultivares após 72 horas de exposição ao Al. Na zona meristemática e na zona de alongamento, o cultivar Conquista apresentou maior porcentagem de Al em comparação ao cultivar P98Y70, 20,20% e 18,54%, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1: Teor relativo de Al (%), determinada por Microscopia Eletrônica de Varredura, com sonda de raio-X acoplada (MEV-EDS), em três regiões da raiz (Coifa, Zona Meristemática e Zona de Alongamento) em dois cultivares de soja, P98Y70 e Conquista, após exposição aos tratamentos controle (0 μ M) e Al (100 μ M) durante 24, 48 e 72 horas.

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre cultivares para um mesmo tratamento, e pela mesma letra minúscula entre tratamentos para um mesmo cultivar, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

CULTIVARES	REGIÕES RADICULARES ANALISADAS			TEMPO
	Coifa	Zona Meristemática	Zona de Alongamento	
P98Y70 Controle	4,31 Ab	3,74 Ab	5,08 Aa	24 horas
P98Y70 Al	15,81 Aa	6,63 Aa	6,29 Ba	
Conquista Controle	4,12 Ab	4,25 Ab	4,44 Ab	
Conquista Al	9,16 Ba	6,56 Aa	8,42 Aa	
P98Y70 Controle	3,90 Ab	3,08 Ab	4,05 Ab	48 horas
P98Y70 Al	9,59 Aa	11,24 Aa	8,72 Aa	
Conquista Controle	3,98 Ab	3,75 Aa	4,17 Ab	
Conquista Al	11,79 Aa	6,58 Ba	10,83 Aa	
P98Y70 Controle	4,70 Ab	3,46 Ab	4,19 Ab	72 horas
P98Y70 Al	15,76 Aa	10,98 Ba	9,98 Ba	
Conquista Controle	4,62 Ab	4,16 Ab	4,80 Ab	
Conquista Al	15,68 Aa	20,20 Aa	18,54 Aa	

Após exposição dos ápices radiculares ao corante Azul de Evans, as raízes tratadas com Al apresentaram coloração azul, que evidencia morte celular. As raízes do tratamento controle não coraram ou apresentaram fraca coloração azul, resultado da menor taxa de morte celular nessas raízes (Figura 5). Para ambos cultivares,

após 24h de tratamento, a coloração azul foi mais intensa por toda a extensão da raiz (Figura 5A e 5D). Para os tempos de 48h (Figura 5B, 5E) e 72h (Figura 5C, 5F) a coloração foi mais intensa no ápice radicular, para ambos os cultivares. Entretanto, para o cultivar P98Y70 foi possível detectar maior intensidade e distribuição da cor azul, evidenciando processo de morte celular mais difuso e recorrente (Figura 5B, 5C).

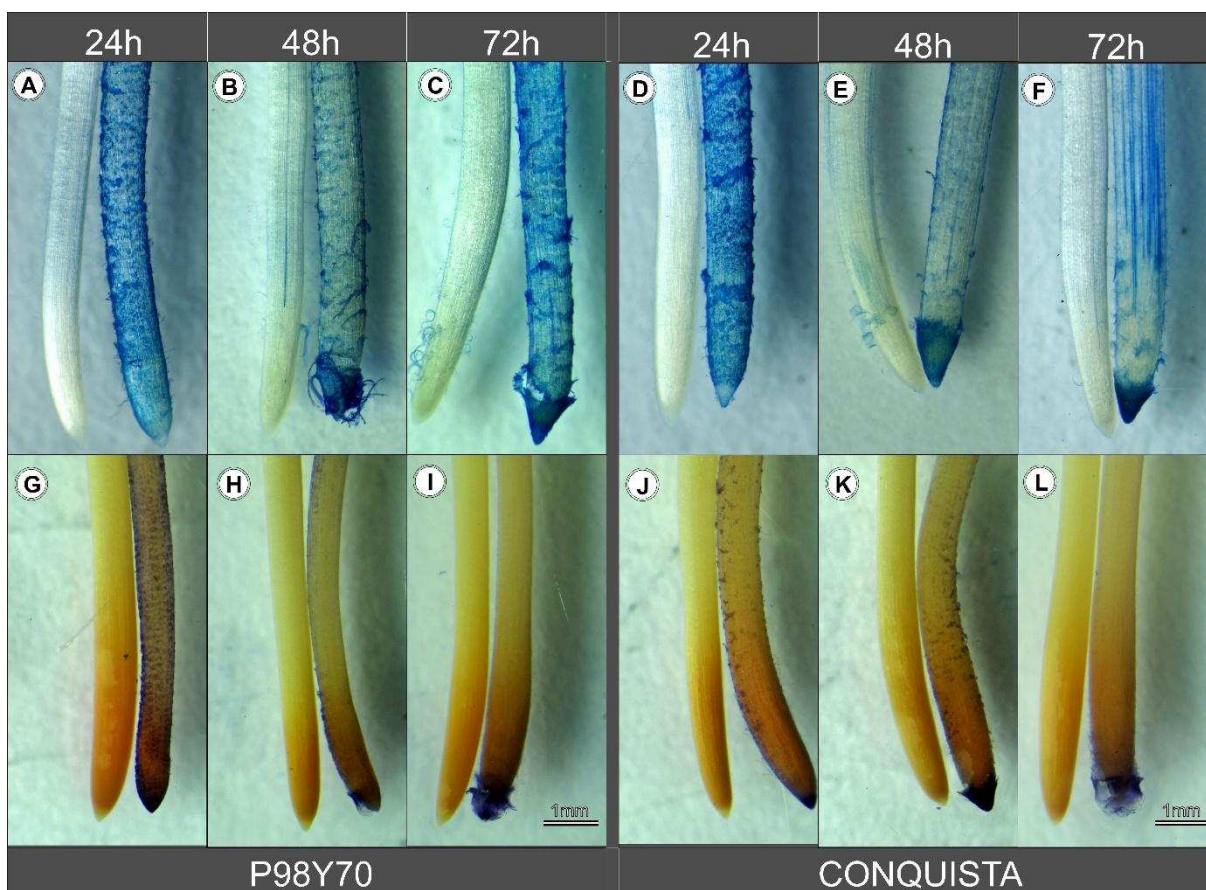


Figura 5: Detecção de morte celular através da coloração com Azul de Evans (A, B, C, D, E, F) e detecção de Al após coloração com Hematoxilina (G, H, I, J, K, L) em ápices radiculares de dois cultivares de soja (P98Y70 e Conquista) após exposição ao Al por 24, 48 e 72h. Todas as fotos são constituídas por raiz de tratamento controle, seguida por raiz de tratamento com Al.

Quando os ápices radiculares foram submetidos à coloração com hematoxilina, as raízes das plantas tratadas com Al apresentaram coloração arroxeada, característica da reação positiva desse corante com o Al. As raízes do tratamento controle não foram coradas, evidenciando ausência de Al (Figura 5G, H, I, J, K, L). No tempo de 24h, o cultivar P98Y70 apresentou coloração arroxeada mais intensa na região do ápice e difusa pela extensão da raiz (Figura 5G). Após 24

horas, a marcação por hematoxilina ficou mais restrita ao ápice radicular, principalmente com 72 horas de tratamento com Al (Figuras 5I e L).

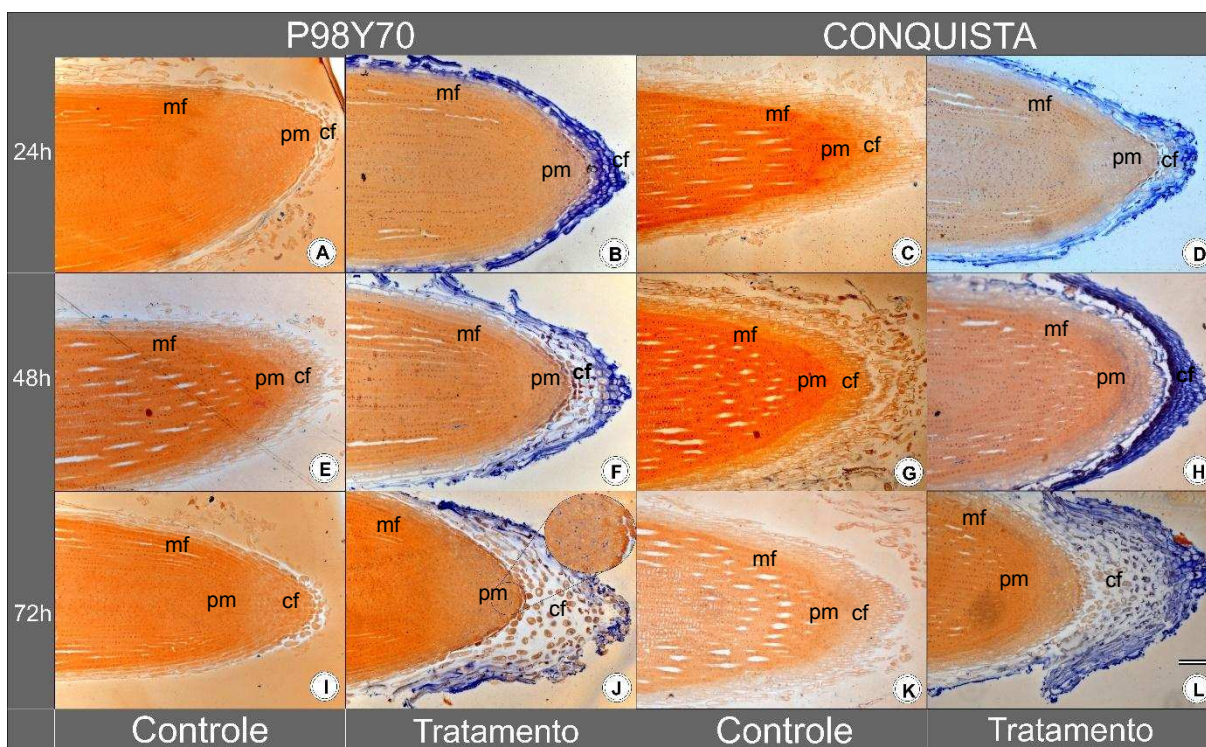


Figura 6: Histolocalização de Al pela reação com o corante Chrome Azurol'S 0,5% em corte longitudinal de ápices de raízes de dois cultivares de soja, P98Y70 e Conquista, após 24, 48 e 72 horas de exposição aos tratamentos controle e alumínio 100µM. Escala: 100µm. cf – coifa; pm – promeristema; mf – meristema fundamental.

O resultado positivo do corante Chrome Azurol'S com Al é evidenciado pela cor azul (Figuras 6B, D, F, H, J, L). Nos tratamentos controle observou-se ausência de cor azul, demonstrando não haver presença detectável de Al nessas raízes (Figura 6A, C, E, G, I, K). Já nos tratamentos com Al, foi possível observar acúmulo deste metal, sobretudo, nas células da coifa (Figura 6B, D, F, H, J e L). Nessas células o Al ligou-se, principalmente à parede celular (Figura 6H). Na Figura 6J é possível observar a presença de Al na região do meristema apical, mostrando a interiorização desse elemento nos tecidos radiculares.

As análises de micromorfologia mostraram que as raízes dos dois cultivares apresentaram aspecto íntegro no tratamento controle (Figuras 7A e E). Na raiz do cultivar Conquista, sob tratamento controle, foi possível observar acúmulo de mucilagem na região próxima à coifa (Figura 7E). Após 24, 48 e 72h de tratamento com Al foi possível observar em ambos cultivares o aparecimento de danos estruturais na coifa e rupturas nas células epidérmicas da raiz (Figura 7B, F, C, G, D

e H). Esses resultados coincidem com os encontrados para a histolocalização do Al, que foi, predominantemente acumulado na coifa e nas células epidérmicas da raiz. Pelas imagens de MEV, não foi possível diferenciar níveis de tolerância entre os dois cultivares.

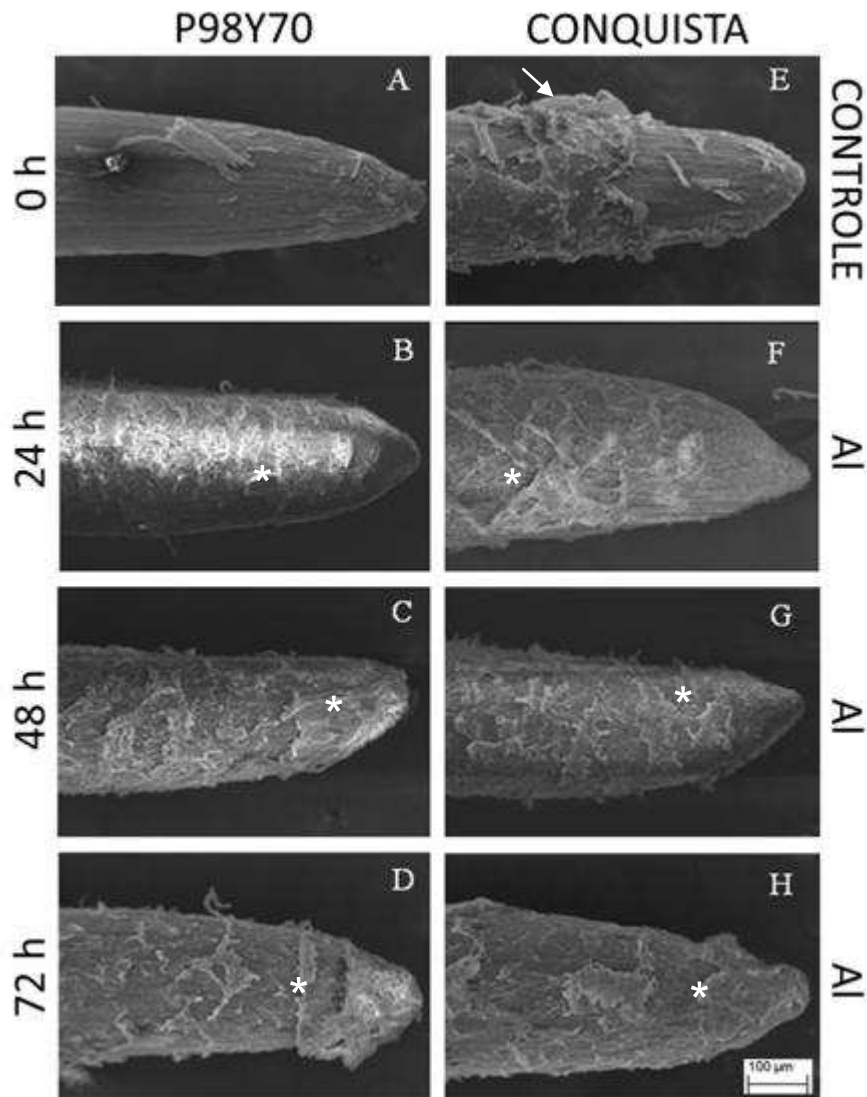


Figura 7: Micromorfologia por Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) de ápices radiculares de dois cultivares de soja, P98Y70 e Conquista, após 24, 48 e 72h de exposição aos tratamentos controle e Al (100μM). Aumento de 250X. Barra 100 μm. Danos estruturais (*). Acúmulo de mucilagem (Seta).

4. DISCUSSÃO

O primeiro sintoma detectável da toxicidade do alumínio (Al) é a rápida inibição do crescimento radicular (Horst et al., 1992, Delhaize e Ryan, 1995),

resultando em um sistema de raiz danificado que limita a absorção de água e nutrientes (Kochian et al., 2004). O mecanismo pelo qual o Al reduz o crescimento da raiz ainda não é completamente compreendido (Horst et al. 2010), mas estudos demonstram que o Al solúvel interfere em uma variedade de processos nas raízes, incluindo danos à integridade das membranas celulares (Yamamoto et al., 2001), inibição das funções mitocondriais (Yamamoto et al., 2002), inibição da divisão celular (Doncheva et al., 2005), inibição das proteínas da parede celular, como a expansina (Cosgrove, 2005), e rigidez da parede celular (Jones et al., 2006).

Neste trabalho, constatamos que a presença do Al foi tóxica e determinante para a redução do alongamento da raiz. O cultivar P98Y70 apresentou-se mais sensível à toxicidade do Al, por apresentar redução na taxa de alongamento radicular após tratamento com Al. Adicionalmente, o cultivar Conquista evidenciou maior alongamento radicular na presença de Al. A quantificação de Al nas raízes corrobora a maior sensibilidade do cultivar P98Y70, pois ambos cultivares apresentaram concentrações iguais de Al para os três tempos de experimentação, entretanto, o P98Y70 foi o que apresentou menores taxas de alongamento.

Diversos estudos já demonstraram a redução do alongamento radicular da soja sob estresse por Al (Silva et al., 2000; Silva et al., 2001; Silva et al., 2005; Silva et al., 2008; Kopittke et al., 2015; Lan et al., 2016). Trabalhando com raízes de soja expostas ao Al, Kopittke et al., 2015, 2016, também observaram inibição na taxa do alongamento radicular em função do aumento da concentração de Al e do tempo de exposição ao agente fitotóxico. A rapidez dessa resposta é indicativo da ação inibitória do Al sobre a expansão e o alongamento, e posteriormente sobre a divisão celular (Delhaize e Ryan 1995, Kochian, 1995).

No presente trabalho, houve correlação entre o sistema radicular reduzido e danificado e a absorção de nutrientes essenciais. A presença de Al foi prejudicial para a absorção de K para o cultivar P98Y70, mostrando-se novamente mais sensível às alterações causadas pelo Al. A presença do Al também reduziu a absorção de Ca e Mg, para os dois cultivares e nos três tempos de experimentação.

Mudanças fisiológicas e celulares, mediadas por Al, que ocorrem na membrana plasmática e no citoplasma são causadas pelo bloqueio da homeostase do Ca (Rengel e Zhang, 2003). O cálcio é um componente indispensável na constituição da lamela média e das paredes celulares e sua deficiência na raiz pode não ser caracterizada por sintomas típicos nas folhas. Pela sua importância no

desenvolvimento das raízes, a falta de cálcio resulta em sistema radicular debilitado, com morte nos ápices radiculares (Rengel e Zhang 2003). Além disso, para o efeito indireto, o Al pode diminuir a extensibilidade da parede com a substituição do Ca na matriz de pectina, que desempenha um papel chave no controle da extensibilidade pela formação e clivagem de ligações de Ca durante o alongamento celular (Boyer, 2009). Outro efeito indireto, seria a diminuição na eficácia de enzimas que atuam no afrouxamento da parede, tais como xiloglucano endotransglicosilase-hidrolase (XTHs) (Tabuchi e Matsumoto 2001, Ma et al., 2004, Wehr et al., 2004).

As interações entre Al e Ca são provavelmente os fatores mais importantes que afetam a absorção e o transporte de Ca em plantas cultivadas em solos ácidos. Além da parede celular, a redução na concentração de Ca induzida pelo Al, pode induzir alterações nas propriedades e arquitetura da membrana plasmática (Sivaguru et al., 2003). Adicionalmente, o Al pode atuar diretamente sobre as proteínas canais e reduzir o influxo de Ca através do bloqueio dos canais de Ca, resposta já observada na espécie *C. humicola* (Zhang et al., 2015).

O Al também promove inibição competitiva com outros nutrientes catiônicos, como o Mg, K e alguns micronutrientes. Zhang et al., (2014) observaram que após tratamento com Al, o conteúdo de Mg diminuiu em raízes de *P. massoniana*. Além disso, Gupta et al, (2013) mostraram que o transporte de Mg é fortemente inibido por Al, pois esses dois cátions apresentam diâmetro atômico semelhante, assim competem pelo mesmo canal transportador. Silva et al. (2005), propuseram que o incremento na concentração de Ca e Mg em solução nutritiva poderia proteger a raiz dos danos causados pelo Al, e concluíram que, os principais efeitos tóxicos do Al, responsáveis por inibir o alongamento celular, são ocasionados, principalmente, pela deficiência desses dois elementos nas células.

A concentração de Al usada no presente trabalho não interferiu na absorção de P, em nenhum dos dois cultivares durante os três tempos. Hirano et al. (2007) sugeriram que a deficiência de P e K não deve ser utilizada como indicador de estresse por Al em solos ácidos. Entretanto, Lu Zheng et al., (2014) demonstraram que a toxicidade do Al pode culminar em deficiência de P nas plantas, devido à complexação do Al com o P na rizosfera, e pela interferência do Al sobre o metabolismo do P absorvido, transformando Pi em P-lábil (fosfato lábil). O acúmulo de P-lábil no ápice da raiz pode ser um dos responsáveis pelo engrossamento do ápice, causado durante o estresse por Al.

A presença de grupos celulares corados pelo corante Azul de Evans, indica que houve morte celular na raiz, sobretudo na região da coifa. Após 48 e 72h de exposição ao Al, o cultivar P98Y70 apresentou coloração azul mais intensa no ápice das raízes, expondo um nível mais avançado de morte celular, conferindo a esse cultivar maior sensibilidade aos efeitos tóxicos do Al. A coloração com hematoxilina evidenciou maior acúmulo de Al (cor arroxeada) na região do ápice radicular. Esse resultado coincide com os resultados encontrados para morte celular e corrobora as informações da literatura, de que o ápice celular é o principal local de acúmulo de Al e dos danos que esse agente fitotóxico pode causar, principalmente em cultivares sensíveis a esse metal (Horst et al., 1992; Delhaize e Ryan, 1995). Uma vez acumulado no ápice radicular, o principal sítio de acúmulo de Al é a parede celular, que pode acumular até 80% de todo o Al absorvido pelas células periféricas (Doncheva et al., 2005; Frantzios et al., 2005; Horst et al., 2010).

Através dos resultados obtidos pelos testes com Chrome Azurol'S, foi possível observar que o principal sítio de acúmulo de Al foi o ápice radicular, mais especificamente, a região da coifa. Adicionalmente, os resultados obtidos por MEV-EDS comprovaram que além da coifa, o Al também acumulou na zona meristemática e na zona de alongamento. Consequentemente, o acúmulo de Al em todas essas regiões foi responsável por induzir danos estruturais às células radiculares, conforme visualizado pelas imagens obtidas por microscópio eletrônico de varredura. Esses danos estruturais são induzidos pelo rompimento das células mais externas (células da epiderme e/ou do córtex), provavelmente pelo crescimento desigual, uma vez que a presença de Al aumenta a rigidez das paredes e pode induzir expansões desiguais em diferentes regiões da célula (Ciamporová, 2000; Tabuchi e Matsumoto, 2001). O Al não conseguiu atingir os tecidos mais internos da raiz no cultivar Conquista, entretanto, no cultivar P89Y70, foi possível detectar reação positiva com Chrome Azurol'S na região meristemática da raiz, demonstrando que esse cultivar foi mais susceptível à interiorização do Al, e consequentemente, exposto a maiores danos durante o desenvolvimento da raiz.

Adicionalmente, pelos resultados de MEV-EDS pôde-se verificar que após as primeiras horas de exposição ao Al, o cultivar P98Y70 foi o que acumulou maiores teores relativos de Al na coifa. Esses resultados demonstraram que as perturbações ocasionadas pelo Al, podem ter se iniciado primeiramente no cultivar P98Y70 e ter prejudicado rapidamente as suas respostas de defesa contra esse agente fitotóxico,

e conseqüentemente, induzir a esse cultivar uma maior susceptibilidade aos danos ocasionados pelo Al.

Além dos danos estruturais, as eletromicrografias de varredura mostraram a presença de mucilagem nas raízes do tratamento controle do cultivar Conquista. Estudos indicam que o desenvolvimento da camada de mucilagem pode estar relacionado com a diminuição da morte celular nos tecidos do ápice da raiz de plantas submetidas ao estresse por Al (Hawes et al, 2000). A proteção das células da raiz contra o Al em cultivares resistentes de soja, se dá pelo acúmulo desse metal na mucilagem secretada tanto pelas células da coifa, quanto por células periféricas das raízes (Cai et al., 2013). Dessa forma, a presença de mucilagem pode conferir maior proteção às plantas, impedindo que concentrações elevadas de Al sejam absorvidas pelas células da raiz (Hawes et al, 2000).

5. CONCLUSÕES

Ambos os cultivares apresentaram concentrações similares de Al nas raízes, entretanto, o cultivar Conquista demonstrou maior resistência ao metal que o cultivar P98Y70. O cultivar Conquista apresentou maior alongamento radicular sob estresse por Al, maior concentração de K e Ca e menor porcentagem relativa de Al na coifa. A presença de mucilagem no cultivar Conquista sob tratamento controle pode indicar que essa camada de polissacarídeos atuou como uma barreira protetora nas plantas expostas ao Al, embora a sua visualização não tenha sido possível sob esse tratamento. O Al também interferiu nas concentrações de Mg em ambos os cultivares, conferindo um sistema radicular enfraquecido e mais susceptível ao estresse. Por outro lado, o cultivar P98Y70 apresentou menor alongamento radicular, menores concentrações de K e Ca e maior porcentagem relativa de Al na coifa. Além disso, o processo de morte celular de forma mais acentuado e a presença de Al nas células meristemáticas configuram o cultivar P98Y70 como mais sensível à toxicidade do Al.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bennet RJ, Breen CM, Fey MV (1985) Aluminum uptake sites in the primary root of *Zea mays* L. *South African Journal of Plant and Soil*, Pretoria 2: 1-7.

Bhering LL Rbio: A Tool For Biometric And Statistical Analysis Using The R Platform. (2017) *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 7: 187-190.

Boyer JS (2009) Cell wall biosynthesis and the molecular mechanism of plant enlargement. *Functional Plant Biology* 36: 383–394.

Cai M, Wang, N, Xing C, Wang F, Wu K, Du X (2013) Immobilization of aluminum with mucilage secreted by root cap and root border cells is related to aluminum resistance in *Glycine max* L. *Environmental Science and Pollution Research* 20: 8924-8933.

Ciamporová ML (2000) Diverse responses of root cell structure to aluminium stress. *Plant and Soil* 226: 113-116.

Clark RB (1975) Characterization of phosphatase of intact maize roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 23: 458-460.

Carpita NC, Gibeaut DM (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant Journal* 3: 1–30.

CONAB-Companhia Nacional de Abastecimento 2017. CONJUNTURA QUINZENAL 08/05/2017 a 12/05/2017.

Cosgrove DJ (1989) Characterization of long-term extension of isolated cell walls from growing cucumber hypocotyls. *Planta* 177: 121–130.

Cosgrove DJ (1997) Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 13: 171–201.

Cosgrove DJ (2005) Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6: 850–861.

Delhaize E, Ryan PR (1995) Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiology* 107: 315–321.

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

Eswaran H, Reich P, Beinroth F (1997) Global distribution of soils with acidity. *Plant-Soil Interactions at Low pH*. Brazilian Soil Science Society 159–164.

Faoro F and Iriti M (2005) Cell death behind invisible symptoms: early diagnosis of ozone injury. *Biologia Plantarum* 49: 585-592.

Famoso AN, Clark RT, Shaff JE, Craft E, McCouch SR, Kochian LV (2010) Development of a novel aluminum tolerance phenotyping platform used for comparisons of cereal aluminum tolerance and investigations into rice aluminum tolerance mechanisms. *Plant Physiology* 153: 1678–1691.

Frantzios G, Galati B, Apostolakos P (2005) Aluminum causes variable responses in actin filament cytoskeleton of the root tip cell of *Triticum turgidum*. *Protoplasma* 225: 129–140.

Furley PA, Ratter JA (1998) Soil resources and plant communities of the central Brazilian Cerrado and their development. *Journal of Biogeography* 15: 97-108.

Gao H, Zhao Q, Zhang X, Wan X and Mao J (2014) Localization of Fluoride and Aluminum in Subcellular Fractions of Tea Leaves and Roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62: 2313–2319.

Gupta N, Gaurav SG, Kumar A (2013) Molecular Basis of Aluminium Toxicity in Plants: A Review. *American Journal of Plant Sciences* 4: 21-37.

Haridasan M (2008) Alumínio é um elemento tóxico para as plantas nativas do cerrado? Fisiologia Vegetal: práticas em relações hídricas, fotossíntese e nutrição mineral.

Hawes MC, Gunawardena U, Miyasaka S, Zhao XW (2000) The role of root border cells in plant defense. *Trends Plant Sciences* 5: 128–133.

Hirano Y, Mizoguchi T, Brunner I (2007) Root parameters of forest trees as sensitive indicators of acidifying pollutants: a review of research of Japanese forest trees. *Journal of Forest Research* 12: 134-142.

Horst WJ, Cakmak I, Szulkiewicz P, Wissemeier AH (1992) Short term responses of soybean roots to aluminum. *Journal of Plant Physiology* 140: 174-178.

Horst WJ, Kollmeier M, Schmohl N (2007) Significance of the root apoplast for aluminium toxicity and resistance of maize. In: Sattelmacher B, Horst W (eds) *The apoplast of higher plants: compartment of storage, transport, and reactions*. Kluwer, Dordrecht 49–66.

Horst WJ, Wang Y, Eticha D (2010) The role of the root apoplast in aluminium-induced inhibition of root elongation and in aluminium resistance of plants: a review . *Annals of Botany* 106: 185–197.

Jones DL, Blancaflor EB, Kochian LV, Gilroy S (2006) Spatial coordination of aluminium uptake, production of reactive oxygen species, callose production and wall rigidification in maize roots. *Plant, Cell & Environment* 29: 1309–1318.

Kariya K, Tsuchiya Y, Sasaki T, Yamamoto Y (2017). Aluminium-induced cell death requires upregulation of NtVPE1 gene coding vacuolar processing enzyme in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Journal of Inorganic Biochemistry* 181: 152-161.

Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27: 137-138.

Kato Y, Miura E, Matsushima R, Sakamoto W (2007) White leaf sectors in yellow variegated are formed by viable cells with undifferentiated plastids. *Plant Physiology* 144: 952-960.

Kochian LV (1995) Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Molecular Biology* 46: 237-260.

Kochian LV, Hoekenga OA, Pineros MA (2004) How Do Crop Plants Tolerate Acid Soils Mechanisms of Aluminium Tolerance and Phosphorus Efficiency. *Annual Review of Plant Biology* 55: 459-493.

Kochian LV, Piñeros MA, Liu J, Magalhães JV (2015) Plant Adaptation to Acid Soils: The Molecular Basis for Crop Aluminum Resistance. *Annual Review of Plant Biology* 66: 571-98.

Kopittke PM, Blamey FPC, Menzies NW (2008) Toxicities of soluble Al, Cu, and La include ruptures to rhizodermal and root cortical cells of cowpea. *Plant and Soil* 303: 217–227.

Kopittke PM, Moore KL, Lombi E, Gianoncelli A, Ferguson BJ, Blamey FPC, Menzies NW, Nicholson TM, McKenna BA, Wang P, Gresshoff P, Kourousias G, Webb R, Green K, Tollenaar A (2015) Identification of the Primary Lesion of Toxic Aluminum in Plant Roots. *Plant Physiology* 167: 1402–1411.

Kopittke PM and Blamey FPC (2016) Theoretical and experimental assessment of nutrient solution composition in short-term studies of aluminium rhizotoxicity. *Plant and Soil* 406: 311–326.

Kukachka BF, Miller RB (1980) A chemical spot-test for aluminum and its value in wood identification. *IAWA Journal* 1: 104-109.

Lan T, You J, Kong L, Yu M, Liu M, Yang Z (2016) The interaction of salicylic acid and Ca²⁺ alleviates aluminum toxicity in soybean (*Glycine max* L.). *Plant Physiology and Biochemistry* 98: 146-154.

Li JY, Liu J, Dong D, Jia X, McCouch SR, Kochian LV (2014) Natural variation underlies alterations in Nramp aluminum transporter (*NRAT1*) expression and function that play a key role in rice aluminum tolerance. *PNAS* 111: 6503–8.

- Li D, Shu Z, Ye X, Zhu J, Pan J, Wang W, Chang P, Cui C, Shen J, Wanping FW, Zhu X, Wang Y (2017) Cell wall pectin methyl-esterification and organic acids of root tips involve in aluminum tolerance in *Camellia sinensis*. *Plant Physiology and Biochemistry* 119: 265-274.
- Ma JF, Shen R, Nagao S and Tanimoto E (2004) Aluminum targets elongating cells by reducing cell wall extensibility in wheat roots. *Plant & Cell Physiology* 45: 583-589.
- Marin AR, Pezeshki SR, Masscheleyn PH, Choi HS (1993) Effect of dimethylarsenic acid (DMAA) on growth, tissue arsenic and photosynthesis in rice plants. *Journal Plant Nutrition* 16: 865-880.
- Menosso OG, Costa JA, Anghinoni I, Bohnen H (2000) Tolerância de genótipos de soja ao alumínio em solução. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 35: 2157- 2166.
- Nishitani K (1997) The role of endoxyloglucan transferase in the organization of plant cell walls. *International Review of Cytology* 173: 157–206.
- Oliveira-Filho AT, Ratter JA (2002) Vegetation physiognomies and woody flora of the cerrado biome. In Oliveira P.S., Marquis R.J. (eds.). *The cerrados of Brazil*. Columbia University Press, New York, EUA.
- Polle E, Konzak CF, Kittrick JA (1978) Visual detection of aluminum tolerance leaves in wheat by hematoxylin staining of seedling roots. *Crop Science* 18: 823-827.
- Perrot-Rechenmann C (2010) Cellular responses to auxin: division versus expansion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2(5): a001446.
- Rbio: A tool for biometric and statistical analysis using the R platform. Bhering LL (2017) *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 17:2.
- Rangel AF, Rao IM, Horst WJ (2009) Intracellular distribution and binding state of aluminum in root apices of two common bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes in relation to Al toxicity. *Physiologia Plantarum* 135: 162–173.
- Rengel Z and Zhang WH (2003) Role of dynamics of intracellular calcium in aluminium-toxicity syndrome. *New Phytologist* 159: 295-314.

Safari M, Ghanati F, Safarnejad MR, Chashmi NA (2017) The contribution of cell wall composition in the expansion of *Camellia sinensis* seedlings roots in response to aluminum. *Planta* 247(2): 381-392.

Sanjib KP and Frantisek B (2015) Signaling and Communication in Plants. Aluminum Stress Adaptation in Plants 24: 1-17.

Sivaguru M, Ezaki B, He ZH, Tong H, Osawa H, Balus kF, Volkmann D,, Matsumoto H (2003) Aluminum-induced gene expression and protein localization of a cell wall-associated receptor kinase in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 132: 2256–2266.

Silva IR, Smyth TJ, Moxley, DF, Carter TE, Allen NS and Rufty TW (2000) Aluminum Accumulation at Nuclei of Cells in the Root Tip. Fluorescence Detection Using Lumogallion and Confocal Laser Scanning Microscopy. *Plant Physiology* 123(2): 543-52.

Silva IR, Smyth TJ, Israel DW and Rufty TW (2001) Altered aluminum inhibition of soybean root elongation in the presence of magnesium. *Plant and Soil*. 230: 223–230.

Silva IR, Ferrufino A, Sanzonowicz C, Smyth TJ, Israel DW and Júnior TEC (2005) Interactions between magnesium, calcium, and aluminum on soybean root elongation. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 29: 747-754.

Silva IR, Corrêa TFC, Novais RF, Grbrim FO, Nunes FN, Silva EF, Smyth TJ (2008) Protective effect of divalent cations against aluminum toxicity in soybean. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 32: 2061-2071.

Singh VP, Tripathi DK, Kumar D, Chauhan DK (2011) Influence of exogenous silicon addition on aluminium tolerance in rice seedlings. *Biological Trace Element Research* 144: 1260–1274.

Sun C, Lu L, Yu Y, Liu L, Hu Y, Ye Y, Jin C, Lin X (2016) Decreasing methylation of pectin caused by nitric oxide leads to higher aluminum binding in cell walls and

greater aluminum sensitivity of wheat roots. *Journal of Experimental Botany* 67: 979–989.

Tabuchi A, Matsumoto H (2001) Changes in cell-wall properties of wheat (*Triticum aestivum*) roots during aluminum-induced growth inhibition. *Physiologia Plantarum* 112: 353–358.

Yamamoto Y, Kobayashi Y, Matsumoto H (2001) Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. *Physiologia Plantarum* 125: 199–208.

Yamamoto Y, Kobayashi Y, Devi SR, Rikiishi S, Matsumoto H (2002) Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells. *Physiologia Plantarum* 128: 63–72.

Yang JL, Li YY, Zhang YJ (2008) Cell wall polysaccharides are specifically involved in the exclusion of aluminum from the rice root apex. *Plant Physiology* 146: 602–611.

Yang JL, Zhu XF, Peng YX, Zheng C, Li GX, Liu Y, Shi, YZ, Zheng SJ (2011) Cell wall hemicellulose contributes significantly to aluminum adsorption and root growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 155: 1885–1892.

Yang C, Zhao T, Yu D and Junyi GJ (2011) Mapping QTLs for Tissue Culture Response in Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) *Molecules and Cells* 31; 32(4): 337–342.

Wang Y, Stab A, Horst WJ (2004) Apoplastic binding of aluminum is involved in silicon-induced amelioration of aluminum toxicity in maize. *Plant Physiology* 136: 3762–3770.

Wehr JB, Menzies NW, Blamey FPC (2004) Inhibition of cell-wall autolysis and pectin degradation by cations. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 485–492.

Zhang H, Shi W, You JF, Bian MD, Qin XM, Yu H, Liu Q, Ryan PR, Yang, ZM (2015) Transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing a β -1,3-glucanase from sweet sorghum (*Sorghum bicolor* L.) show reduced callose deposition and increase tolerance to aluminum toxicity. *Plant, Cell & Environment* 38: 1178–1188.

Zhang H, Jiang Ze, Qin R, Zou J, Jiang W (2014) Donghua Liu, D. Accumulation and cellular toxicity of aluminum in seedling of *Pinus massoniana*. BMC Plant Biology 14:264.

Zhang SJ, Yang JL (2005). Target sites of aluminum phytotoxicity. *Biologia Plantarum* 49: 321–331

Zheng L, Lan P, Shen RF, Li WF (2014) Proteomics of aluminum tolerance in plants. *Proteomics*. 4-5: 566-78.

Zhu XF, Shi YZ, Lei GJ, Fry SC, Zhang BC, Zhou YH, Braam J, Jiang T, Xu XY, Mao CZ, Pan YJ, Yang JL, Wu P, Zheng SJ (2012) XTH31, encoding an in vitro XEH/XET active enzyme, Aluminum-Induced Inhibition of Root Growth: Roles of Cell Wall Assembly 273 regulates aluminum sensitivity by modulating in vivo XET action, cell wall xyloglucan content, and aluminum binding capacity in Arabidopsis. *Plant Cell*. 24: 4731–4747.

Zhu XF, Zhao XS, Wang B, Wu Q, Shen RF (2017) Elevated Carbon Dioxide Alleviates Aluminum Toxicity by Decreasing Cell Wall Hemicellulose in Rice (*Oryza sativa*). *Frontiers in Physiology* 18;8: 512.

Capítulo 2

Respostas antioxidantes e ajustes metabólicos em raízes de soja (*Glycine Max* (L.) Merr.) após exposição ao alumínio

RESUMO

SILVA, Cíntia Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2018. Efeitos do alumínio em raízes de soja: alterações morfoanatômicas, fisiológicas e metabólicas. Orientador: Cleberson Ribeiro

Em pH próximo de 7,0, o Al existe principalmente como óxido de alumínio relativamente insolúveis. No entanto, em pH baixo (pH <5), os íons Al^{3+} são solubilizados na solução do solo, e inibem o crescimento e a função das raízes, induzindo perdas na produção dos vegetais. O Brasil é o segundo maior produtor de soja do mundo, sendo a região do cerrado a principal região produtora, onde os solos apresentam grandes quantidades de Al. Neste estudo, avaliou-se as respostas antioxidantes de dois cultivares de soja ao estresse por Al. Compostos indicadores de estresses, como ROS e MDA, bem como as alterações metabólicas induzidas por este metal também foram avaliados. As plântulas foram cultivadas em sala de crescimento, com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 16/8h, em solução de Clark (pH 4,0), sob dois tratamentos, 0 e 100 μM de AlCl_3 . Os tratamentos constituíram-se em três tempos, 24, 48 e 72 h. Ao final dos períodos experimentais as plântulas foram coletadas para análises posteriores. Foram analisados os conteúdos de H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$, o nível de peroxidação lipídica da membrana, a eficiência das enzimas SOD, CAT, POX, APX, das enzimas reguladoras do ciclo ascorbato-glutationa, bem como os níveis de ascorbato (AA) e glutatona (GSH) e as alterações ocorridas no metabolismo primário da soja. De modo geral, o cultivar P98Y70 mostrou-se mais sensível ao estresse por Al, apresentando maiores concentrações de ROS, maiores níveis de peroxidação lipídica, menor eficiência no uso das enzimas antioxidantes. Apesar, dos níveis de AA e GSH terem aumentado no cultivar P98Y70 não foram suficientes para atenuar os efeitos da toxicidade do Al. Por outro lado, o cultivar Conquista apresentou menores concentrações de ROS, aumentos na atividade das enzimas SOD, CAT, GST e GPX, além de ter acumulado maiores teores de citrato e oxalacetato. Nossos resultados sugerem que o cultivar Conquista apresenta

mecanismos de tolerância e seria mais adaptado para crescer em solos ácidos e na presença de Al tóxico.

PALAVRAS-CHAVE: Alumínio, ROS, Estresse Oxidativo, Metabolismo.

1. INTRODUÇÃO

A exposição das plantas a estresses ambientais, incluindo a toxicidade por metais, leva à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) que induz o estresse oxidativo, e consequentemente pode causar danos às proteínas, lipídios e carboidratos (Sharma et al., 2012). O Al é capaz de se ligar aos fosfolípidos e proteínas das membranas e alterar a sua permeabilidade. Essas alterações já foram avaliadas em diferentes espécies após exposição ao alumínio (Al), tais como soja (Silva et al., 2000), trigo (Sun et al., 2015), centeio (de Sousa et al., 2016), grão-de-bico (Sharma et al., 2016), sorgo (Zhou et al., 2017), alfafa (Cui et al., 2017) e feijão-da-china (Chowra et al., 2017). Nas espécies mais sensíveis ao Al, as membranas celulares são os alvos principais da toxicidade desse metal. Essa fitotoxicidade do Al apresenta-se como fator desencadeador da peroxidação de lipídios na membrana plasmática, danos à estrutura celular, alterações cromossômicas e morte celular. Além disso, a toxicidade do Al também causa inibição no crescimento e desenvolvimento das raízes, o que afeta a absorção de água e nutrientes pela planta (Nicoloso et al., 2009; Yi et al., 2010).

Dentre as espécies reativas de oxigênio formadas durante o estresse por Al, o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são as principais moléculas causadoras do estresse oxidativo. O H_2O_2 pode ser formado em diferentes organelas e compartimentos celulares, como parede celular, citosol, mitocôndrias e cloroplastos. Uma das principais funções do H_2O_2 durante o estresse por Al, é sua participação na formação da lignina, e consequente diminuição do alongamento radicular (Matsumoto e Motoda, 2012).

Para lidar com o excesso das ROS as plantas desenvolveram eficientes sistemas de defesa antioxidante enzimático e não enzimático, que controlam as cascatas de oxidação para proteger as células do dano oxidativo (Sharma et al., 2012). A enzima superóxido dismutase (SOD) é considerada a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo, uma vez que catalisa a dismutação do ($O_2^{\cdot-}$) em

H₂O₂ e oxigênio molecular (O₂). O H₂O₂ pode, então, ser reduzido a água (H₂O) pelas enzimas catalase (CAT), peroxidase total (POX), peroxidase do ascorbato (APX) ou peroxidase da glutathione (GPX) (Sharma et al., 2012). Estudos correlacionaram a tolerância ao Al com os mecanismos antioxidantes em plantas de tabaco (Devi et al., 2003), trigo (Darko et al., 2004) e milho (Giannakoula et al., 2010).

Além das enzimas antioxidantes as plantas podem apresentar o sistema de defesa antioxidante não enzimático, constituído por ascorbato (AA) e glutathione (GSH) (Kochian et al., 2005). A ação conjunta do sistema de defesa enzimático e não enzimático é importante para combater o estresse oxidativo. Neste contexto, se destaca o Ciclo Ascorbato-Glutathione (AA-GSH) (Mittler 2002). O Ciclo AA-GSH é uma importante via de eliminação de H₂O₂, que opera tanto nos cloroplastos quanto no citossol. Alguns estudos demonstraram que a superexpressão dos genes que codificam enzimas do Ciclo AA-GSH conferiu maiores concentrações de AA e GSH, e consequentemente maior tolerância às plantas transgênicas após exposição ao Al (Foyer et al., 1995; Eltayeb et al., 2007).

No entanto, o processo de sinalização do Ciclo AA-GSH sob estresse por Al em soja ainda não é totalmente compreendido. Ascorbato e glutathione são considerados poderosos antioxidantes, atuando diretamente sobre as ROS, como oxigênio singlete (¹O₂) e radical hidroxila (OH[•]) (Xu et al., 2012). Ademais, esses metabólitos também atuam como doadores de elétrons para enzimas chave, como APX e GPX, na eliminação do H₂O₂ (Foyer et al., 2012). Além da APX, outras enzimas envolvidas no ciclo ascorbato-glutathione também desempenham papel importante no controle do estresse oxidativo, como a redutase do monodesidroascorbato (MDHAR), redutase do desidroascorbato (DHAR) e redutase da glutathione (GR) (Sharma et al., 2012).

A desintoxicação do Al nas plantas pode ocorrer através de mecanismos que facilitem a evitação ao Al pelas raízes e mecanismos que permitem que as plantas tolerem o Al no simplasma. Estes dois mecanismos são geralmente definidos como mecanismos de resistência e mecanismos de tolerância ao Al, respectivamente (Kochian et al., 2015). Esses mecanismos dependem, em grande parte, da formação de complexos de Al com ânions de ácidos orgânicos (Sharma et al., 2016), atuando na desintoxicação interna ou externa do Al (Rangel et al., 2010).

Aumento na exsudação de vários ácidos orgânicos, como citrato, malato e oxalato, já foi relatado em diferentes espécies de plantas e correlacionada com sua tolerância ao Al (Kochian et al., 2005). Esses ácidos orgânicos podem facilmente se ligar ao Al, e assim, impedir a entrada desse metal nos tecidos vegetais, ou inativar o Al já acumulado no simplasto (Delhaize et al., 2007; Rangel et al., 2010). Especialmente em soja, o citrato é o ácido orgânico mais estudado em conferir resistência ao estresse por Al (Zheng et al., 2014). Além dos ácidos orgânicos, vários outros mecanismos de tolerância ao Al já foram relatados, como a síntese de proteínas, aminoácidos, açúcares solúveis e compostos fenólicos (Kochian et al., 2005; Grevenstuk et al., 2015; Xu et al., 2016).

A compreensão acerca da influência do Al sobre o perfil metabólico de plantas cultivadas ainda não é suficientemente esclarecedora, entretanto, Chowra et al (2017) demonstraram a variação na concentração de metabólitos em raiz de *Vigna mungo* após exposição ao Al. Esses autores observaram que os metabólitos que desempenham importante papel na tolerância ao Al, tiveram suas concentrações aumentadas, entre eles: triptofano, fumarato, GABA, açúcares, prolina e ácidos orgânicos.

Grevenstuk et al (2015), em seu estudo do estresse induzido por Al em *Plantago almogravensis*, demonstraram que o conteúdo de metabólitos em raízes de plântulas tratadas com Al foi menor do que em plantas controle. Esses autores identificaram queda nas concentrações de açúcares nas raízes, o que os levaram a crer que a exposição ao Al induz maior consumo de energia pelas células. Além disso, verificaram aumento nas concentrações de aspartato nas raízes, consequência da maior taxa de rotação do ciclo TCA, uma vez que aspartato é sintetizado diretamente do oxalacetato.

Embora não haja muitos estudos abrangentes sobre os efeitos do estresse por Al sobre o metabolismo das plantas, algumas respostas podem ser consideradas como biomarcadores gerais de danos celulares. O acúmulo de carboidratos e aminoácidos é uma resposta de defesa comum a estresse abiótico. Além de atuar como osmoprotetores, essas moléculas também podem controlar o acúmulo de ROS induzido pelo estresse (Gupta e Kaur, 2005). Para além das poucas informações acerca da influência do Al sobre o perfil metabólico, temos o aumento da concentração de ácidos orgânicos como a principal alteração metabólica já estudada e mencionada em plantas sob o estresse por esse metal.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os mecanismos de tolerância ao Al presentes em dois cultivares de soja. Para isso, foram avaliadas as alterações nos sistemas de defesa antioxidante e os ajustes metabólicos que ocorreram durante os estádios iniciais do desenvolvimento de raízes de soja expostas ao Al.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO

A escolha dos cultivares a serem utilizados no presente trabalho, deu-se através de experimentos prévios que objetivaram classificar esses cultivares de acordo com o nível de tolerância ao Al. Nesse contexto, por meio de análises de alongamento radicular, dois cultivares se destacaram como resistente e sensível, foram eles, Conquista e P98Y70, respectivamente. As sementes dos dois cultivares de soja (Conquista e P98Y70), foram adquiridas através do Banco de Sementes do Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja do Bioagro na UFV. As sementes foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 5% por 5 minutos e em seguida, lavadas em água destilada. As sementes foram germinadas em rolos de papel germitest umedecido em solução de $\text{CaCl}_2/100\mu\text{M}$, pH 7,0 e mantidas em sala de crescimento com temperatura e umidade controladas. Após três dias no escuro, os rolos foram expostos à luz e ali permaneceram por mais três dias. No sétimo dia as plântulas foram transferidas para solução de Clark (1975), pH 4,0, para aclimação por 24 horas, em temperatura e fotoperíodo controlados, sob aeração constante.

2.2. IMPLEMENTAÇÃO DOS EXPERIMENTOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Após aclimação, as plântulas saudáveis e padronizadas quanto ao tamanho e forma foram selecionadas e transferidas para os tratamentos. As plântulas foram cultivadas em solução de Clark (1975), pH 4,0, sob aeração constante em vasos de plástico com capacidade para 2L. O experimento foi composto por 2 tratamentos (0, 100 μM de Al, na forma de AlCl_3), 5 repetições (4 plântulas por repetição), dispostas em delineamento inteiramente casualizado. O período experimental constou de 24,

48 e 72 horas. O pH foi ajustado diariamente para 4,0. Após o período experimental, as raízes foram coletadas e imediatamente armazenadas em freezer a -80°C, para análises posteriores. Para avaliação das ROS foram utilizadas raízes frescas.

2.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

2.3.1. ÂNION SUPERÓXIDO

Cerca de 50 mg de ápices radiculares frescos foram homogeneizados em meio de extração composto por sal dissódico do ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) 100 µM, NADH 20 µM e tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,8 (Mohammadi e Karr, 2001). A reação foi iniciada pela introdução de epinefrina 25,2 mM em HCl 0,1 N. As amostras foram incubadas a 28°C, sob agitação, por 5 minutos. A leitura da absorbância a 480 nm foi realizada em leitor de microplaca (VERSAmax, Molecular Devices, Crawley, West Sussex, Reino Unido), durante 5 minutos (Misra e Fridovich, 1971; Boveris et al., 2002). A concentração de $O_2^{\cdot-}$ foi determinada pelo acúmulo de adenocromo, utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar de $4,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Boveris et al., 2002).

2.3.2. PERÓXIDO DE HÍDRGÊNIO

Amostras de 200 mg de raízes frescas foram homogeneizadas em meio de extração constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,5, contendo hidroxilamina 1 mM, e centrifugadas a 10.000 xg, por 15 minutos, a 4 °C (Kuo e Kao, 2003). Alíquotas do sobrenadante foram adicionadas a um meio de reação contendo FeNH_4SO_4 100 µM, ácido sulfúrico 25 mM, laranja de xilenol 250 µM e sorbitol 100 mM (Gay e Gebicki, 2000). As amostras foram mantidas no escuro por 30 minutos e a absorbância a 560 nm determinada em leitor de microplaca (Multiskan GO, Thermo Scientific, Waltham, EUA). As concentrações de H_2O_2 foram estimadas com base em curva de calibração preparada com padrões de H_2O_2 .

2.4. AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Amostras de 80 mg de raízes foram maceradas em nitrogênio líquido na presença de 10% (p/v) de polivinilpolipirrolidona (PVPP) e homogeneizadas em ácido

tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v). As amostras foram centrifugadas a 10.000 xg por 15 minutos a 4°C e, posteriormente, alíquotas de 250 µL do sobrenadante foram adicionadas a 750 µL de solução de TCA 20% (p/v) contendo 0,5% (p/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA) (Gomes-Júnior et al., 2006). No controle negativo foi adicionado apenas TCA 20%. As amostras foram incubadas em banho úmido a 95°C, por 30 minutos, e em seguida, a reação foi paralisada em banho de gelo. As amostras foram novamente centrifugadas a 10.000 xg durante 4 minutos e a absorbância avaliada em leitor de microplaca a 532 nm, descontando-se a absorbância inespecífica a 600 nm. A concentração de MDA foi calculada utilizando-se o coeficiente de absorvidade de 155 mM⁻¹ cm⁻¹ (Heath e Packer, 1968).

2.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO SISTEMA ANTIOXIDATIVO

2.5.1. EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA

No presente estudo foram determinadas as atividades das enzimas: dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6), peroxidases (POX, EC 1.11.1.7), peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11) e redutase da glutathione (GR, EC 1.8.1.7). Para a obtenção do extrato enzimático foram utilizados cerca de 30 mg de raízes maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em meio de extração. O meio de extração foi composto por: 1) tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8; ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM; fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 1 % (p/v) (Peixoto et al., 1999), para as enzimas SOD, CAT e POX. 2) tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, EDTA 1 mM, ácido ascórbico 1 mM, PMSF 1 mM, ditioneitol (DTT) 2 mM e PVPP 1 % (p/v) (Peixoto et al., 1999), para a enzima APX. 3) tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0, EDTA 1 mM, triton 0,02 % (v/v), DTT 2 mM, PMSF 1 mM e PVPP 1 % (p/v) (Carlberg e Mannervik, 1985), para a enzima GR.

2.5.2. ATIVIDADE DA DISMUTASE DO SUPERÓXIDO (SOD)

Para a determinação da atividade da SOD, foi utilizado o meio de reação composto por tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), EDTA 0,1 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 mM, metionina 13 mM e riboflavina 2 µM, juntamente com o

extrato enzimático (Giannopolitis e Ries, 1977). A reação foi realizada em câmara com luz fluorescente de 15 watts, a 25 °C por 10 minutos. A produção fotoquímica do azul de formazana foi determinada a 560 nm em leitor de microplaca (Multiskan GO, Thermo Scientific, Waltham, EUA). O branco constituiu de um meio de reação idêntico ao anterior, mas mantido no escuro. Considerou-se 1 U de SOD a quantidade da enzima capaz de inibir a redução do NBT em 50%. O resultado foi expresso em $\text{U min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína.

2.5.3. ATIVIDADE DA CATALASE (CAT)

A atividade da CAT foi determinada pelo consumo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), de acordo com Havir e McHale (1987). O extrato enzimático bruto foi adicionado ao meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7) e H_2O_2 40 μM . A atividade enzimática foi avaliada na absorbância a 240 nm em leitor de microplaca (Multiskan GO, Thermo Scientific, Waltham, EUA) durante 1 minuto. O fator da extinção molar do H_2O_2 ($39,4 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$) foi utilizado para o cálculo da atividade, e o resultado final expresso em $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína.

2.5.4. ATIVIDADE DA PEROXIDASE (POX)

A atividade das peroxidases foi determinada pela adição do extrato enzimático bruto ao meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e H_2O_2 20 mM (Kar e Nishra, 1976). A produção de purpurogalina foi determinada em leitor de microplaca (Multiskan GO, Thermo Scientific, Waltham, EUA) pelo incremento da absorbância durante o primeiro minuto de reação a 420 nm, a 25 °C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $2,47 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Chance e Maehley, 1955) e expressa em $\mu\text{mol de purpurogalina min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína.

2.5.5. ATIVIDADE DA PEROXIDASE DO ASCORBATO (APX)

A atividade da APX foi determinada de acordo com Nakano e Asada (1981), utilizando-se meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,0, ácido ascórbico 0,8 mM, H_2O_2 1,0 mM, e o extrato enzimático. A atividade enzimática foi avaliada na absorbância de 290 nm em leitor de microplaca (Multiskan GO, Thermo Scientific, Waltham, EUA) durante 1 minuto, a 25 °C. O coeficiente de extinção molar do ascorbato de $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ foi utilizado para o

cálculo da atividade da enzima, e o resultado final expresso em μmol de ácido ascórbico $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína.

2.5.6. ATIVIDADE DA REDUTASE DA GLUTATIONA (GR)

Amostras de raízes com aproximadamente 50 mg foram homogeneizadas em meio de extração, contendo tampão fosfato de potássio 0,10 M, pH 7,0; EDTA 1,0 mM, DTT 2,0 mM, PMSF 1,0 mM e PVPV 1% (p/v). O extrato foi centrifugado a 12.000 g por 15 min, a 4 °C e o sobrenadante obtido, utilizado para a avaliação enzimática. A atividade da GR foi determinada pelo método de Foyer e Halliwell (1976), pelo monitoramento da oxidação do NADPH dependente de glutathione em 340 nm, à temperatura de 30°C, durante o primeiro minuto da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção de $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e os resultados expressos em nmoles de NADPH oxidado $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína.

2.5.7. ATIVIDADE DA SINTETASE DA γ -GLUTAMILCISTEÍNA (γ -GCS)

Amostras de 200 mg de raiz foram maceradas em meio de extração, constituído de tampão Tris-HCl 0,1 M e EDTA 5 mM (pH 8,0). O homogeneizado obtido foi centrifugado a 25.000 g por 10 minutos, a 4 °C e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático. A atividade enzimática foi determinada pela adição do extrato em um meio de reação, contendo 10 μmoles de glutamato de sódio, 10 μmoles de L-aminobutirato, 2 μmoles de Na_2EDTA , 0,2 mg de BSA, 20 μmoles de MgCl_2 , 5 μmoles do sal dissódico de ATP e 100 μmoles de tampão Tris-HCl, pH 8,2 (Orlowski e Meister, 1971). Após incubação a 37 °C, durante 30 min, a reação foi paralisada pela adição de 100 μL de TCA 50 % (p/v), seguida de centrifugação a 10.000 g por 10 min. O teor de fosfato inorgânico foi determinado no sobrenadante pelo método do fosfo-molibdato (Lindeman, 1958). A atividade da enzima foi representada como μg de Pi liberado $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína.

2.5.8. ATIVIDADE DA PEROXIDASE DA GLUTATIONA (GPX)

A atividade da GPX foi determinada em extrato obtido pela maceração de aproximadamente 200 mg de raiz em um meio de homogeneização, constituído de

tampão Tris-HCl 0,1M, pH 7,5, EDTA 1,0 mM e MgCl_2 10mM (Nagalakshmi e Prasad, 2001). Após a extração, as amostras foram centrifugadas a 30.000 g, durante 10 minutos a 4°C. Uma alíquota do sobrenadante foi adicionada em um meio de reação constituído de tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0; EDTA 1,0 mM; cloreto de sódio 0,114M; GSH 1,0 mM; NADPH 0,2 mM; H_2O_2 0,25 mM e 1 unidade de redutase da glutathione. A variação na absorvância a 340 nm à temperatura de 30 °C, foi medida no primeiro minuto de reação e a atividade enzimática calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Anderson e Davis, 2004). Os resultados foram expressos em nmoles de NADPH oxidado $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

2.5.9. ATIVIDADE DA SULFOTRANSFERASE DA GLUTATIONA (GST)

A atividade da GST foi avaliada segundo metodologia proposta por Habig e Jakoby, 1981. Amostras de 200 mg de raízes foram extraídas em um meio contendo tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 7,8; EDTA 1,0 mM; DTT 1,0 mM; PMSF 0,10 mM e PVPP 5 % (p/v). O extrato obtido foi centrifugado a 12.000 xg por 15 minutos, à temperatura de 4°C e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático bruto. O meio de reação constituiu-se de tampão fosfato de potássio 0,20 M, pH 6,5; GSH 20 mM e 1-cloro 2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 0,10 M. A reação foi iniciada pela adição do extrato bruto ao meio de reação, e o incremento da absorvância a 340 nm foi realizado durante o primeiro minuto de reação. A atividade enzimática foi calculada a partir do coeficiente de extinção molar de $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os resultados foram expressos em nmoles $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

2.5.10. DETERMINAÇÃO DA MONODEHIDROASCORBATO REDUTASE (MDHAR)

Amostras de 250 mg de raízes foram maceradas em 1 mL de meio de extração, constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8 e ascorbato 1 mM. Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 min a 4 °C e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático.

A atividade da MDHAR foi determinada pela adição do extrato enzimático bruto a um meio de reação, constituído de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,6; NADH

0,1 mM; ascorbato 2,5 mM e 0,4 unidades de ascorbato oxidase (Hossain et al., 1984). A variação na absorvância foi medida a 340 nm durante o primeiro minuto de reação e a atividade enzimática calculada pelo coeficiente de extinção molar de $6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.5.11. DETERMINAÇÃO DA DESIDROASCORBATO REDUTASE (DHAR)

Amostras de 250 mg de raízes foram maceradas em 1 mL de meio de extração, constituído de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4; cloreto de sódio 100 mM, EDTA 2 mM e cloreto de magnésio (MgCl_2) 1 mM (Chen e Gallie, 2006). Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 min a 4 °C e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático. A atividade da DHAR foi determinada de acordo com Nakano e Asada, (1981), pela adição do extrato enzimático em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0; desidroascorbato 2 mM e GSH 5 mM. O meio de reação foi incubado a 30°C e a variação na absorvância medida a 265 nm, durante o primeiro minuto de reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar $14 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.6. AVALIAÇÃO DO SISTEMA ANTIOXIDANTE NÃO ENZIMÁTICO

2.6.1. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH), OXIDADA (GSSG) E TOTAL (GSH+GSSG)

As concentrações de GSH e GSSG foram determinadas de acordo com o método descrito por Griffith (1980). Amostras de aproximadamente 100 mg de massa fresca de raiz foram homogeneizadas em meio constituído de HCl 0,1 M e EDTA 1 mM, seguido de centrifugação a 12.000xg, por 10 min a 4°C. Para a determinação da concentração de glutatona total (GSH+GSSG), 100 µL do sobrenadante foram adicionados a um meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,5, NADPH 30 µM e DTNB 0,6 mM [ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzóico)]. Após incubação a 30°C durante 5 min, foram adicionados 10 µL da enzima redutase da glutatona (50 U mL^{-1}), sendo a absorvância monitorada durante o primeiro minuto de reação a 412 nm. Para a determinação da concentração de

glutathiona oxidada (GSSG) uma alíquota de 200 µL do sobrenadante foi tratada com 10 µL de 2-vinilpiridina (2-VP) durante 60 min a 30°C. Após derivatização da GSH com 2-VP, a concentração de GSSG foi determinada conforme descrito anteriormente para glutathiona total. A concentração de glutathiona reduzida foi calculada pela diferença entre as concentrações de glutathiona total e de glutathiona oxidada. As concentrações de GSH e GSSG foram determinadas por meio de curva de calibração, utilizando-se padrões autênticos de glutathiona.

2.6.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ASCORBATO, DESIDROASCORBATO E ASCORBATO TOTAL

Para a determinação das concentrações de ascorbato (AA) e desidroascorbato (DHA), amostras de 300 mg de raízes foram homogeneizadas em TCA 6% (p/v) e posteriormente centrifugadas a 15.000 g por 5 min, a 4 °C (Kampfinkel et al., 1995). Ascorbato total (AA + DHA) foi determinado em alíquotas dos sobrenadante tratadas com ditioneitol (DTT) 0,5 mM e tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,4, na temperatura de 42°C, por 15 min. Em seguida, foi adicionado N-etilmaleimida (NEM) 0,025% (p/v), TCA 2,5% (p/v), H₃PO₄ 8,4% (v/v), 2,2"-dipiridil 0,8% (p/v) e FeCl₃ 0,3% (p/v) e incubou-se novamente a 42 °C, durante 40 min. A reação foi paralisada em banho de gelo e a absorvância determinada a 525 nm. A concentração de AA foi determinada conforme descrito anteriormente, mas omitindo-se o DTT e o NEM. A concentração de DHA foi calculada pela diferença entre a concentração total (AA + DHA) e a concentração da forma reduzida (AA). As concentrações de AA, DHA e ascorbato total foram estimadas com base em curva de calibração preparada, com padrões e ascorbato e os resultados expressos em µmol g⁻¹ MF.

2.7 PERFIL METABÓLICO

2.7.1. EXTRAÇÃO DOS METABÓLITOS

A avaliação do perfil metabólico foi realizada apenas para as plantas após 72h de exposição ao Al. A extração dos metabólitos seguiu o protocolo adaptado de Lisec et al. (2006), em que 100 mg de material vegetal, coletados ao meio dia, foram macerados em nitrogênio líquido e liofilizados a -48°C por 12 horas e armazenados a

-80°C até a extração. Para a extração foram utilizados 10 mg de material liofilizado e adicionados 1,5 mL de tampão de extração (água ultrapura, metanol P.A. e clorofórmio 1: 2,5: 1) e 60 µL de ribitol 0,2 mg mL⁻¹ em cada amostra. As amostras foram agitadas a 950 rpm em termomixer a 4°C por 30 minutos. Posteriormente foram centrifugadas a 14.000xg a 4°C por 5 minutos e, então, 1 mL do sobrenadante foi transferido para novo tubo, onde foram adicionados 750 µL de água ultrapura prosseguindo-se nova centrifugação a 14.000xg a 4°C por 15 minutos. Alíquotas do sobrenadante foram transferidas para novos tubos, secas em concentrador à vácuo sem aquecimento e armazenadas a -80°C até a derivatização.

2.7.2. DERIVATIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA AMOSTRA

Antes de iniciar esta etapa as amostras armazenadas a -80°C foram secas novamente em concentrador à vácuo por 30 minutos. As amostras foram submetidas à derivatização com 40 µL de piridina, contendo metoxiamina hidróclorido a 20 mg mL⁻¹, sob agitação de 300 rpm, por 2 horas, a 37°C. Após esse período foi adicionado 70 µL da solução de N-Metil-N- (trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA) (20 µL mL⁻¹ da mistura padrão do tempo de retenção), previamente preparada segundo Lisec et al. (2006), seguido por aquecimento a 37°C por 30 min. Por fim, 100µL da alíquota foi transferida para vial e realizada a análise subsequente. Os níveis relativos de metabólitos foram determinados nas amostras derivatizadas por meio de cromatografia gasosa acoplada ao detector por espectrometria de massas (GC-MS), num sistema de análises composto por cromatógrafo a gás (Agilent 7890A) e espectrômetro TruTOF® HT TOFMS, Leco, equipado com coluna capilar de 30 m (MDN-35), de acordo com (Lisec et al., 2006). Para realização das análises, foi injetado 1 µl da amostra no modo *splitless* a 230°C, carregado pelo gás hélio, em fluxo contínuo de 2 mL min⁻¹. A temperatura do forno foi inicialmente mantida constante a 80° C e, em seguida, foi aumentado em 15°C min⁻¹, até alcançar a temperatura de 330 °C, a qual foi mantida durante 5 minutos. Os dados foram processados no programa TargetSearch (Cuadros-Inostroza et al., 2009). Depois de identificados, os valores relativos dos metabólitos foram normalizados pelo peso da amostra e pela mediana do valor relativo.

2.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram submetidos à análise de variância ANOVA, sendo as médias comparadas com o Teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas à partir do software RBIO (Biometria no R) (Bhering 2017).

3. RESULTADOS

Independente do tempo, após exposição ao Al, as raízes de ambos cultivares de soja apresentaram aumento na concentração de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), exceto em 72h para o cultivar Conquista (Figura 1A). Entre os cultivares, a maior concentração de $O_2^{\cdot-}$ foi observada nas raízes do cultivar P98Y70 após 72 horas de exposição ao Al, sendo 30% maior em relação ao cultivar Conquista para esse mesmo tratamento. Para os três tempos de avaliação, o cultivar P98Y70 sempre apresentou aumento na concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) após tratamento com Al (Figura 1B). Já para o cultivar Conquista houve aumento somente no tempo de 24h. Com 48 e 72h de exposição ao Al, a concentração de H_2O_2 foi 48 e 37% maior na raiz do cultivar P98Y70 em relação ao Conquista, respectivamente.

Após exposição ao Al, as raízes de ambos cultivares apresentaram aumento na concentração de MDA, exceto em 24h para o cultivar P98Y70 (Figura 1C). Com 24h de exposição ao Al, o cultivar Conquista apresentou a maior taxa de peroxidação de lipídeos. Contudo, após 48 e 72h de exposição ao Al, a taxa de peroxidação de lipídeos foi maior no cultivar P98Y70, sendo 24% e 34% maior que o cultivar Conquista, respectivamente.

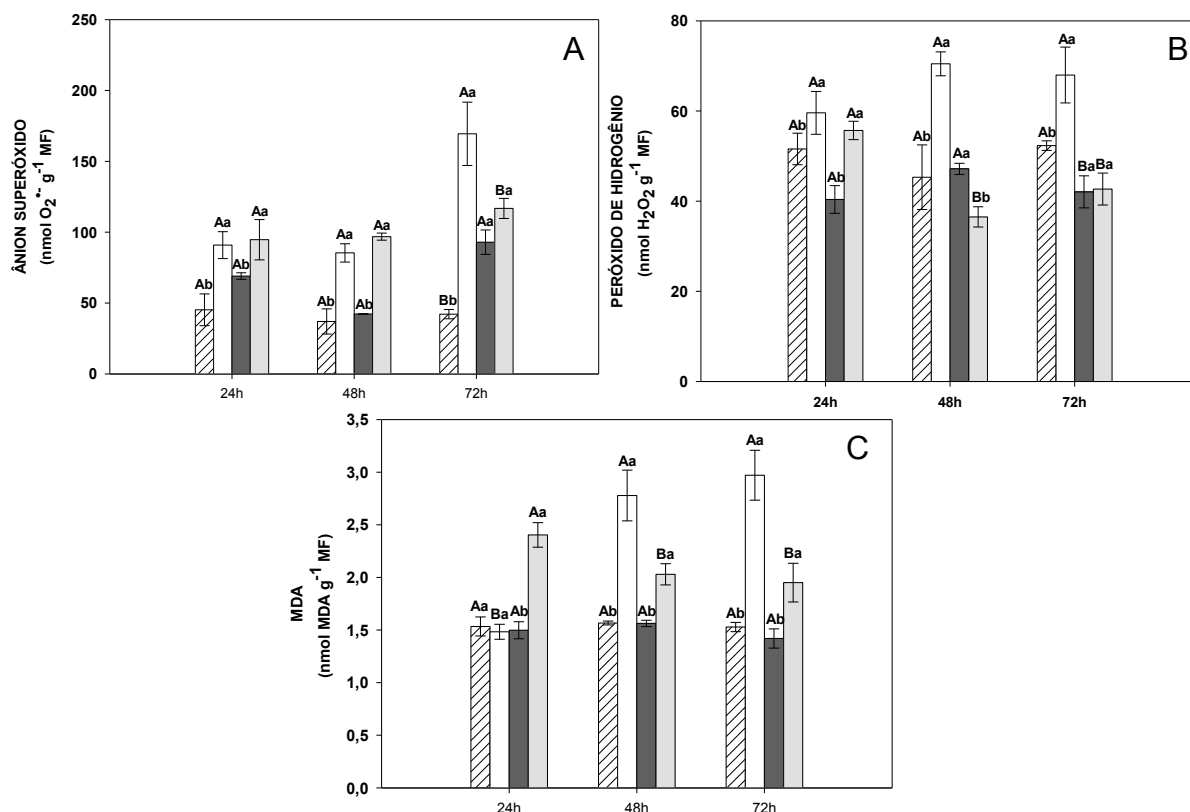


Figura 1: Concentração de ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$), de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e de MDA (peroxidação de lipídios) em raízes de dois cultivares de soja, P98Y70-0μM Al (▨), P98Y70-100μM Al (□), Conquista-0μM Al (■), Conquista-100μM Al (▩). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre cultivares e pela mesma letra minúscula entre tratamentos não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão da média.

De modo geral, a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POX) aumentou em ambos cultivares após exposição ao Al, e entre os cultivares foi maior no cultivar Conquista. Já a enzima peroxidase do ascorbato (APX) apresentou variações na atividade entre os cultivares após exposição ao Al, e entre os cultivares, a atividade foi maior no P98Y70 (Figura 2).

Com relação a SOD, a atividade desta enzima aumentou em ambos cultivares após tratamento com Al, exceto em 72h para o Conquista, no qual a atividade permaneceu inalterada (Figura 2A). Já entre os cultivares na presença de Al, a atividade da SOD foi maior no cultivar Conquista e P98Y70 com 24 e 72h, respectivamente. Após exposição do cultivar Conquista ao Al, a atividade da CAT aumentou em 24 e 48h e reduziu em 72h. Já o cultivar P98Y70 apresentou aumento apenas no tratamento com 24h (Figura 2B). Entre os cultivares, a atividade da CAT foi sempre maior nas raízes do cultivar Conquista após exposição ao Al. Independente do tempo de avaliação, após exposição ao Al a atividade da POX

aumentou nas raízes do cultivar Conquista (Figura 2C). Já no cultivar P98Y70 houve aumento apenas com 72h de tratamento. Entre os cultivares, a atividade da POX foi sempre maior nas raízes do cultivar Conquista, exceto no tratamento controle com 24h de avaliação, no qual a atividade foi semelhante. Após exposição ao AI, a atividade da APX aumentou no cultivar P98Y70 após 24 e 72h e no Conquista após 48h (Figura 2D). Entre os cultivares, P98Y70 apresentou maior atividade da APX após 24 e 72h de tratamento com AI e Conquista após 48h.

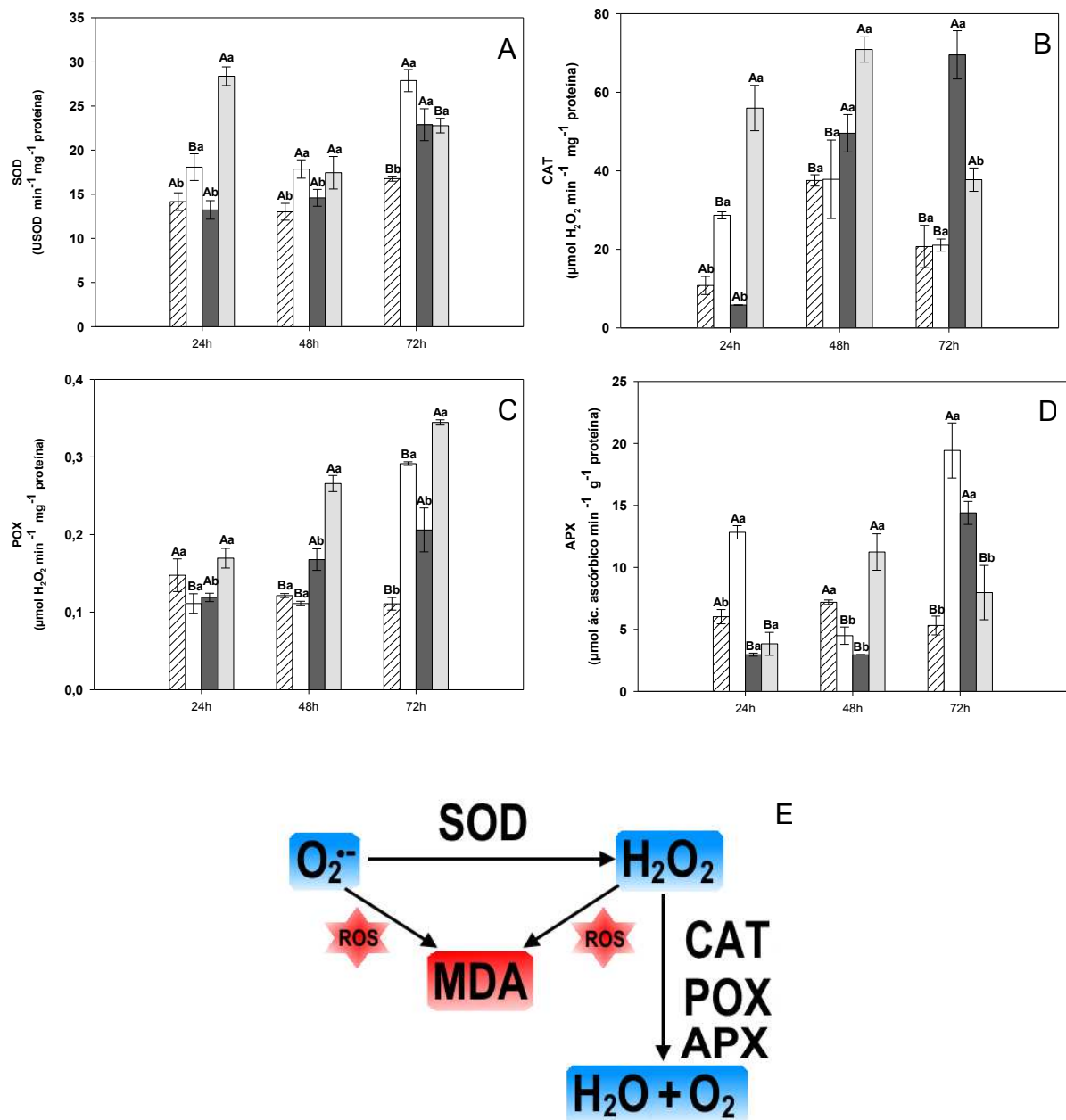


Figura 2: Atividade das enzimas Superóxido Dismutase (SOD) (A), Catalase (CAT) (B), Peroxidase (POX) (C) e Peroxidase do Ascorbato (APX) (D) em raízes de dois cultivares de soja. Esquema representativo da ação conjunta das enzimas SOD, CAT, POX e APX (E). P98Y70-0μMAl (▨), P98Y70-100μM Al (□), Conquista-0μM Al (■), Conquista-100μM Al (▩). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre cultivares e pela mesma letra minúscula entre tratamentos não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão da média. Esquema representativo da atuação mútua das enzimas para controle de ROS.

Na presença de Al, houve aumento na atividade da enzima GR em todos os tempos para os dois cultivares (Figura 3A). Entre os cultivares, o Conquista apresentou maior atividade da GR nos tempos de 24 e 48 horas. Para a GST, o Al aumentou a atividade na Conquista com 24 horas e em P98Y70 com 48 e 72 horas (Figura 3B). Entre os cultivares, as maiores atividades para a GST foram obtidas

para Conquista com 24 horas e para P98Y70 com 72 horas após tratamento com Al.

Inicialmente, a atividade da GPX reduziu em ambos cultivares após 24 horas de exposição ao Al (Figura 3C). Contudo, após 48 e 72 horas de exposição ao Al houve acréscimo na atividade da GPX, apenas para o cultivar Conquista. Independente da presença de Al, com 48 e 72 horas de tratamento, a atividade da GPX foi sempre maior nas raízes do Conquista. A atividade da enzima γ -GCS não diferiu entre os cultivares e não houve alteração na atividade após tratamento com Al, exceto para P98Y70 com 72 horas de avaliação (Figura 3D).

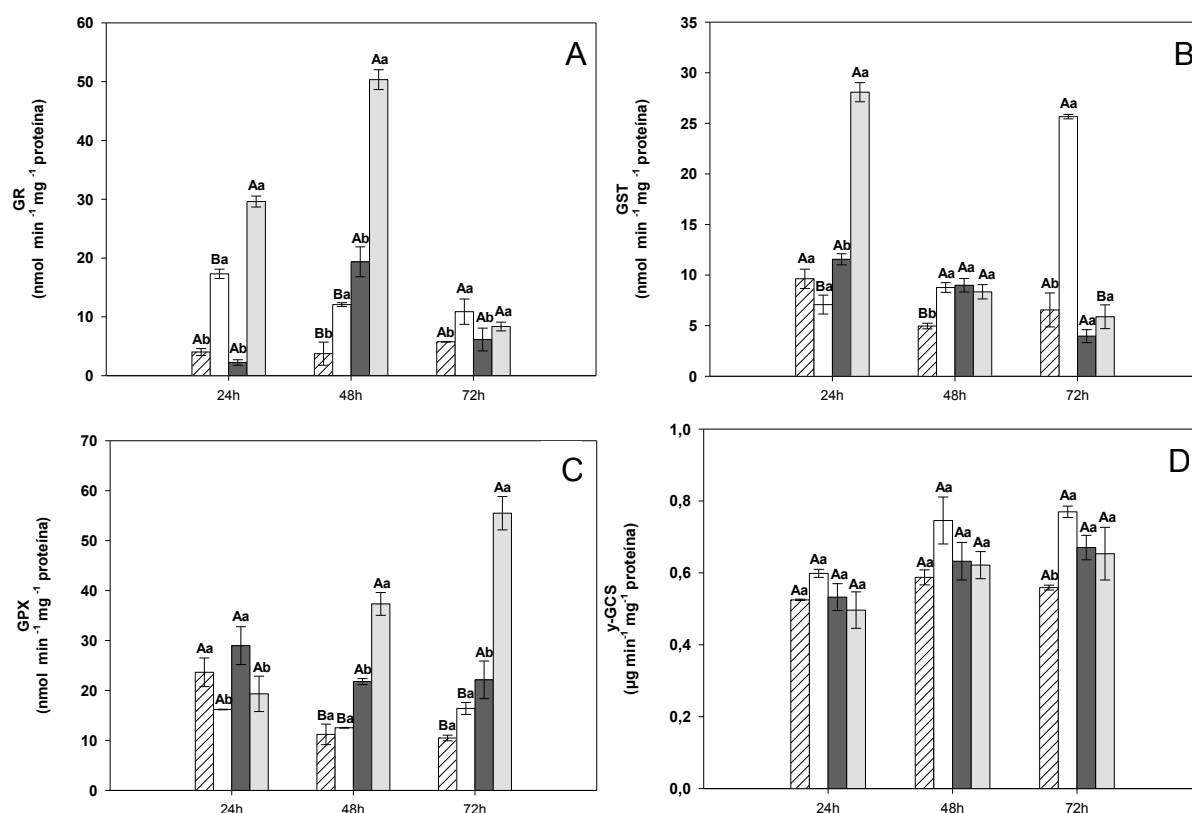


Figura 3: Atividade das enzimas Glutathiona Redutase (GR) (A), Sulfotransferase da Glutathiona (GST) (B), Peroxidase da Glutathiona (GPX) (C) e γ -Glutamilcisteína (γ -GCS) (D) em raízes de dois cultivares de soja, P98Y70-0 μ MAI (▨), P98Y70-100 μ M Al (□), Conquista-0 μ M Al (■), Conquista-100 μ M Al (▩). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre cultivares e pela mesma letra minúscula entre tratamentos não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão da média.

Com relação a concentração de glutathiona total, após 24 e 48 horas de exposição ao Al os cultivares não diferiram entre si. Já após 72 horas de exposição ao Al, P98Y70 apresentou maior concentração de glutathiona total em relação ao cultivar Conquista (Figura 4A). A concentração de glutathiona oxidada (GSSG) foi maior no cultivar P98Y70 após 24 horas de exposição ao Al, bem como no

tratamento controle. Para os demais tempos de tratamento não houve diferenças significativas entre os cultivares (Figura 4B). A concentração de glutathiona reduzida (GSH) seguiu a mesma tendência da concentração de glutathiona total. O cultivar P98Y70 apresentou maior concentração de GSH sob tratamento com Al após 72 horas (Figura 4C).

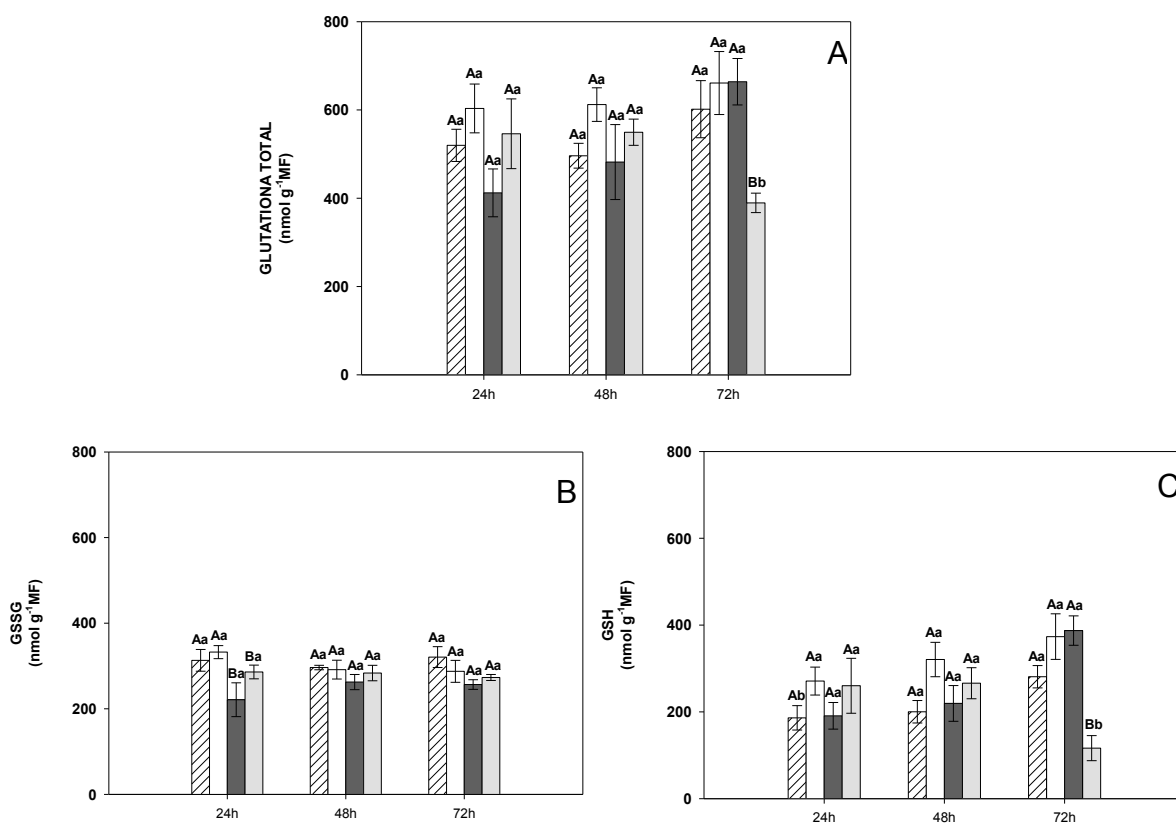


Figura 4: Concentração de Glutathiona Total (GSH+GSSG) (A), Glutathiona Reduzida (GSH) (B), Glutathiona Oxidada (GSSG) (C) em raízes de dois cultivares de soja, P98Y70-0μM Al (▨), P98Y70-100μM Al (□), Conquista-0μM Al (■), Conquista-100μM Al (▩). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre cultivares e pela mesma letra minúscula entre tratamentos não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão da média.

Nos primeiros tempos de avaliação, o Al reduziu a atividade da enzima MDHAR após 24 horas de tratamento para o cultivar P98Y70 e após 48 horas para o Conquista. Entretanto, após 72 horas de tratamento, o Al aumentou a atividade desta enzima nos dois cultivares. Entre os cultivares, as maiores atividades da MDHAR foram obtidas nos tratamentos controles do P98Y70 com 24 horas e no Conquista com 48 horas (Figura 5A). A atividade da DHAR reduziu em ambos cultivares após 24 e 72 horas de tratamento com Al. Entre os cultivares, as maiores

atividades da DHAR foram obtidas após 48 horas de avaliação no cultivar P98Y70 independente da presença de Al (Figura 5B).

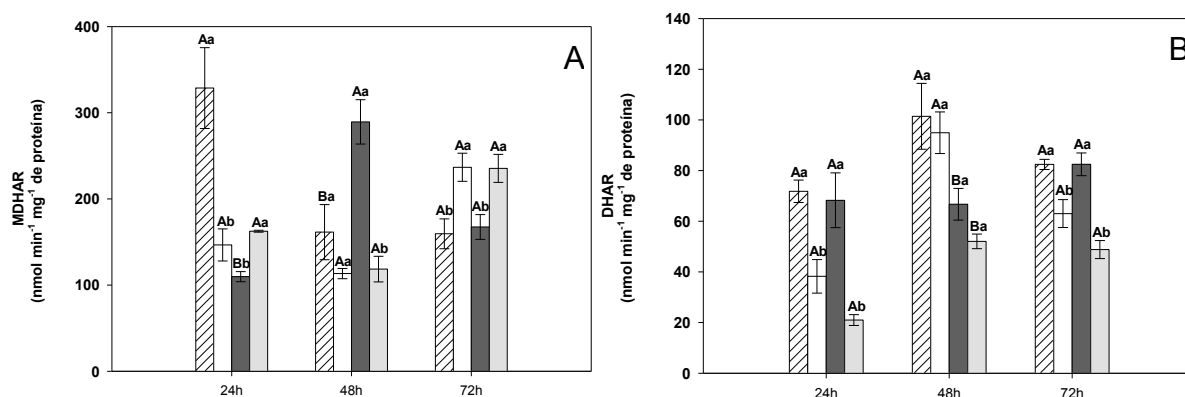


Figura 5: Atividade das enzimas Monodesidroascorbato Redutase (MDHAR) (A) e Desidroascorbato Redutase (B) em raízes de dois cultivares de soja, P98Y70-0μMAI (▨), P98Y70-100μMAI (□), Conquista-0μM Al (■), Conquista-100μM Al (▒). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre cultivares e pela mesma letra minúscula entre tratamentos não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão da média.

A concentração de ascorbato total (AA+DHA) aumentou no cultivar P98Y70 durante o tempo de tratamento com Al, atingindo a maior concentração após 72 horas de exposição ao metal. O cultivar P98Y70 apresentou concentração de ascorbato total 69%, 63% e 77% maiores que o cultivar Conquista após 24, 48 e 72 horas de exposição ao Al. Já o cultivar Conquista apresentou aumento na concentração de ascorbato total, após 48 e 72 horas de tratamento com Al (Figura 6A). Para os resultados de ascorbato (AA), o cultivar P98Y70 apresentou maiores concentrações após 24 horas de tratamento em relação ao cultivar Conquista. Decorridas 48 e 72 horas de exposição ao Al, os dois cultivares não apresentaram diferenças entre si, entretanto, para o Cultivar Conquista, houve acréscimo nas concentrações de AA em relação aos seus tratamentos controle (Figura 6B).

A concentração de desidroascorbato (DHA) foi maior no cultivar P98Y70 após 24, 48 e 72 horas de exposição ao Al, sendo 45%, 45% e 22% maiores que no cultivar Conquista sob mesmo tratamento, respectivamente (Figura 6C). Para os tratamentos controles, o cultivar P98Y70 apresentou maior concentração de DHA que o cultivar Conquista, após 48 e 72 horas de período experimental (Figura 6C).

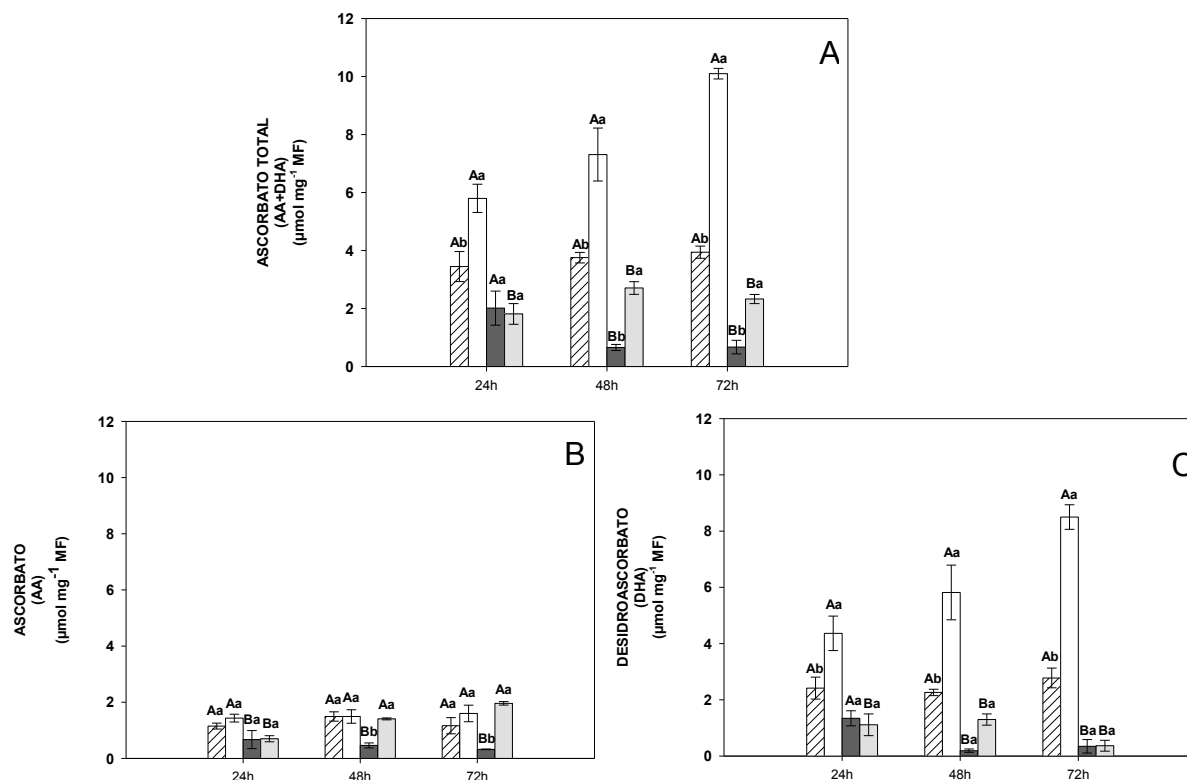


Figura 6: Concentração de Ascorbato Total (A), Ascorbato (B) e Desidroascorbato (C) em raízes de dois cultivares de soja, P98Y70-0μM Al (▨), P98Y70-100μM Al (□), Conquista-0μM Al (■), Conquista-100μM Al (▩). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre cultivares e pela mesma letra minúscula entre tratamentos não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão da média.

Após 72 horas de exposição ao Al, foi possível observar alterações na abundância relativa em diferentes grupos de metabólitos (aminoácidos, ácidos orgânicos e açúcares) nas raízes dos dois cultivares de soja (Tabela 1). Após análise, foram detectados 8 diferentes tipos de aminoácidos nas raízes dos cultivares de soja. Entretanto nenhum aminoácido apresentou alteração na abundância relativa nas raízes do cultivar Conquista após tratamento com Al. Por outro lado, os aminoácidos leucina, asparagina, cisteína e isoleucina apresentaram acréscimos nas raízes do cultivar P98Y70 após tratamento com Al. Com relação aos ácidos orgânicos, foram detectados 9 tipos diferentes. Apenas dois não apresentaram alterações nas suas abundâncias relativas após tratamento com Al, ácido láctico e succinato. Os ácidos pirúvico, malônico e málico aumentaram nas raízes do cultivar P98Y70 após exposição ao Al. Já para o cultivar Conquista, os ácidos pirúvico, oxálico e ascórbico apresentaram aumento após tratamento com este metal. Por outro lado, o Al reduziu a abundância dos ácidos malônico e fumárico no cultivar Conquista. Entre os cultivares, a abundância relativa dos ácidos

malônico e málico foi maior no cultivar P98Y70, e dos ácidos cítrico e ascórbico foi maior no cultivar Conquista.

Para avaliação dos açúcares, foram detectados 9 diferentes tipos. Os açúcares galactose, rafinose, frutose e ribulose não apresentaram alteração na suas abundâncias relativas em nenhum dos dois cultivares após tratamento com Al. Já os açúcares eritrose, maltose, xilose e ribose aumentaram nas raízes do cultivar P98Y70 após exposição ao Al. Para o cultivar Conquista, houve aumento nos açúcares xilose e frutose 6-fosfato após tratamento com este metal. Por outro lado, a presença de Al reduziu a disponibilidade dos açúcares frutose 6-fosfato no cultivar P98Y70 e do açúcar maltose no cultivar Conquista. Entre os cultivares, o tratamento com Al aumentou a abundância do açúcar frutose 6-fosfato e ribose, nas raízes dos cultivares Conquista e P98Y70, respectivamente.

Dois componentes do metabolismo secundário de plantas, foram identificados nas raízes dos dois cultivares de soja: ácido chiquímico e ácido cinâmico. Entretanto, não houve alterações nas suas abundâncias relativas após exposição ao Al em nenhum dos cultivares analisados.

Na figura 7 é possível acompanhar o comportamento de cada metabólito nas raízes dos cultivares P98Y70 e Conquista após 72 horas de tratamento com Al. Embora os testes estatísticos não tenham apontado diferença significativa para alguns metabólitos, o padrão de cor demonstra que houve tendência biológica visível, tendo o tratamento controle como referência.

Tabela 1: Abundância relativa de diferentes grupos de metabólitos em raízes de dois cultivares de soja P98Y70 e Conquista após 72 horas de exposição aos tratamentos controle (0 μ M de Al) e alumínio (100 μ M de Al).

CULTIVAR	METABÓLITOS						
	Leucina	Ácido Aspártico	Tirosina	Asparagina	Cisteína	Isoleucina	Valina
P98Y70 Controle	68,59 Ab	90,34 Aa	114,17 Aa	103,53 Ab	102,08 Ab	114,92 Ab	100,61 Aa
P98Y70 Al	149,03 Aa	114,14 Aa	120,48 Aa	315,27 Aa	142,00 Aa	153,52 Aa	130,04 Aa
Conquista Controle	104,82Aa	113,86 Aa	125,57 Aa	126,72 Aa	115,26 Aa	113,63 Aa	101,90 Aa
Conquista Al	71,84 Ba	102,21 Aa	102,37Aa	97,29 Ba	104,59 Ba	102,61 Ba	88,46Ba

CULTIVAR	METABÓLITOS						
	Alanina	Ácido Pirúvico	Ácido Cítrico	Ácido Malônico	Ácido Málico	Ácido Lático	Oxalacetato
P98Y70 Controle	92,69 Aa	97,37 Ab	91,21 Aa	103,66 Ab	92,00 Bb	119,29 Aa	74,54 Aa
P98Y70 Al	132,55 Aa	153,93 Aa	82,14 Ba	152,35 Aa	140,67 Aa	86,21 Aa	81,43 Aa
Conquista Controle	104,00 Aa	95,72 Ab	122,67 Aa	128,05 Aa	134,53 Aa	90,05 Aa	52,35 Ab
Conquista Al	102,57Aa	143,72 Aa	129,37 Aa	55,28 Bb	97,61 Ba	127,65 Aa	106,73 Aa

CULTIVAR	METABÓLITOS						
	Ácido Fumárico	Succinato	Ácido Ascórbico	Eritrose	Maltose	Galactose	Rafinose
P98Y70 Controle	70,14 Ba	99,20 Aa	89,36 Aa	37,03 Bb	81,04 Bb	110,10 Aa	77,04 Aa
P98Y70 Al	121,87 Aa	102,32 Aa	39,00 Bb	134,10 Aa	134,53 Aa	100,06 Aa	100,34 Aa
Conquista Controle	172,49 Aa	153,87 Aa	112,05 Ab	79,27 Aa	239,63 Aa	118,11 Aa	115,87 Aa
Conquista Al	114,72 Ab	147,70 Aa	190,70 Aa	109,34 Aa	154,31 Ab	100,07 Aa	138,06 Aa

CULTIVAR	METABÓLITOS						
	Frutose	Xilose	Frutose-6-Fosfato	Ribulose	Ribose	Ácido Chiquímico	Ácido Cinâmico
P98Y70 Controle	85,89 Aa	97,16 Ab	286,94 Aa	109,05 Aa	103,72 Ab	97,02 Aa	124,39 Aa
P98Y70 Al	98,00 Aa	137,44 Aa	82,81 Bb	127,36 Aa	117,84 Aa	99,11 Aa	96,83 Aa
Conquista Controle	88,66 Aa	61,93 Bb	72,68 Bb	143,71 Aa	100,75 Aa	103,20 Aa	125,19 Aa
Conquista Al	109,60 Aa	109,82 Aa	284,02 Aa	100,00 Aa	100,00 Ba	102,20 Aa	86,23 Aa

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre cultivares e pela mesma letra minúscula entre tratamentos não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Cores representativas para diferentes grupos de metabólitos. Aminoácidos (rosa), ácidos orgânicos (lilás), açúcares (laranja), compostos secundários (azul).

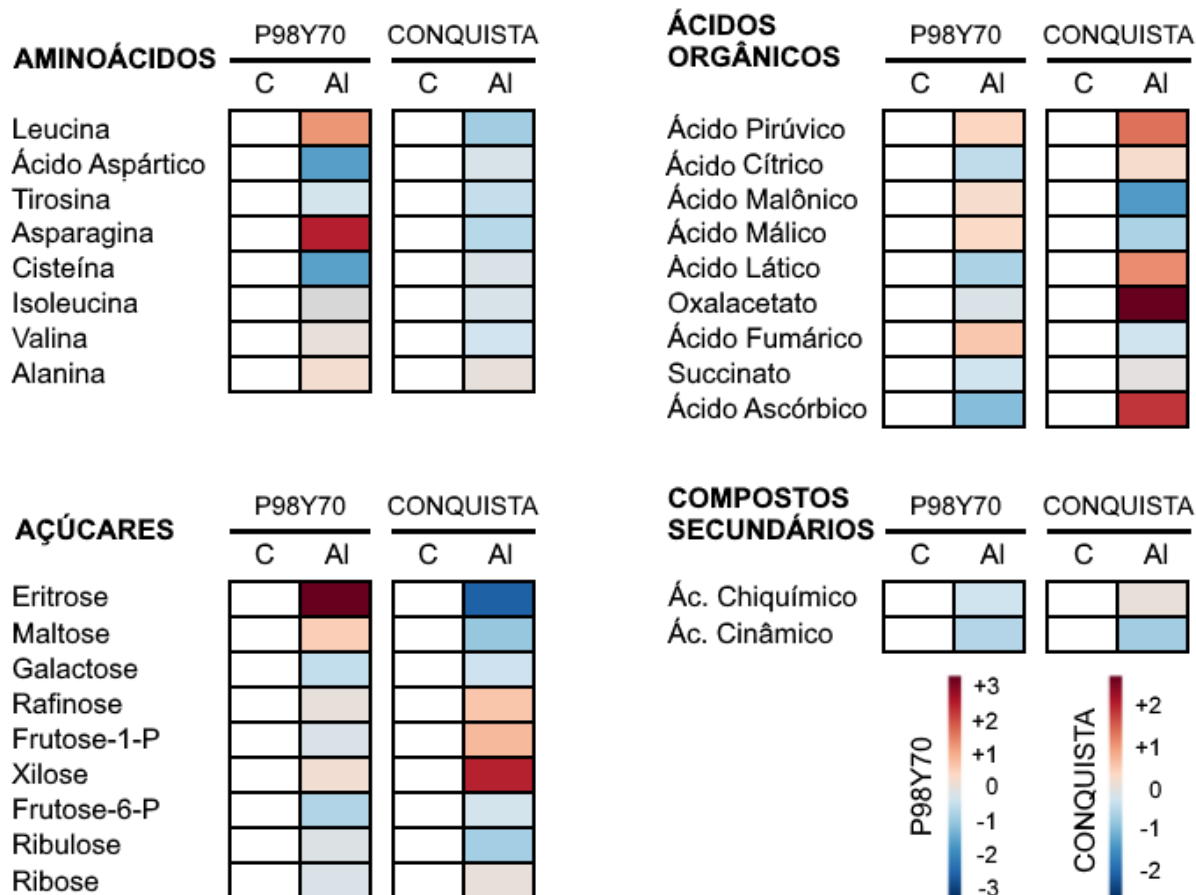


Figura 7. *Heatmap* representando as mudanças na abundância relativa de diferentes grupos de metabólitos em raízes de dois cultivares de soja: P98Y70 e Conquista, após 72 horas de exposição ao Al.

4. DISCUSSÃO

A exposição ao Al resulta em estresse oxidativo através do acúmulo de ROS, que resulta no comprometimento dos sistemas antioxidantes e na peroxidação lipídica da membrana (Achary et al., 2008; Ma et al., 2012; Xu et al., 2012). A peroxidação lipídica induzida por Al foi relatada em muitas espécies de plantas, incluindo sorgo (Peixoto et al., 1999), grama-verde (Panda et al., 2003), arroz (Kuo e Kao 2003, Guo et al., 2012), cevada (Guo et al., 2004), triticale (Liu et al., 2008), e trigo (Hossain et al., 2005). No presente estudo, foram encontrados níveis elevados de ROS nos dois cultivares após exposição ao Al, entretanto, o cultivar P98Y70 apresentou níveis mais elevados de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio após exposição ao Al. Consequentemente, o cultivar P98Y70 também apresentou os maiores teores de peroxidação de lipídios em comparação ao cultivar Conquista.

Aumentos similares na produção de H_2O_2 e peroxidação lipídica em plantas expostas ao Al foram encontrados em lúpulo (Tamás et al., 2004); arroz (Ma et al., 2007); tabaco (Zhang et al., 2009); milho (Anjum et al., 2016) e feijão-da-índia (Chowra et al., 2017). Os resultados encontrados para acúmulo de ROS e peroxidação lipídica coincidem com os resultados da análise de crescimento radicular (Cap. 1), nos quais apontam para uma maior taxa de inibição do alongamento da raiz para o cultivar P98Y70, enquanto o cultivar Conquista apresentou menores taxas de inibição, mostrando-se menos sensível à toxicidade do Al.

A implicação do estresse oxidativo como mecanismo primário de inibição do alongamento radicular pela toxicidade do Al, ainda é discutível (Navascues et al., 2012). No entanto, o maior acúmulo de $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e de peroxidação lipídica nas raízes e as maiores taxas de inibição do alongamento radicular do cultivar P98Y70, confirmam a presença do estresse oxidativo durante a toxicidade por Al.

Aumentos significativos na produção de MDA e ROS e atividade total das enzimas antioxidantes têm sido documentados em plantas submetidas ao estresse por Al, incluindo batata (Tabaldi et al., 2009), tabaco (Yin et al. 2010), arroz (Pandey et al., 2016), tomate (Nogueirol et al., 2015), alfafa (Cui et al., 2017) e sorgo (Zhou et al., 2017).

A SOD é uma enzima antioxidante que está envolvida na dismutação do $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 e O_2 e está localizada em diferentes organelas celulares (Sharma et al., 2012). No presente trabalho os níveis de atividade da enzima SOD foram superiores nas raízes do cultivar Conquista após 24h de exposição ao Al. Por outro lado, após 48 e 72h de exposição ao estresse, os níveis de atividade da SOD aumentaram no cultivar P98Y70 e diminuíram no cultivar Conquista. Esses resultados sugerem que o tempo de ativação dos mecanismos de degradação de $O_2^{\bullet-}$ foi menor no cultivar Conquista, conferindo a esse cultivar menor susceptibilidade aos danos causados pelo ânion superóxido, e por conseguinte, ao estresse por Al.

Semelhante aos nossos resultados, maior atividade de SOD em cultivar caracterizado como tolerante ao Al, e menor atividade em cultivar caracterizado como sensível foi relatada em soja, milho, arroz, azevém e trigo (Du et al., 2010; Meriga et al., 2010; Pandey et al., 2013). Gill et al. (2015) mostraram que as plantas transgênicas com superexpressão de SOD possuem maior eficiência de eliminação de ROS e tornam-se plantas mais resistentes ao estresse abiótico.

Situação semelhante à atividade da SOD foi encontrada nas atividades das enzimas CAT e POX. O cultivar Conquista, sob exposição de Al, apresentou maior atividade das duas enzimas, sendo que para a enzima CAT houve aumento crescente da atividade até 48h, com uma queda após 72h de exposição, entretanto, mantendo maior atividade que o cultivar P98Y70. Esses resultados sugerem que o mecanismo de eliminação de H_2O_2 por CAT em P98Y70 é menos efetivo sob o estresse em comparação com o cultivar Conquista. Liu et al. (2017) mostraram que a atividade da catalase reduziu em raízes do cultivar de soja Jiyu70 após 12 horas de exposição ao Al. Essas discrepâncias podem ser causadas pelos diferentes métodos de pesquisa, diferentes tempos de medição, e ainda por diferenças entre cultivares.

Para a POX, a atividade foi crescente no cultivar Conquista e apresentou o maior pico após o tempo máximo de exposição ao Al. A atividade da APX também se mostrou constante para o cultivar Conquista ao longo do período de exposição ao Al. Esses resultados significam que o cultivar Conquista manteve um padrão para a atividade das enzimas, logo, esse pode ter sido um dos motivos que lhe conferiu menor susceptibilidade ao estresse oxidativo induzido pelo Al. Du et al. (2010) observaram que em raízes de soja a atividade da APX aumentou proporcionalmente com a concentração de Al e à duração do tratamento. O mesmo comportamento foi encontrado em plantas de arroz 3 semanas após a exposição ao Al (Silva et al., 2013). Uma maior atividade da APX também foi encontrada em plantas de feijão e de trigo após exposição ao estresse por Al (Wang et al., 2010; Sun et al., 2015).

A glutathiona pode ser encontrada nas células em dois estados, o reduzido (GSH) e o oxidado (GSSG), sendo a forma oxidada formada por duas moléculas de glutathiona unidas por uma ponte dissulfeto (Rouhier et al., 2007). Diversas são as funções da glutathiona no meio celular, tais como transporte e estoque de enxofre (S) reduzido; regulação nutricional para o S; antioxidante; transporte de hormônios e detoxificação de xenobióticos e metais pesados (Rennenberg, 2001).

No presente trabalho, o comportamento da atividade da enzima γ -glutamylcisteína sintetase não foi suficientemente representativo para diferenciar os dois cultivares entre sensível e tolerante. Entretanto, P98Y70 apresenta um pequeno acréscimo na atividade da enzima após 72h de estresse, o que refletiu nesse cultivar uma maior concentração de GSH após 72h de exposição ao estresse.

A atividade da GR no presente estudo sugere que o cultivar Conquista mantém maiores níveis de atividade da enzima constitutivamente e também sob indução do estresse causado pelo Al. Entretanto, a atividade da GR não foi um indicativo conclusivo no aumento da concentração de GSH nos cultivares após o estresse por Al. Aumentos na atividade total da enzima GR têm sido claramente documentados em plantas submetidas ao estresse por Al, incluindo lúpulo (Guo et al., 2004), arroz (Ma et al., 2007), centeio (Silva et al., 2013) e tomate (Nogueiral et al., 2015). Por outro lado, um declínio na atividade da GR pelo estresse com Al foi relatado em ervilha após exposição de 48 horas (Panda e Matsumoto, 2010).

Para a atividade da enzima GST, os resultados apresentados sugerem, mais uma vez, que o cultivar Conquista leva menor tempo de ativação das enzimas antioxidantes sob o estresse por Al. Outra evidência que sustenta nossa hipótese, é a atividade aumentada da GST apenas após 72h de exposição ao Al para P98Y70, corroborando assim, o maior tempo que esse cultivar leva até a ativação de enzimas importantes do sistema de defesa antioxidante. Ezaki et al. (2001) descobriram que a superexpressão da GST é uma maneira efetiva de prevenir a toxicidade de Al em *Arabidopsis*. Sun et al. (2015) também demonstraram maior atividade da enzima GST em plantas de trigo sob estresse por Al. Esses autores sugeriram que maior atividade da enzima GST resulta em maior desintoxicação de ROS.

No presente estudo, a atividade da GPX no cultivar Conquista manteve o seu padrão, e apresentou atividade crescente de GPX, enquanto o cultivar P98Y70 manteve baixa atividade, chegando a ser menor que o tratamento controle. Sharma et al. (2012) também relataram maior atividade da GPX durante exposição a vários metais pesados e seca. Pandey et al. (2016) sugerem que a atividade aumentada da GPX na remoção de H_2O_2 em cultivares de arroz tolerantes ao Al desempenhe um papel crucial na defesa da planta durante o estresse oxidativo.

Os resultados obtidos para GSH sugerem que as moléculas de glutathione não foram responsáveis pela defesa aos danos oxidativos no cultivar Conquista, mas pode ter contribuído na defesa antioxidante do cultivar P98Y70 após 72h de exposição ao estresse. Panda et al. (2003) e Devi et al. (2003) encontraram maiores concentrações de glutathione em gramíneas e plantas de tabaco submetidas ao estresse por Al. Sun et al. (2015) demonstraram em seu estudo, no qual raízes de

trigo foram submetidas ao estresse por Al, uma menor concentração de GSH, que pode ser explicada pela maior atividade da enzima GST, tal qual como ocorreu no presente trabalho.

No presente trabalho, as concentrações de ascorbato (AA) foram menores no cultivar Conquista, nos três tempos de imposição do estresse. Esses resultados poderiam ser explicados através da menor eficiência das enzimas MDHAR e DHAR, ou através do aumento da atividade da enzima APX. Nesse contexto, os resultados da atividade da enzima DHAR justificam os resultados para a menor concentração de ascorbato, já que a mesma também apresentou menor atividade no cultivar Conquista após 48h de exposição ao Al. Já os parâmetros de menor atividade da enzima MDHAR e maior atividade da APX parecem não justificar claramente as concentrações de ascorbato no cultivar Conquista.

As maiores concentrações de ascorbato encontrados no cultivar P98Y70 também poderiam ser explicados através das atividades das enzimas APX, MDHAR e DHAR. Entretanto, nossos resultados para a atividade dessas enzimas e a correlação com a maior concentração de ascorbato no cultivar P98Y70 não são conclusivos. Dessa forma, podemos inferir que a concentração de ascorbato nesse cultivar seja constitutivamente maior, e que, apesar de maior concentração de ascorbato, o referido cultivar apresentou maior teor de H_2O_2 e um nível mais elevado de peroxidação lipídica em comparação com o cultivar Conquista após exposição ao Al.

As maiores concentrações de DHA no cultivar P98Y70 fizeram aumentar nesse cultivar as concentrações de ascorbato total, entretanto, corrobora com nossos resultados anteriormente apresentados, que o ciclo do ascorbato não foi efetivo no combate ao estresse oxidativo, uma vez que esse mesmo cultivar apresentou maiores níveis de H_2O_2 nas células. Já o cultivar Conquista apresentou menores concentrações de DHA e de ascorbato total, entretanto, menores concentrações de H_2O_2 e menores taxas de peroxidação lipídica. Dessa forma, podemos sugerir que o ciclo do ascorbato não foi eficiente no combate ao estresse oxidativo imposto pela toxicidade do Al nas raízes de ambos os cultivares utilizados nesse estudo.

Yin et al. (2010) demonstraram que a superexpressão de DHAR, mas não de MDHAR, conferiu ao tabaco transgênico maior tolerância ao Al, protegendo as

raízes do estresse oxidativo. O aumento pode ser devido ao fato de que MDHA é uma molécula instável, e se não rapidamente reduzido a AA, pode ser oxidada espontaneamente para DHA (Asada, 1999). Sun et al. (2015) também mostraram em seus estudos com genótipos de trigo expostos ao Al, que o aumento na atividade de DHAR se sobrepôs à atividade de MDHAR, o que conferiu maior tolerância ao estresse oxidativo para o genótipo tido como tolerante.

No presente trabalho, a síntese de aminoácidos no cultivar P98Y70 pode ter sido aumentada como uma forma de tolerância ao estresse. Estretanto, o cultivar Conquista, por manter seus níveis iguais aos do tratamento controle, pode estar sinalizando que o Al não foi causador de estresse para que justificasse um ajuste metabólico para essas moléculas.

Nossos resultados sugerem que o aumento da exsudação de ácido cítrico e oxilacetato no cultivar Conquista pode ter sido um dos fatores primordiais para uma maior tolerância ao estresse por Al, o que pode ter levado à diminuição de moléculas de Al^{3+} no simplasto, devido à maior complexação. Em contraste, a maior secreção de ácido málico e malônico no cultivar P98Y70 parece não ter sido tão eficiente no combate às moléculas livres de Al^{3+} no simplasto, haja vista que esse cultivar apresentou menores taxas de alongamento celular (Cap. 1) e maiores de teores de ROS.

Nossos resultados vão ao encontro dos resultados encontrados por Silva et al. (2001), esses autores demonstraram que o ácido cítrico e não o málico foi responsável por conferir maior tolerância a plântulas de soja expostas ao estresse por Al. Além disso, Wang et al. (2013) descobriram que a superexpressão de genes relacionados à síntese de citrato em *Brassica napus* transgênica, pode promover aumento na exsudação de citrato sob o estresse de Al e com isso, aumentar a tolerância dessas plantas a esse agente tóxico.

De modo geral, os teores de açúcares não apresentaram diferenças entre os cultivares. O aumento de frutose-6-fosfato no cultivar Conquista após 72h de exposição ao estresse pode indicar maior tolerância desse cultivar. Nossos resultados sugerem que, com o aumento de frutose-6-fosfato o cultivar Conquista pôde manter uma maior reserva de intermediários para obtenção de energia. Esse resultado pode sugerir que houve uma maior taxa de rotação do ciclo TCA, fato esse que pode ser corroborado pelo maior acúmulo de ácido cítrico nesse cultivar, e por

não haver evidências de maiores teores de intermediários da glicose, como a frutose, que pudessem estar paralisando o ciclo. Grevenstuk et al. (2015) sugerem que a consequência da exposição ao Al nas raízes parece ser um maior consumo de energia. Em nosso trabalho essa consequência pode ser hipotetizada à partir da maior taxa de rotatividade do TCA no cultivar Conquista.

Os resultados obtidos através da análise do perfil metabólico, apontam evidências do comportamento de plântulas de soja frente ao estresse por Al. Entretanto, maiores informações acerca das alterações metabólicas ocorridas em plantas sob estresse por Al são necessárias, sobretudo, para que se possa caracterizar cultivares tolerantes e sensíveis a esse metal.

5. CONCLUSÕES

Nossos resultados sugerem que o cultivar P98Y70 neutraliza os efeitos negativos da toxicidade do Al nas raízes aumentando o conteúdo de GSH, ascorbato, aminoácidos, ácido málico e ácido malônico, embora sem sucesso porque os indicadores de estresse oxidativo e o alongamento radicular (Cap. 1) foram afetados pela exposição ao Al. Em contrapartida, o cultivar Conquista mostrou-se mais tolerante ao estresse causado pelo Al, uma vez que o aumento na atividade das enzimas SOD, CAT, POX, GST e GPX nas primeiras horas de exposição ao estresse, o maior acúmulo de citrato, oxalacetato e frutose-6-fosfato foram eficientes no combate às ROS, degradação de membrana, e consequentemente à menor taxa de inibição do alongamento radicular (Cap. 1).

Dessa forma, a tolerância em plantas de soja para o estresse causado pelo Al parece estar associada a maiores atividades constitutivas e induzidas das enzimas antioxidantes e à capacidade do ácido orgânico em neutralizar a toxicidade das moléculas de Al no meio simplástico. Portanto, a identificação de cultivares que possuam uma melhor adaptação a solos ácidos e com presença de Al tóxico, deve incluir estudos mais aprofundados sobre esses critérios.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Achary VM, Jena S, Panda KK, Panda BB (2008) Aluminium induced oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 70: 300-310.

Anjum SA, Ashraf U, Khan I, Tanveer M, Ali M, Hussain I, Wang LC (2016) Chromium and Aluminum Phytotoxicity in Maize: MorphoPhysiological Responses and Metal Uptake. *Clean–Soil, Air, Water* 44: 1–10.

Asada K (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Biology* 50: 601–639.

Bhering LL (2017) Rbio: A Tool For Biometric And Statistical Analysis Using The R Platform. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 17: 187-190.

Boveris A, Alvarez S, Bustamante J, Valdez L (2002) Measurement of superoxide radical and hydrogen peroxide production in isolated cells and subcellular organelles. *Methods in Enzymology* 349: 280-287.

Carlberg C, Mannervik B (1985). Glutathione reductase. *Methods in Enzymology* 113: 488-495.

Chance B, Maehley AC (1955). Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology* 2: 764-775.

Chen Z, Gallie DR (2006) Dehydroascorbate reductase affects leaf growth, development, and function. *Plant Physiology* 142: 775-787.

Chowra U, Yanase E, Koyama H, Panda SK (2017) Aluminium-induced excessive ROS causes cellular damage and metabolic shifts in black gram *Vigna mungo* (L.) Hepper. *Protoplasma* 254: 293-302.

Clark RB (1975) Characterization of phosphates in intact maize roots. *Journal Agriculture Food Chemistry* 23: 458-460.

Cuadros-Inostroza A, Caldana C, Redestig H (2009) TargetSearch-a Bioconductor package for the efficient preprocessing of GC-MS metabolite profiling data. *BMC Bioinformatics* 428: 10-16.

Cui W, Cao H, Yao P, Pan J, Gu Q, Xu S, Wang R, Ouyang Z, Wang Q, Shen W (2017) Methane enhances aluminum resistance in alfalfa seedlings by reducing aluminum accumulation and reestablishing redox homeostasis. *Biometals* 5: 719-732.

Darko E, Ambrus H, Stefanovits-Bányai E, Fodor J, Bakos F, Barnab B (2004) Aluminium toxicity, Al tolerance and oxidative stress in an Al-sensitive wheat genotype and in Al-tolerant lines developed by in vitro microspore selection. *Plant Science* 166: 583-591.

de Sousa A, AbdElgawad H, Han A, Teixeira J, Matos M and Fidalgo F (2016) Oxidative Metabolism of Rye (*Secale cereale* L.) after Short Term Exposure to Aluminum: Uncovering the Glutathione–Ascorbate Redox Network. *Plant Science* 7: 685.

Delhaize E, Gruber BD, Ryan PR (2007) The roles of organic anion permeases in aluminium resistance and mineral nutrition. *FEBS Letters* 81: 2255-2262.

Devi SR, Yamamoto Y, Matsumoto H (2003) An intracellular mechanism of aluminum tolerance associated with high antioxidant status in cultured tobacco cells, *J. Journal of Inorganic Biochemistry* 97: 59–68.

Du J, Grant D, Tian Z, Nelson RT, Zhu L, Shoemaker RC, Ma J (2010) Soy TEdb: a comprehensive database of transposable elements in the soybean genome. *BMC Genomics* 11: 113.

Eltayeb AE, Kawano N, Badawi GH, Kaminaka H, Sanekata T, Shibahara T, Inanaga S, Tanaka K (2007) Overexpression of monodehydroascorbate reductase in transgenic tobacco confers enhanced tolerance to ozone, salt and polyethylene glycol stresses. *Planta* 225: 1255–1264.

Ezaki B, Katsuhara M, Kawamura M, Matsumoto H (2001) Different mechanisms of four aluminum (Al)-resistant transgenes for Al toxicity in Arabidopsis. *Plant Physiology* 127: 918–927.

Foyer CH, Neukermans J, Queval G, Noctor G, Harbinson J (2012) Photosynthetic control of electron transport and the regulation of gene expression. *Journal of Experimental Botany* 63: 1637-1661.

Foyer CH, Halliwell B (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133: 21.

Foyer CH, Souriau N, Perret S, Lelandais M, Kunert KJ, Pruvost C, Jouanin L (1995) Overexpression of glutathione reductase but not glutathione synthetase leads to increases in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in poplar trees. *Plant Physiology* 109: 1047–1057.

Gay C, Gebicki JM (2000) A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferricxylenol orange hydroperoxide assay. *Analytical Biochemistry* 284: 217-220.

Giannakoula A, Moustakas M, Syros T and Yupsanis T (2010) Aluminum stress induces up-regulation of an efficient antioxidant system in the Al-tolerant maize line but not in the Al-sensitive line. *Environmental and Experimental Botany* 3: 487–494.

Giannopolitis CN, Ries SK (1977). Superoxide Dismutases. *Plant Physiology* 59: 309-314.

Gill SS, Anju, NA, Gill R, Yadav S, Hasanuzzaman M, Fujita M, Mishra P, Sabat SC, Tuteja N (2015) Superoxide dismutase-mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. *Environmental Science and Pollution Research* 22: 10375–10394.

Gomes-Júnior RA, Moldes CA, Delite FS, Pompeu GB, Gratão PL, Mazzafera P, Lea PJ, Azevedo AR (2006) Antioxidative metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. *Chemosphere* 65: 1330-1337.

Grevenstuk T, Moing A, Maucourt M, Deborde C, Romano A (2015) Aluminium stress disrupts metabolic performance of *Plantago almodavensis* plantlets transiently. *Biometals* 28: 997-1007.

Griffith OW (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry* 106: 207-212.

Guo T, Zhang G, Zhou M, Wu F, Chen J, (2004) Effects of aluminum and cadmium toxicity on growth and antioxidant enzyme activities of two barley genotypes with different Al resistance. *Plant and Soil* 258: 241–248.

Guo TR, Yao PC, Zhang ZD, Wang JJ, Mei WANG (2012) Involvement of antioxidative defense system in rice seedlings exposed to aluminum toxicity and phosphorus deficiency. *Rice Science* 19: 207–212.

Gupta AK, Kaur N (2005) Sugar signaling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *Journal of Biosciences* 30: 761-776.

Havir EA, Mchale NA (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology* 84: 450-455.

Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplast: I- Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Biochemistry and Biophysics* 125: 189-198.

Hossain MA, Hossain AKMZ, Kihara T, Koyama H and Hara T (2005) Aluminum-induced lipid peroxidation and lignin deposition are associated with an increase in H₂O₂ generation in wheat seedlings. *Soil Science and Plant Nutrition* 51: 223–230.

Kampfenkel K, Montagu MV, Inzé D (1995) Extraction and Determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. *Analytical Biochemistry* 225: 165-167.

Kar M, Nishra D (1976). Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology* 57: 315-319.

Kochian LV, Pineros MA, Hoekenga OA (2005) The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. *Plant and Soil* 274: 175-195.

Kochian LV, Pineros MA, Liu J and Magalhaes JV (2015) Plant Adaptation to Acid Soils: The Molecular Basis for Crop Aluminum Resistance. *Annual Review of Plant Biology* 66: 23-28.

Kuo MC, Kao CH (2003) Aluminum effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. *Plant Biology* 46: 149-152.

Lindeman W (1958) Observations on the behavior of phosphate compounds in *Chlorella* at the transition from dark to light. *International Conference on the Peaceful Uses of Atomic Energy* 24: 8-15.

Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols* 1: 387-396.

Liu N, Song F, Zhu X, You J, Yang Z and Li X (2017) Salicylic Acid Alleviates Aluminum Toxicity in Soybean Roots through Modulation of Reactive Oxygen Species Metabolism. *Frontiers in Chemistry* 5: 96.

Liu Q, Yang JL, He LS, Li YY, Zheng SJ (2008). Effect of aluminum on cell wall, plasma membrane, antioxidants and root elongation in triticale. *Biologia Plantarum* 52: 87–92.

Ma B, Gao L, Zhang H, Cui J and Shen Z (2012). Aluminum-induced oxidative stress and changes in antioxidant defenses in the roots of rice varieties differing in Al tolerance. *Plant Cell* 31: 687–696.

Ma B, Wan J and Shen Z (2007) H₂O₂ production and antioxidant responses in seeds and early seedlings of two different rice varieties exposed to aluminum. *Plant Growth Regulation* 52: 91–100.

Matsumoto H, Motoda H (2012) Aluminum toxicity recovery process in root apices. Possible association with oxidative stress. *Plant Science* 185–186: 1–8.

Meriga B, Attitalla IH, Ramgopal M, Ediga A, Kavikishor PB (2010) Differential tolerance to aluminum toxicity in rice cultivars: involvement of antioxidative enzymes and possible role of aluminum resistant locus. *Academic Journal of Plant Sciences* 3: 53–63.

Misra HP, Fridovich I (1971) The generation of superoxide radical during the autoxidation of ferredoxins. *Journal of Biological Chemistry* 246: 6886-6890.

Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Sciences* 7: 405–410.

Mohammadi M, Karr AL (2001) Superoxide anion generation in effective and ineffective soybean root nodules. *Journal of Plant Physiology* 158: 1023-1029.

Nagalakshmi N, Prasad MNV (2001) Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. *Plant Science* 160: 291-299.

Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22: 867-880.

Navascues J, Perez-Rontome C, Sanchez DH, Staudinger C, Wienkoop S, Rellan-Alvarez R, Becana M (2012) Oxidative stress is a consequence, not a cause, of aluminum toxicity in the forage legume *Lotus corniculatus*. *New Phytologist* 193: 625–636.

Nicoloso FT, Tabaldi LA, Cargnelutti D, Goncalves JF, Pereira LB, Castro GY, Maldaner J, Rauber R, Rossato LV, Bisognin DA, Schetinger MRC (2009) Lipid

peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. *Chemosphere* 76: 1402-1409.

Nogueiro RC, Monteiro FA, Gratão PL, Lucélia Borgo L, Azevedo RA (2015) Tropical soils with high aluminum concentrations cause oxidative stress in two tomato genotypes. *Environmental Monitoring and Assessment* 187: 73.

Orlowski Meister A (1971) Partial reactions catalyzed by γ -glutamylcysteine synthetase and evidence for an activated glutamate intermediate. *Journal of Biological Chemistry* 246: 7095-7105.

Panda SK, Matsumoto H (2010) Changes in antioxidant gene expression and induction of oxidative stress in pea (*Pisum sativum* L.) under Al stress. *BioMetals* 23: 753–762.

Panda SK, Singha LB, Khan MH (2003) Does aluminium phytotoxicity induce oxidative stress in greengram (*Vigna radiata*)? *Bulgarian Journal of Plant Physiology* 29(1–2): 77–86.

Pandey P, Srivastava RK, Dubey RS (2013) Water deficit and aluminum tolerance are associated with a high antioxidative enzyme capacity in Indica rice seedlings. *Protoplasma* 251: 147–160.

Pandey P, Srivastava RK, Rajpoot R, Rani A, Pandey AK, Dubey RS (2016) Water deficit and aluminum interactive effects on generation of reactive oxygen species and responses of antioxidative enzymes in the seedlings of two rice cultivars differing in stress tolerance. *Environ Sci Pollut Environmental Science and Pollution Research* 23: 1516–1528.

Peixoto PHP, Cambraia J, Sant'ana R, Mosquim RR, Moreira MA (1999) Aluminium effects on lipid peroxidation and on activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 11: 137-143.

Rangel AF, Rao IM, Braun HP, Horst WJ (2010) Aluminum resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris*) involves induction and maintenance of citrate exudation from root apices. *Physiologia Plantarum* 138: 176-190.

Rennenberg H (2001) Glutathione: an ancient metabolite with modern tasks. In: Grill D, Tausz M, De Kok LJ, editors. Significance of glutathione to plant adaptation to the environment. Kluwer Academic Publishers 1–11.

Rouhier N, Unno H, Bandyopadhyay S (2007) Functional, structural, and spectroscopic characterization of a glutathioneligated [2Fe-2S] cluster in poplar glutaredoxin C1. *National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 1373–1379.

Sharma M, Sharma V, Tripathi BN (2016). Rapid activation of catalase followed by citrate efflux effectively improves aluminum tolerance in the roots of chick pea (*Cicer arietinum*). *Protoplasma* 253: 709–718.

Sharma P, Bhushan Jha A, Dubey RS and Pessarakli M (2012) Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany* 217037: 26.

Silva IR, Smyth TJ, Raper CD, Carter TE and Ruffy TW (2001) Differential aluminum tolerance in soybean: An evaluation of the role of organic acids. *Physiologia Plantarum* 112: 200 – 210.

Silva S, Pinto G, Correia B, Pinto-Carnide O, Santos C (2013) Rye oxidative stress under long term Al exposure. *Journal of Plant Physiology* 170-10.

Smirnoff N (1996). The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany* 78: 661-669.

Sun C, Liu L, Yan Yu Y, Liu W, Lu L, Jin C and Lin X (2015) Nitric oxide alleviates aluminum-induced oxidative damage through regulating the ascorbate-glutathione cycle in roots of wheat. *Journal of Integrative Plant Biology* 57: 550–561.

Tabaldi LA, Cargnelutti D, Gonçalves JF, Pereira LB, Castro G, Maldaner J (2009) Oxidative stress is an early symptom triggered by aluminum in Al-sensitive potato plantlets. *Chemosphere*, 76: 1402–1409.

Tamás L, Simonovicová M, Huttová J and Mistrik I (2004) Aluminum stimulated hydrogen peroxide production of germinating barley seeds. *Environmental and Experimental Botany* 51: 281–288.

Wang HH, Huang JJ, and Bi YR (2010) Nitrate reductase-dependent nitric oxide production is involved in aluminum tolerance in red kidney bean roots. *Plant Science* 179: 281–288.

Wang Y, Xu H, Kou J, Shi L, Zhang C, Xu F (2013) Dual effects of transgenic *Brassica napus* overexpressing CS gene on tolerances to aluminum toxicity and phosphorus deficiency. *Plant and Soil* 362: 231–246.

Xu FJ, Li G, Jin CW, Liu WJ, Zhang SS, Zhang YS (2012). Aluminum-induced changes in reactive oxygen species accumulation, lipid peroxidation and antioxidant capacity in wheat root tips. *Biologia Plantarum* 56: 89–96.

Xu Q, Wang Y, Ding Z, Song L, Li Y, Ma D, Wang Y, Shen J, Jia S, Sun H (2016) Aluminum induced metabolic responses in two tea cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry* 101: 162–172.

Yi HL, Yi M, Li HH, Wu LH (2010) Aluminum induces chromosome aberrations, micronuclei, and cell cycle dysfunction in root cells of *Vicia faba* *Environmental Toxicology and Chemistry* 25: 124–129.

Yin YG, Kobayashi Y, Sanuki A, Kondo S, Fukuda N, Ezura H (2010) Salinity induces carbohydrate accumulation and sugar-regulated starch biosynthetic genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv. 'Micro-Tom') fruits in an ABA- and osmotic stress-independent manner. *Journal of Experimental Botany* 61: 563–574.

Zhang B, Wang X, Li X, Ni Y and Li H (2009) Aluminum uptake and disease resistance in *Nicotiana rustica* leaves. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73: 655–663.

Zheng L, Lan P, Shen RF, and Li WF (2014) Proteomics of aluminum tolerance in plants. *Proteomics* 14: 566–578.

Zhou D, Yang Y, Zhang J, Jiang F, Craft E, Thannhauser TW, Kochian LV and Liu J (2017) Quantitative iTRAQ Proteomics Revealed Possible Roles for Antioxidant Proteins in Sorghum Aluminum Tolerance. *Plant Science* 7: 2043.

7. CONCLUSÕES GERAIS

Diante dos resultados obtidos nesse estudo, concluímos que o estresse por Al apresentou-se mais danoso ao cultivar P98Y70, ao passo que o cultivar Conquista mostrou-se mais resistente.

O cultivar Conquista apresentou menor interferência do Al sob o seu crescimento radicular, o que já o torna um cultivar adequado para estudos sobre esse estresse, uma vez que a principal consequência do estresse por Al é a inibição do alongamento radicular e o enfraquecimento das raízes. O cultivar também mostrou ter um sistema antioxidante mais eficiente, capaz de manter a integridade das células e, conseqüentemente, manter o desenvolvimento das plântulas de soja. Sobretudo, esse cultivar apresentou maiores concentrações de ácidos orgânicos, indicando que os mecanismos de resistência, via exclusão e mecanismos de tolerância atuaram em conjunto.

Por outro lado, o cultivar P98Y70 apresentou respostas não satisfatórias ao que tange a complexa linha de defesa das plantas frente ao estresse imposto. Esse cultivar mostrou-se mais sensível, uma vez que não ativou, ou ativou tardiamente, os mecanismos de defesa das plantas, principalmente o sistema antioxidante e a principal linha de defesa das plantas contra o Al, a exsudação de ácidos orgânicos. P98Y70 apresentou um sistema radicular menor e mais enfraquecido, prejudicando o desenvolvimento adequado das plântulas de soja.

Portanto, torna-se importante compreender os mecanismos de resistência adotados por diferentes espécies para lidar com a toxicidade do Al. Nosso estudo levou em consideração a toxicidade do Al sobre a soja e os mecanismos de resistência empregados por dois cultivares diferentes. Esses resultados poderão contribuir sensivelmente para investigações posteriores. Sugerimos que mais estudos sejam feitos afim de investigar os mecanismos de tolerância ao Al em plantas cultivadas, sobretudo estudos com abordagens moleculares e genéticas.