

**ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR Al^{+3} E pH BAIXO EM
CULTIVARES DE SOJA**

NAÉLIA DA SILVA DE MOURA

**FORTALEZA-CE
2010**

**ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR Al^{+3} E pH BAIXO EM
CULTIVARES DE SOJA**

NAÉLIA DA SILVA DE MOURA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Agronomia, área de concentração em Solos e Nutrição de Plantas outorgado pela Universidade Federal do Ceará.

**FORTALEZA-CE
2010**

Esta dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Agronomia, Área de Concentração em Solos e Nutrição de Plantas, outorgado pela Universidade Federal do Ceará. Uma via do presente estudo encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca de Tecnologia da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Naélia da Silva de Moura

Dissertação aprovada em ____ de _____ de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Prof.º Joaquim Albenísio Gomes Silveira - Doutor.
Universidade Federal do Ceará/DBBM – Orientador

Prof.º Fabio Rossi Cavalcanti - Doutor
Universidade Federal do Ceará/Campus Cariri - Co-orientador

Prof.º Sérgio Luís Ferreira da Silva – Doutor
Universidade Federal do Ceará/DBBM

Prof.º Luís Pontes Aguiar – Doutor
Universidade do Vale do Acaraú/Sobral-CE

Dedico

A Deus meu refúgio e minha fortaleza. Aos meus pais Natanael e Maria Moura e aos meus irmãos Jeferson, Nathália e Nágela, sem os quais isso tudo não teria sentido.

SUCESSO

*Existe duas maneiras básicas de conseguir **sucesso** na vida. Ou você possui um **talento excepcional** em alguma área de atividade e explora isso, ou você segue o caminho comum e correto de **disciplina, estudo, esforço, humildade, privações e trabalho** para conseguir o que deseja.*

*Em qualquer uma delas, não existem **sonhos** se realizando da noite pro dia. Nenhuma árvore nasce, cresce e oferece frutos instantaneamente. Tudo demanda trabalho, **paciência e dedicação**.*

*E também não existe **sorte**, o que existe é esforço. Não existe essa estória de marcar um gol estando no banco de reservas.*

*Você tem que estar em campo, chamando o jogo pra si, tomando a **responsabilidade**: a responsabilidade por si próprio, de quem faz a própria vida, e de quem não **espera**, mas faz **acontecer**.*

(Augusto Branco)

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Joaquim Albenísio Gomes Silveira, pela orientação, exemplo e apoio;

Ao professor Dr. Fábio Rossi Cavalcanti pela orientação, auxílio e paciência;

A todos que fazem parte do departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e do departamento de Solos e Nutrição de Plantas que colaboraram direto ou indiretamente para minha formação.

Aos meus pais Natanael e Maria Moura pelo amor, apoio e confiança;

Aos meus irmãos Jeferson, Nathália e Nágela.

Ao meu namorado Darlan Pereira Viana pelo amor, apoio e amizade.

A minha amiga Deusiane pelo apoio amizade e companheirismo;

Aos amigos que conquistei nesse período, Cristina, Tathyana, Cinthya, Marcus.

Aos colegas de laboratório, Aurenívia, Aílton, Adilton, Ana Karla, André, Evandro, Fabrício, Jamille, Luís, Marcio, Milton, Rafael, Rachel, Raquel, Sérgio e Suyanne;

A minha turma de mestrando de 2008;

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes instituições:

- ✓ *Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e científico - CNPq*
- ✓ *Universidade Federal do Ceará - UFC*

<i>Desenho experimental</i>	38
4.6.Delineamento e análise estatística	39
4.7.Avaliações	40
4.7.1. <i>Determinação do crescimento relativo da raiz e parte aérea</i>	40
4.7.2. <i>Pesagem de massa da matéria seca</i>	40
4.7.3. <i>Porcentagem de dano de membrana (%)</i>	40
4.7.4. <i>Extração de proteínas solúveis e insolúveis</i>	41
4.7.5. <i>Determinação de proteínas solúveis e insolúveis</i>	41
4.7.6. <i>Extração para determinar a peroxidação de lipídios</i>	42
4.7.7. <i>Peroxidação de lipídios (TBARS)</i>	42
4.7.8. <i>Extração de peróxido de hidrogênio</i>	43
4.7.9. <i>Determinação de peróxido de Hidrogênio</i>	43
4.7.10. <i>Extração enzimática</i>	43
4.7.11. <i>Atividade de dismutase de superóxidos (SOD)</i>	43
4.7.12. <i>Atividade de peroxidases de ascorbato (APXs)</i>	44
4.7.13. <i>Atividade de catalase (CAT)</i>	44
4.7.14. <i>Determinação de alumínio (Método da aluminona)</i>	44
a) <i>Obtenção da curva padrão</i>	44
b) <i>Obtenção do extrato - Digestão nitroperclórica</i>	45
c) <i>Método para quantificação do alumínio</i>	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1.Resposta do cultivar M-Soy 8222 exposto a cinco doses crescentes de Al⁺³	47
5.1.1. <i>Indicadores de crescimento</i>	47
a) <i>Comprimento da parte aérea e da raiz</i>	47
b) <i>Massa seca</i>	48
5.1.2. <i>Sintomas visuais</i>	49
5.1.3. <i>Dano de membrana</i>	50
5.2.Resposta de cinco cultivares de soja submetida a uma concentração de Al⁺³	51
5.2.1. <i>Indicadores de crescimento</i>	51
a) <i>Comprimento da parte aérea e da raiz</i>	51
b) <i>Massa seca</i>	52
5.2.2. <i>Dano de membrana</i>	52
5.2.3. <i>Sintomas visuais</i>	53
5.3.Resposta de cultivares de soja a exposição ao Al⁺³ e pH baixo em diferentes tempos	54
a) <i>Comprimento radicular</i>	54
b) <i>Dano de membrana</i>	56
c) <i>Peroxidação de lipídeos</i>	57
d) <i>Conteúdo de proteínas solúveis</i>	59
e) <i>Conteúdo de proteínas insolúveis</i>	60
f) <i>Atividade de APX</i>	61
g) <i>Atividade de CAT</i>	62
h) <i>Atividade de SOD</i>	63

5.4. Resposta de cultivares de soja à exposição de Al⁺³ e pH baixo.....	64
a) <i>Conteúdo de proteínas solúveis e insolúveis.....</i>	64
b) <i>Concentração de Peróxido de hidrogênio e peroxidação de lipídeos.....</i>	66
c) <i>Atividade de APX.....</i>	67
d) <i>Atividade de CAT.....</i>	67
e) <i>Atividade de SOD.....</i>	67
f) <i>Concentração de alumínio nas raízes de soja.....</i>	68
6. SÍNTESE DOS RESULTADOS.....	71
7. CONCLUSÃO.....	74
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
9. ANEXOS.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS

Al:	Alumínio
AlNH₄(SO₄)₂ 12 H₂O:	Sulfato de amônio e alumínio
Al⁺³:	Alumínio na forma trocável
APX:	(EC 1.11.1.1) - Peroxidase do ascorbato
ASA:	Ascorbato
BHA:	Butil-Hidroxi-Anizol
BHT:	Butil-Hidroxi-Tolueno
BSA:	Albumina sérica bovina
Ca (NO₃)₂:	Nitrato de cálcio
Ca⁺²:	Íon cálcio
CAT:	(EC 1.11.1.6) – Catalase
Cu⁺²:	Íon cobre
CuSO₄:	Sulfato de cobre
% DM:	Dano de membrana
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
Fe-EDTA:	Complexo Ferro-EDTA
FeSO₄:	Sulfato de ferro
g:	Gramas
GSR:	Glutathione redutase
H⁺:	Íon hidrogênio
H₂O:	Água
H₂O₂:	Peróxido
H₂SO₄:	Ácido sulfúrico
H₃BO₃:	Ácido bórico
HCl:	Ácido clorídrico
K₂HPO₄:	Hidrogênio dipotássio
KNO₃:	Nitrato de potássio
MF:	Matéria fresca
mg:	Miligrama
MgCl:	Cloreto de magnésio
MgSO₄:	Sulfato de magnésio
mL:	Militro
mM	Milimol
MnCl₂:	Cloreto de manganês
MS:	Matéria seca
(NH₄)₂SO₄:	Sulfato de amônio
NaClO:	Hipoclorito de sódio
NaOH:	Hidroxido de sódio
NBT:	Nitrobutil tetrazolio
NH₄Cl:	Cloreto de amônio
nm:	Nanômetro

O₂⁻:	Radical superóxido
P.A:	Puro para análise
PG:	Propil galato
pH:	Potencial hidrogeniônico
ppm:	Parte por milhão
SOD:	(EC 1.15.1.1)- Dismutase do superóxido
TBA:	Ácido tiobarbitúrico
UA:	Unidade de atividade enzimática
XO:	Orange de Xilenol
μL:	Microlitro
μM:	Micromolar

LISTA DE FIGURAS

Ilustração 1. Descrição da coleta do experimento III.....	37
Ilustração 2. Descrição da coleta do experimento IV.....	39
Ilustração 3. Esquema realizado para determinar as concentrações de alumínio nos tecidos das raízes de soja.....	47
Figura 1. Estrutura fenólica do antioxidante sintético Butil hidroxi anisol – BHA.....	26
Figura 2. Visão geral da parte aérea de plantas de soja do cultivar M-Soy 8222 (A) e raízes com sintomas de toxidez (B).....	49
Figura 3. Plantas das cultivares M-Soy 8222 (A) e M-Soy 9144 (B), apresentando diferença de comprimento quando submetidas aos tratamentos de 0 e 100mM Al^{+3} . Raiz com toxidez de Al^{+3} da cultivar M-Soy 8222 (C).....	54
Figura 4. Crescimento radicular de duas cultivares de soja M-Soy 8222 (A) e M-Soy 9144 (B) submetidas a tratamentos de pH (4,0 e 6,0), Al^{+3} (200mM) e BHA (100mM), observadas em cinco tempos. Letras iguais nas colunas, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	55
Figura 5. Plantas de soja da cultivar M-Soy 9144 submetida a concentrações de pH, Al^{+3} no tempo de 72 horas e 24 horas de antioxidante BHA.....	56
Figura 6. Dano de membrana em raízes de duas cultivares, M-Soy 8222 (A) e M-Soy 9144(B), submetidos a tratamentos de pH (4,0 e 6,0), Al^{+3} (200 mM) e antioxidante BHA (100 mM) observados em cinco tempos. Letras iguais nas colunas, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	57
Figura 7. Peroxidação de lipídeos em tecidos de raízes de duas cultivares, M-Soy 8222 (A) e M-Soy 9144 (B), submetidos a tratamentos de pH (4,0 e 6,0), Al^{+3} (200 mM) e antioxidante (100 mM) observados em cinco tempos. Letras iguais nas colunas, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	58
Figura 8. Conteúdo de proteína solúvel das raízes das cultivares M-Soy 8222(A) e M-Soy 9144 (B) submetidos a tratamentos de pH (4,0 e 6,0), Al^{+3} (200mM) e antioxidante BHA (100 mM) observados em cinco tempos. Letras iguais nas colunas, entre os tempos, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	59
Figura 9. Conteúdo de proteína insolúvel em tecidos de raízes submetidos a tratamentos de pH (4,0 e 6,0), Al^{+3} (200mM) e antioxidante BHA (100 mM) observados em cinco tempos. Letras iguais nas colunas, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	60
Figura 10. Atividade de APX em tecidos de raízes de duas cultivares M-Soy 8222 (A) e M-Soy 9144 (B), submetidos a tratamentos de pH (4,0 e 6,0), Al^{+3} (200mM) e antioxidante BHA (100 mM) observados em cinco tempos. Letras iguais nas colunas, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	61
Figura 11. Atividade de CAT, em tecidos de raízes de duas cultivares M-Soy 8222 (A) e M-Soy 9144 (B), submetidos a tratamentos de pH (4,0 e 6,0), Al^{+3} (200mM) e antioxidante (100 mM) observados em cinco tempos. Letras iguais nas colunas, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	62

- Figura 12.** Atividade de SOD em tecidos de raízes submetidos a tratamentos de pH (4,0 e 6,0), Al^{+3} (200mM) e antioxidante BHA (100mM) observados em cinco tempos. Letras iguais nas colunas, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 63
- Figura 13.** Proteínas solúveis (A) e proteínas insolúveis (B) em tecidos de raízes submetidos a tratamentos de pH (4,0 e 6,0), Al^{+3} (200mM) e antioxidante BHA (100mM). Letras iguais nas colunas, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 64
- Figura 14.** Peróxido de hidrogênio (A) e peroxidação de lipídeos (B) em tecidos de raízes de duas cultivares de soja submetidas a tratamentos de pH (4,0 e 6,0), Al^{+3} (200mM) e antioxidante BHA (100mM). Letras iguais nas colunas, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 66
- Figura 15.** Atividade de APX (A), CAT (B), SOD (C), nos tecidos das raízes de soja de duas cultivares submetidas a tratamentos com pH (4,0 e 6,0), Al^{+3} (200mM) e antioxidante BHA (100mM). Letras iguais nas colunas, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 67
- Figura 16.** Concentração de alumínio (mg/g MS) em raízes de soja, das cultivares M-Soy 8222 e M-Soy 9144. Letras iguais nas colunas, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Alíquotas de reagentes utilizados para obtenção da curva padrão de Al^{+3} (OLIVEIRA, 2006).....	45
Tabela 2. Comprimento (cm) da parte aérea e raiz de plantas de soja do cultivar M-Soy 8222 submetidas a doses crescentes de Al^{+3}	48
Tabela 3. Produção de massa seca (g) de plantas de soja submetidas a cinco doses crescentes de Al^{+3}	49
Tabela 4. Dano de membrana (%), de folhas e raiz do cultivar M-Soy 8222 submetidas a doses crescentes de Al^{+3}	50
Tabela 5. Comprimento (cm) de cinco cultivares de soja submetidas a 0 e 100 μM de Al^{+3}	51
Tabela 6. Produção da massa seca (g) de cinco cultivares de soja submetidas a 0 e 100 μM de Al^{+3}	52
Tabela 7. Dano de membrana (%) em cinco cultivares de soja. Folhas (A) e raiz (B).....	53

ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR Al^{+3} E pH BAIXO EM CULTIVARES DE SOJA

Autor: Naélia da Silva de Moura

Orientador: Joaquim Albenísio Gomes da Silveira

A toxidez causada por alumínio em plantas cultivadas em solos de pH baixo é um dos fatores mais limitante para as produções agrícola. Este trabalho objetivou caracterizar o estresse causado pela toxidez de Al^{+3} e pH baixo, em diferentes cultivares de soja com relação aos aspectos gerais de cada cultivar expostas a diferentes concentrações e tempos de exposição a este íon. Para isso, foram conduzidos quatro experimentos em casa de vegetação. O primeiro experimento caracterizou-se o comportamento de uma cultivar de soja (M-Soy 8222) submetida a concentrações crescentes de alumínio (0, 25, 50, 75 e 100 μM de Al^{3+}). No segundo experimento avaliou-se a resposta diferencial de cultivares comerciais de soja, este experimento foi constituído de dois tratamentos (0 e 100 μM de Al^{3+}), cinco cultivares (M-Soy 8222, M-Soy 8866, M9144RR, M-Soy 9350 e FT-106) e três repetições. No terceiro experimento analisou-se o estresse oxidativo causado em cultivares de soja (M-Soy 8222 e M-Soy 9144) pela exposição ao Al^{+3} e pH baixo em diferentes tempos e a recuperação das mesmas através do uso de um antioxidante. Esta observação foi realizada em cinco tempos (0, 12, 24, 48 e 72h) de exposição a concentrações de pH (4,0 e 6,0) e tratamentos de Al^{+3} (200 μM) e do antioxidante Butil Hidroxi Anisol-BHA combinado com Al^{+3} (200 μM e 100 μM) e do antioxidante BHA isoladamente (100 μM). O quarto experimento foi realizado com o objetivo de confirmar os resultados do terceiro experimento no tempo de 72h onde foi constituído dos mesmos tratamentos que o experimento III. As cultivares estudadas apresenta comportamento diferencial aos efeitos tóxicos de alumínio, porém os efeitos foram observados apenas nas raízes. A cultivar M-Soy 8222, apresentou um sistema de alívio enzimático mais eficiente do que a cultivar M-Soy 9144, porém para parâmetros com crescimento e dano de membrana, mostrou-se afetada. O uso do antioxidante BHA pode diminuir os efeitos tóxicos do alumínio e também os que são causados por pH 4,0. Os efeitos tóxicos causados pelo Al, observados neste trabalho se assemelha aos que foram causados por pH 4,0, porém se faz necessário mais estudos acerca desta observação.

Palavras-chave: *Glicine max*, toxidez de alumínio, estresse oxidativo.

OXIDATIVE STRESS INDUCED BY Al^{+3} AND LOW pH IN SOYBEAN CULTIVARS

Author: Naélia da Silva de Moura

Advisor: Joaquim Gomes da Silveira

The toxicity caused by aluminum in plants grown in soils with low pH is one of the most limiting factors for agricultural production. This study aimed to characterize the stress caused by toxic levels of Al^{+3} and low pH in different soybean cultivars in relation to general aspects of each genotype exposed to different concentrations and times of exposure to this ion. For that, they moved four experiments in the greenhouse. The first experiment characterized the behavior of one cultivar (M-Soy 8222) submitted to increasing concentrations of aluminum (0, 25, 50, 75 and 100 μ M Al^{+3}). In the second experiment, the differential response of cultivars of soybean, this experiment consisted of two treatments (0 and 100 μ M Al^{+3}), five cultivars (M-Soy 8222, M-Soy 8866, M9144RR, M-Soy 9350 and FT-106) and three replications. The third experiment examined whether the oxidative stress caused in soybean (M-Soy 8222 and M-Soy 9144) by exposure to low pH and Al^{+3} in different times and recovery from through the use of an antioxidant. This observation was conducted in five times (0, 12, 24, 48 and 72h) of exposure to treatments of pH (4.0 and 6.0), Al^{+3} (200 μ M), the antioxidant butyl-hydroxy anisole BHA combined with Al^{+3} (200 μ M and 100 μ M) and the antioxidant BHA alone (100 μ M). The fourth experiment was carried out to confirm the results of the third experiment time of 72 hours which was composed of the same treatments as the experiment III. The differential cultivars showed tolerance to the toxic effects of aluminum, but the effects observed only in roots. The cultivar M-Soy 8222, filed an enzyme system of relief more efficient than the cultivar M-Soy 9144, but for parameters on growth and membrane damage, was affected. The use of the antioxidant BHA may reduce the toxic effects of aluminum and also those caused by pH 4.0. The toxic effect caused by Al, observed in this work is similar to those caused by pH 4.0, however we still need more studies on this observation.

Keywords: *Glicine max*, aluminum toxicity, oxidative stress.

1. INTRODUÇÃO

O Al compõe 8% da crosta terrestre, sendo o terceiro elemento mais abundante da litosfera, após o oxigênio e o silício. Nos solos, o Al está presente na fase sólida e se encontra como minerais primários e secundários na forma de aluminossilicatos, oxihidróxidos, sulfatos e fosfatos (FERNANDES, 2006). Na solução do solo o Al^{+3} pode ocasionar distúrbios em diversos processos citológicos, bioquímicos e fisiológicos da maioria das espécies de plantas cultivadas em solos com elevada acidez (HERMANN & VENTURINE, 2010).

A toxidez do alumínio é considerada um dos principais fatores limitantes do crescimento vegetal em solos ácidos presentes nas regiões tropicais, principalmente, devido à inibição do crescimento radicular (GIANNAKOULA et al., 2008). O alumínio em níveis tóxicos está presente em 50% das áreas com potencial agrícola, considerando também que a acidez nos solos tem se agravado com o extensivo uso de fertilizantes amoniacais (ZHANG et al., 2007).

O Al^{+3} torna-se tóxico para a maioria das espécies vegetais, mesmo em baixas concentrações, afetando o crescimento e funcionamento das raízes e bloqueando os mecanismos de aquisição e transporte de água e nutrientes (ROSSIELLO & JACOB NETO, 2006). Os primeiros efeitos do Al^{+3} em processos metabólicos podem ser observados poucos minutos após a indução ao estresse, os quais são seguidos de efeitos secundários que

aparecem depois de algumas horas ou dias. A parte distal da zona de transição no ápice das raízes, onde as células estão entrando em fase de alongamento, é o sítio primário da ação tóxica do Al^{+3} . Em função da rápida reatividade do Al^{+3} , as injúrias podem ocorrer na parede celular, na membrana plasmática, no citoesqueleto e até no núcleo celular. Entretanto, a maior associação do Al^{+3} com a raiz ocorre no apoplasto e outra pequena fração do Al^{+3} rapidamente entra e interage no simplasto (SILVA et al., 2000; TAYLOR et al., 2000).

Assim um método que pode ser utilizado para superar as restrições à produção agrícola em solos ricos em Al^{+3} é a seleção de cultivares tolerantes a sua toxicidade e a exploração do potencial genético destas culturas tolerantes, pois espécies e cultivares diferem amplamente no grau de tolerância ao excesso deste elemento no solo (OLIVEIRA, 2002).

O estresse por Al^{+3} , assim como por outros fatores, resulta na produção de Espécies Reativas de Oxigênio – EROs e, provavelmente, na ativação de sistemas de defesa antioxidante enzimático e não enzimático. Evidências que sustentam esta hipótese apóiam-se em correlações entre o aumento na produção de EROs, sob algum tipo de estresse, como aumento na atividade de certas enzimas e, ou na concentração de certos metabólitos, principalmente em espécies e, ou cultivares tolerantes. No entanto, ainda não é perfeitamente compreendido o mecanismo pelo qual o Al^{+3} e outros fatores de estresse atuam na intensificação da formação de EROs (YAMAMOTO et al., 2001)

Desta forma estes estudos relacionam o Al^{+3} ao estresse oxidativo, principalmente à peroxidação de lipídios e proteínas da membrana plasmática (YAMAMOTO et al, 2001). A peroxidação dos lipídios seria resultado dos efeitos do Al^{+3} na membrana (alteração de sua fluidez, permeabilidade, etc.), aumentando sua susceptibilidade à peroxidação (CAKMAK & HORST, 1991). No entanto, também há a hipótese de que a geração da peroxidação lipídica, medida por Al^{+3} , ocorra devido ao aumento na produção de EROs induzido por esse metal, aliada à redução na capacidade de destoxificação destas espécies (RYYPPO et al., 1998).

Para manter sob controle a produção EROs, as plantas e todos os organismos possuem um sistema antioxidante representado por componentes enzimáticos e não enzimáticos. A toxicidade por Al^{+3} e a ocorrência de estresse oxidativo afetam a atividade de enzimas do sistema antioxidante da célula e de compostos antioxidantes não enzimáticos como uma resposta na intenção de manter a homeostase celular, evitando os efeitos tóxicos do Al^{+3} .

O objetivo deste trabalho foi caracterizar o estresse causado pela toxidez de Al^{+3} e pH baixo em cultivares de soja com relação aos aspectos gerais de cada cultivar expostas a diferentes concentrações e tempos de exposição e ainda observar se existe recuperação do estresse causado por Al^{+3} e pH baixo através do uso de um antioxidante.

2. HIPÓTESE E OBJETIVOS

2.1.HIPÓTESE

Em diferentes genótipos de soja há contrastes sintomatológicos e fisiológicos de sensibilidade a níveis tóxicos de Al^{+3} e pH baixo. Existe estresse oxidativo associado à toxidez por Al^{+3} e pH baixo em genótipos sensíveis de soja. Plantas de soja tolerantes possuem um sistema enzimático eficiente de aclimação por alívio oxidativo.

2.2.OBJETIVO

2.2.1. Geral

Caracterizar o estresse causado pela toxidez de Al^{+3} e pH baixo em cultivares de soja com relação aos aspectos gerais de cada cultivar expostas a diferentes concentrações e tempos de exposição e ainda observar se existe recuperação do estresse causado por Al^{+3} e pH baixo através do uso de um antioxidante.

2.2.2. Específicos

- ❖ Avaliar a resposta da planta de soja em relação a diferentes concentrações de alumínio;
- ❖ Avaliar os aspectos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos de cinco cultivares de soja, que possam identificá-las como sensíveis ou tolerantes ao estresse de alumínio;

- ❖ Avaliar a ação do estresse oxidativo em cultivares de soja com tolerância diferencial à toxidez por alumínio;
- ❖ Investigar a relação entre a toxicidade de Al^{+3} e a produção de enzimas relacionadas a espécies reativas de oxigênio e a peroxidação de lipídios;
- ❖ Caracterizar os efeitos causados pela toxidez de alumínio e por pH ácido;
- ❖ Observar o comportamento das cultivares em diferentes tempos de exposição ao alumínio.
- ❖ E ainda observar se as cultivares estudadas consegue se restabelecer dos danos causados pela toxidez de alumínio, através do uso de um antioxidante.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1.A cultura da soja

A soja pertence à classe *Dicotyledoneae*, à subclasse *Archichlamydeae*, à ordem *Rosales*, à subordem *Luguminosineae*, à família *Leguminosae*, à subfamília *Papilionaceae*, à tribo *Phaseoleae*, ao gênero *Glycine* Linné, ao subgênero *Glycine* subgênero soja (Moench) e à espécie *Glycine Max* (Linné) Merrill (BORÉM, 1999b).

Leguminosa domesticada pelos chineses há cerca de cinco mil anos. Há três mil anos a soja se espalhou pela Ásia, onde começou a ser utilizada no consumo humano por seu alto valor alimentício. No final do século XV chegou ao ocidente, mas foi só no início do século XX que passou a ser cultivada comercialmente nos Estados Unidos. A partir de então, houve um rápido crescimento na produção, com o desenvolvimento das primeiras cultivares comerciais (CONWAY, 2003). É cultivada em mais de 80 países, gerando um volume superior a 162 milhões de toneladas métricas de grãos. O Brasil ocupa o segundo lugar no ranking dos maiores produtores e exportadores dessa leguminosa (IBGE, 2004).

A soja é utilizada como constituinte em muitos alimentos processados e representa a principal fonte de óleo e proteína para rações destinadas à alimentação animal (IBGE, 2004). O grão da soja dá origem a produtos e subprodutos utilizados atualmente pela agroindústria de alimentos e indústria química. A proteína de soja dá origem a produtos comestíveis (ingredientes de padaria, massas, produtos de carne, cereais, misturas preparadas, bebidas,

alimentação para bebês, confecções e alimentos dietéticos). É utilizada também pela indústria de adesivos, nutrientes, alimentação animal, adubos, formulador de espumas, fabricação de fibra, revestimento, papel e emulsão de água para tintas. A soja integral é utilizada pela indústria de alimentos em geral e o óleo cru se transforma em óleo refinado e lecitina, que dá origem a inúmeros outros produtos (CONWAY, 2003).

As leguminosas, principalmente a soja, têm sido utilizadas como plantas indicadoras da toxidez de alumínio por serem mais sensíveis à sua presença na solução do solo, com as respostas drásticas a essa toxidez, se manifestando no estágio plantular (MARSCHNER, 1995). Portanto considerada uma espécie muito, sensível à acidez dos solos (FAQUIN et al., 2000).

3.2.Acidez do solo

As áreas de acidez natural dos solos concentram-se em duas amplas regiões: uma no hemisfério norte, coberta por bosques de coníferas, sob clima temperado e outra, de distribuição intertropical, coberta por savanas e florestas úmidas (VON UEXKULL & MUTERT, 1995). Além disso, em outras partes do mundo, os níveis de acidez dos solos estão aumentando, em decorrência de atividades humanas. Entre os motivos de acidificação antropogênica dos solos estão à liberação atmosférica de poluentes industriais, associada à lixiviação de solos com chuvas ácidas, as atividades de mineração e, no setor agrícola, a nitrificação subsequente à aplicação de altas doses de fertilizantes amoniacais (RENGEL & ZHANG, 2003).

Só no Brasil, mais de 500 milhões de hectares são cobertos por solos ácidos, que compreende cerca de dois terços do total do seu território a maior área de solos ácidos dentro de um único país (VITORELO, 2000). Um estudo abrangendo 26 solos de regiões brasileiras mostrou que 75% dos valores de pH da camada superficial variam entre 3,78 e 5,52 e que o Al^{3+} foi o cátion trocável predominante em mais de um terço dos solos com pH inferior a 5,6 (ABREU JUNIOR. et. al., 2003).

À medida que os solos se acidificam, íons Al presentes são solubilizados e passam a ocupar as posições de troca catiônica, em superfícies eletronegativas dos colóides, substituindo os cátions removidos por lixiviação. Por ser um cátion trivalente, o Al^{+3} é retido firmemente e, sua concentração, na solução do solo, é baixa, dentro de uma faixa de $\mu mol L^{-1}$ (HAYNES & MOKOLOBATE, 2001).

O alumínio pode ocorrer sob diferentes formas na solução do solo, apresentando-se predominantemente como alumínio trivalente (Al^{+3}) em condições ácidas (pH < 5,0) e à

medida que o pH aumenta as espécies Al(OH)^{2+} e Al(OH)_2^+ podem ser formadas. Parte da dificuldade em estudar os processos que ocorrem nas plantas, decorrentes da ação deste metal, pode ser atribuída a sua complexidade (DELHAIZE & RYAN, 1995).

3.3. Toxicidade de alumínio nas plantas

O efeito da acidez do solo sobre as plantas provém principalmente de alterações químicas, entre elas: solubilização do alumínio (Al), manganês (Mn) e ferro (Fe) na solução do solo, atingindo níveis tóxicos, assim como a complexação de alguns elementos essenciais, sendo o fósforo (P) o mais limitado (KOCHIAN, 1995).

Devido às influências do pH e de sua força iônica, o poder fitotóxico do Al não decorre diretamente de sua concentração total em solução, senão da atividade das espécies, individualmente, podendo apresentar maior ou menor grau de Fitotoxicidade; assim, a identificação do grau de toxidez das diversas espécies tem sido outra área de estudo aberta a controvérsias (TAYLOR et al., 2000).

Nas células das raízes, o alumínio altera as propriedades da parede celular e da plasmalema, afetando a absorção de íons e o sistema de carregadores de nutrientes, resultando na inibição da elongação celular do eixo principal, o que torna as raízes mais grossas e pouco funcionais (DELHAIZE & RYAN, 1995). Assim, ocorre uma redução na capacidade da planta para obter água e nutrientes do subsolo, em virtude do enraizamento superficial, tornando-a, portanto, menos produtiva e mais susceptível à seca (EMBRAPA, 2006). Para Kochian (1995), a redução da taxa de elongação do sistema radicular manifesta-se após uma breve exposição das raízes às soluções contendo alumínio.

O primeiro sítio de fixação de alumínio se situa na coifa e na mucilagem radicular. De acordo com Barceló & Poschenrieder (2002), o primeiro sintoma da toxicidade do alumínio é extremamente rápido, em questão de minutos ocorre inibição do crescimento da raiz que resulta em redução e danos no sistema radicular. Primeiramente, o alumínio inibe a expansão e elongação das células das raízes, e posteriormente a divisão celular (MATSUMOTO, 2000). O sítio da toxicidade do alumínio esta localizada no ápice da raiz, sendo esta região alvo de muitas pesquisas de tolerância ao alumínio (SIVAGURU et al., 1999).

Em geral, o efeito tóxico do alumínio é bem notado em raízes de plantas antes que qualquer sintoma possa ser evidenciado na parte aérea. Contudo, pode-se observar redução do crescimento (JONES & KOCHIAN, 1995) que pode ser uma consequência dos danos que ocorrem na raiz (MATSUMOTO et al., 2000), tais como o limitado crescimento que

restringe a absorção de nutrientes e água, principalmente fósforo e cálcio. Desta forma, a toxidez do alumínio pode afetar consideravelmente o rendimento das culturas, em solos com baixa fertilidade.

Os sintomas de alumínio nem sempre são facilmente identificáveis. Os sintomas foliares se assemelham à deficiência de fósforo (folhas de crescimento anormal; coloração púrpura, nas folhas e nas nervuras) ou ainda à deficiência de cálcio (enrolamento das folhas jovens, colapso do ápice da planta e dos pecíolos) podendo haver variações de sintomas a depender da espécie estudada (MATSUMOTO *et al.*, 2000). Além disso, pelo fato do alumínio ser um ligante metálico com preferência por doadores de oxigênio e alta afinidade por grupos carboxila e fosfato, este se liga principalmente aos componentes da parede celular (ZHANG & TAYLOR, 1991). Entretanto, também há evidências que o mesmo é transportado através da membrana plasmática da raiz para dentro das células após curta exposição. A quelatação do alumínio por ácidos orgânicos excretados pelas raízes em resposta a sua toxicidade é um mecanismo bastante evidente de escape (PELLET *et al.*, 1995).

3.4. Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é definido como um acúmulo de Espécies Reativas de Oxigênio - EROs que causam danos à estrutura das biomoléculas DNA, lipídios, carboidratos e proteínas, além de outros componentes celulares. As espécies reativas de oxigênio podem ser geradas de forma endógena durante o metabolismo celular, ou de forma exógena, como por exposição a alguns estresses. Para se defender destas espécies reativas de oxigênio, as células aeróbicas desenvolveram vários mecanismos de defesa podendo este ser físicos ou químicos, neste, enzimas antioxidantes, como por exemplo, peroxidases do ascorbato (APX), catalase (CAT), dismutase de superóxido (SOD), desempenham esse papel. Aliados a essas enzimas as células também possuem antioxidantes de baixo peso molecular, não enzimáticos, como o ácido ascórbico, a glutathiona reduzida (GHS) e outro grupos tiólicos não protéicos que removem tipos diferentes de EROs. O estresse oxidativo é um importante componente da reação das plantas a níveis tóxicos de alumínio, estimulando a ação dessas enzimas antioxidantes. (RICHARDS *et al.*, 1998).

Ainda existem os antioxidantes extrínsecos que são normalmente aditivos sintéticos e utilizados na indústria de alimentos. O uso desses antioxidantes é realizado para aumentar o tempo de conservação dos alimentos. Os antioxidantes principais e mais conhecidos fazem

parte de grupo polifenóis, como butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e propil galato (PG), que são sintéticos, e tocoferóis, que são naturais. Estes últimos também podem ser classificados como antioxidantes biológicos (MANCINI, 2008).

Antioxidante sintético

O BHA é um dos antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria de alimentos. A estrutura fenólica destes compostos **Figura 1**, permite a doação de um próton a um radical livre, regenerando, assim, a molécula do acilglicerol e interrompendo o mecanismo de oxidação por radicais livres. Dessa maneira, os derivados fenólicos transformam-se em radicais livres. Entretanto, estes radicais podem se estabilizar sem promover ou propagar reações de oxidação (MANCINI, 2008).

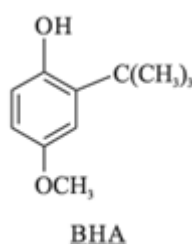


Figura 1. Estrutura fenólica do antioxidante sintético Butil hidroxi anisol - BHA.

O BHA é um antioxidante mais efetivo na supressão da oxidação em gorduras animais que em óleos vegetais. Como a maior parte dos antioxidantes fenólicos, sua eficiência é limitada em óleos insaturados de vegetais ou sementes. Apresenta pouca estabilidade frente a elevadas temperaturas, mas é particularmente efetivo no controle de oxidação de ácidos graxos de cadeia curta. O BHA age como sequestrante de radicais peróxidos. Os antioxidantes fenólicos funcionam como sequestradores de radicais e, algumas vezes, como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os produtos intermediários formados pela ação destes antioxidantes são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático apresentada por estas substâncias (MANCINI, 2008).

No metabolismo celular aeróbico a formação de EROs é inevitável, pois são produzidas no processo de respiração celular que ocorre nas mitocôndrias das células, bem

como nas vias relacionadas à fotossíntese. Nestes eventos celulares, as EROs são subprodutos fundamentais do metabolismo aeróbico (MITTLER, 2002).

Situações de estresse podem intensificar a produção de EROs, aumentando a oxidação dos componentes celulares, o que pode causar danos aos organismos (SCANDALIOS, 2002). Nesses casos as EROs são citadas como centralizadores de uma resposta a agentes estressores (MITTLER 2002; MITTLER et al, 2004).

As EROs, formadas por elétrons livres ou não pareados, têm uma instabilidade elétrica muito grande, e por esta razão, mesmo tendo meia vida muito curta, apresentam grande capacidade reativa, podendo afetar qualquer composto que esteja próximo, a fim de captar um elétron desse composto na intenção de obter sua estabilização. Desse modo, as EROs podem iniciar reações em cadeia com varias moléculas orgânicas, que nesse caso funcionam como substâncias oxidantes, levando à peroxidação lipídica, a inativação de enzimas e à degradação de ácidos nucleicos, dentre outras consequências (LAMB & DIXON, 1997).

A formação das EROs se dá primeiramente pelo o radical superóxido (O_2^-), que pode ser dismutado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou mesmo através de ação catalítica, pela atuação da enzima superóxido dismutase (SOD) (HALLIWELL & GUTTERIDE, 1998). Podem ser geradas pela desestabilização das camadas de elétrons do O_2 , formando os radicais O_2^- ; H_2O_2 e OH (DAVIES, 1982).

Possuem potencial para interagir de forma não especifica com muitos componentes celulares, desencadeando reações peroxidativas e causando um dano significativo às membranas e a outras macromoléculas essenciais, tais como os pigmentos fotossintéticos, as proteínas, os ácidos nucleicos e os lipídios (SHALATA & TAL, 1998). A peroxidação lipídica é uma das principais consequências da cadeia de reação dos radicais livres. Os radicais mais reativos, como os superóxidos, atacam as moléculas biológicas pela abstração do hidrogênio e este mecanismo desencadeia a peroxidação lipídica (HALLIWELL & CHIRICO, 1993). A peroxidação lipídica em biomembranas causa danos na estrutura e funcionamento da mesma, alterando sua fluidez, inativando os receptores e as enzimas da membrana e aumentando a permeabilidade a íons como o Ca^{2+} (HALLIWELL & CHIRICO, 1993). A iniciação da peroxidação ocorre pelo ataque aos ácidos graxos, ou a um lado específico da cadeia de qualquer substância química que tenha reatividade suficiente para separar um H^+ da cadeia do ácido graxo. Os ácidos graxos poliinsaturados são particularmente sensíveis à peroxidação (HALLIWELL & CHIRICO, 1993).

3.5. Por que utilizar a cultura da soja como modelo vegetal?

Nos últimos dez anos houve um rápido avanço dos campos de soja no Nordeste e a produção alcançou números maiores que o triplo das produções anteriores sendo uma consequência da ampliação das áreas de plantios nos estados da Bahia, Maranhão e Piauí. Esses estados em conjunto representam 75% da produção de soja no Nordeste. Dos dez maiores municípios produtores, seis estão localizados no oeste da Bahia, três no Maranhão e um no Piauí (IBGE, 2009).

Em 2002 a produção nordestina era pouco mais de 2,1 milhões de toneladas e em 2008 subiu para 4,8 milhões de toneladas assim tornando-se a terceira maior região produtora do Brasil, após Centro-Oeste e Sul. A safra de soja em 2007/08 foi de 1,6 milhões de hectares e produtividade média de 3 mil toneladas por hectare, a mais elevada do País.

A soja tornou-se uma das culturas de exportação mais importantes cultivadas no Brasil. Uma vasta área de campos de soja é cultivada atualmente em regiões do Cerrado, e esta aumenta consideravelmente a cada ano. Nesta região, os níveis de acidez de mais de 50% dos solos são elevados e os níveis de alumínio (Al) nas camadas superficiais e sub-superfície tornam-se tóxicas para as plantas (ESWARAN, 1997). Sendo a toxidez por alumínio o principal efeito da acidez dos solos. (FAQUIN et al., 1994). Desta forma o seu cultivo nestas áreas pode ser um fator limitante para a produção agrícola devido aos danos sofridos pelas plantas.

A toxidez por Al é considerada a maior fonte de estresse abiótico em plantas cultivadas em todo mundo. A produção de Soja, como outras culturas, é severamente afetada pela toxicidade de Al em solos ácidos. O mecanismo de respostas a toxidez de alumínio em soja ainda não são bem entendidos (DONG et al. 2004, ERMOLAYEV et al. 2003).

Na exposição a estresses ambientais, as plantas exibem uma grande variedade de respostas nos níveis molecular e celular, atingindo praticamente todo aspecto da fisiologia e do metabolismo da planta (FLOWERS et al., 2000; HASEGAWA et al., 2000; XIONG & ZHU, 2002). Mudanças morfológicas e no desenvolvimento (como ciclo de vida, inibição do crescimento da parte aérea e aumento do crescimento da raiz), ajustamento no transporte de íons (como a absorção, extrusão e seqüestro de íons) e mudanças metabólicas (como metabolismo do carbono, síntese de solutos compatíveis, aumento da síntese de compostos antioxidantes, aumento da atividade de enzimas) são respostas comuns a estresses ambientais variados (XIONG & ZHU, 2001; 2002). Algumas dessas respostas são desencadeadas por sinais de estresse ambiental primário, enquanto que outras podem resultar de estresses secundários ou de sinais secundários. Ainda que algumas mudanças

sejam claramente adaptativas, outras são simplesmente conseqüências da injúria causada pelo estresse (XIONG et al., 2002; ZHU, 2002).

Assim espécies vegetais não adaptadas aos níveis tóxicos de Al^{+3} podem apresentar crescimento radicular prejudicado ou paralisado, desta forma terão um menor volume de solo explorado por suas raízes e conseqüentemente um menor aproveitamento de água e nutrientes (MALAVOLTA et al., 1997). Embora exista uma variação significativa da tolerância ao Al entre 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 e espécies arbóreas (MOYER; HENRY et al., 2003).

Para superar as restrições à produção agrícola em solos ricos em alumínio a seleção de cultivares tolerantes a sua toxicidade e a exploração do potencial genético destas culturas tolerantes é de grande importância, pois espécies e cultivares diferem amplamente no grau de tolerância ao excesso deste elemento no solo (OLIVEIRA, 2002).

Durante a exposição a estresses ambientais as plantas exibem uma grande variedade de respostas nos níveis molecular e celular, alterando vários aspectos fisiológicos e metabólicos (HASEGAWA et al., 2000; ZHU, 2002). Mudanças morfofisiológicas e bioquímicas relacionadas ao desenvolvimento da planta (mudanças no ciclo de vida e na relação parte aérea/raiz), com a homeostase iônica (partição, extrusão e seqüestro de íons) e com o metabolismo primário (síntese de osmólitos e expressão de proteínas), são respostas comumente observadas em plantas submetidas a estresses (XIONG e ZHU, 2002).

Poucas publicações tratam especificamente do estresse induzido por alumínio, as quais indicam que existe uma relação entre a toxicidade do íon Al^{+3} e a produção de enzimas relacionadas a espécies oxidativas de oxigênio e a peroxidação de lipídios (YAMAMOTO et al, 2001). Assim alguns estudos estão sendo realizados testando a hipótese da tolerância ao alumínio estar relacionada a capacidade das plantas suportarem o estresse de oxidativo induzido por Al. Níveis tóxicos deste elemento podem induzir a produção de EROs (YAMAMOTO, 2001) ativando genes que codificam a síntese ou a ativação de enzimas relacionadas ao sistema de defesa antioxidativo das plantas (EZAKI et al., 2000).

Desta forma estes estudos relacionam o Al^{+3} ao estresse oxidativo, principalmente à peroxidação de lipídios e proteínas da membrana plasmática (YAMAMOTO et al, 2001). A peroxidação dos lipídios seria resultado dos efeitos do Al^{+3} na membrana (alteração de sua fluidez, permeabilidade, etc.), aumentando sua susceptibilidade à peroxidação (CAKMAK & HORST, 1991). No entanto, também há a hipótese de a geração da peroxidação lipídica, medida por Al, pode ocorrer devido ao aumento na produção de EROs induzido por esse

metal, aliada à redução na capacidade de destoxificação destas espécies (RYYPPO et al., 1998). Por isso tudo é que o material vegetal escolhido foi a cultura da soja.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Estratégia experimental

Na tentativa de obter respostas a respeito da hipótese levantada neste trabalho, uma sequência metodológica foi organizada envolvendo quatro experimentos. O primeiro experimento consistiu na caracterização da toxidez de alumínio em uma cultivar de soja (Msoy 822) submetida a concentrações crescentes (0, 25, 50, 75 e 100 μmol) de Al^{3+} durante 7 dias. Observou-se que a dose de 50 μM de alumínio poderia causar toxidez nas plantas de soja, porém optou-se por utilizar a concentração maior, de 100 μl , pois a concentração menor poderia não ser suficiente para resultar em alterações nos parâmetros que seriam avaliados nos experimentos seguintes, baseado nesta constatação realizou-se o segundo experimento, submetendo cinco cultivares de soja (M-Soy 8222, M-Soy 8866, M9144RR, M-Soy 9350 e FT-106) a 0 e 100 μM de Al^{3+} (concentração identificada anteriormente como toxica) objetivando selecionar as cultivares que apresentassem tolerância diferencial a toxidez de Al^{3+} . Assim as plantas permaneceram por 7 dias.

Após identificar duas cultivares de tolerância diferencial ao alumínio M-Soy 8222 e M-Soy 9144 realizou-se o terceiro experimento para observar o comportamento, destas cultivares a tempos de exposição ao Al^{3+} , pH baixo e antioxidante. Para isso as duas cultivares foram submetidas a concentrações de pH, tratamentos de Al^{3+} e BHA (**pH 6,0, pH 4,0, 200 μmol de**

Al^{+3} , 200 μmol de Al + 100 μmol de BHA e 100 μmol de BHA) em cinco tempos de exposição (0, 12, 24, 48 e 72 horas). Neste experimento utilizou-se a concentração de 200 μmol , pois a concentração de 100 μM poderia não ser suficiente para resultar em alterações nos parâmetros observados neste experimento, relacionado com o estresse oxidativo. Observou-se através dos parâmetros avaliados que o efeito do alumínio só ocorreu após 24h de exposição ao íon, e que 24h de aplicação do antioxidante BHA é suficiente para recuperação das plantas ao estresse. Observou-se também que 200 μM de alumínio não é suficiente para causar danos na parte aérea e por isso estudou-se a partir deste experimento, apenas os efeitos nas raízes das plantas de soja.

Com base em todos os dados obtidos através dos experimentos anteriores, realizou-se o quarto experimento, com duas cultivares, de comportamento contrastante e cinco tratamentos, como no experimento anterior, porém neste apenas um tempo foi observado (72 horas). Este experimento foi realizado com o objetivo de confirmar os resultados obtidos no terceiro experimento no tempo de 72 horas e ainda confirmar os efeitos do antioxidante BHA.

4.2. Material vegetal

O material vegetal utilizado foram plantas de soja cujas sementes foram adquiridas da Monsanto® Agroindústria, por aquisição comercial. Em todos os experimentos, para obtenção das plantas, realizou-se uma semeadura em bandejas de isopor contendo areia lavada, semeando-se uma semente por célula e irrigando diariamente com água destilada. Para isso as sementes passaram por processo de desinfecção, onde permaneceram em solução de NaClO a 0,2% (v/v), por 1 minuto, em seguida foram lavadas por 3 vezes com água destilada e por fim permaneceram por mais 0,5 minuto em álcool 70%. As plantas começaram a germinar aos três dias da semeadura.

4.3. Local do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, do Laboratório de Metabolismo e Estresse de Plantas (LABPLANT), do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, localizada no Campus do Pici, em Fortaleza, Ceará, Brasil, que, de acordo com a classificação de Köppen, possui um clima do tipo Aw' e situa-se a uma altitude de 20 m acima do nível do mar, com as seguintes coordenadas geográficas: latitude $3^{\circ} 44' \text{ S}$ e longitude $38^{\circ} 33' \text{ W}$.

4.4. Meio de cultivo

A solução nutritiva utilizada foi de Clarck, (1975), modificada, apresentando a seguinte composição de macronutrientes (mM): 2,07 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; 1 NH_4Cl ; 0,14 K_2HPO_4 ; 0,25 MgSO_4 ; 1,86 KNO_3 ; 0,25 MgCl e micronutrientes (μM): 40 H_3BO_3 ; 9 MnCl_2 ; 3 CuSO_4 ; 7 ZnMoO_4 ; 0,1 Na_2MoO_4 ; 100 Fe-EDTA, com ajuste do pH para $6,0\pm 0,2$.

4.5. Condições experimentais

4.5.1. Experimento I – Caracterização da toxidez de alumínio em cultivar de soja submetida a concentrações crescentes (0, 25, 50, 75 e 100 μM) de alumínio

4.5.1.1. Objetivo

Avaliar o comportamento da planta de soja submetida a concentrações crescentes de alumínio (0, 25, 50, 75 e 100 μM).

4.5.1.2. Desenho experimental

Antes de transferência das plantas para solução nutritiva elas foram selecionadas quanto tamanho e expansão de folhas para que fossem transferidas para vasos com capacidade de 900 ml contendo solução nutritiva, Clarck, 1975, modificada (de acordo com o tem 4.3) e oxigenação através de compressores de ar. Desta forma as plantas permaneceram por 3 dias (período de aclimatação). Após período de aclimatação o pH foi ajustado a $4,0\pm 0,2$ para que posteriormente fosse aplicado os tratamentos de alumínio (0, 25, 50, 75 e 100 μM). O pH da solução foi aferido diariamente, com HCl 1,0N ou NaOH 1,0N, de forma que a solução permanecesse na mesma faixa de pH, conforme a necessidade. Havia medições de comprimento da parte aérea e raiz a cada dois.

A coleta foi realizada aos sete dias de tratamento. Na coleta foram realizadas medições de comprimento de parte aérea e raiz e determinação de dano de membrana. As plantas foram divididas em parte aérea e raiz e assim acondicionadas em sacos de papel e levadas a secar em estufa a 70°C até que material atingisse peso constante, determinando posteriormente o peso de massa seca das plantas.

4.5.2. Experimento II - Resposta diferencial ao alumínio em cultivares comerciais de soja (*Glicine max*, L).

4.5.2.1 Objetivo

Avaliar a tolerância de cinco cultivares de soja (M-Soy 8222, M-Soy 8866, M9144RR, M-Soy 9350 e FT-106) quanto à toxidez causada por alumínio submetendo-as a uma concentração de 100 μ M deste íon, identificada no experimento I, como tóxica para planta de soja.

4.5.2.2. Desenho experimental

Antes da transferência das plantas para solução nutritiva elas foram selecionadas quanto tamanho e expansão de folhas para que fossem transferidas para vasos com capacidade de 900 ml contendo solução nutritiva, Clarck, 1975, modificada (de acordo com o tem 2.3) e oxigenação através de compressores de ar. Assim as plantas permaneceram por 3 dias (período de aclimatação). Após período de aclimatação o pH foi ajustado a 4,0 \pm 0,2 para que fosse aplicado o tratamento de alumínio. Desta forma, as cinco cultivares de soja permaneceram por sete dias em condições de presença e ausência de alumínio, 0 e 100 μ M respectivamente. Medições de comprimento de parte aérea e raiz foram realizadas a cada dois dias. A coleta foi realizada aos sete dias de tratamento, nesta ocasião, houve medições de comprimento e determinação de dano de membrana, posteriormente as plantas foram divididas em parte aérea e raiz para que fossem acondicionadas em sacos de papel e levadas a estufa à 70 °C ate atingir peso constante, para posterior determinação de massa seca da planta

4.5.3. Experimento III – Estresse oxidativo causado em cultivares de soja pela exposição ao Al⁺³ e pH baixo em diferentes tempos.

4.5.3.1. Objetivo

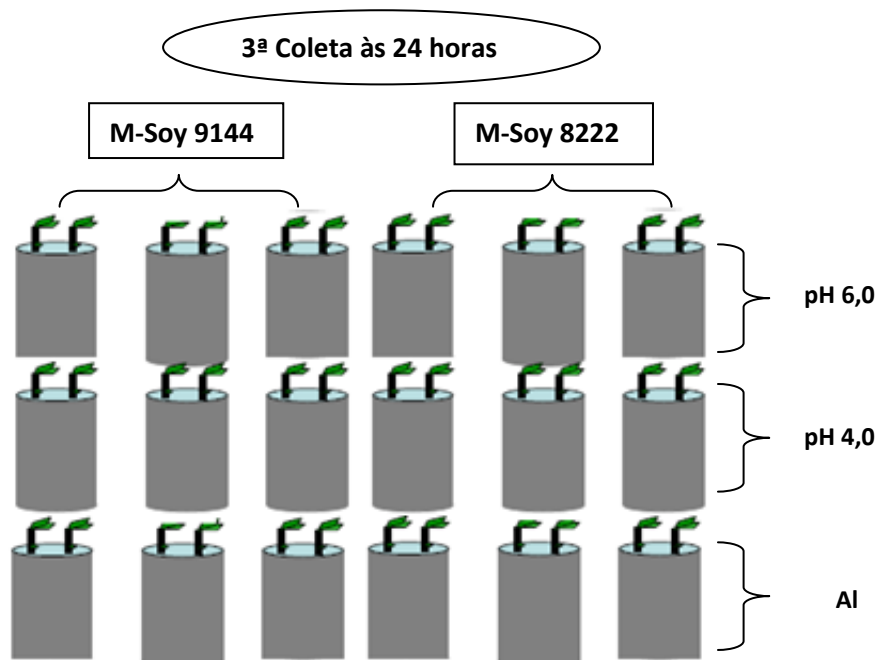
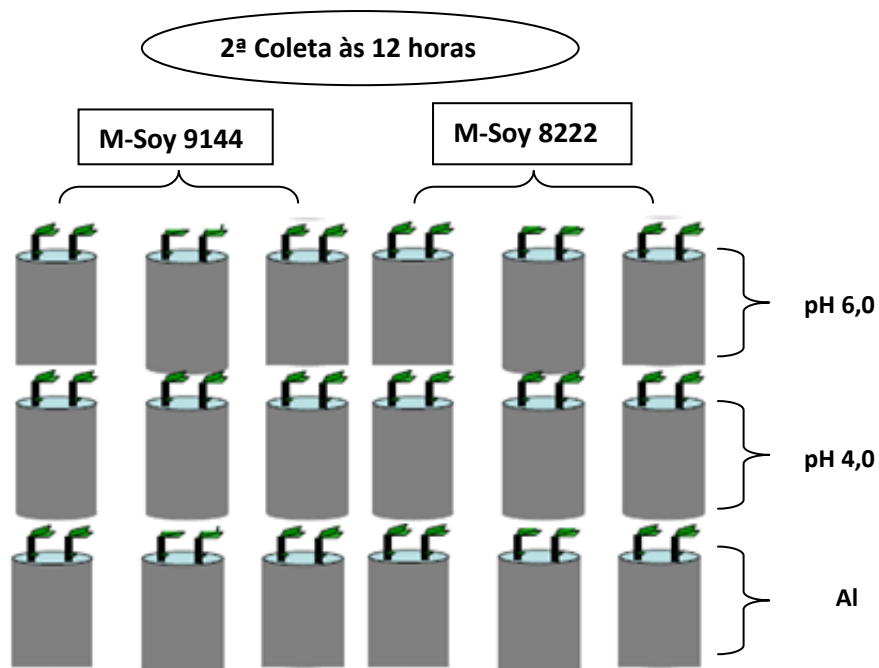
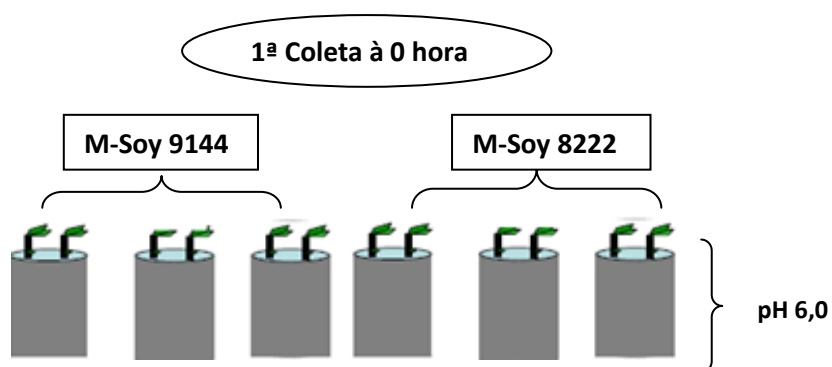
O objetivo deste experimento foi estudar se há correlação entre o estresse causado por Al⁺³ e pH baixo em plantas de soja e o aumento de Espécies Reativas de Oxigênio em diferentes tempos.

4.5.3.2. Desenho experimental

Neste experimento foram utilizadas duas cultivares de soja M-Soy 8222 e M-Soy 9144 que apresentaram comportamento contrastante a presença do alumínio no experimento II. Os procedimentos de desinfecção, semeadura e transferência para solução nutritiva, foram realizados de acordo com os experimentos anteriores. As plantas foram submetidas a concentrações de **pH** (4,0 e 6,0), **Al³⁺** (200 μ M), **Al³⁺ + BHA**(200 μ M+ 100 μ M) e **BHA** (100 μ M). No período de aclimação as plantas permaneceram em solução nutritiva com pH 6,0, logo após, o pH foi ajustado à 4,0 para que fosse aplicado os tratamento de Al³⁺ e BHA. O tratamento de alumínio foi aplicado após o ajuste do pH para 4,0, enquanto que o de BHA foi aplicado 48 horas após a aplicação do tratamento de alumínio.

As coletas foram realizadas em cinco tempos (0, 12, 24, 48 e 72 horas). de acordo com a **Ilustração I**.

As medições de comprimento de raiz foram realizadas por ocasião da transferência das plantas para solução nutritiva e outra a cada coleta realizada. Ainda na coleta foi realizada a medida de dano de membrana. As raízes após as medições de comprimento e retirada do material para medir dano de membrana foram imediatamente congeladas em N₂ líquido e armazenadas a -80 para análises posteriores. As análises realizadas com esse material foram: peroxidação de lipídeos (TBARS), proteínas solúvel e insolúvel, peroxidases do ascorbato (APX), catalases (CAT) e dismutases do superóxido (SOD).



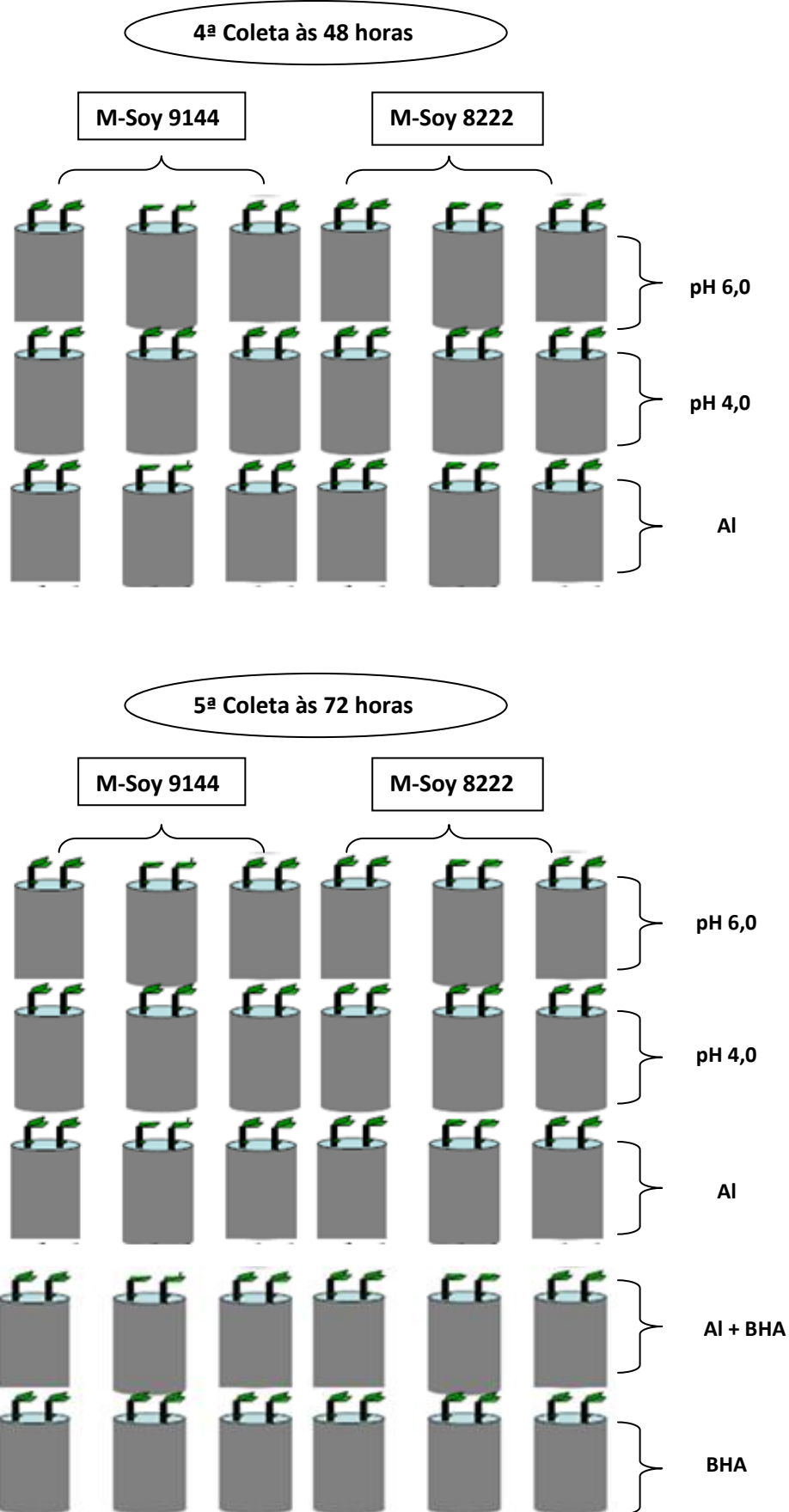


Ilustração 1. Descrição da coleta do experimento III.

4.5.4. Experimento IV – Estresse oxidativo causado em plantas de soja pela exposição à 72 horas ao Al^{3+} e pH baixo.

4.5.4.1. Objetivo

Confirmar os resultados obtidos no experimento III, no tempo de 72 horas de exposição a um nível tóxico de Al^{3+} e pH baixo e o efeito do antioxidante - BHA.

4.5.4.2. Desenho experimental

Neste experimento foram utilizadas as mesmas cultivares, M-Soy 8222 e M-Soy 9144, do experimento III. Os procedimentos de desinfecção, semeadura e transferência para solução nutritiva, foram realizados de acordo com os experimentos anteriores. As plantas foram submetidas a de concentrações de pH (4,0 e 6,0), Al^{3+} (200 μ M) e Al^{3+} + BHA (200 μ M + 100 μ M) e BHA (100 μ M). No período de aclimação as plantas permaneceram em solução nutritiva com pH 6,0, logo após, o pH foi ajustado à 4,0 para que fosse aplicado os tratamento de Al^{3+} e BHA. O tratamento de Al^{3+} foi aplicado após o ajuste do pH enquanto que o de BHA foi aplicado 48 horas após a aplicação do tratamento de alumínio. A coleta foi realizada após 72 horas da aplicação do tratamento de alumínio de acordo com a **Ilustração 2.**

As medições de comprimento de raiz foram realizadas por ocasião da transferência das plantas para solução nutritiva, outra no dia da aplicação do BHA e ultima no dia da coleta. Ainda na coleta foi realizada a medida de dano de membrana. Após as medições de comprimento e retirada do material para medir dano de membrana, uma parte das raízes foram acondicionadas em sacos de papel para serem levadas a estufa à 70°C, para posterior determinação do íon alumínio. A outra parte das raízes eram imediatamente congeladas em N_2 líquido e armazenadas a -80 para posterior análise de peróxido de hidrogênio e peroxidação de lipídeos (TBARS), proteínas solúvel e insolúvel, peroxidases do ascorbato (APX), catalases (CAT) e dismutases do superóxido (SOD).

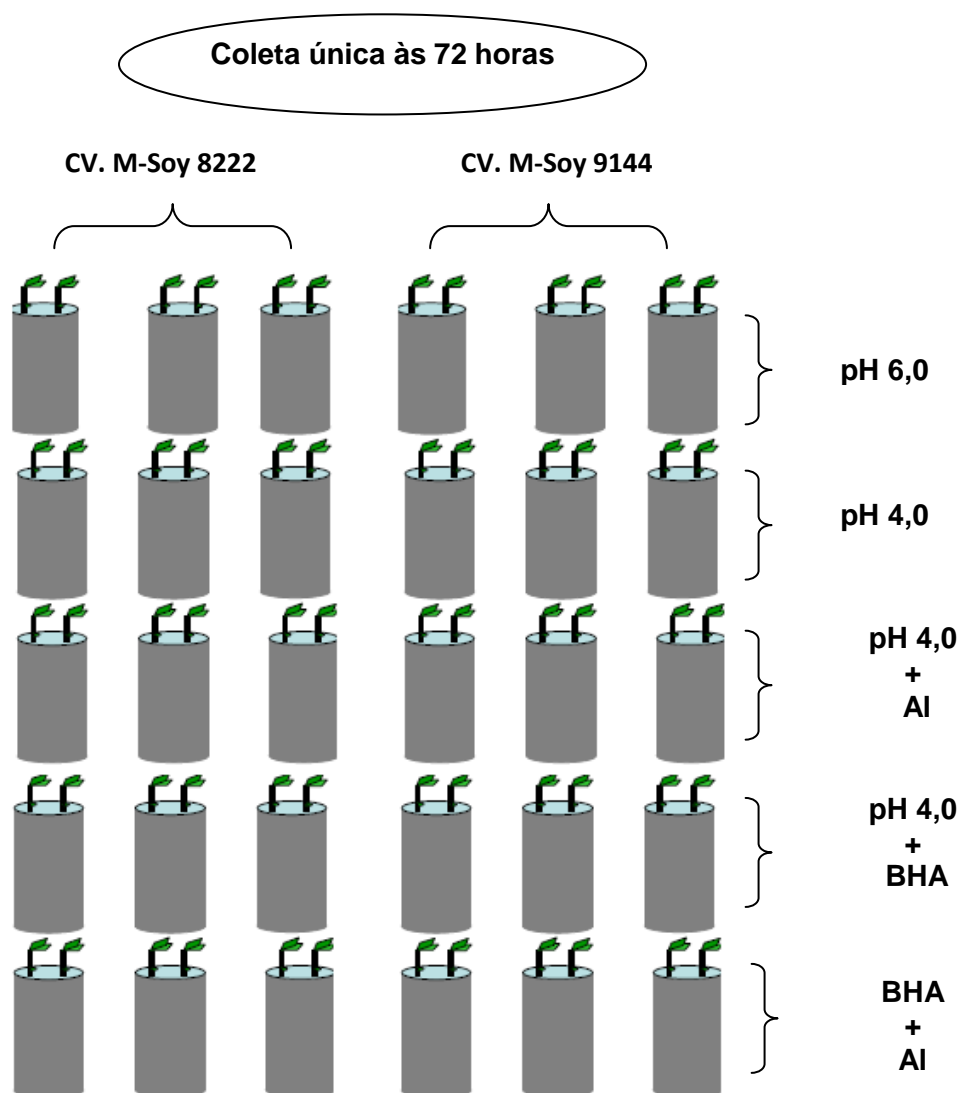


Ilustração 2. Descrição da coleta do experimento IV

4.6. Delineamento e análise estatística

Em todos os experimentos foi utilizado delineamento em blocos casualizados. Para o experimento I, foi utilizado uma cultivar (M-Soy 8222), cinco tratamentos (0, 25, 50, 75 e 100 μ M de Al) e três repetições. No experimento II, cinco cultivares (M-Soy 8222, M-Soy 8866, M9144RR, M-Soy 9350 e FT-106), dois tratamentos (0 e 100 μ M de Al) e três repetições. No experimento III, duas cultivares (M-Soy 8222 e M-Soy 9144), cinco tratamentos (pH 4,0; pH 6,0; 200 μ M de Al; 200 μ M de Al + 100 μ M de BHA e 100 μ M de BHA), cinco tempos de coleta (0, 12, 24, 48 e 72 horas) e três repetições. No experimento IV, foram utilizadas duas cultivares, cinco tratamentos (pH 6,0, pH 4,0, 200 μ M de Al⁺³ e 200 μ M de Al⁺³ + 100 μ M de BHA e 100 μ M de BHA), um tempo de coleta (72 horas) e três repetições.

Os resultados obtidos foram comparados, em mesmo nível de significância, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade pelo programa computacional SISVAR - Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados - desenvolvido por Ferreira (2000).

4.7. Avaliações

4.7.1. Determinação do crescimento relativo da raiz e parte aérea.

Em todos os experimentos foram realizadas determinações do crescimento relativo da parte aérea e da raiz com o auxílio de escala métrica. Assim relacionaram-se os dados de crescimento das plantas tratadas com alumínio e das plantas controle, em função do tempo exposição.

4.7.2. Pesagem de massa da matéria seca

A pesagem foi realizada com o auxílio de balança analítica, para isso as plantas após coleta foram separada em parte aérea e raiz (apenas para os experimentos I e II), armazenadas em sacos de papel e assim levadas a estufa a 70°C por um período de 72 horas. Quando o material atingiu peso constante procedeu-se a pesagem.

4.7.3. Porcentagem de dano de membrana

A metodologia utilizada foi adaptada a partir de Blum e Ebercon (1981). Para isso 10 discos de folhas primárias foram retirados por meio de um perfurador cilíndrico de base com diâmetro de 10 mm. Em seguida, os discos foram colocados em tubos rosqueados contendo 10 ml de H₂O deionizada, e fechados hermeticamente. Retirou-se os primeiros 5cm da raiz para realizar a medida do dano de membrana, da mesma forma utilizada para os discos foliares, colocou-se o material radicular em tubos contendo água deionizada.

Os tubos foram deixados em repouso, à temperatura ambiente (25 °C), por 6 horas, sob agitação ocasional. Decorrido o tempo estabelecido, a solução que estava em contato com os discos foi transferida para tubos de ensaio e a primeira leitura (L1), em condutímetro, foi determinada. A solução foi devolvida para os tubos rosqueados ainda com o material vegetal, estes, fechados hermeticamente e aquecidos em banho-maria a 100 °C, por 60 minutos. Assim em temperatura ambiente, a água de contato foi novamente transferida para tubos de ensaio e novas leituras (L2), foram realizadas.

O percentual de dano de membrana foi calculado a partir da relação entre os valores da primeira e da segunda leitura de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ DM} = \frac{\text{L1}}{\text{L2}} \times 100,$$

Onde: % DM: percentagem de dano de membrana

L1: Leitura inicial

L2: Leitura final

❖ *As seguintes determinações foram realizadas apenas nos experimentos III e IV*

4.7.4. Extração de proteínas solúvel e insolúveis

Para extração de proteínas solúvel e insolúvel 100 mg de raízes foram maceradas em presença de N₂ até a obtenção da farinha e em seguida adicionado 1 mL de TCA 5%. O extrato foi centrifugado a 10.000 x g por 30 min em 4°C, o sobrenadante foi coletado e utilizado para determinação de proteínas solúveis. Para a determinação das proteínas insolúveis o precipitado foi resuspendido em 1 mL de uréia 8M + tiouréia 1M + CHAPS 2% + DTT 50 mM + Anfólitos 1%. O sobrenadante foi recolhido e utilizado para a determinação das proteínas insolúveis.

4.7.5. Determinação de proteínas solúvel e insolúveis

A determinação do conteúdo de proteínas solúveis totais foi realizada pelo método descrito por Bradford (1976). O método é baseado na mudança da coloração do reagente *Coomassie Brilliant blue* G-250 quando ligado a proteína e para a curva padrão utilizou-se a proteína albumina sérica bovina (BSA). Para a determinação, alíquotas de 10 µL do extrato protéico diluído 1/4 foram misturadas com 2,5 mL do reagente de Bradford, submetidas à leve agitação e incubados por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram lidas a 595 nm e a concentração expressa em mg de proteína.g⁻¹ MS.

A determinação do conteúdo de proteínas insolúveis totais foi realizada com base no método proposto por Lowry (1951). O método se baseia numa seqüência de duas reações que ocorre entre as ligações peptídicas protéicas com o íon Cu²⁺ e em seguida a formação de um complexo do ácido molibdatotungsténico (presente no reagente de *Folin-Ciocalteu*) com os resíduos de triptofano e tirosina (abundantes nas proteínas insolúveis) resultando em um composto colorido que pode ter sua concentração estimada em espectrofotômetro a 750 nm.

Assim, para as determinações, alíquotas de 1 mL do extrato foram transferidas para tubos de ensaio, adicionou-se 5 mL do reagente Folin C (Carbonato de sódio anidro 2% em NaOH 0,1N + sulfato de cobre 0,5% em de citrato de sódio 1%) e, após 10 minutos, 0,5 mL do Folin D (reagente de fenol 1N).

Por fim, os tubos foram incubados a 25 °C por 30 minutos e então as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 750 nm. A concentração das proteínas insolúveis totais foi obtida comparando-se com a curva padrão de BSA e a concentração foi expressa em mg de proteína.g⁻¹ MS.

4.7.6. Extração para determinar a peroxidação de lipídios (TBARS)

Para a determinação da peroxidação de lipídios foi realizada extração, macerando 100 mg de raízes em N₂ líquido e adicionando 1 mL de TCA 5%. O extrato foi centrifugado a 10.000g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e utilizado para a determinação da peroxidação de lipídeos.

4.7.7. Determinação da peroxidação de lipídeos

A peroxidação de lipídios foi mensurada a partir da quantidade de malonilaldeído (MDA) do extrato de raízes, através da sua reação específica com o ácido tiobarbitúrico (TBA), reação na qual é gerado um cromóforo de cor avermelhada. O método que foi utilizado foi descrito inicialmente por Heath & Packer (1968) e adaptado por Peixoto (1998).

Alíquotas de 500 µl do extrato foram transferidas para tubos de ensaio, e a estes adicionados 2 ml de reagente contendo TBA a 0,5 % (p/v) dissolvido em TCA a 20 % (p/v). Os tubos foram hermeticamente fechados e a mistura de reação ficou incubada em banho-maria a 95 °C, por 45 min, e em seguida resfriada em banho de gelo. As amostras foram centrifugadas a temperatura ambiente (25 °C) por 5 minutos, em centrífuga de bancada. As leituras foram realizadas a 25 °C nas absorvâncias de 532 e 660 nm, respectivamente (esta, relativo à reação não específica). A segunda leitura foi subtraída da primeira para obtenção da leitura específica e a quantidade do complexo MDA-TBA formada foi calculada através do coeficiente de extinção molar de 155 mM⁻¹ cm⁻¹ (Heath & Packer, 1968). Os resultados foram expressos em **nmol MDA-TBA/ g MF**

4.7.8. Extração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Para a extração de peróxido de hidrogênio foram maceradas 50 mg de raiz em N_2 líquido e posteriormente, adicionado 500 μ L de tampão fosfato de potássio 100mM, pH 6,0 + KCN 5 mM + carvão 0,3% + PVPP 0,1%. O extrato foi centrifugado a 12.000g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para a determinação do peróxido de hidrogênio.

4.7.9. Determinação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

A concentração de H_2O_2 foi determinada pelo método descrito por Gay et al. (1999). Neste ensaio, o peróxido de hidrogênio reage com Fe^{+2} a pH baixo, na presença do corante alaranjado de xilenol (XO) para a formação de Fe^{+3} . A concentração de Fe^{+3} gerada foi calculada pelo aumento da absorbância, ocasionado pela formação do complexo Fe-XO.

Alíquotas de 100 μ l do extrato foram transferidas para tubos de ensaio e adicionado 900 μ l de reagente contendo 0,25 mM de $FeSO_4$, 0,25 mM de $(NH_4)_2SO_4$, 0,25 mM de H_2SO_4 , 124 μ M de alaranjado de xilenol e 99 mM de sorbitol. A mistura de reação foi incubada por 30 minutos, a 25°C, e posteriormente, foram realizadas as leituras de absorbância, no comprimento de onda de 560 nm. As concentrações de H_2O_2 foram obtidas a partir de curva padrão e os dados foram expressos μ Mol/g MF.

❖ Atividades enzimáticas.

4.7.10. Extração enzimática

Para a extração enzimática foi necessário macerar 100 mg de raiz em almofariz com N_2 líquido e adicionar 1000 μ L de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0 + EDTA 1 mM + ácido ascórbico 1 mM. O extrato foi centrifugado a 12.000g a 4°C por 30 minutos. O sobrenadante foi coletado e utilizado nas reações enzimáticas abaixo.

4.7.11. Atividade de dismutase de superóxidos (SODs)

Esta atividade enzimática foi determinada segundo metodologia adaptada de Peixoto (1999) a partir de Del Longo et al. (1993) e Gianopolitis & Ries (1977). Neste método, é determinada a inibição da redução do NBT (p-nitro blue tetrazolium) pelo extrato enzimático, evitando assim a formação do cromóforo. Neste ensaio, uma unidade de atividade enzimática (UA) de SOD é considerada como a quantidade de enzima necessária para obter 50 % de inibição da redução do NBT pela SOD contida no extrato enzimático.

Para tanto, os extratos foram descongelados em banho de gelo (± 4 °C) e após liquefação alíquotas de 100 μ l foram então transferidas para tubos de ensaios protegidos da luz, contendo

tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, 0,1 mM de EDTA, 13 mM de L-metionina e 75 μ M de NBT. A reação foi iniciada pela adição de 2 μ M de Riboflavina e a concomitante transferência dos tubos para uma câmara iluminada por uma lâmpada fluorescente circular de 30 Watts, durante um período de 10 minutos. Em seguida, leituras de absorvância a 560 nm foram tomadas em espectrofotômetro. Foram considerados como brancos da reação, os tubos sem extrato, expostos e não expostos à luz. A atividade foi determinada pelo cálculo da quantidade de extrato que inibiu 50 % da redução de NBT (BEAUCHAMP e FRIDOVICH, 1971) e expressa em U/g MF/min (MAIA, 2004).

4.7.12. Atividade da peroxidases de ascorbato (APXs)

A atividade de APX foi determinada de acordo com o método de Nakano & Asada (1981), modificado por Koshiha (1993), no qual a presença de APX no extrato bruto diminui a concentração de peróxido de hidrogênio do meio, pela redução de ácido ascórbico fornecido. Alíquotas de 100 μ l dos extratos foram transferidas para tubos de ensaio e adicionados, 2,7 ml de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, contendo 0,8 mM de ácido L-ascórbico P.A. A leitura da reação em espectrofotômetro foi iniciada no momento da adição de H₂O₂ ao meio de reação, observando o decréscimo da leitura no intervalo de 0-120 segundos (realizados a cada 30 segundos) em uma absorvância de 290 nm.

Adicionalmente, leituras de tubos controles, com e sem a amostra, na ausência de peróxido de hidrogênio, foram realizadas. Para efeito de cálculo, foi considerado que o decréscimo de 1 unidade de absorvância equivale a 1 unidade de atividade (UA). As atividades do extrato total foram determinadas pelo cálculo da quantidade de extrato que reduziu a leitura de absorvância em 1 UA e expressos em μ mol ASA/g MF/ min

4.7.13. Atividade de catalase (CAT)

A determinação da catalase foi determinada pela adição de 100 μ L do extrato enzimático a 2,9 mL de uma solução contendo H₂O₂ 12,5 mM e tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, e pela medição da diminuição da absorvância a 240 nm, a 30°C (HAVIR & MCHALE, 1987). A atividade da enzima foi calculada usando o coeficiente de extinção molar de 36M⁻¹ cm⁻¹.

4.7.14. Determinação de alumínio (Método da aluminona, adaptado)

a) Obtenção da curva padrão

Este método foi adaptado a partir método de Oliveira (2006). Para obtenção da curva foi

necessário o uso do tampão acetato de aluminona pH 4,6, obtido através da adição de 120 mL de ácido acético glacial à 37 g de NaOH e 0,35 g de aluminona completado para um volume de 1 L de água destilada e pH corrigido para 4,6. Uma solução padrão contendo 10 ppm de Al^{3+} a partir de $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. E ainda o uso de uma solução de HCl 0,3N

A curva foi obtida conforme a **Tabela 1**. Após, agitar os tubos em vórtex e levá-los ao banho-maria a 80 °C durante 30 minutos este foram resfriados a temperatura ambiente e adicionados 1 mL do tampão acetato de aluminona. Desta forma permaneceram em repouso por 30 minutos e em seguida a leitura foi determinada em espectrofotômetro a $\lambda = 525 \text{ nm}$.

b) Obtenção do extrato – Digestão nitroperclórica

Primeiramente 200 mg de massa seca foram colocadas em tubos digestor e adicionados 4 mL de uma mistura de ácido nítrico (HNO_3) concentrado e ácido perclórico (HClO_4) (2:1) e assim permaneceram em repouso por duas horas. Em seguida o material foi digerido a 150°C, alcançado gradualmente, as amostras foram retiradas do bloco digestor quando se encontraram reduzidas a metade. Logo em seguida as amostras foram novamente levadas para o bloco digestor e permaneceram por mais 20 minutos a 210°C. A digestão foi finalizada quando a solução se tornou incolor, e com o aparecimento de uma fumaça branca e densa do ácido perclórico. Então, as amostras esfriaram a temperatura ambiente e assim adicionada à amostra foram diluídas 30 vezes, para proceder determinação do conteúdo de alumínio.

Tabela 1. Alíquotas de reagentes utilizados para obtenção da curva padrão de Al^{3+} (OLIVEIRA, 2006).

TUBOS	Solução padrão de Al (ml)	Água destilada (ml)	HCl 0,3 N (ml)	ppm de Al
1	0	3	1	0
2	0,3	2,7	1	3
3	0,6	2,4	1	6
4	0,9	2,1	1	9
5	1,2	1,8	1	12
6	1,8	1,2	1	18
7	2,4	0,6	1	24
8	3	0	1	30

* Volume reacional = 4 mL.

c) Método para quantificação do alumínio

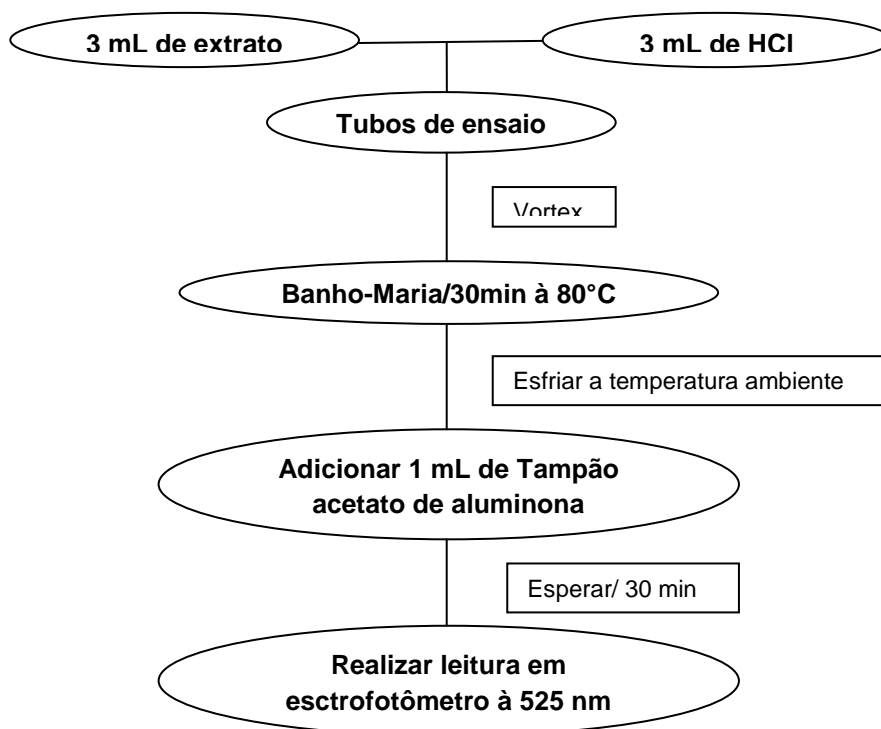


Ilustração 3. Esquema realizado para determinar as concentrações de alumínio nos tecidos das raízes de soja.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Resposta do cultivar M-Soy 8222 exposto a cinco doses crescentes de Al^{+3}

5.1.1. Indicadores de crescimento

a) Comprimento da parte aérea e da raiz

Observou-se que houve declínio no crescimento da parte aérea e das raízes conforme o aumento das dosagens de alumínio. Concentrações a partir de $50 \mu M$ de Al^{3+} podem afetar o crescimento das plantas, observado tanto na parte aérea quanto nas raízes embora a diferença tenha sido observada de forma mais acentuada nas raízes (**Tabela 2**). Na parte aérea houve um decréscimo de 22% em plantas submetidas a $100 \mu mol$ de Al^{+3} em relação ao controle ($0 \mu mol$ de Al^{+3}) enquanto que nas raízes o decréscimo foi de 31%.

Ainda que o tempo de exposição seja considerado curto para causar toxidez na parte aérea, foi observado que as plantas sofreram interferência no seu crescimento. O efeito tóxico do alumínio é bem notado nas raízes das plantas, antes que qualquer sintoma possa ser evidenciado na parte aérea, é provável que a redução de crescimento na parte aérea, tenha ocorrido devido aos danos que ocorrem na raiz (MATSUMOTO et al., 2000), tais como o limitado crescimento que restringe a absorção de nutrientes e água, principalmente fósforo e cálcio (**Tabela 2**).

Tabela 2. Comprimento (cm) da parte aérea e raiz de plantas de soja do cultivar M-Soy 8222 submetidas a doses crescentes de Al^{3+} .

Tratamentos (μM de Al^{3+})	Comprimento (cm)	
	Parte aérea	Raiz
0	18,7 Aa	17,2 Aa
25	18,2 Aa	17,1 Aa
50	17,5 Aab	14,0 Bb
75	17,0 Aab	13,6 Bb
100	14,4 Bc	11,8 Cc

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de significância de 5% pelo Teste de Tukey.

b) Massa seca

O efeito tóxico do alumínio influenciou no peso da matéria seca das plantas, na parte aérea e na raiz. Na parte aérea foi observada a diminuição da matéria seca quando as plantas foram submetidas a concentrações maiores ou iguais a $75 \mu M$ de Al^{3+} havendo a partir desta concentração diferença significativa das demais (**Tabela 3**). Nas raízes também houve diferença estatística entre os tratamentos aplicados, embora essa diferença seja mais significativa na concentração de $100 \mu M$ de Al^{3+} (**Tabela 3**). A parte aérea sofreu uma redução de 58% quando as plantas foram submetidas a $100 \mu mol$ de Al^{3+} em relação ao controle, enquanto que a raiz sofreu redução de 60%.

A diminuição da matéria seca na raiz pode ser devida a redução na divisão celular ocorrida pela influência tóxica do alumínio. Essa diminuição da produção de matéria seca corresponde aos efeitos do alumínio no crescimento das plantas.

Os fatores, comprimento e produção de matéria seca, são considerados parâmetros indicadores da toxicidade de alumínio em plantas e estão diretamente relacionadas, pois quando há diminuição no comprimento conseqüentemente pode haver a diminuição de matéria seca. O critério mais utilizado para medir a toxicidade ao Al^{3+} é a comparação do crescimento e/ou do peso das raízes de plantas crescidas em solução nutritiva com pH ácido e uma concentração adequada de Al^{3+} com plantas controles crescidas na ausência de Al^{3+} (CAMBRAIA & CAMBRAIA, 1995).

Tabela 3. Produção de massa seca (g) de plantas de soja submetidas a cinco doses crescentes de alumínio.

Tratamentos ($\mu\text{M de Al}^{3+}$)	Massa seca (g)	
	Parte aérea	Raiz
0	0,67 Aa	0,22 Ba
25	0,53 Aa	0,12 Cab
50	0,52 Aa	0,12 Cab
75	0,34 Bb	0,094 Db
100	0,28 Bb	0,089 Db

* Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de significância de 5% pelo Teste de Tukey.

5.1.2. Sintomas visuais

Neste trabalho, a parte aérea não apresentou nenhum sintoma visível de toxidez nas folhas, porém o seu crescimento em tamanho foi reduzido (**Figura 2A**). Nas raízes os sintomas identificados foram a redução no crescimento do tamanho, engrossamento das mesmas e aumento na emissão de raízes laterais (**Figura 2B**).

Os sintomas de toxidez de alumínio nem sempre são facilmente identificáveis principalmente na parte aérea (MATSUMOTO et al., 2000). Anjos 2007, trabalhando com plântulas de milho submetidas a uma concentração de 200 μM de Al observou que em um período de 7 dias a parte aérea das mesmas não apresentaram sintomas visíveis.

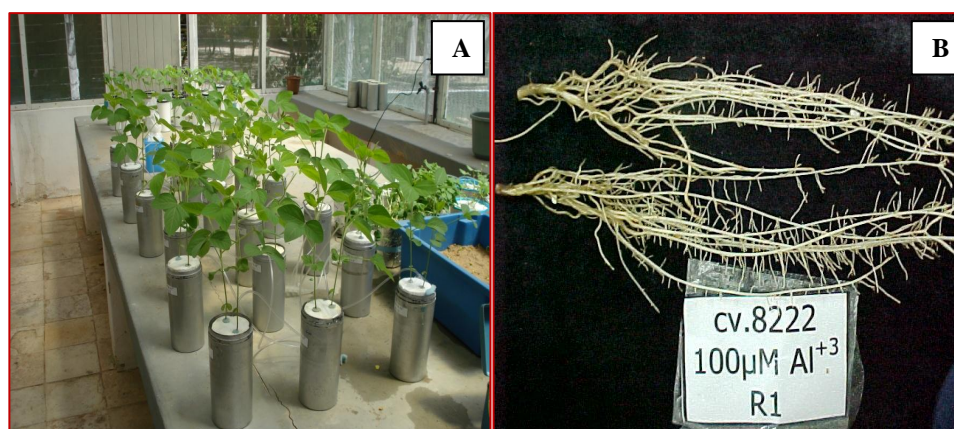


Figura 2. Visão geral da parte aérea de plantas de soja do cultivar M-Soy 8222 (A) e raízes com sintomas de toxidez (B).

Como as raízes são os primeiros órgãos a entrar em contato com o Al^{+3} no solo, desde as primeiras observações foi registrado que os sintomas de toxidez expressavam-se de forma mais acentuada no sistema radicular (ROSSIELLO & JACOB NETO, 2006). A rápida resposta da raiz indica que num primeiro momento o Al inibe a expansão e alongação das células das raízes, e depois a divisão celular também passa a ser inibida (MATSUMOTO, 2000). Apesar dos principais sintomas situarem-se nas raízes muitos outros podem surgir na parte aérea (FRÁGUAS & TERSARIOL, 1993).

5.1.3 Dano de membrana

O dano de membrana foi medido para observar a estabilidade das membranas celulares em função das concentrações de alumínio. Houve diferença significativa entre os tratamentos tanto nas folhas como em raízes. Foi observado que o dano de membrana nas folhas de plantas submetidas a $100\mu\text{mol}$ de Al^{+3} é de 46,4% em relação à planta controle, porém esse aumento foi mais significativo em raízes, 52%, em plantas submetidas a $100\mu\text{M}$ de Al^{3+} (Tabela 4). É observado que o dano de membrana em $0\mu\text{mol}$ de Al é alto, isso se deve provavelmente ao fato de que as plantas se encontravam em condições de pH 4,0. O dano de membrana foi mais expressivo em raízes submetidas a concentrações mais elevadas.

Tabela 4. Dano de membrana (%), de folhas e raiz do cultivar M-Soy 8222 submetidas a doses crescentes de Al^{+3}

Tratamentos (μM de Al^{3+})	Dano de Membrana (%)	
	Folhas	Raiz
0	34,2 Dc	44,6 Cd
25	42,3 Cb	47,7 Ccd
50	47 Cb	54 Bc
75	54,6 Bab	67,9 Bb
100	63,9 Ba	93 Aa

* As médias com a mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de significância de 5% pelo Teste de Tukey.

Observa-se através do gráfico que nas folhas, $100\mu\text{mol}$ de Al^{+3} causa aumento no dano de membrana em 46,4% e em raízes esse aumento é de 52%, mostrando assim que esta concentração induz significativamente o dano nas membranas celulares, (Tabela 4). Maldanner (2008) observou que o Al^{+3} induz danos de membrana em genótipos de *Plaffia glomerata*.

5. 2. Resposta de cinco cultivares de soja submetida a uma concentração de Al^{+3}

5.2.1. Indicadores de crescimento

a) Comprimento da parte aérea e da raiz

No segundo experimento o Al^{+3} inibiu o comprimento da parte aérea e radicular em todas as cultivares. O crescimento da parte aérea das cultivares M-Soy 8222, M-Soy 8866 e M-Soy 9350 apresentaram diferença estatística entre os tratamentos de Al^{+3} , enquanto que as cultivares M-Soy 9144 e FT-106 não apresentaram diferença significativa quando se realizou essa mesma comparação (**Tabela 5**).

O comprimento radicular das cultivares M-Soy 8222, M-Soy 8866, FT-106 e 9350 apresentaram diferença tratamentos. As raízes da cultivar M-Soy 9144 mostraram-se mais resistentes a concentração de Al^{+3} não apresentando diferença entre plantas controle e plantas com tratamento de Al^{+3} (**Tabela 5**).

A cultivar M-Soy 8222 apresentou maior decréscimo no comprimento da parte aérea apresentando um delta (diferença entre a planta controle e as plantas em tratamento) de 17%. O menor delta apresentado na parte aérea foi da cultivar FT-106 com 7%.

Nas raízes o menor delta foi da cultivar M-Soy 9144 apresentando apenas 14% de decréscimo no comprimento das raízes enquanto que o maior decréscimo observado foi observado na cultivar M-Soy 9350, porém essa não difere da cultivar M-Soy 8222, que apresentou maior decréscimo na parte aérea (**Tabela 5**).

Tabela 5. Comprimento (cm) de cinco cultivares de soja submetidas a 0 e 100 μM de Al^{3+} .

Cultivares	*Comprimento (cm)					
	Parte aérea			Raiz		
	0 μM de Al^{3+}	100 μM de Al^{3+}	**Delta (%)	0 μM de Al^{3+}	100 μM de Al^{3+}	**Delta (%)
MSoy 8222	18,3 Aba	15,2 Ab	17	7,1 Aa	5,2 Bb	27
MSoy 8866	19,7 Aba	17,7 Ab	10	7,4 Aa	5,7 ABb	22
M9144 RR	21,7 Aba	18,7 Aa	13	8,4 Aa	7,2 Aa	14
FT-106	16,9 Ba	15,6 Aa	7	6,9 Aa	4,8 Cb	30
MSoy 9350	20,0 Aba	17,5 Ab	12,5	7,8 Aa	5,5 Bb	29

* Médias com a mesma letra maiúscula (cultivares) e minúscula (dose) não diferem ao nível de significância de 5%, respectivamente pelo Teste de Tukey e Teste F.

** Diferença percentual da variável biológica considerando o controle (0 μM de Al^{3+}) e a dose (100 μM de Al^{3+})

b) *Massa seca*

Na parte aérea, a cultivar M-Soy 8222 apresentou 68,6% de decréscimo na produção de matéria seca, sendo a cultivar que foi mais afetada com a concentração de Al^{3+} , porém não difere estatisticamente da cultivar M-Soy 8866 que apresentou 49,3% de diminuição na produção de matéria seca na parte aérea. As cultivares FT-106 e M-Soy 9350 foram as cultivares que mais toleraram a presença do Al^{3+} (**Tabela 6**).

As cultivares apresentou entre si diferença na produção de massa seca das raízes. A cultivar M-Soy 9144 apresentou o maior delta, 34%, porém é igual estatisticamente as cultivares M-Soy 8222, M-soy 8866 e FT-106, diferindo apenas da cultivar M-Soy 9350, que apresentou o menor delta, 23% (**Tabela 6**).

Cruz et. al, (2008), trabalhando com plantas de sorgo observou que doses crescentes de alumínio afetaram severamente a produção de massa seca das plantas, onde foi verificado um decréscimo significativo da massa seca à medida que se aumentaram as doses de alumínio na solução nutritiva.

Tabela 6. Produção da massa seca (g) de cinco cultivares de soja submetidas 0 e 100 μM de Al^{3+}

Cultivares	*Massa seca (g)					
	Parte aérea			Raiz		
	0 μM de Al^{3+}	100 μM de Al^{3+}	**Delta (%)	0 μM de Al^{3+}	100 μM de Al^{3+}	Delta (%)
MSoy 8222	0,341 Ca	0,107 Cb	68,6	0,168 Ba	0,124 BCb	26
MSoy 8866	0,217 Da	0,110 Cb	49,3	0,121 Ca	0,086 Cb	28,9
M9144 RR	0,350 Ba	0,198 Bb	43,4	0,258 Aa	0,170 Ab	34
FT-106	0,360 Ba	0,243 ABb	32,5	0,117 Ca	0,087 Cb	25,6
MSoy 9350	0,449 Aa	0,301 Ab	32,9	0,122 Ca	0,093 Ca	23

* Médias com a mesma letra maiúscula (cultivares) e minúscula (dose) não diferem ao nível de significância de 5%, respectivamente pelo Teste de Tukey e Teste F.

** Diferença percentual da variável biológica considerando o controle (0 μM de Al^{3+}) e a dose (100 μM de Al^{3+})

5.2.2. *Dano de membrana*

A porcentagem de dano de membrana mede o aumento do extravasamento do conteúdo celular, devido ao aumento da fluidez das membranas em decorrência de injurias sofridas em decorrência a diversos estresses (SUASSUNA, 2007). Neste trabalho o tratamento de Al causou dano nas membranas nas folhas das cinco cultivares apresentando diferença significativa entre as mesmas, porém os danos foram maiores nas cultivares 8222, 8866 e FT-106 sendo que esta situação é mais evidenciada na primeira. A cultivar 9144 apresentou

menor dano de membrana nas folhas, em raízes não difere da cultivar M-soy 8866 que apresenta o menor dano de membrana (**Tabela 7**).

A diferença do dano de membrana em plantas controle em relação às submetidas a concentrações de Al^{+3} é maior nas cultivares M-Soy 8222 e na cultivar M-Soy 8866, sendo, 45 e 31,5%, respectivamente, nas folhas. Nas raízes a cultivar que apresenta maior dano de membrana, é cultivar M-Soy 8222, com 35,5%. A cultivar que se mostra menos afetada pelo estresse de Al^{+3} é a cultivar M-Soy 9144, apresentando menor dano tanto nas folhas como nas raízes, apresentando um aumento de apenas 17% em relação em planta afetadas por Al^{+3} nas folhas e de 23,9% nas raízes.

Tabela 7. Dano de membrana (%) em cinco cultivares de soja. Folhas (A) e raiz (B).

Cultivares	*Dano de membrana (%)					
	Folhas			Raiz		
	0 μM de Al^{+3}	100 μM de Al^{+3}	**Delta (%)	0 μM de Al^{+3}	100 μM de Al^{+3}	**Delta (%)
MSoy 8222	42 Cb	77,5 Aa	45	50,1 ABb	75,4 ABa	33,5
MSoy 8866	55,1 Bb	80,5 Aa	31,5	49,7 ABb	62,4 BCa	20,3
M9144 RR	38,4 Ca	46,4 Ca	17	39,1 Bb	51,4 Ca	23,9
FT-106	61,4 Ab	85,5 Aa	28,1	59,5 Ab	85,4 Aa	30,3
MSoy 9350	52,6 Ba	62,8 Ba	16,2	60,4 Ab	76,5 ABa	21

* Médias com a mesma letra maiúscula (cultivares) e minúscula (dose) não diferem ao nível de significância de 5%, respectivamente pelo Teste de Tukey e Teste F.

** Diferença percentual da variável biológica considerando o controle (0 μM de Al^{+3}) e a dose (100 μM de Al^{+3})

5.2.3. Sintomas visuais

Neste experimento os sintomas visíveis foram semelhantes aos que foram apresentados no experimento I, porém a cultivar M-Soy 8222 (**Figura 3A**) apresentou-se mais afetada do que as demais, enquanto que a M-Soy 9144, menos afetada (**Figura 3B**). Na parte aérea houve apenas redução no crescimento principalmente na cultivar M-Soy 8222, enquanto que na raiz houve engrossamento e emissão de raízes laterais. (**Figura 3A, B e C**).

O efeito da toxidez se manifesta, inicialmente, sob a forma de redução na taxa de crescimento das raízes, que, como tal, é um fenômeno muito rápido: nos genótipos mais sensíveis, a redução do alongamento das raízes acontece entre 30 minutos e 2 horas após o início da exposição ao Al^{+3} (BARCELÓ & POSCHENRIEDER, 2002).

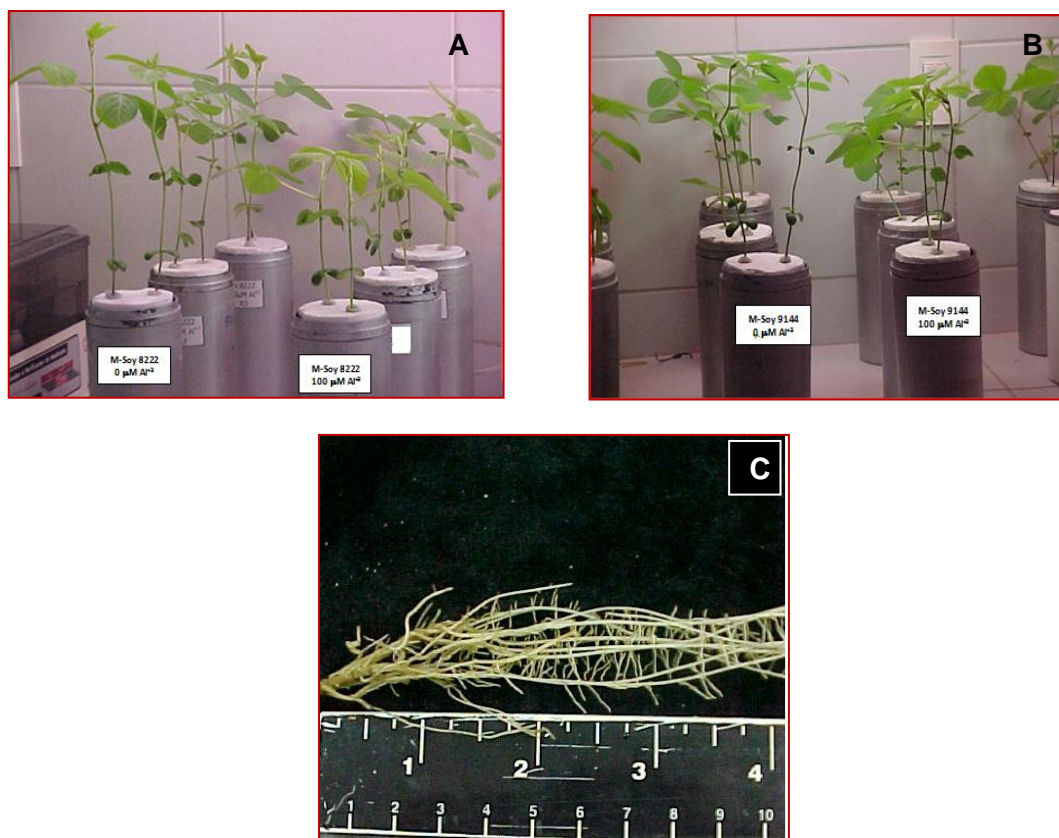


Figura 3. Plantas das cultivares M-Soy 8222 (A) e M-Soy 9144 (B), apresentando diferença de comprimento quando submetidas aos tratamentos de 0 e 100 μ M Al⁺³. Raiz com toxidez de Al⁺³ da cultivar M-Soy 8222 (C).

Na parte aérea, os sintomas resultantes da toxidez não são claramente identificáveis, e as injúrias provocadas pelo Al⁺³ podem ser confundidas com aqueles decorrentes de desbalanço ou deficiência nutricional, especialmente do P: redução geral do crescimento, folhas pequenas e verde-escuras, com maturação tardia e ramos com coloração purpúrea. Em outros casos, os sintomas são semelhantes às deficiências de Ca e Fe, com o enrolamento de folhas jovens ou malformações e colapso e pecíolos. Também tem sido relatada a ocorrência de aéreas cloróticas ou necróticas sobre a superfície foliar, lembrando sintomas de toxidez de Mn ou mesmo de deficiência hídrica (KOCHIAN, 1995).

5.3 Resposta de cultivares de soja a exposição ao Al⁺³ e pH baixo em diferentes tempos.

5.3.1. Comprimento radicular de duas cultivares de soja (M-Soy 8222 e M-Soy 9144).

Nas duas cultivares, o Al⁺³ reduziu o crescimento radicular em relação às plantas que estavam em condições de pH 6,0. A raiz continua a crescer em presença de Al⁺³, porém de forma

mais lenta em relação a planta controle (pH6,0). É observado que nas duas cultivares o efeito que o pH 4,0 causa é semelhante ao causado pela toxidez do Al^{+3} , havendo também um crescimento mais lento. Houve recuperação significativa apenas na cultivar M-Soy 9144 quando tratadas com o antioxidante BHA em relação às plantas tratadas com o alumínio em condição de pH 4,0 este efeito foi mais significativo e ocorreu nas duas cultivares (**Figura 4 A e B**).

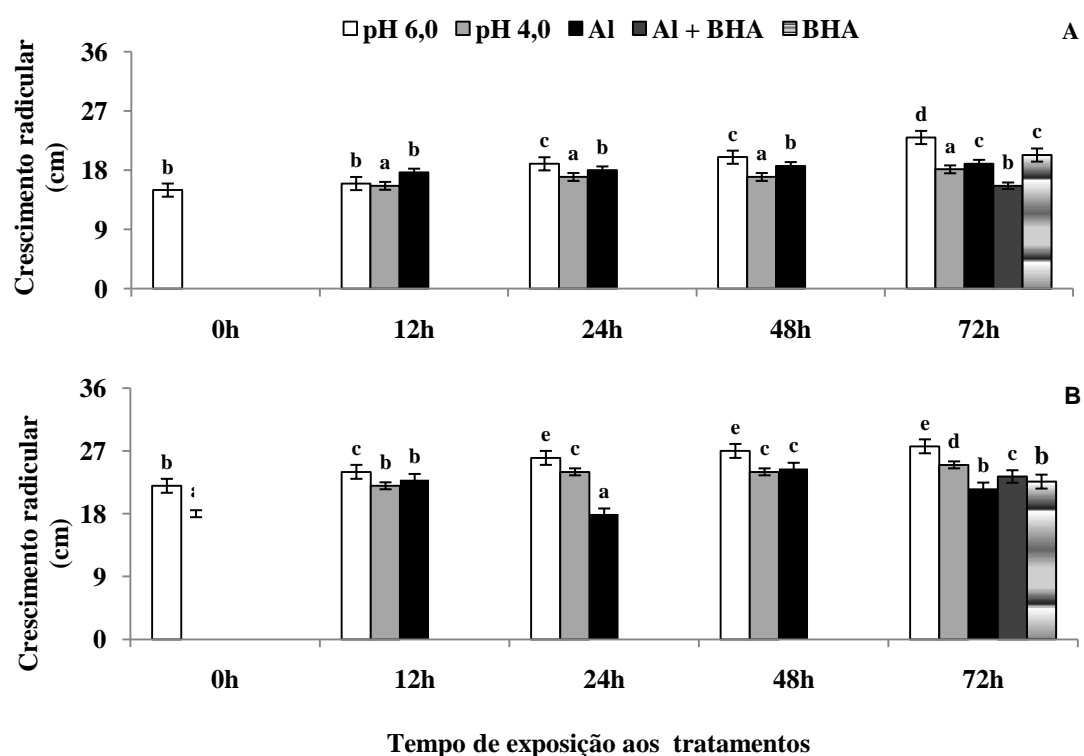


Figura 4. Crescimento radicular de duas cultivares de soja M-Soy 8222 (A) e M-Soy 9144 (B) submetidas a tratamentos de pH (4,0 e 6,0), Al^{+3} (200 μ M) e BHA (100 μ M), observadas em cinco tempos. Letras iguais nas colunas, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Rocha (2006), trabalhando com plantas de milho tolerante e sensível a presença de alumínio, observou que houve redução no crescimento das raízes em concentrações de 150 e 200 μ M nas duas cultivares estudadas como o que ocorreu neste trabalho quando as plantas foram submetidas a 200 μ M de Al^{+3} . Bonato (2001) observou reduções contrastantes no crescimento radicular ao submeter duas cultivares milho uma tolerante (AG 5011) e outra sensível (AG 122), a uma concentração de 185 μ M de alumínio. A cultivar tolerante apresentou menor inibição do crescimento radicular após 3 dias de tratamento. Mascarenhas et al., (1984), trabalhando com cultivares de soja, observaram que, em concentrações elevadas de alumínio, maiores que 185 μ M, não influenciava no comprimento das raízes de cultivares

sensível e tolerante. De acordo com este autor isso deve ter ocorrido devido ao efeito causado pelo alumínio que deve ter ultrapassado a capacidade de tolerância da cultivar tolerante, eliminando assim as diferenças entre as cultivares.

O crescimento radicular, especialmente da raiz principal, parece ser um dos melhores indicativos, quando comparado a outros parâmetros de crescimento para indicar tolerância diferencial ao alumínio (CAMBRAIA, 1991).



Figura 5. Plantas de soja da cultivar M-Soy 9144 submetida a concentrações de pH, Al^{+3} no tempo de 72 horas e 24 horas de antioxidante BHA.

Neste experimento em 72 horas de exposição aos tratamentos de pH e Al^{+3} e 24 horas de BHA, a planta que apresentou maior crescimento foi a que estava submetida a condições de pH 6,0 enquanto que as que estavam em condições de pH 4,0 e Al^{+3} apresentaram o crescimento reduzido. As plantas que foram tratadas por 24 horas com o antioxidante BHA apresentaram recuperação no crescimento, principalmente aquelas que estavam submetidas apenas a condições de pH 4,0 (**Figura 5**).

5.3.2. Dano de membrana em duas cultivares de soja (M-Soy 8222 e M-Soy 9144).

Houve aumento no dano de membrana das duas cultivares estudadas em função do tempo. As plantas submetidas à concentração de alumínio e pH 4,0 sofreram um maior dano de membrana, porém as que estavam em presença de pH 4,0 só começaram a sofrer danos a partir de 24h de exposição enquanto que as que estavam em presença de alumínio após 12h de exposição. Na cultivar M-Soy 8222, os danos foram maiores do que na cultivar M-Soy 9144, apenas nos tempos de 12 e 24h após esse período o dano nas duas cultivares são semelhantes. O BHA proporcionou uma redução significativa no dano de membranas das duas cultivares, na cultivar M-Soy 8222 a redução foi de 43% em relação às plantas tratadas

com Al^{+3} e de 43,7% em relação às plantas tratadas com pH 4,0. Na cultivar M-Soy 9144 o BHA reduziu o dano de membrana em 50% e em relação as que estavam em presença de Al^{+3} e em presença de pH 4,0 reduziu 42,8%. (**Figura 6**).

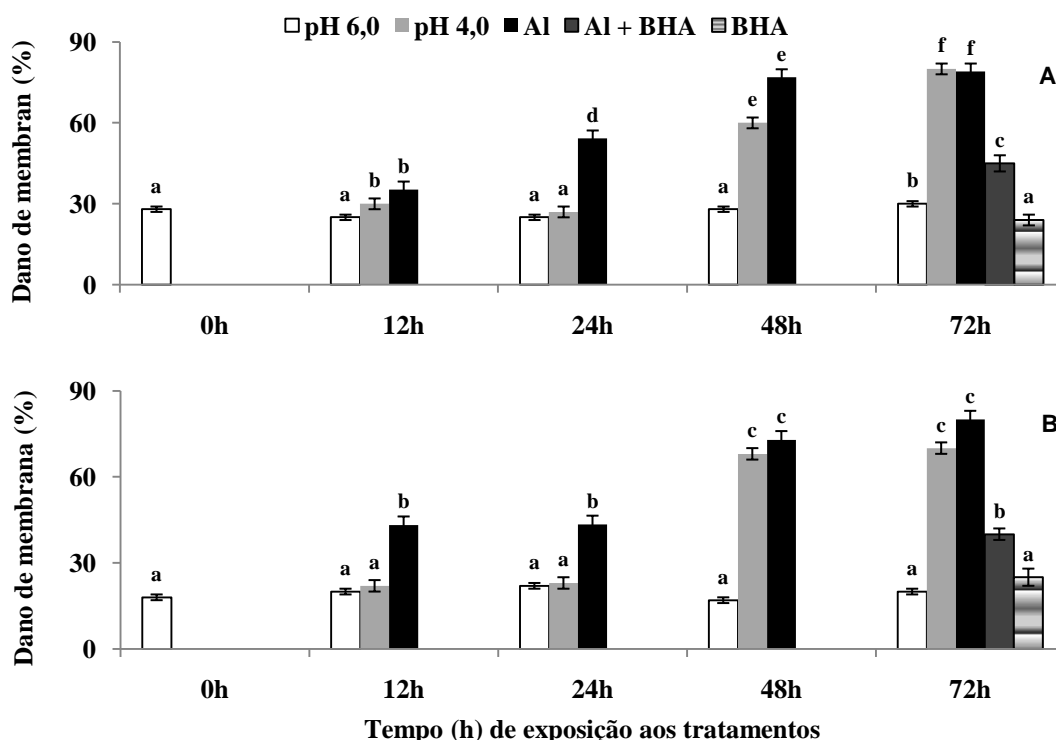


Figura 6. Dano de membrana em raízes de duas cultivares, M-Soy 8222 (A) e M-Soy 9144(B), submetidos a tratamentos de pH (4,0 e 6,0), Al^{+3} (200 μM) e antioxidante BHA (100 μM) observados em cinco tempos. Letras iguais nas colunas, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5.3.3. Peroxidação de lipídeos de duas cultivares de soja (M-Soy 8222 e M-Soy 9144).

A peroxidação de lipídeos aumentou em função do tempo nas plantas tratadas com Al e pH 4,0 e não alterou em condições de pH 6,0 nas duas cultivares. Em plantas da cultivar M-Soy 8222 submetidas a tratamentos com Al e pH 4,0 o conteúdo de peróxido de lipídeos aumenta em 63 e 59%, respectivamente, em relação as plantas controle (pH 6,0). Na cultivar M-Soy 9144 esta mesma relação é de 66% para Al e de 35,2% em pH 4,0. Indicando que a cultivar 9144 possui maior produção de peróxido de lipídeos em condições de estresse por alumínio (**Figura 7**).

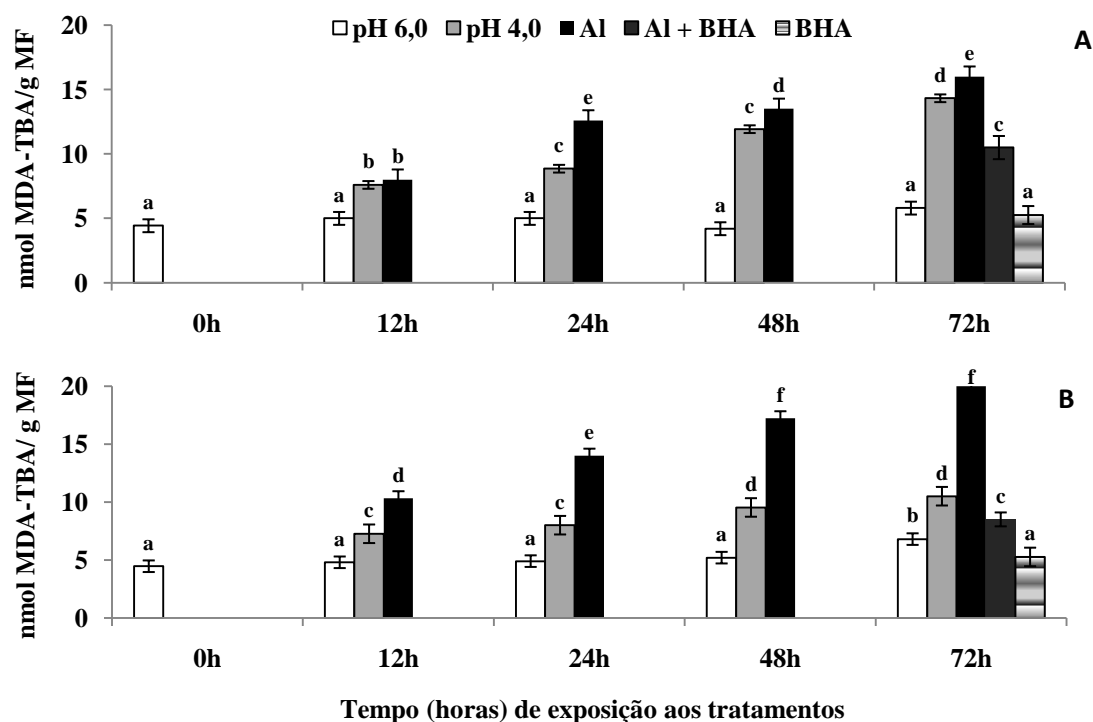


Figura 7. Peroxidação de lipídeos em tecidos de raízes de duas cultivares, M-Soy 8222 (A) e M-Soy 9144 (B), submetidos a tratamentos de pH (4,0 e 6,0), Al^{+3} (200 μM) e antioxidante (100 μM) observados em cinco tempos. Letras iguais nas colunas, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Esse aumento na peroxidação de lipídeos é considerado como um sintoma da ocorrência de danos oxidativos nas células.

A cultivar M-Soy 9144 apresentou um menor dano nas membranas, essa redução pode ser resultante da capacidade do alumínio em diminuir a atividade da H^+ -ATPase da membrana plasmática (PEIXOTO,1997). A inibição da atividade da H^+ -ATPase é, aparentemente, decorrente da ligação do alumínio ao complexo enzima-substrato pelos resíduos SH do sítio ativo e, também, aos fosfolipídeos das membranas, o que provoca alterações no microambiente da enzima e, conseqüentemente, modificações na conformação e na atividade da H^+ -ATPase. A redução na atividade dessa enzima poderia ser então, uma estratégia utilizada pelas plantas para reduzir o conteúdo de alumínio acumulado no simplasto, o que poderia resultar numa menor peroxidação dos lipídeos (CAKMAK & HORST, 1991).

Fonseca Junior (2007), trabalhando com cultivares de arroz de tolerância diferencial, submetidas a 1mM de Al, observou que o alumínio proporcionou um aumento na peroxidação de lipídeo em cultivar sensível e que na tolerante o efeito não foi significativo, como o que foi observado neste trabalho (Figura 6). Meriga et al., (2004), trabalhando com cultivares asiáticos

de arroz observou um aumento no conteúdo de peróxido de lipídeos de 82% em cultivar sensível e 43% em tolerante, quando estas foram expostas a 56 horas de tratamento de 80 μ M de Al, Peixoto, (2001), observou em sorgo um aumento de 200% em cultivar sensível e de 126% em cultivar tolerante.

5.3.4. Conteúdo de proteína solúvel de duas cultivares de soja (M-Soy 8222 e M-Soy 9144).

O conteúdo de proteína solúvel foi drasticamente diminuído em função dos tratamentos de Al e pH 4,0 no decorrer do tempo. A cultivar M-Soy 9144 apresentou um menor conteúdo de proteína solúvel em relação a cultivar M-Soy 8222 no tempo de 72 horas de exposição ao alumínio e pH 4,0. Em presença de pH 6,0 a quantidade de proteína não é alterado. Nas duas cultivares o conteúdo de proteína solúvel só é diminuído a partir de 48 horas de exposição ao alumínio. O BHA diminui o efeito do alumínio sobre o conteúdo de proteína, porém de forma pouco significativa (**Figura 8**).

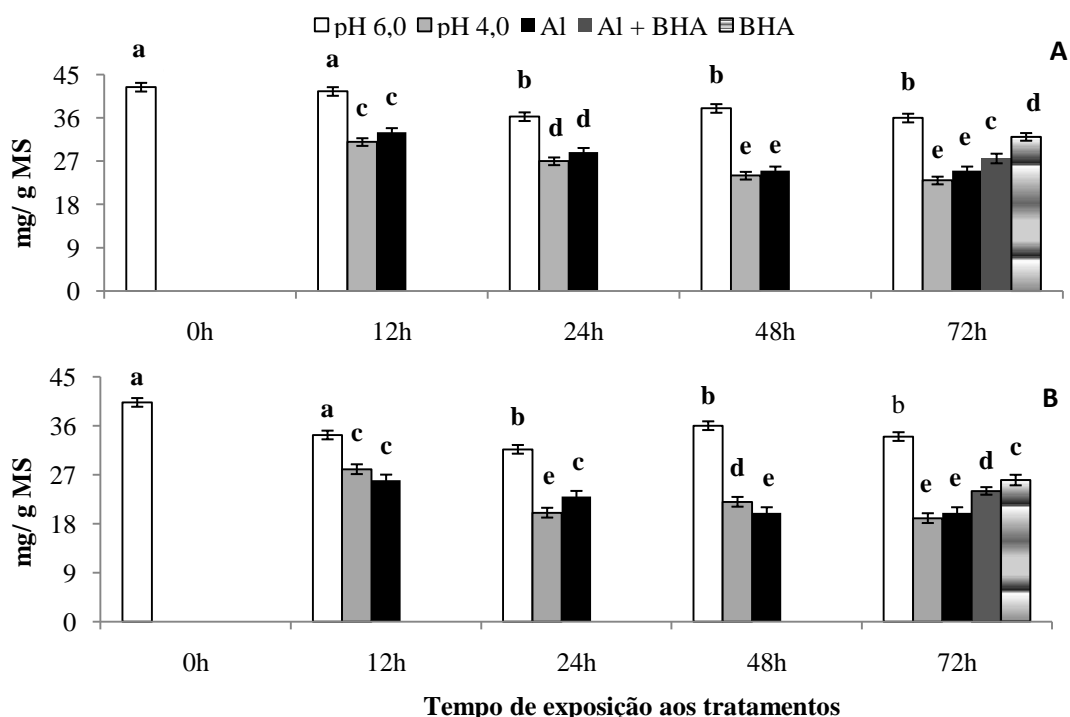


Figura 8. Conteúdo de proteína solúvel das raízes das cultivares M-Soy 8222(A) e M-Soy 9144 (B) submetidos a tratamentos de pH (4,0 e 6,0), Al⁺³ (200 μ M) e antioxidante BHA (100 μ M) observados em cinco tempos. Letras iguais nas colunas, entre os tempos, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As plantas da cultivar M-Soy 8222 em presença de Al e pH 4,0, tem o conteúdo de proteína solúvel diminuído em 30,55% e 36,11%, respectivamente no tempo de 72 horas. Na cultivar M-Soy 9144 ocorre diminuição do conteúdo de proteína solúvel em presença de Al, de 41,17%. (Figura 8).

5.3.5 Conteúdo de proteína insolúvel de duas cultivares de soja (M-Soy 8222 e M-Soy 9144).

A quantidade de proteína insolúvel foi diminuída nas duas cultivares em função do tempo de exposição aos tratamentos de Al e pH 4,0 porém observa-se através da figura 5, que a cultivar M-Soy 8222 possui um conteúdo maior de proteína insolúvel do que a cultivar M-Soy 9144, isso se deve provavelmente a própria característica da planta (Figura 9).

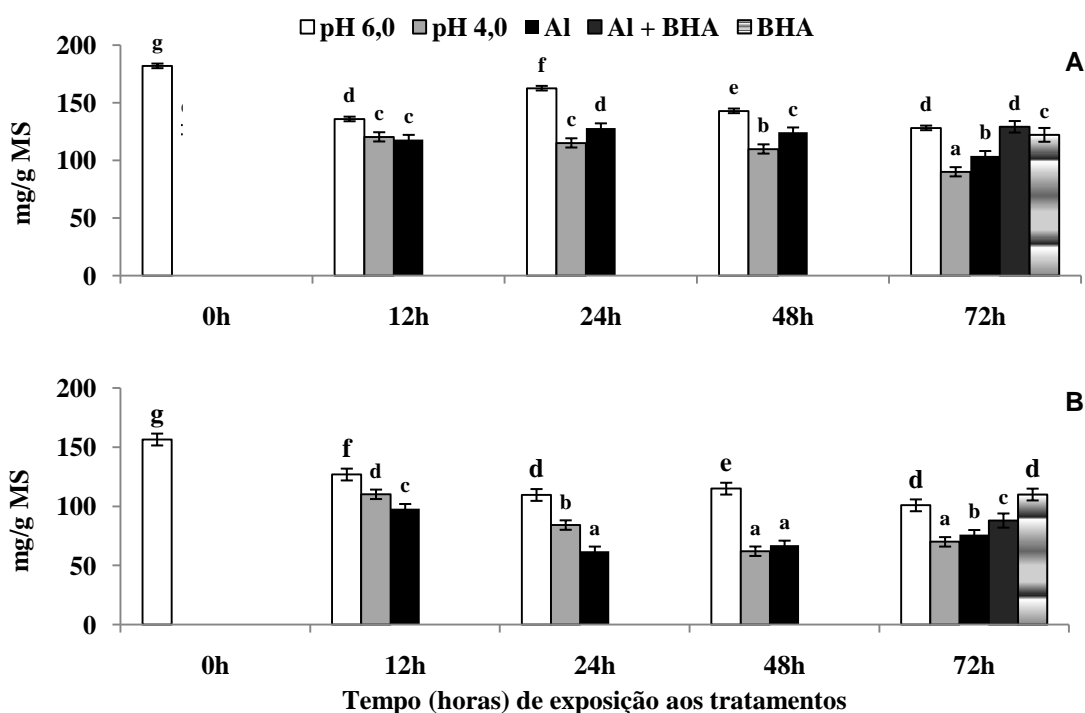


Figura 9. Conteúdo de proteína insolúvel em tecidos de raízes submetidos a tratamentos de pH (4,0 e 6,0), Al^{+3} (200 μ M) e antioxidante BHA (100 μ M) observados em cinco tempos. Letras iguais nas colunas, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na cultivar M-Soy 8222 a diminuição de proteína insolúvel em plantas que estavam sobre tratamentos de Al e pH 4,0 foi de 18,78 e 29,7%, respectivamente em 72 horas.

Enquanto que na cultivar M-Soy 9144, foi de 30,28% para alumínio e de 35,78% para pH 4,0 em 72 horas. As cultivares que estavam em presença de pH 6,0 tiveram o conteúdo de proteína insolúvel diminuído em função do tempo nas duas cultivares. O BHA proporcionou um aumento de proteína solúvel em reação as plantas tratadas com Al e pH 4,0. O teor de proteína insolúvel é diminuído após 24h de tratamento nas duas cultivares (**Figura 9**).

5.3.6. Atividade de APX em duas cultivares de soja (M-Soy 8222 e M-Soy 9144).

A atividade de APX aumentou nas duas cultivares estudadas em relação aos tratamentos de Al e pH 4,0, contudo a cultivar M-Soy 8222 apresentou uma maior atividade em relação a cultivar M-Soy 9144. Observa-se através da **figura 10**, que a atividade da APX na cultivar M-Soy 8222 aumenta significativamente nos tratamentos de alumínio e pH 4,0. Nesta cultivar o tratamento de alumínio influencia mais a atividade da enzima do que o tratamento de pH 4,0 o mesmo não ocorre na cultivar M-Soy 9144, onde o efeito é contrário.

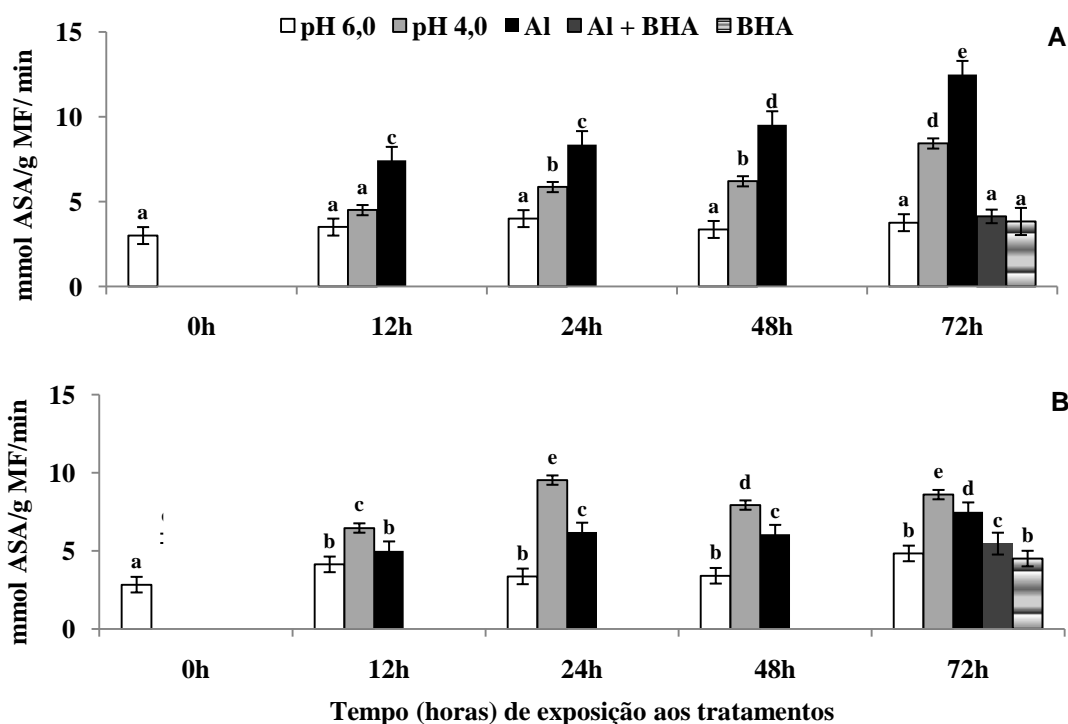


Figura 10. Atividade de APX em tecidos de raízes de duas cultivares M-Soy 8222 (A) e M-Soy 9144 (B), submetidos a tratamentos de pH (4,0 e 6,0), Al^{3+} (200 μ M) e antioxidante BHA (100 μ M) observados em cinco tempos. Letras iguais nas colunas, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na cultivar M-Soy 8222 há aumento na atividade de APX de 69 % e 55% nas plantas submetidas a Al e pH 4,0, respectivamente, em relação as plantas que estavam em condições de pH 6,0. Na cultivar M-Soy 9144 o aumento é de 35,6% para Al⁺³ e de 43% para pH 4,0 em relação as plantas submetidas a pH 6,0.

As plantas que foram tratadas com Al e em seguida com BHA, diminuiram significativamente a atividade da enzima nos dois cultivar.

O cultivar M-Soy 8222 pelo aumento da atividade enzimática pode indicar que possui maior potencial para remoção de H₂O₂ do interior das células do que o cultivar M-Soy 9144.

5.3.7. Atividade de CAT em duas cultivares de soja (M-Soy 8222 e M-Soy 9144).

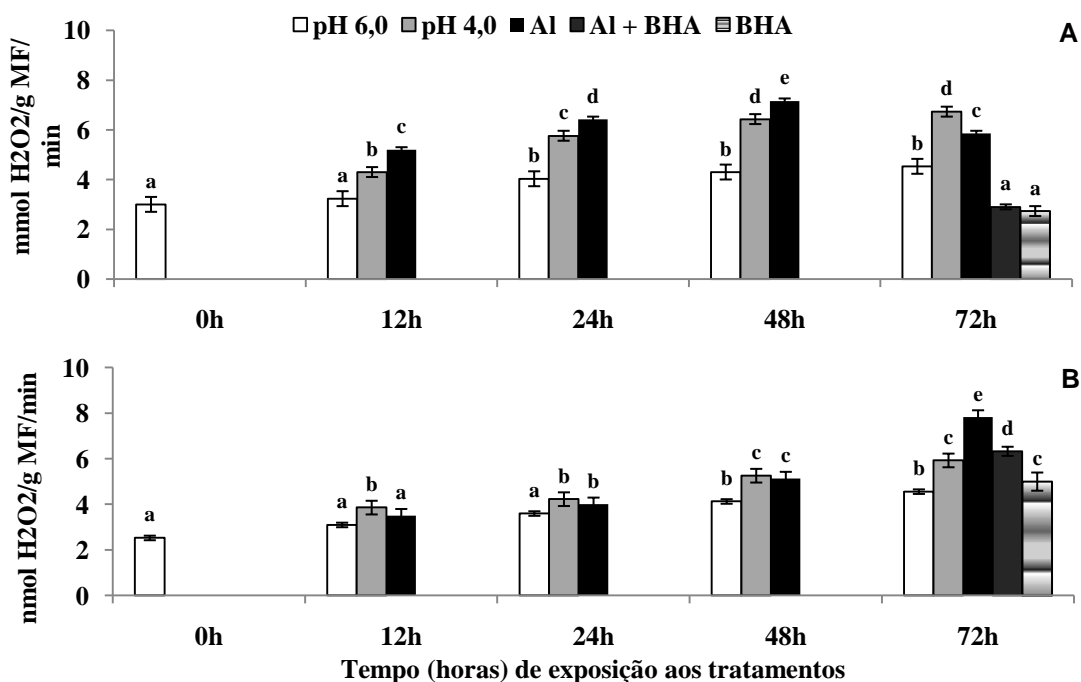


Figura 11. Atividade de CAT, em tecidos de raízes de duas cultivares M-Soy 8222 (A) e M-Soy 9144 (B), submetidos a tratamentos de pH (4,0 e 6,0), Al⁺³ (200μM) e antioxidante (100 μM) observados em cinco tempos. Letras iguais nas colunas, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A atividade de CAT aumentou em função do tempo de exposição aos tratamentos e que na cultivar M-Soy 8222 essa atividade é diminuída depois de 48 horas, enquanto que a atividade continua aumentado nas plantas submetidas a pH 4,0. Na cultivar M-Soy 9144 o

aumento da atividade é observado em todos os tempos e que o tratamento de Al^{+3} influencia mais na atividade que o pH 4,0.

O cultivar M-Soy 8222 teve a atividade de CAT diminuída significativamente quando foi submetido ao BHA por 24 horas, o mesmo ocorre no cultivar M-Soy 9144, porém de forma menos acentuada (**Figura 11**).

Segundo Mizuno et al., (1998), a ação conjunta das enzimas APX e CAT podem atuar protegendo as células das plantas contra os níveis tóxicos de H_2O_2 causados por diferentes estresses, apesar de apresentarem diferentes afinidades por H_2O_2 .

5.3.8. Atividade de SOD em duas cultivares de soja (M-Soy 8222 e M-Soy 9144).

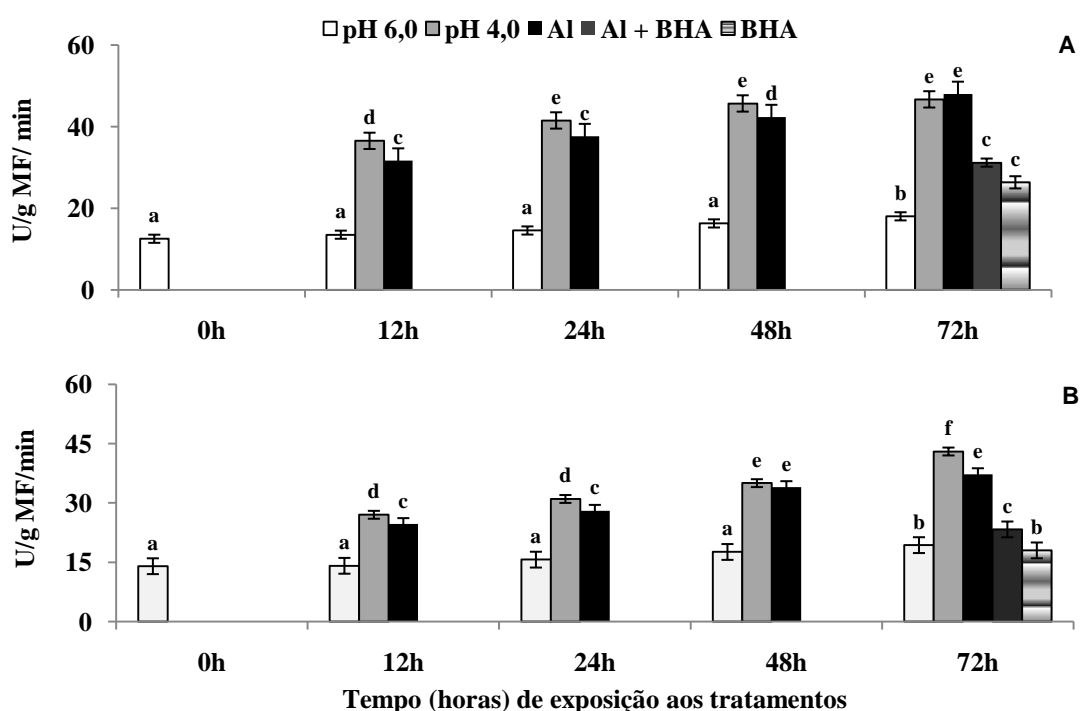


Figura 12. Atividade de SOD em tecidos de raízes submetidos a tratamentos de pH (4,0 e 6,0), Al^{+3} (200 μM) e antioxidante BHA (100 μM) observados em cinco tempos. Letras iguais nas colunas, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A atividade de SOD aumentou significativamente nos dois cultivares submetidos a Al e pH 4,0 em relação as que encontravam-se em condições de pH 6,0. O cultivar M-Soy 8222 (**Figura 12A**) em condições de pH 6,0, teve a atividade de SOD aumentada em 62,5% em

relação a plantas tratadas com Al^{+3} e de 61% em condições de pH 4,0, demonstrando um que este tratamentos possuem efeito similares na atividade da SOD. No cultivar M-Soy 9144 (**Figura 12B**) o aumento da atividade de SOD em 72h foi de 48% nas plantas tratadas com Al^{+3} em relação as que estavam em condições de pH6,0, esse aumento foi maior quando comparou-se as plantas em condições de pH4,0 com as de pH 6,0, sendo este aumento de 55,04%. Observou-se que a atividade de SOD aumenta em plantas do cultivar M-Soy 9144 tratadas com alumínio ate 48 horas e que depois decresce o mesmo não ocorreu no cultivar M-Soy 8222. O BHA diminui significativamente a atividade de SOD nas duas cultivares.

5.4. Resposta de cultivares de soja à exposição de Al^{+3} e pH baixo.

5.4.1. Conteúdo de proteínas solúveis e insolúveis em resposta ao estresse de alumínio.

As proteínas são encontradas em todas as partes da célula vegetal e são fundamentais sob todos os aspectos estruturais e funcionais da célula (BRAY, 2000). Assim, mudanças nos teores de proteínas registrados em plantas submetidas às condições de estresse, podem representar um grande dano ou um mecanismo de aclimatação para o crescimento e desenvolvimento vegetal (PARIDA ; DAS, 2005; SILVEIRA et al., 2003).

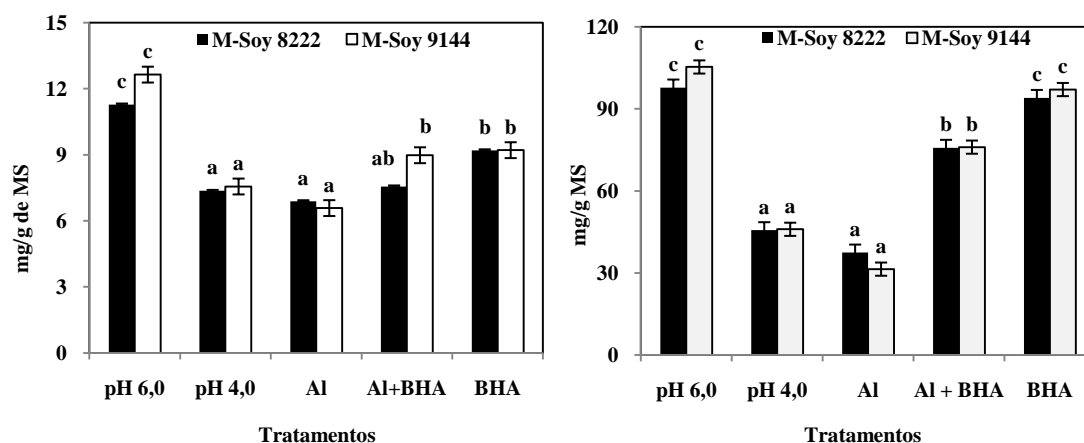


Figura 13. Conteúdo de proteínas solúveis (A) e proteínas insolúveis (B) em tecidos de raízes submetidos a tratamentos de pH (4,0 e 6,0), Al^{3+} (200 μ M) e antioxidante BHA (100 μ M). Letras iguais nas colunas, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Neste trabalho procurou-se evidenciar os efeitos estressantes de alumínio e pH ácido em raízes de soja bem como observar se a planta conseguiria se recuperar do estresse causado por

estes, com auxílio de um antioxidante. O conteúdo de proteína solúvel diminuiu em função dos tratamentos de alumínio e pH ácido, porém quando submetidas a 48 horas de estresse por alumínio e em seguida submetidas a 100 mM de BHA por 24 horas as plantas conseguiram se recuperar indicando que este pode atenuar os efeitos causados pela exposição ao alumínio. Observou-se que o tratamento de Al^{+3} e pH 4,0 causaram decréscimos semelhantes no conteúdo de proteína solúvel (**Figura 13 A**).

Segundo Tester e Davenport (2003), sob condições de estresse, a síntese de proteínas pode ser aumentada visando à estabilização de membranas celulares, ou ainda, a sinalização atribuída ao estímulo do estresse. Por outro lado, o aumento brusco da concentração de proteínas solúveis em plantas expostas a estresses pode refletir um aumento da solubilização de inúmeras proteínas e não um aumento de síntese proteica (CAVALCANTI et al., 2004).

O conteúdo de proteína insolúvel nos tecidos das raízes de soja diminuiu quando submetidas a condições de pH ácido e a concentração de alumínio. As plantas que foram submetidas a condições de estresse por Al^{+3} por 48 horas e 24h de BHA conseguiram acumular um conteúdo de proteína insolúvel maior que as plantas que permaneceram por 72 horas em presença de $200\mu\text{M}$ de alumínio. O efeito do antioxidante em plantas submetidas a estresse apenas de pH ácido obteve um maior acúmulo de proteína insolúvel do que as estressadas por alumínio, indicando que o antioxidante possui maior efeito em presença de pH ácido do que de alumínio (**Figura 13B**).

5.4.2. Influencia dos tratamentos sobre peróxido de hidrogênio e lipídeos

O acúmulo de peróxido de hidrogênio aumentou significativamente em plantas submetidas a estresse de Al^{+3} e pH 4,0 nas duas cultivares estudadas e esse acúmulo diminuiu em plantas que foram tratadas com o antioxidante. O aumento na concentração de peróxido de hidrogênio pode ter relação com o tempo de exposição ao íon como relata Fonseca Júnior, (2007) e aos prováveis efeitos do pH ácido (**Figura 14A**).

Dipierro et al, (2005) encontrou aumento na concentração de peróxido de hidrogênio em plântulas de abóbora com o aumento de exposição ao Al^{+3} na concentração de $50\mu\text{M}$ até 48 horas, seguido por decréscimo significativo após 72 horas. O acúmulo de EROs parece aumentar com o tempo de exposição a esse íon. Tamás et al, (2004), observaram que a diminuição de peróxido de hidrogênio com o aumento da concentração de Al^{+3} de 0 a 8 mM de Al. A diminuição de peróxido de hidrogênio pode ocorrer devido a ação de enzimas antioxidantes

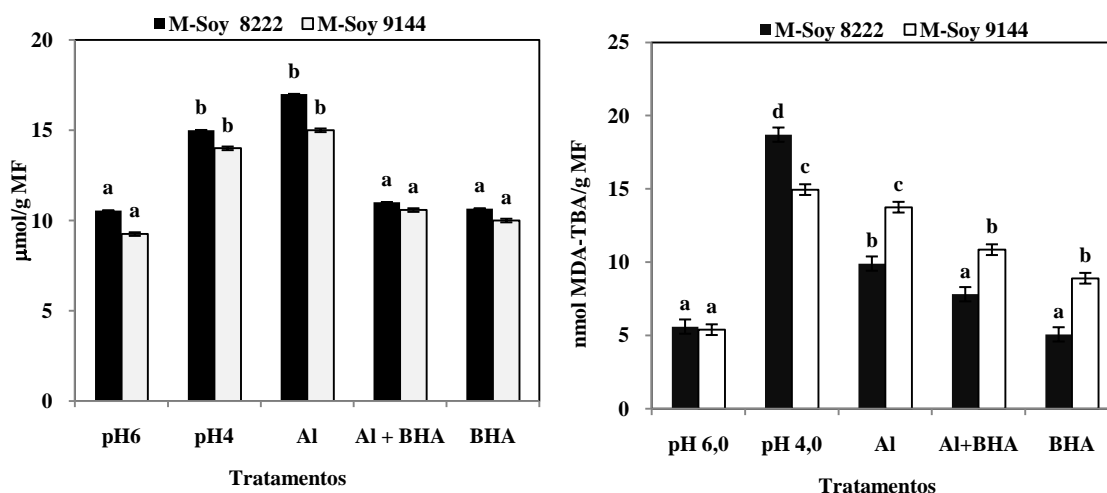


Figura 14. Peróxido de hidrogênio (A) e peroxidação de lipídeos (B) em tecidos de raízes de duas cultivares de soja submetidas a tratamentos de pH (4,0 e 6,0), Al^{+3} (200 μ M) e antioxidante BHA (100 μ M). Letras iguais nas colunas, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Neste trabalho observa-se através da **figura 14B**, que os tratamentos proporcionaram um aumento no conteúdo de peróxido de lipídeos. Este aumento seria resultado dos efeitos do Al^{+3} na membrana (alteração de sua fluidez, permeabilidade, etc.), aumentando sua susceptibilidade à peroxidação (CAKMAK & HORST, 1991). No entanto, também há a hipótese de que a geração de peróxido de lipídeos, medida por Al^{+3} , ocorra devido ao aumento na produção de EROs induzido por esse metal, aliada à redução na capacidade de destoxificação destas espécies (RYYPPO et al., 1998). Neste trabalho a cultivar M-Soy 8222 apresentou-se com maior conteúdo de peróxido de lipídeos. Não houve diferença no conteúdo de peróxido de lipídeos entre as cultivares quando estas estavam em condições de pH 6,0, indicando que o pH 4,0 isoladamente ou combinado com o alumínio pode induzir um aumento indicador de estresse oxidativo.

A peroxidação de lipídeos induzida por alumínio, entretanto, é considerada um evento secundário e posterior à ação do Al^{+3} (YAMAMOTO, et al., 2001), que seria inicialmente, a indução de processos que resultariam na produção de intermediários reativos de oxigênio. A peroxidação lipídica em biomembranas causa danos na estrutura e funcionamento da mesma, alterando sua fluidez, inativando os receptores e as enzimas da membrana e aumentando a permeabilidade a íons como o Ca^{2+} (HALLIWELL & CHIRICO, 1993).

5.4.3. Atividade enzimática

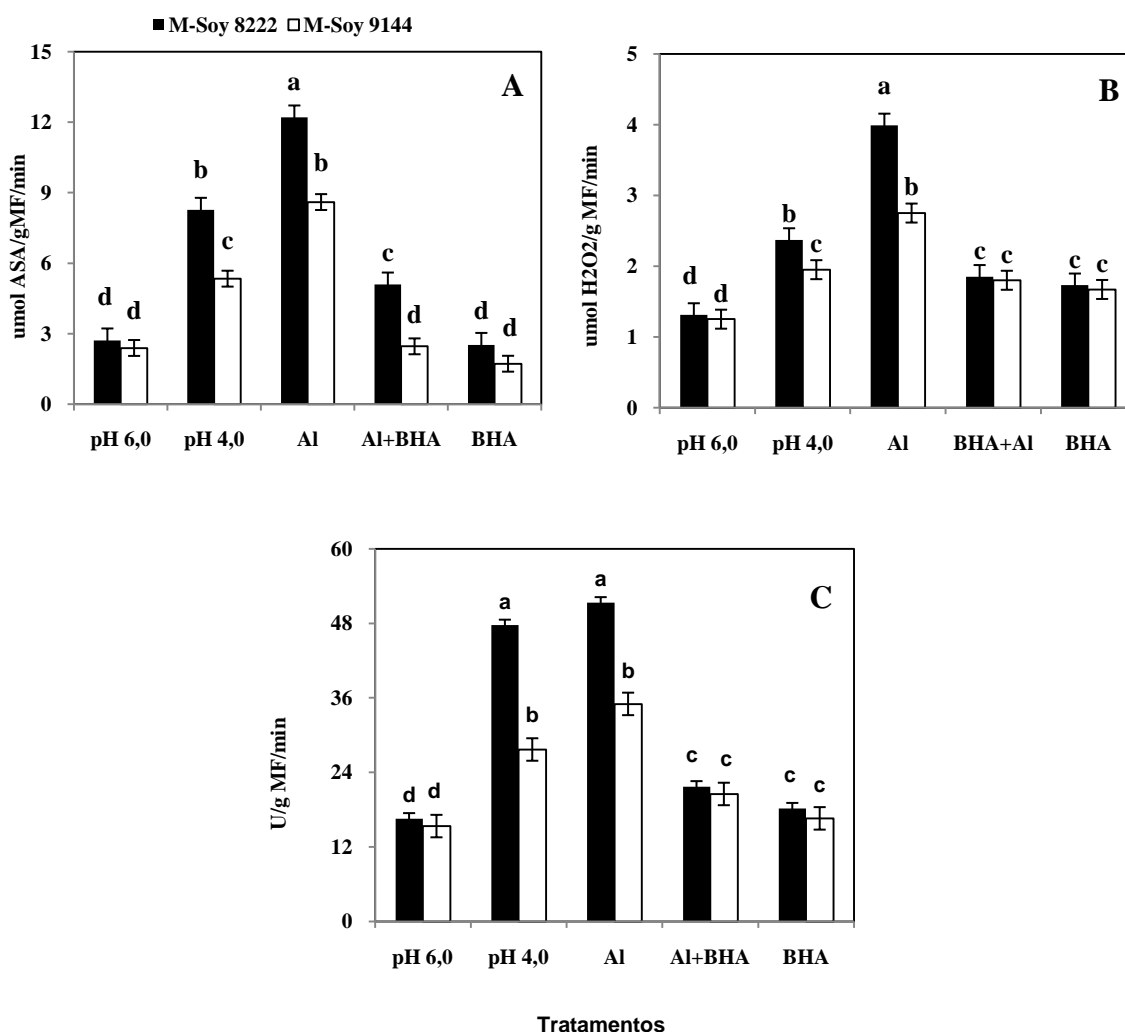


Figura 15. Atividade de APX (A), CAT (B), SOD (C), nos tecidos das raízes de soja de duas cultivares submetidas a tratamentos com pH (4,0 e 6,0), Al³⁺ (200µM) e antioxidante BHA (100µM). Letras iguais nas colunas, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

As enzimas APX, CAT e SOD estão envolvidas diretamente na defesa da planta contra estresse oxidativo. Neste trabalho a atividade de todas as enzimas estudadas aumentou quando as plantas foram submetidas aos tratamentos de alumínio e pH ácido, as plantas da cultivar M-Soy 9144 apresentou uma menor atividade destas enzimas em relação a cultivar M-Soy 8222. Em presença do BHA, as plantas das duas cultivares diminuíram a atividade enzimática, provavelmente o antioxidante atenuou o efeito dos tratamentos desta forma a enzima não atuou como nas plantas submetidas aos demais tratamentos (**Figura 15**).

As duas cultivares estudadas apresentaram atividades similares de APX em condições de pH 6,0 (Figura 6A). Nas plantas tratadas com Al a diferença foi significativa, a cultivar M-Soy 8222, apresentou um aumento de 35,6% em relação a cultivar M-Soy 9144 e quando essas foram tratadas com BHA sofreram uma redução significativa na atividade desta enzima. Na cultivar M-Soy 8222 a redução foi de 38,45% em relação a planta tratada com Al e na cultivara M-Soy 9144 foi de 53,93%, indicando que o antioxidante pode interferir na atividade da enzima. **(Figura 15 A)**

Nas duas cultivares a atividade de CAT aumentou em presença dos tratamentos com alumínio, porém na cultivar M-Soy 8222 essa atividade mostra-se maior em relação cultivar M-Soy 9144 **(Figura 15B)**. Rocha (2006), trabalhando com duas cultivares de milho, uma tolerante e outra sensível, não obteve diferença significativa da atividade desta enzima, dentre as cultivares estudadas, ao contrario de Peixoto (2009), que obteve uma redução na atividade de CAT em raízes de plantas de sorgo, após 10 dias de exposição ao alumínio.

A atividade de SOD foi semelhante à atividade de APX e CAT, havendo um aumento desta atividade em presença de alumínio. Quando as duas cultivares estavam em condições de pH 6,0 a atividade de SOD não apresentou diferença significativa. O tratamento com alumínio, contudo, resultou em uma diminuição de 31,81% na cultivar M-Soy 9144 em relação a cultivar M-Soy 8222 **(Figura 15C)**. Darkó et al., 2004, trabalhando com trigo observou um aumento na atividade de SOD em relação a plantas sensíveis, como o que é mostrado neste trabalho, enquanto que para Peixoto (1999), plantas de sorgo em presença de alumínio aumentavam a atividade da mesma enzima em cultivares tolerantes.

As plantas das duas cultivares tratadas com BHA não obtiveram aumento na atividade das enzimas estudadas. As que estavam sobre tratamento de pH 4,0 se comportaram de forma similar as que foram tratadas com Al tendo a atividade destas enzimas aumentadas.

5.4.4. Concentração de alumínio nas raízes de soja

Os teores de Al nas raízes da cultivar M-Soy 9144 foram menores do que na cultivar M-Soy 8222 demonstrando assim maior resistência a esse íon. As plantas submetidas a pH 4,0 e 6,0 e BHA serviram apenas como controle para aquelas que receberam tratamento de alumínio. Nas duas cultivares o BHA diminuiu o efeito toxico do alumínio. **(Figura 16)**.

Giannakoula et al, (2007), trabalhando com duas linhagens de milho (*Zea mays* L.) com tolerância diferencial ao alumínio, constataram aumento nos teores de alumínio em folhas e raízes com a exposição das plantas a concentrações de Al no meio de cultivo. Após sete dias de exposição ao Al na concentração de 480µM encontraram teores de Al nas raízes cerca de

45 vezes maior na linhagem tolerante e de 65 vezes maior na sensível, em relação ao controle. O acúmulo de Al nas raízes dessas linhagens foi muito mais elevado que o observado neste experimento, demonstrando que o acúmulo de Al nas plantas, especialmente nas raízes, depende não apenas da concentração do Al na solução de cultivo, mas também do tempo de exposição a este elemento.

A maior capacidade das raízes acumularem Al deve-se, provavelmente, a forte interação deste cátion trivalente com várias estruturas no sistema radicular (TAYLOR, 1991), principalmente no apoplasto, rico em cargas negativas (KOCHIAN, 1995).

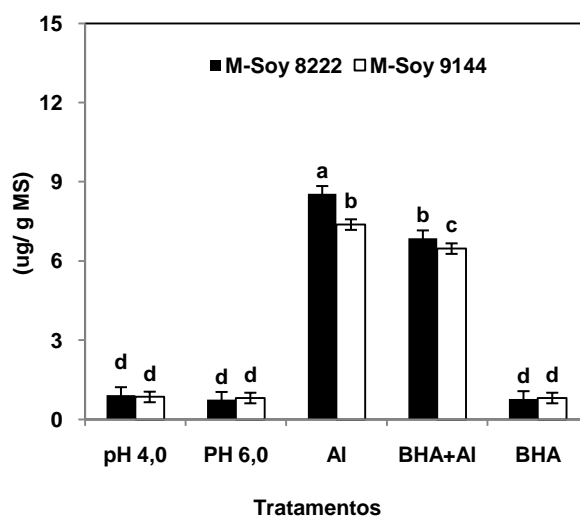


Figura 16. Concentração de alumínio ($\mu\text{g/g MS}$) em raízes de soja, das cultivares M-Soy 8222 e M-Soy 9144. Letras iguais nas colunas, entre os tratamentos, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O acúmulo de Al nas plantas, especialmente nas raízes, depende não apenas da concentração do Al na solução de cultivo, mas também do tempo de exposição a este elemento (ANJOS, 2007). A maior capacidade das raízes acumularem Al deve-se, provavelmente, a forte interação deste cátion trivalente com várias estruturas no sistema radicular (TAYLOR, 1991), principalmente no apoplasto (KOCHIAN, 1995), rico em cargas negativas.

Anjos (2007), trabalhando com dois genótipos de milho, observou que o teor de alumínio nas raízes aumentou com a elevação dos teores de Al (até $200\mu\text{M}$) em solução nutritiva, em um período de 24 horas. Em muitos casos a imobilização do Al na planta tem sido relacionada à sua precipitação na forma de compostos insolúveis, como por exemplo, na forma de fosfato (KOCHIAN, 1995).

6. SINTESE DOS RESULTADOS

- Dosagens a partir de 50 μ M de Al em solução podem causar toxidez em raízes de plantas de soja, porém não é suficiente para causar sintomas visíveis de toxidez na parte aérea em sete dias de exposição ao alumínio;
- 100 μ M de Al⁺³ diminui 18% o comprimento da parte aérea das plantas de soja. Nas raízes essa diminuição é de 31%. Esta mesma concentração diminui 58% da massa seca da parte aérea e 60% nas raízes.
- A parte aérea não apresentou sintomas de toxidez na parte aérea, porém apresentou diminuição no crescimento. Nas raízes os sintomas foram evidentes, apresentando engrossamento e emissão de raízes laterais, além de diminuição no crescimento.
- As cultivares apresentaram comportamento diferencial ao Al⁺³. A cultivar M-Soy 8222 apresentou menor crescimento, peso de matéria seca. Nas raízes apresentou maior dano de membrana na parte aérea e nas raízes;

- A cultivar M-Soy 9144 apresentou maior comprimento na parte aérea e na raiz, maior conteúdo de matéria seca e menor dano de membrana na parte aérea;
- As cultivares que mais apresentaram comportamento contrastante foram as cultivares M-Soy 8222 e M-Soy 9144.
- O alumínio e o pH 4,0 afeta o comprimento radicular das duas cultivares estudadas nos experimentos III e IV, porém na cultivar M-Soy 8222 esse efeito é maior;
- Os efeitos causados pela presença de Al e pH 4,0 em solução foram semelhantes;
- O dano de membrana na cultivar M-Soy 8222 aumenta em presença de Al^{+3} e pH 4,0 e o BHA diminui esse dano. O mesmo ocorre na cultivar M-Soy 9144;
- A peroxidação de lipídeos na cultivar M-Soy 9144 apresenta efeito mais significativo em presença de Al^{+3} . Em presença de pH 4,0 a peroxidação também aumenta, porém em menor proporção. O BHA diminui a peroxidação de lipídeos nos dois tratamentos;
- O conteúdo de proteína solúvel e insolúvel diminui nas duas cultivares em presença de pH 4,0 e Al em todos os tempos. O BHA recupera os efeitos causados por Al e pH 4,0;
- A atividade de APX é maior na cultivar M-Soy 8222 em presença de Al e maior em M-Soy 9144 em presença de pH 4,0;
- A atividade de CAT em M-Soy 9144 é igual nos tratamentos de Al nos tempos de 12 a 48h depois decresce;
- A atividade de SOD na cultivar M-Soy 8222 em presença de Al é menor do que em pH 4,0 até 48h depois a atividade em Al aumenta em M-Soy 9144 a atividade é maior em pH 4,0 em todos os tempos.

- O conteúdo de proteína solúvel e insolúvel diminui na cultivar M-Soy 9144, enquanto que a atividade das enzimas APX, CAT e SOD aumenta em 72 horas de exposição ao alumínio e pH 4,0;
- O uso do antioxidante BHA pode diminuir os efeitos tóxicos do alumínio e de pH 4,0;
- A cultivar M-Soy 8222 acumula mais alumínio em suas raízes do que a cultivar M-Soy 9144.

7. CONCLUSÃO

As cultivares estudadas apresenta comportamento diferencial aos efeitos tóxicos de alumínio, porém efeitos observados apenas nas raízes. A cultivar M-Soy 8222, apresentou um sistema de alívio enzimático mais eficiente do que a cultivar M-Soy 9144, porém para parâmetros com crescimento e dano de membrana, mostrou-se mais afetada. O uso do antioxidante BHA pode diminuir os efeitos tóxicos do alumínio e também os que são causados por pH 4,0. Os efeitos tóxicos causados pelo Al, observados neste trabalho se assemelha aos que foram causados por pH 4,0, porém se faz necessário mais estudos acerca desta observação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU JUNIOR., C.H.; MURAOKA, T. & OLIVEIRA, F.C. **Carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre em solos tratados com composto de lixo urbano**. R. Bras. Ciências do Solo, 26:769-780, 2002.

ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, S.L. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in **plants**. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 372, 1331-1341, 2002.

ANJOS, O. F.; **Exsudação de ácido málico e alongamento radicular em genótipos de milho tratados com níveis tóxicos de alumínio**. Visoça, 2007. 57 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Visoça.

BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. **Environmental and Experimental Botany**, v.48, n.1, 2002.

BEAUCHAMP, C. AND I. FRIDOVICH. **Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels**. Anal. Biochem. 1971. **44**: 276_287

BLUM, A. & EBERCON, A. Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat. **Crop Science**, v. 21 (1): p. 43-47, 1981.

BONATO, C. M. Efeito do alumínio sobre a respiração radicular e mitocondrial em dois cultivares de milho. Tese de doutorado, Universidade Federal de Viçosa, 98 p., 2001.

BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. 817p.

BRADFORD, M. M. A **Rapid And Sensitive Method For The Quantification Of Microgram Quantities Of Protein Utilizing The Principle Of Protein-Dye Binding**. Anal. Biochem. V. 72, P. 246-254. 1976.

BRAY, E.A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists. Pp.1158-1203, 2000.

CAKMAK and W.J. HORST , **Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max.*)**. *Physiol. Plant* **83** (1991), pp. 463–468.

CAMBRAIA, J.; CAMBRAIA, M.C. Avaliação de híbridos de milho quanto à tolerância ao alumínio, em solução nutritiva. **Ceres**, v.42, p.297-307, 1995.

CAMBRAIA, j.; SILVA, M.A.; CANO, M.A.O.; SANT'ANNA, R. Método simples para a avaliação de cultivares de sorgo quanto a tolerância ao alumínio. *Revista de Fisiologia Vegetal*, v. 3, p. 87-95, 1991.

CLARK, J. Characterization of phosphatase of intact maize roots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 23, p. 458-460, 1975.

CAVALCANTI, F. R.; OLIVEIRA, J. T. A.; MARTINS-MIRANDA, A. S.; VIÉGAS, R. A. & SILVEIRA, J. A. G. Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. **New Phytol.**, v. 163, p. 563 – 571. 2004.

DELHAIZE E.; RYAN P.R.; RANDALL P.J. **Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices**. *Plant Physiology*, v.103, n.3, p.695-702, 1993.

DARKÓ, E; AMBRUS, H.; STEFANOVITS-BÁNYAI, E.; FODOR, J.; BAKOS, F.; BARNABÁS, B. Aluminium toxicity, Al tolerance and oxidative stress in an Al-sensitive wheat genotype and in Al-tolerance lines developed by in vitro microspore selection. **Plant Science**, v. 166, p. 583-591, 20004.

DELHAIZE, E., RYAN, P.R. Aluminium toxicity and tolerance in plants. **Plant physiology**, v.107, p.315, 1995.

DIPIERRO, N.; MODELLI, D.; PACIOLLA, C.; BRUNETTI, G.; DIPIERRO, S. Changes in the ascorbato system in the response of pumpkin (*Cucurbita pepo*, L.) roots to aluminum stress. **Journal of Plant Physiology**, 162: 529-536, 2005.

DODGE, C.S., HIATT, A.J. Relationship of pH to ion uptake imbalance by varieties of wheat (*Triticum vulgare*). **Agronomy Journal**, Madison, v.64, p.476-481, 1992.

ECHART, C. L. e CAVALLI-MOLINA, S. Fitotoxicidade do alumínio: efeitos, mecanismo de tolerância e seu controle genético. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.3, p.531-541, 2001.

EMBRAPA. Centro Nacional e Pesquisa em Solos. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Brasília:Embrapa-SPI; Rio de Janeiro: Embrapa-Solos, 2006.306 p

EZAKI, B.; GARDNER, R. C.; EZAKI, Y.; MATSUMOTO, H. Expression of aluminum-induced genes in transgenic Arabidopsis plants can ameliorate aluminum stress and/or oxidative stress. *Plant Physiology*, 122: 657-665, 2000.

FAQUIN, V.; LIMA, D.V.; FURTIN NETO, A.E.; CURI, N.; HIGA, N.T; MORAES, A.R. Nutrição mineral do braquiário e da soja cultivados em Latossolos sob Cerrado da região de Cuiabá-MT. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.29, n.1, p.110-117, 2000.

FRÁGUAS, J.C.; TERSARIOL, A. L. Comportamento de porta-enxertos de videiras em relação a níveis de saturação de alumínio no solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v.28, n.8, p.897-906, ago. 1993.

FRANCHINI, J.C.; MEDA, A.R.; CASSIOLATO, M.E.; MIYAZAWA, M. & PAVAN, M.A. **Potencial de extratos de resíduos vegetais na mobilização do calcário no solo por métodos biológicos**. *Sci. Agric.*, 58:357-360, 2001.

FONSECA JÚNIOR, E. M.; Produção de intermediários reativos de oxigênio em arroz, na presença de alumínio. Tese de mestrado. **Universidade Federal de Viçosa**, 44p, 2007.

GIANNAKOULA, A. et al. Aluminum tolerance in maize is correlated with increased levels of mineral nutrients, carbohydrates and proline, and decreased levels of lipid peroxidation and Al accumulation. **Journal of Plant Physiology**, v.165, p.385-396, 2008.

GIANOPOLITIS, C.N., RIES, S.K.: Superoxide dismutase.Occurrence in higher plants.-*Plant Physiol.* **59**: 309–314, 1977.

GUO, T.R. et al. Physiological changes in barley plants under combined toxicity of aluminum, copper and cadmium. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v.57, n.2, p.182-188, 2007.

HALLIWELL, B., AND S. CHIRICO. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* 1993. 57:715S–725S.

HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A.; ZHU, J. K. & BOHNERT, H. J. Plant Cellular and Molecular Responses to High Salinity. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**, v. 51, p. 463-499, 2000.

HAVIR, E.A.; MCHALE, N.A. **Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves**. *Physiologia Plantarum*, v.84, p.450-455, 1987.

HAYNES, R.J.; MOKOLOBATE, M.S. **Amelioration of Al toxicity and P deficiency in acid soils by additions of organic residues: a critical review of the phenomenon and the mechanisms involved**. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, Dordrecht, v.59, p.47-63, 2001.

JONES, D.L. Organic acids in the rhizosphere – a critical review. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.205, p.25-44, 1998.

JONES, D.L.; KOCHIAN, L.V. **Aluminum inhibition of the inositol 1,4,5-triphosphate signal transduction pathway in wheat roots: a role in aluminum toxicity.** *Plant Cell*, v.7, p.1913-1922, 1995.

KOCHIAN, L.V. **Cellular mechanisms of aluminium toxicity and resistance in plants.** *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v.46, p.237-260, 1995.

KOCHIAN, L.V.; HOEKENGA, O.A. & PIÑEROS, M.A. **How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency.** *Ann. Rev. Plant Biol.*, 55:459-493, 2004.

LAMB, C., DIXON, A. **The oxidative burst in plant disease resistance.** *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, MA, J. F. et al. Isolation and characterization of a rice mutant hypersensitive to Al. *Plant Cell Phys.*, v.46, n.7, p. 1054-1061, 1997.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, A.S. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações.** Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato. 1989. 201p.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. de. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações.** 2.ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997.

MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. **Academic Press.** New York, 2 ed. p. 889, 1995.

MASCARENHAS, H. A.A.; CAMARGO, C. E. O.; FALIVENE, S. M. P. Tolerância de cultivares de soja a dois níveis de alumínio em soluções nutritivas em diferentes concentrações salinas. *Bragantia*, v. 43, p. 459-466, 1984.

MATSUMOTO, H. **Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants.** *International Review Cytology*, San Diego, v.200, p.1-46, 2000.

MERIGA, B; REDDY, K.; RAO, K.R.; REDDY, L. A.; KISHOR, P. B. K. Aluminum-induced production of oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA damage in seedlings of rice (*Oryza sativa*). *Journal of Plant Physiology*, 161: 63-68. 2004.

MITTLER, R. **Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance.** *Trends in Plant Science*, v. 7, 405-410, 2002.

MITTLER, R. VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; VAN BREUSEGEM, F. **The reactive oxygen gene network of plants.** *Trends in Plant Science*, v.9, p.490-498, 2004.

MIZUNO, M., KAMEI, M., TSUCHIDA, H. Ascorbate peroxidases and catalase cooperate for protection against hydrogen peroxide generated in potato tubers during low-temperature storage. *Biochemistry Molecular Biology International*, 44: 717-725, 1998.

NAKANO, Y.; ASADA, K. **hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidases in spinach chloroplast.** *Plant Cell Physiology*, v. 22, p. 867 - 880, 1981.

OLIVEIRA, P.H. de. **Herança genética e mapeamento molecular da tolerância à toxicidade do alumínio em Aveia (*Avena sativa* L.)**. Porto Alegre, 2002. 102f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Setor de Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

PARIDA, A.K.; DAS, A.B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60, p. 324-349, 2005.

PASTORI, G.M.; FOYER, C.H. **Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of "redox" and abscisic acid-mediated controls**. *Plant Physiology*, v.129, p.460-468, 2002.

PEIXOTO, P. H. P.; CAMBRAIA, J.; MOSQUIM, P. R.; MOREIRA, M. A. Aluminum effects on fatty acid composition and lipid peroxidation of a purified plasma membrane fraction of root apices of two sorghum cultivars. *Journal of Plant Nutrition*, 24: 1061-1070, 2001.

PEIXOTO, P.H.P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANNA, R.; MOSQUIM, P.R.; MOREIRA, M.A. **Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum**. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Brasília, v. 11, n. 3, p. 137-143, 1999.

PELLET, D.M.; GRUNES, D.L.; KOCHIAN, L.V. **Organic acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.)**. *Planta*, v.196, n.4, p.788-795, 1995.

RENGEL, Z. & ZHANG, W.H. **Role of dynamics of intracellular calcium in aluminum-toxicity syndrome**. *New Phytol.*, 159:295-314, 2003.

RICHARDS, D. K., SCHOTT, E. J., SHARMA, Y. K., DAVIS, K., GARDNER, R. C. **Aluminum induces roots**. *J. Agric. Food Chem.*, 23:458-460, 1975.

RYYPPO A, IIVONEN S, RIKALA R, SUTINEN ML, VAPAAVUORI E. **Responses of Scots pine seedlings to low root zone temperature in spring**. *Physiologia Plantarum* **102**, 503–512, 1998.

SHALATA, A., Tal, M.: **The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii***.- *Physiol. Plant.* **104**: 169–174, 1998

SILVA, I. R. et al. Aluminum accumulation at nuclei of cells in the root tip. Fluorescence detection using lumogallion and confocal laser scanning microscopy. **Plant Physiology**, Rockville, v.123, n.2, p.543-552, 2000.

SILVEIRA, J.A.G.; VIÉGAS, R.A.; ROCHA, I.M.A.; MOREIRA, A.C.O.M.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A. Proline accumulation and glutamine synthetase activity are increased by salt induced proteolysis in cashew leaves. **Journal of Plant Physiology**, v. 160, p. 115-123, 2003.

SIVAGURU, M.; BALUSKA, F.; VULKMANN, D.; FELLE, H. H.; HORST, W. J. **Impacts of aluminum on the cytoskeleton of maize root apex: short-term effects on the distal part of the transition zone.** *Plant Physiology*, Rockville, v.119, n.3, p.1073-1082, 1999.

STORI, G.M.; TRIPPI, V.S. **Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought.** *Plant Cell Physiology*, v.34, p.1023-1028, 1993.

STROBEL, B.J. et al. **Low molecular weight aliphatic acids in soil solution under different vegetations determined by capillary zone electrophoresis.** *Plant and Soil*, Dordrecht, v.212, p.115-121, 1999.

TAMÁS, L.; SIMONOVICOVÁ, M.; HUTTOVÁ, J. MISTRÍK, I. Aluminum stimulated hydrogen peroxide production of germinating barley seeds. **Environmental and Experimental Botany**, 51: 281-288, 2004.

TAYLOR, G. J. et al. Direct measurement of aluminum uptake and distribution in single cells of *Chara corallina*. **Plant Physiology**, Rockville, v.123, n.3, p.987-996, 2000.

TAYLOR, G.J. Current views of the aluminum stress response: the physiological basis of tolerance. In: RANDALL, D.D.; BLEVINS, D.G.; MILES, C.D. (ed.). **Current topics in plant biochemistry and physiology**. Columbia: University of Missouri, 1991. v.10, p.57-93.

TESTER, M.; DAVENPORT, R. Na⁺ Tolerance and Na⁺ Transport in Higher Plants. **Annals of Botany**, v. 91, p. 503-527, 2003.

VITORELLO, V.A. et al. Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v.17, n.1, p.129-143, 2005.

VON UEXKÜLL, H.R.; MUTERT, E. **Global extent, development and economic impact of acid soils.** *Plant and Soil*, v.171, p.1-15, 1995

WENZL, P.; CHAVES, A. L.; PATIÑO, G. M.; MAYER, J. E.; RAO, I. M. **Aluminum stress stimulates the accumulation of organic acids in root apices of Brachiaria species.** *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, Weinheim, v.165, n.5, p.582-588, 2002.

YAMAMOTO, Y., KOBAYASHI, Y., MATSUMOTO, H. **Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots.** *Plant Physiology*, 125: 199-208, 2001.

XIONG, L. e ZHU, J. K. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. **Plant Cell Environment**, v. 25, n. 2, p. 131-139. 2002.

ANEXOS



Figura 1. Plântulas de soja da cultivar M-Soy 8222 com 7 dias após sementeira (DAS). Experimento I.



Figura 2. Plântulas de soja da cultivar M-Soy 8222, após a transferência para solução nutritiva no experimento I.



Figura 3. Visão geral das plantas da cultivar M-Soy 8222 no experimento I.

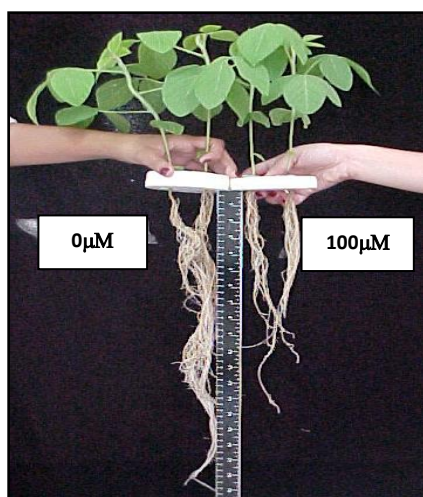


Figura 4. Cultivar M-Soy 8222 apresentando menor comprimento de raiz em plantas tratadas com $100\mu\text{M Al}^{+3}$. Experimento I.



Figura 5. Visão geral do experimento II. Ausência de sintomas de toxidez de alumínio devido ao curto período de exposição ao íon.

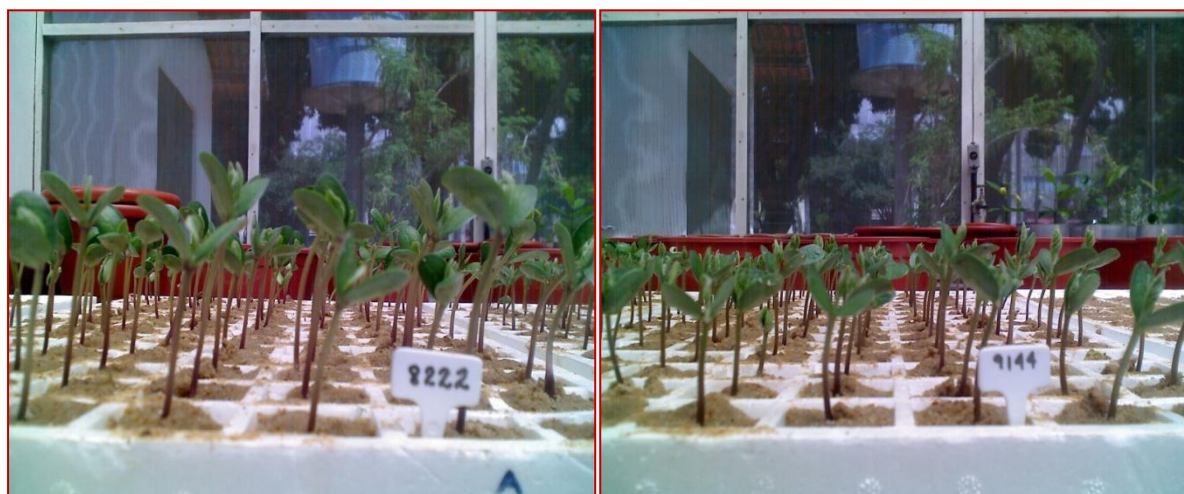


Figura 6. Plantas das cultivares M-Soy 8222 e M-Soy 9144. Experimento III.

Tabela 1. Característica das cultivares de soja utilizada neste estudo.

CARACTERÍSTICAS DAS CULTIVARES					
Características botânicas e agronômicas	M-Soy 8222	M-SOY 8866	M-Soy 9144	FT-106	M-Soy 9350
Cor da flor	Roxa	Branca	Roxa	Roxa	Branca
Cor da Pubescencia	Marrom	Marrom	Marrom	Cinza	Cinza
Cor do hilo	Preto	Preto	Marrom	Preto imperfeito	Marrom claro
Hábito de crescimento	Determinado	Determinado	Determinado	Determinado	Determinado
Inserção de vagens	X	13	14 ** cm	15 cm**	x
Acamamento	Resistente	Moderadamente resistente	Moderadamente resistente	Moderada resistência	x
Ciclo em dias**	105-112	115-120 dias	118-130	125-135	x
Grupo de maturação	8.2	8.8	9.0	9.3	9.1
Principais doenças					
Cancro da haste	R	R	R	R	x
Mancha olho de rã	R	R	R	R	x
Pústula bacteriana	R	R	R	R	x
Mancha alvo	MR	R	MS	MS	x
Crestamento bacteriano	MR	MR	R	MR	x
Vírus da necrose da haste	R	R	R	R	x
Oídio	MR	MR	MS	MR	x
Doenças de final de ciclo	MS	MR	MR	MS	x
Regiões de adaptação	MT, MG, GO e BA	MA, PI, TO, BA e Norte do MT	MA, PI, TO, BA e Norte do MT	MA, PI, TO, BA e Norte do MT	MT, MS, GO, DF e BA

Fonte: Monsanto® Agroindústria

** depende do local: época de plantio, altitude, etc.

X: Informação não encontrada

R: Resistente

MR: Moderadamente resistente

MS: Moderadamente suscetível

S: susceptível