
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA VEGETAL)**

**O MEIO DE CULTURA SÓLIDO DIMINUI A EXSUDAÇÃO DE ÁCIDOS
ORGÂNICOS EM RAÍZES DE PLANTAS EXPOSTAS AO ALUMÍNIO EM
RELAÇÃO À SOLUÇÃO NUTRITIVA?**

MARCELA PAULA SILVA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Vegetal).

Junho - 2019

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA VEGETAL)**

**O MEIO DE CULTURA SÓLIDO DIMINUI A EXSUDAÇÃO DE ÁCIDOS
ORGÂNICOS EM RAÍZES DE PLANTAS EXPOSTAS AO ALUMÍNIO EM
RELAÇÃO À SOLUÇÃO NUTRITIVA?**

MARCELA PAULA SILVA

ORIENTADOR: PROF. DR. GUSTAVO HABERMANN

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Vegetal).

Junho - 2019

S586m Silva, Marcela Paula
O Meio de Cultura Sólido Diminui a Exsudação de Ácidos Orgânicos em Raízes de Plantas Expostas ao Alumínio em Relação à Solução Nutritiva? / Marcela Paula Silva. -- Rio Claro, 2019
49 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientador: Gustavo Habermann

1. Alumínio. 2. GC-MS. 3. Trigo. 4. Ácidos orgânicos. 5. PCA.
I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

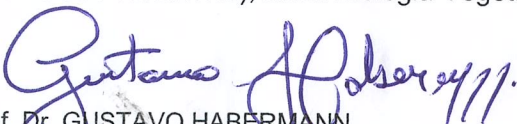
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: **O meio de cultura sólido diminui a exsudação de ácidos orgânicos em raízes de plantas expostas ao alumínio em relação à solução nutritiva?**

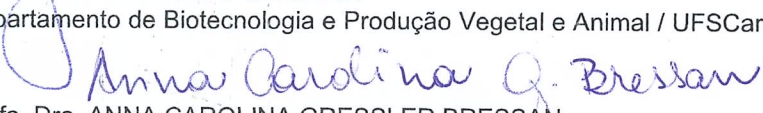
AUTORA: MARCELA PAULA SILVA

ORIENTADOR: GUSTAVO HABERMANN

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA VEGETAL), área: Biologia Vegetal pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. GUSTAVO HABERMANN
Departamento de Botânica / UNESP - Instituto de Biociências de Rio Claro - SP


Prof. Dr. JEAN CARLOS CARDOSO
Departamento de Biotecnologia e Produção Vegetal e Animal / UFSCar - Universidade Federal de São Carlos / SP


Profa. Dra. ANNA CAROLINA GRESSLER BRESSAN
Pós Doutorado do Departamento de Botânica / UNESP - Instituto de Biociências de Rio Claro - SP

Rio Claro, 29 de julho de 2019

“Cada um contribua segundo propôs em seu coração; não com tristeza, nem por obrigação; porque Deus ama quem dá com alegria.”

2 Coríntios 9:7

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado a vida e essa oportunidade de concluir a pós-graduação. Sou muito grata aos meus amigos por terem me ajudado e apoiado durante esse caminho, por terem dado forças para lutar e conseguir finalizar esta etapa da minha vida. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Gustavo Habermann pela oportunidade. Sou grata ao Prof. Doutor Osmar Malaspina, pelo apoio e confiança pela oportunidade de desenvolver atividades em seu laboratório de cromatografia. Agradeço ao meu amigo Sebastião Zanão Filho pela ajuda no laboratório, por passar grandes ensinamentos, pelo seu companheirismo e amizade. Agradeço a Necis Miranda não só pela sua amizade, mas também pela ajuda e conselhos. Agradeço também ao Prof. Dr. Jose Silvio Govone, Milene Ferro e Erick Aceiro pela ajuda estatística e aos demais colegas do CEIS que de uma maneira ou de outra contribuíram para meu aprimoramento como profissional e pessoa.

Agradeço a minha mãe e meu pai que me apoiaram em toda essa etapa do curso, que esteve ao meu lado ajudando, dando forças para continuar e agradeço aos meus companheiros Ato e Yasmim, que considero muito, por estarem sempre ao meu lado ajudando nos momentos difíceis, aconselhando e até mesmo corrigindo quando preciso. Se não fosse pelo seu companheirismo e amizade eu não estaria onde estou. Mostrou-me e ensinou muito da vida, e todos os ensinamentos e aprendizados que tive serão eternos.

Obrigado a todos os amigos e companheiros que fazem parte da minha vida. Vocês são muito caros para mim.

SUMÁRIO	
RESUMO	4
ABSTRACT	5
1. INTRODUÇÃO	6
2. MATERIAIS E MÉTODOS	11
Material vegetal e condições experimentais	11
Ácidos Orgânicos	13
Análise dos dados	13
3. RESULTADOS	16
4. DISCUSSÃO	38
5. CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS	41
ANEXO I	47

O MEIO DE CULTURA SÓLIDO DIMINUI A EXSUDAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS EM RAÍZES DE PLANTAS EXPOSTAS AO ALUMÍNIO EM RELAÇÃO À SOLUÇÃO NUTRITIVA?

Resumo

O alumínio (Al) é um dos componentes mais abundantes da crosta terrestre e é tóxico à maioria das plantas, sendo o seu primeiro sintoma de toxicidade a redução no crescimento radicular. Algumas plantas desenvolveram mecanismos para tolerar a presença do Al por meio da formação de complexos de ácidos orgânicos (AOs) com Al, internamente (no simplasto da folha ou das raízes) ou fora da raiz (apoplasto da raiz ou rizosfera). Neste trabalho, plantas de *Triticum aestivum* L. (Poaceae) (trigo) de cultivar sensível ao Al (ANAHUC75) e tolerante ao Al (JAC5) foram cultivadas em diferentes concentrações de Al, variando o estado físico do meio, sendo estes sólido e líquido. Foram encontrados o ácido oxálico e succínico exsudados pelas raízes e acumulados no meio de cultura. Estes foram qualificados e quantificados por Cromatografia Gasosa por Espectrofotometria de Massas (GC-MS) e analisados por métodos estatísticos (ANOVA, teste de Kruskal-Wallis e PCA). Assim, foi possível verificar que o estado físico do meio de cultura gera diferenças significativas nas concentrações de exsudados pela raiz quando cultivadas nas mesmas concentrações de Al, visto que para o ácido succínico em ambas as cultivares e em todos os tratamentos e o ácido oxálico na cultivar tolerante apresentaram disparidade em relação aos teores exsudados.

Palavras-chave: 1. Alumínio. 2. GC-MS. 3. Trigo. 4. Ácidos orgânicos. 5. PCA.

DOES SOLID CULTURE MEDIUM DECREASE THE EXSUDATION OF ORGANIC ACIDS IN ROOTS OF PLANTS EXPOSED TO ALUMINUM IN RELATION TO NUTRIENT SOLUTION?

Abstract

Aluminum (Al) is one of the most abundant elements of the Earth's crust and it is toxic to most plants, being the reduction of root growth its first toxicity symptom. Some plants have developed mechanisms to tolerate Al through the formation of organic acid complexes (AOs) with Al. This occurs internally (in the root or leaf symplast) or outside the root environment (root apoplast or even in the rhizosphere). Here, *Triticum aestivum* L. (Poaceae) (wheat) plants of an Al-sensitive cultivar (ANAHUC75) and an Al-tolerant cultivar (JAC5) were cultivated at different concentrations of Al, varying the physical state of the medium, being solid and liquid. Oxalic and succinic acid were exuded by the roots and accumulated in the culture medium. These were qualified and quantified by Mass Spectrophotometric Gas Chromatography (GC-MS) and analyzed by statistical methods (ANOVA, Kruskal-Wallis test and PCA). Thus, it was possible to verify that the physical state of the culture medium generates significant differences in the concentrations of root exudates when cultivated at the same Al concentrations, since for succinic acid in both cultivars and in all treatments and oxalic acid in tolerant cultivar presented disparity in relation to the exudate contents.

Key words: 1. Aluminum. 2. GC-MS. 3. Wheat 4. Organic acids. 5. PCA.

1. Introdução

O trigo (*Triticum* sp.) é uma das espécies agrícolas mais antigas, apresentando o seu processo de domesticação há cerca 10.000 anos, o qual deverá ter acontecido na zona do Crescente Fértil (região que compreende essencialmente o Iraque e a antiga Mesopotâmia) e poderá ter ocorrido em paralelo com a domesticação de outros cereais, nomeadamente da cevada (Peleg Z., et al, 2011).

De acordo com Shewry 2009, atualmente o trigo é o terceiro cereal mais produzido em todo o mundo, sendo ultrapassado apenas pelo arroz e milho. Apesar disso, tem a vantagem de poder ser cultivado numa região muito mais vasta do que as cultivares de milho e arroz, pois apresenta inúmeras variedades (cerca de 25.000) que se adaptaram às condições agroecológicas específicas de onde são cultivadas.

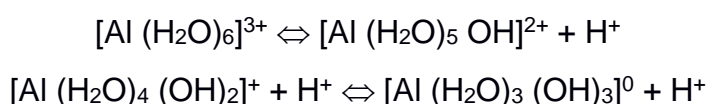
No entanto, a acidez dos solos é um dos principais obstáculos ao cultivo e produção do trigo, aproximadamente 50% dos solos agricultáveis no mundo são ácidos (pH < 5,0), impactando a produtividade agrícola (Kochian et al., 2004; Sujatha & Mehar, 2015), e 60% dos solos na América do Sul têm pH < 4,0 (von Uexküll & Mutert, 1995). Visto isso, uma das formas de corrigir a acidez do solo é através da aplicação de calcário agrícola ($\text{CaCO}_3 + \text{MgCO}_3$), porém, muitas vezes não é uma opção economicamente viável devido aos custos, além de corrigir apenas camadas superficiais, não sendo eficaz na correção da acidez do subsolo, devido à baixa mobilidade dos componentes solúveis do calcário aplicado na superfície do solo (Hartwig, Irineu et al, 2007).

Os solos ácidos podem apresentar diversas origens, incluindo os naturais, como por exemplo os solos de origem vulcânica, ou antropológicas, em resultado da poluição causada pela queima de combustíveis fósseis (Yang Y, et al, 2012). Nos solos, o alumínio encontra-se normalmente sobre a forma de óxidos ou alumino-silicatos, não estando biodisponível para as plantas. Estes solos podem sofrer processos de acidificação, que solubilizam e tornam biodisponível o alumínio, transformando-o na sua forma catiônica (Al^{3+}) (Ma JF et al., 2001)

O metal existe de forma mais abundante nos estados 2^+ e 3^+ , apresentando assim alta afinidade à ânions e grupos iônicos, como o flúor (F^-) e o

grupo hidroxila (OH⁻), respectivamente (Mossor-Pietraszewska, 2001). Outros grupos com afinidade ao Al para formação de ligações complexas são a carboxila, carbonila e o fosfato (Vitorello et al., 2005). A forma iônica do Al (Al³⁺) é geralmente muito solúvel em pH ácido e considerada a mais tóxica para plantas (Gupta et al., 2013), mesmo em concentrações micromolares (Ma et al., 2001; Silva, 2012). A acidez potencial devido ao Al trocável é observada em pH ≤ 5,5. Em solos com pH acima de 5,5, o Al encontra-se em formas precipitadas (Jones, 1979; Bohnen, 1995) com a solubilidade do Al³⁺ consideravelmente baixa.

Tudo isso ocorre porque o Al apresenta uma massa molecular relativamente baixa (27g/mol) e opera um campo magnético forte de três cargas positivas. Além disso, em solos tropicais e subtropicais úmidos, com altas precipitações pluviométricas, nutrientes solúveis como cálcio, magnésio, potássio e outros elementos básicos são lixiviados. A remoção de cátions básicos e a degradação da matéria orgânica reduzem o pH do solo. Em pH baixo, o hidrogênio (H⁺) atua sobre os minerais liberando íons Al³⁺, retidos pelas cargas negativas das partículas de argila do solo. Sendo assim, é possível visualizar a sequência de reações de hidrolises que ocorrem nos compostos de argila no ciclo da argila de acordo com Malavolta.



Portanto, em presença de bases, o Al³⁺ é gerador de prótons. Logo, estando na solução do solo o Al³⁺ é causa de acidez (porque libera H⁺). Porém o Al³⁺ também pode ser considerado consequência da acidez do solo, uma vez que o H⁺ pode digerir o mineral de argila e liberar outro átomo de Al, reiniciando o ciclo (Malavolta, 1980). Logo, quanto mais baixo o pH, maior a tendência da presença de Al com carga positiva e quando o pH do solo se encontra entre 5 e 7,0, maior é sua tendência de apresentar carga zero, que não provoca reações de toxicidade às plantas.

Em plantas, são vários os sintomas das injúrias causadas pelo Al³⁺. Em algumas espécies os sintomas nas folhas são semelhantes a sintomas de

deficiência de P^{2+} , em outras, semelhantes à deficiência de Ca^{2+} ou de Fe^{3+} . O sintoma mais perceptível de toxicidade ao Al^{3+} é a inibição do crescimento das raízes (Barcelo & Poschenrieder, 2002; Horst et al., 2010). Estes sintomas já foram observados em plantas herbáceas, como o feijoeiro caupi (*Vigna unguiculata*) (Kopittke et al., 2008) e arbóreas (Brunner & Sperisen, 2013), incluindo o gênero *Citrus* (Nogueira et al., 1989; Santos et al., 1999; Pereira et al., 2003).

Levando em conta o fato de o Al ser muito reativo, o seu íon Al^{3+} pode se ligar às cargas negativas da parede celular (apoplasto) (Kopittke et al., 2015) das células da raiz. Além disso, o Al prejudica o citoesqueleto, a membrana plasmática e o núcleo das células (Kochian et al., 2004). Entretanto, a maior associação do Al com a raiz ocorre no apoplasto, em que uma pequena fração do Al rapidamente entra e interage no simplasto (Silva, et al., 2000; Taylor et al., 2000). O Al interage com as vias de transdução de sinais, em especial os relacionados com a homeostase e transporte do cálcio (Ca^{2+}), podendo alterar os níveis de Ca^{2+} (Zhang; Rengel, 1999), e pode interagir e inibir a enzima fosfolipase C associada às vias de transporte do Ca (Jones; Kochian, 1995).

Muitos estudos associaram a exsudação radicular à mobilização de nutrientes no solo (Canarini et al., 2019). No entanto, o mecanismo pelo qual o Al^{3+} interfere com o influxo de íons em plantas não é conhecido. Mas mostrou-se interações com a absorção de muitos ânions e cátions (Nunes-Nesi et al., 2014). O Al^{3+} tem interferido negativamente na absorção de minerais catiônicos, enquanto aumenta a absorção de íons minerais aniônicos.

As pesquisas distinguem os mecanismos de tolerância ao Al em duas classes principais, em que um grupo é formado pelos processos de exclusão, que atuam no sentido de impedir a entrada do Al pela raiz e grupos que permitem a planta acumular o Al em locais específicos da sua estrutura como vacúolos e apoplasto (Kochian et al., 2004). Algumas plantas desenvolveram formas de tolerar a toxicidade ao Al por meio da formação de complexos estáveis de ácidos orgânicos (AOs) (Ma et al., 2001).

Os AOs nas plantas são produzidos a partir do ciclo de Krebs e não só atuam no processo de tolerância à toxicidade aos metais como também são intermediários no metabolismo do carbono. Entretanto, continua sem saber como a

exsudação dos AOs pela planta é controlada e como exatamente e sob quais circunstâncias as plantas se beneficiam deste processo (Canarini et al, 2019).

Outra forma pela qual as plantas podem atingir a tolerância ao Al^{3+} é por meio da alcalinização da rizosfera (Degenhardt et al., 1998). Isso ocorre devido a liberação de ânions de AOs pelas raízes, resultando em alcalinização da rizosfera por meio de canais de ânions ativados por Al na membrana plasmática (Ma et al., 2001), complexação de Al^{3+} com ácidos orgânicos e posterior desintoxicação de Al (Panda e Matsumoto, 2007). Esse mecanismo ocorre, por exemplo, em plantas de trigo (*Triticum aestivum*) e milho (*Zea mays*) (Ma et al., 2001). A superexpressão do citrato também está correlacionada positivamente com a tolerância ao alumínio em tabaco (*Nicotiana tabacum*) transgênico e papaia (*Carica papaya*) (De la Fuente et al., 1997).

O citrato, o oxalato e o malato são alguns dos ânions de AOs comumente liberados que podem formar complexos suficientemente fortes com o Al^{3+} . O malato é liberado das raízes de cultivares de trigo tolerantes ao Al^{3+} (Delhaize, et al.,1993); citrato, de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*) tolerantes ao Al^{3+} (Miyasaka, et al., 1991), milho (*Zea mays*) (Pellet, et al., 1995), *Cassia tora* (Ma, et al.,1997) e soja (*Glycine max*) (Yang, et al., 2000) e o oxalato, de trigo mourisco (*Fagopyrum esculentum*) (Ma, et al., 1997) e taro (*Colocasia esculenta*) (Ma, Miyasaka, 1998). Algumas espécies de plantas, como triticales tolerante a Al (*Triticosecale wittmack*), colza (*Brassica napus*), aveia (*Avena sativa*), rabanete (*Raphanus sativus*) e centeio (*Secale cereale*) exsudam tanto malato quanto citrato (Ma, et al, 2000.; Li, et al.,2000).

As plantas que apresentam como resposta a desintoxicação de Al na rizosfera contêm AOs que são transportados do citosol para o apoplasto. No pH quase neutro do citosol, os AOs são quase totalmente dissociados de seus prótons e passam a ânions do AOs correspondente. São esses ânions de AOs que provavelmente são exsudados para o apoplasto da raiz. Embora muitos tipos de AOs sejam encontrados nas células da raiz, apenas um ou dois AO específico são secretados em resposta ao Al^{3+} para qualquer espécie (Ma, 2000; Pellet et al., 1995).

Dentre as diversas pesquisas realizadas para compreender o mecanismo de exsudação dos AOs em resposta à tolerância ao Al são realizados em solução nutritiva líquida. Delhaize (1993) demonstrou a resistência de genótipos de

trigo tolerantes e sensíveis ao Al usando solução nutritiva líquida. Isso pode indicar que esses genótipos testados em solução nutritiva devem ter não apenas a exsudação de AOs como mecanismo de resistência. Em meio sólido (solo ou gel/meio de cultura sólido) as reações de troca entre a rizosfera e o meio poderiam ser mais lentas ou estáveis, visto que este processo está correlacionado com o fenômeno físico-químico da difusão (Canarini et al 2019).

Para compor o meio sólido, a agarose, que é a fração gelificante do ágar, é uma molécula linear neutra essencialmente isenta de sulfatos, consistindo em cadeias de unidades alternadas repetidas de D-galactose β -1,3 e de 3,6-anidro-L ligado a α -1,4 -galactose (NCBI). Esse composto apresenta um peso molecular de 336,33 g/mol do monômero e um raio de superfície de 127 Å² (NCBI), que estruturalmente formará poros suficientes para permear as substâncias dissolvidas no meio e criar um gradiente de difusão estruturalmente estável e bem definido, tanto é que por essa característica, o ágar é utilizado como substância gelificante para separação de proteínas nas eletroforeses horizontais e processos de cromatografia por afinidade (Palma, M. S. 2010).

Com base nos processos de trocas, recentemente, Canarini et al 2019, propôs uma nova estrutura conceitual para exsudatos radiculares. Esta estrutura é elaborada com base em dois conceitos principais, tendo em vista que o primeiro está relacionado à exsudação radicular dos metabólitos primários sendo impulsionada pela difusão, com plantas e micróbios tanto modulando os gradientes de concentração quanto, portanto, as taxas de difusão para o solo, dependendo de seu estado nutricional; e o segundo conceito baseando-se nas concentrações de metabólitos exsudados que podem ser detectadas na ponta da raiz e os sinais são traduzidos para modificar a arquitetura da raiz.

As plantas podem modificar a concentração dos metabólitos controlando os processos de fonte/dreno ou expressando e regulando os canais de efluxo, desafiando, portanto, a ideia de exsudação radicular como um processo passivo puramente não regulado (Canarini et al 2019). Através do fluxo de exsudato radicular, elas podem aumentar localmente as concentrações de muitos metabólitos comuns, que podem servir como sensores e integradores do estado nutricional da planta, da disponibilidade de nutrientes no ambiente circundante bem como das diferenças estruturais do solo (Canarini et al 2019).

Tendo em vista tudo isso, o objetivo e hipótese deste trabalho seria que existe disparidade na exsudação de AOs (provocado pela adição de Al) tendo como diferença a consistência do meio de cultura. Para tal, seria importante analisar os exsudatos das duas culturas, na presença ou ausência de alumínio, e analisar e identificar os seus exsudatos, especificamente com relação à presença de ácidos orgânicos e outros possíveis compostos. Sendo assim os tipos de exsudatos radiculares irão, em última instância, melhorar nossos conhecimentos sobre os processos que determinam a exsudação dos AOs bem como a sua interação com os diferentes estados físicos da solução nutritiva.

2. Materiais e Métodos

Material vegetal e condições experimentais

Foram utilizadas sementes de trigo (*Triticum aestivum*) das cultivares tolerantes - JAC 5 (116575) - e sensíveis - ANAHUC 75 (116509) – ao Al, fornecidas pela Embrapa Trigo (Passo Fundo, RS). As sementes foram colocadas para germinar sobre papel absorvente umedecido com água dentro de germboxes e mantidas à temperatura constante de 25 °C e foto período de 24 h, fornecido por luz fluorescente ($80 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em estufa incubadora tipo BOD. Depois de germinadas, adicionou-se fungicida do grupo químico Carboxina/Tiram em dosagem usual para sementes de trigo em plantio de campo, deixando agir por 24h. Após este período, as plantulas foram transferidas para tubos de ensaio de vidro (25 cm de comprimento x 3 cm de diâmetro) com os meios de cultura sólido e líquido, sendo o meio de cultura líquido oxigenado com bomba aeradora externa em um período de 4 horas/dia.

Utilizou-se a solução nutritiva básica proposta por [Delhaize et al. \(2004\)](#) para a composição química do meio sólido (ágar) e líquido (solução) com as seguintes

concentrações de Al^{+3} (μM): 0, 5, 10 e 30 como mostra no esquema da figura 01.

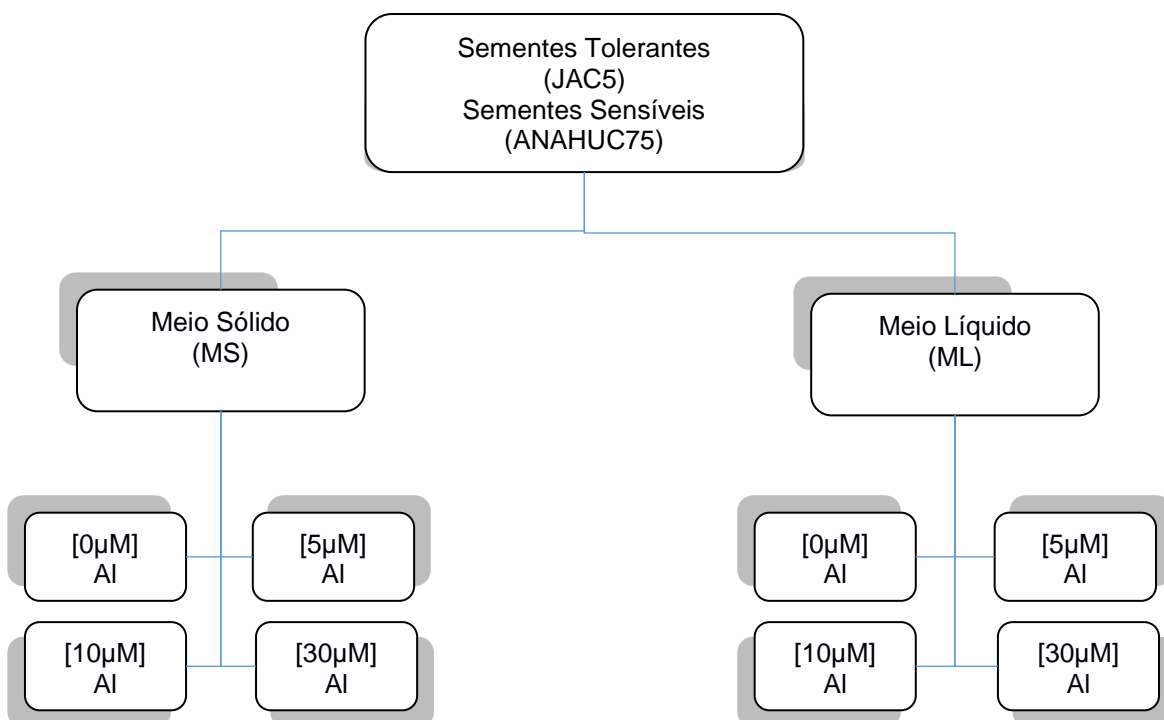


Figura 1: Esquema referente à ordenação do experimento para sementes tolerantes.

Estas concentrações de Al^{+3} foram estabelecidas por testes preliminares em laboratório, tendo como base os estudos de [Delhaize et al. \(1993\)](#) e [Ryan et al. \(1995\)](#) e [Delhaize et al. \(2004\)](#) como causadoras de diminuição do crescimento de raiz em trigo sem cessar a sua atividade. Para a composição do meio sólido, utilizou-se a mesma solução nutritiva proposta por [Delhaize et al. \(2004\)](#), no entanto como solidificante, empregou-se o ágar da marca *Difco*TM de grau microbiológico de Ref. 214010 em uma concentração de 0,6%, previamente estabelecida e adequadas em testes preliminares. Para cada tratamento, foram utilizadas três repetições, em duplicata, e essa replicata foi realizada em dias diferentes, perfazendo um total de seis amostras para cada tratamento.

A solução nutritiva de [Delhaize et al. \(2004\)](#) apresenta como composição química de: 500 μM KNO_3 , 500 μM CaCl_2 , 500 μM NH_4NO_3 , 150 μM MgSO_4 , 100 μM KH_2PO_4 , 2 μM Fe:EDTA, 11 μM H_3BO_3 , 2 μM MnCl_2 , 0.35 μM ZnCl_2 e 0.2 μM CuCl_2 . A concentração nominal de Al^{+3} na solução será de 0, 5, 10 e 30 μM Al^{+3} , usando como fonte o AlCl_3 . O pH da solução foi ajustado inicialmente em $4,0 \pm 0,1$ a fim de manter o Al^{+3} solúvel. Junto à solução nutritiva, adicionou-se o indicador

de pH verde de bromocresol para que pudesse ser acompanhado a mudança de pH no meio de cultura e em torno da raiz.

O indicador de pH verde de bromocresol é um indicador ácido-base que apresenta pontos de viragem em intervalos de pKa na faixa de pH trabalhadas no experimento. Sendo assim, em pH 3,8 apresenta coloração amarelo, pH 4,5 verde e em pH 5,4 azul (Sigma-Aldrich).

Ácidos Orgânicos

Quando as plantas atingiram $\frac{3}{4}$ do comprimento dos tubos com relação à parte aérea (aproximadamente após 8 dias, conforme dados do estudo piloto), estas foram retiradas dos meios de cultura e suas raízes lavadas em solução 40 mM de Na₂CO₃, para que ocorresse a extração dos AOs e esses permanecessem na forma fixa respectiva, como sal sódico.

A solução de lavagem foi evaporada em tubos do tipo vial (5 mL), ressuspensa em metanol, ao qual realizou-se a derivatização (metilação). A reação de metilação compreende em adicionar KOH (preparado em metanol com concentração de 2M) no tubo vial com o metanol, deixando-se reagir à 60°C por 10 minutos. Após, adiciona-se H₂SO₄ (7N – preparado em metanol), deixando-se reagir à 60°C por 10 minutos. Posteriormente à estas reações, adicionou-se hexano e, agitou-se vigorosamente por 10 minutos e deixou-se em descanso por aproximadamente uma hora. Após separadas as fases, as amostras foram injetadas no GC-MS (Shimadzu, modelo GC-2010/GCMS-QP2010 Plus com injetor automático de amostra AOC-20i, gás de arraste hélio ultrapuro (9999), coluna RTX-5MS da Restek com 30 metros de comprimento e diâmetro de 0,25mm). As condições de análise compreenderam em modo *splitless* com temperatura de interface/injeção de 250°C, temperatura do ionizador de 230°C. O método apresenta uma corrida em 14 minutos/amostra e uma faixa de detecção de massas de 40 a 450 m/z. (De Oliveira Carvalho, Brenda Mistral, et al 2016).

Análise dos dados

A quantificação dos AOs nas amostras foi realizada mediante a construção de curvas de calibração. Para tanto, concentrações crescentes de soluções dos ácidos esterificados (metilados) de ácidos cítrico, málico, oxálico e

succínico PA foram injetadas no GC-MS a fim de estabelecer os picos crescentes que foram utilizados para o cálculo da equação de regressão dos mínimos quadrados das concentrações nominais utilizadas.

Os picos de cada amostra analisada foram integrados automaticamente pelo *software* do sistema para obtenção de uma maior precisão. O *software* utilizado foi o *LabSolutions* versão *GCMSsolution Version 2.72 Shimadzu Corporation* licenciado para o CEIS (Centro de Estudo de Insetos Sociais). A área equivalente referente a cada pico identificado foi aplicada à sua respectiva equação da reta obtendo-se o valor em ppm ($\mu\text{g/L}$) para cada composto da amostra.

Para a análise de normalidade, foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk a partir do *software BioEstat 5.3.*, que visa fornecer o parâmetro valor de prova (valor- p , *p-value* ou significância), que pode ser interpretado como a medida do grau de concordância entre os dados e a hipótese nula (H_0), sendo H_0 correspondente à distribuição Normal. Quanto menor for o valor- p , menor é a consistência entre os dados e a hipótese nula (De Mesquita Lopes et al. 2013). Então, a regra de decisão adotada para saber se a distribuição é Normal ou não é rejeitar H_0 : (i) se valor- $p \leq \alpha$, rejeita-se H_0 , ou seja, não se pode admitir que o conjunto de dados em questão tenha distribuição Normal; (ii) se valor- $p > \alpha$, não se rejeita H_0 , ou seja, a distribuição Normal é uma distribuição possível para o conjunto de dados em questão (De Mesquita Lopes et al. 2013).

Foram realizados testes paramétricos a partir da ANOVA dois critérios pelo *software BioEstat 5.3.* Este teste compara, além da variação entre os tratamentos, a variabilidade entre os blocos, os quais correspondem às linhas do *grid* geral. Para isso, as amostras devem ter o mesmo tamanho e os escores mensurados a nível intervalar ou de razões. Há, neste modelo, dois valores de F: dos tratamentos e dos blocos, sendo o tratamento designado o tipo de meio de cultura e os blocos as concentrações de AI estabelecidas.

No entanto, o estudo procura esclarecer se há interações entre os tratamentos e os blocos, devendo-se, nessa circunstância, efetuar repetições para visualizar esse detalhe da pesquisa (ANOVA: fatorial $a \times b$ (com replicação)). Os resultados desta análise de variância são apresentados sob a forma de três (3) F-testes: a) dos tratamentos (tipo de meio de cultura); b) dos blocos ([AI]); c) da interação entre tratamentos e blocos, todos com os respectivos valores de p .

Neste caso, utilizou-se um valor de 95 % de confiança, ao qual α apresentava um valor de 5%. Sendo assim, se ocorresse de os dados trabalhados apresentarem rejeição à hipótese nula ($\alpha < 0.05$ – compreendendo a igualdade das amostras), seriam realizados testes não paramétricos empregando o teste de Kruskal-Wallis com α de 5% sendo estes testes elaborados pelo programa *Software PAST 3.14*.

O teste de Kruskal-Wallis é o teste equivalente não paramétrico da Análise de Variância Simples (ANOVA), porém este se estrutura na comparação da média dos ranks dos grupos. Este teste foi escolhido como base não paramétrica porque pode ser usado para determinar se existem diferenças estatisticamente significativas entre dois ou mais grupos de uma variável independente em uma variável dependente contínua ou ordinal. Considera-se a alternativa não paramétrica à ANOVA *one-way*, e uma extensão do teste U de Mann-Whitney para permitir a comparação de mais de dois grupos independentes (Laerd Statistics, 2019

Optou-se também por utilizar agrupamentos e Análise de Componente Principal (PCA). Os agrupamentos e PCAs foram gerados pelo *software R*.

3. Resultados

As amostras dos meios de cultura e raízes apresentaram diferenças com relação ao pH inicial e final. Para comparação, foi confeccionada uma curva colorimétrica de pH mostrado na figura 02.

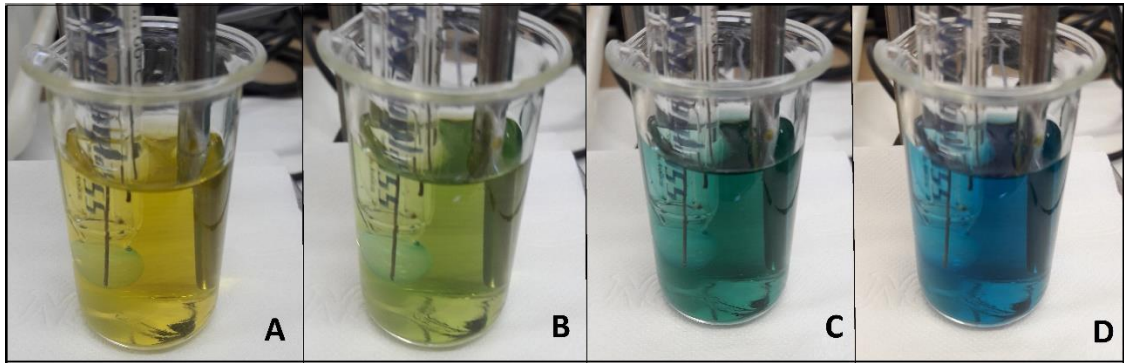


Figura 2: Curva colorimétrica do indicador de pH verde de bromocresol. Legenda: A: pH 4,0; B: pH 4,5; C: pH 5,0; D: pH 5,5.

A figura 03 retrata a região radicular após inserção no meio de cultura sólido, no início e no final. Como se pode observar, as regiões da coifa e de alongamento celular apresentaram elevação no pH, constatado pela coloração azulada, o que representa uma faixa de pH entre 5,0 e 5,5.

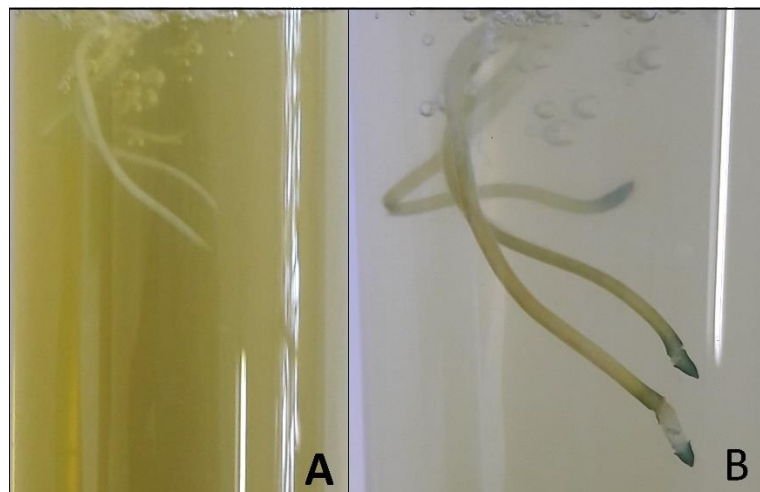


Figura 3: Fotografia da raiz da cultivar ANAHUC 75 (sensível) no dia inicial (A) e no final do experimento (B) em concentração de $0 \mu\text{M Al}^{+3}$. A coloração azul no ápice da raiz indica alcalinização da região.

O mesmo também ocorre no meio de cultura líquido, como mostra a figura 04.

O mesmo também ocorre no meio de cultura líquido, como mostra a figura 04.

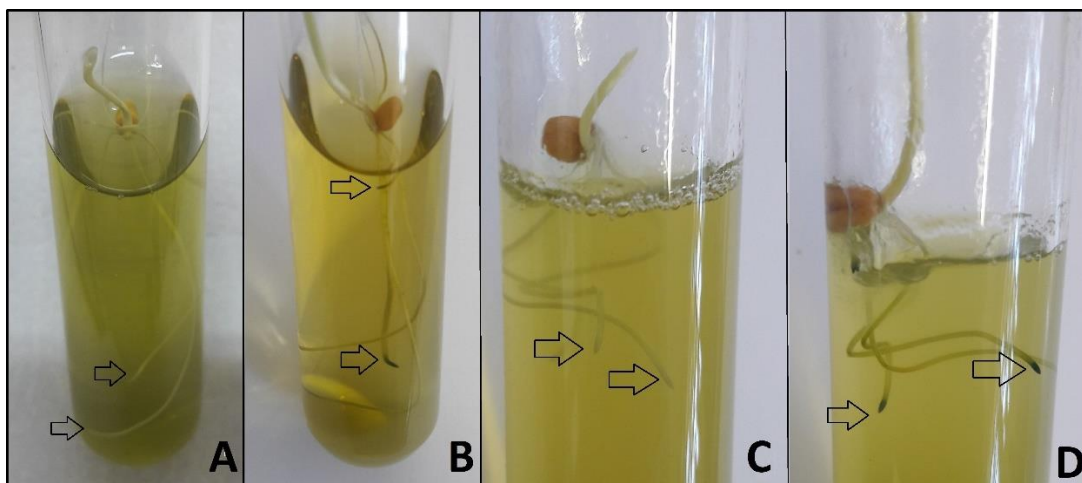


Figura 4: Comparação entre meio de cultura líquido (A e B) e sólido (C e D) da cultivar JAC5 (tolerante) na concentração de $30 \mu\text{M Al}^{+3}$ no início do experimento (A e C) e no final do experimento (B e D). As setas indicam o ápice radicular.

Para quantificação dos AOs, foi confeccionada uma curva de calibração para cada ácido orgânico analisado (figura 05) de acordo com a característica de cada amostra, perfazendo um intervalo de 0 a 200 ppm, com todas as curvas apresentando valores de $R^2 < 0,992$.

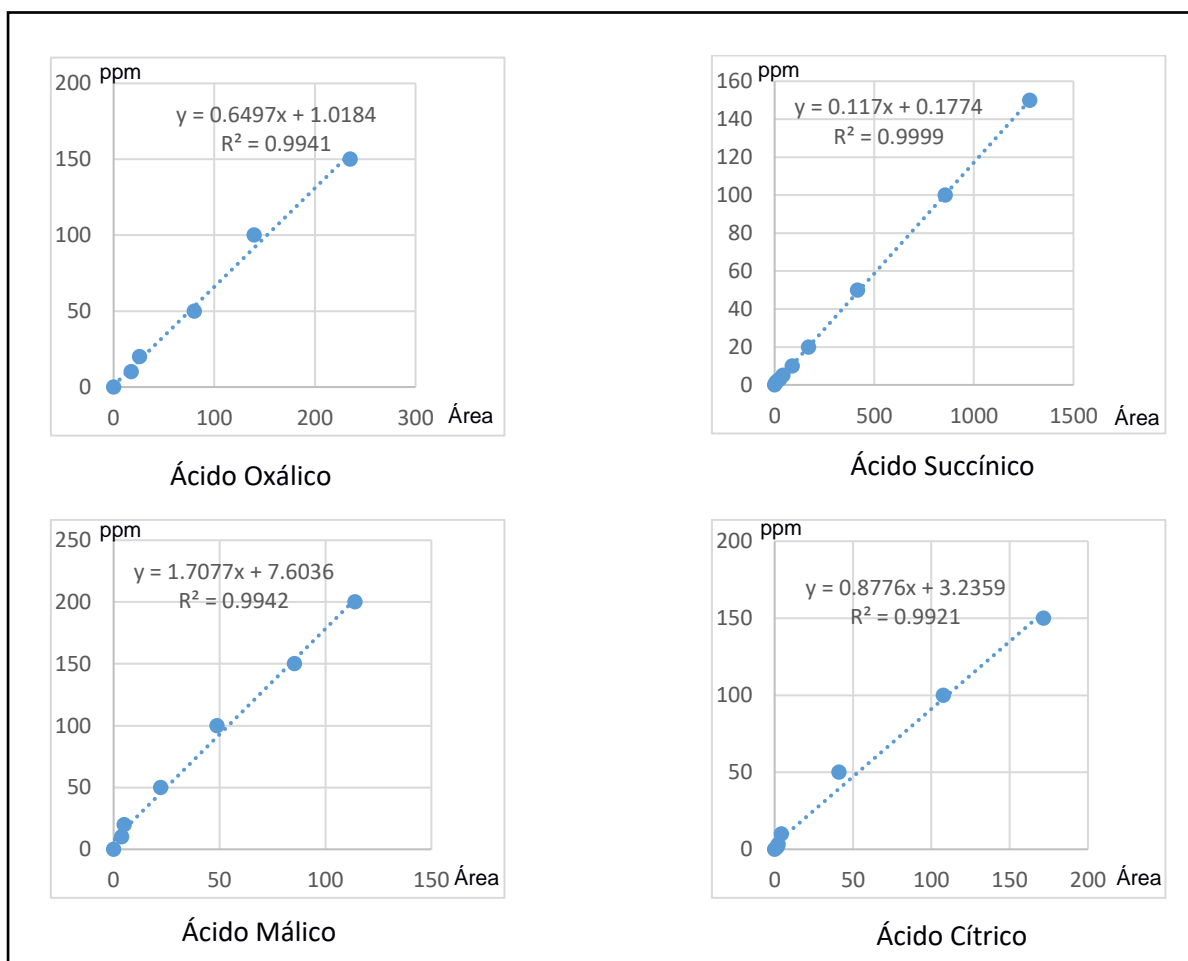


Figura 5: Curva de Calibração cromatográfica para todos os ácidos orgânicos e suas respectivas equações da reta (R^2).

Foi encontrado em todas as amostras o ácido oxálico e o ácido succínico. Desses ácidos orgânicos encontrados foram feitas as análises estatísticas utilizando o teste de Shapiro-Wilk, teste ANOVA fatorial a x b (com replicação) e posteriormente o teste de Kruskal-Wallis com um α 5%

Para aplicar o teste, as amostras foram tratadas e separadas de acordo com o AO e a cultivar, e neles apresentavam os resultados obtidos no meio sólido e no meio líquido. Sendo assim, foram gerados 4 grupos, os quais são:

- Ácido Oxálico– Cultivar Sensível
- Ácido Oxálico – Cultivar Tolerante
- Ácido Succínico – Cultivar Sensível

- Ácido Succínico – Cultivar Tolerante

Com base no teste de Shapiro-Wilk, é possível observar pela tabela 1, que o parâmetro valor de prova (valor-p) foram todos inferiores a 5%, o que pode ser interpretado baseado na regra de decisão com a rejeição da hipótese de H_0 (hipótese nula - que seria correspondente à distribuição Normal). Sendo assim, menor é a consistência entre os dados e a hipótese nula, sugerindo uma análise não paramétrica.

Tabela 1: Teste de Normalidade De Shapiro-Wilk.

Resultados	Ác. Oxálico Cultivar Sensível	Ác. Oxálico Cultivar Tolerante	Ác. Succínico Cultivar Sensível	Ác. Succínico Cultivar Tolerante
Tamanho da amostra =	48	48	48	48
Média =	9.809	9.1563	2.326	2.1425
Desvio padrão =	3.5484	3.4531	1.7356	1.3522
W =	0.9214	0.8179	0.8234	0.7961
p =	0.0099	0.0088	0.0089	0.0086

Para complementar as análises paramétricas, foi elaborado o teste ANOVA fatorial a x b (com replicação), que é preciso gerar duas hipóteses a serem testadas, sendo elas H_0 e H_1 . Elas baseiam-se no seguinte critério:

H_0 : A exsudação de AOs no meio de cultura sólido e o meio de cultura líquido não apresentam diferenças significativas, sendo $\mu_{\text{meio sólido}} = \mu_{\text{meio líquido}}$

H_1 : A exsudação de AOs nos diferentes meios de culturas apresentam interações significativas $\mu_{\text{meio sólido}} \neq \mu_{\text{meio líquido}}$

Os resultados obtidos encontram-se nas tabelas 2, 3, 4 e 5.

A tabela 2 representa a análise estatística gerada pelo teste ANOVA fatorial a x b (com replicação) em que a hipótese H_0 está relacionada à igualdade das amostras. De acordo com o grau de confiança estabelecido em 95%, é possível observar que este grupo não apresentou diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos pois o valor de α foi de 0,3247 na comparação entre os tratamentos, $\alpha=0,4038$ na comparação entre as concentrações de Al trabalhadas, sendo assim, não houve diferenciação entre os exsudados de ácido oxálico liberados pelo cultivar sensível no meio de cultura líquido e no meio de cultura sólido, aceitando a nulidade das amostras e recusando a hipótese de diferenças entre os tipos de meios de cultura (H_1).

Tabela 2: Resultados ANOVA para o grupo de dados Ácido Oxálico-Cultivar Sensível.

FONTES DE VARIÇÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	1	240.40 e+06	240.40 e+06
Blocos	3	721.63 e+06	240.54 e+06
Interação	3	720.77 e+06	240.26 e+06
Erro	40	961.49 e+07	240.37 e+06
	---	---	---
F (Tratamentos) =	1.0001	---	---
Graus de liberdade =	1, 40	---	---
p (Tratamentos)	0.3247	---	---
F (Blocos) =	1.0007	---	---
Graus de liberdade =	3, 40	---	---
p (Blocos) =	0.4038	---	---
F (Interação) =	0.9995	---	---
Graus de liberdade =	3, 40	---	---
p (Interação) =	0.5957	---	---

No entanto, para os outros três agrupamentos (Ácido Oxálico – Cultivar Tolerante, Ácido Succínico – Cultivar Sensível, Ácido Succínico – Cultivar Tolerante), todos eles apresentaram $\alpha < 0,0001$ (tabela 3, 4 e 5) tanto nos tratamentos, como nos blocos e interação. O que significa a rejeição da hipótese de igualdade (H_0) e assentimento à hipótese H_1 , e com isso, mostrando que há uma diferença

significativa entre os meios de cultura, entre as concentrações trabalhadas e existe uma interação significativa entre eles dentro do próprio grupo.

Tabela 3: Resultados ANOVA para o grupo de dados Ácido Oxálico-Cultivar Tolerante.

	GL	SQ	QM
FONTES DE VARIÇÃO			
Tratamentos	1	38.6205	38.6205
Blocos	3	386.4171	128.8057
Interação	3	138.3637	46.1212
Erro	40	0.4073	0.0102
	---	---	---
F (Tratamentos) =	3792.395	---	---
Graus de liberdade =	1, 40	---	---
p (Tratamentos)	< 0.0001	---	---
F (Blocos) =	12648.26	---	---
Graus de liberdade =	3, 40	---	---
p (Blocos) =	< 0.0001	---	---
F (Interação) =	4528.939	---	---
Graus de liberdade =	3, 40	---	---
p (Interação) =	< 0.0001	---	---

Tabela 4: Resultados ANOVA para o grupo de dados Ácido Succínico-Cultivar Sensível.

	GL	SQ	QM
FONTES DE VARIÇÃO			
Tratamentos	1	97.8289	97.8289
Blocos	3	18.2665	6.0888
Interação	3	25.2096	8.4032
Erro	40	0.2708	0.0068
	---	---	---
F (Tratamentos) =	14448.69	---	---
Graus de liberdade =	1, 40	---	---
p (Tratamentos)	< 0.0001	---	---
F (Blocos) =	899.2796	---	---
Graus de liberdade =	3, 40	---	---
p (Blocos) =	< 0.0001	---	---
F (Interação) =	1241.097	---	---
Graus de liberdade =	3, 40	---	---
p (Interação) =	< 0.0001	---	---

Tabela 5: Resultados ANOVA para o grupo de dados Ácido Succínico-Cultivar Tolerante.

FONTES DE VARIÇÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	1	62.7438	62.7438
Blocos	3	15.5173	5.1724
Interação	3	7.5137	2.5046
Erro	40	0.1644	0.0041
	---		---
F (Tratamentos) =	15263.7541		---
Graus de liberdade =	1, 40		---
p (Tratamentos)	< 0.0001		---
F (Blocos) =	1258.3056		---
Graus de liberdade =	3, 40		---
p (Blocos) =	< 0.0001		---
F (Interação) =	609.2896		---
Graus de liberdade =	3, 40		---
p (Interação) =	< 0.0001		---

Sendo assim, para todos os grupos foram feitos o teste de Teste de Kruskal-Wallis com α de 5% (0,05). Os resultados obtidos encontram-se na tabela 6.

Tabela 6: Resultado do Teste de Kruskal-Wallis aplicados para cada grupo.

Ácido Oxálico Cultivar Sensível	Teste de Kruskal-Wallis	
	$H(ch^2)$	0
	H_c (tie corrected)	0
	p (same)	1
Ácido Oxálico Cultivar Tolerante	Teste de Kruskal-Wallis	
	$H(ch^2)$	4,688
	H_c (tie corrected)	4,688
	p (same)	0,03038
Ácido Succínico	Teste de Kruskal-Wallis	
	$H(ch^2)$	35,27

Cultivar Sensível	H_c (tie corrected)	35,27
	p (same)	2,877 E-09
Ácido Succínico	Teste de Kruskal-Wallis	
	$H(ch^2)$	35,27
Cultivar Tolerante	H_c (tie corrected)	35,27
	p (same)	2,874 E-09

Como é possível observar, para o ácido oxálico no cultivar sensível, não houve diferenças significativas entre os teores exsudados no meio de cultura sólido e líquido, pois o valor de α foi de 1. Mas nesta mesma cultivar sensível, os teores de exsudato de ácido succínico apresentaram diferenças expressivas entre os tipos de meio de cultura, onde os valores de α foi 2,877 E⁻⁰⁹.

No entanto, para a cultivar tolerante, com relação ao ácido oxálico, obtiveram-se diferenças significativas entre os teores exsudados no meio de cultura sólido e líquido, pois o valor de α foi 0,03038. Em se tratando desta mesma cultivar, mas com relação ao exsudato de ácido succínico, as diferenças também foram extremamente expressivas entre os tipos de meio de cultura, visto que os valores de α foi 2,874 E⁻⁰⁹.

Também foram feitos agrupamentos em R, como mostrado nas figuras 6, 7, 8 e 9. Eles evidenciam que os exsudatos de ácido oxálico nas cultivares sensíveis ao Al⁺³, tendem a apresentar valores de exsudação bem agrupados nas concentrações 0 e 5 μ M Al⁺³. Entretanto, nas cultivares tolerantes, os teores de exsudatos de ácido oxálico na concentração de 0 μ M Al⁺³ são mais dispersos e tendem a apresentar valores mais bem agrupados nas concentrações de 5, 10 e 30 μ M Al⁺³, mas, mesmo assim, expressaram diferenças significativas estatisticamente. Quando se trata dos exsudatos de ácido succínico, tantos nas cultivares tolerantes quanto nas cultivares sensíveis, os valores encontrados em todas as concentrações de μ M Al⁺³ apresentaram pontos no plano cartesiano das figuras 7 e 8 que não convergiam, ou seja, não se agrupavam no mesmo ponto. Isso, ilustra com clareza porque as diferenças estatísticas foram bastante significativas.

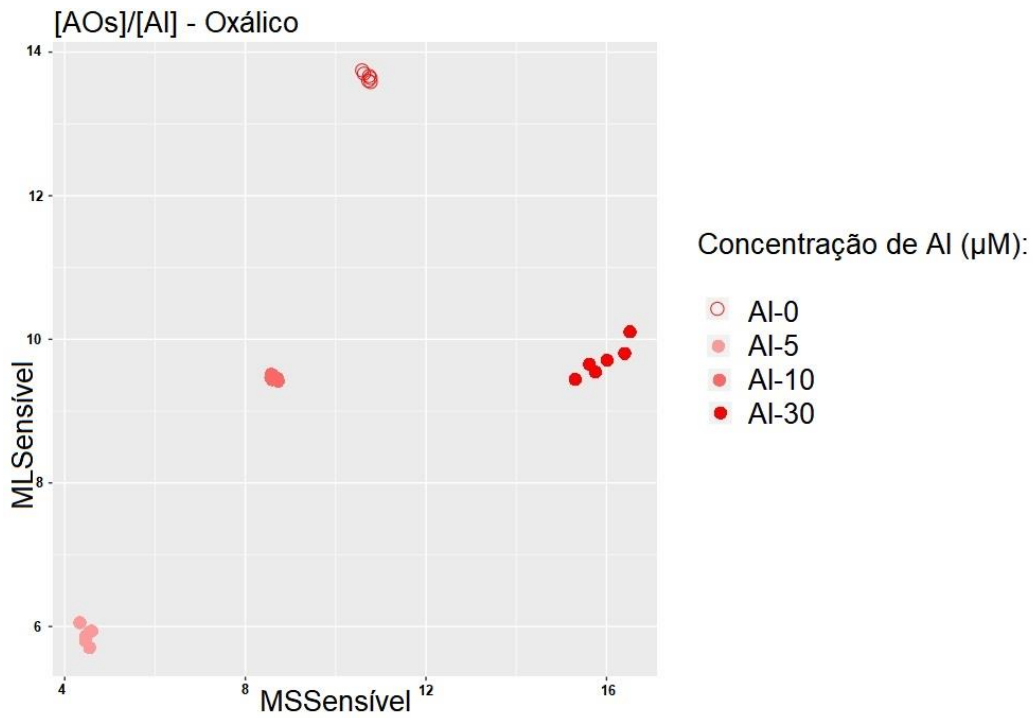


Figura 6: Agrupamento das cultivares sensível (ANAHUC75) de acordo com a exsudação do ácido oxálico com relação ao tipo de meio de cultura e concentrações de Al^{+3} (μM).

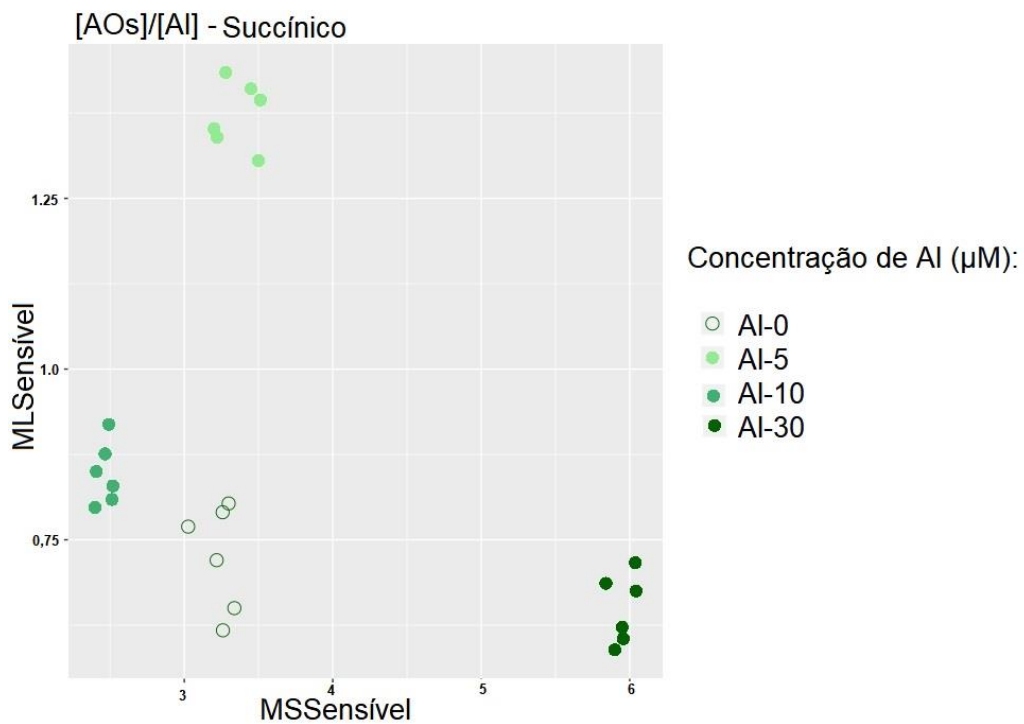


Figura 7: Agrupamento das cultivares sensível (ANAHUC75) de acordo com a exsudação do ácido succínico com relação ao tipo de meio de cultura e concentrações de Al^{+3} (μM).

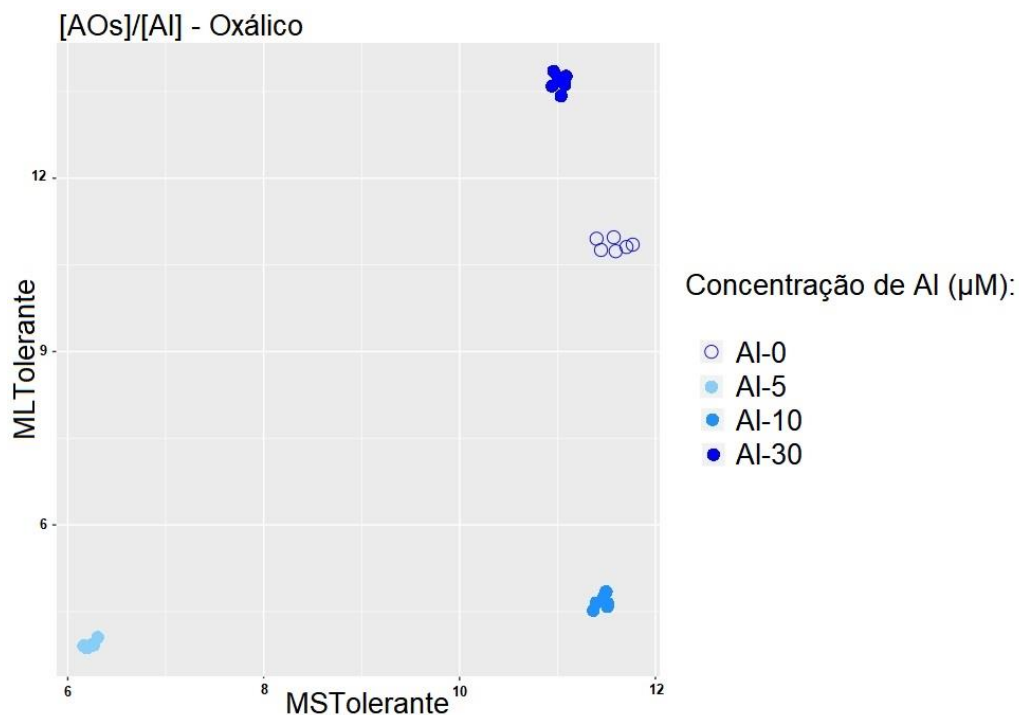


Figura 8: Agrupamento das cultivares tolerante (JAC5) de acordo com a exsudação do ácido oxálico com relação ao tipo de meio de cultura e concentrações de Al^{+3} (μM).

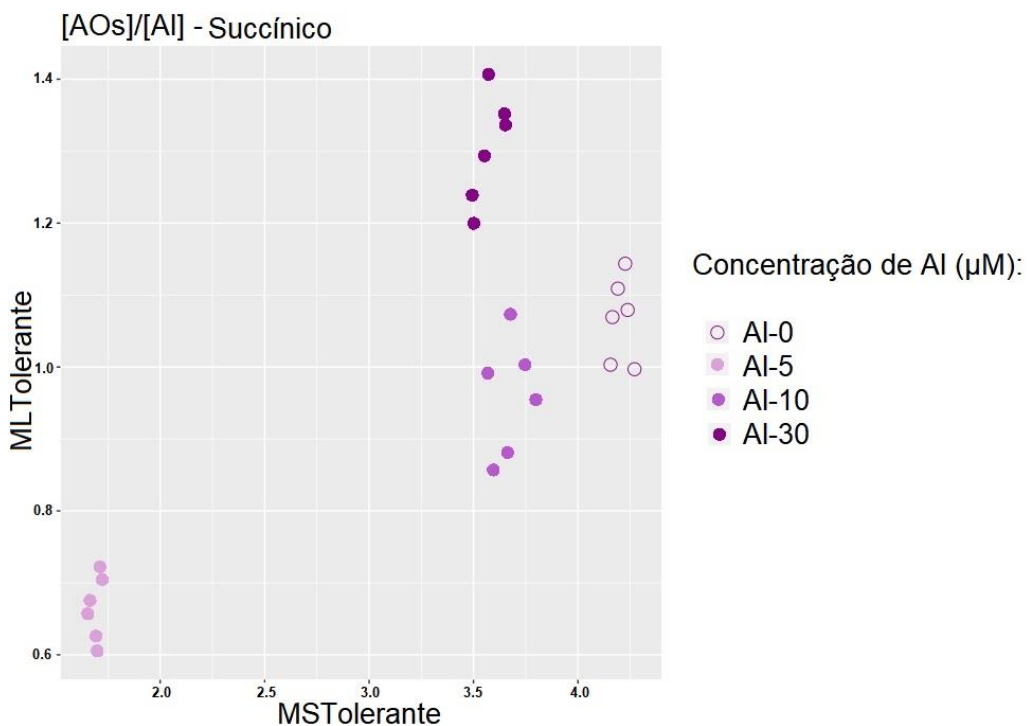


Figura 9: Agrupamento das cultivares tolerante (JAC5) de acordo com a exsudação do ácido succínico com relação ao tipo de meio de cultura e concentrações de Al^{+3} (μM).

A análise de PCA envolve projetar um conjunto de dados (amostragem) multivalorados e numéricos na direção da maior (máximo) da variância.

No caso das PCAs nas figuras 10, 11, 12 e 13, foram projetados os dados tabulados usando duas variáveis (Meio Sólido e Meio Líquido) para 24 amostras divididas nas concentrações de alumínio já mencionadas. Os agrupamentos referentes a essas análises PCAs constam no Anexo I (página 47).

Como é possível observar na figura 15 para o ácido oxálico exsudado pela cultivar sensível, o eixo destacado por PC1 observa-se uma variância total de 81,22% em relação a mostra de dados e nesse caso indica que 81,22% desses dados podem ser interpretados pela componente principal PC1. Por outro lado, no eixo PC2 tem-se 18,78%, indicando a interpretação complementar ao eixo da PC1. Note que PC1+PC2 totaliza 100% dos dados, uma vez que análise de PCA garante a projeção dos dados nos eixos PC1 e PC2 sem a perda de informação.

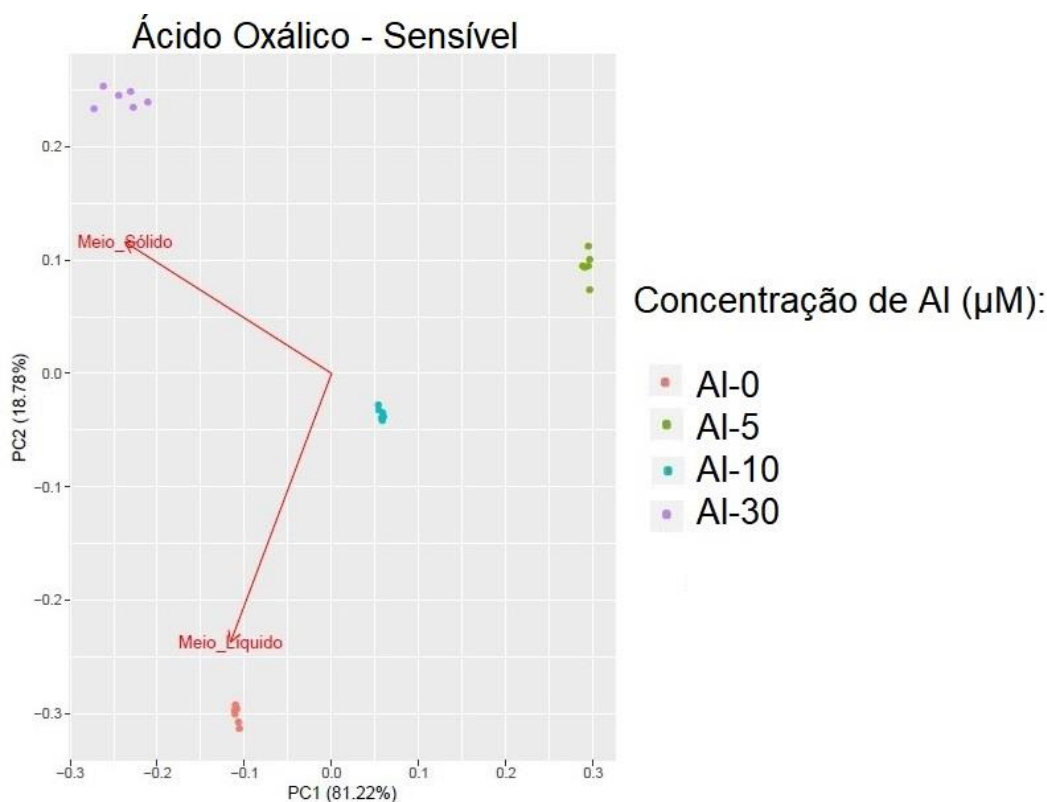


Figura 10: Análise PCA das cultivares sensível (ANAHUC75) de acordo com o Ácido Oxálico exsudado com relação ao tipo de meio de cultura e concentrações de Al^{+3} (μM).

Além disso, observa-se que existem dois vetores em vermelho (Meio Líquido e Meio Sólido) destacados na Figura 10. Ambos vetores, representam a projeção dos dados coletados na direção dos autovetores e autovalores da variância. Observe que o vetor Meio Líquido forma um ângulo inferior à 90° do vetor Meio Sólido.

Ainda pode-se verificar que existem dois grupos na direção dos vetores Meio Líquido e Meio Sólido, sendo os agrupamentos com concentrações de Al de 0 e de 30 μM respectivamente. Nesse caso, o agrupamento Al-0 (μM) está mais correlacionado com o meio líquido enquanto o meio sólido está mais correlacionado com a concentração de Al-30 (μM). Também, observando-se os grupos Al-5 e Al-10 (μM) nota-se que existe uma baixa correlação entre os meios e as respectivas concentrações. Isso pode-se verificar, uma vez que ambos os grupos Al-5 e Al-10 (μM) estão na direção oposta da projeção dos autovetores sugerindo uma instabilidade em relação aos meios estudados, que quer dizer que os meios de cultura quando comparados, não apresentam respostas estáveis.

Para a figura 11, com relação ao PCA do ácido succínico exsudado pela cultivar sensível, o eixo destacado por PC1 apresenta uma variância total de 96,16% em relação à mostra de dados. A sua componente com relação a do ácido oxálico referente à figura 10 é maior, sendo assim, 96,16% desses dados podem ser explicados pela componente principal PC1. O eixo PC2 explica somente 3,84% dos dados, indicando a sua interpretação complementar ao eixo da PC1 sem perdas de informações. Com relação aos seus vetores, é possível observar que o vetor Meio Líquido é ortogonal ao vetor Meio Sólido (i.e., forma um ângulo reto em relação à base ortogonal).

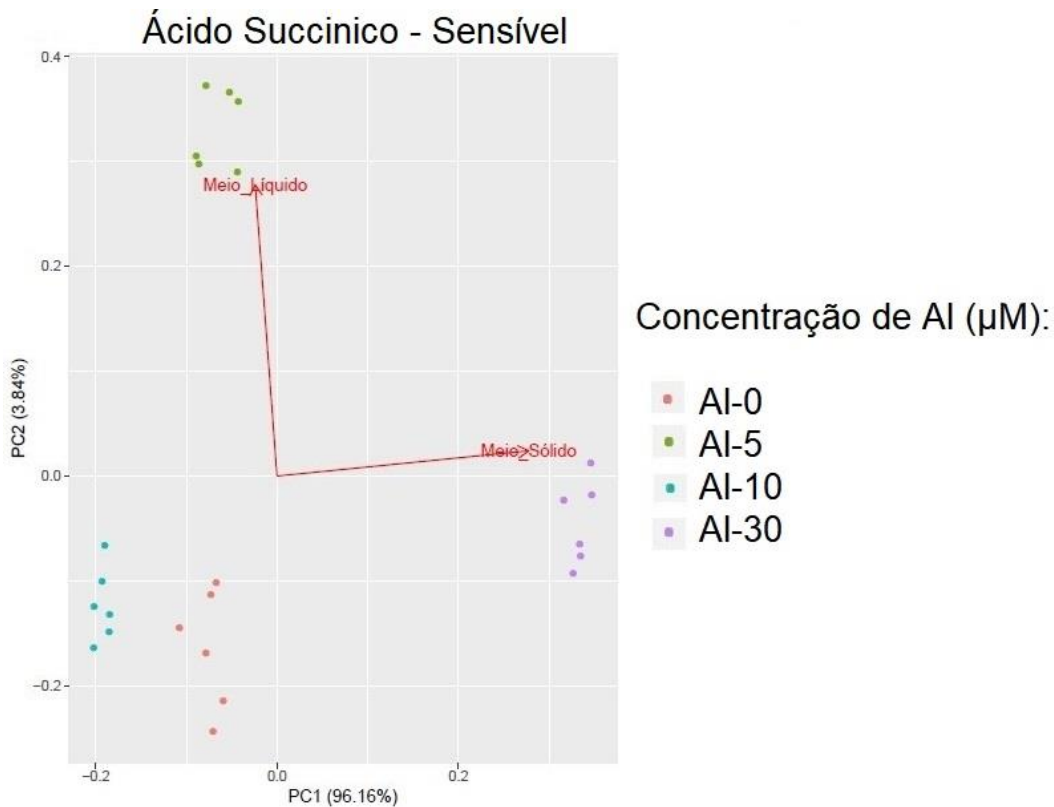


Figura 11: Análise PCA das cultivares sensível (ANAHUC75) de acordo com o Ácido Succínico exsudado com relação ao tipo de meio de cultura e concentrações de Al^{+3} (μM).

Além disso pode-se verificar que também existem dois grupos na direção dos vetores Meio Líquido e Meio Sólido que consisti nos agrupamentos com concentrações de alumínio de 5 e de 30 μM . Nesse caso, o agrupamento Al-5 (μM) está mais correlacionado com o meio líquido enquanto o meio sólido está mais correlacionado com a concentração de Al-30 (μM), sendo esta última, conexa à proximidade do vetor como ocorreu com o ácido oxálico (figura 10). Do mesmo modo, vale ressaltar que os grupos Al-0 e Al-10 (μM) existe uma baixa correlação entre os meios e as respectivas concentrações, uma vez que ambos se encontram na direção oposta da projeção dos autovetores e autovalores sugerindo igualmente uma instabilidade em relação aos meios estudados, que quer dizer que os meios de cultura quando comparados, não apresentam respostas estáveis

De acordo com a figura 12, a análise PCA do ácido oxálico exsudado pela cultivar tolerante, o eixo disjunto por PC1 apresenta uma variância total de 86,08% em relação à mostra de dados sendo possível explicar está percentagem dos

elementos pela componente principal PC1. O eixo PC2 interpreta complementarmente 13,92% dos dados sem gerar perdas de informações. Quando comparamos com o PCA do ácido oxálico exsudado pelo cultivar sensível (figura 10), é possível observar que o PC1 da cultivar tolerante abrange uma explicação mais ampla que o PC1 do cultivar sensível.

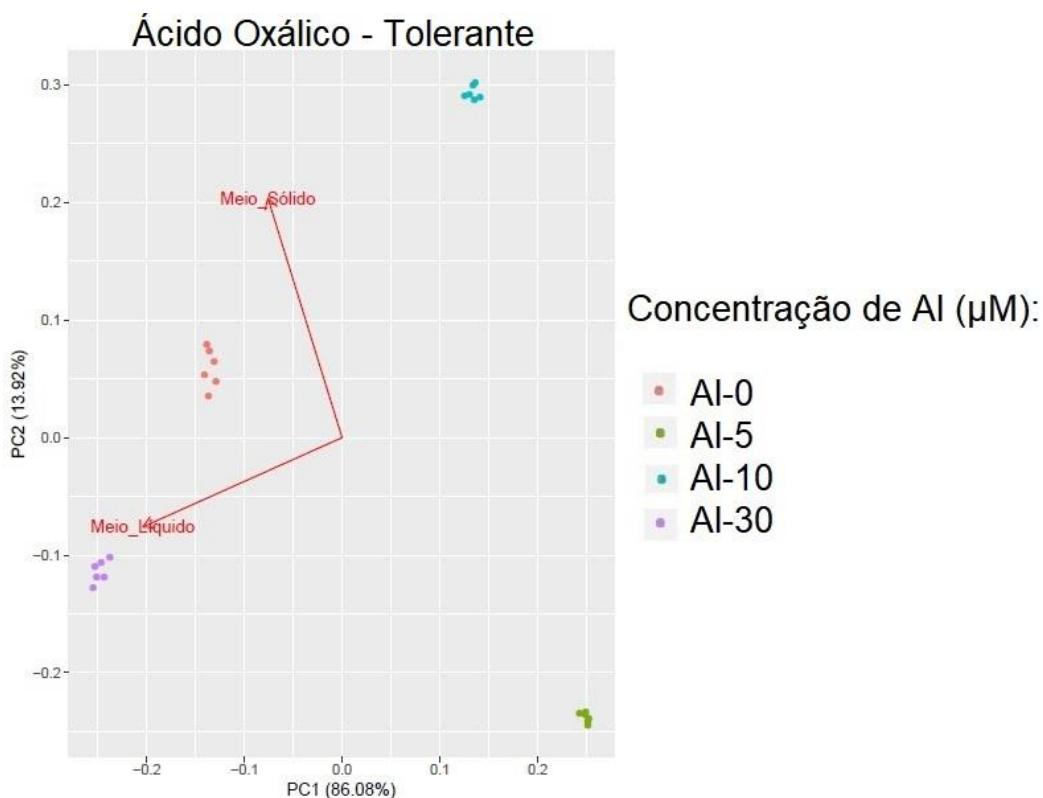


Figura 12: Análise PCA das cultivares tolerante (JAC5) de acordo com o Ácido Oxálico exsudado com relação ao tipo de meio de cultura e concentrações de Al³⁺ (µM).

Em se tratando dos seus vetores, é possível observar que a abertura em graus do vetor Meio Líquido em relação ao vetor Meio Sólido é próxima a um ângulo reto. Igualmente, pode-se verificar que existe um grupo na direção dos vetores Meio Líquido e Meio Sólido, sendo este o agrupamento de AI-30 (µM) cujo está mais correlacionado com o meio líquido, diferente do agrupamento de AI-30 (µM) do PCA do ácido oxálico exsudado pela cultivar sensível (figura 10), que está mais correlacionado com o meio sólido. Enquanto isso, o agrupamento AI-0 (µM), encontra-se entre os vetores, estando parcialmente relacionado a ambos. Já nos grupos AI-5 e AI-10 (µM), existe uma baixa correlação entre os meios e as respectivas concentrações podendo constatar, pelas suas direções opostas às das projeções dos

autovetores e autovalores sugerindo novamente uma instabilidade em relação aos meios estudados, que quer dizer que os meios de cultura quando comparados, não apresentam respostas estáveis.

Na análise da figura 13, com relação ao PCA do ácido succínico exsudado pela cultivar tolerante, o eixo destacado por PC1 mostrar-se uma variância absoluta de 97,46% em relação à mostra de dados. A sua componente com relação a do ácido succínico referente à figura 15 é máximo, sendo assim, 97,46% desses dados podem ser explicados pela componente principal PC1. O eixo PC2 interpreta simplesmente 2,54% dos dados, proporcionando a sua complementariedade ao eixo da PC1, sem perdas de informações. Com relação aos seus vetores, é possível observar que o vetor Meio Líquido é ortogonal ao vetor Meio Sólido.

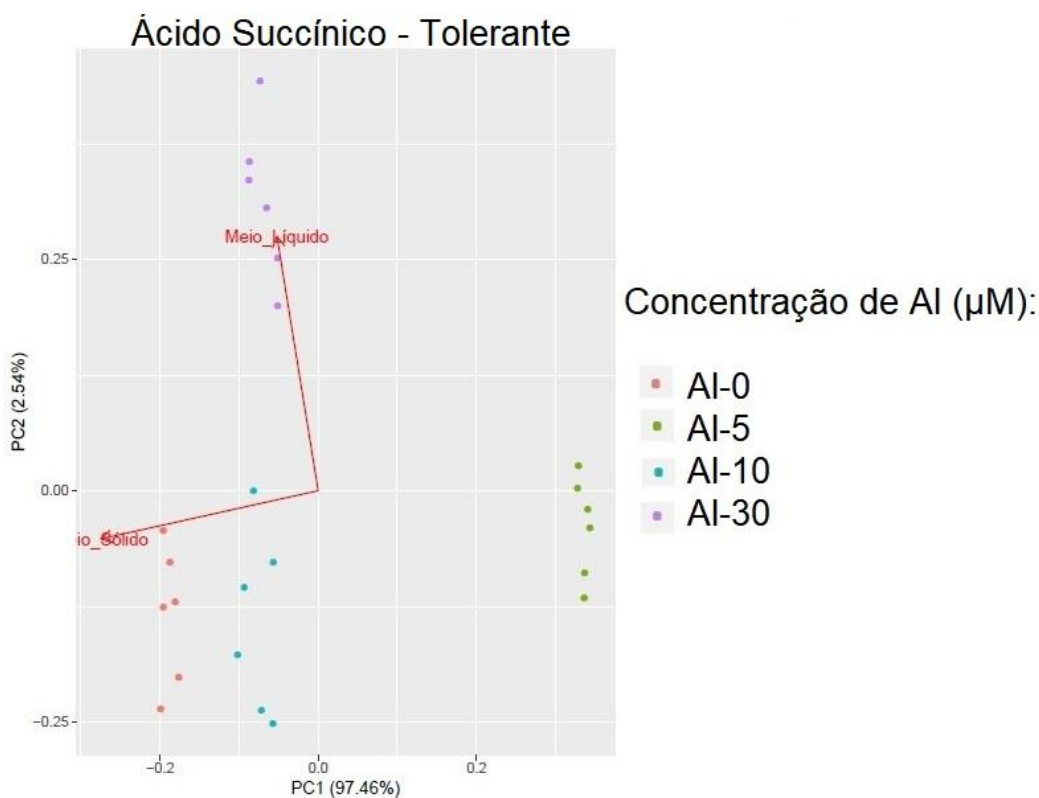


Figura 13: Análise PCA das cultivares tolerante (JAC5) de acordo com o Ácido Succínico exsudado com relação ao tipo de meio de cultura e concentrações de Al^{3+} (μM).

De acordo com o plano cartesiano desta componente, é possível verificar que os agrupamentos das amostras estão dispersos (vide figuras do Anexo I

- página 47). Ao mesmo tempo existem 3 grupos que intersectam os vetores Meio Líquido e Meio Sólido, e nesse caso são os agrupamentos com concentrações de 0, 10 e de 30 μM . O agrupamento AI-0 e AI-10 (μM) está levemente correlacionado com o meio sólido porque uma pequena parte da sua afluência cruza o eixo, enquanto no meio líquido, o agrupamento AI-30 (μM) apresenta melhor correlação, sendo esta última, relacionada à proximidade e direção do vetor. Também é possível notar que o grupo AI-5 (μM) não apresenta correlação entre os meios, uma vez que ele se encontra na direção oposta da projeção dos autovetores e autovalores sugerindo igualmente uma inconstância em relação aos meios estudados, que quer dizer que os meios de cultura quando comparados, não apresentam respostas estáveis.

Em se tratando de uma análise geral, foram elaborados PCAs para o ácido oxálico e o ácido succínico de forma que os dados tolerantes e sensíveis, meio líquido e meio sólido foram agrupados de maneira a mostrar suas diferenças, como segue na figura 14 e 15, e os seus agrupamentos estão presentes no Anexo I.

No eixo destacado por PC1 da figura 14 compreende uma variância total de 78,37% em relação a mostra de dados e nesse caso indica que 78,37% desses dados podem ser interpretados e explicados pela componente principal PC1. Complementando essa componente, no eixo PC2 tem-se 21,63%, totalizando 100% da projeção dos dados nos eixos. Na sequência, observa-se que gerou dois vetores em vermelho (Sensível e Tolerante). Ambos vetores, representam a projeção dos dados coletados na direção dos seus autovetores e autovalores da variância.

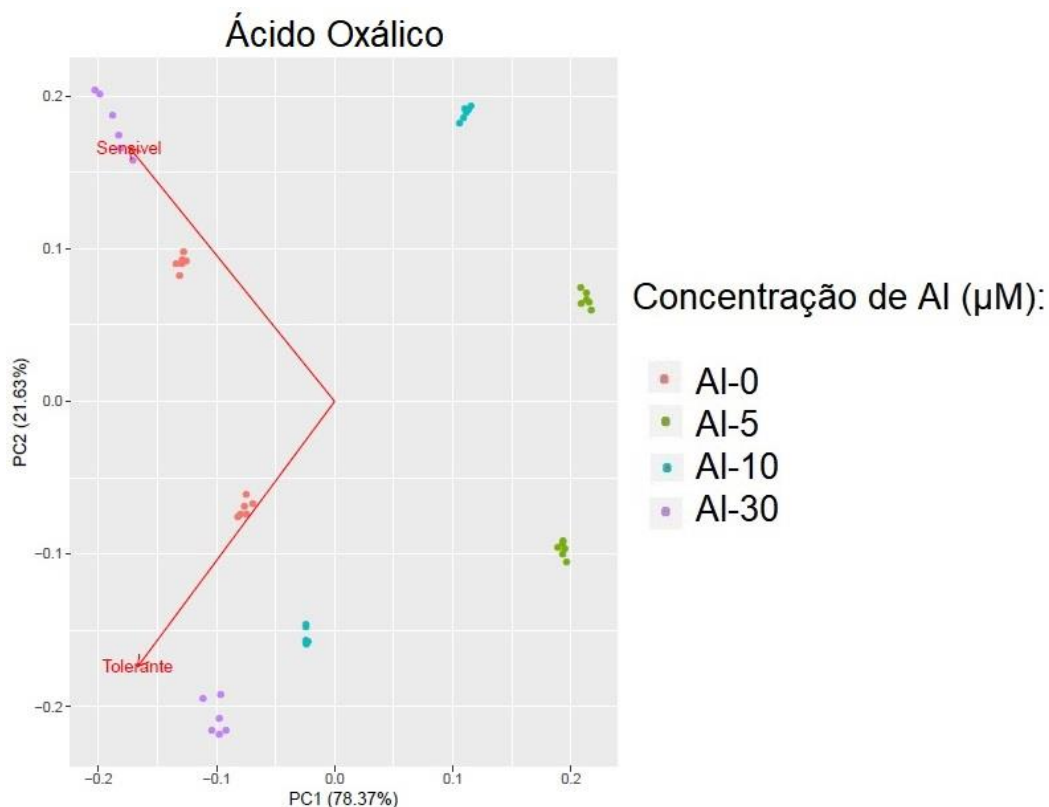


Figura 14: Análise PCA das cultivares sensíveis (ANAHUC 75) e tolerante (JAC5) de acordo com o Ácido Oxálico exsudado com relação ao meio de cultura sólido e líquido de acordo com as concentrações de Al^{+3} (μM).

Nota-se que o vetor Sensível apresenta um ângulo maior que 90° ao vetor Tolerante. Assim, é possível observar que existe o agrupamento AI-30 (μM) convergindo ao sentido do vetor sensível e o agrupamento AI-0 (μM) com, tanto um grupo próximo ao vetor Tolerante quanto outro grupo próximo ao vetor Sensível. Para os demais agrupamentos, existe uma baixa correlação entre as cultivares, meios e as respectivas concentrações. Visto que eles estão na direção oposta da projeção dos autovetores e autovalores sugerindo uma ampla diferença entre as cultivares estudados para a exsudação do ácido oxálico.

Para o ácido succínico, a sua componente destacada por PC1 da figura 15 apresenta uma variância total de 86,63% em relação a mostra de dados e nesse caso indica que esta percentagem explica e interpreta a componente principal PC1 para a totalidade desses dados. Concomitantemente a essa componente, no eixo PC2 tem-se 13,37%, envolvendo a interpretação complementar ao eixo da PC1 totalizando 100% da projeção dos dados nos eixos. É possível observa que originou dois vetores

em vermelho (Sensível e Tolerante). Ambos vetores, representam a projeção dos dados coletados na direção dos seus autovetores e autovalores da variância.

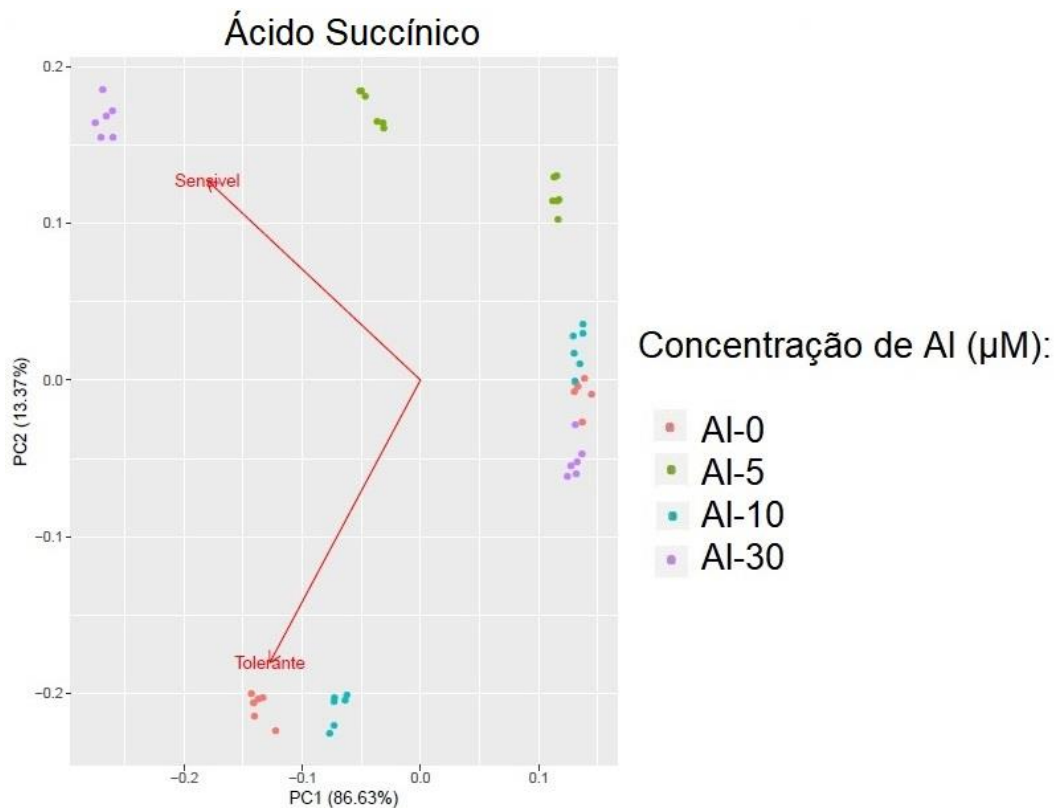


Figura 15: Análise PCA das cultivares sensíveis (ANAHUC 75) e tolerante (JAC5) de acordo com o Ácido Succínico exsudado com relação ao meio de cultura sólido e líquido de acordo com as concentrações de Al^{+3} (μM).

É possível observar que o vetor Sensível também apresentou um ângulo maior que 90° ao vetor Tolerante. Com isso, avalia-se que o agrupamento AI-30 (μM) também está convergindo ao sentido do vetor sensível e o agrupamento AI-0 (μM) ao vetor Tolerante. Ambos estes agrupamentos foram observados de forma direcional na projeção de dados do ácido oxálico demonstrado na figura 13. Já os demais agrupamentos, existe uma baixa correlação entre as cultivares, meios e as respectivas concentrações. Visto que eles igualmente estão na direção oposta da projeção dos autovetores e autovalores sugerindo grande diferença entre as cultivares estudados para a exsudação do ácido succínico.

Visto tudo isso, nota-se que para os PCAs geral elaborados nas análises das figuras 14 e 15, constata a diferença significativa das cultivares sensíveis (ANAHUC 75) e tolerantes (JAC5) das sementes de trigo.

Locupletando-se as análises, foi gerado um agrupamento *biplot* com todos os dados como mostra a figura 16.

Para tanto foi elaborado um PCA com gráfico *biplot* para todas as colunas e linhas (NxM) das matrizes de PCA obtendo na componente principal (PC1) 72,27% e 23,31% na segunda componente, respectivamente. A Figura acima é uma razoável aproximação em duas dimensões uma vez que cerca de 95,58% dos dados originais estão sendo projetados nas duas dimensões do PC1 e PC2.

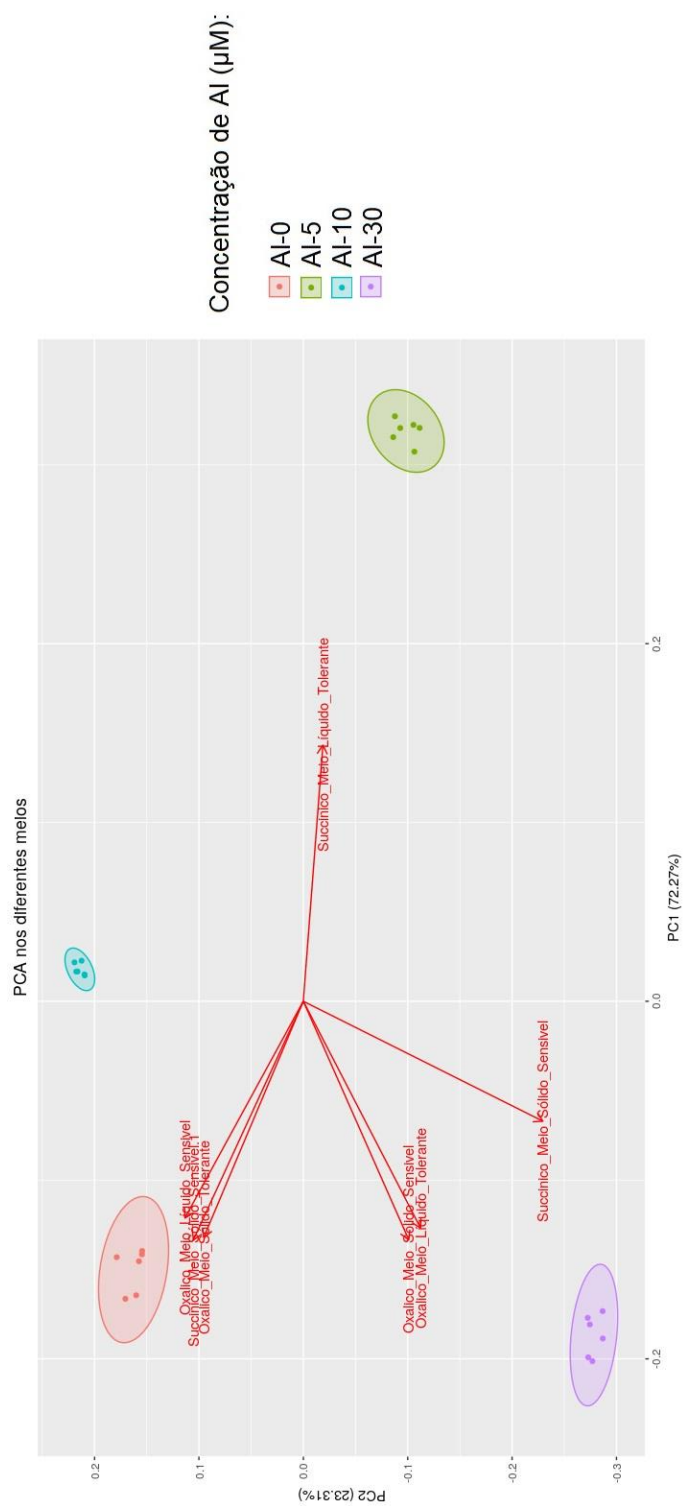


Figura 16: : Análise PCA gerado em um gráfico *biplot* das cultivares sensíveis (ANAHUC 75) e tolerante (JAC5) de acordo com o Ácido Succínico exsudado com relação ao meio de cultura sólido e líquido de acordo com as concentrações de Al³⁺ (μM).

Para tanto foi elaborado um PCA com gráfico *biplot* para todas as colunas e linhas (NxM) das matrizes de PCA obtendo na componente principal (PC1) 72,27% e 23,31% na segunda componente, respectivamente. A Figura acima é uma razoável aproximação em duas dimensões uma vez que cerca de 95,58% dos dados originais estão sendo projetados nas duas dimensões do PC1 e PC2.

É possível verificar que a concentração de Al com 5 μM se torna mais tolerante apenas para o ácido succínico quando o meio é líquido. O agrupamento Al-30 μM encontra-se entre os vetores Oxálico-Meio-Sólido-Sensível, Oxálico-Meio-Líquido-Tolerante e Succínico-Meio-Sólido-Sensível. Por outro lado, nota-se que o ácido oxálico no meio líquido e sólido estão correlacionados sugerindo que, nesse caso o meio não interfere na sensibilidade ou tolerância estudada para valores de concentrações de Al 0 μM . E por fim, para o agrupamento AL-10 μM é importante ressaltar que ele se encontra na direção oposta da projeção dos autovetores sugerindo, para esta concentração uma grande diferença entre as cultivares estudados e entre os AOs exsudados.

Na tabela 07, quando se representa os valores brutos da somatória dos AOs encontrados por cultivar e por meio, percebe-se uma inversão de exsudação tanto com relação ao tipo da cultivar, como com relação ao tipo de meio de cultura utilizado. Isso mostra que o papel da difusão dos compostos no meio pode regular a taxa de excreção dos AOs, pois o meio sólido apresenta uma taxa de difusão menor por gerar um gradiente em torno da raiz, assim como também o meio gerará uma resistência à dispersão, o que traz como características próximas da do ambiente terrestre. Já o meio líquido apresentará uma taxa de difusão maior, pois os AOs liberados serão diluídos no meio e não conseguirão criar um gradiente em torno da raiz para formar uma interface.

Tabela 7: Comparação da cultivar e o meio de acordo com a [Al]. Legenda: ○: valor bruto menor; ●: valor bruto maior.

	Meio Sólido	Meio Líquido
[$\mu\text{M Al}$]	Sensível ANAHUC75	Sensível ANAHUC75
0	○	●
5	●	○
10	●	○
30	●	○
[$\mu\text{M Al}$]	Tolerante JAC5	Tolerante JAC5
0	●	○
5	●	○
10	●	○
30	○	●

As concentrações transitórias destes metabólitos na interface do ápice radicular, de acordo com [CANARINI et al 2019](#), podem servir como indicador para o reconhecimento do ambiente pelas plantas e sinalização entre raízes e regiões de brotamento para modificar o crescimento da raiz e a alocação de carbono.

Em todas as amostras analisadas foram encontrados diferentes tipos de ácidos graxos. Para qualificação, foi confeccionada uma curva qualitativa de padrões de ácido láurico, mirístico, palmítico, oleico, linoleico, esteárico. Dentre estes ácidos graxos, foram encontrados o ácido láurico, mirístico, palmítico, oleico e esteárico. Encontrou-se também o ácido linolênico e ácido glutárico, no entanto, eles foram identificados pelo *software* do cromatógrafo com base na *NIST*. Para todos esses ácidos graxos seriam necessários mais estudos a fim de saber quais papéis eles desempenham e se eles estão ligados à exsudação da raiz ou se foram liberados pela semente.

4. Discussão

Um dos mecanismos principais que controlam a disponibilização dos nutrientes e metais do solo é a adsorção (Freitas, I. C. V. et al 2010). Este fenômeno físico-químico significa o acúmulo de um determinado elemento ou substância na interface entre a superfície sólida e a solução adjacente (Sposito, 1989), no qual uma substância é acumulada numa interface entre fases caracterizando um coloide.

O solo representa um controlador natural da biodisponibilidade de metais, e os fatores que conduzem sua capacidade em retê-los são extremamente complexos, dificultando a possibilidade de se efetuar previsões acerca do comportamento desses elementos, principalmente a longo prazo (Oliveira; Mattiazzo, 2001).

Com relação ao processo de adsorção, é considerado o mais importante processo regulador da concentração de metais na solução do solo. As reações de adsorção-dessorção de metais nas superfícies dos constituintes coloidais do solo são consideradas responsáveis pela concentração na solução do solo e conseqüentemente pela disponibilidade às plantas (Swift; McLaren, 1991).

O ágar, se apresenta como um fito-coloide com característica não celulósica (Lopes; Lobo; Costa, 2005; Correia 2016). Sua propriedade de formar gel atóxico ocorre devido aos três átomos de hidrogênio em sua estrutura, que limitam a formação de uma hélice pela molécula (Raphael, 2010). Por apresentar uma carga levemente negativa, a solução de ágar apresenta uma estabilidade dependente da hidratação e carga elétrica. O seu elevado grau de permeabilidade é evidenciado facilmente quando em concentrações entre 0,5% e 2,5%, são utilizados para separação de moléculas de ácidos nucleicos de diferentes tamanhos, bem como para a verificação da qualidade de DNA ou RNA de uma amostra (Fani, 2008).

Sendo assim, é possível verificar que o ágar compreende um meio de cultura fisicamente e estruturalmente muito mais próximo ao solo que as soluções nutritivas líquidas, visto que, o ágar é capaz de formar gradientes de concentrações de bases trocáveis como ocorre no solo.

No entanto, a solução nutritiva líquida não apresenta essa capacidade de formar um gradiente estável, sendo que de tal modo, os complexos AO:Al tenderiam a se diluir e novas espécies de Al³⁺ tóxico tenderiam a se transportar novamente para o apoplasto da raiz, possivelmente intensificando o processo de toxicidade.

Dos quatro ácidos orgânicos esperados, somente o ácido oxálico e o ácido succínico foram encontrados nas amostras, no entanto, de acordo com [Delhaize, et al., \(1993\)](#) e [Ryan et al. \(2001\)](#), o malato e o citrato são os dois AOs encontrados em maiores concentrações liberados das raízes de cultivares de trigo. Devido ao fato de que os AOs esperados não terem sido exsudado no período de oito dias, acredita-se que este longo tempo de permanência, quando comparado com os experimentos de [Delhaize, et al., \(1993\)](#) e [Ryan et al. \(1995\); \(2001\)](#) que apresentam uma duração média de 4 a 8 horas, ative outros mecanismos metabólicos de respostas para dar prioridade a outros AOs.

Com relação às análises estatísticas, o teste ANOVA fatorial a x b (com replicação) confirmou que para a exsudação do ácido succínico em ambas as cultivares, os dois tipos de meio de cultura estudados apresentaram diferenças significativas quanto aos seus comportamentos. No entanto, no que diz respeito ao ácido oxálico, para a cultivar sensível, não houve diferenças no processo de exsudação deste ácido quando comparado os meios de cultura. Mas, para este mesmo AO, na cultivar tolerante, as respostas dos exsudatos foram significativamente diferentes. Para tanto, as análises não paramétricas feitas para todos os tratamentos confirmaram estes resultados obtidos.

No que diz respeito ao comportamento das concentrações de Al trabalhadas para cada meio de cultura com relação a cada cultivar, foi estudado com análises de agrupamento e análises de componentes principais.

Pelo fato de todos os PCAs terem apresentado agrupamentos de concentrações de Al contrários aos vetores resultantes, que representam a tendência de comportamento do meio sólido e do meio líquido, isso mostra que em todas as comparações de AOs e meio de cultura apresentam uma instabilidade confirmada quimiometricamente pela PCA, o que biologicamente quer dizer que os meios de

cultura trabalhados, tanto sólido quanto líquido, são diferentes e podem induzir respostas de exsudação quanto à concentração de exsudato díspares no mesmo tratamento ([Al]). O que é possível verificar quando observado a descrição do PCA *biplot* e a inversão dos valores brutos da somatória dos AOs exsudados.

5. Conclusão

De acordo com o presente trabalho foi possível verificar as diferenças significativas entre as cultivares de sementes de trigo sensíveis (ANAHUC 75) e tolerantes (JAC5) ao Al, bem como as disparidades quando cultivados nas mesmas condições nutritivas, mas em aspectos físicos diferentes, sendo eles sólidos e líquidos. Sendo assim, baseado em análises cromatográficas e estatísticas pode-se concluir que o estado físico do meio de cultura interfere expressivamente na resposta de exsudação de ácidos orgânicos pelas raízes da planta.

Referências

- Barceló J, Poschenrieder C** (2002) Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. *Env. Exp. Bot.* **48**: 75-92
- Bohnen, H.** Acidez e calagem. In: GIANELLO, C., BISSANI, C. A., TEDESCO, M. J. (eds.) *Princípio de fertilidade de solo*. Porto Alegre: Dep. de Solos. Fac. de Agronomia. UFRGS, 1995. P. 51-76.
- Brunner I, Sperisen C** (2013) Aluminum exclusion and aluminum tolerance in woody plants. *Front Plant Sci* **4**: 1-12
- Canarini, Alberto et al.** Root exudation of primary metabolites: mechanisms and their roles in plant responses to environmental stimuli. *Frontiers in Plant Science*, v. 10, 2019.
- Correia, Marília Ferreira.** Produção e caracterização físico-química de filmes a base de colágeno bovino, ágar-ágar e agarose. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
- De la Fuente, J.M., Ramirez-Rodriguez, V., Cabrera-Ponce, J.L., Herrera-Estrella, L.,** 1997. Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science* 276 (5318), 1566–1568.
- Degenhardt, J., Larsen, P. B., Howell, S. H., & Kochian, L. V. (1998).** Aluminum Resistance in the Arabidopsis Mutant *atr-104* Is Caused by an Aluminum-Induced Increase in Rhizosphere pH. *Plant Physiology*, 117(1), 19-27.
- Delhaize, E., Ryan, P.R., Randall, P.J.,** (1993). Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) (II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices). *Plant Physiol.* 103 (3), 695–702.
- Delhaize, Emmanuel et al.** Engineering high-level aluminum tolerance in barley with the ALMT1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 101, n. 42, p. 15249-15254, 2004.
- Fani, Márcia.** Agar-Agar - O mais antigo fitocolóide. *Aditivos & Ingredientes*. São

Paulo: Editora Insumos Ltda., v.56, mai/jun. 2008. 31p.

- FREITAS, Isael Cristina Vinhal et al.** Adsorção e dessorção de metais no solo e coeficientes de isotermas de Freundlich e Langmuir. *Agropecuária técnica*, v. 31, n. 2, 2010.
- Gupta, N., Gaurav, S.S., Kumar, A., 2013.** Molecular basis of aluminium toxicity in plants: a review. *Amer J. Plant Sci.* 4, 21–37, 21.
- Hartwig, Irineu et al.** Mecanismos associados à tolerância ao alumínio em plantas. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 28, n. 2, p. 219-228, 2007.
- Horst WJ, Wang Y, Eticha D (2010)** The role of the root apoplast in aluminium-induced inhibition of root elongation and in aluminium resistance of plants: a review. *Ann Bot* **106**: 185–197.
- Jones, D. L.; Kochian, L. V.** Aluminum inhibition of the inositol 1,4,5-triphosphate signal transduction pathway in wheat roots: a role of aluminum toxicity. *Plant Cell*, Rockville, v.7, n.11, p.1913-1922, 1995.
- Jones, U.S.** Fertilizers e soil fertility. Reston: Reston.1979. 368p.
- Kochian L V., Hoekenga OA, Piñeros MA (2004)** How Do Crop Plants Tolerate Acid Soils? Mechanisms of Aluminum Tolerance and Phosphorous Efficiency. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 459–493
- Kopittke PM, Blamey FPC, Menzies NW (2008)** Toxicities of soluble Al, Cu, and La include ruptures to rhizodermal and root cortical cells of cowpea. *Plant Soil* **303**: 217–227
- Kopittke, P. M., Moore, K. L., Lombi, E., Gianoncelli, A., Ferguson, B. J., Blamey, F. P. C., ... & Gresshoff, P. M. (2015).** Identification of the primary lesion of toxic aluminum in plant roots. *Plant Physiology*, 167(4), 1402-1411.
- Laerd Statistics - Kruskal-Wallis H Test in SPSS Statistics | Procedure, output and interpretation of the output using a relevant example.** *statistics.laerd.com*. Consultado em 4 de abril de 2019
- Li, X. F., Ma, J. F., & Matsumoto, H. (2000).** Pattern of aluminum-induced secretion

of organic acids differs between rye and wheat. *Plant physiology*, 123(4), 1537-1544.

Lopes, Carla Martins; Lobo, José Manuel Sousa; Costa, Paulo. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, Porto, v. 41, n. 2, p.143-155, abr. 2005. Trimestral.

Lopez-Bucio, J., Nieto-Jacobo, M.F., Ramirez-Rodriguez, V., Herrera-Estrella, L., (2000). Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. *Plant Sci.* 160 (1), 1–13.

Ma, J. F. (2000). Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants.

Ma, J.F., (2007). Syndrome of aluminum toxicity and diversity of aluminum resistance in higher plants. *Int. Rev. Cytol.* 264, 225–252

Ma, J.F., Ryan, P.R., Delhaize, E., 2001. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends Plant Sci.* 6 (6), 273–278.

Ma, J. F., Taketa, S., & Yang, Z. M. (2000). Aluminum tolerance genes on the short arm of chromosome 3R are linked to organic acid release in triticale. *Plant Physiology*, 122(3), 687-694.

Ma, J. F., Zheng, S. J., & Matsumoto, H. (1997). Specific secretion of citric acid induced by Al stress in *Cassia tora* L. *Plant and cell physiology*, 38(9), 1019-1025.

Ma, J. F., Zheng, S. J., Matsumoto, H. & Hiradate, S., (1997). Detoxifying aluminum with buckwheat. *Nature*, 390 pp. 569-570. doi:10.1038/37518.

Ma, Z., & Miyasaka, S. C. (1998). Oxalate exudation by taro in response to Al. *Plant Physiology*, 118(3), 861-865.

Malavolta, E. Elementos de nutrição mineral de plantas. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1980. 251 p.

Matsumoto, H., 2000. Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. *Int. Rev. Cytol.* 200, 1–46.

De Mesquita Lopes, Manuela; Branco, Verônica Teixeira Franco Castelo; Soares, Jorge Barbosa. Utilização dos testes estatísticos de Kolmogorov-Smirnov e

Shapiro-Wilk para verificação da normalidade para materiais de pavimentação. **Transportes**, v. 21, n. 1, p. 59-66, 2013.

Miyasaka, S. C., Buta, J. G., Howell, R. K., & Foy, C. D. (1991). Mechanism of aluminum tolerance in snapbeans: root exudation of citric acid. *Plant physiology*, 96(3), 737-743.

Mossor-Pietraszewska, T. (2001). Effect of aluminium on plant growth and metabolism. *ACTA BIOCHIMICA POLONICA-ENGLISH EDITION*-, 48(3), 673-686.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Agar, CID=71571511, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Agar> (accessed on July 31, 2019)

Nunes-Nesi, A., Brito, D.S., Inostroza-Blancheteau, C., Fernie, A.R., Araújo, W.L., 2014. The complex role of mitochondrial metabolism in plant aluminum resistance. *Trend Plant Sci.* 19 (16), 399–407.

Nogueira S dos SS, Nagai V, Carelli MLC, Fahl JI (1989) Comportamento de porta-enxertos de citros em presença do alumínio. *Pesqui Agropecuária Bras* **24**: 3–8.

Oliveira, F.C.; Mattiazzo, M.E. Mobilidade de metais pesados em um Latossolo Amarelo distrófico tratado com lodo de esgoto e cultivado com canade-açúcar. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, v.58, n.4, p.807-812, 2001.

De Oliveira Carvalho, Brenda Mistral; Zanao Filho, S. ; Silva, Marcela Paula ; Habermann, Gustavo . Method for quantification of organic acids in root tips using GCMS.. In: XXXI Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, 2016, Corrientes. XXXI Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Resistência: Eudene, 2016. p. 205-205.

Palma, M.S; Delazari dos Santos, L.; Material de apoio de formação de recursos humanos em análise proteômica. Rio Claro, UNESP/CEIS; 2010.

Panda, S.K., Matsumoto, H., 2007. Molecular physiology of aluminum toxicity and tolerance in plants. *Bot. Rev.* 73 (4), 326–347.

Peleg Z, Fahima T, Korol A, Abbo S, Saranga Y. Genetic analysis of wheat

- domestication and evolution under domestication. *J Exp Bot* 2011; 62: 5051-5061.
- Pellet, D. M., Grunes, D. L., & Kochian, L. V. (1995).** Organic acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). *Planta*, 196(4), 788-795.
- Pereira WE, Siqueira DL de, Puiatti M, Martínez CA, Salomão LCC, Cecon PR** (2003) Growth of *Citrus* rootstocks under aluminium stress in hydroponics. *Sci Agric* **60**: 31-41
- Raphael, Ellen.** Estudo de eletrólitos poliméricos à base de ágar para aplicação em dispositivos eletrocromáticos. 2014. 147 f. Curso de Físico-química Orgânica, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.
- Ryan PR, Delhaize E, Randall PJ** (1995) Characterization of Al-stimulated efflux of malate from the apices of Al-tolerant wheat roots. *Planta* 196:103–110
- Santos CH dos, Grassi-Filho H, Rodrigues JD, Pinho SZ de** (1999) Níveis de alumínio e acúmulo de macronutrientes em porta-enxertos cítricos em cultivo hidropônico. *Sci Agric* **56**: 1165–1175
- Sarruge JR, Haag HP** (1974) Análises químicas em plantas, Esalq Piracicaba
- Sigma-Aldrich**
<https://www.sigmaaldrich.com/Graphics/COofAInfo/SigmaSAPQM/SPEC/11/114359/114359-BULK_SIAL_.pdf> Acesso 30/07/2019.
- Shewry PR.** Wheat. *J Exp Bot* 2009; 60: 1537-1553.
- Silva, I. R.; Smyth T. J.; Moxley, D. F.; Carter, T. E.; Allen, N. S.; Ruffy, T. W.** 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.
- Silva, I.R., Smyth, T.J., Raper, C.D., Carter, T.E., Ruffy, T.W.,** 2001. Differential aluminum tolerance in soybean: an evaluation of the role of organic acids. *Physil. Plant*. 112 (2), 200–210.
- Silva, S.,** (2012). Aluminium toxicity targets in plants. *J. Bot.* 2012, 8, 219462.
- Sposito, G.** The chemistry of soils. New York: Oxford University Press, 1989. 234p.

- Sujatha, K., Mehar, S.K., 2015.** Toxic effects of aluminium in plants. *Ind. J. Plant Sci.* 4 (1), 1–4.
- Swift, R.S.; R.G. McLaren.** Micronutrient adsorption by soils and soil colloids. In BOLT, G.H.; DE BOODT, M.F.; HAYES, M.H.B.; McBRIDE, M.B. (Ed.). Kluwer Academic Publ., Dordrecht, the Netherlands: Interactions at the soil colloid-soil solution interface. 1991. cap. 9, p. 257-292.
- Taylor, G.J., Foy, C.D., 1985.** Mechanisms of aluminum tolerance in *Triticum aestivum* (wheat). IV. The role of ammonium and nitrate nutrition. *Can J. Bot.* 63 (12), 2181–2186.
- Taylor, G. J.; McDonald-Stephens, J. L.; Hunter, D. B.; Bertsch, P. M.; Elmore, D.; Rengel, Z.; Reid, R. J.** Direct measurement of aluminum uptake and distribution in single cells of *Chara corallina*. *Plant Physiology*, Rockville, v.123, n.3, p.987-996, 2000.
- von Uexküll HR, Mutert E (1995)** Global extent, development and economic impact of acid soils. *Plant Soil* **171**: 1–15
- Vitorello VA, Capaldi FR, Stefanuto VA (2005)** Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. *Braz J. Plant Physiol* **17**: 129-143
- Yamamoto, Y., Kobayashi, Y., Devi, S.R., Rikiishi, S., Matsumoto, H., (2002).** Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiol.* 128 (1), 63–72.
- Yang Y, Ji C, Ma W, Wang S, Wang S, Han W, Mohammat A, Robinson D, Smith P.** Significant soil acidification across northern China's grasslands during 1980s–2000s. *Global Change Biol* 2012; 18: 2292–2300.
- Yang, Z. M., Sivaguru, M., Horst, W. J., & Matsumoto, H. (2000).** Aluminium tolerance is achieved by exudation of citric acid from roots of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum*, 110(1), 72-77.
- Zhang, W.H.; Rengel Z.** Aluminium induces an increase in cytoplasmic calcium in intact wheat root apical cells. *Australian Journal of Plant Physiology*, Collingwood, v.26, n.5, p.401-409, 1999.

Anexo I

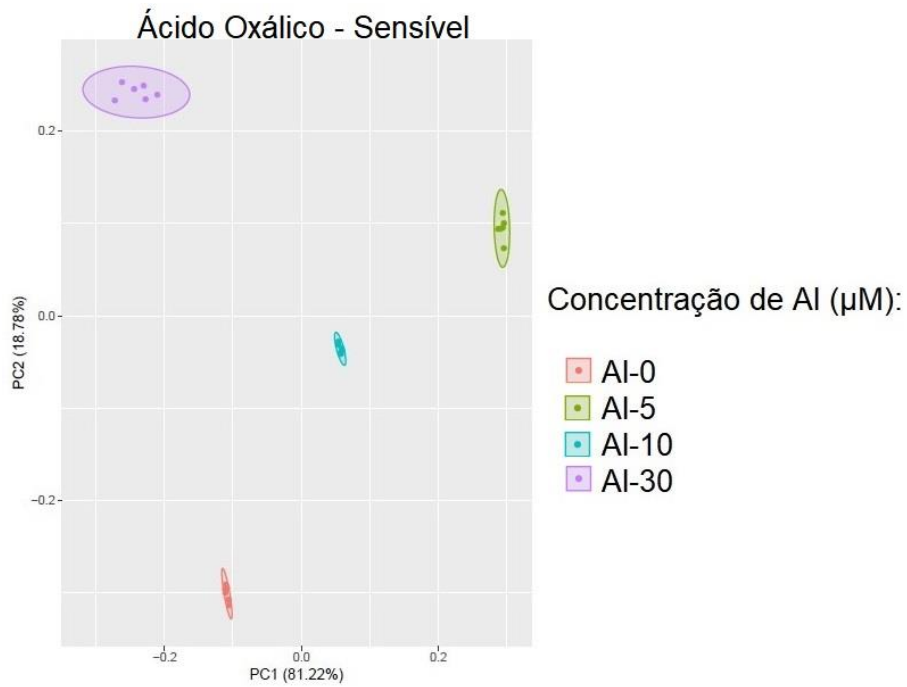


Figura 17: Agrupamento referente à análise PCA das cultivares sensível (ANAHUC75) de acordo com o Ácido Oxálico exsudado com relação ao tipo de meio de cultura e concentrações de Al+3 (μM).

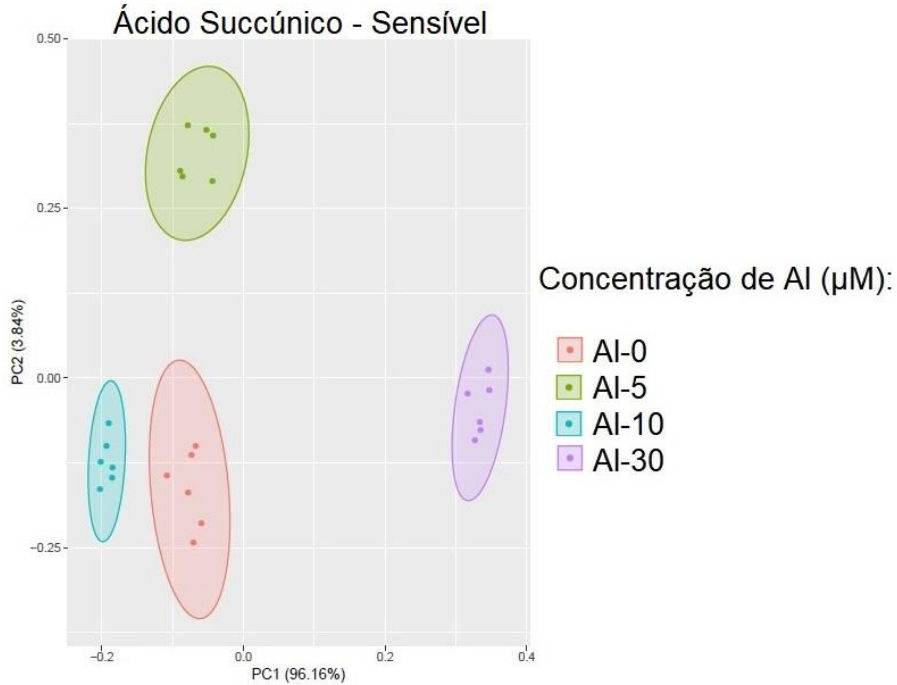


Figura 18: Agrupamento referente à análise PCA das cultivares sensível (ANAHUC75) de acordo com o Ácido Succínico exsudado com relação ao tipo de meio de cultura e concentrações de Al+3 (μM).

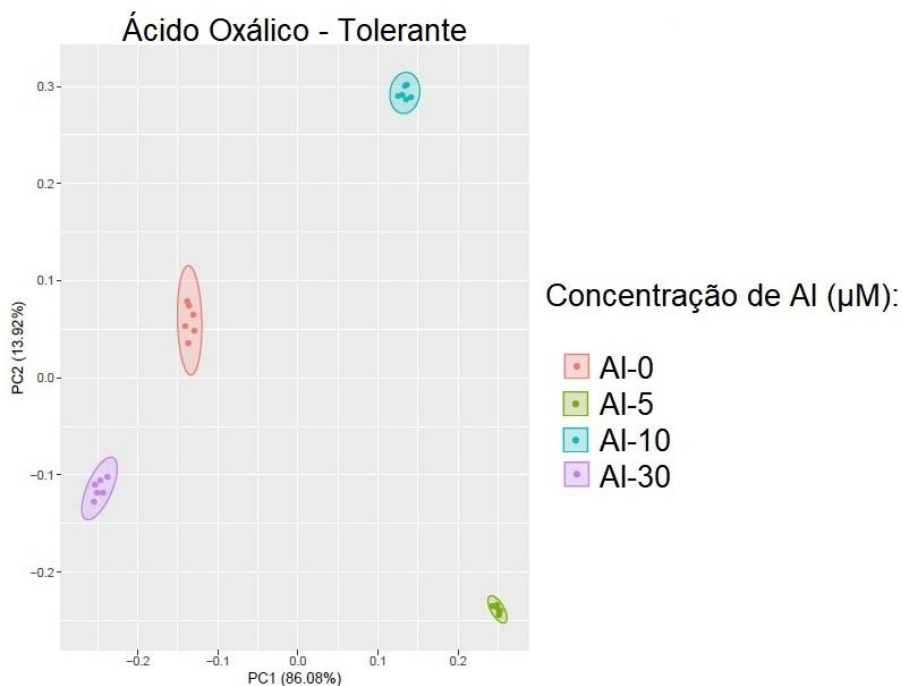


Figura 19: Agrupamento referente à análise PCA das cultivares tolerante (JAC5) de acordo com o Ácido Oxálico exsudado com relação ao tipo de meio de cultura e concentrações de Al+3 (μM).

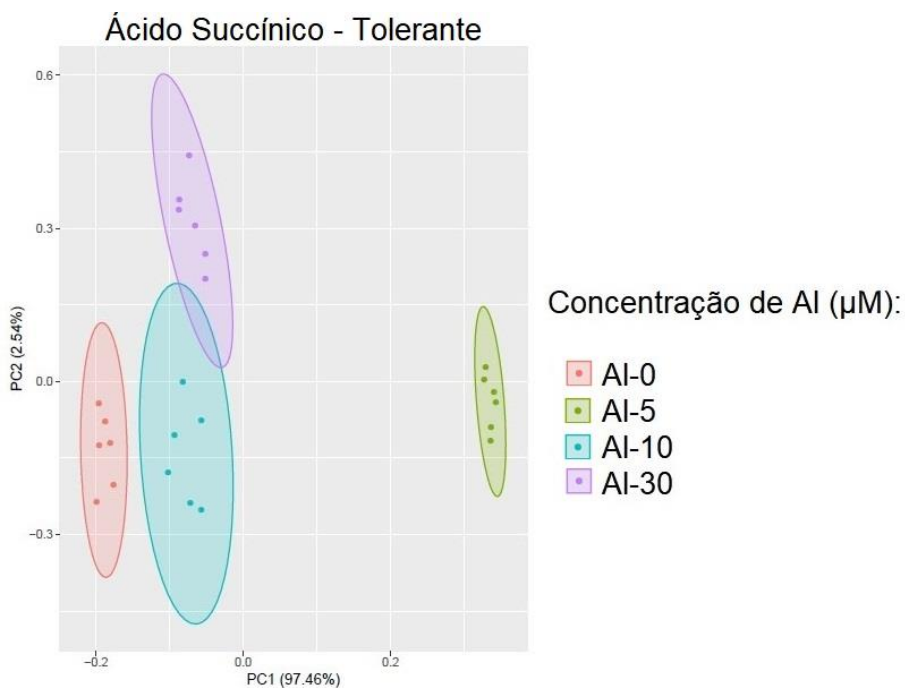


Figura 20: Agrupamento referente à análise PCA das cultivares tolerante (JAC5) de acordo com o Ácido Succínico exsudado com relação ao tipo de meio de cultura e concentrações de Al+3 (μM).

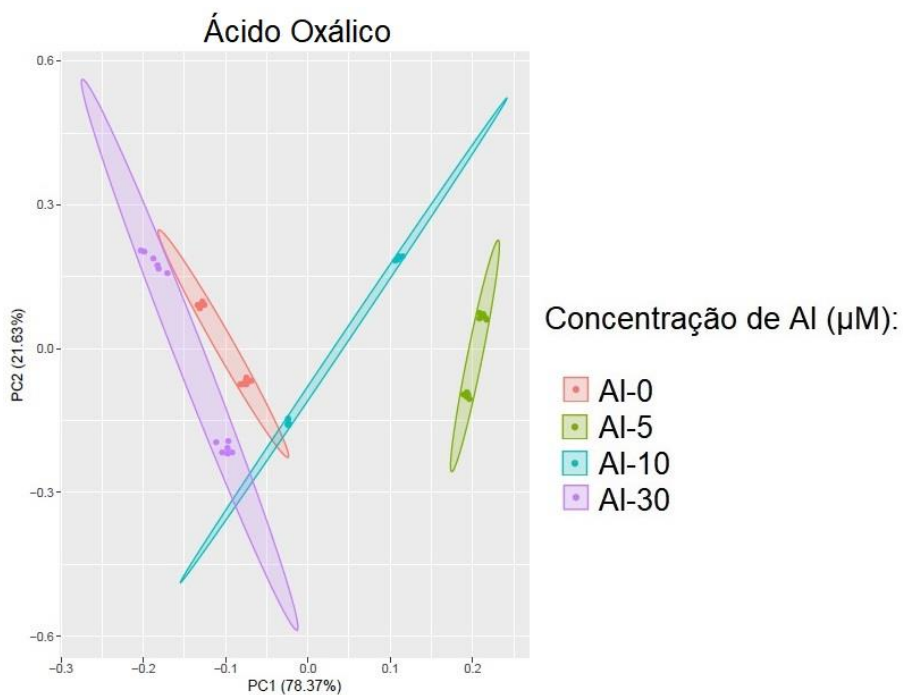


Figura 21: Agrupamento referente à análise PCA das cultivares sensíveis (ANAHUC 75) e tolerante (JAC5) de acordo com o Ácido Oxálico exsudado com relação ao meio de cultura sólido e líquido de acordo com as concentrações de Al³⁺ (μM).

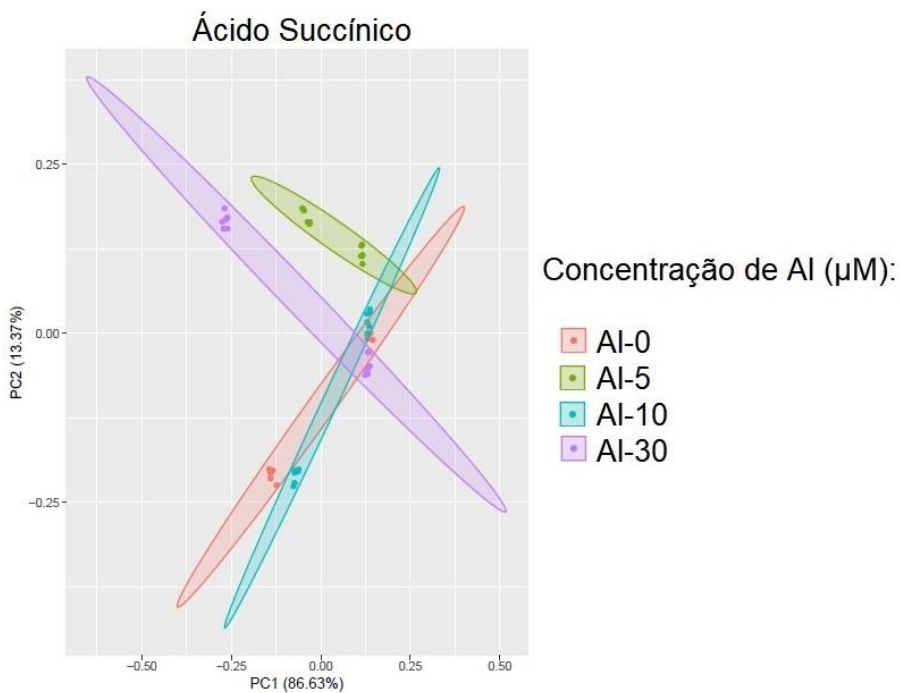


Figura 22: Agrupamento referente à análise PCA das cultivares sensíveis (ANAHUC 75) e tolerante (JAC5) de acordo com o Ácido Succínico exsudado com relação ao meio de cultura sólido e líquido de acordo com as concentrações de Al³⁺ (μM).