

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**MECANISMOS DE TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM PLANTAS DE
QUINOA**

Emilaine da Rocha Prado

Engenheira Agrônoma

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**MECANISMOS DE TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM PLANTAS DE
QUINOA**

Emilaine da Rocha Prado

Orientadora: Profa. Dra. Priscila Lupino Gratão

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Produção Vegetal).

P896m Prado, Emilaine da Rocha
Mecanismos de tolerância ao alumínio em plantas de quinoa /
Emilaine da Rocha Prado. -- Jaboticabal, 2023
64 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Priscila Lupino Gratão

1. Fisiologia vegetal. 2. Bioquímica. 3. Estresse oxidativo. 4.
Toxicidade metal em plantas. 5. Alumínio em plantas. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

IMPACTO ESPERADO NA SOCIEDADE

Os resultados do presente estudo possibilitam o posicionamento da cultura da quinoa, cultivar BRS Piabiru em ambientes ácidos com presença de alumínio disponível na concentração de até 0,2 mg L⁻¹.

A quinoa é um cereal interessante sob inúmeros aspectos. Em 2012 foi reconhecido pela ONU como alimento para segurança nutricional, dado os altos teores de proteína, contempla todos os aminoácidos essenciais para ingestão humana, além de não conter glúten nos seus grãos.

A Embrapa Cerrado lançou a cultivar de quinoa BRS Piabiru como alternativa de cultivo na entressafra e 2º. cultivo no centro-oeste brasileiro, notoriamente solos ácidos com alta disponibilidade de alumínio tóxico. Até a data de divulgação da presente pesquisa, não se tinha conhecimento acerca da tolerância desta espécie nestas condições. Assim, os resultados do nosso estudo constituem base para implementação da quinoa BRS Piabiru no cerrado brasileiro, o que possibilita vantagens de ordem fitossanitária, com a rotação de culturas como alternativa a soja e milho; impacto de ordem econômica, dado o preço atrativo da quinoa no mercado nacional e demanda em expansão, com possibilidade ainda de alternativa de renda de grupos vulneráveis, o que cumpre também sua função social. Neste aspecto, tem-se também o papel do grão na promoção de segurança alimentar, social, ambiental e ainda, pode-se favorecer a produção de silagem, farelos e uso gastronômico de alta qualidade, dada a excepcionalidade nutricional dos grãos de quinoa.

Por fim, com os resultados da pesquisa há contribuição para expansão da cultura no Brasil, inclusão de alimentos com alto valor nutricional na dieta dos brasileiros, contribui ainda para agricultura mais sustentável e inclusiva, além de constituir-se estudo pioneiro para fomentação de inovações na área, sendo um dos grandes desafios da produção de alimentos contemporânea e Objetivos Do Desenvolvimento Sustentável das Nações Unidas [SDG 2; SDG 3 e SDG9] (ONU, 2023).

EXPECTED IMPACT ON SOCIETY

The results of the present study allow the positioning of the quinoa culture, cultivar BRS Piabiru, in acidic environments with the presence of available aluminum at concentrations of up to 0.2 mg L⁻¹.

Quinoa is an interesting cereal in many ways. In 2012 it was recognized by the UN as a food for nutritional security, given its high protein content, it includes all the essential amino acids for human intake, in addition to not containing gluten in its grains. Embrapa Cerrado launched the quinoa cultivar BRS Piabiru as an alternative for cultivation in the off-season and 2nd. cultivation in the Brazilian Midwest, notoriously acidic soils with high availability of toxic aluminum. Until the date of disclosure of this research, there was no knowledge about the tolerance of this species under these conditions. Thus, the results of our study constitute the basis for the implementation of BRS Piabiru quinoa in the Brazilian cerrado, which enables phytosanitary advantages, with crop rotation as an alternative to soy and corn; economic impact, given the attractive price of quinoa in the national market and expanding demand, with the possibility of an alternative income for vulnerable groups, which also fulfills its social function. In this aspect, there is also the role of the grain in promoting food, social and environmental security, and it can also favor the production of silage, bran and high-quality gastronomic use, given the nutritional exceptionality of quinoa grains.

Finally, with the results of the research there is a contribution to the expansion of culture in Brazil, the inclusion of foods with high nutritional value in the diet of Brazilians, it also contributes to a more sustainable and inclusive agriculture, in addition to constituting a pioneering study for the promotion of innovations in area, being one of the great challenges of contemporary food production and the Sustainable Development Goals of the United Nations [SDG 2; SDG 3 and SDG9] (UN, 2023).



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: MECANISMOS DE TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM PLANTAS DE QUINOA

AUTORA: EMILAINE DA ROCHA PRADO

ORIENTADORA: PRISCILA LUPINO GRATÃO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Agronomia (Produção Vegetal), pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. PRISCILA LUPINO GRATÃO (Participação Virtual)
Departamento de Biologia / FCAV UNESP Jaboticabal

Prof. Dr. RAFAEL FERREIRA BARRETO (Participação Virtual)
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/UFMS / Chapadão do Sul/MS

Documento assinado digitalmente

RAFAEL FERREIRA BARRETO
Data: 28/04/2023 18:33:53-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Pós-doutoranda GELZA CARLIANE MARQUES TEIXEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Ciências da Produção Agrícola / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente

GELZA CARLIANE MARQUES TEIXEIRA
Data: 28/04/2023 15:57:11-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Jaboticabal, 28 de abril de 2023

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

EMILAINE DA ROCHA PRADO – Jaboticabal – SP. Nasceu em 24 de junho de 1988 em Ituverava, São Paulo, Brasil. Filha de Lidiani da Rocha Prado e Renato de Mello Prado. No ano de 2016 ingressou no curso de agronomia na Universidade Estadual Paulista (Unesp), câmpus de Jaboticabal – SP. Durante a graduação participou de alguns projetos e grupos de pesquisa. No ano de 2016 ingressou no projeto de extensão Hortaliças, que visa possibilitar aos alunos conhecimentos para aplicação prática na condução de horta, cujos produtos eram doados para entidades assistenciais de Jaboticabal e de Taiúva. Ao fim do mesmo ano, realizou Estágio/Treinamento Laboratorial com ênfase na Fisiologia do Estresse em Plantas Cultivadas. E nos anos subsequentes, durante a graduação realizou três programas de Iniciação científica, com os seguintes títulos: Etileno e selênio no controle do estresse oxidativo em tomateiro (Bolsista CAPES/PROCAD em 2016); Selenito na biofortificação e controle do estresse oxidativo por cádmio em micro-tomateiro: análises enzimáticas (Iniciação Científica Reconhecida sem Bolsa - ISB/UNESP em 2018) e Selênio e tolerância ao cádmio em micro-tom (Bolsista PIBIC/CNPq em 2019). Em fevereiro de 2021 obteve o título de Engenheira Agrônoma e em março do mesmo ano iniciou o curso de mestrado, junto ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal) na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Realizou monitoria e estágio docência na disciplina de Fisiologia Vegetal ministrada à pós-graduação e investigou os mecanismos de tolerância ao alumínio em plantas de quinoa, com auxílio de ferramentas bioquímicas e da fisiologia do estresse, a partir de análises do sistema antioxidante de defesa.

O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim, terás o que colher.

Cora Coralina

E quando você menos espera, a vida te vira do avesso, e você descobre que o avesso é o seu lado certo.

Caio Fernando Abreu

“Todo caminho da gente é resvaloso. Mas também, cair não prejudica demais. A gente levanta, a gente sobe, a gente volta!... O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem. (...) Ser capaz de ficar alegre e mais alegre no meio da alegria, e ainda mais alegre no meio da tristeza...”

Guimarães Rosa

Ao meu esposo Reginaldo, minha inspiração diária.

Ao nosso filho Rafael, que nasceu ao fim do
mestrado da mamãe e ressignificou nossas vidas. A
minha amada mãe Lidiani: força e ternura, além de
melhor avó do mundo. Ao pai e irmão, Renato e
Renato Jr.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, que sempre nos capacita, e cuja presença se faz palpável desde as ações mais triviais até as bençãos mais extraordinárias. Seja na experiência da maternidade ou na capacidade de explorar e avançar cientificamente. Em ambas, vidas são geradas e salvas todos os dias, a partir desta constante edificação divina.

À minha mãe, meu porto-seguro e inspiração. Me considero uma pessoa de sorte, pois a tenho por perto. Mulher forte, determinada, psicopedagoga, formada no ensino médio com bebê no colo e, década depois, se formou brilhantemente em Pedagogia cuidando (com maestria e excepcionalidade) de um casal de filhos pequenos. E, já na minha adolescência, se especializou em psicopedagogia. Nunca nos faltou um olhar terno, juntamente com rigidez a partir de exemplos de conduta e, acima de tudo, muito amor e ensinamentos. O maior deles, *nunca deixe de estudar, filha*. Te amo, mãe. Agradeço por todas orações e apoio nos momentos mais difíceis. Obrigada também por ser a melhor vovó do mundo! Rafael lhe ama de todo coração, e cresce feliz com a vovó *Lidi* por perto.

Agradeço ao meu esposo e eterno amor, Reginaldo de Oliveira. Fonte de todo meu ânimo e motivação. Por quem nutro profunda admiração: como pessoa altruísta, profissional extremamente ético, marido atencioso e, agora, como melhor pai que Rafael poderia ter. Obrigada amor, por tamanho companheirismo, gentileza e confiança no nosso trabalho.

Ao meu pai, com quem divido a profissão de engenharia agrônoma. Pai obteve o título UFU, em 1995, quando eu tinha 6 anos. E eu, me formei na universidade em que ele é um exímio docente/pesquisador da Nutrição de Plantas. Mas pai não entende só de nutrir plantas. Nutre inspiração, empenho e exemplos diários de dedicação primorosa à profissão. Inspira alunos, inspira a família. Pai é meu exemplo de profissional. Há uma leva de alunos, no Brasil e do exterior, que foram auxiliados por ele, cujo título de mestre ou doutoramento só seria possível por meio dele. Que motiva a 'nunca parar'. *Terminou mestrado? Vamos para o Doutorado. Terminou? Pós doc. Acabou? Pós-doc no exterior*. Às vezes os objetivos claros são

fundamentais para formação plena do discente e futuro profissional da área. Metas tão obstinadas nos motivam. E este ano, prof Renato alcançou a maior de todas as metas: é pesquisador 1A do CNPq. Parabéns, pai. Mais que merecido. Praticamente toda semana tem um novo artigo do Genplant para atualizar o conhecimento na área. O que interessa nisto tudo? Todos os alunos/orientados, sem exceção, consideram a experiência acadêmica com professor Renato imprescindível para o seu crescimento profissional. Meu pai forma mestres e doutores, todos os anos. O que muitos talvez não saibam é que meu pai forma pessoas melhores, mais preparadas não só para o mercado, mas para a vida. Te amo, pai. Obrigada pelo exemplo.

Aos meus amados avós: Vidal e Sebastiana. Vovô Vidal que, no auge dos seus 92 anos (muito bem vividos e repleto de pessoas queridas a sua volta e com uma altivez e disposição de se admirar), tanto me amparou durante a gestação do seu primeiro bisneto. Tenho e guardarei todos santinhos e preces para mostrar o carinho do seu bisavô ao Rafael. Agradeço a torcida e oração também de minha vovó Tianinha, e todos os tios e tias, com os quais divido muitos anseios e que transmitem muito de ‘vivência’ e ternura. Em especial à estrelinha mais linda que nos guia e ilumina lá do céu, desde o segundo ano da minha graduação. Você está presente em cada passo da nossa caminhada, vovó Jair. Sua presença durante todo este percurso acadêmico e no nosso milagre Rafael é evidente e me emociona todos os dias.

Desde a minha graduação, fui privilegiada por ter grandes profissionais por perto. Docentes que sempre me inspiraram. Tive a honra e imensa alegria de conhecer a Profa Dra Priscila Gratão já no primeiro ano do curso de agronomia, apesar de somente ter a disciplina ministrada por ela (Fisiologia Vegetal) dali a 3 semestres. Na época, tinha lido os capítulos de ‘relações hídricas’ e ‘fotossíntese’. Pensei, “como pode ser tão complicado e ao mesmo tempo fascinante?” Munido de somente isto, pedi a orientação, pois gostaria de trabalhar com estresse por Al em cana de açúcar. Me foram apresentados os tomates mutantes, a dissertação da Pri sobre Cádmio, fui coorientada pela exímia Leticia Rodrigues Alves, que me apresentou o poder do selênio, da organização e da verdadeira parceria e amizade. Muitos eventos, trabalhos de campo e bancada, e alguns artigos depois, me encontro de volta ao alumínio.

Por isto, e por toda parceria, confiança e disposição ímpar, agradeço imensamente à melhor orientadora que eu poderia ter. Pri, você inspira e ilumina a

todos a sua volta. Desconheço alma mais generosa e profissional mais competente na área. Te admiro, e todos que lhe conhecem também. Obrigada por tudo!

Aos meus amigos de graduação da UNESP-FCAV, Michele, Maria Helena, Bruna, Milena, Ingrid e Andressa. Agradeço aos meus amigos e companheiros de bancada Rafael, Ricardo Borjas, Mirela, Mariana, Clebson, Letícia. Aos amigos do coração Leandra, Joel, Gelza, Lara, Sara e Regiara. E ainda, ao nosso ‘anjo do laboratório’, Sônia Raymundo. Obrigada Soninha, você estará sempre nas minhas melhores memórias. Agradeço também à minha coorientadora Leticia Rodrigues Alves, cujos ensinamentos e amizade me foram tão valiosos, desde o começo da graduação. Agradeço também pelas orações e torcida da recém dinda Larissa Castro e dindo Zé Pinelli, Vocês são incríveis e nos inspiram diariamente.

A todos meus professores da graduação e do mestrado, em especial ao saudoso professor Itamar (*in memoriam*) e professora Mara Cristina, cujas paixões pelo solo e docência tanto me cativaram e inspirará gerações por anos e anos.

Ao programa de pós-graduação em Agronomia (Produção Vegetal) pela oportunidade de cursar o Mestrado. À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, pela acolhida.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas concedidas deste a graduação. Obrigada pelo apoio financeiro - número do processo 130739/2021-9 -, oferecido pelas instituições fomentadores.

Por fim, especialmente agradeço a todos que confiam na ciência e persistem em contribuir para o avanço do conhecimento científico, apesar de estarmos em tempos tão sombrios e obtusos. Sempre haverá esperança por tempos melhores, pois sempre haverá esforços renovados por novos comprometidos cientistas.

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

Meus sinceros agradecimentos

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 O problema do alumínio para a produção agrícola	3
2.2 Estresse oxidativo provocado pelo Al	7
2.3 Estresse por Al e alterações morfológicas	8
2.4 Mecanismos de tolerância ao Al	9
2.4.1 Exsudação de ácidos orgânicos	9
2.4.2 Compartimentalização	10
2.4.3 Mecanismo antioxidante de defesa	11
2.5 A importância da quinoa.....	13
2.6 Referências	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Condições de crescimento e experimentais	17
3.2 Parâmetros de crescimento da planta (parte aérea e raiz)	18
3.3 Conteúdo de clorofila e de carotenoides	18
3.4 Conteúdo de peróxido de hidrogênio	19
3.5 Conteúdo de MDA	20
3.6 Conteúdo de Prolina	20
3.7 Açúcar Total	20
3.8 Proteínas e extração enzimática	21
3.9 Análise estatística	21
4. RESULTADOS	23
5. DISCUSSÃO	34
6. CONCLUSÃO	40
7. REFERÊNCIAS	41

MECANISMOS DE TOLERANCIA AO ALUMÍNIO EM PLANTAS DE QUINOA

RESUMO – A toxicidade do alumínio (Al) é o fator mais limitante para a agricultura tropical e subtropical. A cultura da quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), identificada como alimento do futuro, será implantada neste contexto de solos ácidos e de alta concentração de Al solúvel e tóxico, mas não há relatos científicos sobre os efeitos deste elemento na fisiologia, bioquímica e metabolismo desta espécie. O objetivo deste trabalho foi investigar mecanismos de tolerância ao Al em quinoa BRS Piabiru quando submetida a níveis baixos e altos de Al^{3+} . O experimento foi realizado em sala controlada e sistema hidropônico em pH 4, com 6 concentrações de Al (0, 0,2, 1, 5, 25 e 125 mg L^{-1}) na forma de cloreto de alumínio. As plantas foram coletadas aos 60 dias após o plantio (DAP). Folhas de plantas tratadas com as maiores concentrações de Al (25 e 125 mg L^{-1}) apresentaram aumento no conteúdo MDA e atividade de algumas enzimas (SOD e GSH-Px). A maior massa seca de planta foi obtida no tratamento controle e 0,2 mg L^{-1} , que obteve maior massa seca de raízes. A massa seca da quinoa e os parâmetros biométricos das plantas foram gradualmente reduzidos à medida que as concentrações de alumínio foram aumentadas. As plantas com menor concentração de Al acumularam mais açúcares totais, produziram mais carotenoides, além de aumento no conteúdo de prolina, atividade de GPOX em folhas, além de maior volume das raízes. Este pode ser um dos mecanismos de tolerância das plantas de quinoa sob exposição ao Al.

Palavras-chave: *Chenopodium quinoa*, estresse oxidativo, sistema antioxidante, toxicidade

ALUMINIUM TOLERANCE MECHANISM IN QUINOA PLANTS

ABSTRACT – Aluminum (Al) toxicity is the most limiting factor for tropical and subtropical agriculture. The culture of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd), identified as food of the future, will be implemented in this context of acidic soils and high concentration of soluble and toxic Al, and there are no scientific reports about the mechanisms of tolerance of the crop to stresses by Al. The aim of this work was to investigate mechanisms of Al tolerance in quinoa BRS Piabiru when submitted to lower and high levels of Al^{3+} . The experiment was carried out in a controlled room and hydroponic system at pH 4, with 6 concentrations of Al (0, 0.2, 1, 5, 25 and 125 mg L^{-1}) in the form of aluminum chloride. Plants were collected at 60 days after planting (DAP). Plants with the highest concentration of Al (25 and 125 mg L^{-1}) increased MDA and some enzymes activities (SOD and GSH-Px). The highest dry mass of plant was obtained in the control treatment and 0.2 mg Al L^{-1} , which obtained highest roots dry mass. Dry mass of quinoa and biometrics parameters of plants were gradually reduced as aluminum concentrations were increased. Plants with the lowest concentration of Al accumulated more total sugars, produced more carotenoids, proline content, GPOX activity and roots volume were increased. This may be the tolerance mechanism of quinoa plants under Al exposure.

Keywords: *Chenopodium quinoa*, oxidative stress, antioxidant system, toxicity.

1 INTRODUÇÃO

O alumínio (Al) é o metal mais abundante na crosta terrestre e sua forma livre (Al^{3+}) é tóxico à maioria das espécies cultivadas, mesmo em baixas concentrações (Cárcamo et al., 2019; Famoso et al., 2010; Feng et al., 2023). O poder deletério do Al está associado ao desencadeamento da superprodução de espécies reativas de oxigênio (ERO) que, em excesso, promovem a interrupção da homeostase celular, oxidação de macromoléculas biológicas (lipídios, açúcares, proteínas e ácidos nucleicos), peroxidação lipídica e mudanças na atividade enzimática (Giannakoula et al., 2018; Guo et al., 2018; Yu et al., 2019; Chauhan et al., 2021).

A toxicidade de Al em plantas é provocada pela alta afinidade do metal pelas paredes celulares, membranas e metabólitos (Phukunkamkaew et al., 2021), sendo o maior desafio para a produção agrícola em regiões tropicais e subtropicais, especialmente em relação a cultura da quinoa (Amjad et al., 2021). Assim a caracterização de mecanismos fisiológicos e bioquímicos que conferem tolerância ao Al em cultivares agrícolas é essencial para a expansão das fronteiras agrícolas e a segurança alimentar (Lata-Tenesaca et al., 2021).

Para lidar com a toxicidade de Al, as plantas desenvolveram várias estratégias, dentre as quais, o mecanismo externo de efluxo de ácidos orgânicos pelas raízes, amplamente documentado e compreendido (Miyasaka., et al 1991; Matsumoto et al., 2012). Porém, outras vias, como o mecanismo de tolerância pelo aumento do sistema antioxidante de defesa, são pouco exploradas (Cárcamo-Fincheira et al., 2021).

Embora haja evidências de que o sistema antioxidante (enzimático e não enzimático) seja responsivo a altas concentrações de Al (Awasthi et al., 2019; Amjad et al., 2020; Chen et al., 2020), estudos recentes sobre esses mecanismos de tolerância mostram divergências. Por exemplo, plantas de trigo expostas a 10 mm L^{-1} de Al obtiveram incremento na atividade das enzimas catalase e ascorbato peroxidase (Yu et al., 2019). Ao passo que em arroz, a mesma concentração de Al diminuiu o nível de atividade destas enzimas (Awasthi et al. 2019).

Deste modo, embora outras vias de defesa a toxicidade de Al, como aumento de compostos secundários, já tenham sido evidenciados em alguns estudos com

espécies de arroz (Awasthi et al., 2017; Ma et al., 2012), alface (Chen et al., 2020) e *blueberry* (Cárcamo et al., 2019), há forte evidência de que o sistema antioxidante de defesa seja umas das vias de tolerância preponderantes em vegetais que não possuam mecanismos externos para minimizar os efeitos das altas concentrações de Al, como é o caso da quinoa (Hinojosa et al., 2018). Nesta mesma espécie observou-se a presença de adaptações morfológicas e produção de metabólitos secundários, tais como os polifenóis (Chen et al., 2020) em plantas expostas à deficiência hídrica (Serna et al., 2020), estresse salino (Parvez et al., 2020), altas temperaturas (Hinojosa et al., 2019) e por alguns metais pesados, como cromo (Guarino et al., 2020; Scoccianti et al., 2016) e a combinação cádmio e chumbo (Amjad et al., 2021). Assim, a quinoa tem sido considerada uma espécie resistente a diversos estresses abióticos (Hinojosa et al., 2018), o que suscita a hipótese de que também apresentem tolerância ao Al.

A quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) é classificada como pseudo-cereal, planta de ciclo anual, halófita facultativa, e pertencente à família Amaranthaceae, originária da Cordilheira dos Andes e eleita pela FAO como cultura destinada a oferecer segurança alimentar no século XXI (Angeli et al., 2020). Nos últimos anos tem despertado interesse da comunidade científica e de produtores (Grenfell-Shaw et al., 2021; Rosales et al., 2020) pela elevada qualidade nutricional e alta adaptabilidade a condições adversas. Todavia, um dos maiores entraves para expansão da cultura no Brasil e demais áreas tropicais, é o desconhecimento acerca da tolerância da quinoa ao ambiente em que será implementada. Neste caso, um dos fatores presentes em tais áreas, é a alta concentração de Al^{+3} .

Assim, objetivou-se investigar se as plantas de quinoa possuem tolerância ao Al, e, se sim, até quais concentrações. Além disso, quais seriam os mecanismos antioxidantes acionados na promoção de tolerância ao Al nestas plantas, e qual efeito em parâmetros de crescimento, fisiológicos e bioquímicos das plantas.

Observou-se diminuição de massa de plantas à medida que as concentrações de alumínio foram aumentadas. No entanto, a concentração 0,2 mg de Al estimulou maior volume de raízes, carotenoides, conteúdo de prolina, açúcar total e atividade da GPOX. Em maiores concentrações de Al houve incremento na atividade das enzimas SOD, CAT e GSH-Px. Este pode ser o mecanismo de tolerância das plantas de quinoa

sob exposição ao Al. Tal estudo é imprescindível também para elucidar os mecanismos de tolerância ao Al em plantas estratégicas nutricionalmente e que visem a segurança alimentar mundial. Além de contribuir no posicionamento da cultivar no cenário agrícola brasileiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O problema do alumínio para produção agrícola

A acidificação do solo é fenômeno natural, porém ações antrópicas aceleram o processo de diminuição do pH do solo (Guo et al., 2010; Feng et al., 2023), cuja consequência mais drástica para a agricultura é a disponibilidade do alumínio (Al) na forma iônica Al^{3+} (Lin e Wu, 1994). O Al é um constituinte natural do solo, sendo terceiro elemento mais abundante, cuja forma precipitada (aluminossilicatos) não é absorvida pelas plantas. Todavia, durante o processo de acidificação do solo ($\text{pH} < 5,0$), inicia-se sua solubilização, que culmina em formas fitotóxicas, principalmente íon Al^{3+} , considerada a forma mais tóxica (Panda et al., 2009; Schmitt et al., 2016; Chauhan et al., 2021) para a maioria das culturas cultivadas.

Neste sentido, a toxicidade do alumínio (Al) é um importante fator que limita o crescimento das plantas e afeta a produtividade das culturas em solos ácidos. O Al (íons Al^{3+}) é absorvido pelas células radiculares e possui consequência mais evidente a inibição do crescimento das raízes e/ou engrossamento radicular, o que prejudica a absorção de água e nutrientes. E técnicas de calagem e gessagem, embora imprescindíveis quando há indicativo de tal prática a partir da interpretação da análise de solo, podem ser onerosas, demandarem tempo, condições climáticas favoráveis e, se não for aplicado corretamente, o problema da alta saturação de Al no solo persistirá. E ainda, no caso da calagem, só haverá correção da acidez do solo nas camadas superficiais (0-20cm), e sabe-se que o Al tóxico é altamente solubilizado e percola em profundidade. Sendo assim, embora a prática de calagem e gessagem sejam considerados pré-requisitos para implementação de culturas em tais condições (alta acidez e alta concentração de Al trocável), traz ainda uma série de benefícios

(tais como diminuição da acidez, e consequente diminuição do poder deletério do Al, dado que não assumirá a forma tóxica; aumento da disponibilidade de Ca e S, além de condicionar melhorias no sistema radicular), o emprego de tais técnicas agronômicas demanda esforços, tempo e acesso à informação da correta amostragem e interpretação da análise de solo. Neste contexto, em que a aplicação de gesso agrícola e calcário são fundamentais para cultivo, e emprego de genótipos tolerantes para implementação da cultura também seria interessante, uma vez que trariam ainda mais benefícios, dado que solo (a partir da aplicação de calcário e gesso agrícola) e planta (tolerância ao Al), estariam ajustados para maiores produtividades no cenário de solos do cerrado.

A tolerância ao Al nos genótipos pode apresentar-se a partir de mecanismos de tolerância externos ao Al (tais como de secreção de ácidos orgânicos, como malato, citrato e oxalato pelas raízes), são capazes de quelar o Al^{3+} para formar um complexo Al-OA não tóxico, que diminui a entrada de Al^{3+} nas células radiculares. No entanto, em plantas que não possuem tal recurso de sobrevivência, a entrada de íons de Al^{3+} , certamente acarretará na superprodução de espécies reativas de oxigênio (ERO) nas células, deletérias por provocar danos a biomoléculas como lipídios, carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos. Quando há uma superprodução de ERO, as plantas possuem mecanismos para que haja modulação da desintoxicação a partir do sistema de defesa antioxidante, enzimático e/ou não enzimático.

2.2 Estresse oxidativo em plantas provocado pelo Al

O estresse oxidativo é gerado durante a condição de estresse biótico ou abiótico, como consequência de um grave desequilíbrio celular, provocado por superprodução de espécies reativas de oxigênio (ERO), condição em que há uma produção mais intensa do que a capacidade dos mecanismos antioxidantes de desintoxicá-las. Nesse sentido, haverá o desencadeamento de distúrbios fisiológicos, como por exemplo, danos em proteínas, DNA, lipídeos e carboidratos, podendo as plantas entrarem em colapso total ou morte celular programada.

Embora a produção de ERO se dê constantemente, como produto da fotossíntese e respiração celular, estas espécies reativas são produzidas em baixas

concentrações, por vários processos metabólicos no cloroplasto, mitocôndrias, peroxissomos, membrana plasmática, apoplasto e núcleo (Sandálio et al., 2013), ou seja, a produção de ERO é fundamental para o metabolismo das plantas. Como exemplo pode-se citar a redução do oxigênio molecular (O_2) para H_2O , nesta ação pode ser transferido um, dois ou três elétrons para o O^2 , formando radicais superóxido (O^{2-}) e a hidroxila (OH^-), além de produtos não radicais, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete (1O_2) (Demidchik, 2015).

A exposição das plantas ao estresse por Al desencadeia a superprodução de ERO nas mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos (Liu et al., 2014) que podem causar danos oxidativos aos componentes celulares se não houver a ativação efetiva do sistema antioxidante de defesa ou se a maquinaria antioxidante estiver sobrecarregada (Sivaguru et al., 2013).

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

2.3 Estresse por Al e alterações morfológicas

Por outro lado, um dos sintomas mais bem relatados na literatura e notórios nas plantas sob toxicidade por Al com alterações na morfologia da raiz já é bem relatada na literatura (Kopittke et al., 2015), estudos seminais exploraram a ligação entre a toxicidade do Al e a inibição do crescimento radicular em plantas superiores (Matsumoto, 2000; Gupta et al., 2013; Panda et al., 2009; Chauhan et al., 2021). O dano radicular causado durante a exposição prolongada ao Al, acarreta subsequente deficiência na absorção de água e nutrientes, o que culmina em decréscimos no

crescimento e produtividade da cultura (Jones e Kochian, 1995; Barceló e Poschenrieder, 2002).

Sabe-se que a maior parte do Al absorvido do solo penetra através do ápice da raiz, mas provoca danos também à epiderme e ao córtex radicular (Silva, 2012; Kopittke et al., 2015). Estudos recentes apontaram que o distúrbio responsável pela rápida redução no crescimento radicular e/ou engrossamento está relacionado à interrupção da expansão celular através da desorganização de microtúbulos e microfilamentos nas células radiculares (Wallace e Andersen, 1984; Sade et al., 2016). Neste sentido, o Al provoca redução da divisão celular e ao bloqueio da ação do citoesqueleto (Ciamporová, 2002; Panda et al., 2009; Silva, 2012), aumento na tensão dos filamentos de actina (Grabski e Schindler 1995; Amenós et al., 2009), cuja consequência são deformações morfológicas e estruturais nas raízes de plantas não tolerantes ao Al (Kopittke et al., 2015).

O Al adsorvido nas células liga-se, principalmente, à matriz de pectina da parede celular, mais especificamente, nos grupos carboxílicos carregados negativamente (Chang et al., 1999). Dessa forma, a ligação forte e rápida do Al desintegra as propriedades estruturais e mecânicas da parede celular levando à diminuição da extensibilidade da parede (Kochian et al., 2005).

Devido às suas propriedades físico-químicas, o Al apresenta uma forte interação com a superfície da membrana plasmática carregada negativamente e, portanto, serve como primeiro alvo potencial para a toxicidade do Al^{3+} dentro do simplasma (Ishikawa e Wagatsuma, 1998). Após a ligação do Al, a estrutura e a função da membrana ficam comprometidos, o que resulta na susceptibilidade à alteração do fluxo de íons e oxidação a partir da superprodução de ERO pelo metabolismo vegetal (Kochian et al., 2015). Haja vista a alta afinidade que o Al na forma iônica (Al^{3+}) assume por praticamente todos os compostos celulares, especialmente com 2 doadores, como DNA, ATP e lipídios (Phukunkamkaew et al., 2021).

Neste sentido, há fortes evidências de que as plantas que acumulam Al devem possuir mecanismos de tolerância que desintoxicam o Al internamente. Várias hipóteses para o mecanismo interno de tolerância ao Al têm sido propostas, dentre as quais, as mais consolidadas, tais como a quelatização no citosol, compartimentação

no vacúolo (Kochian 1995; Taylor 1991), bem como os estudos mais incipientes e promissores, como de modulação a partir do sistema antioxidante de defesa.

2.4 Mecanismos de tolerância ao Al

O problema da toxicidade de Al nas plantas é estudado há muito tempo na literatura científica, de modo que alguns mecanismos de tolerância já são bem esclarecidos. Dentre estes, a exsudação de ácidos orgânicos na rizosfera, compartimentalização e, o mais incipiente, tolerância modulada pelo mecanismo antioxidante de defesa.

2.4.1 Exsudação de ácidos orgânicos

Um dos mecanismos mais estudados, que atuam na desintoxicação interna de Al, inclui a formação de complexos de Al com ácidos orgânicos e compostos fenólicos e seu sequestro em vacúolos, afim manter o baixo nível de Al livre no citosol e impedir a sua ação fitotóxica (Kochian et al., 2005).

Sob altas concentrações de Al no meio, plantas que apresentam mecanismo de tolerância por exclusão por Al, podem apresentarem a exsudação de ácidos orgânicos, tais como malato, citrato e oxalato. Trata-se de um mecanismo importante e já bem compreendido de resistência das plantas à toxicidade do metal (Kochian et al., 2015).

Os ácidos orgânicos são exsudados pelas raízes e atingem a região da rizosfera, sendo capazes de fazer a quelatização com as moléculas de Al livre (Al^{3+}). Tal processo substitui o Al tóxico por moléculas estáveis e não fitotóxicas. O mecanismo de exclusão já também é bem consolidado na literatura, bem como a identificação de genótipos que possuem tal recurso para lidar com altas concentrações de Al no meio já está avançada. Sabe-se, por exemplo, que na cultura do milho são exsudados primordialmente citrato, e em trigo há a detoxicação interna pela complexação do Al com oxalato e posterior compartimentalização vacuolar

(Kochian et al., 2005; Shen et al 2002). Já em folhas de hortênsias, foi demonstrado que o Al é quelado com citrato em uma proporção de 1:1 (Ma et al. 1997a). Em folhas de trigo mourisco, Al é complexado com oxalato em uma proporção de 1:3 (Ma et al. 1997b). O complexo Al-oxalato (1:3) também estava presente em folhas de *Melastoma malabathricum* L., embora outras formas de Al também tenham sido observadas (Watanabe et al. 1998). Tanto o Al-oxalato (1:3) e o complexo Al-citrato (1:1) não são formas fitotóxicos, portanto o Al é detoxicado no metabolismo vegetal.

2.4.2 Compartimentalização

O Al pode ser isolado em sítios, tal como o vacúolo, e não comprometer o metabolismo vegetal, pois será compartimentalizado e não irá compor o citosol vegetal (Taylor, 1988). O trabalho seminal responsável por tal comprovação foi realizado por Barceló et al., (1996) a partir de microanálises de raio-X, foi observado depósitos densos de elétrons em vacúolos das pontas das raízes extraídas de plântulas de milho acondicionadas em Al^{3+} por 24 a 120h. o que comprova a vigência deste mecanismo de tolerância em tais genótipos e evidencia a importância deste mecanismo no auxílio à tolerância de plantas ao Al.

2.4.3 Mecanismo antioxidante de defesa

Para desintoxicar as células, as plantas podem empregar um complexo sistema antioxidante, enzimático e não enzimático. Os antioxidantes enzimáticos compreendem enzimas como a superóxido dismutase, catalase, peroxidases e enzimas do ciclo do ascorbato e glutathione. Do sistema antioxidante não enzimático, pode-se destacar a atuação do ascorbato, da glutathione, compostos fenólicos e carotenoides (Silva et al., 2000), que protegem as células vegetais dos danos oxidativos, eliminando as ERO, para reestabelecer a homeostase vegetal.

Todavia, mecanismos antioxidantes de tolerância ao Al ainda estão pouco esclarecidos e controversos. Sabe-se que a resposta das plantas contra os efeitos

deletérios das ERO ocorre através de um sistema de defesa que compreende antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Abbas et al., 2017) capazes de agir contra as ERO e interromper cascatas de oxidação descontrolada nas células tanto sob condições normais, como quando estimuladas por eventos de estresse (Czarnocka e Karpinski, 2018).

O ascorbato (AsA), a glutathiona (GSH), o β -caroteno, o α -tocoferol, os carotenoides e a prolina, são os principais agentes não enzimáticos do maquinário antioxidante (Sachdev et al., 2021), que visam restabelecer a homeostase celular a partir da detoxicação da cascata de produção exacerbada de ERO desencadeada pela exposição ao Al, a partir do sequestro ou degradação destes e, assim, previne possíveis danos celulares.

E ainda, em condições de estresse, as plantas podem modificar a síntese de seus metabólitos para conseguir se adaptar e sobreviver às pressões do ambiente (Arbona et al., 2013), todavia tais estudos ainda são incipientes.

O aminoácido prolina ocorre amplamente nas plantas e normalmente se acumula em grandes quantidades em resposta a estresses abióticos (Giannakoula et al., 2008), incluindo o estresse por Al (Galvez et al., 1991; Klan et al., 2000). Além disso, os carotenoides são pigmentos e fotoprotetores que também protegem contra danos oxidativos (Young et al., 2018).

Além do mecanismo antioxidante não enzimático, as plantas podem se proteger dos efeitos deletérios do Al a partir de ativação do sistema antioxidante enzimático.

Algumas das enzimas antioxidantes presentes na linha de defesa enzimática incluem a SOD, APX, CAT, GR, GPOX, GSH-PX entre outras peroxidases (Gratão et al., 2015; Alves et al., 2018). O ácido ascórbico (AsA), tocoferóis, polifenóis e carotenoides compreendem os antioxidantes não enzimáticos (Sharma et al., 2012). A SOD é reconhecida como a primeira enzima antioxidante a compor a linha de defesa enzimática contra as ERO, atuando na dismutação de ânions superóxido em excesso nas células (Sharma et al., 2012; Gratão et al., 2015). Em angiospermas, pode ser caracterizada sob três isoformas encontradas em distintas localidades (Yan et al., 2017), sendo nas mitocôndrias e peroxissomos, preferencialmente encontrada a manganês SOD (Mn-SOD) (Ueda et al., 2013), nos cloroplastos a ferro SOD (Fe-SOD) e a cobre/zinco SOD (Cu/Zn-SOD) predominante no citosol, cloroplastos e

peroxissomos (Jozefczak et al., 2015). Estudos recentes com trigo demonstram que a atividade enzimática (SOD, APX, GR) se correlacionam positivamente com o tratamento de Al (Pirzadah et al., 2019).

A Superóxido dismutase (SOD EC 1.15.1.1) é uma metaloenzima e pode ser considerada a principal enzima antioxidante pois participa da primeira linha de defesa contra a toxicidade de ERO. Esta enzima catalisa a dismutação de O_2^- em H_2O_2 e O_2 em todos os compartimentos subcelulares, incluindo cloroplastos, mitocôndrias, núcleo, peroxissomos, citoplasma e apoplastos (GILL et al., 2015). Experimentos com batata (Dorneles et al., 2019 e trigo (Darko et al., 2004) evidenciaram que a exposição ao Al provocou declínio da atividade da SOD para os genótipos sensíveis.

A catalase (CAT EC 1.11.1.6) também caracteriza por uma enzima crucial na detoxicação celular. O H_2O_2 é uma molécula que pode ser altamente reativa, no entanto pode ser convertida rapidamente em H_2O e O_2 pela ação da CAT (EC 1.11.1.6) em diferentes compartimentos, sendo considerada uma parte vital do mecanismo de defesa antioxidante (Gill e Tuteja, 2010).

A ação da catalase ocorre em peroxissomos, glioxissomos e organelas. Esta enzima é um eficiente eliminador de ERO, exibe alta taxa de reação, que pode dismutar cerca de 6 milhões de moléculas de H_2O_2 por minuto. Além disso, a CAT não utiliza nenhum agente redutor equivalente, atua direta e eficientemente durante a conversão de H_2O_2 (Gill e Tuteja, 2010). Darko et al. (2004) demonstraram a importância da CAT na promoção de tolerância ao Al utilizando genótipos tolerantes e sensíveis ao metal. A partir destes resultados, evidenciou-se o papel importante de enzimas na detoxicação das ERO quando expostas ao Al.

A Glutathione Peroxidase (GSH-Px, EC 1.11.1.9) constitui-se em uma classe de isoenzimas que utilizam a glutathione para reduzir o H_2O_2 , protegendo as células do dano oxidativo. Considerada uma enzima reguladora redox (Gill et al., 2013; Hasanuzzaman et al., 2020). A GSH-Px participa do ciclo AsA-GSH e depende de GSH como seu doador de elétrons específico para reduzir H_2O_2 e outros hidroperóxidos, sendo capaz de reparar efetivamente a peroxidação lipídica da membrana celular (Alves et al., 2018). Além disso, GSH-Px, que catalisa a oxidação de GSH a GSSG, é citosólico e relacionado a papéis importantes em plantas, como vias de sinalização de estresse salino, sinalização de ABA e homeostase redox (Zhai

et al. 2013). A GSH participa da degradação do H_2O_2 através de uma reação catalisada pela enzima Glutathione Peroxidase (GSH-Px).

A Guaiacol peroxidase (GPOX E.C.1.11.1.7) é considerada uma enzima importante no combate a estresses abióticos, utilizando o H_2O_2 . Em algumas espécies de plantas, quando expostas ao estresse salino, pode ocorrer um aumento de sua atividade tanto nas folhas, como nas raízes para reduzir os danos oxidativos causados por esta condição (Gill & Tuteja, 2010). A GPOX está envolvida na desintoxicação do H_2O_2 através da oxidação do guaiacol (Hiraga et al. 2001), e estudos demonstraram que o seu incremento está intimamente relacionado a níveis elevados de Al no meio (Nogueirol et al., 2015).

2.5 A importância da quinoa

A quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) é uma planta de ciclo anual, pertencente à família Amaranthaceae, de acordo com a APG III (antiga Chenopodiaceae) e originária da Cordilheira dos Andes. Recentemente foram desenvolvidas linhagens no Brasil, e sua domesticação e aclimação à ambientes do cerrado está incipiente, sendo a BRS Piabiru a primeira e única cultivar de quinoa recomendada para o Brasil. A quinoa também é classificada como a cultura mais indicada para a segurança alimentar mundial (FAO 2020), pois fornece todos os aminoácidos essenciais à alimentação humana, possui alta adaptabilidade a diferentes condições climáticas, e algumas espécies do gênero possuem tolerância a estresse salino (Adolf et al., 2013; Iqbal et al., 2020).

Algumas espécies de quinoa já foram classificadas como halófitas facultativas, o que pode indicar tolerância a outros estresses, especialmente o hídrico (Jaikishun et al., 2019). E ainda, estudos recentes sugerem que haja também características de metalófitas em plantas de quinoa (Amjad et al., 2021). Assim sendo, a cultura da quinoa tem sido considerada como tolerante a múltiplos estresses abióticos (Jacobsen et al., 2003).

Muitos estudos destacam a quinoa como o melhor alimento de origem vegetal para o consumo humano, pois, em comparação com a maioria dos cereais, apresenta um grande equilíbrio de aminoácidos essenciais, vitaminas e minerais (Dakhili et al., 2019; Silva et al., 2020), benéficos para a saúde humana.

Trata-se de uma cultura interessante e extremamente promissora, não só pelo seu valor nutricional, mas também por sua composição de compostos bioativos, como compostos fenólicos e vitamina C, que podem variar entre espécies e ambientes de adaptação (Hirose et al., 2010).

Devido ao atrativo nutricional e comercial da quinoa, sua produção e consumo ampliaram-se em países que podem representar condições limitantes para seu desenvolvimento, mesmo sendo uma cultura que ostenta características de tolerância (Jacobsen et al., 2003). Várias pesquisas abordaram principalmente a tolerância ao estresse salino e à seca (Hinojosa et al., 2018; Parvez et al., 2020). Essa adaptabilidade permitiu que a quinoa seja considerada uma cultura promissora às culturas tradicionais de grãos.

A cultivar BRS Piabiru é a primeira opção como cultivo granífero de quinoa, e sua inserção objetivou contribuir na diversificação dos sistemas produtivos no Brasil (Spehar et al., 2006). A adaptabilidade da quinoa às condições dos sistemas de produção e condições de cultivo depende da continuidade nos estudos sobre as bases nutricionais e, especialmente, fisiológica, objetivando revelar se há adaptabilidade da cultura e tolerância às características do meio em que será implementada, notoriamente, solos com alta acidez e elevadas concentrações de Al livre. A partir do uso de estratégias que contemplem tais objetivos, a cultivar é promissora alternativa para produção mais expressiva de grãos, silagem, opção gastronômica e ainda, do ponto de vista científico, estudos que visem desvendar a adaptabilidade da promissora cultura nas condições em que haverá a implementação são fundamentais para maior êxito no cultivo. O presente estudo constituir-se-á base do conhecimento sobre a tolerância ao Al desta importante espécie no mencionado contexto.

2.6 REFERÊNCIAS

ADOLF, V.I.; JACOBSEN, S; SHABALA, S. Salt tolerance mechanisms in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Environmental and Experimental Botany*, v. 92, p. 43-54, 2013.

AMENÓS, M. et al. Different effects of aluminum on the actin cytoskeleton and brefeldin A-sensitive vesicle recycling in root apex cells of two maize varieties differing in root elongation rate and aluminum tolerance. **Plant and Cell Physiology**, v. 50, n. 3, p. 528-540, 2009.

BANERJEE, A.E.; ROYCHOUDHURY, A. WRKT Proteins: Signaling and Regulation of Expression during abiotic stress responses. **The Scientific World Journal** 1-17, 2015.

CHAUHAN, D.K. et al. Aluminum toxicity and aluminum stress-induced physiological tolerance responses in higher plants. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 41, n. 5, p. 715-730, 2021

CZARNOCKA C, KARPINSKI S (2018) Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stresses. **Free Radical Biology and Medicine** 122: 4-40.

DAKHILI, S. et al., 2019. Quinoa protein: Composition, structure and functional properties. *Food Chemistry*, v.299, p. 125–161.

DARKÓ, É. et al. Aluminium toxicity, Al tolerance and oxidative stress in an Al-sensitive wheat genotype and in Al-tolerant lines developed by in vitro microspore selection. **Plant Science**, v. 166, n. 3, p. 583-591, 2004.

DEMIDCHIK, V. Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. **Environmental and experimental botany**, v. 109, p. 212-228, 2015.

DORNELES, A.O.S. et al. Aluminum stress tolerance in potato genotypes grown with silicon. **Bragantia**, v. 78, p. 12-25, 2019.

FENG, Q. et al. Physiological and TMT-based quantitative proteomic responses of barley to aluminium stress under phosphorus-Piriformospora indica interaction. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2023.

GILL, S.S. et al. Glutathione and glutathione reductase: a boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 70, p. 204-212, 2013.

GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant physiology and biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant physiology and biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

GUPTA, D. K.; HUANG, H. G.; CORPAS, F. J. Lead tolerance in plants: strategies for phytoremediation. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, p. 2150-2161, 2013.

HINOJOSA, L. et al., 2018. Quinoa abiotic stress responses: A review. *Plants*, v.7.

HIRAGA S, SASAKI K, ITO H, OHASHI Y, MATSUI H (2001) A large family of class III plant peroxidases. **Plant Cell Physiol**, v.42:462–468

HIROSE, Yuko et al. Antioxidative properties and flavonoid composition of *Chenopodium quinoa* seeds cultivated in Japan. **Food Chemistry**, v. 119, n. 4, p. 1300-1306, 2010.

IQBAL, S. et al. The extraordinary salt tolerance of quinoa. In: *Emerging research in alternative crops*. Springer, Cham, 2020. p. 125-143.

Jacobsen, S. E.; Mujica, A.; Jensen, C. R., 2003. The resistance of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) to adverse abiotic factors. *Food Reviews International*, v.19, p. 99–109.

KOCHIAN, L.V. et al. Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum resistance. **Annual Review of Plant Biology**, v. 66, p. 571-598, 2015.

KOCHIAN, L.V.; PINEROS, M.A.; HOEKENGA, O.A. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. **Plant and Soil**, v. 274, p. 175-195, 2005.

KOPITTKE, P.M. et al. Identification of the primary lesion of toxic aluminum in plant roots. **Plant Physiology**, v. 167, n. 4, p. 1402-1411, 2015.

LIU, J.; PIÑEROS, M.A.; KOCHIAN, L.V. The role of aluminum sensing and signaling in plant aluminum resistance. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 56, n. 3, p. 221-230, 2014.

MA, J.F. et al. Detoxifying aluminium with buckwheat. **Nature**, v. 390, n. 6660, p. 569-570, 1997.

MA, J.F.; HIRADATE S. Form of aluminium for uptake and translocation in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). **Planta**, v.211 ,p.355-360, 2000.

MA, J.F.; HIRADATE, S.; MATSUMOTO, H. High aluminum resistance in buckwheat: II. Oxalic acid detoxifies aluminum internally. **Plant Physiology**, v. 117, n. 3, p. 753-759, 1998.

MA, JF, HIRADATE S.; NOMOTO, K.; IWASHITA, T.; MATSUMOTO, H. Internal detoxification mechanism of Al in hydrangea. Identification of Al form in the leaves. **Plant Physiol**, v.113:1033-1039, 1997a.

NOGUEIROL, R.C. et al. Tropical soils with high aluminum concentrations cause oxidative stress in two tomato genotypes. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, p. 1-16, 2015.

PANDA, S.K.; BALUŠKA, F.; MATSUMOTO, H. Aluminum stress signaling in plants. **Plant signaling & behavior**, v. 4, n. 7, p. 592-597, 2009.

PARVEZ, S. et al., 2020. Effect of salinity on physiological, biochemical and photostabilizing attributes of two genotypes of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) exposed to arsenic stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.187, p. 109814.

PIRZADAH, T.B. et al. Aluminium stress modulates the osmolytes and enzyme defense system in *Fagopyrum* species. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 144, p. 178-186, 2019.

SACHDEV S.; ANSARI S.A.; ANSARI M.I.; FUJITA M.; HASANUZZAMAN M. Abiotic Stress and Reactive Oxygen Species: Generation, Signaling, and Defense Mechanisms. **Antioxidants**, v. 10, n. 2, p. 277, 2021.

SADE, H. et al. Toxicity and tolerance of aluminum in plants: tailoring plants to suit to acid soils. **Biometals**, v. 29, p. 187-210, 2016.

SANDALIO, L.M. et al. Role of peroxisomes as a source of reactive oxygen species (ROS) signaling molecules. Peroxisomes and their key role in cellular signaling and metabolism, p. 231-255, 2013.

SHARMA, P.; JHA, A.B.; DUBEY, R.S.; PESSARAKLI M (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidant defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany** 1-26.

SHEN, R et al. Compartmentation of aluminium in leaves of an Al-accumulator, *Fagopyrum esculentum* Moench. **Planta**, v. 215, p. 394-398, 2002.

SILVA, P.M. et al., 2020. Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): An overview of the potentials of the “golden grain” and socio-economic and environmental aspects of its cultivation and marketization. *Foods*, v. 9, p. 31.

WATANABE T.; OSAKI, M.; YOSHIHARA, T.; TADANO, T. Distribution and chemical speciation of aluminum in the Al accumulator plant.1998.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em sistema de cultivo hidropônico em sala climatizada (temperatura, luz e umidade) localizada no Departamento de Biologia da UNESP-FCAV (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias 'Júlio de Mesquita Filho') da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, Brasil. Sementes de quinoa cv. BRS Piabiru (Spehar et al., 2006) foram obtidos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasil.

3.1 Condições de crescimento e experimentais

As sementes da quinoa foram esterilizadas com solução de hipoclorito de sódio (5%), enxaguadas três vezes e semeadas em caixas preenchidas com uma mistura 1:1 (em volume) de substrato comercial BioPlant® (composto de turfa de esfagno, vermiculita e fibra de coco) e vermiculita. As caixas foram mantidas em uma sala controlada. Mudanças com sete dias de idade foram transplantadas por vaso (2L) em sistema de cultivo hidropônico aeração, contendo solução nutritiva Clark em pH 4 por sete dias em 50% de força iônica para aclimação e mais sete dias em 50% de força iônica, para que, após este período, a solução ofertada chegasse a 100% de força iônica aos 24 DAE.

A solução foi renovada a cada 3 dias e o pH foi mantido em 4, medido e ajustado diariamente com solução (1 mol L^{-1}) de HCl ou NaOH, quando necessário. A imposição do estresse pelo Al iniciou-se no 24º dia após a emergência, e as plantas foram coletadas para análise aos 54 DAE, final da fase vegetativa das plantas de quinoa BRS Piabiru.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com seis tratamentos, sendo cinco concentrações de Al, que foram obtidas em experimentos anteriores. O Al foi fornecido na forma de cloreto, segundo Cárcamo et al. (2019). O experimento teve 8 repetições, sendo 4 para análise de crescimento e 4 para análise bioquímica. (T1) Controle (T2) $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de Al; (T3) 1 mg L^{-1} de Al; (T4) 5 mg L^{-1} de Al (T5) 25 mg L^{-1} de Al (T6) 125 mg L^{-1} de Al, sendo este último equivalente a $4625 \text{ } \mu\text{M}$ de Al^{+3} (Shaff et al., 2010). As concentrações experimentais foram baseadas em estudos pretéritos a partir da normativa da FAO acerca do limite permitido para utilização de água para irrigação de culturas contendo Al, de 5 mg L^{-1} (Ayers et al., 1985).

A solução nutritiva adotada foi baseada em Clark (1975), pois é adaptada para amplo suprimento de nutrientes em condições ácidas, possui alta estabilidade de pH, pois as plantas absorvem água e nutrientes, e baixa concentração de fósforo em relação à solução nutritiva de Hoagland, o que reduz a probabilidade de precipitação de Al como AlPO_4^- .

A composição química nominal desta solução também foi testada no software Geochem-EZ (Shaff et al., 2010), resultando em 92% de Al^{3+} livre disponível. O pH da solução foi medido diariamente e mantido em $4,0 \pm 0,1$ (usando solução de NaOH ou HCl) para garantir a solubilidade do Al. A solução foi totalmente substituída a cada 3 dias,

Após um período de 54 dias pós germinação, correspondendo a 30 dias sob exposição ao Al, amostras de folhas e raízes foram imersas em N_2 líquido e armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para análise de peroxidação lipídica, H_2O_2 , açúcares totais, concentração de prolina, extração de enzimas e determinação de proteínas. E as demais repetições foram lavadas com água destilada e mantidas em sacos de papel e secas em estufa de secagem ($60\text{ }^{\circ}\text{C}$) até atingir peso constante para secagem. determinação de massa seca dos tecidos das plantas.

3.2 Parâmetros de crescimento da planta (parte aérea e raiz)

As medidas biométricas foram realizadas ao final do experimento (54 DAE), medindo-se o comprimento da raiz e da parte aérea da planta com uma régua graduada em mm, e para área foliar, com o software Image J® (Orsini et al., 2010).

As raízes das plantas foram colocadas em uma proveta graduada com volume conhecido de água, seguindo a metodologia proposta em Siemens & Zwiazek (2008). Após a imersão total das raízes, o volume das raízes foi obtido pela diferença entre o volume anterior e o atual. O volume das raízes foi expresso em cm^3 .

Para quantificar o acúmulo de massa seca, as plantas foram divididas em três partes (folhas, caule e raiz) e todas as amostras foram então colocadas em sacos de papel e colocadas em estufa de ar quente a 65°C até peso constante. O peso final foi registrado em balança com precisão de 0,001 g, e a média de cada planta em cada vaso, e foi utilizada para determinar a massa seca

3.3 Conteúdo de clorofila e carotenoides

O conteúdo de clorofila e de carotenoides foi determinado espectrofotometricamente. Folhas frescas (0,50 mg) foram adicionadas a um tubo com 2 ml de acetona (80%). Após refrigeração durante 72h a 4°C até inteira despigmentação do tecido foliar, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro. Os carotenóides foram lidos em 470 nm, clorofila *a* em 645 e clorofila *b* em 662 nm (Lichtentlaler, 1987).

3.4 Conteúdo de peróxido de hidrogênio

A concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi determinada de acordo com Alexieva et al. (2001). Aproximadamente 200 mg de material vegetal congelado foram pesados e moídos em almofariz de porcelana com nitrogênio líquido. No material vegetal macerado triturado foi adicionado misturado com 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v) e mantido em tubo Eppendorf. O material foi homogeneizado por vortex e centrifugado a 10.000 rpm por 15 min a 4°C. Em seguida, 200 µL de sobrenadante foi coletado e misturado com 200 µL de tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,5 (100 mM) e 800 µL de iodeto de potássio (1 M). As amostras foram colocadas no gelo por 1 h. Após aquecimento à temperatura ambiente, as leituras de absorbância foram feitas a 390 nm em um espectrofotômetro. A concentração de H₂O₂ na folha foi calculada com base em uma curva padrão e os resultados expressos em µmol g⁻¹ MF (massa fresca).

3.5 Conteúdo de MDA

A peroxidação lipídica foi avaliada de acordo com Heath e Packer (1968). Para a extração, o material foliar foi macerado em 2 mL de solução de ácido tricloroacético a 0,1% (p/v), depois centrifugado a 4000 rpm por 15 min a 4°C. A 200 µL de sobrenadante foi então adicionado 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,5%. A mistura foi vigorosamente agitada e incubada a 95°C por 30 min. A reação foi parada

em gelo e centrifugada a 4000 rpm por 10 min. A absorbância foi então registrada em 535 nm, e uma absorbância não específica em 600 nm. Para calcular o teor de MDA, foi utilizado o coeficiente de extinção molar $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, e os resultados foram expressos em nmol MDA g^{-1} de massa fresca (MF).

3.6 Conteúdo de Prolina

Folhas frescas e amostras de raízes (0,5 g) foram homogeneizadas em ácido sulfosalicílico 3% e filtradas. O filtrado da mistura foi adicionado com 1 mL cada de ninidrina ácida e ácido acético glacial e foi colocado em água fervente por 1 h. Tolueno (4 mL) foi adicionado à mistura, e a absorbância foi medida espectrofotometricamente a 520nm e convertida em mmol g^{-1} peso fresco contra prolina padrão. O conteúdo de prolina foi determinado conforme descrito por Bates et al. (1973).

3.7 Açúcar Total

Para a extração, 0,5 g de material vegetal foi moído em almofariz e pilão de porcelana, misturado com 5 mL de solução de MCW (60% metanol, 25% clorofórmio e 15% água) e mantido em geladeira por 24 horas a 4°C. O material foi agitado em vórtex e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Em outro tubo, 2,0 mL do sobrenadante do extrato de MCW foram transferidos e misturados com 0,5 mL de clorofórmio e 0,75 mL de água deionizada. Após a separação de fases, a concentração de açúcares totais foi determinada usando a fase solúvel em água. Para quantificar os açúcares totais, 10 μL de sobrenadante foi misturado com 250 μL de fenol a 5% (m/v) e 1 mL de ácido sulfúrico concentrado (Dubois et al., 1956). A mistura foi agitada em vórtex e após resfriamento até a temperatura ambiente, a absorbância das amostras foi lida a 490 nm. Os resultados foram expressos em mg g^{-1} MF.

3.8 Proteínas e extração enzimática

A extração enzimática de folhas e raízes foi realizada por Boaretto et al. 2014. Os tecidos foram homogeneizados em um almofariz resfriado a frio com um pilão usando um tampão de extração contendo 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,5), 1 mM de ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), 3 mM de DL-ditiotreitol e 5% (p/v) polivinilpolipirrolidona insolúvel na proporção volume/peso fresco de 3:1 para folhas e frutos e 2:1 para raízes. O homogenato foi centrifugado a 10.000 xg por 30 min, e o sobrenadante foi armazenado a -80 °C para posterior determinação da atividade da Superóxido dismutase (SOD, EC: 1,15,1,1), Catalase (CAT, EC 1.11. 1.6), atividade de Guaiacol peroxidase (GPOX, EC1.11.1.7) e atividade de ensaio de Glutathione peroxidase (GSH-Px, EC 1.11.1.9). A concentração de proteína foi ensaiada seguindo o método de Bradford (1976) usando albumina de soro bovino como padrão.

A determinação da atividade da SOD seguiu o protocolo desenvolvido por Giannopolitis e Ries (1977). O meio de ensaio continha solução salina tamponada com fosfato de sódio 50 mM (pH 7,8), metionina 50 mM, EDTA 10 mM, cloreto de azul de nitrotetrazólio 1 mM e riboflavina 0,1 mM; essas substâncias reagiram sob uma lâmpada fluorescente (25 °C, 5 min), o que resultou na formação de um composto azul de formazan. A absorbância foi lida no comprimento de onda de 560 nm. Os resultados foram expressos em U mg de proteína⁻¹.

A atividade da Catalase (CAT) foi determinada medindo a degradação de H₂O₂ a 240 nm durante 1 min. A atividade da catalase (CAT) foi analisada espectrofotometricamente a 25 °C em uma mistura de reação contendo o extrato protéico, 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 25 µL H₂O₂ (solução a 30%) (Nogueiro et al., 2015). A atividade de CAT foi expressa como mmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

A atividade da GSH-Px foi determinada de acordo com Flohé e Günzler (1984) com algumas modificações. Uma mistura contendo extrato de planta, tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), EDTA 3 mM, 0,24 U GR/mL, glutathione 10 mM (GSH) e azida de sódio 1 mM foi incubada a 37°C por 10 min. Além disso, NADPH 1,5 mM e

H₂O₂ 1,5 mM foram adicionados e a oxidação do NADPH foi monitorada por 5 min a 340 nm. A atividade enzimática de GSH-Px foi calculada usando o coeficiente de extinção molar de 6,22 mM⁻¹ cm⁻¹ (Nagalakshmi e Prasad, 2001), e os resultados foram expressos em µmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

A atividade de GPOX foi determinada de acordo com Monteiro et al. (2011). Uma mistura contendo tampão fosfato-citrato (fosfato de sódio dibásico 0,2 M: ácido cítrico 0,1 M) pH 5,0, enzima (extrato vegetal) e 0,5% guaiacol, foi incubada por 15 min a 30 °C. A reação foi então interrompida transferindo imediatamente as cubetas descartáveis para um banho de água gelada, seguido da adição de solução de metabissulfito de sódio a 2%. A atividade da GPOX foi monitorada em 450 nm (absorbância) e uma unidade de atividade da enzima GPOX (U) corresponde a um aumento de 0,001 na absorbância expressa como min⁻¹ mg⁻¹ de proteína (Monteiro et al., 2011).

3.9 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste F (p<0,05) e, quando significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (p<0,05). Os resultados foram expressos como a média e o erro padrão da média (SEM) de quatro repetições independentes para o crescimento da planta, teor de clorofila e carotenoides, conteúdo de prolina, açúcares totais e proteínas solúveis totais e para cada extrato vegetal MDA, H₂O₂, SOD, CAT, Atividades GPOX e GSH-Px. A análise estatística foi realizada por meio do software estatístico AgroEstat®.

A análise de correlação de Pearson (p<0,05) também foi realizada para verificar as variáveis dependentes diretamente correlacionadas aos tratamentos. Por meio do software R (R Development Core Team, 2015), o pacote “corrplot” foi acessado para criar o mapa de calor, utilizando as funções “color” e “cor.mtest” e criar matrizes de coeficiente e p-value, respectivamente. Para facilitar a visualização de correlações significativas, foram inseridos asteriscos nas células do mapa de calor.

4. RESULTADOS

Crescimento de plantas

Os resultados apresentados na Fig. 1 mostram que a altura da parte aérea, área foliar, comprimento e volume das raízes diminuíram nas plantas expostas em concentração de Al maior que 0,2 mg. Os menores comprimentos de parte aérea foram encontrados nas plantas submetidas as maiores concentrações de Al (Fig. 1A). O mesmo padrão foi observado para a área foliar, pois as plantas sob 1, 5, 25 e 125 mg de Al, mostraram reduções de 31%, 34%, 46% e 62% na área foliar em relação ao tratamento controle (Fig. 1B).

Em relação ao sistema radicular, quando comparado ao tratamento controle, as plantas expostas a 1, 5, 25 e 125 mg de Al exibiram reduções de 43%, 52%, 60% e 92% no comprimento de raízes (Fig. 1C), e 59%, 78%, 89% e 95% no volume de raízes, respectivamente (Fig. 1D). Curiosamente, as plantas expostas a menor concentração de Al (0,2 mg) tiveram um aumento de 3,12% no volume de raízes, em relação ao tratamento controle (Fig. 1D).

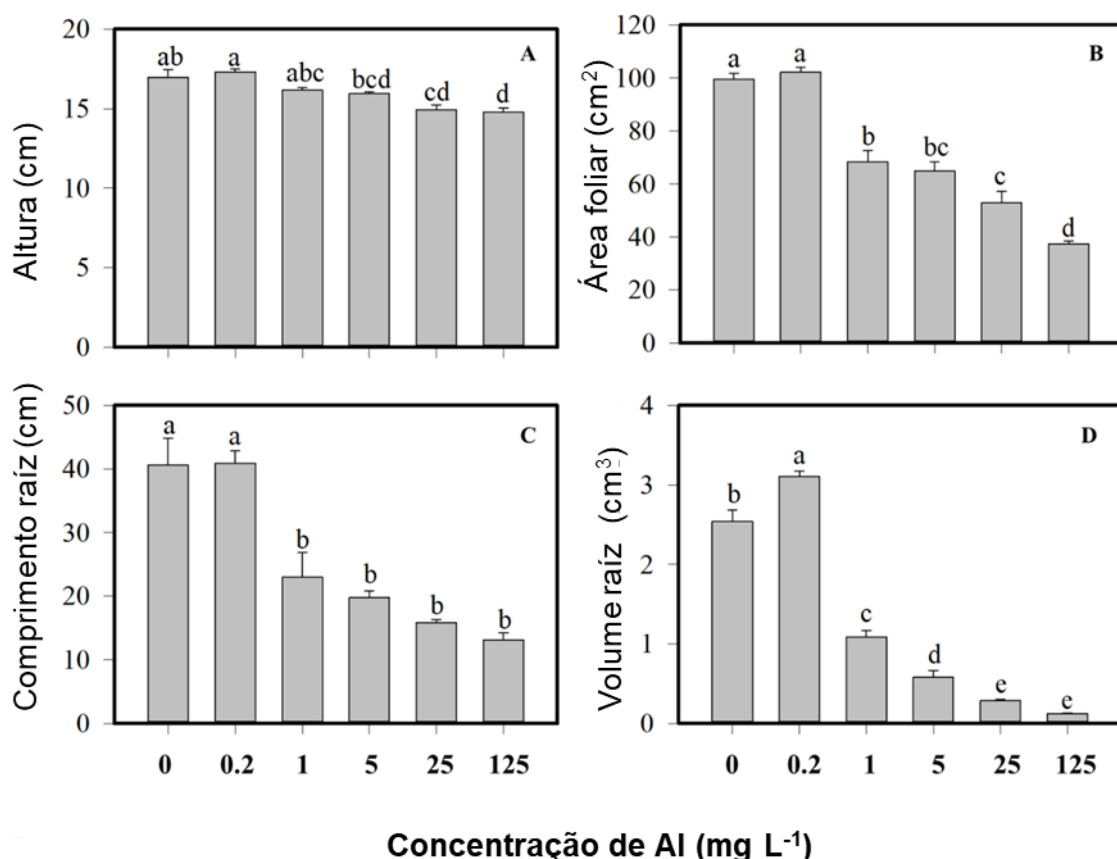


Fig. 1. Altura de planta (A), área foliar (B), comprimento de raiz (C) e volume de raiz (D) medidos em plantas de quinoa aos 54 DAE, após um período de 30 dias na presença de seis concentrações de alumínio (0, 0,2, 1, 5, 25, 125 mg L⁻¹). As barras indicam o erro padrão da média. Letras diferentes no topo das colunas indicam a diferença entre os tratamentos com diferença significativa em $P < 0,05$ pelo teste de Tukey.

A massa seca das plantas de quinoa foi gradualmente reduzida à medida que as concentrações de alumínio foram aumentadas. A maior massa seca de plantas foi obtida no tratamento controle e a menor concentração de alumínio (0,2 mg Al L⁻¹), não havendo diferença entre esses tratamentos para raízes e parte aérea (Fig. 2). A massa seca da parte aérea das plantas expostas ao Al tiveram diminuição de 19%, 27%, 40% e 46% sob 1, 5, 25 e 125 mg de Al, respectivamente, comparado ao controle (Fig. 2A). Nas raízes de plantas condicionadas as concentrações de 1, 5, 15 e 125 mg de Al, o acúmulo de massa seca das raízes foi diminuído em 39%, 43%, 68% e 76%, respectivamente, comparado ao controle (Fig. 2C).

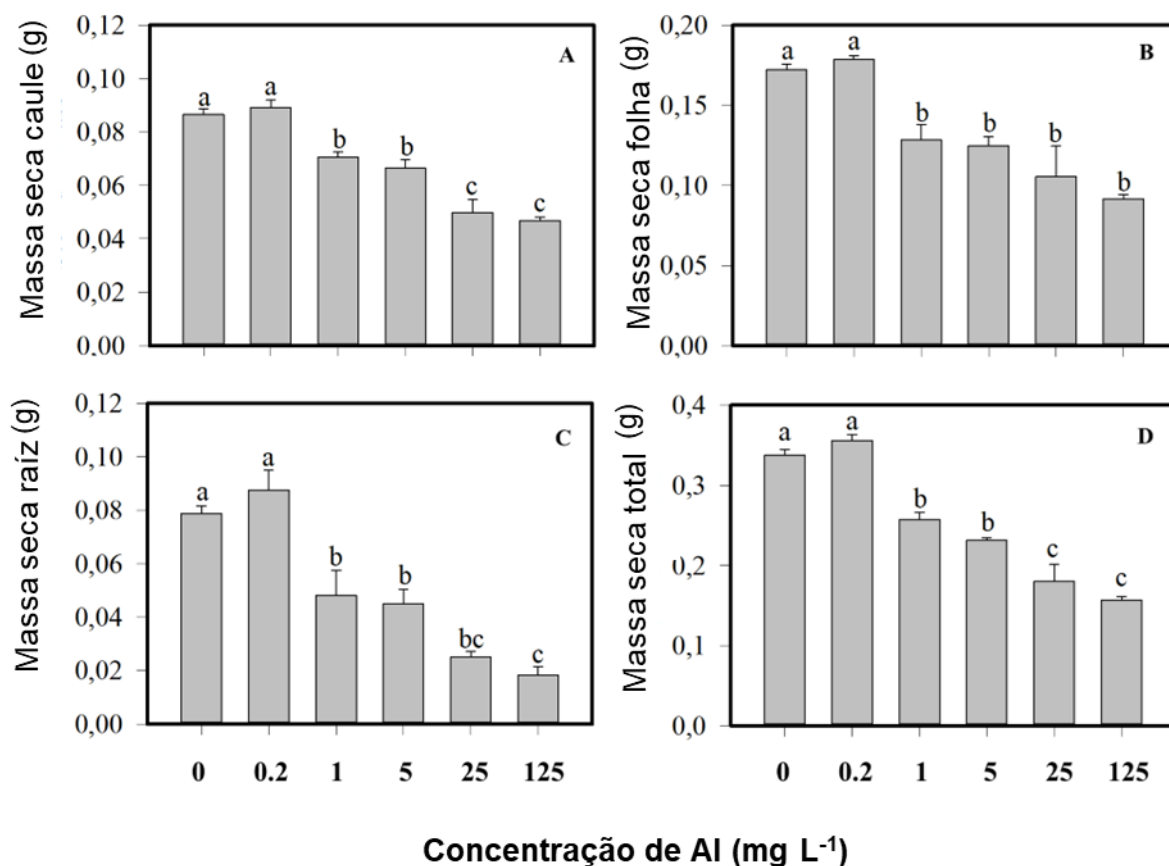


Fig. 2. Massa seca de caule (A) massa seca de folha (B), massa seca das raiz (C) e massa seca total (D) medidos em plantas de quinoa aos 54 DAE, após um período de 30 dias na presença de seis concentrações de alumínio (0, 0,2, 1, 5, 25, 125 mg L⁻¹). As barras indicam o erro padrão da média. Letras diferentes no topo das colunas indicam a diferença entre os tratamentos com diferença significativa em $P < 0,05$ pelo teste de Tukey.

Pigmentos fotossintéticos

As plantas que receberam o tratamento controle, 0,2 e 1 mg de Al L⁻¹ não diferiram entre si quanto ao teor de clorofila total, sendo superiores às demais. O menor teor de clorofila total foi observado nas plantas tratadas com 25 e 125 mg de Al, com decréscimos de 43 e 75%, respectivamente (Fig. 3A). As plantas que receberam o tratamento com 0,2 mg de Al L⁻¹ resultaram no maior teor de carotenóides, com aumento de 13% em relação ao tratamento controle. Em

concentrações de 25 e 125 mg foram responsáveis por um declínio de 36% e 71% no conteúdo de carotenóides (Fig. 3B).

Proteína e açúcares

O teor de proteína foi menor nas plantas que receberam as maiores concentrações de Al. Plantas submetidas às concentrações 25 e 125 mg apresentaram diminuição de 46% e 61%, respectivamente, comparado ao controle (Fig. 4A). O acúmulo de açúcares totais foi 28% e 37% maiores nas plantas sob as concentrações de 0,2 e 5 mg de Al que o tratamento controle.

Os açúcares totais da planta foram maiores nas concentrações de 0,2 e 5 mg L⁻¹, sendo 28% e 37% maiores que o tratamento controle. A maior concentração de Al (125 mg L⁻¹) foi responsável por uma redução de 17% em relação ao tratamento controle (Fig. 4B).

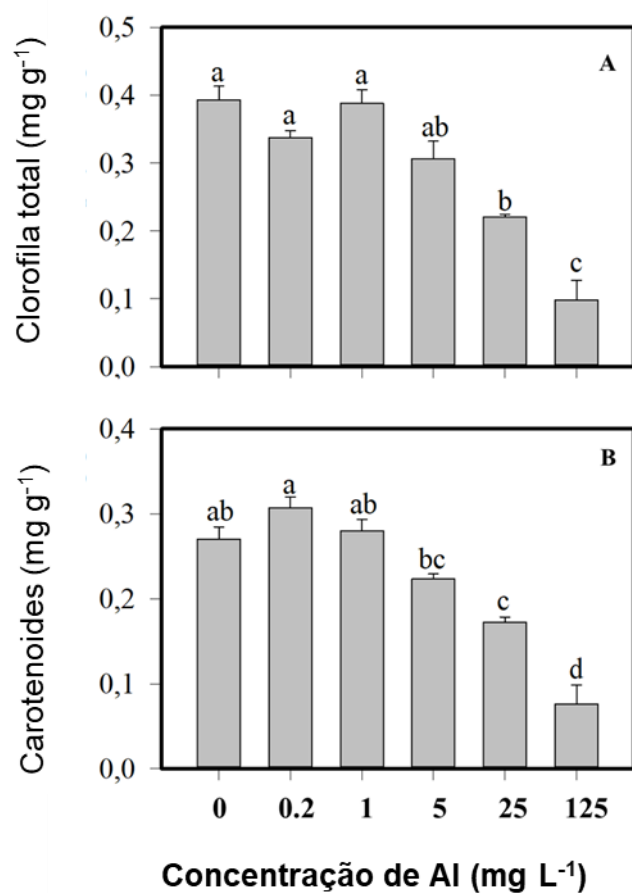


Fig. 3. Clorofila total (B) e teor de carotenoides (B) medidos em plantas de quinoa aos 54 DAE, após um período de 30 dias na presença de seis concentrações de alumínio (0, 0,2, 1, 5, 25, 125 mg L⁻¹). As barras indicam o erro padrão da média. Letras diferentes no topo das colunas indicam a diferença entre os tratamentos com diferença significativa em $P < 0,05$ pelo teste de Tukey.

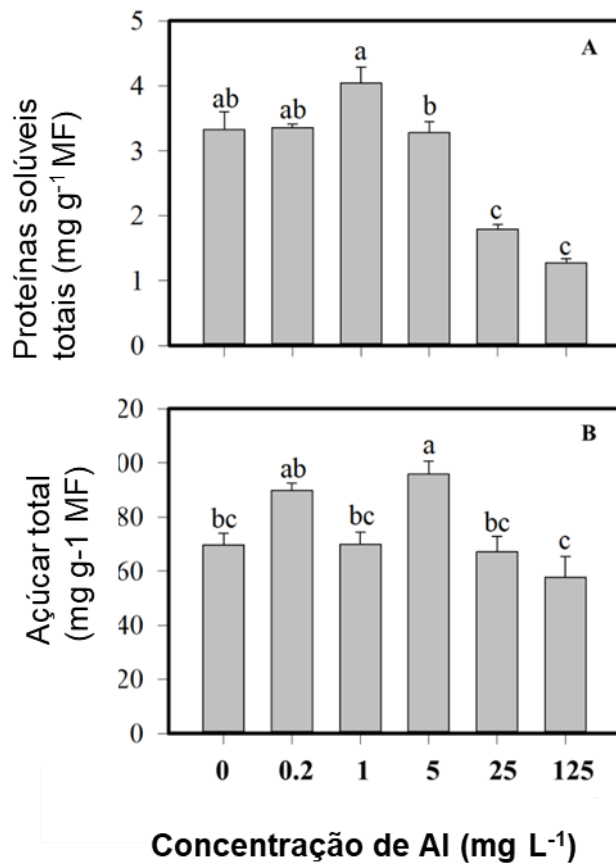


Fig. 4. Proteínas solúveis (A) e açúcar total (B) medidos em plantas de quinoa aos 54 DAE, após um período de 30 dias na presença de seis concentrações de alumínio (0, 0,2, 1, 5, 25, 125 mg L⁻¹). As barras indicam o erro padrão da média. Letras diferentes no topo das colunas indicam a diferença entre os tratamentos com diferença significativa em $P < 0,05$ pelo teste de Tukey.

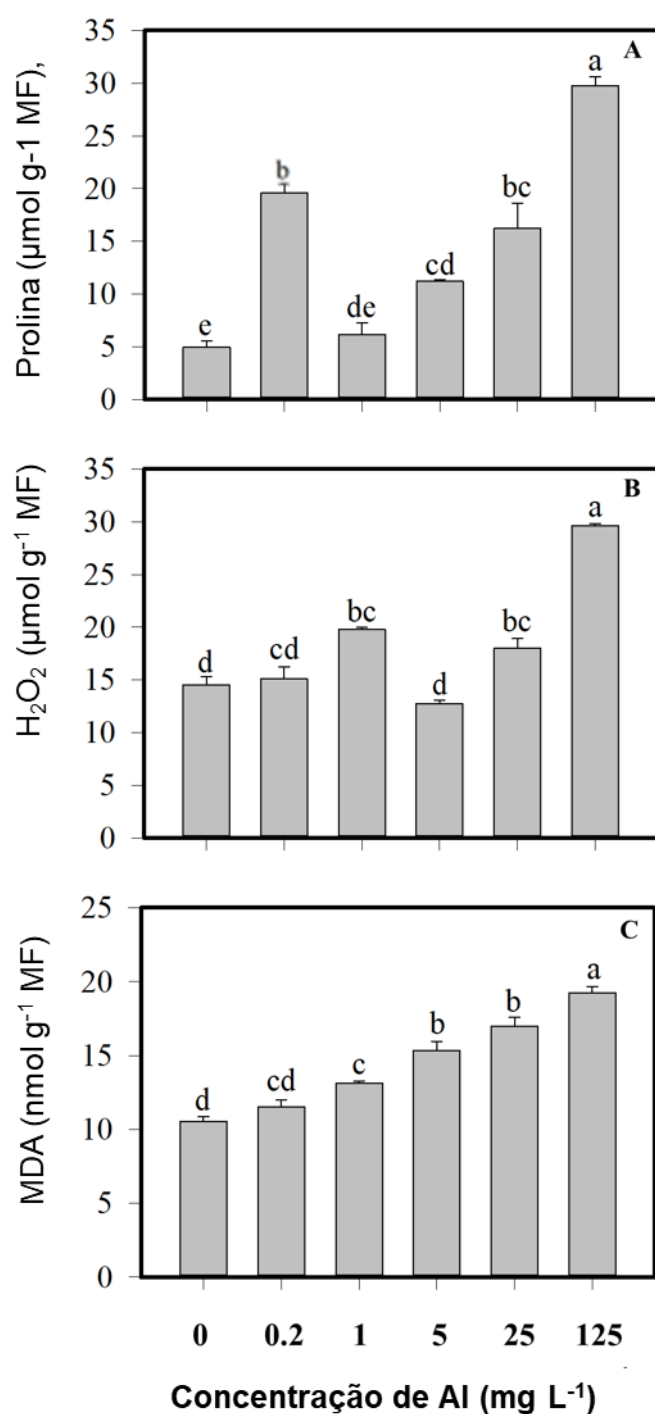


Fig. 5. Prolina (A), H₂O₂ (B) e malondialdeído (MDA) (C) medidos em folhas de plantas de quinoa com cinquenta e quatro dias de idade por um período de 14 dias na presença de seis concentrações de alumínio (0, 0,2, 1, 5, 25, 125 mg L⁻¹). As barras indicam o erro padrão da média. Letras diferentes no topo das colunas indicam a diferença entre os tratamentos com diferença significativa em $P < 0,05$ pelo teste de Tukey.

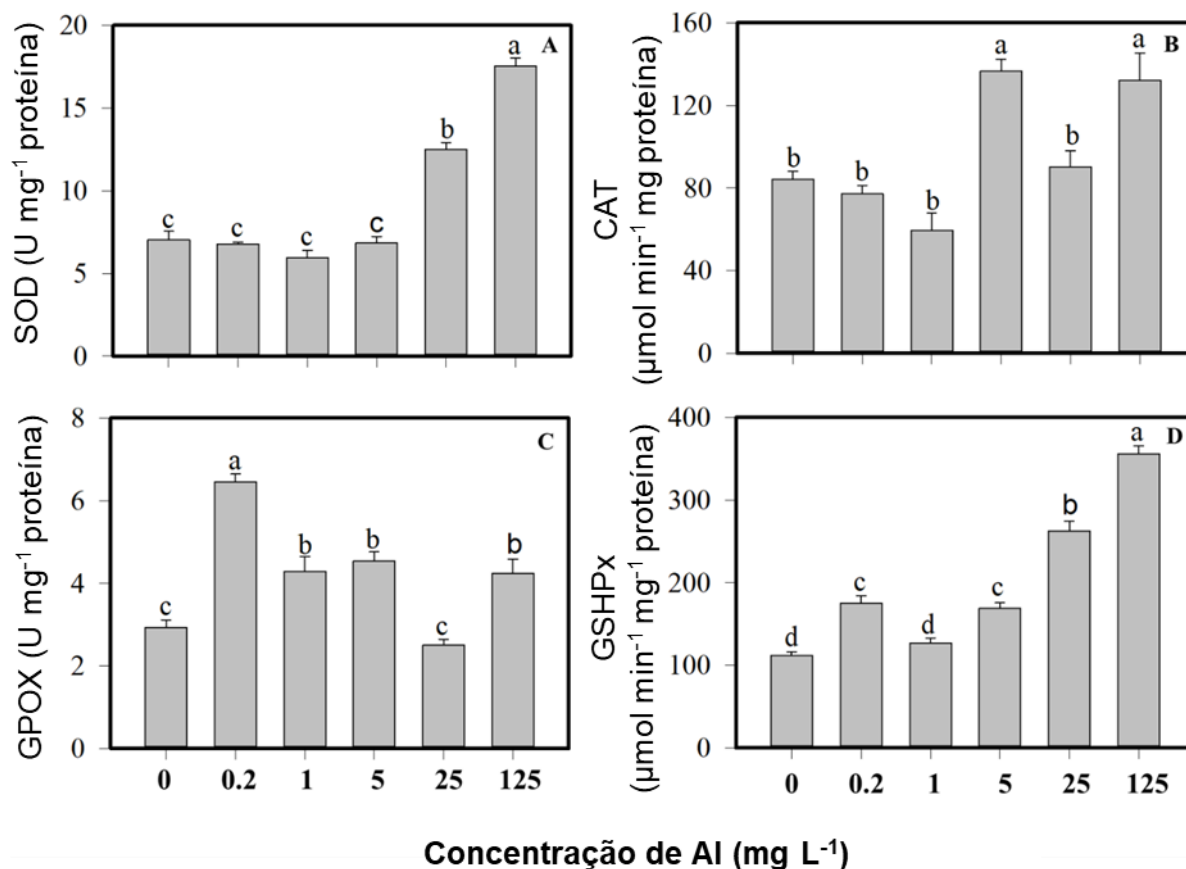


Fig. 6. Atividade enzimática. SOD (A), CAT(B), GPOX (C) e GSHPx (D) de folhas de plantas de quinoa com cinquenta e quatro dias de idade durante um período de 14 dias na presença de seis concentrações de alumínio (0, 0,2, 1, 5, 25, 125 mg L⁻¹). As barras indicam o erro padrão da média. Letras diferentes no topo das colunas indicam a diferença entre os tratamentos com diferença significativa em $P < 0,05$ pelo teste de Tukey.

Produção de prolina, peroxidação lipídica e teor de peróxido de hidrogênio

As plantas submetidas a 125 mg Al também apresentaram os maiores teores de H₂O₂, em comparação com o tratamento controle (Fig. 5B). Os teores de MDA nas plantas aumentaram 9,45%, 24%, 45%, 61% e 82% nos tratamentos 0,2, 1, 5, 2 e 125 mg de Al, respectivamente, em relação ao tratamento controle (Fig. 5C), porém não houve diferença entre a menor concentração de Al (0,2 mg Al) e o tratamento controle.

As plantas submetidas à 125 mg L⁻¹ apresentaram os maiores teores de H₂O₂, porém, já nas concentrações de 1 mg de Al e 25 mg de Al observou-se aumento de

36% e 24% no teor de peróxido de hidrogênio em relação às plantas do tratamento controle. Curiosamente, no tratamento com 5 mg de Al houve uma diminuição de 12% no teor de peróxido das plantas, em comparação com o tratamento controle (Fig. 5B).

O conteúdo de MDA das folhas aumentou à medida que as concentrações de Al aumentaram, porém não houve diferença entre a menor concentração de Al (0,2 mg Al) e o tratamento controle. O aumento no teor de MDA das plantas foi de 9,45%, 24%, 45%, 61% e 82% nos tratamentos 0,2, 1,5, 2 e 125 mg L⁻¹, respectivamente, em relação ao tratamento controle (Fig. 5C). A maior concentração de MDA foi observada nas plantas que receberam a maior concentração de Al (125 mg L⁻¹).

A produção de prolina nas plantas foi aumentada com a adição de concentrações de Al nas plantas, exceto para a concentração de 0,2 mg L⁻¹, que foi superior ao tratamento controle e inferior à concentração de 125 mg L⁻¹. A produção de prolina nas plantas que receberam o tratamento 125 mg de Al L⁻¹ aumentou 501% em relação ao tratamento controle. Plantas submetidas à concentração de 0,2 mg apresentaram aumento de 295% no conteúdo de prolina em comparação ao tratamento controle. Não houve diferença estatística entre os tratamentos controle e 1 mg de Al (Fig. 5A).

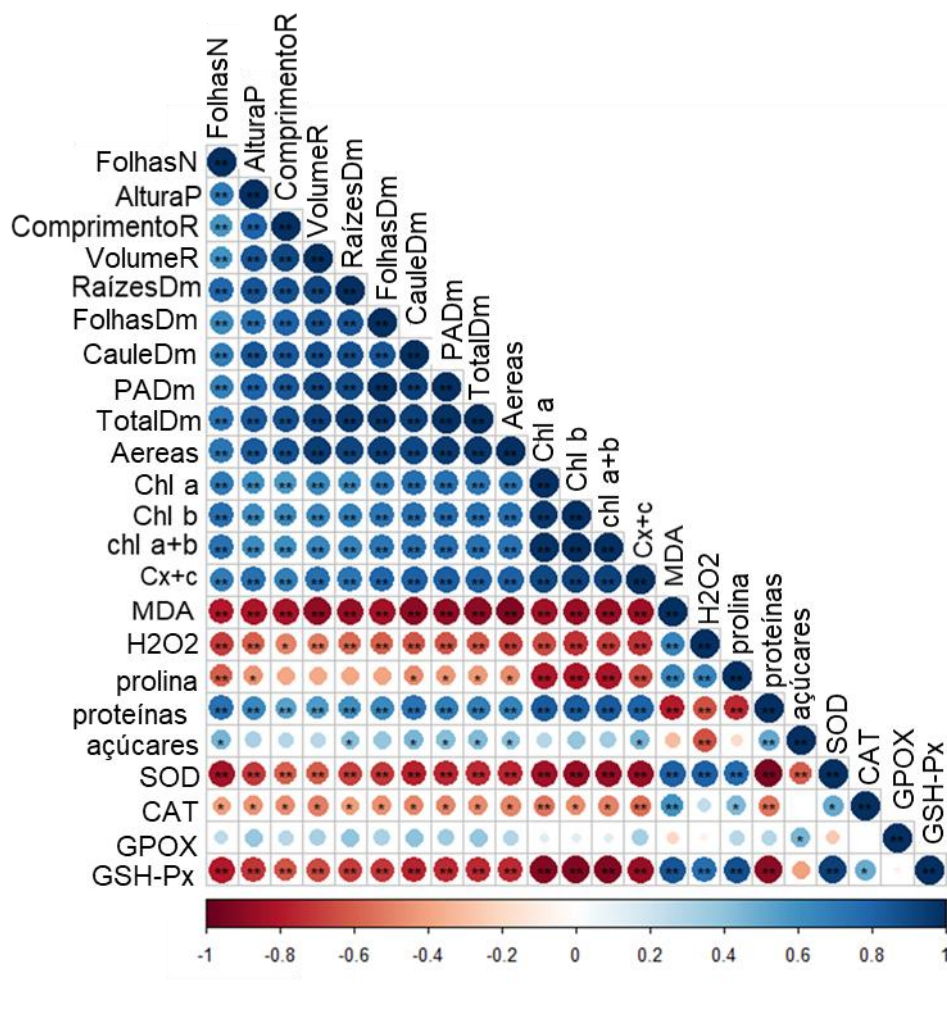


Fig. 7. Heatmap mostrando a correlação de Pearson entre os parâmetros biométricos, fisiológicos, bioquímicos e enzimáticos de plantas de quinoa em resposta à aplicação de Al como fonte de cloreto de alumínio. * Indica relação significativa ($p \leq 0,05$) e ** indica ($p \leq 0,01$). Abreviaturas: Número de folhas (FolhasN), Altura das plantas (AlturaP), Comprimento das raízes (ComprimentoR), Volume das raízes (VolumeR), Massa seca das raízes (RaízesDm), Massa seca das folhas (FolhasDm), Massa seca do caule (CauleDm), Massa seca da parte aérea (ShootDm), Massa Seca Total (TotalDm), Área foliar (Aereas), clorofila a (Chl a), clorofila b (Chl b), clorofila total (chl a+b), carotenóides totais (Cx+c), malondialdeído (MDA), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), conteúdo de prolina (prolina), proteínas solúveis totais (proteínas), açúcares totais (açúcares), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), guaiacol peroxidase (GPOX) e glutatona peroxidase (GSH-Px).

Atividade enzimática e correlação de Pearson

Nas plantas que receberam 25 e 125 mg de Al, observou-se aumentos na atividade da SOD em 78% e 149%, respectivamente, comparado ao controle (Fig. 6A). Nas plantas submetidas a 5 e 125 mg de Al, observou-se um aumento de 62% e 56% na atividade da CAT, em relação ao controle (Fig. 6B). Já para a GPOX, a maior atividade foi observada em plantas submetidas à menor concentração de Al (0,2 mg), responsável pelo aumento de 220,55% em relação ao tratamento controle (Fig. 6C).

O Al também estimulou aumentos progressivos na atividade da GSH-Px, pois nas plantas submetidas as concentrações de 0,2, 1, 5, 25 e 125 mg de Al houve incrementos de 57%, 14%, 51%, 135% e 219%, respectivamente, em comparação ao tratamento controle (Fig. 6D).

Nas plantas que receberam os tratamentos 25 mg L⁻¹ e 125 mg L⁻¹, observou-se maior atividade da enzima SOD 78% e 149%, respectivamente, e não houve diferença entre os tratamentos controle, 1, 0.2. e 5 mg L⁻¹ de Al (Fig. 6A).

Nas plantas tratadas com 5 mg L⁻¹ e 125 mg de Al, observou-se um aumento de 62% e 56% na atividade da enzima catalase, não havendo diferença entre os tratamentos controle, 0,2 e 1 mg L⁻¹ (FIG. 6B). O tratamento 0,2 mg de Al L⁻¹ foi responsável pela maior atividade da enzima GPOX em plantas de quinoa, com aumento de 220,55% em relação ao tratamento controle (Fig. 6C). E as menores atividades no tratamento controle e 25 mg L⁻¹.

O Al estimulou a atividade enzimática de GSH-Px, de modo que as maiores atividades da enzima GSH-Px foram obtidas em plantas com maiores concentrações de Al (25 e 125 mg de Al), sendo 135% e 219% maiores que o tratamento controle. Com exceção da concentração de 1 mg L⁻¹, houve uma tendência de aumento progressivo e linear da atividade de GSH-Px à medida que a concentração de Al no meio aumentou em 57%, 14%, 51%, 135% e 219%, respectivamente, em comparação com o tratamento de controle (Fig. 6D).

Em geral, foi observada correlação positiva entre pigmentos fotossintéticos e proteína total com os parâmetros de crescimento e massa seca de planta (Fig. 7), evidenciando a importância destes para o desenvolvimento das plantas. Por outro lado, verificou-se correlação negativa do MDA com os parâmetros de crescimento,

massa seca, pigmentos fotossintéticos e proteína totais e açúcares totais. Já a enzima SOD correlacionou-se positivamente com H_2O_2 , MDA e prolina. A enzima CAT correlacionou-se negativamente com o teor de carotenoides, enquanto GPOX foi positivamente correlacionada com os açúcares totais. Observou-se, também, correlação positiva entre GSH-Px, prolina, SOD, MDA e H_2O_2 (Fig. 7).

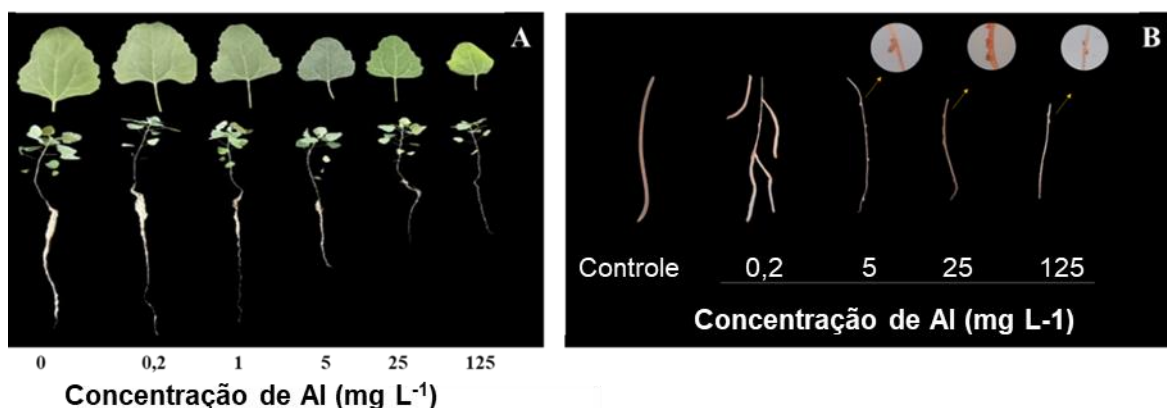


Fig.8. Efeito do alumínio no crescimento de plantas de quinoa expostas a 0, 0,2, 1, 5, 25 e 125 mg L⁻¹ por 30 dias na planta (A) e no ápice radicular(B).

5. DISCUSSÃO

A alta disponibilidade de Al^{+3} no ambiente de cultivo das plantas limita o crescimento da maioria das espécies agrícolas cultivadas. Embora os programas de melhoramento de plantas tenham selecionado cultivares com maior tolerância ao Al^{+3} , os mecanismos bioquímicos e fisiológicos envolvidos na proteção das plantas a este elemento ainda carecem de esclarecimentos. A quinoa é a única espécie entre cereais e pseudo-cereais, que, além de possui todos os aminoácidos essenciais para dieta humana (De Oliveira Vergara et al., 2019), foi selecionada como alimento para segurança alimentar mundial (ONU 2020) e tem sido considerada tolerante a diversos estresses abióticos (Lata-Tenesaca et al., 2021). Assim, consideramos a hipótese que a cultivar de quinoa BRS PIABIRU apresente mecanismos de desintoxicação aos

efeitos deletérios do Al^{+3} , haja vista que a cultivar foi desenvolvida para ambiente de cerrado, notavelmente de pH ácido com elevado teores Al^{+3} (Spehar et al., 2006).

Crescimento de plantas

Nossos resultados mostraram que plantas de quinoa cultivadas na presença de 0.2 mg L^{-1} Al apresentaram incremento de volume radicular (Fig 1D) com crescimento de raízes secundárias (Fig 6B). Tal acréscimo pode estar relacionado com o já relatado efeito do metal observado em outras espécies, especialmente nas culturas do chá verde (*Camellia sinensis*), rododendro indiano (*Melastoma malabathricum*) e da cultura do arroz (*Oryza sativa*), em que o Al é capaz de induzir o alongamento radicular, além de desenvolvimento de raízes secundárias, o que pode explicar o aumento do volume radicular em tais plantas (Ghanati et al., 2005; Watanabe et al., 2005), mas os mecanismos envolvidos nesta indução ainda não são bem esclarecidos.

Já em concentrações maiores (5 a 125 mg L^{-1}) o Al induziu danos fisiológicos em raíz e parte aérea, apresentado pelas reduções no tamanho e volume de raízes, além da diminuição na área foliar, o que impactou negativamente o acúmulo de massa seca destes órgãos (Fig 2). Isso sugere que o dano do Al as plantas de quinoa seja sistêmico, acometendo a planta inteira. Há estudos incipientes que apontam os danos provocados do Al nas raízes relacionando com auxina (Li et al., 2018), pectinas (Nagayama et al., 2022) e capacidade do genótipo de alterar o pH da rizosfera, que está intimamente relacionada com a exsudação de ácidos orgânicos no meio (Zheng et al, 1998; Nazari et al., 2023).

Pigmentos fotossintéticos

Além do comprometimento radicular das plantas (Abd El-Moneim et al., 2014; Awasthi et al., 2017), o Al acarreta mudanças também na parte aérea, como diminuição da área foliar (Gavassi et al., 2020) e alteração na coloração das folhas, seja por pontuações esbranquiçadas (Rouphael et al., 2017) e/ou amarelecimento

(RIAZ et al., 2018; Blamey et al., 2015). A ação fitotóxica do Al acarreta alterações nas estruturas foliares que podem afetar diretamente a atividade do sistema fotossintético (Almeida et al., 2019). De fato, a partir 5 mg L⁻¹ de Al, as plantas de quinoa apresentaram uma redução significativa nos teores de clorofila total e carotenoides (Fig. 3), indicando uma menor capacidade de eficiência fotoquímica. Isto afetou diretamente a integridade metabólica celular refletindo em diminuições no conteúdo de açúcar total (Fig. 3B) e proteínas (Fig. 3A), importantes precursores de outros metabólitos essenciais as plantas (Wang et al., 2015). Esse mecanismo contribui para elucidar o papel do Al na redução do crescimento das plantas de quinoa BRS PIABIRU.

Proteína e açúcar

A concentração 1 mg L⁻¹ de Al estimulou a produção de proteínas solúveis totais em plantas de quinoa, no entanto, nas maiores concentrações, as diminuições foram lineares (Fig. 3). Em estudo de Tamman et al. (2018) em mudas de arroz, a aplicação de 500 µM de Al também aumentou o teor de proteínas solúveis totais em 20% em relação ao tratamento controle. Tal acréscimo carece de maiores esclarecimentos na literatura, no entanto especulamos que seja também um mecanismo de tolerância ao Al em plantas de quinoa, pois o conteúdo de MDA nesta concentração não diferiu do MDA obtido na concentração 0.2 mg (Fig. 5A), que obteve aumento no volume de raízes (Fig 1D) e massa seca semelhante ao tratamento controle (Fig 2D).

Produção de prolina, peroxidação lipídica e conteúdo de peróxido de hidrogênio

O aminoácido prolina ocorre amplamente nas plantas e normalmente se acumula em grandes quantidades em resposta a estresses abióticos (Giannakoula et al., 2008), incluindo o estresse por Al (Galvez et al., 1991; Hayat et al., 2012; Klan et

al., 2000). Todavia, nossos dados revelam que a concentração de Al de 0,2 mg L⁻¹ (0,007 mmol L⁻¹) não representou um fator estressante para a cultivar de quinoa testada, pelo contrário, tal concentração promoveu crescimento de raízes, com efeito estimulante nos teores de carotenoides e de prolina, sem haver, portanto, acréscimo no conteúdo de MDA em relação ao tratamento controle. Tais respostas estão em consonância com estudos de Moreno-Alvarado et al. (2017) em que 0,2 mmol L⁻¹ de Al resultou em efeito benéfico quanto ao crescimento das plantas, teor de aminoácidos e prolina. Neste sentido, nossos dados mostram que os teores de prolina nas plantas de quinoa expostas ao Al confirmaram o papel deste osmólito no alívio da toxicidade causada pelo Al, especialmente na concentração 0,2 mg (Fig. 4C). O papel da prolina como protetor celular sob condições de estresse a partir da eliminação e tamponamento das células de potencial redox foi demonstrado também nos trabalhos de Ashraf & Fooland, (2015) com a cultura do arroz.

Atividade enzimática e correlação de Pearson

O estresse oxidativo em plantas é caracterizado pela ruptura da homeostase celular, gerado a partir da superprodução de espécies reativas do oxigênio (ROS). Nestas condições, além de mecanismos não enzimáticos, tais como prolina e carotenoides, as plantas ativam um sistema de defesa antioxidante enzimático, que compreendem, por exemplo, as enzimas superóxido dismutase (SOD, EC: 1,15,1,1), catalase (CAT, EC 1.11. 1.6), guaiacol peroxidase (GPOX, EC1.11.1.7), glutathione peroxidase (GSH-Px, EC 1.11.1.9) que também estão envolvidas na eliminação do excesso de ROS no tecido vegetal (Kuo e Kao, 2003; Zouari et al. 2016; Serna, et al., 2020; Amjad et al., 2021) e protegem as células vegetais do dano oxidativo, eliminando e neutralizando as ROS, no sentido de restaurar o equilíbrio entre sua produção e degradação.

A primeira resposta de defesa das plantas para restabelecer a homeostase celular e amenizar a toxicidade de Al, são estratégias de mecanismo DETOX enzimático, com participação de enzimas como a SOD, que dismutam superóxido em

peróxido de hidrogênio (Noctor e Foyer 2016). Em seguida, o H_2O_2 pode ser eliminado pela catalase (CAT, EC 1.11.1.6), glutathione peroxidase (GPX, EC 1.11.1.9) (Noctor et al. 2018) e outras peroxidases. Já as enzimas CAT e GPOX desempenham papel importante na detoxificação do H_2O_2 , pois utiliza este substrato da enzima SOD (o peróxido de hidrogênio) e o degrada, em H_2O e O_2 . Nossos resultados evidenciam tal evento. Em nosso trabalho, a atividade da enzima SOD foi menor nas concentrações mais baixas de Al (0.2, 1 e 5 mg L^{-1}) e não diferiram das plantas de quinoa do tratamento controle. Além disso, não houve aumento pronunciado no conteúdo de MDA em tais concentrações (Fig. 5C), o que se pode deduzir que não houve alta atividade enzimática desta enzima pois não houve desequilíbrio da homeostase celular com superprodução de ERO nas menores concentrações de Al. No entanto, as maiores concentrações de Al (25 e 125 mg L^{-1}), provocaram aumento da atividade da enzima SOD, sendo ainda maior na maior concentração de Al, o que corresponde também ao maior conteúdo de H_2O_2 (Fig 5B). Tal resultado é esperado e indica a alta capacidade da enzima em dismutar o O_2^- em H_2O_2 . Esses achados são consistentes com os resultados de estudos anteriores que mostraram que a atividade da SOD foi aumentada em outras plantas já consideradas tolerantes ao Al, como na cultura do chá (Huang et al., 2021) e do arroz (Basit et al., 2022).

Assim, quando há a superprodução de ERO, as plantas podem ativar um sistema de defesa antioxidante enzimático, que compreendem, por exemplo, as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), guaiacol peroxidase (GPOX), e mecanismos não enzimáticos, como prolina (PRO) e carotenoides (CAR) que também estão envolvidos na eliminação do excesso de ROS no tecido vegetal (Zouari et al. 2016; SERNA, et al., 2020; AMJAD et al., 2021) e protegem as células vegetais do dano oxidativo, eliminando e neutralizando as ROS, no sentido de restaurar o equilíbrio entre sua produção e degradação.

Em nossos resultados, o estresse e dano oxidativo por Al foi constatado pelo aumento no conteúdo de MDA (Fig. 5C), declínio no conteúdo de pigmentos fotossintéticos (Fig. 4A e B), proteínas (Fig. 3A) e açúcares totais (Fig.3B) que, afetou negativamente o crescimento das plantas (Fig. D e E), com consequente diminuição do acúmulo de biomassa (Fig. 1D), com declínio da massa seca da parte aérea (Fig 1B) e massa seca de raízes (Fig. 1C) a partir da concentração 1 mg de Al L^{-1} , e sendo

o decréscimo mais pronunciado a partir da concentração 5 mg de Al^{-1} . E ainda, plantas submetidas as concentrações acima de 5 mg L^{-1} acarretou decréscimo de proteínas totais, todavia acompanhado com acréscimo na atividade de enzimas, tais como SOD e GSH-Px.

Estudos recentes mostram a contribuição do sistema antioxidante da quinoa na proteção das plantas contra diferentes tipos de estresse como o déficit hídrico (Serna et al., 2020), salinidade (Parvéz et al., 2020), estresse térmico (Hinojosa et al., 2019) e por metais pesados como cádmio e chumbo (Guarino et al., 2020). Na presente pesquisa, foi observado aumento na atividade das enzimas SOD, CAT, GPOX e GSH-Px em plantas submetidas ao Al (Fig. 5). Entretanto, tais atividade enzimáticas mostraram padrões de ativação diferenciados: a GPOX apresentou maior atividade nas menores concentrações de Al (Fig. 5 C), enquanto SOD, CAT e GSH-px foram estimuladas nas maiores (Figs. 5 A, B e D), sugerindo que estas enzimas antioxidantes permaneceram ativas fornecendo uma proteção maior evitando o colapso e morte das plantas, embora o Al tenha causado efeitos negativos ao crescimento e ao metabolismo das plantas de quinoa (Fig. 1).

Quanto as especificidades de cada enzima, uma das primeiras respostas de defesa das plantas para restabelecer a homeostase celular em condições de estresse envolve a participação da SOD, que dismuta o ânion superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Noctor e Foyer 2016). Em seguida, o H_2O_2 pode ser eliminado pela CAT (Noctor et al. 2018) e outras peroxidases. A GPOX também desempenha papel importante na desintoxicação do H_2O_2 , pois utiliza H_2O_2 da enzima SOD, e proveniente de outras vias, e o degrada, em H_2O e O_2 . Em nosso trabalho, a atividade da enzima SOD foi menor nas concentrações mais baixas de Al (0,2, 1 e 5 mg L^{-1}) e não diferiram das plantas de quinoa do tratamento controle. Além disso, não houve aumento pronunciado no conteúdo de MDA em tais concentrações (Fig. 5C), o que se pode deduzir que não houve alta atividade enzimática desta enzima pois não houve desequilíbrio da homeostase celular com superprodução de ROS nas menores concentrações de Al. No entanto, as maiores concentrações de Al (25 e 125 mg L^{-1}), provocaram aumento da atividade da enzima SOD, sendo mais elevada na maior concentração de Al, o que corresponde também ao maior conteúdo de H_2O_2 (Fig. 5B). Tal resultado é esperado e indica a alta capacidade da enzima em dismutar o O_2^- em

H₂O₂. Esses achados são consistentes com os resultados de estudos anteriores que mostraram que a atividade da SOD foi aumentada em outras plantas já consideradas tolerantes ao Al, como na cultura do chá (Huang et al., 2021) e do arroz (Basit et al., 2022). Além disso, nossos dados mostraram que as enzimas SOD, CAT e GSH-PX parecem atuar conjuntamente na promoção de tolerância ao Al em concentrações mais elevadas de Al, pois o incremento de suas atividades correlacionou positivamente com o MDA e H₂O₂ (Fig. 7), ou seja, com exceção da GPOX, houve correlação positiva entre as enzimas SOD, CAT e GSH-PX com o principal indicador de estresse oxidativo MDA (Fig. 7), o que evidencia o papel importante destas enzimas na proteção do estresse por Al. E ainda, a correlação positiva entre SOD, CAT e GSH-PX mostra o sinergismo de ação dessas enzimas (Fig. 7). Assim, foram observados aumentos de atividade das enzimas SOD, CAT, GPOX e GSH-Px em plantas submetidas ao alumínio (Fig. 6), porém estas enzimas mostraram um padrão de ativação diferente; a GPOX apresentou maior atividade nas menores concentrações de Al (Fig. 6C), enquanto SOD, CAT e GSH-Px foram estimuladas nas maiores (Figs. 6A, B e D), o que sugere que estas enzimas antioxidantes permaneceram ativas fornecendo uma proteção maior evitando o colapso e morte das plantas, dado os efeitos negativos bem pronunciados do Al no crescimento, massa seca e metabolismo das plantas de quinoa. E ainda, enzima GPOX foi fundamental para que minimizar o efeito deletério do Al na concentração 0,2 mg L⁻¹, haja vista que não houve diferença na massa seca e na produção de MDA em relação às plantas do tratamento controle. Tal fato pode ser explicado pela atuação da GPOX estar relacionada à manutenção da integridade da parede celular, e assim, anulou-se o efeito tóxico nestas em tais circunstâncias, haja vista que o poder deletério do Al é responsável por afetar, sobretudo, membranas e parede celular com posterior lesão dos tecidos (Awasthi et al., 2017).

Nossos resultados indicam também que há, fundamentalmente, dois mecanismos de tolerância ao Al em plantas de quinoa, a depender da concentração: na menor concentração (0,2mg L⁻¹) há incremento do sistema antioxidante com atuação sobretudo da prolina (antioxidante não enzimático) e da GPOX, enquanto na concentração mais elevada (125 mg) há aumento significativo das enzimas antioxidantes como SOD, CAT e GSH-Px. Estes resultados sinalizam o dinamismo do

sistema antioxidante de defesa das plantas na manutenção de atividades fisiológicas das plantas de quinoa sob diferentes concentrações de Al em ambientes ácidos.

E ainda, é possível visualizar duas vias de tolerância ao Al. A primeira com atuação nas menores concentrações (até $0,2 \text{ mg L}^{-1}$), com atuação da prolina e da GPOX. E outra, nas maiores concentrações (25 e 125 mg L^{-1}), em que também há atuação da prolina, todavia sem aumento da GPOX, mas com incremento das enzimas SOD, CAT e GSH-Px. No primeiro caso, observa-se a tolerância ao Al em plantas de quinoa. Já no segundo, o incremento do sistema antioxidante enzimático, sem atuação da GPOX, não foi suficiente para reduzir os efeitos deletérios do Al em massa seca e aumento da produção de MDA.

Em síntese, o crescimento e acúmulo de massa seca de plantas de quinoa foram diminuídos à medida que as concentrações de alumínio foram aumentadas. Entretanto, é importante ressaltar que a concentração $0,2 \text{ mg}$ de Al estimulou maior volume de raízes, conteúdo de prolina, açúcar total e atividade da GPOX. Em maiores concentrações de Al (25 e 125 mg) houve incremento expressivo no conteúdo de MDA, acompanhado com aumento na atividade das enzimas SOD, CAT e GSH-Px, o que evitou colapso no metabolismo vegetal. Estudos futuros nas áreas proteômicas e metabolômicas podem auxiliar na elucidação de outros mecanismos de tolerância ao Al em plantas de quinoa.

6. CONCLUSÃO

A toxicidade do Al acarretou diminuição no crescimento, biomassa e pigmentos fotossintéticos, além provocar aumento linear na peroxidação lipídica em plantas de quinoa, o que indica não tolerância ao metal. Portanto, não se recomenda o cultivo de quinoa BRS-Piabiru em ambientes de pH 4 com concentrações de Al^{3+} disponível a partir de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de Al^{3+} . No entanto, maior atividade da GPOX, juntamente com maior produção de prolina, estão associados a ganhos em volume de raízes na concentração de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$. Por fim, a correlação positiva entre enzimas antioxidantes e concentração crescente de Al, indica que este sistema de defesa contribui para minimizar os danos causados pela toxicidade do Al. O presente estudo constitui a

base para o conhecimento dos efeitos do Al em plantas de quinoa, contribuindo para o posicionamento desta espécie em ambientes ácidos com teores elevados de Al livre.

7. REFERÊNCIAS

Abd El-Moneim, D., Contreras, R., Silva-Navas, J., Gallego, F. J., Figueiras, A. M., & Benito, C. (2014) Pectinmethylesterase gene and aluminum tolerance in *Secale cereale*. **Environmental and experimental botany**, 107, 125-133

Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., & Karanov, E. (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell&Environment**, 24(12), 1337-1344

Almeida Rodrigues, A., Carvalho Vasconcelos Filho, S., Müller, C., Almeida Rodrigues, D., de Fátima Sales, J., Zuchi, J., ... & Pereira Barbosa, D. (2019) Tolerance of *Eugenia dysenterica* to aluminum: germination and plant growth. **Plants**, 8 (9), 317

Amjad, M., Iqbal, M. M., Abbas, G., Farooq, A. B. U., Naeem, M. A., Imran, M., ... & Jacobsen, S. E. (2022) Assessment of cadmium and lead tolerance potential of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) and its implications for phytoremediation and human health. **Environmental Geochemistry and Health**, 44(5), 1487-1500

Angeli, V., Miguel Silva, P., Crispim Massuela, D., Khan, M. W., Hamar, A., Khajehei, F., ... & Piatti, C. (2020) Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): An overview of the potentials of the “Golden Grain” and socio-economic and environmental aspects of its cultivation and marketization. **Foods**, 9(2), 216

Ashraf, M. F. M. R., & Foolad, M. R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and experimental botany**, 59(2), 206-216.

Awasthi, J. P., Saha, B., Panigrahi, J., Yanase, E., Koyama, H., & Panda, S. K. (2019) Redox balance, metabolic fingerprint and physiological characterization in contrasting Northeast Indian rice for aluminum stress tolerance. **Scientific reports**, 9(1), 1-21

Awasthi, J. P., Saha, B., Regon, P., Sahoo, S., Chowra, U., Pradhan, A., ... & Panda, S. K. (2017) Morpho-physiological analysis of tolerance to aluminum toxicity in rice varieties of Northeast India. **PloS one**, 12(4), e0176357

AYERS, Robert S. et al. Water quality for agriculture. **Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 1985.

Barrs, H. D., & Weatherley, P. E. (1962). A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. **Australian journal of biological sciences**, 15(3), 413-428

Basit, F., Liu, J., An, J., Chen, M., He, C., Zhu, X., ... & Guan, Y. (2022) Seed priming with brassinosteroids alleviates aluminum toxicity in rice via improving antioxidant defense system and suppressing aluminum uptake. **Environmental Science and Pollution Research**, 29 (7), 10183-10197

Bates, C. J., Prynne, C. J., & Levene, C. I. (1972) Ascorbate-dependent differences in the hydroxylation of proline and lysine in collagen synthesized by 3T6 fibroblasts in culture. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure**, 278(3), 610-616

Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and soil**, 39(1), 205-207

Blamey, F. P. C., Hernandez-Soriano, M. C., Cheng, M., Tang, C., Paterson, D. J., Lombi, E., ... & Kopittke, P. M. (2015) Synchrotron-based techniques shed light on mechanisms of plant sensitivity and tolerance to high manganese in the root environment. **Plant Physiology**, 169(3), 2006-2020

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, 72(1-2), 248-254

Cárcamo, M. P., Reyes-Díaz, M., Rengel, Z., Alberdi, M., Omena-Garcia, R. P., Nunes-Nesi, A., & Inostroza-Blancheteau, C. (2019) Aluminum stress differentially affects physiological performance and metabolic compounds in cultivars of highbush blueberry. **Scientific reports**, 9(1), 1-13

Carcamo-Fincheira, P., Reyes-Diaz, M., Omena-Garcia, R. P., Vargas, J. R., Alvear, M., Florez-Sarasa, I., ... & Inostroza-Blancheteau, C. (2021) Metabolomic analyses of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) cultivars revealed mechanisms of resistance to aluminum toxicity. **Environmental and Experimental Botany**, 183, 104338

Clark, R. B. (1975) Characterization of phosphatase of intact maize roots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 23(3), 458-460

CLARK, Ralph B. Characterization of phosphatase of intact maize roots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 23, n. 3, p. 458-460, 1975.

Du, H., Huang, Y., Qu, M., Li, Y., Hu, X., Yang, W., ... & Zhang, S. (2020) A maize ZmAT6 gene confers aluminum tolerance via reactive oxygen species scavenging. **Frontiers in plant science**, 11, 1016

Famoso, A. N., Clark, R. T., Shaff, J. E., Craft, E., McCouch, S. R., & Kochian, L. V. (2010) Development of a novel aluminum tolerance phenotyping platform used for comparisons of cereal aluminum tolerance and investigations into rice aluminum tolerance mechanisms. **Plant physiology**, 153(4), 1678-1691

Galvez, L., Clark, R. B., Klepper, L. A., & Hansen, L. (1991) Organic acid and free proline accumulation and nitrate reductase activity in sorghum (*Sorghum bicolor*) genotypes differing in aluminium tolerance. In **Plant-Soil Interactions at Low pH** (pp. 859-867). Springer, Dordrecht.

Gavassi, M. A., Dodd, I. C., Puértolas, J., Silva, G. S., Carvalho, R. F., & Habermann, G. (2020) Aluminum-induced stomatal closure is related to low root hydraulic conductance and high ABA accumulation. **Environmental and Experimental Botany**, 179, 104233

- Ghanati, F., Morita, A., & Yokota, H. (2005) Effects of aluminum on the growth of tea plant and activation of antioxidant system. **Plant and soil**, 276(1), 133-141
- Giannakoula, A., Moustakas, M., Mylona, P., Papadakis, I., & Yupsanis, T. (2008) Aluminum tolerance in maize is correlated with increased levels of mineral nutrients, carbohydrates and proline, and decreased levels of lipid peroxidation and Al accumulation. **Journal of plant physiology**, 165(4), 385-396
- Giannakoula, A., Moustakas, M., Syros, T., & Yupsanis, T. (2010) Aluminum stress induces up-regulation of an efficient antioxidant system in the Al-tolerant maize line but not in the Al-sensitive line. **Environmental and Experimental Botany**, 67(3), 487-494
- Giannopolitis, C. N., & Ries, S. K. (1977). Superoxide dismutases: II. Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings. **Plant physiology**, 59(2), 315-318
- GOLA, Deepak et al. Assessment of drain water used for irrigation in the Delhi region. **Journal of Health and Pollution**, v. 10, n. 26, 2020.
- Grenfell-Shaw, L., & Tester, M. (2021) Abiotic stress tolerance in quinoa. In *The quinoa genome* (pp. 139-167). Springer, Cham.
- Guarino, F., Ruiz, K. B., Castiglione, S., Cikatelli, A., & Biondi, S. (2020) The combined effect of Cr (III) and NaCl determines changes in metal uptake, nutrient content, and gene expression in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 193, 110345
- Guo, P., Qi, Y. P., Cai, Y. T., Yang, T. Y., Yang, L. T., Huang, Z. R., & Chen, L. S. (2018) Aluminum effects on photosynthesis, reactive oxygen species and methylglyoxal detoxification in two Citrus species differing in aluminum tolerance. **Treephysiology**, 38(10), 1548-1565.
- Hinojosa, L., González, J. A., Barrios-Masias, F. H., Fuentes, F., & Murphy, K. M. (2018) Quinoa abiotic stress responses: A review. **Plants**, 7(4), 106

- Hinojosa, L., Matanguihan, J. B., & Murphy, K. M. (2019) Effect of high temperature on pollen morphology, plant growth and seed yield in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). **Journal of agronomy and crop science**, 205(1), 33-45
- Hirich, A., Jelloul, A., Choukr-Allah, R., & Jacobsen, S. E. (2014) Saline water irrigation of quinoa and chickpea: seedling rate, stomatal conductance and yield responses. **Journal of Agronomy and Crop Science**, 200(5), 378-389
- Huang, D., Gong, Z., Chen, X., Wang, H., Tan, R., & Mao, Y. (2021) Transcriptomic responses to aluminum stress in tea plant leaves. **Scientific reports**, 11(1), 1-10
- Khan, A. A., McNeilly, T., & Collins, J. C. (2000) Accumulation of amino acids, proline, and carbohydrates in response to aluminum and manganese stress in maize. **Journal of plant nutrition**, 23 (9), 1303-1314
- Kuo, M. C., & Kao, C. H. (2003). Aluminum effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. **Biologia plantarum**, 46(1), 149-152
- Lata-Tenesaca, L. F., de Mello Prado, R., de Cássia Piccolo, M., da Silva, D. L., & da Silva, J. L. F. (2021) Silicon modifies C: N: P stoichiometry and increases nutrient use efficiency and productivity of quinoa. **Scientific reports**, 11(1), 1-9
- LI, Xuewen et al. Boron alleviates aluminum toxicity by promoting root alkalization in transition zone via polar auxin transport. **Plant Physiology**, v. 177, n. 3, p. 1254-1266, 2018.
- Lightenthaler, H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in enzymology**, 148, 350-382
- Ma, B., Gao, L., Zhang, H., Cui, J., & Shen, Z. (2012). Aluminum-induced oxidative stress and changes in antioxidant defenses in the roots of rice varieties differing in Al tolerance. **Plant cell reports**, 31(4), 687-696
- Ma, Q., Rengel, Z., & Kuo, J. (2002) Aluminium toxicity in rye (*Secale cereale*): root growth and dynamics of cytoplasmic Ca^{2+} in intact root tips. **Annals of Botany**, 89(2), 241-244.
- Matsumoto, H., & Motoda, H. (2012) Aluminum toxicity recovery processes in root apices. Possible association with oxidative stress. **Plant Science**, 185, 1-8

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

Moreno-Alvarado, M., García-Morales, S., Trejo-Téllez, L. I., Hidalgo-Contreras, J. V., & Gómez-Merino, F. C. (2017) Aluminum enhances growth and sugar concentration, alters macronutrient status and regulates the expression of NAC transcription factors in rice. **Frontiers in plant science**, 8, 73.

NAGAYAMA, Teruki et al. Effects of polygalacturonase overexpression on pectin distribution in the elongation zones of roots under aluminium stress. **AoB Plants**, v. 14, n. 2, p. plac003, 2022.

NAZARI, Fatemeh et al. Aluminum accumulation in Amaranthus species and mechanisms of Al tolerance. **Biologia**, p. 1-19, 2023.

Nogueirol, R. C., Monteiro, F. A., Gratão, P. L., Borgo, L., & Azevedo, R. A. (2015) Tropical soils with high aluminum concentrations cause oxidative stress in two tomato genotypes. **Environmental Monitoring and Assessment**, 187(3), 1-16

Oliveira Vergara, R., Martins, A. B. N., Pedo, T., Radke, A. K., Gadotti, G. I., Villela, F. A., ... & Meneguzzo, M. R. R. (2019) Plant growth and physiological quality of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) seeds grown in Southern Rio Grande do Sul, **Brazil. Australian Journal of Crop Science**, 13(5), 678-682

Orsini, F., D'Urzo, M. P., Inan, G., Serra, S., Oh, D. H., Mickelbart, M. V., ... & Maggio, A. (2010) A comparative study of salt tolerance parameters in 11 wild relatives of *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, 61(13), 3787-3798

Parvez, S., Abbas, G., Shahid, M., Amjad, M., Hussain, M., Asad, S. A., ... & Naeem, M. A. (2020) Effect of salinity on physiological, biochemical and photostabilizing attributes of two genotypes of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) exposed to arsenic stress. **Ecotoxicology and environmental safety**, 187, 109814

Phukunkamkaew, S., Tisarum, R., Pipatsitee, P., Samphumphuang, T., Maksup, S., & Cha-Um, S. (2021) Morpho-physiological responses of indica rice (*Oryza sativa* sub. indica) to aluminum toxicity at seedling stage. **Environmental Science and Pollution Research**, 28(23), 29321-29331

- R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Riaz, M., Yan, L., Wu, X., Hussain, S., Aziz, O., Wang, Y., ... & Jiang, C. (2018) Boron alleviates the aluminum toxicity in trifoliolate orange by regulating antioxidant defense system and reducing root cell injury. **Journal of environmental management**, 208, 149-158
- Rosales, G., & Mercado, W. (2020) Effect of changes in food price on the quinoa consumption and rural food security in Peru. **Scientia Agropecuaria**, 11(1), 83-93
- Rouphael, Y., Rea, E., Cardarelli, M., Bitterlich, M., Schwarz, D., & Colla, G. (2016) Can adverse effects of acidity and aluminum toxicity be alleviated by appropriate rootstock selection in *cucumber*?. **Frontiers in plant science**, 7, 1283
- Scoccianti, V., Bucchini, A. E., Iacobucci, M., Ruiz, K. B., & Biondi, S. (2016) Oxidative stress and antioxidant responses to increasing concentrations of trivalent chromium in the Andean crop species *Chenopodium quinoa* Willd. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 133, 25-35
- Serna, F., Montenegro, J. D., Cruz, W., & Koc, G. (2020) Identificación de genes relacionados con la tolerancia a la sequía en 41 variedades de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd). **Scientia Agropecuaria**, 11(1), 31-38
- Shaff, J. E., Schultz, B. A., Craft, E. J., Clark, R. T., & Kochian, L. V. (2010) GEOCHEM-EZ: a chemical speciation program with greater power and flexibility. **Plant and soil**, 330(1), 207-214
- Siemens, J., & Zwiazek, J. J. (2008) Root hydraulic properties and growth of balsam poplar (*Populus balsamifera*) mycorrhizal with *Hebeloma crustuliniforme* and *Wilcoxina mikolae* var. *mikolae*. **Mycorrhiza**, 18(8), 393-401
- Spehar, C. R. (2006) Adaptation of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) to increase the agricultural and alimentary diversity in Brazil. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, 23(1), 41-62
- Szurman-Zubrzycka, M., Chwiłkowska, K., Niemira, M., Kwaśniewski, M., Nawrot, M., Gajecka, M., ... & Szarejko, I. (2021) Aluminum or Low pH—Which Is the Bigger Enemy

of Barley? Transcriptome Analysis of Barley Root Meristem Under Al and Low pH Stress. *Frontiers in genetics*, 12, 675260

Tammam, A. A., Khalil, S. M., Hafez, E. E., & Elnagar, A. M. (2018) Impacts of Aluminum on Growth and Biochemical Process of Wheat Plants Under Boron Treatments. **Current Agriculture Research Journal**, 6(3), 300.

UNITED NATIONS (UN). The Sustainable Development Goals Report 2020. New York: **United Nations Publications**, 2020

Wang, L., Fan, X. W., Pan, J. L., Huang, Z. B., & Li, Y. Z. (2015) Physiological characterization of maize tolerance to low dose of aluminum, highlighted by promoted leaf growth. **Planta**, 242(6), 1391-1403

YOUNG, Andrew J.; LOWE, Gordon L. Carotenoids—antioxidant properties. **Antioxidants**, v. 7, n. 2, p. 28, 2018.

Yu, Y., Zhou, W., Liang, X., Zhou, K., & Lin, X. (2019) Increased bound putrescine accumulation contributes to the maintenance of antioxidant enzymes and higher aluminum tolerance in wheat. *Environmental pollution*, 252, 941-949

ZHENG, Shao Jian; MA, Jian Feng; MATSUMOTO, Hideaki. Continuous secretion of organic acids is related to aluminium resistance during relatively long-term exposure to aluminium stress. **Physiologia Plantarum**, v. 103, n. 2, p. 209-214, bri1998.