

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**Papel dos transportadores de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) nos
mecanismos de tolerância ao alumínio em *Arabidopsis thaliana***

Ana Luiza Viana da Silva
Magister Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

ANA LUIZA VIANA DA SILVA

Papel dos transportadores de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) nos mecanismos de tolerância ao alumínio em *Arabidopsis thaliana*

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

Orientador: Adriano Nunes Nesi

Coorientadores: Wagner Luiz Araujo
Paula da F. Pereira

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S586p
2023
Silva, Ana Luiza Viana, 1997-
Papel dos transportadores de nicotinamida adenina
dinucleotídeo (NAD) nos mecanismos de tolerância ao alumínio
em *Arabidopsis thaliana* / Ana Luiza Viana Silva. – Viçosa,
MG, 2023.

1 dissertação eletrônica (60 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Adriano Nunes Nesi.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Vegetal, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2026.260>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Nicotinamida adenina dinucleotídeo. 2. Coenzimas.
3. Translocador 1 do nucleotídeo adenina. 4. Estresse
fisiológico. 5. Mitocôndrias - Metabolismo. 6. Respiração
celular. 7. *Arabidopsis thaliana*. 8. Alumínio. I. Nesi, Adriano
Nunes, 1975-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Biologia Vegetal. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia
Vegetal. III. Título.

CDD 22. ed. 572.7

ANA LUIZA VIANA DA SILVA

Papel dos transportadores de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) nos mecanismos de tolerância ao alumínio em *Arabidopsis thaliana*

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

APROVADA: 1 de agosto de 2023.

Assentimento:

Ana Luiza Viana da Silva
Autora

Adriano Nunes Nesi
Orientador

Essa dissertação foi assinada digitalmente pela autora em 21/05/2026 às 16:28:05 e pelo orientador em 21/05/2026 às 16:33:02. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **G1CE.6XAX.01EQ** e clique no botão 'Validar documento'.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela iluminação e bênçãos na minha vida.

Aos meus pais, Ademar da Silva e Maria Aparecida Viana Silva pelo suporte e incentivo que recebi durante toda a minha vida, ensinando-me sempre a me reerguer diante de momentos difíceis e a seguir sendo uma pessoa de valores éticos.

À minha tia-avó Zilda Maria Soares, que sempre terá um lugar de precioso valor em mim, por me ensinar a força que tem uma mulher. E aos meus irmãos, Marco Aurélio e Letícia pelo apoio, compreensão e amor de sempre.

Ao meu companheiro e, melhor amigo, Jean Oder pelo apoio incondicional, amor, paciência, persistência e incentivo para este trabalho e na vida.

Ao meu orientador, Professor Adriano Nunes Nesi pela excelente orientação, aprendizado, crescimento acadêmico, paciência, incentivo e confiança em mim depositada.

Agradeço ao Bruno Gomes, que chegou por último nessa jornada, mas que acrescentou muito ao trabalho com sua ajuda laboratorial e momentos agradáveis.

À Carolina Souza por me apoiar sem ressalvas, acreditar que tudo daria certo, pela ajuda e por inacreditavelmente sempre se mostrar positiva.

Aos amigos Sandy e Vitor. Sem vocês esses dois anos teriam sido sem graça, sem brilho. Obrigada por continuarem ao meu lado em todos os momentos, vocês já viram meu esgotamento máximo e mesmo assim estivemos juntos.

À família Maffili Sant'Anna: Quim, Fá, Raissa e Rayanne. Viçosa ou qualquer lugar no mundo onde vocês estiverem sempre será um lar pra mim. Obrigada de forma especial a Rayanne por sempre me ouvir e me acalmar a mais de 15 anos.

Aos amigos que mais sinto falta todos os dias, por ficarmos longe fisicamente, mas sempre juntos em pensamentos e sentimentos: Carolina Marques, Micheliny Oliveira, Marcelo Vaz, Grazielle Rezende, Karina Pereira, Ana Maria Medeiros e Thaís.

Agradeço a Maria Carolina e Julianna por toda parceria, ajuda e cuidado que sempre demonstraram até aqui comigo.

Agradeço a Dora Martins e Jéssica Soares por serem tão solícitas comigo, sempre com muita paciência e bom humor me auxiliando.

Ao Jonas Vargas, por ter disponibilizado seu tempo para me auxiliar mesmo à distância.

À Bianca Nogueira e Júlia Paiva, por sempre compartilharem comigo suas

experiências laboratoriais e por serem sempre gentis.

À toda equipe do “Time dos transportadores”, Paula, Rita, Bárbara, Julianna, Bruno e Samuel, o suporte de vocês foi essencial.

Aos professores Wagner Araújo e José Francisco de Carvalho Gonçalves pela atenção e apoio nos momentos difíceis.

A todos da Unidade de Crescimento em Plantas (UCP) que de alguma forma ajudaram na construção desse trabalho, principalmente ao excelente trabalho técnico do Mateus Nunes. De forma especial, gostaria de agradecer a Yasmin, Débora, João Pedro, Priscilla, Welder e Dani pela amizade e inúmeros momentos acolhedores.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

“Let everything happen to you
Beauty and terror
Just keep going
No feeling is final”.

(Rainer Maria Rilke)

RESUMO

SILVA, Ana Luiza Viana da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2023. **Papel dos transportadores de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) nos mecanismos de tolerância ao alumínio em *Arabidopsis thaliana*.** Orientador: Adriano Nunes Nesi. Coorientadores: Wagner Luiz Araujo e Paula da Fonseca Pereira.

Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) é uma coenzima que desempenha um papel central no metabolismo redox em todos os domínios da vida. Esse nucleotídeo de pirimidina é muito importante em diversas reações oxirredutoras necessárias para um bom funcionamento do metabolismo celular, como fotossíntese, -oxidação de lipídios, via oxidativa das pentoses e ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), possuindo papel de sinalizador a nível celular. O alumínio (Al) está entre os principais limitantes do desenvolvimento e produtividade de culturas em solos ácidos ($\text{pH} < 5$). A acidificação do solo culmina na solubilização de cátions tóxicos de Al no mesmo, sendo a principal forma o Al^{3+} . Quando submetidas à longos períodos de exposição ao Al, as plantas sofrem diversas alterações fenotípicas. Com efeito, a toxicidade ao Al resulta no estresse oxidativo, acarretando danos aos componentes celulares. A exposição ao Al causa redução na respiração mitocondrial, provavelmente devido a danos oxidativos resultantes da produção acentuada de espécies reativas de oxigênio (ROS). Em *Arabidopsis*, já foram identificados diversos transportadores de NAD^+ , incluindo os localizados na membrana interna (NDT1 e NDT2) e o transportador peroxissomal (PXN). O papel dessas proteínas é importar essa nicotinamida para o interior da respectiva organela em troca de diversos nucleotídeos, fosfatados ou não. O NAD desempenha papel fundamental de regulação no estado redox celular e em reações oxidativas do metabolismo de ROS. Por tudo isso, hipotetiza-se que os transportadores de NAD mitocondriais e peroxissomais possuem papel importante nas plantas em resposta ao Al em níveis tóxicos. Assim, níveis ideais de NAD^+ em cada organela seriam necessários para respostas adequadas da planta a esse metal. A fim de elucidar mecanismos de tolerância ao Al em distintos estádios do desenvolvimento de *Arabidopsis thaliana*, o genótipo selvagem (WT) e os mutantes deficientes na expressão dos transportadores de NAD (*ndt1*, *ndt2* e *pxn1*) foram submetidos aos tratamentos pH 5.7, pH 4 e pH 4 + Al. Parâmetros de germinação, morfométricos e histoquímicos foram analisados em plântulas e parâmetros metabólicos e fotossintéticos em plantas adultas. Os resultados demonstraram que os mutantes apresentaram menor velocidade de germinação que o WT, sendo que *pxn1* foi o mutante mais afetado para este parâmetro. Análises *in silico* sugerem que a proteína

PXN é altamente expressa em sementes durante a germinação. Apesar das diferenças na velocidade da germinação, a porcentagem final de germinação é igual para todos os genótipos. Os mutantes *ndt1* e *ndt2* apresentaram maior comprimento de raiz que o WT sob condições ótimas. Nas demais análises, os genótipos não apresentaram diferenças importantes no conteúdo de metabólitos ou parâmetros fotossintéticos apresentados. Esses últimos resultados coincidem com os de análises prévias com os mesmos genótipos. Em síntese, a baixa expressão dos transportadores mitocondriais e peroxissomal não promoveu alterações significativas nos parâmetros de desenvolvimento das plantas sob tratamentos de pH ácido e Al em concentrações tóxicas.

Palavras-chave: Transportadores; Coenzimas; Estresse abiótico; Metabolismo mitocondrial; Respiração

ABSTRACT

SILVA, Ana Luiza Viana da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2023. **The role of nicotinamida adenine dinucleotide (NAD) carriers in aluminum tolerance mechanisms in *Arabidopsis thaliana*.** Adviser: Adriano Nunes Nesi. Co-advisers: Wagner Luiz Araujo and Paula da Fonseca Pereira.

Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) is a coenzyme that plays a central role in redox metabolism across all domains of life. This pyrimidine nucleotide is crucial in various oxidation–reduction reactions required for proper cellular metabolic function, such as photosynthesis, lipid -oxidation, the oxidative pentose phosphate pathway, and the tricarboxylic acid (TCA) cycle, and it also acts as a cellular signaling molecule. Aluminum (Al) is among the major limiting factors for crop development and productivity in acidic soils (pH < 5). Soil acidification leads to the solubilization of toxic Al cations, predominantly in the form of Al³⁺. When exposed to prolonged periods of Al, plants undergo several phenotypic changes. Indeed, Al toxicity results in oxidative stress, causing damage to cellular components. Exposure to Al reduces mitochondrial respiration, likely due to oxidative damage resulting from the enhanced production of reactive oxygen species (ROS). In *Arabidopsis*, several NAD transporters have already been identified, including those located in the inner mitochondrial membrane (NDT1 and NDT2) and the peroxisomal transporter (PXN). The role of these proteins is to import nicotinamide adenine dinucleotide into their respective organelles in exchange for various nucleotides, phosphorylated or not. NAD plays a fundamental role in regulating cellular redox state and oxidative reactions within ROS metabolism. Altogether, it is hypothesized that mitochondrial and peroxisomal NAD transporters play an important role in plant responses to Al at toxic levels. Thus, optimal levels of NAD within each organelle would be required for appropriate plant responses to this metal. To elucidate mechanisms of Al tolerance at different developmental stages of *Arabidopsis thaliana*, the wild type (WT) and mutants deficient in the expression of NAD transporters (*ndt1*, *ndt2*, and *pxn1*) were subjected to treatments of pH 5.7, pH 4, and pH 4 + Al. Germination, morphometric, and histochemical parameters were analyzed in seedlings, and metabolic and photosynthetic parameters were analyzed in adult plants. The results showed that the mutants exhibited slower germination rates than the WT, with *pxn1* being the most affected mutant for this parameter. *In silico* analyses suggest that the PXN protein is highly expressed in seeds during germination. Despite differences in germination rate, the final germination percentage was the same for all genotypes. The *ndt1* and *ndt2* mutants

displayed greater root length than the WT under optimal conditions. In the remaining analyses, the genotypes showed no major differences in metabolite content or the photosynthetic parameters assessed. These latter results are consistent with previous analyses carried out with the same genotypes. In summary, reduced expression of mitochondrial and peroxisomal transporters did not lead to significant alterations in plant developmental parameters under acidic pH treatments and toxic Al concentrations.

Keywords: Transporters ; Coenzymes; Abiotic stress ; Mitochondrial metabolism ; Respiration

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Importância da nicotinamida adenina dinucleotídeo ao nível celular	11
1.2. Vias de síntese e compartimentalização celular	12
1.3. Importância do metabolismo e transporte de NAD em condições ótimas e adversas.....	13
1.4. Os efeitos dos solos ácidos na toxicidade do alumínio	16
1.5. Alumínio e mecanismo de resposta das plantas	16
1.6. Envolvimento do metabolismo e transporte do NAD em respostas ao Al	19
1.7. Hipóteses e objetivos do trabalho	20
2. MATERIAIS E MÉTODOS	21
2.1. Material vegetal.....	21
2.2. Condições experimentais	23
2.3. Avaliação da germinação	23
2.4. Avaliação do crescimento radicular	24
2.5. Ensaio histoquímico de ROS.....	24
2.6. Avaliação das taxas respiratórias em plântulas inteiras	24
2.7. Avaliação de respostas ao meio pH ácido e ao alumínio em plantas adultas.....	25
2.8. Avaliação de fluorescência da clorofila- <i>a</i>	25
2.9. Avaliação biométrica após estresse	26
2.10. Análises bioquímicas.....	26
2.11. Análises <i>in silico</i>	27
2.12. Análises estatísticas.....	28
4. RESULTADOS.....	28
4.1. Efeitos da baixa expressão de transportadores de NAD em respostas a acidez do meio de cultivo e presença de alumínio durante a germinação.....	28
4.2. Influência da deficiência na expressão de transportadores de NAD no crescimento radicular sob pH ácido e Al.....	29
4.3. Variação no pH do meio e presença de Al culmina em estresse oxidativo em plantas mutantes para transportadores de NAD	31
4.4. Respiração de plântulas com deficiência na expressão de transportadores de NAD sob pH ácido e Al....	32
4.5. Influência da deficiência na expressão de transportadores de NAD na eficiência do fotossistema II em plantas sob pH ácido e Al.....	34
4.6. Alterações metabólicas em resposta às variações no pH e ao Al	34
5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS.....	49
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	60

1. INTRODUÇÃO

1.1. Importância da nicotinamida adenina dinucleotídeo ao nível celular

Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) é uma coenzima que desempenha um papel central no metabolismo redox em todos os domínios da vida. Os nucleotídeos de pirimidina são compostos por dois nucleosídeos conectados por um grupo difosfato (GAKIÈRE *et al.*, 2018). Esse nucleotídeo de pirimidina é essencial em diversas reações oxirredutivas necessárias para um bom funcionamento do metabolismo celular, possuindo também um papel sinalizador a nível celular (HUNT e GRAY, 2009). O NAD pode ser encontrado na forma oxidante, NAD⁺ e na forma redutora, NADH. Ainda existe também, em uma forma fosforilada e oxidada, NADP⁺ e reduzida, NADPH. NADP é a forma mais envolvida em processos biossintéticos (KRAMER *et al.*, 2004) enquanto o NAD está frequentemente associado a processos catabólicos (GEIGENBERGER, 2003).

Além das funções práticas na regulação do equilíbrio redox, estudos recentes indicam novas funções para o NAD e suas substâncias derivadas do controle de processos celulares associados. Isso inclui a regulação da transcrição e do metabolismo dos microtúbulos através de processos que envolvem a remoção de grupos acetila por meio do NAD e/ou a adição de grupos mono/poli(ADP-ribosilação) (NORTH *et al.*, 2003). Além da sinalização intracelular do cálcio (Ca²⁺) por meio de uma molécula derivada do NAD chamada ADP-ribose cíclica (NORTH *et al.*, 2003; SANCHEZ *et al.*, 2004; DE BLOCK *et al.*, 2005). Esses acontecimentos dentro das células são seguidos por uma redução na quantidade de NAD presente nas células, mesmo que isso não esteja relacionado às reações de equilíbrio redox (HASHIDA *et al.*, 2009). De maneira interessante, a ausência da enzima poli(ADP-ribose) polimerase (PARP) alivia a redução do NAD e o esgotamento de ATP, resultando em uma maior capacidade de tolerância a condições de seca, calor intenso e alta exposição à luz (DE BLOCK *et al.*, 2005).

As coenzimas NAD(P) participam de vias metabólicas essenciais nos tecidos vegetais, tais como: a) fotossíntese, na qual a coenzima fosfatada (NADP⁺) recebe elétrons oriundos da fase fotoquímica, reduzindo-se a NADPH que é utilizado na fase bioquímica ou em outras vias (LIM *et al.*, 2020); b) β-oxidação de lipídios, onde uma série de reações com ácidos graxos ocorrem em peroxissomos (principalmente em glioxissomos, durante a germinação de sementes), gerando Acetil-CoA, NADH, H⁺ e ATP (EASTMOND *et al.*, 2000). A β-oxidação de lipídeos é um processo importante

para as plantas, que diferente de muitos animais, utilizam os lipídios como fonte de carbono e não necessariamente energia (CHAPMAN *et al.*, 2012). Esse processo torna-se essencial em tecidos heterotróficos, conferindo condições para a germinação e posterior estabelecimento das plântulas (CHAPMAN *et al.*, 2012). Além disso, o NADH configura poder redutor e doa elétrons para a cadeia transportadora, contribuindo assim na síntese de ATP (CALDER, 2015); c) via oxidativa das pentoses, que é um caminho alternativo do metabolismo da glicose, onde ocorre a geração de NADPH como um dos principais produtos desse ciclo e que posteriormente, é utilizado em reações anabólicas, especialmente síntese de lipídios e para mecanismos de resposta a espécies reativas de oxigênio (ROS; SHARKEY, 2021); e d) ciclo dos ácidos tricarboxílicos (ciclo TCA), onde grande parte do NADH da via respiratória é formado, para utilização na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (YANG *et al.*, 2016).

1.2. Vias de síntese e compartimentalização celular

Para evitar a morte das células vegetais devido à diminuição do NAD, existe um mecanismo que mantém os níveis celulares. Ou seja, assim que os níveis diminuem, o NAD é imediatamente sintetizado novamente. Descobertas previamente descritas na literatura em relação a identificação dos genes envolvidos na biossíntese do NAD em *Arabidopsis* trazem informações sobre a importância desse processo em diversas etapas de desenvolvimento, tais como germinação de sementes e o crescimento dos tubos polínicos (HASHIDA *et al.*, 2007; HUNT *et al.*, 2007). Ao contrário de vários genes que codificam enzimas catabólicas do NAD, os genes responsáveis por cada etapa da biossíntese do NAD são encontrados em apenas uma ou poucas cópias no genoma de *Arabidopsis* (HUNT *et al.*, 2004; NOCTOR *et al.*, 2006).

Em síntese, o aspartato desempenha o papel de precursor na síntese *de novo* do NAD em *Arabidopsis* (KATOH *et al.*, 2006). Após a formação do quinolinato a partir do aspartato e diidroxiacetona fosfato por meio da ação da aspartato oxidase e quinolinato sintase, o quinolinato é convertido em nicotinato mononucleotídeo (NaMN) pela quinolinato fosforibosiltransferase (HASHIDA *et al.*, 2009). Em seguida, o NaMN passa por uma adenilação para se tornar dinucleotídeo nicotinato adenina (NaAD), e posteriormente sofre amidação para se transformar em NAD, sendo esta a etapa final da biossíntese do NAD (HASHIDA *et al.*, 2009).

Ademais, o NAD atua como substrato para a geração cíclica de ADP-ribose, poli(ADP-ribosil)ação, desacetilação de proteínas e assim por diante, durante as quais o NAD é quebrado em nicotinamida (HASHIDA *et al.*, 2009). Além da via de síntese *de novo*, *Arabidopsis* utiliza uma via de reciclagem na qual o NaMN é formado a partir da nicotinamida através de duas etapas enzimáticas (KATOH *et al.*, 2006; WANG e PICHERSKY, 2007). Já que a última etapa da produção de NAD⁺ ocorre no citosol, admite-se que NAD⁺ deve ser importado para as organelas celulares para permitir um metabolismo celular adequado.

Além disso, NAD⁺ quinases podem sintetizar NADP⁺ de NAD⁺ e de ATP no citosol (NADK1; BERRIN *et al.*, 2005; WALLER *et al.*, 2010) e nos cloroplastos (NADK2; CHAI *et al.*, 2005, 2006). Foi ainda encontrado em *A. thaliana* uma NADH quinase peroxissomal, que usa NADH em vez de NAD⁺ como substrato para produzir NADH (NADK3; TURNER *et al.*, 2004; WALLER *et al.*, 2010).

Dado que certas reações que consomem NAD(P) desempenham um papel significativo em situações de estresse e/ou são induzidas pelo estresse, a concentração de NAD pode exercer influência nas respostas das plantas diante de desafios ambientais (NOCTOR, 2006). HUNT *et al.*, (2004) sugere que a proporção de NADH/NAD⁺ poderia regular a diferenciação celular, desenvolvimento e transformação em resposta ao estado redox em plantas. Causando mudanças na expressão de conjuntos específicos de genes, influenciando caracteres como: regulação de hormônios, reprodução e densidade das células-guarda (HASHIDA *et al.*, 2007, 2010; DE SOUZA CHAVES *et al.*, 2019; FEITOSA-ARAÚJO *et al.*, 2020; WEI *et al.*, 2020). Com essa conexão entre razão NADH/NAD⁺ e os processos de desenvolvimento da planta, sugere-se um envolvimento próximo dos níveis de nicotinamidas (NaM) com a organogênese e envelhecimento de plantas. Dessa forma, a razão NADH/NAD⁺ é baixa em tecidos mais ativos e mais alta em tecidos de armazenamento (STEINBECK *et al.*, 2020).

1.3. Importância do metabolismo e transporte de NAD em condições ótimas e adversas

A síntese de NAD⁺ é de grande importância para todas as células, pois participa de diversos processos metabólicos e age também como substrato para enzimas produtoras de NaM (CANTÓ *et al.* 2015). Agentes abióticos, como seca, salinidade e calor, são as principais causas de perda de rendimento das culturas. Essas perdas

resultam de uma combinação de diferentes estresses durante o crescimento, bem como de adversidades severas causadas pelas condições do tempo (MITTLER, 2006). Durante o desenvolvimento da planta existe um controle fino dos níveis de NAD na célula (WANG e PICHERSKY 2007). Sob condições estressantes, as plantas possuem uma maior demanda energética para execução de seus mecanismos de defesa e/ou tolerância. Dessa forma, muitos estudos têm sido realizados para identificação de genes envolvidos em mecanismos de defesa (VANDERAUWERA *et al.*, 2007). A regulação do equilíbrio energético nas células é uma estratégia promissora para aprimorar o desempenho, o rendimento e a capacidade de adaptação das plantas em face de condições ambientais adversas (VANDERAUWERA *et al.*, 2007).

Devido às suas diversas funções essenciais, os níveis celulares de NAD devem se manter adequados. Síntese *de novo* e de salvamento são as vias reconhecidas em plantas com o papel na biossíntese de NAD (DING *et al.*, 2021) Nas células eucarióticas, ambas as vias ocorrem no citosol, o que requer uma distribuição constante do NAD entre os compartimentos celulares. Como resultado, proteínas são necessárias para transportar o NAD através das membranas intracelulares (ROERMUND *et al.*, 2016). Em plantas, seres humanos e fungos, membros da família de transportadores mitocondriais são responsáveis pela importação do NAD nas mitocôndrias, plastídios e peroxissomos (TODISCO *et al.*, 2006; PALMIERI *et al.*, 2009; AGRIMI *et al.*, 2012a, 2012b; BERNHARDT *et al.*, 2011).

Em plantas, foram reconhecidos os transportadores de NAD presentes na membrana interna de mitocôndrias, NDT1 e NDT2 (DE SOUZA CHAVES *et al.*, 2019; FEITOSA-ARAÚJO *et al.*, 2020) e, um transportador peroxissomal, o PXN (BERNHARDT *et al.*, 2011). NDT1 e NDT2 catalisam o transporte de NAD⁺ do citosol por NaMN, nicotinamida mononucleotídeo (NMN) ou NaAD além de outros nucleotídeos como a adenina dinucleotídeo fosfato (ADP) e/ou adenina mononucleotídeo fosfato (AMP) (PALMIERI *et al.*, 2009). Entretanto, esses transportadores não trocam NAD por nicotinamida ou nicotinato (PALMIERI *et al.*, 2009). O transportador PXN é responsável por importar NAD⁺ citosólico ao glioxissomo para β -oxidação dependente de NAD⁺ (DE SOUZA CHAVES *et al.*, 2019). Esse transporte ocorre de modo antiporte, o que significa que o NAD⁺ é levado em uma troca estrita com um contra-substrato, provavelmente o AMP (BERNHARDT *et al.*, 2011). A perda de PXN em *Arabidopsis* causa defeitos na β -oxidação durante o

período do estabelecimento de plântulas. Observa-se que a quebra de ácido graxo liberado dos lipídios de armazenamento em sementes é atrasada, o que leva à retenção de corpos lipídicos nas plântulas mutantes *pxn* (BERNHARDT *et al.*, 2011). FEITOSA-ARAÚJO *et al.*, 2020 relatou que mutantes *pxn-1* apresentaram fenótipo diferenciado em relação ao WT, apresentando menor número de células de pavimentação nas folhas e maior área estomática. Além disso, também apresentam diminuição da expressão de genes envolvidos na diferenciação de estômatos (MUTE, SCRM1/ICE1). Essa diminuição na expressão dos genes acima citados em *pxn-1*, pode gerar uma menor capacidade de fechamento de estômatos em alto CO₂ comparado aos mutantes *ndt-1* e *ndt-2* (FEITOSA-ARAÚJO *et al.*, 2020).

Considerando a importância do NAD para o metabolismo das plantas, admite-se que os genes relacionados ao transporte sejam expressos em toda a planta e que possuam funções fisiológicas específicas (BERNHARDT *et al.*, 2011). AtNDT1 é expresso em sementes, plântulas, folhas e flores maduras, mas é fortemente expresso em grãos de pólen (DE CHAVES *et al.*, 2019). Uma vez que a mobilização dos lipídios de armazenamento é essencial para o estabelecimento das plântulas, é crucial ter níveis adequados de NAD⁺ para que ocorra a conversão dos ácidos graxos em carboidratos (BERNHARDT *et al.*, 2011) e, a repressão de NDT1 configura uma mobilização prejudicada do óleo armazenado durante o estabelecimento das plântulas (DE CHAVES *et al.*, 2019). Em mutantes *ndt1* pode ser observada uma reduzida expressão dos demais transportadores de NAD⁺ (NDT2 e PXN) em grãos de pólen, flores e sementes, sugerindo que a expressão reduzida de NDT1 pode impactar os níveis de expressão de NDT2 e PXN (DE CHAVES *et al.*, 2019).

NDT2 também é amplamente expresso pela planta (bar.utoronto.com; TOUFIGHI *et al.*, 2005), entretanto apresenta importância singular na germinação de sementes, estabilização de plântulas e fase reprodutiva (FEITOSA-ARAÚJO *et al.*, 2020). Plantas mutantes para esta proteína produzem sementes com baixa germinação, plântulas com níveis elevados de ácidos graxos e maior tempo para estabelecimento das plântulas (FEITOSA-ARAÚJO *et al.*, 2020). Adicionalmente, a expressão reduzida de NDT2 aumenta a expressão de genes que codificam enzimas das vias *de novo* e de salvamento da biossíntese de NAD em flores e durante o estabelecimento de plântulas (FEITOSA-ARAÚJO *et al.*, 2020). O controle da transcrição nos genes envolvidos na biossíntese de NAD ainda é pouco conhecido, mas existir uma expressão diferencial destes genes na ausência de NDT2 demonstra

que a importação mitocondrial adequada do NAD é verificada e se necessário, a biossíntese do NAD é positivamente regulada (FEITOSA-ARAÚJO *et al.*, 2020).

1.4. Os efeitos dos solos ácidos na toxicidade do alumínio

O alumínio (Al) é um dos principais fatores que afeta o crescimento de plantas e por consequência, a capacidade produtiva das plantas em solos ácidos ($\text{pH} < 5,0$) (KUMAR *et al.*, 2009). A liberação de cátions de Al provocado pela acidez dos solos impõem sérias restrições ao crescimento e desenvolvimento das raízes, absorção de água e absorção de nutrientes pelas mesmas (SIQUEIRA *et al.*, 2021). Estimativas apontam que cerca de 50% das terras cultiváveis do mundo são ácidas, com risco potencial de toxicidade por Al (KOCHIAN *et al.*, 2015). Visto que o Al o terceiro metal mais abundante e ubiquamente distribuído na crosta terrestre, pode se tornar um fator em última instância e comprometer a segurança alimentar no mundo (EEKHOUT *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2019).

A acidez do solo limita o desenvolvimento ideal das plantas, por meio da toxicidade de prótons (H^+) e manganês (Mn^{2+}) (IUCHI *et al.*, 2007). O Al solubiliza-se no solo em diferentes formas iônicas ($\text{Al}(\text{OH})^{2+}$ e Al^{3+}) que são consideradas tóxicas para as plantas. As raízes são os órgãos mais sensíveis ao estresse por Al, entretanto, partes aéreas também são conhecidas por serem amplamente afetadas por este metal (LI e XING, 2011; MATTIELLO *et al.*, 2014). Além disso, o Al^{3+} presente nas células pode se ligar a várias biomoléculas, incluindo DNA, RNA, proteínas, lipídios e carboidratos, causando um impacto significativo na expressão gênica, na síntese de proteínas e na integridade da membrana (KOCHIAN *et al.*, 2015). A maioria das espécies vegetais submetidas à exposição prolongada ao Al sofrem diversas alterações fisiológicas, morfológicas e moleculares (SINGH *et al.*, 2017). Nesse contexto, é imprescindível contar com mecanismos que estimulem o reconhecimento dos efeitos tóxicos do alumínio, a fim de desencadear respostas nos níveis da transcrição, pós-transcrição e metabolismo das raízes das plantas (SIQUEIRA *et al.*, 2022a e b).

1.5. Alumínio e mecanismo de resposta das plantas

Um dos principais indicadores da toxicidade por Al é o comprometimento do crescimento radicular (ANDERSSON, 1988; YANG *et al.*, 2001). Tal resposta é caracterizada pela redução na atividade mitótica nos ápices radiculares, o que

compromete a absorção de água e minerais, influenciando o crescimento e o desenvolvimento da planta (MA *et al.*, 2001; MOSSOR-PIETRASZEWSKA, 2001; NUNES-NESI *et al.*, 2014). De fato, a zona de transição distal da raiz (ZDT) é considerada a região radicular mais suscetível ao Al (KOPITTKKE *et al.*, 2015). Com efeito, o Al também é conhecido por apresentar um perfil genotóxico, e a exposição prolongada a esse elemento acarreta a alteração do DNA em plantas, restringindo a sua replicação (MATSUMOTO, 1991; BHALERAO *et al.*, 2013). Notavelmente, essa restrição ocorre como resultado da inibição da quinase dependente de ciclina (CDK)/ciclina (CYC) em fases específicas do ciclo celular, como os pontos de verificação G1-S, intra-S e G2-M (HU *et al.*, 2016). Ademais, o Al possui um efeito inibitório sobre os microtúbulos e microfilamentos de actina, alterando sua estabilidade e organização bem como sua polimerização (SINGH *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2019).

A toxicidade do Al pode ainda resultar em interações complexas do Al com alvos apoplasmáticos (parede celular), membrana plasmática e simplasmático (citossol) (KOCHIAN *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2008). Essas interações acarretam mudanças nas propriedades físicas, composição, dinâmica de permeabilidade e estrutura da membrana plasmática, além de impactar a estrutura das paredes celulares, absorção de Ca^{2+} e outros cátions, bem como a transdução de sinal e estresse oxidativo (RENGEL, 2004).

Durante a evolução das plantas, ocorreu o surgimento de diferentes formas de resistência para reduzir os danos causados pelo alumínio. Esses mecanismos podem ser classificados em dois tipos principais: tolerância e exclusão. Resumidamente, o mecanismo de tolerância envolve o sequestro e a desintoxicação interna do alumínio, enquanto o mecanismo de exclusão impede que o íon de alumínio alcance a ponta da raiz, por meio da liberação de ácidos orgânicos (AO) através de uma complexa e extensa família de proteínas transportadoras (DELHAIZE *et al.*, 2007; KOCHIAN *et al.*, 2015). Os mecanismos de resistência variam entre as espécies e envolvem transportadores específicos. Portanto, a desintoxicação diferencial de espécies fitotóxicas de Al usando AOs, como malato, citrato e oxalato, tem sido relatada em várias espécies de plantas, promovendo a quelação de cátions e impedindo o contato do Al com a membrana plasmática da raiz (KOCHIAN *et al.*, 2005). O principal AO utilizado para quelar Al na rizosfera do trigo (*Triticum aestivum*) e *A. thaliana* é o malato e envolve os canais iônicos *TaALMT1* e *AtALMT1* do transportador de malato ativado por Al, respectivamente (SASAKI *et al.*, 2004; KOBAYASHI *et al.*, 2007).

Esses AOs estão estreitamente ligados ao metabolismo mitocondrial e, portanto, a reprogramação do metabolismo mitocondrial pode ser crucial para manter o alongamento das raízes durante situações de estresse causado pelo Al (NUNES-NESI *et al.*, 2014).

Os mecanismos de resistência estão estreitamente ligados ao metabolismo das mitocôndrias (NUNES-NESI *et al.*, 2013). Além de ser a principal fonte de AOs, o ciclo TCA desempenha um papel fundamental na produção de ATP na mitocôndria por meio da fosforilação oxidativa em tecidos heterotróficos e da síntese de equivalentes redutores (ou seja, NADH, FADH₂ e NAD(P)H) (FERNIE *et al.*, 2004; NUNES-NESI *et al.*, 2013). O ciclo TCA pode operar de duas maneiras distintas: um modo cíclico responsável pela produção de ATP e equivalentes redutores, e um modo não cíclico, dependendo das demandas metabólicas e fisiológicas da célula (SWEETLOVE *et al.*, 2010), por exemplo, em condições de estresse. Os AOs são formas transitórias ou fixas de armazenamento de carbono e são importantes intermediários do ciclo TCA (IGAMBERDIEV e EPRINTSEV, 2016). Além disso, esses AOs também são formados pelo ciclo do glioxilato e tal rota é essencial durante a germinação de plantas, permitindo a conversão do acetil-coA (proveniente da β -oxidação de lipídios) em moléculas mais complexas, como succinato e oxaloacetato para serem utilizados pelo ciclo TCA (CAVALCANTI *et al.*, 2014; SHARMA *et al.*, 2016). Aliás, esses AOs tornam-se muito importantes em respostas ao Al, como citado anteriormente, por meio do mecanismo de tolerância por exclusão onde o Al³⁺ é quelado através de AOs exsudados pela raiz. Portanto, os AOs, incluindo os intermediários do ciclo TCA e ciclo do glioxilato, desempenham um papel crucial em diversos processos bioquímicos, como produção de energia, vias de biossíntese, manutenção do equilíbrio redox e iônico, tornando-se essenciais em processos adaptativos das plantas a diferentes ambientes (IGAMBERDIEV e EPRINTSEV, 2016).

Recentemente ZHANG e FERNIE (2023) compilaram informações sobre o papel de enzimas do ciclo TCA na interação das plantas com o Al. Sugere-se que a fosforilação oxidativa mitocondrial não apenas fornece a energia para o crescimento e desenvolvimento radicular, mas também fornece AOs (como citrato e malato) para troca iônica com Al³⁺ (ZHANG e FERNIE, 2023). Na presença de Al nas raízes, a proteína Al *sensitive* 3 (ALS3) é considerada responsável pela redistribuição de íons Al³⁺ nas raízes para a parte aérea, a fim de proteger o ápice radicular da toxidez. AOs (malato e citrato) produzidos durante o ciclo TCA são transportados para o citosol, o

transportador de malato ativado pelo alumínio (ALMT) é responsável pela liberação de malato para o apoplasto, da mesma forma, o citrato é liberado para o apoplasto por meio do transportador de excreção de compostos tóxicos e multidroga (MATE), também ativado pelo íon Al^{3+} . Os AOs são lançados para o solo por transporte antiporte com íons fosfato (PO_4^-) (NARANG *et al.*, 2000).

Estudos sugerem que a superexpressão de citrato sintase poderia aumentar a tolerância após exposição a Al^{3+} em raízes de tabaco e aumentar a absorção de fósforo com ambos os fenômenos atribuídos ao aumento da exsudação de citrato na rizosfera (DE LA FUENTE *et al.*, 1997). O aumento da secreção de AO tem sido relatado como uma abordagem potencial para aumentar a tolerância ao Al. Muitos fatores de transcrição e proteínas foram caracterizados como associados à tolerância ao Al, como o transportador de malato ativado e os genes envolvidos na secreção de malato e citrato ativada por Al (YANG *et al.*, 2019). Assim, trabalhos de manipulação dos níveis de AOs em plantas podem gerar resultados que auxiliem o desenvolvimento de estratégias de tolerância em solos ácidos.

1.6. Envolvimento do metabolismo e transporte do NAD em respostas ao Al

Em longa exposição a níveis tóxicos de Al^{3+} , acredita-se que em decorrência de danos oxidativos devido a produção acentuada de ROS a respiração mitocondrial é reprimida (LIU *et al.*, 2014). PLUCINSKA e KAROLEWSKI (1994) observaram um aumento do estado redox celular (alta razão $NADH / NAD^+$) e maior produção de ROS nas células na presença de tratamento Al 4,0 mM em cultivo hidropônico de mudas de pinheiro bravo. Embora o Al não possa catalisar as reações redox por si só, um aumento no estresse oxidativo sob a toxicidade do Al foi relatado em diversos grupos de plantas (SINGH *et al.*, 2017).

Tem sido sugerido que o Al, ao entrar na mitocôndria, interfere nas proteínas Fe-S dos complexos I e III, inibindo assim a atividade da cadeia de transporte de elétrons (MATTIELLO *et al.*, 2010). A inibição do transporte de elétrons na mitocôndria diminui o gradiente eletroquímico de prótons e conseqüentemente a produção de ATP. Adicionalmente, o acúmulo de elétrons resulta no aumento da geração de ROS (MATTIELLO *et al.*, 2010). Estudos têm evidenciado que em resposta a diversos estresses que culminam no estresse oxidativo, aminoácidos produzidos a partir da degradação de proteínas são potencialmente utilizados como substratos para síntese de ATP (ENGQVIST *et al.*, 2011). O aumento nos níveis de ROS induz a perda de

potencial de membrana mitocondrial por danos causados nas membranas dessa organela (PANDA *et al.*, 2008; LI e XING, 2011). Hildebrandt *et al.* (2015) traz uma relação de diversos aminoácidos que servem como fonte alternativa de produção de energia celular para plantas, uma vez que as mesmas possam estar sob algum estresse, culminando na degradação de proteínas e liberação de aminoácidos livres. Na mesma direção, Batista-Silva *et al.* (2019) demonstrou para *Arabidopsis thaliana* que na fase de recuperação aos estresses por seca e salinidade há degradação de proteínas abundantes, o que culminou na liberação de aminoácidos livres que aparentemente foram utilizados como substratos respiratórios alternativos, compensando a diminuição da fotossíntese.

Apesar de ROS serem geradas como moléculas de resposta após o estresse por Al^{3+} , também atuam como moléculas de sinalização iniciando respostas vívidas para combater a toxicidade do Al^{3+} (RANJAN *et al.*, 2021). As ROS ativam os transportadores de membrana para exsudar ácidos orgânicos e compostos fenólicos para quelar o Al^{3+} presente no solo, impedindo a entrada de Al^{3+} nas células de raiz (RANJAN *et al.*, 2021).

1.7. Hipóteses e objetivos do trabalho

A hipótese desse trabalho é de que sob condições de pH ácido e alumínio em níveis tóxicos, os mutantes com baixa expressão dos transportadores de NAD (NDT1, NDT2 e PXN) apresentam alterações significativas no crescimento e desenvolvimento em comparação ao genótipo selvagem (WT) das plantas. Ou seja, a mutação nos genes NDT1 e NDT2 e PXN tornam as plantas mais sensíveis ao Al. Os transportadores de NAD desempenham um papel crucial no metabolismo energético e na resposta ao estresse oxidativo. Desta forma, a ausência ou redução de sua expressão pode levar a um desequilíbrio metabólico e maior suscetibilidade ao estresse causado pelo pH ácido e a concentrações tóxicas de alumínio.

Apesar dos avanços obtidos nos estudos bioquímicos e moleculares na identificação e caracterização de transportadores de NAD mitocondriais e peroxissomais em plantas, o papel fisiológico dessas proteínas não está totalmente esclarecido. Neste sentido, é necessário aprofundar-se na função destes transportadores em plantas cultivadas sob condições ótimas e também adversas ao crescimento e desenvolvimento vegetal (como em solos ácidos e/ou com presença de Al em concentração tóxica). Logo, é de grande valia a verificação e compreensão do

papel fisiológico destas proteínas em plantas. Admite-se então a importância do papel do transporte e metabolismo de NAD dentro da célula nas respostas ao estresse por Al. Apesar de potencialmente atuar na supressão de danos oxidativos, na manutenção do meristema radicular, e na tolerância ao Al o conhecimento acerca da importância do transporte de NAD na modulação das respostas ao Al a nível de raiz é ainda bastante incipiente e fragmentado.

Por tudo isso, neste trabalho objetivou-se caracterizar as alterações fisiológicas e metabólicas ocasionadas pela baixa expressão dos transportadores mitocondriais e peroxissomal (NDT1, NDT2 e PXN) em plantas submetidas a um pH ácido (pH 4) e pH ácido acrescido de Al em concentração tóxica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Nos experimentos, foram utilizadas linhagens de *Arabidopsis thaliana* do tipo selvagem (Col-0) e linhas com inserção de T-DNA nos genes que codificam para transportadores mitocondriais de NAD (NDT1, At2g47490; NDT2, At1g25380) e peroxissomal (PXN, At2G39970) (Figura 1 e Tabela 1). Os mutantes *ndt1*, *ndt2* e *pxn1* foram previamente caracterizados e possuem reduzida expressão das proteínas transportadoras, mais especificamente, 87% (DE SOUZA CHAVES *et al.*, 2019), 55% de redução no nível de expressão (FEITOSA-ARAÚJO *et al.*, 2020) e expressão *knockout* (BERNHARDT *et al.*, 2012; Tabela 1), respectivamente.

Tabela 1. Descrição das linhagens utilizadas no trabalho.

Genótipo	Identificador do gene	Linhagem	Localização subcelular	Referências
WT (Col-0)	-	-	-	-
NDT1	At2g47490	GK-241G12	Membrana interna da mitocôndria	de Souza Chaves et al. (2019)
NDT2	At1g25380	GK-143G09	Membrana interna mitocondrial	Feitosa-Araújo et al. (2020)
PXN1	At2G39970	GABI_046D01	Membrana peroxissomal	Bernhardt et al. (2012)

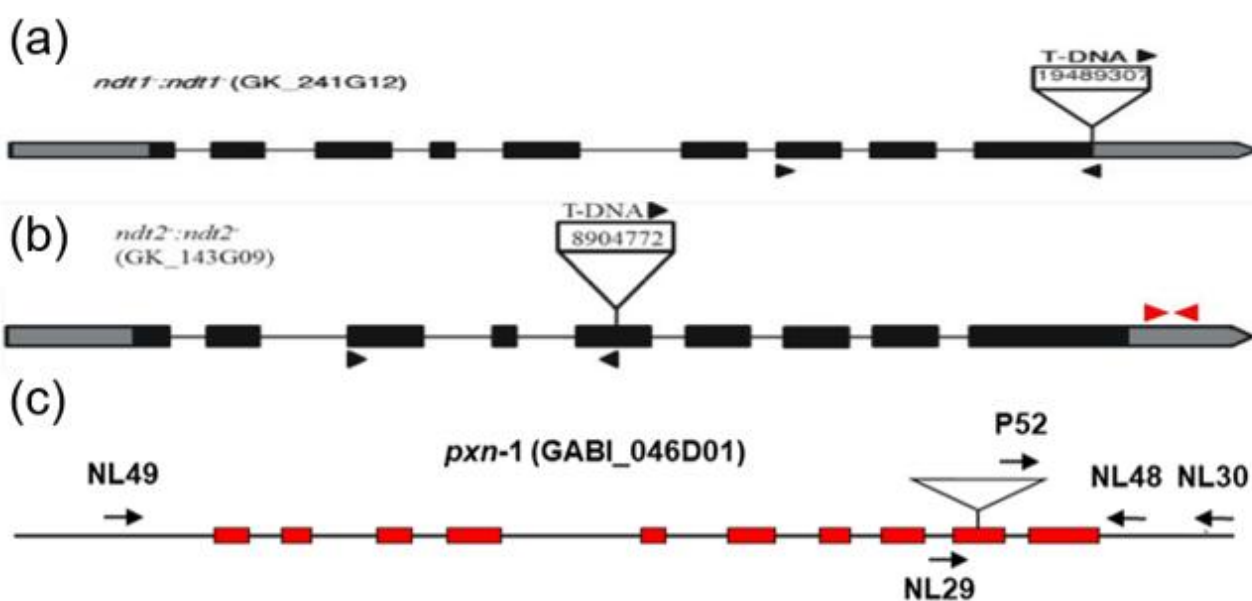


Figura 1. Esquematização das inserções T-DNA para os genótipos mutantes. **(a)** *ndt1* (modificado de DE SOUZA CHAVES et al.,2019); **(b)** *ndt2* (modificado de FEITOSA-ARAÚJO et al.,2020); **(c)** *pxn1* (modificado de BERNHARDT et al.,2012).

2.2. Condições experimentais

Sementes dos genótipos utilizados (Tabela 1) foram desinfestadas superficialmente em etanol 70% (v/v) por 1 minuto e 30 segundos e, em seguida, em hipoclorito de sódio 2,5% (v/v) por 15 minutos. Posteriormente, as sementes foram lavadas seis vezes com água ultrapura autoclavada. Após a desinfestação, as sementes foram estratificadas no escuro a 4°C por 48h e distribuídas em placas contendo meio de cultivo sem sacarose com a metade da concentração dos sais e vitamina MS (meia força) (MURASHIGE e SKOOG, 1962). As placas com as sementes foram mantidas em câmara de crescimento à 22 ± 2 °C, umidade relativa de 60%, irradiância de 150 μmol de fótons m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 8 h de luz e 16 h de escuro, em todos os experimentos. O meio de cultivo foi submetido a alteração do pH e adição de AlCl₃ para a obtenção de três tratamentos distintos: ½ MS pH 5.7 (controle), ½ MS pH 4 (pH ácido) e ½ MS pH 4 + 300μM de AlCl₃. Essa concentração de alumínio foi baseada em experimentos preliminares variando concentrações de 75 a 300 μM de AlCl₃ a fim de adequar as condições que proporcionam maiores efeitos nos mutantes em questão.

Experimentos independentes sob as mesmas condições foram realizados para coleta de material vegetal para respiração radicular e testes histoquímicos para identificação de ROS.

2.3. Avaliação da germinação

Os testes de germinação foram conduzidos em três condições diferentes: pH 5.7, pH 4 e pH 4 + 300μm de AlCl₃. Para cada condição foram utilizadas seis placas de petri (90x15mm). Cada placa foi dividida em quatro campos, nos quais 20 sementes esterilizadas de cada genótipo (WT, *ndt1*, *ndt2*, *pxn1*). As placas foram colocadas para germinar nas condições citadas no item 2.2. A contagem de sementes germinadas foi efetuada diariamente por 72h após colocadas na luz. A protrusão da radícula foi o critério de germinação utilizado. Os resultados foram avaliados em termos de porcentagem diária de sementes germinadas.

2.4. Avaliação do crescimento radicular

Para a avaliação do crescimento radicular, as sementes foram germinadas em placas redondas preparadas com meio de cultivo $\frac{1}{2}$ MS pH 5 corrigido com KOH 1M. Esse pH foi escolhido por ser intermediário em relação aos valores de pH utilizados no trabalho, de forma que o processo de germinação fosse isolado. Após o terceiro dia sob a luz, as sementes germinadas foram transferidas para placas de petri quadradas contendo meios com os três tratamentos indicados acima.

As taxas de crescimento das raízes foram analisadas conforme metodologia anteriormente descrita por ZHU *et al.* (2012), em um período de 10 dias após o estratificação e transferência das placas para luz. Ao final deste intervalo, as placas foram escaneadas (HP Scanjet G2410 Flatbed Scanner) e o comprimento das raízes foi mensurado com o auxílio do software ImageJ conforme descrito anteriormente (SCHNEIDER *et al.*, 2012).

2.5. Ensaios histoquímicos de ROS

A avaliação qualitativa das raízes para presença de ROS foi realizada através de teste histoquímico para peróxido (H_2O_2) e superóxido (O_2^-). O tempo de exposição para 3,3'Diaminobenzidina (DAB) foi de 3h e para Nitrobluetetrazolium (NBT) foi de 40 min (KONG *et al.*, 2011). Identificou-se H_2O_2 e O_2^- utilizando $1,0 \text{ mg.ml}^{-1}$ de DAB, e $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ NBT, respectivamente. As amostras foram lavadas 3x em água destilada, clarificadas com etanol 70% por 10 min e suas raízes foram observadas utilizando estereomicroscópio (Zeiss modelo Stemi 2000-C). A análise da fotos foi realizada com auxílio do software ImageJ conforme protocolo descrito por SCHNEIDER e colaboradores (2012).

2.6. Avaliação das taxas respiratórias em plântulas inteiras

As taxas de oxigênio (O_2) consumido foram avaliadas em um eletrodo de oxigênio do tipo Clark, conforme descrito por JIANG *et al.* (2019). Antes de se mensurar as taxas respiratórias, a massa fresca das plântulas foi obtida para posterior normalização dos dados. Posteriormente, o mesmo material foi incubado em tampão contendo 50 mM de HEPES (N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico), 10 mM de MES (ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico) (pH 6,6) e 0,2 mM de $CaCl_2$. Para evitar a interferência da luz, as plantas foram aclimatadas no escuro por 30

minutos. A taxa de consumo de O₂ foi calculada assumindo-se que a concentração de O₂ no tampão saturado de ar era de 260 µM a 23°C, segundo dados obtidos previamente em calibrações realizadas no equipamento.

2.7. Avaliação de respostas ao meio pH ácido e ao alumínio em plantas adultas

As sementes contidas em placas foram submetidas ao processo de estratificação por um período de 48 horas a 4 °C e posteriormente mantidas em câmara de crescimento à 22 ± 2 °C, umidade relativa de 60%, irradiância de 150 µmol de fótons m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 8 h de luz e 16 h de escuro, durante dez dias. Após este período, as plântulas foram transplantadas para potes plásticos de 0.1 L de capacidade em uma mistura de substrato comercial Carolina Soil Padrão (Tabela S1) e areia autoclavada, na proporção de 60% e 40% respectivamente. Os potes com as plantas foram mantidos nas mesmas condições por um período de quatro semanas, para que fossem realizadas as avaliações fisiológicas.

As plantas foram submetidas aos tratamentos: i) controle (pH 5.7); ii) pH 4; e iii) pH 4 + 300µm AlCl₃ por 120h seguidas. Durante todos os cinco dias foram colocados 10mL de solução nutritiva composta por 2,2g/L de MS meia força e 0,5g/L de MES hydrate dissolvidos em água destilada, em cada vaso e uma vez no dia. Além disso, para a obtenção do tratamento com pH ácido (pH 4), essa solução teve seu pH ajustado. Da mesma forma, para o tratamento pH ácido + Al a solução foi acrescida de cloreto de alumínio. A aplicação das soluções referentes aos tratamentos foi realizada em todos os potes uma vez ao dia no intervalo da primeira hora que antecede o início do fotoperíodo (de 8 horas às 9 horas da manhã), de 24 em 24 horas.

As plantas foram coletadas após passadas as 120 horas de tratamento, utilizando o intervalo de tempo da primeira hora de luz.

2.8. Avaliação de fluorescência da clorofila-a

A fim de quantificar o rendimento quântico máximo do fotossistema II (Fv/Fm), foi utilizado o fluorímetro portátil - modelo WALZ-MINI-PAM-II/R (WALLS, Effeltrich, Germany). As plantas foram organizadas e casualizadas em seis repetições (vasos) de cada genótipo em cada tratamento e as medições ocorreram durante todos os cinco dias de aplicação dos tratamentos citados no item 2.7. No final do fotoperíodo as plantas foram aclimatadas no escuro por uma hora. Após a aclimatação, um pulso luminoso (com o auxílio de uma pinça do fluorímetro) foi aplicado sobre uma folha

jovem totalmente expandida da planta analisada e os dados de Fv/Fm foram gerados e extraídos do aparelho para análises posteriores.

2.9. Avaliação biométrica após estresse

A fim de verificar possíveis alterações na arquitetura após aplicação dos tratamentos, as plantas foram fotografadas no dia anterior ao início da aplicação dos tratamentos (dia 0) e no último dia de análise (dia 5), antes de ser feita a coleta. Posteriormente as imagens foram utilizadas para quantificar a área foliar total por meio do software ImageJ (SCHNEIDER *et al.*, 2012).

2.10. Análises bioquímicas

Ao final da aplicação dos tratamentos, amostras das raízes e partes aéreas das plantas foram coletadas, rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente liofilizadas. Para extração metanólica, uma quantidade conhecida de biomassa liofilizada foi misturada com 700 μ L de metanol (100%) e aquecida a 80 °C por 20 minutos sob agitação de 750 rpm. O extrato metanólico foi então centrifugado a 13.500 g por 15 minutos a 4 °C, e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo (volume de 1,5 mL). O pellet foi utilizado para a extração de proteínas solúveis totais e amido, enquanto o sobrenadante foi utilizado para quantificar pigmentos, aminoácidos totais, açúcares, prolina e compostos fenólicos totais.

Assim, 25 μ L do sobrenadante, mais 175 μ L de metanol foram usados para quantificação de clorofilas, por determinação de densidades ópticas em OD653nm e OD666nm (Microplate reader, Versa max, Molecular Devices; PORRA *et al.*, 1989) e de densidade óptica de 470nm para a leitura de carotenóides. Ao volume residual foram, sequencialmente, adicionados 375 μ L de clorofórmio e 750 μ L de água. Este novo extrato foi centrifugado a 13.500 g por 10 minutos a 4°C, levando à formação de duas fases muito características: uma aquosa (polar, superior) e outra orgânica (apolar, inferior). A fase aquosa, onde se encontram os metabólitos de interesse, foi coletada e transferida para outro novo microtubo (volume de 1,5 mL) para quantificação dos aminoácidos.

Para a quantificação dos aminoácidos, um total de 50 μ L foi transferido para uma microplaca de 96 poços, sendo complementado com 50 μ L de tampão citrato de sódio (1 M, pH 5,2), ascorbato 0,02%, além de 100 μ L de niidrina. A microplaca foi

selada e aquecida a 95 °C por 20 minutos, para ser lida a 570 nm (leitor de microplacas, Versa max, Molecular Devices; CROSS *et al.*, 2006). O pellet foi lavado com 1.000 µL de etanol (70%), tratado com NaOH (0,1 M) e aquecido por uma hora a 95 °C para extração de proteínas. Em seguida, foi adicionado a uma microplaca 250µL de Bradford (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate) e lido a 595 nm (Microplate Reader, Versa max, Molecular Devices; Bradford, 1976). O restante do pellet foi neutralizado com ácido acético (1 M) para quantificação de amido, a 340nm (FERNIE *et al.*, 2001). A quantificação de prolina foi realizada utilizando 50µL do extrato transferidos para uma microplaca pirogênica de 96 poços, com 100µL de ninidrina 1%, etanol 20% e ácido acético 60%. Também foi realizada uma curva padrão de prolina 1mM e a placa foi levada ao termomixer por 20 minutos a 95 °C e a leitura foi feita a 520nm. Os compostos fenólicos totais foram quantificados por meio da utilização de 5µL de extrato, 30µL de água ultrapura, 25µL de folin e 125µL de NaCO₃. A placa foi levada ao termomixer por 40 minutos a 25 °C, sem agitação e a leitura foi realizada a 725nm.

A quantificação de açúcares e amido foram realizadas utilizando 5µL e 10µL respectivamente. Essas quantidades foram estabelecidas por meio de testes preliminares executados a partir de uma curva de linearidade levando em consideração os genótipos e os tratamentos em questão. Para os açúcares solúveis (glicose, frutose e sacarose), 160µL de um mix de reagentes (contendo 150 µL de tampão Hepes/KOH 0.1 M + 3 mM MgCl₂ pH 7.0, 4.65 µL de ATP 109 mM (60 mg mL⁻¹), 4.65 µL de NADP⁺ 48.4 mM (36 mg mL⁻¹), 0.77 µL de Glicose-6P desidrogenase (G6-PDH; 700 U mL⁻¹)) foram adicionados em microplaca de 96 poços junto aos 5µL de extrato. A leitura foi feita de forma cinética, com a aplicação de 1,5 U de hexocinase, 0.7 U de fosfoglicose isomerase (PGI) e 5 U de invertase, necessariamente nessa ordem após a estabilização das linhas de base de cada uma. As leituras foram realizadas a 340nm.

2.11. Análises *in silico*

A partir de análise *in silico* a expressão de genes de *A. thaliana* que codificam os transportadores de NAD, em diferentes órgãos da planta. Os dados de expressão gênica foram obtidos a partir da base de dados disponíveis na plataforma Bioarray Resource (BAR; www.bar.utoronto.ca; TOUFIGHI *et al.*, 2005). Os dados de

expressão nos diferentes órgãos e tecidos da planta são oriundos de SCHMID *et al.*, 2005 e NAKABAYASHI *et al.*, 2005.

2.12. Análises estatísticas

Os experimentos foram conduzidos em um esquema fatorial duplo no delineamento inteiramente casualizado (DIC). O fator A foi constituído por genótipos (WT, *ndt1*, *ndt2* e *pxn1*) e o fator B por tratamentos (pH 5.7, pH 4.0 e pH 4.0 + Al³⁺), com 5 repetições. A normalidade dos dados foi confirmada pelo teste de Shapiro-Wilk a 5% de probabilidade. Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) por meio do teste F ($P \leq 0,05$). Quando significativas, as características foram submetidas ao teste Tukey de comparação de médias ($P < 0,05$). As análises foram realizadas com o auxílio do software R (RDC TEAM, 2013), com o pacote experimental Designs (FERREIRA *et al.*, 2014).

4. RESULTADOS

4.1. Efeitos da baixa expressão de transportadores de NAD em respostas a acidez do meio de cultivo e presença de alumínio durante a germinação

Análise de expressão *in silico* (TOUFIGHI *et al.*, 2005) sugere que genes codificando transportadores de NAD na mitocôndria (NDT1 e NDT2) e no peroxissomo (PXN) são expressos em sementes durante o período de estratificação/germinação (NDT2 e PXN) e estágios iniciais do desenvolvimento da plântula (NDT1, NDT2 e PXN; Figura 2D). Assim, a fim de avaliar a importância dos transportadores de NAD em respostas ao meio ácido na presença de Al durante a germinação, foram comparadas a germinação de sementes dos genótipos *ndt1*, *ndt2* e *pxn1* e do tipo selvagem (WT) em condições ótimas (pH 5.7), em pH ácido (pH 4) e pH ácido acrescido de Al. Sob condições ótimas (pH 5.7), verificou-se que a taxa de germinação máxima atingida nos genótipos testados se difere em 12-24h (WT e *ndt1*) e 24-36h (*ndt2* e *pxn1*) após a exposição à luz (Figura 2A). O mesmo comportamento foi observado no tratamento com pH 4 + Al³⁺, repetindo, inclusive a mesma ordem vista no tratamento pH 5.7 (Figura 2A e 2C). Finalmente, no tratamento pH 4,0, todos os genótipos apresentaram maior taxa de crescimento no período 12-24h. As taxas finais de germinação em todos os tratamentos não foram estatisticamente significativas.

4.2. Influência da deficiência na expressão de transportadores de NAD no crescimento radicular sob pH ácido e Al

Análise de expressão *in silico* indica que os genes NDT1, NDT2 e PXN são expressos nas raízes, especialmente em tecidos de revestimento e no periciclo (Figura 3D). Verifica-se também que NDT1 e PXN são mais expressos do que NDT2 nos mesmos tecidos.

Com o intuito de verificar a importância dos transportadores de NAD no crescimento radicular de plântulas de *Arabidopsis* em respostas a acidez do meio de cultivo e ao Al em concentração tóxica, plântulas de linhas deficientes na expressão de NDT1, 2 e PXN e plantas do tipo selvagem (WT) foram crescidas em condições ótimas (pH 5.7), em pH ácido (pH 4) e pH ácido acrescido de Al em concentração tóxica, por 10 dias. Verificou-se que em condições ótimas, os genótipos *ndt1* e *pxn1* apresentaram maior crescimento radicular em relação a plântulas do genótipo selvagem (Figura 3A). Plântulas da linha *ndt2* não apresentaram diferença significativa em relação ao WT. Em pH ácido não foram observadas diferenças significativas para comprimento de raízes entre os genótipos durante os dias de avaliação (Figura 3B). De forma semelhante, os genótipos não diferiram em meio com Al quanto ao comprimento de raiz no final dos 10 dias de avaliação (Figura 3C). Entretanto, os genótipos *ndt1* e *pxn1* apresentaram maiores comprimentos radiculares durante os dias de avaliação (Figura 3C).

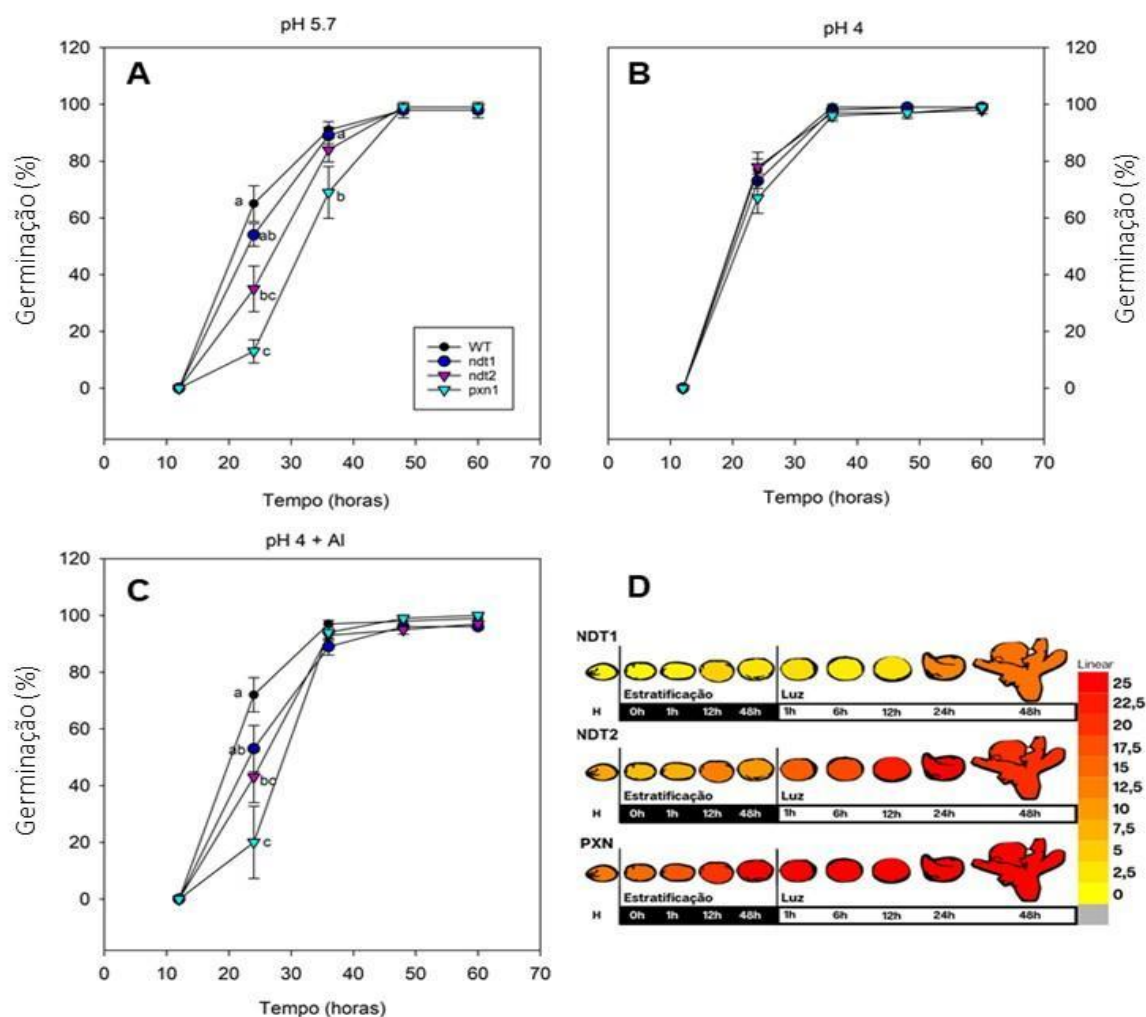


Figura 2. Porcentagem de germinação acumulada de sementes e expressão relativa (mRNA) dos transportadores NDT1, NDT2 e PXN no período de germinação. A germinação foi monitorada por 60 horas em intervalos de 12 horas. (A): germinação dos genótipos no tratamento pH 5.7; (B): germinação dos genótipos no tratamento pH 4.0; (C) germinação dos genótipos no tratamento pH 4.0 + AI; (D) análise *in silico* da expressão relativa dos transportadores nos estágios da germinação. Genótipos: WT (círculos pretos), *ndt1* (círculo azul), *ndt2* (triângulo roxo) e *pxn1* (triângulo azul ciano). Os valores são apresentados como média \pm erro padrão ($n = 5$). As médias seguidas de letras diferentes se diferem para o parâmetro em 5% de probabilidade (teste de Tukey).

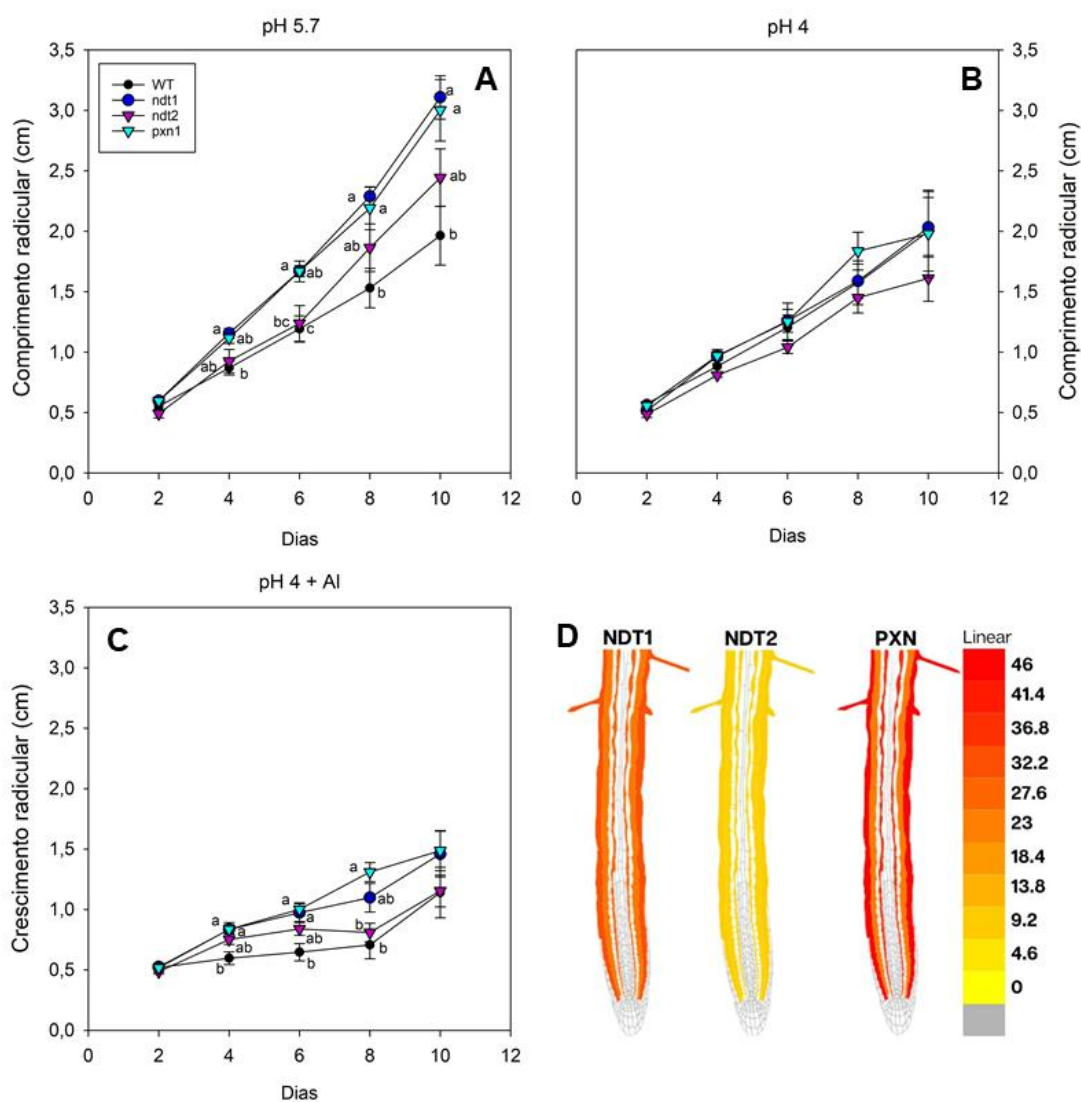


Figura 3. Crescimento radicular e expressão relativa (mRNA) dos transportadores NDT1, NDT2 e PXN no período de germinação. O comprimento radicular foi monitorado por 10 dias em intervalos de 2 dias. (A): crescimento radicular dos genótipos no tratamento pH 5.7; (B): crescimento radicular dos genótipos no tratamento pH 4.0; (C) crescimento radicular dos genótipos no tratamento pH 4.0 + Al; (D) análise *in silico* da expressão relativa dos transportadores nos tecidos radiculares. Genótipos: WT (círculos pretos), *ndt1* (círculo azul), *ndt2* (triângulo roxo) e *pxn1* (triângulo azul ciano). Os valores são apresentados como média \pm erro padrão ($n = 5$). As médias seguidas de letras diferentes se diferem para o parâmetro em 5% de probabilidade (teste de Tukey).

4.3. Variação no pH do meio e presença de Al culmina em estresse oxidativo em

plantas mutantes para transportadores de NAD

Nos ensaios histoquímicos de hematoxilina, que buscaram avaliar a deposição de Al nas raízes, evidenciou-se que os genótipos mutantes apresentaram cor arroxeada mais contrastante no tratamento pH 4 + Al³⁺ quando comparadas ao WT, tal coloração fica mais evidente nos ápices radiculares (Figura 5). Adicionalmente, ensaios histoquímicos por coloração diferencial com DAB e NBT foram utilizados para avaliar qualitativamente os níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e superóxido (O²⁻) nas raízes. No ensaio de DAB o genótipo WT apresentou coloração menos intensa que os demais (Figura 5B) e no ensaio de NBT os genótipos apresentaram coloração semelhante nos mesmos tratamentos (Figura 5C). Tais resultados indicam que a deficiência dos transportadores de NAD pode, até certo ponto, ocasionar acúmulo de ROS nos ápices radiculares. Constata-se também que o pH ácido e o Al influenciam no maior incremento de ROS em todos os genótipos avaliados.

4.4 Respiração de plântulas com deficiência na expressão de transportadores de NAD sob pH ácido e Al

Nos testes realizados para quantificar a respiração das plântulas de *Arabidopsis*, não foram verificadas diferenças entre os genótipos nas três condições de cultivo (Figura 4).

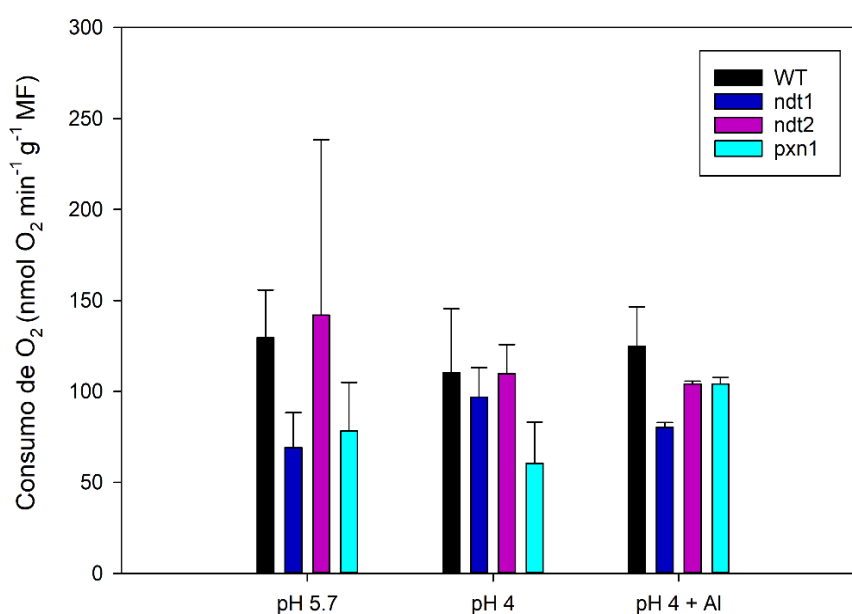


Figura 4. Respiração de plântulas (evolução de O₂) submetidas a estresse por alumínio (Al) em níveis tóxicos. A respiração foi avaliada após o décimo dia da emissão da radícula. Genótipos: WT (barras pretas), *ndt1* (barras azuis), *ndt2* (barras roxas) e *pxn1* (triângulo azul ciano). Os valores são apresentados como média ± erro padrão (n = 3). As médias seguidas de letras diferentes se diferem para o parâmetro em 5% de probabilidade (teste de Tukey).

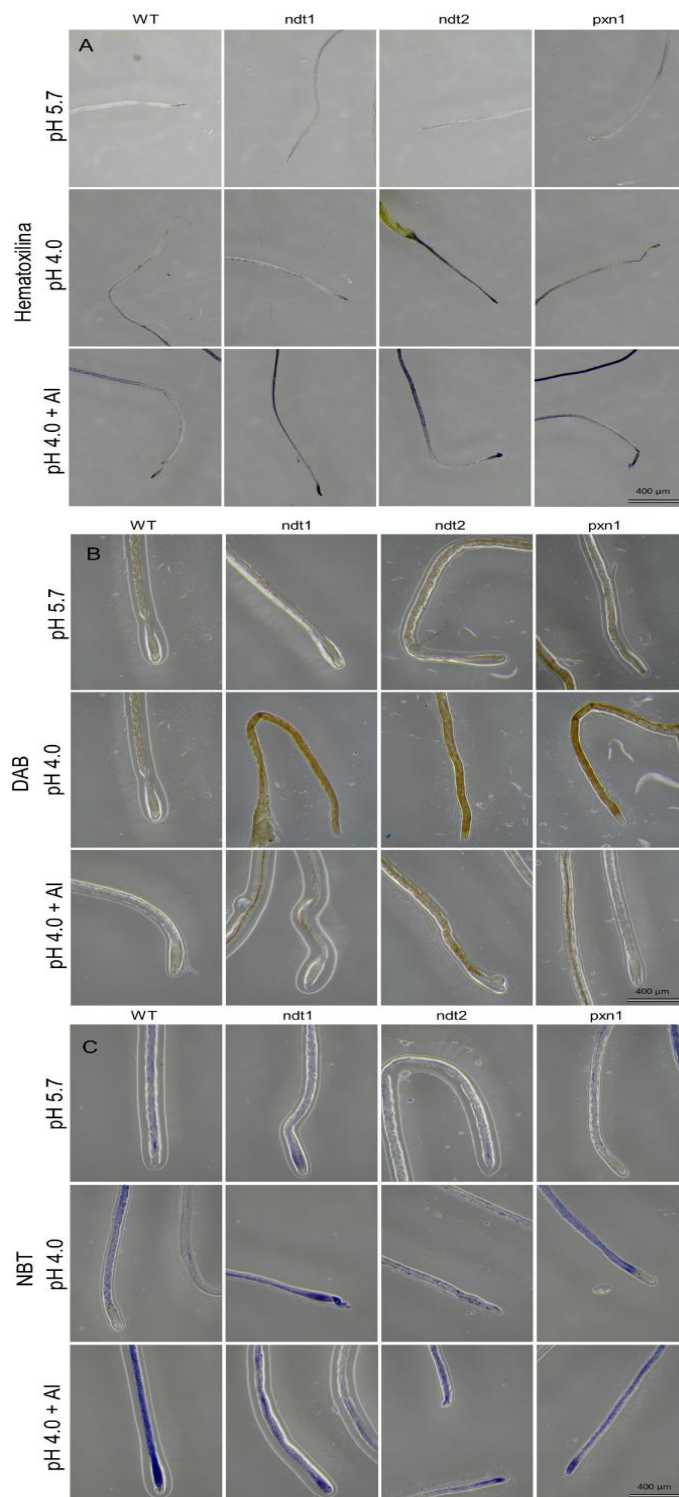


Figura 5. Ensaio histoquímico para detecção de Al e espécies reativas de oxigênio (ROS). Imagens das plantas de *Arabidopsis thaliana* expostas ao corante: (A) hematoxilina;

(B) 3,3' diaminobenzidina (DAB); (C) nitroblue tetrazólio (NBT). (A) Ensaio histoquímico feito com hematoxilina nas raízes de plântulas de *Arabidopsis thaliana* para deposição de Al e localização nos tecidos radiculares. (B e C) Ensaio histoquímico para detecção de ROS nas raízes de plântulas de *A. thaliana*. (B) Detecção do ânion superóxido e (C) peróxido de hidrogênio.

4.5. Influência da deficiência na expressão de transportadores de NAD na eficiência do fotossistema II em plantas sob pH ácido e Al

Na avaliação da razão da fluorescência variável pela fluorescência máxima (Fv/Fm) foi possível observar que para todos os tratamentos os valores máximos foram observados no dia 4 do experimento para todos os tratamentos e genótipos, sendo que houve novamente uma queda no último dia (dia 5; Figura 6). No tratamento pH 5.7 apenas no dia 1 houve diferenças significativas em plantas do mutante *ndt2* cujos valores foram superiores que os demais mutantes (Figura 6A). Sob condição de acidez, plantas do mutante *ndt2* apresentaram valores inferiores aos demais genótipos no dia 1 e o genótipo WT apresentou valores inferiores que os demais no dia 2 (Figura 6B). No tratamento com Al³⁺ o genótipo WT apresentou valores inferiores que os demais no dia 3 da análise (Figura 6C).

4.6. Alterações metabólicas em resposta às variações no pH e ao Al

Para investigar como o transporte de NAD participa nas respostas metabólicas de plântulas submetidas ao pH ácido e ao Al, foram avaliados os níveis de compostos relacionados ao metabolismo do nitrogênio e açúcares.

Na avaliação de clorofilas totais os genótipos não apresentaram diferenças significativas para os tratamentos pH 5.7 e pH 4, com exceção de plantas do genótipo *ndt1* apresentou maiores teores de clorofila do que os demais genótipos no tratamento pH 4 + Al o (Figura 7A). No tratamento pH 5.7 o mutante *ndt1* apresentou os menores valores de clorofila total e o mutante *ndt2* apresentou os maiores (Figura 7A). A razão clorofila *a* / clorofila *b* (Chl *a/b*) também não variou significativamente entre os genótipos nos três tratamentos, porém o mutante *pxn1* apresentou menores valores no tratamento pH 4 + Al (Figura 7B).

No tratamento pH 5.7 os genótipos não diferiram significativamente quanto ao conteúdo total de carotenóides, já nos tratamentos pH 4 e pH 4 + Al o mutante *ndt1* apresentou valores inferiores que os demais genótipos. O mutante *ndt1* apresentou

menores valores sob o tratamento pH 5.7 e o mutante *ndt2* apresentou maiores valores sob este mesmo tratamento (Figura 7C).

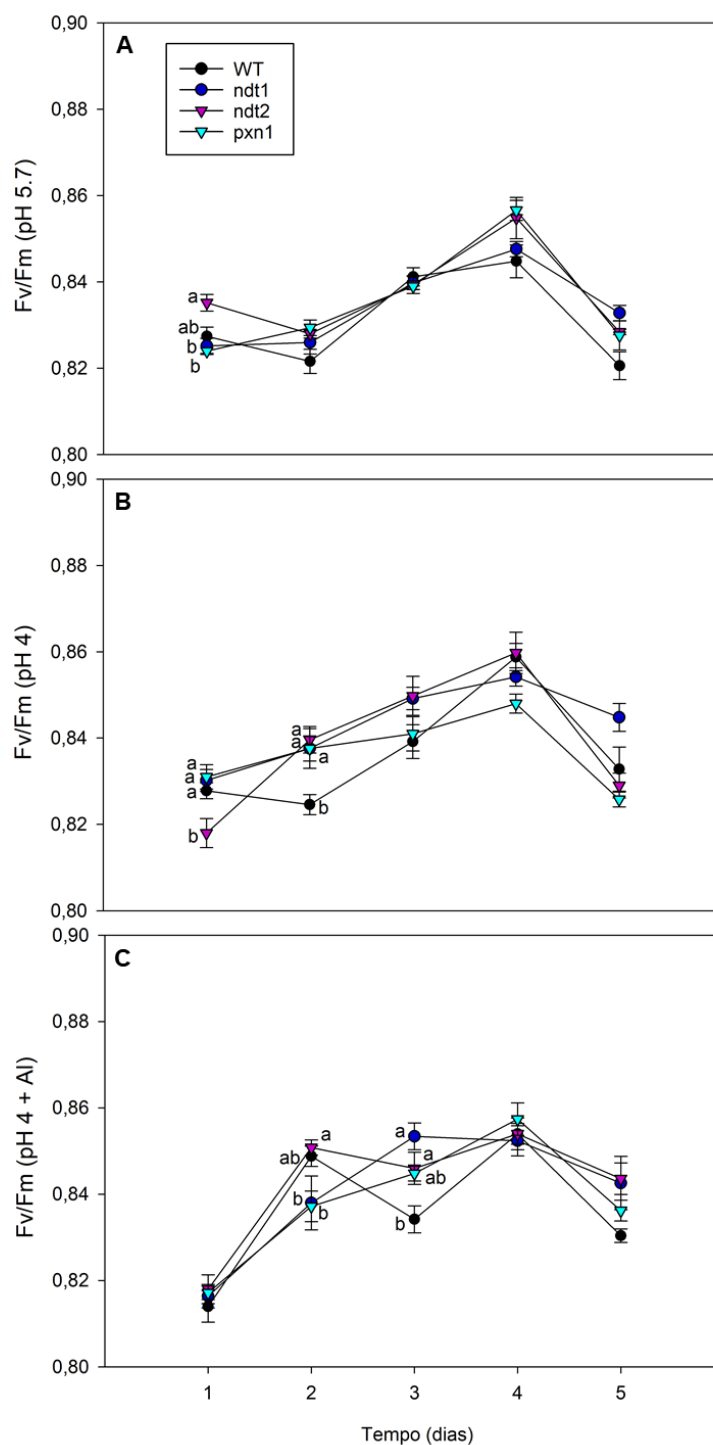


Figura 6. Eficiência do fotossistema II em plantas adultas (Fv/Fm). O parâmetro foi analisado durante 5 dias após o início da aplicação de meio nutritivo contendo os tratamentos. (A): Fv/Fm dos genótipos no tratamento pH 5.7; (B): Fv/Fm dos genótipos no tratamento pH

4.0; (C) Fv/Fm dos genótipos no tratamento pH 4.0 + Al; Genótipos: WT (círculos pretos), *ndt1* (círculo azul), *ndt2* (triângulo roxo) e *pxn1* (triângulo azul ciano). Os valores são apresentados como média \pm erro padrão (n = 5). As médias seguidas de letras diferentes se diferem para o parâmetro em 5% de probabilidade (teste de Tukey).

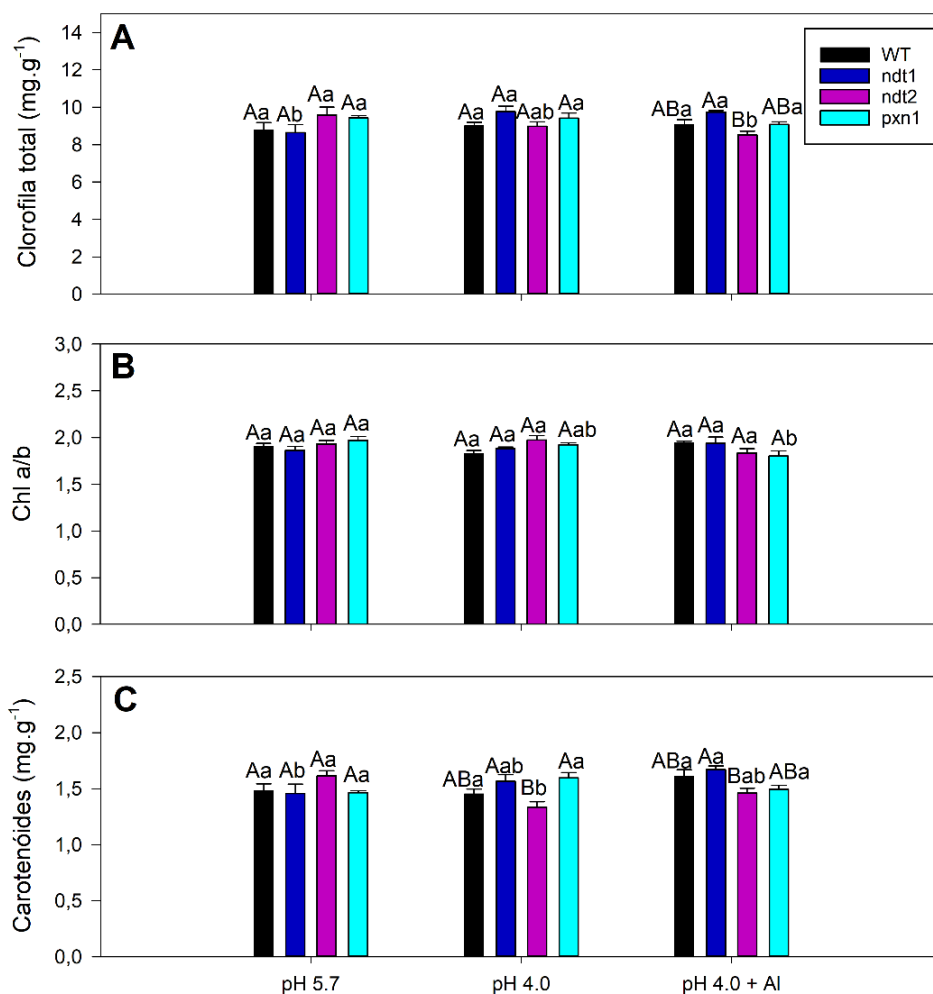


Figura 7. Análise do conteúdo de pigmentos fotossintéticos. O ensaio foi avaliado após 5 dias de adição de meio nutritivo contendo os tratamentos. (A): conteúdo total de clorofilas; (B) razão Chl a/b; (C) conteúdo total de carotenóides. Genótipos: WT (barras pretas), *ndt1* (barras azuis), *ndt2* (barras roxas) e *pxn1* (barras azuis ciano). Os valores são apresentados como média \pm erro padrão (n =5). As médias seguidas de letras diferentes se diferem para o parâmetro em 5% de probabilidade (teste de Tukey), letras maiúsculas diferenciam genótipos diferentes dentro do mesmo tratamento e letras minúsculas diferenciam o mesmo genótipo em diferentes tratamentos.

Com relação ao conteúdo total de proteínas solúveis não foram observadas diferenças na parte aérea entre genótipos nos tratamentos (Figura 8B). Tal comportamento não se repetiu nas raízes, sendo que no tratamento pH 5.7 o genótipo WT apresentou valores significativamente maiores que os demais, já no tratamento pH 4 + Al o genótipo WT apresentou os menores valores. De maneira geral, verifica-se que os genótipos tendem a apresentar menores níveis de proteínas solúveis totais nas raízes sob o tratamento pH 4 + Al, sendo que WT e *ndt1* apresentaram diminuição dos valores neste tratamento (Figura 8A).

Os níveis de aminoácidos totais em raízes do mutante *pxn1* tiveram redução sob o tratamento pH 5.7 quando comparado aos demais genótipos. O genótipo WT apresentou os maiores valores no tratamento pH 4 e os genótipos WT e *pxn1* apresentaram valores significativamente maiores que os demais sob o tratamento pH 4 + Al (Figura 8C). Aparentemente o pH 4 + Al afetou positivamente os valores no mutante *pxn1* e negativamente os níveis nos mutantes *ndt1* e *ndt2* (Figura 8C). Referente aos níveis de aminoácidos livres totais na parte aérea, os genótipos não apresentaram diferenças significativas entre si nos tratamentos pH 4 e pH 4 + Al, já no pH 5.7, o mutante *ndt1* que apresentou valores significativamente inferiores em relação ao WT (Figura 8D).

Em relação aos níveis de prolina nas raízes, os genótipos não diferiram entre si no tratamento pH 4 + Al. No tratamento pH 5.7 o WT apresentou valores significativamente inferiores em relação aos demais genótipos e no tratamento pH 4.0, WT e *pxn1* apresentaram os maiores valores (Figura 8E). Com relação aos níveis de prolina na parte aérea, apenas no tratamento pH 5.7 diferenças significativas foram observadas. Nessa condição verificou-se que as linhas com baixa expressão dos transportadores de NAD apresentaram níveis reduzidos de prolina em relação ao genótipo WT (Figura 8F).

Em relação a quantificação de compostos fenólicos na raiz, apenas os tratamentos pH 4 e pH 4 + Al apresentaram diferenças significativas entre os genótipos avaliados (Figura 8G). Nesses dois tratamentos o mutante *pxn1* apresentou os maiores valores para frutose em relação aos outros genótipos (Figura 8G). No tratamento com pH ácido, o WT foi o genótipo mais afetado (Figura 8G). Para os níveis de compostos fenólicos na parte aérea, apenas os tratamentos pH 4 e pH 4 + Al apresentaram diferenças significativas entre os genótipos (Figura 8H). No pH 4, os

genótipos que mais se diferenciam foram *ndt1* e *pxn1*, sendo *ndt1* mais similar ao WT e *pxn1* demonstrando os menores valores de compostos fenólicos (Figura 8H). No pH ácido acrescido de Al, o mutante que mais se diferenciou foi o *ndt2*, apresentando os menores valores (Figura 8H).

O conteúdo de amido encontrado em folhas não apresentou diferenças estatísticas em nenhum dos tratamentos (Figura 9B). Já em raízes em pH 4 + Al os níveis de amido diferiram nos genótipos em questão (Figura 9A). O mutante *pxn1* obteve o maior valor de amido sob tratamento com Al (Figura 9A) tendo níveis de amido próximos aos do WT. O único genótipo que não difere nos tratamentos foi o *ndt2*. O resultado para a quantificação de glicose na raiz só demonstrou diferença significativa entre os genótipos sob o tratamento com Al (Figura 9C), sendo o *ndt2* o mutante mais afetado e o *pxn1* o que apresentou os maiores valores. Não houve diferença significativa entre os tratamentos e nem entre os genótipos para os valores de glicose referentes ao conteúdo de parte aérea (Figura 9D). Referente ao conteúdo de frutose nas raízes, os genótipos se comportaram de forma semelhante nos tratamentos pH 5.7 e pH 4 + Al (Figura 9E). No tratamento pH 4, o *ndt1* foi o genótipo mais afetado entre todos os outros e o *pxn1* apresentou os maiores valores (Figura 9E). Além disso, todos os genótipos se comportaram de forma semelhante, independentemente dos tratamentos (Figura 9E). Analisando o conteúdo de frutose na parte aérea, foi demonstrado que os tratamentos pH 4 e pH 4 + Al provocaram diferenças significativas entre os genótipos (Figura 9F). No pH 4, o tipo selvagem foi o genótipo mais afetado e que mais se difere dos outros genótipos (Figura 9F). O *pxn1* apresentou os maiores valores em relação aos outros genótipos, apesar de demonstrar semelhança ao *ndt1* (Figura 9F). O mutante *pxn1* apresentou diferença significativa apenas no tratamento pH 4. No tratamento com Al, o *ndt1* apresentou maiores níveis de frutose em relação aos outros genótipos, acompanhado de WT que demonstrou um maior nível de frutose em relação ao tratamento pH 4 (Figura 9F).

Em relação aos teores de sacarose nas raízes, os genótipos apresentaram diferenças nos tratamentos pH 5.7 e pH 4 (Figura 9G). Sendo *pxn1* o genótipo que apresentou maiores valores em ambos os tratamentos. Além disso, foi observado uma semelhança para os níveis de sacarose dos mutantes *ndt1* e *ndt2* nesses tratamentos. O único genótipo que não apresentou diferença significativa entre os tratamentos foi o *ndt1*. Os outros genótipos apresentaram uma semelhança nos tratamentos pH 4 e

pH 4 + AI (Figura 9G). Na parte aérea nenhuma alteração significativa foi observada entre os mutantes em nenhum dos tratamentos (Figura 9H).

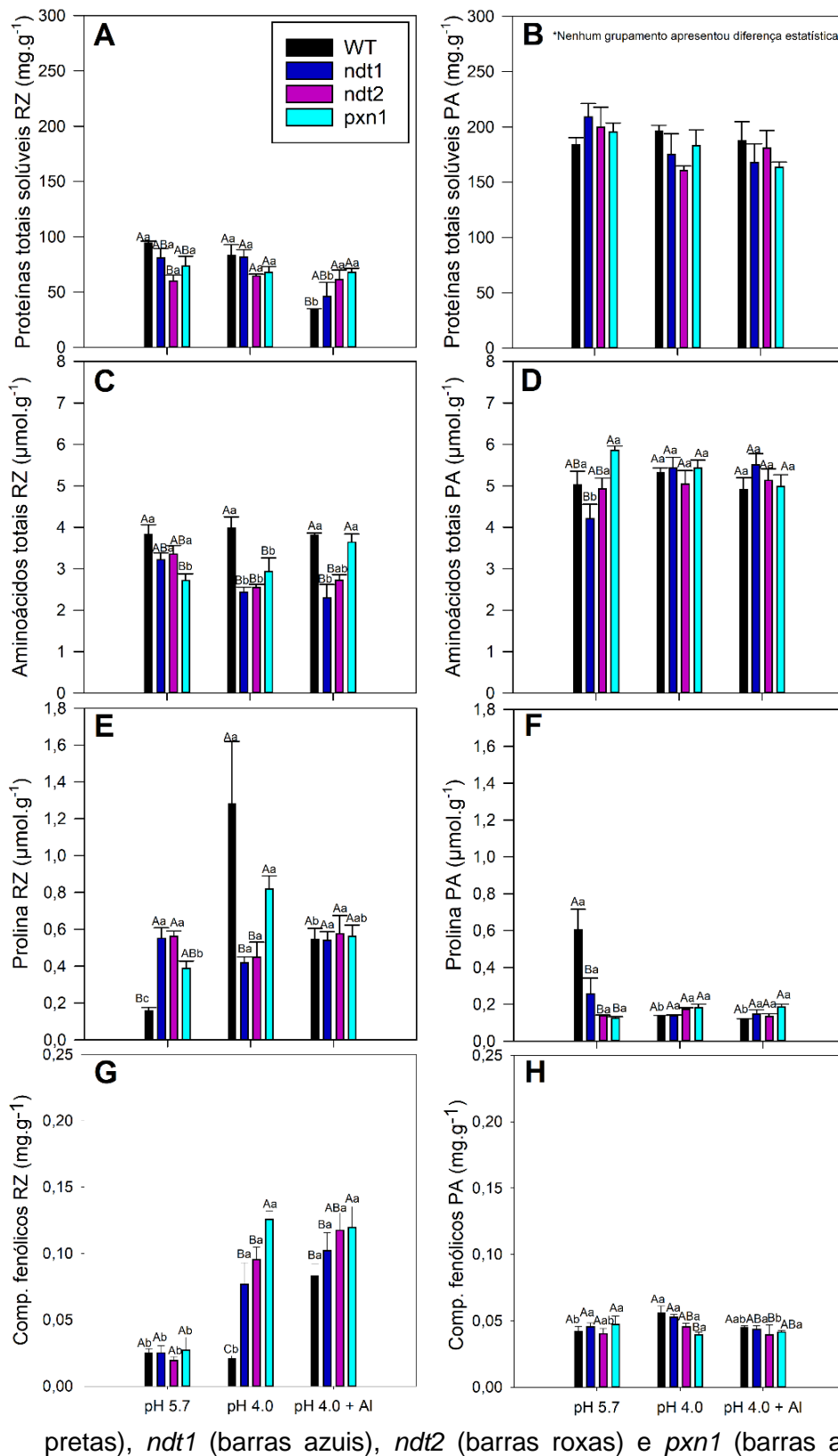


Figura 8. Análise de compostos nitrogenados em raiz e parte aérea. O ensaio foi avaliado após 5 dias de adição de meio nutritivo contendo os tratamentos. (A): proteínas totais solúveis na raiz; (B) proteínas totais solúveis na parte aérea; (C) aminoácidos totais na raiz; (D) aminoácidos totais na parte aérea; (E) conteúdo de prolina na raiz; (F) conteúdo de prolina na parte aérea; (G) compostos fenólicos na raiz; (H) compostos fenólicos na parte aérea. Genótipos: WT (barras

seguidas de letras diferentes se diferem para o parâmetro em 5% de probabilidade (teste de Tukey), letras maiúsculas diferenciam genótipos diferentes dentro do mesmo tratamento e letras minúsculas diferenciam o mesmo genótipo em diferentes tratamentos. *RZ: Raiz; PA: Parte aérea.

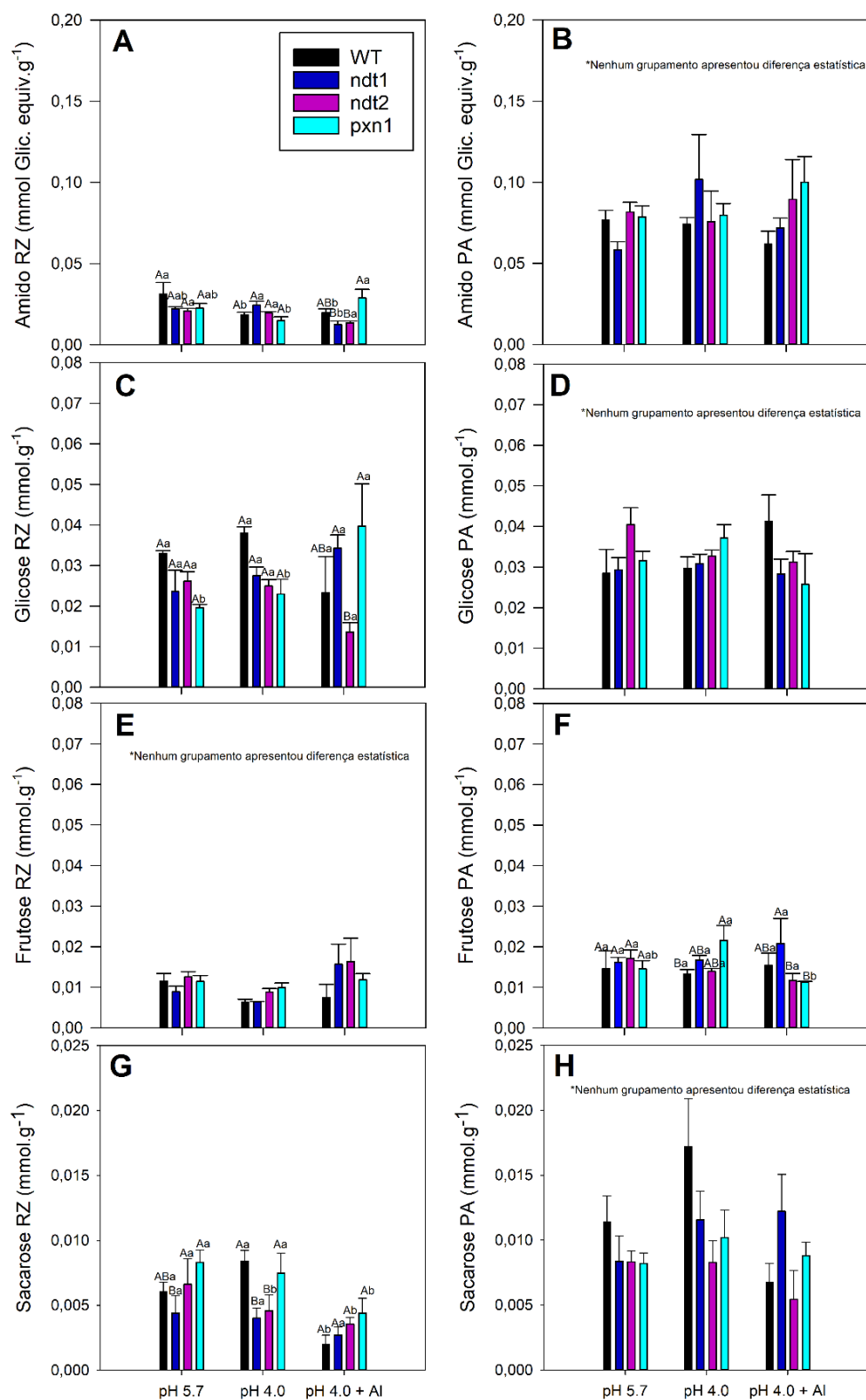


Figura 9. Análise de amido e açúcares em raiz e parte aérea. O ensaio foi avaliado após 5 dias de adição de meio nutritivo contendo os tratamentos. (A): amido na raiz; (B) amido na parte aérea; (C) glicose na raiz; (D) glicose na parte aérea; (E) frutose na raiz; (F) frutose na parte aérea; (G) sacarose na raiz; (H) sacarose na parte aérea. Genótipos: WT (barras pretas), *ndt1* (barras azuis), *ndt2* (barras roxas) e *pxn1* (barras azuis ciano). As médias seguidas de letras diferentes

se diferem para o parâmetro em 5% de probabilidade (teste de Tukey), letras maiúsculas diferenciam genótipos diferentes dentro do mesmo tratamento e letras minúsculas diferenciam o mesmo genótipo em diferentes tratamentos. *RZ: Raiz; PA: Parte aérea.

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, investigou-se a importância do transporte de NAD mediado por transportadores mitocondriais e peroxissomal, NDT1, NDT2 e PXN em condições de estresses provocados por acidez e Al em concentração tóxica no meio de cultivo. O resultado da máxima germinação para todos os genótipos no tempo 24h, independente do tratamento, pode estar associada ao nível de expressão desses transportadores na semente (Figura 2). A expressão de NDT1 e NDT2 não é totalmente suprimida em seus mutantes, como em PXN, ou seja, ainda existe um nível de expressão residual dessas proteínas que pode mascarar os efeitos da sua deficiência (FEITOSA-ARAÚJO *et al.*, 2020). Além disso, por não se tratar de duplos mutantes, o transporte de NAD na mitocôndria pode ser suprido por NDT2 na falta de NDT1 e vice-versa (DE SOUZA CHAVES *et al.*, 2019). Por outro lado, o mutante *pxn1* é um mutante *knockout* e o transporte de NAD para o peroxissomo não pode ser substituído por outra proteína na ausência de PXN (BERNHARDT *et al.*, 2011). Observando os transportadores mitocondriais (NDT1 e NDT2), os resultados indicam um maior impacto negativo na germinação quando há supressão da expressão de NDT2, uma vez que o mutante *ndt1* apresenta uma germinação mais célere que o mutante *ndt2*, evidenciado principalmente no ponto das 24h nos tratamentos de pH 5.7 e pH 4.0 + Al. De forma geral, *ndt1* não apresentou diferenças significativas neste parâmetro em relação ao WT. No final do experimento de germinação, nota-se que os tratamentos sem Al alcançaram valores finais equivalentes, havendo na literatura registro de plantas que toleram certas variações de pH sem decréscimo na germinação (SUTHIPRADIT e ALVA, 1986) e quando houve acréscimo de alumínio verifica-se que ocorreu impacto negativo na germinação total. Para a emissão da radícula, as sementes de *Arabidopsis* mobilizam as reservas lipídicas presentes no endosperma e as utilizam como fonte de carbono e energia (BAUD *et al.*, 2002). Essa mobilização acontece por meio da β -oxidação de lipídios, processo no qual ácidos graxos entram no glioxissomo, onde são convertidos em graxo-acil-CoA pela enzima sintase do graxo-acil-CoA, que por sua vez são clivados em acetil-CoA (RINALDI *et al.*, 2016). A β -oxidação de lipídios envolve a redução de $\frac{1}{2}$ O₂ a H₂O e a formação de um NADH para cada acetil-CoA produzido (RINALDI *et al.*, 2016). A menor taxa de germinação de *pxn1* nos tratamentos pode ser explicada pela deficiência do transporte de NAD no glioxissomo, impactando a germinação dessas sementes. Além disso, as

sementes de *pxn1* podem apresentar dormência (PENFIELD, 2017). Inclusive, no pH 4 não houve diferença na germinação das sementes entre os genótipos.

Sob condições ótimas, plântulas *ndt1* e *pxn1* apresentaram maior comprimento radicular, o que corrobora com os dados de análises *in silico* onde NDT1 e PXN são mais expressos em tecido radicular do que NDT2 (bar.utoronto.com; TOUFIGHI *et al.*, 2005). Entretanto, como discutido acima, o transporte mitocondrial de NAD pode ser suprido em *ndt1* pela expressão residual do próprio NDT1 e pelo NDT2 uma vez que não existe um mutante duplo viável (DE SOUZA CHAVES *et al.*, 2019). Estudos recentes indicam que plantas *ndt1* exibem um maior número de folhas e área foliar total, e maior peso seco do sistema radicular, quando comparados ao tipo selvagem (DE SOUZA CHAVES *et al.*, 2019). No tratamento pH 5.7 existe diferença no comprimento radicular entre os mutantes e o WT no décimo dia de avaliação. No entanto, no pH 4 + Al essa diferença não existe mais. A diferença no comprimento da raiz entre os mutantes e o WT nos dias 4, 6 e 8 no tratamento com pH 4 + Al não se repete no desenvolvimento no tratamento com pH 4, o que pode ser explicado fisiologicamente pela diferença de sensibilidade entre os genótipos ao meio ácido e ao meio ácido mais Al. O principal órgão afetado pela concentração tóxica de Al no meio é a raiz (SIQUEIRA *et al.*, 2021), dessa forma, espera-se que haja uma reorganização da homeostase celular diante de um transporte reduzido de NAD para as organelas. Registre-se que a acidificação do meio de cultivo (pH < 4,5) e o Al em concentrações tóxicas, influenciam no acúmulo de ROS (LI e XING, 2011; XALXO e SAHU, 2017). Esse trabalho demonstrou, por teste qualitativo (DAB e NBT), um resultado positivo para a presença de Al e ROS sob os tratamentos pH 4 e pH 4 + Al³⁺, para todos os genótipos (Figura 4). O DAB detecta o peróxido de hidrogênio e o NBT detecta radicais superóxido, entretanto esses testes qualitativos costumam apresentar bastante falso positivo, o que no trabalho em sequência a esse, é aconselhado utilizar tratamento com catalase (para DAB) e um tratamento com a enzima SOD (superóxido; NBT).

O valor de Fv/Fm é um parâmetro usado para medir a eficiência da fotossíntese em plantas, especialmente em resposta ao estresse ambiental. O valor Fv/Fm refere-se à eficiência máxima do fotossistema II (PSII) na conversão da luz em energia fotoquímica (MOTOHASHI e MYOUGA, 2015). Quando as plantas estão sob estresse, especialmente estresse causado por danos ao aparato fotossintético, como desidratação, altas temperaturas, excesso de luz ou exposição a substâncias tóxicas,

o valor de Fv/Fm pode diminuir (ESSEMINE *et al.*, 2012; ZULFUGAROV *et al.*, 2014). Em condições ideais e sem estresse, o valor de Fv/Fm é próximo a 0,8, indicando uma fotossíntese eficiente (MOTOHASHI e MYOUGA, 2015). No entanto, quando as plantas estão sob estresse, o valor de Fv/Fm pode cair significativamente. Valores abaixo de 0,8 são geralmente considerados indicativos de estresse em plantas de *Arabidopsis* e outras espécies vegetais (MAXWELL E JOHNSON, 2000). O estresse causado pelo Al no meio pode afetar negativamente a eficiência fotossintética das plantas, resultando em valores reduzidos de Fv/Fm (CUNHA NETO *et al.*, 2020). Quando as raízes das plantas de *Arabidopsis* estão expostas a concentrações tóxicas de Al, ocorrem vários efeitos negativos, incluindo danos ao aparato fotossintético, redução na atividade fotossintética e acúmulo de ROS (CUNHA NETO *et al.*, 2020; GUO *et al.*, 2014). Entretanto, além de não demonstrarem grandes variações quantitativas, os valores de Fv/Fm para os genótipos foram muito próximos de 0,8. Interessantemente, no quarto dia de experimento em todos os genótipos verificou-se valores máximos de Fv/Fm seguidos de uma baixa. Portanto, é possível que as condições de tratamento sugeridas para as plantas desse trabalho não tenham sido suficientes (valor de pH, concentração de alumínio, tempo de exposição) para configurar um estresse significativo. Irrigar com solução de Al uma planta cultivada em solo não é tão efetivo quanto usar o mesmo tratamento com plantas cultivadas em areia ou vermiculita, visto que o Al pode ser complexado por inúmeras moléculas que podem ser facilmente encontradas no solo, sem que haja um controle. Apesar disso, as plantas *ndt1* e *ndt2* foram as que se apresentaram menos afetadas logo nos primeiros 2 dias de experimento. Esse dado corrobora com o que foi encontrado por DE SOUZA CHAVES (2019), onde foi demonstrado maiores taxas fotossintéticas e desenvolvimento vegetativo.

A análise de clorofila total dos genótipos demonstrou que os mutantes (*ndt1*, *ndt2* e *pxn1*) não apresentam decréscimo deste parâmetro quando comparados ao WT (Figura 7A). Da mesma forma, FEITOSA-ARAÚJO (2020) ao trabalhar com os mesmos genótipos em condições de alto e baixo CO₂ ambiente não atestou diferenças significativas entre os genótipos no conteúdo total de clorofila. De forma semelhante, a razão Chl_a/b não apresentou diferenças significativas entre os genótipos em cada tratamento (Figura 7B), sendo outro dado semelhante ao obtido por FEITOSA-ARAÚJO (2020). O NADP(H) desempenha um papel fundamental para a biossíntese de clorofilas que ocorre nos cloroplastos (CHAI *et al.*, 2005). De acordo com os

resultados deste trabalho e resultados anteriores, é provável que as mutações contidas nos genótipos estudados não afetem a produção de clorofilas, provavelmente por se tratar de mutações que afetam proteínas em outros compartimentos celulares, que não o cloroplasto. Nos tratamentos sob pH 4 e pH 4 + Al o mutante *ndt2* (Figura 7C) apresentou os menores valores na produção de carotenóides. Em condições de estresse o metabolismo redox mitocondrial é afetado, sendo que NDT2 é importante para a regulação dos níveis de NAD⁺ mitocondrial (PALMIERI *et al.*, 2009), o acetil-CoA produzido nas mitocôndrias é utilizado em vias de biossíntese de carotenóides (JONES *et al.*, 1986). Assim, é possível que sob estresse, a baixa expressão de NDT2 esteja afetando o fornecimento de precursores para a biossíntese de carotenóides (FEITOSA-ARAÚJO *et al.*, 2022).

O conteúdo de proteínas diferiu na parte aérea para os genótipos analisados (Figura 8B). Nas raízes o genótipo WT apresentou os menores valores sob o tratamento pH 4.0 + Al (Figura 8A). O estresse por Al tende a diminuir o conteúdo total e o padrão de expressão de proteínas gerais e relacionadas ao estresse por Al e choque térmico (MOREFIELD *et al.*, 2005), os resultados sugerem que nas raízes o genótipo WT pode estar sob maior estresse que os demais.

Com relação aos níveis de aminoácidos totais nas raízes foi verificado que o genótipo WT apresentou os maiores valores independente do tratamento (Figura 8C). Entretanto, durante rápido estresse, é reportado que há aumento do nível de aminoácidos livres devido à maior degradação de proteínas para remobilização ou utilização como substrato (ARAÚJO *et al.*, 2011). Assim, os resultados obtidos sugerem que sob pH 4 + Al os genótipos WT e *pxn1* podem estar sob maior estresse nas raízes (Figura 8C).

Durante o estresse ácido, foi possível notar conteúdos menores de prolina nas raízes dos mutantes com baixa expressão de NDT1 e NDT2, em relação ao tipo selvagem e ao mutante com baixa expressão de PXN (Figura 8E). O bloqueio no transporte de NAD entre a mitocôndria e o citosol, como ocorre em plantas com baixa expressão de NDT1 e NDT2, compromete o equilíbrio redox celular ao limitar a regeneração de NAD⁺ citosólico e a exportação de equivalentes redutores para o citosol. Sob estresse por acidez, essa limitação reduz o fluxo de carbono por vias geradoras de NADPH, como a via das pentoses-fosfato e o ciclo do malato, diminuindo a disponibilidade desse cofator para a enzima Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato redutase (P5CR), etapa final da biossíntese de prolina a partir de glutamato. Como o acúmulo

de prolina atua como importante osmoprotetor e antioxidante, essa restrição metabólica compromete a capacidade da raiz de ajustar seu estado osmótico e neutralizar ROS, aumentando a sensibilidade ao estresse ácido (Figura 8E).

Os compostos fenólicos podem atuar como antioxidantes, protegendo as células contra os danos oxidativos causados pelo estresse (AHMAD *et al.*, 2018). Tal informação explica o aumento do conteúdo de compostos fenólicos em raízes nos tratamentos pH 4 e pH 4 + Al (Figura 8G). Nestes dois tratamentos, o mutante *pxn1* apresentou os maiores valores para esse parâmetro, o que sugere um papel fundamental do transporte de NAD para o peroxissomo sob condições que induzam estresse oxidativo nas raízes, como aqueles promovidos pelos tratamentos pH 4 e pH 4 + Al. O acúmulo predominante de compostos fenólicos nas raízes, observado sob estresse por acidez (pH 4) e alumínio (Al^{3+}), embora não represente o padrão típico em condições de estresses sistêmicos, pode ser explicado pela natureza localizada e primária do estímulo adverso. Nestas condições, o sistema radicular constitui o principal sítio de percepção e resposta, desencadeando a ativação diferencial da via fenilpropanoide, possivelmente por indução localizada da fenilalanina amônia-liase (PAL) e de outras enzimas associadas. O aumento de fenólicos radiculares desempenha funções múltiplas, incluindo a complexação de Al^{3+} no apoplasto, reduzindo sua toxicidade celular, o reforço da parede celular via lignificação, limitando a penetração e mobilidade do metal, e a atenuação do estresse oxidativo por meio de sua capacidade antioxidante e de atuação como substratos para peroxidases. Dessa forma, a síntese direcionada desses metabólitos nas raízes sob estresses radiculares diretos representa uma estratégia adaptativa eficiente, permitindo neutralizar de forma imediata e localizada os efeitos deletérios do Al^{3+} e da elevada acidez do meio rizosférico (LIU *et al.*, 2022).

Vários trabalhos de pesquisa sugerem que as plantas remobilizam suas reservas de amido para liberar energia, carboidratos e intermediários para ajudar a mitigar o estresse (THALMANN e SANTELIA, 2017). Nas análises de amido e açúcares tanto nas raízes quanto na parte aérea dos genótipos, não foi possível estabelecer uma correlação entre conteúdo de amido e conteúdo de açúcares. Possivelmente, os tratamentos aplicados (concentração do Al e tempo de exposição) não tenham sido suficientemente impactantes para esses parâmetros.

6. CONCLUSÕES

De forma geral, a baixa expressão dos transportadores mitocondriais e peroxissomal não resultou em alterações significativas nos principais parâmetros morfológicos de desenvolvimento vegetal sob condições de estresse por pH ácido e alumínio em níveis tóxicos. Contudo, foi detectada uma diferença estatisticamente relevante no crescimento da raiz primária no tratamento com pH 4 + Al entre os genótipos avaliados, sugerindo uma resposta diferencial específica a esse estressor. Assim, foi possível observar a importância de NDT1, NDT2 e PXN no desenvolvimento da planta. Apesar dos resultados aqui apresentados apontarem uma certa redundância da função dos transportadores, especialmente NDT1 e NDT2, vale ressaltar que apesar de realizarem muitas vezes a mesma função, existe uma diferenciação dos níveis de expressão dessas proteínas em diferentes tecidos da planta. PXN parece ser o transportador mais sensível durante a germinação das sementes, o que pode ser facilmente relacionado à mobilização de reservas na semente que permeiam o glioxissomo.

Por tudo isso, admite-se a necessidade de estudos futuros com linhas duplo mutantes para NDT1 e NDT2 a fim de elucidar sobre a importância do transporte de NAD na mitocôndria. Aliás, estudos que avaliem o perfil metabólico de PARPs (proteínas envolvidas no metabolismo do NAD, que dentre muitas funções, atuam contra o dano à fita de DNA ocasionado muitas vezes por estresse oxidativo; PHAM *et al.*, 2015), também por meio de regulação negativa das proteínas, podem ajudar a estabelecer estratégias para um aprimoramento das respostas ao estresse.

O cerrado é um dos principais biomas do Brasil, caracterizado por apresentar uma vegetação diversificada, que inclui árvores, arbustos, gramíneas e outras formas de vida vegetal. As plantas do cerrado são altamente adaptadas para sobreviver em solos ácidos e com altos teores de alumínio (ALMEIDA RODRIGUES *et al.*, 2019). Estudos indicam que certas espécies podem acumular entre 1.000 e 15.000 mg de íons Al^{3+} por kg de matéria seca (HARIDASAN, 1982; SCHMITT *et al.*, 2016). Surpreendentemente, concentrações de aproximadamente 320 a 530 μM de Al^{3+} podem, de fato, estimular o crescimento das raízes dessas plantas (LI *et al.*, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2016). Essa habilidade adaptativa é notável e demonstra a capacidade dessas espécies em prosperar em ambientes com altas concentrações de Al, oferecendo uma vantagem competitiva em solos ácidos. Dessa forma, seria importante estudar os transportadores mitocondriais e peroxissomal de NAD nessas

plantas nativas reconhecidamente tolerantes ao Al. Em consideração ao cenário mundial para produção de alimentos, alguns cultivares que apresentem menor produção em solos ácidos também podem ser candidatas à essa investigação.

REFERÊNCIAS

AGRIMI, Gennaro et al. The human gene SLC25A17 encodes a peroxisomal transporter of coenzyme A, FAD and NAD⁺. **Biochemical Journal**, v. 443, n. 1, p. 241-247, 2012.

AGRIMI, Gennaro et al. The peroxisomal NAD⁺ carrier of *Arabidopsis thaliana* transports coenzyme A and its derivatives. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, v. 44, p. 333-340, 2012.

AHMAD, Bilal et al. Response of exogenous salicylic acid on cadmium induced photosynthetic damage, antioxidant metabolism and essential oil production in peppermint. **Plant Growth Regulation**, v. 86, p. 273-286, 2018.

AKIRA KATOH et al. Early Steps in the Biosynthesis of NAD in *Arabidopsis* Start with Aspartate and Occur in the Plastid. **Plant Physiology**, v. 141, n. 3, p. 851–857, 12 maio 2006.

ALMEIDA RODRIGUES, Arthur et al. Tolerance of *Eugenia dysenterica* to aluminum: Germination and plant growth. **Plants**, v. 8, n. 9, p. 317, 2019.

ANDERSSON, Maud. Toxicity and tolerance of aluminium in vascular plants: A literature review. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 39, p. 439-462, 1988.

ARAÚJO, Wagner L. et al. Protein degradation—an alternative respiratory substrate for stressed plants. **Trends in plant science**, v. 16, n. 9, p. 489-498, 2011.

BAUD, Sébastien et al. An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 151-160, 2002.

BATISTA-SILVA, Willian et al. The role of amino acid metabolism during abiotic stress release. **Plant, cell & environment**, v. 42, n. 5, p. 1630-1644, 2019.

BERNHARDT, K. et al. A peroxisomal carrier delivers NAD⁺ and contributes to optimal fatty acid degradation during storage oil mobilization. **The Plant Journal**, v. 69, n. 1, p. 1–13, 25 out. 2011.

BERRIN, Jean-Guy et al. Stress induces the expression of AtNADK-1, a gene encoding a NAD (H) kinase in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 273, n. 1, p. 10-19, 2005.

BERTRAND GAKIÈRE et al. NAD⁺ Biosynthesis and Signaling in Plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 37, n. 4, p. 259–307, 4 jul. 2018.

BHALERAO, Satish A. et al. Aluminium toxicity in plants—a review. **Journal of Applicable Chemistry**, v. 2, n. 3, p. 447-474, 2013.

BLOCK, M. D. et al. Poly(ADP-ribose) polymerase in plants affects energy homeostasis, cell death and stress tolerance. **The Plant Journal**, v. 41, n. 1, p. 95–106, 17 nov. 2004.

BÜRKLE, A. Physiology and pathophysiology of poly(ADP-ribosyl)ation *. **BioEssays**, v. 23, n. 9, p. 795–806, 27 ago. 2001.

CALDER, P et al. Fatty acids: Metabolism. **The Encyclopedia of Food and Health**. Oxford, GB. Oxford: Academic Press, pp. 632-644. 2015.

CANTÓ, Carles; MENZIES, Keir J.; AUWERX, Johan. NAD⁺ metabolism and the control of energy homeostasis: a balancing act between mitochondria and the nucleus. **Cell metabolism**, v. 22, n. 1, p. 31-53, 2015.

CAVALCANTI, Joao Henrique Frota et al. Evolution and functional implications of the tricarboxylic acid cycle as revealed by phylogenetic analysis. **Genome biology and evolution**, v. 6, n. 10, p. 2830-2848, 2014.

CHAI, Mao-Feng et al. NADK2, an *Arabidopsis* chloroplastic NAD kinase, plays a vital role in both chlorophyll synthesis and chloroplast protection. **Plant Molecular Biology**, v. 59, p. 553-564, 2005.

CHAI, Mao-Feng et al. NADK3, a novel cytoplasmic source of NADPH, is required under conditions of oxidative stress and modulates abscisic acid responses in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 47, n. 5, p. 665-674, 2006.

CHAPMAN, Kent D.; DYER, John M.; MULLEN, Robert T. Biogenesis and functions of lipid droplets in plants: thematic review series: lipid droplet synthesis and metabolism: from yeast to man. **Journal of lipid research**, v. 53, n. 2, p. 215-226, 2012.

CHEN, Poyu et al. A multi-level response to DNA damage induced by aluminium. **The Plant Journal**, v. 98, n. 3, p. 479-491, 2019.

CROSS, Joanna M. et al. Variation of enzyme activities and metabolite levels in 24 *Arabidopsis* accessions growing in carbon-limited conditions. **Plant Physiology**, v. 142, n. 4, p. 1574-1588, 2006.

CUNHA NETO, Antonio Rodrigues da et al. Negative effects on photosynthesis and chloroplast pigments exposed to lead and aluminum: a meta-analysis. **Cerne**, v. 26, p. 232-237, 2020.

D'AMOURS, D. et al. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. **The Biochemical Journal**, v. 342 (Pt 2), p. 249–268, 1 set. 1999.

DE LA FUENTE, Juan Manuel et al. Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. **Science**, v. 276, n. 5318, p. 1566-1568, 1997.

DE BLOCK, Marc et al. Poly (ADP-ribose) polymerase in plants affects energy homeostasis, cell death and stress tolerance. **The Plant Journal**, v. 41, n. 1, p. 95-106, 2005.

DELHAIZE, Emmanuel; GRUBER, Benjamin D.; RYAN, Peter R. The roles of organic anion permeases in aluminium resistance and mineral nutrition. **Febs Letters**, v. 581, n. 12, p. 2255-2262, 2007.

DE SOUZA CHAVES, I. et al. The mitochondrial NAD⁺ transporter (NDT1) plays important roles in cellular NAD⁺ homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology**, v. 100, n. 3, p. 487–504, 1 nov. 2019.

DING, Y. et al. Construction of an Alternative NAD⁺ De Novo Biosynthesis Pathway. **Advanced Science**, v. 8, n. 9, p. 2004632, 1 mar. 2021.

EASTMOND, P. J.; HOOKS, M.; GRAHAM, I. A. The Arabidopsis acyl-CoA oxidase gene family. **Biochem. Soc. Trans.** v. 28, p. 95–99. 2000.

EEKHOUT, Thomas; LARSEN, Paul; DE VEYLDER, Lieven. Modification of DNA checkpoints to confer aluminum tolerance. **Trends in plant science**, v. 22, n. 2, p. 102-105, 2017.

ENGQVIST, Martin KM et al. Plant D-2-hydroxyglutarate dehydrogenase participates in the catabolism of lysine especially during senescence. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 13, p. 11382-11390, 2011.

ESSEMINE, Jemâa et al. Enhanced sensitivity of the photosynthetic apparatus to heat stress in digalactosyl-diacylglycerol deficient *Arabidopsis*. **Environmental and experimental botany**, v. 80, p. 16-26, 2012.

FEITOSA-ARAUJO, Elias. The role of NAD⁺ compartmentation and dynamics in *Arabidopsis thaliana*. 2020.

FEITOSA-ARAUJO, Elias et al. Downregulation of a mitochondrial NAD⁺ transporter (NDT2) alters seed production and germination in *Arabidopsis*. **Plant and Cell Physiology**, v. 61, n. 5, p. 897-908, 2020.

FEITOSA-ARAUJO, Elias et al. NAD meets ABA: Connecting cellular metabolism and hormone signaling. **Trends in Plant Science**, v. 27, n. 1, p. 16-28, 2022.

FERNIE, Alisdair R. et al. Fructose 2, 6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. **Planta**, v. 212, p. 250-263, 2001.

FERNIE, A. R.; CARRARI, F.; SWEETLOVE, L. J. Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, n. 3, p. 254–261, jun. 2004.

FERREIRA, Eric B. et al. ExpDes: an R package for ANOVA and experimental designs. **Applied Mathematics**, v. 5, n. 19, p. 2952, 2014.

GAKIÈRE, Bertrand et al. NAD⁺ biosynthesis and signaling in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 37, n. 4, p. 259-307, 2018.

GEIGENBERGER, P. Response of plant metabolism to too little oxygen. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, n. 3, p. 247–256, 1 jun. 2003.

GUO, D. Y. et al. Aluminum tolerance in *Arabidopsis thaliana* as affected by endogenous salicylic acid. **Biologia plantarum**, v. 58, n. 4, p. 725-732, 2014.

HARIDASAN, M. Aluminium accumulation by some cerrado native species of central Brazil. **Plant and soil**, v. 65, p. 265-273, 1982.

HASHIDA, Shin-nosuke et al. Arabidopsis thaliana nicotinate/nicotinamide mononucleotide adenyltransferase (AtNMNAT) is required for pollen tube growth. **The Plant Journal**, v. 49, n. 4, p. 694-703, 2007.

HASHIDA, S.; TAKAHASHI, H.; UCHIMIYA, H. The role of NAD biosynthesis in plant development and stress responses. **Annals of Botany**, v. 103, n. 6, p. 819–824, 5 fev. 2009.

HILDEBRANDT, Tatjana M. et al. Amino acid catabolism in plants. **Molecular plant**, v. 8, n. 11, p. 1563-1579, 2015.

HU, Ping et al. A continuum damage mechanics approach coupled with an improved pit evolution model for the corrosion fatigue of aluminum alloy. **Corrosion Science**, v. 113, p. 78-90, 2016.

HUNT, L. et al. NAD – new roles in signalling and gene regulation in plants. **Plant physiology**, v. 163, n. 1, p. 31–44, 1 jul. 2004.

HUNT, Lee; HOLDSWORTH, Michael J.; GRAY, Julie E. Nicotinamidase activity is important for germination. **The Plant Journal**, v. 51, n. 3, p. 341-351, 2007.

HUNT, Lee; GRAY, Julie E. The relationship between pyridine nucleotides and seed dormancy. **New Phytologist**, v. 181, n. 1, p. 62-70, 2009.

IGAMBERDIEV, Abir U.; EPRINTSEV, Alexander T. Organic acids: the pools of fixed carbon involved in redox regulation and energy balance in higher plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1042, 2016.

IUCHI, Satoshi et al. Zinc finger protein STOP1 is critical for proton tolerance in Arabidopsis and coregulates a key gene in aluminum tolerance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 23, p. 9900-9905, 2007.

JALEEL, Cheruth Abdul et al. Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, p. 427-436, 2009.

JIANG, Zhenxiang et al. Mitochondrial AOX supports redox balance of photosynthetic electron transport, primary metabolite balance, and growth in Arabidopsis thaliana under high light. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 12, p. 3067, 2019.

JONES, Benjamin L.; PORTER, John W.; HARDING JR, Roy W. Biosynthesis of carotenes in higher plants. **Critical reviews in plant sciences**, v. 3, n. 4, p. 295-324, 1986.

KATOH, Akira et al. Early steps in the biosynthesis of NAD in Arabidopsis start with aspartate and occur in the plastid. **Plant physiology**, v. 141, n. 3, p. 851-857, 2006.

KIM, M. Y. et al. Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1: 'PAR-laying' NAD⁺ into a nuclear signal. **Genes & Development**, v. 19, n. 17, p. 1951-1967, 1 set. 2005.

KOBAYASHI, Yuriko et al. Characterization of AtALMT1 expression in aluminum-inducible malate release and its role for rhizotoxic stress tolerance in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 145, n. 3, p. 843-852, 2007.

KOCHIAN, Leon 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, Leon V.; PINEROS, Miguel A.; HOEKENGA, Owen A. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. **Plant and Soil**, v. 274, n. 1, p. 175-195, 2005.

KONG, Xiangpei et al. ZmMKK4 regulates osmotic stress through reactive oxygen species scavenging in transgenic tobacco. **Plant cell reports**, v. 30, p. 2097-2104, 2011.

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

KRAMER, David M.; AVENSON, Thomas J.; EDWARDS, Gerald E. Dynamic flexibility in the light reactions of photosynthesis governed by both electron and proton transfer reactions. **Trends in plant science**, v. 9, n. 7, p. 349-357, 2004.

KUMAR, Anil; DOGRA, Samrita; PRAKASH, Atish. Protective effect of curcumin (*Curcuma longa*), against aluminium toxicity: Possible behavioral and biochemical alterations in rats. **Behavioural brain research**, v. 205, n. 2, p. 384-390, 2009.

LI, Chunlei et al. Effects of aluminium on ultrastructure and antioxidant activity in leaves of tea plant. **Acta physiologiae plantarum**, v. 33, p. 973-978, 2011.

LI, Zhe; XING, Da. Mechanistic study of mitochondria-dependent programmed cell death induced by aluminium phytotoxicity using fluorescence techniques. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 1, p. 331-343, 2011.

LIM, Shey-Li et al. In planta study of photosynthesis and photorespiration using NADPH and NADH/NAD⁺ fluorescent protein sensors. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 3238, 2020.

LIU, Huabin et al. Aluminum stress signaling, response, and adaptive mechanisms in plants. **Plant signaling & behavior**, v. 17, n. 1, p. 2057060, 2022.

LIU, Jiping; PIÑEROS, Miguel A.; KOCHIAN, Leon 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.

LIU, Q. et al. Effect of aluminum on cell wall, plasma membrane, antioxidants and root elongation in triticale. **Biologia Plantarum**, v. 52, p. 87-92, 2008.

MA, Jian Feng; RYAN, Peter R.; DELHAIZE, Emmanuel. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. **Trends in plant science**, v. 6, n. 6, p. 273-278, 2001.

MATSUMOTO, H. Biochemical mechanism of the toxicity of aluminium and the sequestration of aluminium in plant cells. In: **Plant-Soil Interactions at Low pH: Proceedings of the Second International Symposium on Plant-Soil Interactions at Low pH, 24–29 June 1990, Beckley West Virginia, USA**. Springer Netherlands, 1991. p. 825-838.

MATTIELLO, Lucia et al. Transcriptional profile of maize roots under acid soil growth. **BMC Plant Biology**, v. 10, p. 1-14, 2010.

MATTIELLO, Lucia et al. Transcriptome analysis highlights changes in the leaves of maize plants cultivated in acidic soil containing toxic levels of Al³⁺. **Molecular biology reports**, v. 41, p. 8107-8116, 2014.

MAXWELL, Kate; JOHNSON, Giles N. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. **Journal of experimental botany**, v. 51, n. 345, p. 659-668, 2000.

MITTLER, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. **Trends in Plant Science**, v. 11, n. 1, p. 15–19, jan. 2006.

MOREFIELD, Heather; GOODMAN, Tomeko V.; HAMISSOU, Mijitaba. The effects of aluminum toxicity on the protein expression of *Arabidopsis thaliana*. **Bios**, v. 76, n. 2, p. 84-88, 2005.

MOSSOR-PIETRASZEWSKA, Teresa. Effect of aluminium on plant growth and metabolism. **Acta Biochimica Polonica**, v. 48, n. 3, p. 673-686, 2001.

MOTOHASHI, Reiko; MYOUGA, Fumiyoshi. Chlorophyll fluorescence measurements in *Arabidopsis* plants using a pulse-amplitude-modulated (PAM) fluorometer. **Bio-protocol**, v. 5, n. 9, p. e1464-e1464, 2015.

MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, 1962

NAKABAYASHI, K. et al. Genome-wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. **The plant journal**, v. 41, n. 5, p. 697-709, 2005.

NARANG, Ram A.; BRUENE, Asja; ALTMANN, Thomas. Analysis of phosphate acquisition efficiency in different *Arabidopsis* accessions. **Plant physiology**, v. 124, n. 4, p. 1786-1799, 2000.

NOCTOR, G. et al. NAD(P) synthesis and pyridine nucleotide cycling in plants and their potential importance in stress conditions. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 8, p. 1603–1620, 19 maio 2006.

NORTH, Brian J. et al. The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. **Molecular cell**, v. 11, n. 2, p. 437-444, 2003.

NUNES-NESI, Adriano et al. Regulation of the mitochondrial tricarboxylic acid cycle. **Current opinion in plant biology**, v. 16, n. 3, p. 335-343, 2013.

NUNES-NESI, Adriano et al. The complex role of mitochondrial metabolism in plant aluminum resistance. **Trends in Plant Science**, v. 19, n. 6, p. 399-407, 2014.

PALMIERI, F. et al. Molecular identification and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* mitochondrial and chloroplastic NAD⁺ carrier proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 45, p. 31249–31259, 6 nov. 2009.

PANDA, Sanjib Kumar et al. Mitochondrial alterations related to programmed cell death in tobacco cells under aluminium stress. **Comptes Rendus Biologies**, v. 331, n. 8, p. 597-610, 2008.

PENFIELD, Steven. Seed dormancy and germination. **Current Biology**, v. 27, n. 17, p. R874-R878, 2017.

PHAM, Phuong Anh et al. Analysis of knockout mutants reveals non-redundant functions of poly (ADP-ribose) polymerase isoforms in *Arabidopsis*. **Plant molecular biology**, v. 89, p. 319-338, 2015.

PLUCIŃSKA, Gabriela; KAROLEWSKI, Piotr. Aluminium effects on pyridine nucleotide redox state in roots of Scots pine. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, v. 63, n. 2, p. 167-171, 1994.

PORRA, R. J.; THOMPSON, W. A. A.; KRIEDEMANN, P. E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 975, n. 3, p. 384-394, 1989.

RANJAN, Alok et al. Alleviating aluminum toxicity in plants: Implications of reactive oxygen species signaling and crosstalk with other signaling pathways. **Physiologia Plantarum**, v. 173, n. 4, p. 1765-1784, 2021.

RENGEL, Z. Aluminium cycling in the soil-plant-animal-human continuum. **Biometals**, v. 17, p. 669-689, 2004.

RINALDI, Mauro A. et al. The roles of β -oxidation and cofactor homeostasis in peroxisome distribution and function in *Arabidopsis thaliana*. **Genetics**, v. 204, n. 3, p. 1089-1115, 2016.

RODRIGUES, A. A. et al. Influence of aluminum on root growth and of anatomy *Stenocalyx dysentericus* (DC.) O. Berg. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 24, p. 1193-1200, 2016.

ROERMUND, VAN et al. The Peroxisomal NAD Carrier from *Arabidopsis* Imports NAD in Exchange with AMP. **Plant physiology**, v. 171, n. 3, p. 2127–2139, 2 maio 2016.

RONGVAUX, A. et al. Reconstructing eukaryotic NAD metabolism. **BioEssays**, v. 25, n. 7, p. 683–690, 13 jun. 2003.

SASAKI, Takayuki et al. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. **The Plant Journal**, v. 37, n. 5, p. 645-653, 2004.

SÁNCHEZ, Juan-Pablo; DUQUE, Paula; CHUA, Nam-Hai. ABA activates ADPR cyclase and cADPR induces a subset of ABA-responsive genes in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 38, n. 3, p. 381-395, 2004.

SCHMID, M. et al. A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. **Nature genetics**, v. 37, n. 5, p. 501-506, 2005

SCHMITT, Marco; WATANABE, Toshihiro; JANSEN, Steven. The effects of aluminium on plant growth in a temperate and deciduous aluminium accumulating species. **AoB Plants**, v. 8, p. plw065, 2016.

SCHNEIDER, Caroline A.; RASBAND, Wayne S.; ELICEIRI, Kevin W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature methods**, v. 9, n. 7, p. 671-675, 2012.

SCHREIBER, V. et al. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 7, p. 517–528, 1 jul. 2006.

SHARMA, Anket et al. Pre-sowing seed treatment with 24-epibrassinolide ameliorates pesticide stress in Brassica juncea L. through the modulation of stress markers. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 1569, 2016.

SHARKEY, T. D. Pentose Phosphate Pathway Reactions in Photosynthesizing Cells. **Cells**, v. 10, n. 6, p. 1547, 18 jun. 2021.

SINGH, Shweta et al. Toxicity of aluminium on various levels of plant cells and organism: a review. **Environmental and Experimental Botany**, v. 137, p. 177-193, 2017.

SIQUEIRA, João Antonio et al. Photoperiod shapes aluminium tolerance in plants. **bioRxiv**, p. 2021.02. 12.430934, 2021.

SIQUEIRA, J. A. et al. Metabolic and DNA checkpoints for the enhancement of Al tolerance. **Journal of Hazardous Materials**, v. 430, p. 128366, maio 2022.

SIQUEIRA, J. A. et al. A long and stressful day: Photoperiod shapes aluminium tolerance in plants. **Journal of Hazardous Materials**, v. 432, p. 128704, 15 jun. 2022.

STEINBECK, J. et al. In Vivo NADH/NAD⁺ Biosensing Reveals the Dynamics of Cytosolic Redox Metabolism in Plants. **The Plant Cell**, v. 32, n. 10, p. 3324–3345, 13 ago. 2020.

SUTHIPRADIT, S.; ALVA, A. K. Aluminum and pH limitations for germination and radicle growth of soybean. **Journal of plant nutrition**, v. 9, n. 1, p. 67-73, 1986.

SWEETLOVE, Lee J. et al. Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle. **Trends in plant science**, v. 15, n. 8, p. 462-470, 2010.

THALMANN, Matthias; SANTELIA, Diana. Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress. **New Phytologist**, v. 214, n. 3, p. 943-951, 2017.

TODISCO, Simona et al. Identification of the mitochondrial NAD⁺ transporter in Saccharomyces cerevisiae. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 3, p. 1524-1531, 2006.

TOUFIGHI, K. et al. The Botany Array Resource: e-Northern, Expression Angling, and promoter analyses. **The Plant Journal**, v. 43, n. 1, p. 153–163, 10 jun. 2005.

TOUFIGHI, K. et al. **University of Toronto**. The Bio-Analytic Resource for Plant Biology. Disponível em: <https://www.bar.utoronto.ca>. Acesso em: 23 de maio de 2025.

TURNER, William L. et al. Cloning and characterization of two NAD kinases from Arabidopsis. Identification of a calmodulin binding isoform. **Plant Physiology**, v. 135, n. 3, p. 1243-1255, 2004.

VANDERAUWERA, S. et al. Silencing of poly(ADP-ribose) polymerase in plants alters abiotic stress signal transduction. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 38, p. 15150–15155, 18 set. 2007.

XALXO, Roseline; SAHU, Keshavkant. Acid rain-induced oxidative stress regulated metabolic interventions and their amelioration mechanisms in plants. **Biologia**, v. 72, n. 12, p. 1387-1393, 2017.

WALLER, Jeffrey C. et al. Subcellular and tissue localization of NAD kinases from Arabidopsis: compartmentalization of de novo NADP biosynthesis. **Planta**, v. 231, p. 305-317, 2010.

WANG, Guodong; PICHERSKY, Eran. Nicotinamidase participates in the salvage pathway of NAD biosynthesis in Arabidopsis. **The Plant Journal**, v. 49, n. 6, p. 1020-1029, 2007.

WEI, Hongbin et al. Light regulation of stomatal development and patterning: shifting the paradigm from Arabidopsis to grasses. **Plant communications**, v. 1, n. 2, 2020.

YANG, Zhen Ming et al. Characterization of aluminium-induced citrate secretion in aluminium-tolerant soybean (*Glycine max*) plants. **Physiologia Plantarum**, v. 113, n. 1, p. 64-71, 2001.

YANG, Y.; SAUVE, A. A. NAD⁺ metabolism: Bioenergetics, signaling and manipulation for therapy. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1864, n. 12, p. 1787–1800, 1 dez. 2016.

YANG, Jian-li; FAN, Wei; ZHENG, Shao-jian. Mechanisms and regulation of aluminum-induced secretion of organic acid anions from plant roots. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 20, n. 6, p. 513, 2019.

ZHANG, Y.; FERNIE, A. R. The Role of TCA Cycle Enzymes in Plants. **Advanced Biology**, p. e2200238, 21 jun. 2023.

ZHU, Xiao Fang et al. XTH31, encoding an in vitro XEH/XET-active enzyme, regulates aluminum sensitivity by modulating in vivo XET action, cell wall xyloglucan content, and aluminum binding capacity in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 24, n. 11, p. 4731-4747, 2012.

ZULFUGAROV, Ismayil S. et al. Production of superoxide from Photosystem II in a rice (*Oryza sativa*L.) mutant lacking PsbS. **BMC plant biology**, v. 14, n. 1, p. 1-15, 2014.

MATERIAL SUPLEMENTAR**Tabela S1. Especificações técnicas do substrato Carolina Soil Padrão**

Especificações técnicas do substrato Carolina Soil Padrão	
Composição	Turfa de sphagnum, vermiculita expandida, calcário dolomítico, gesso agrícola e fertilizante NPK (traços).
Potencial hidrogeniônico (pH)	5,5 ± 0,5
Condutividade elétrica	0,7 ± 0,3
Densidade	145 kg/m ³
Capacidade de retenção de água	55%
Umidade máxima	50%
Reatividade	Produto estável e inerte
Natureza física	Sólido