

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**Importância dos mecanismos de respostas de danos ao DNA na tolerância ao
Arsênio em Plantas**

José Pires de Araujo Neto
Magister Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

JOSÉ PIRES DE ARAUJO NETO

**Importância dos mecanismos de respostas de danos ao DNA na tolerância ao
Arsênio em Plantas**

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: Wagner Luiz Araujo

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

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

T

A663i
2024

Araujo Neto, José Pires de, 1998-

Importância dos mecanismos de resposta aos danos ao DNA
na tolerância ao arsênio em plantas / José Pires de Araujo Neto.
– Viçosa, MG, 2024.

1 dissertação eletrônica (46 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Wagner Luiz Araújo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Vegetal, 2024.

Referências bibliográficas: f. 38-46.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.829>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Plantas - Efeito do arsênio. 2. Plantas - Metabolismo.
3. Plantas - Raízes - Efeito do stress. 4. DNA - Análise.
I. Araújo, Wagner Luiz, 1980-. II. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de
Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. III. Título.

CDD 22. ed. 571.954715

JOSÉ PIRES DE ARAUJO NETO

**Importância dos mecanismos de respostas de danos ao DNA na tolerância ao
Arsênio em Plantas**

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: 30 de agosto de 2024.

Assentimento:

José Pires de Araujo Neto
Autor

Wagner Luiz Araujo
Orientador

Essa dissertação foi assinada digitalmente pelo autor em 20/12/2024 às 16:05:17 e pelo orientador em 20/12/2024 às 20:18:28. 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 **IVPG.IRBH.4ODP** e clique no botão 'Validar documento'.

*Dedico a minha família,
Em especial, as mulheres que me criaram.
Minha mãe, Ely.
Minhas tias, Selma, Telma, Delma e Ellem.
Minhas avós, “Dona Lúcia” &
In memoriam, “Dona Zenaide”
Com amor,
J. P. A. Neto*

AGRADECIMENTOS

A minha família, em especial as mulheres que juntas estruturam quem sou: minha mãe, Elicleides Santa Ana da Silva, por ser meu alicerce de educação, caráter e responsabilidade. Obrigado por nunca medir esforços para me apoiar. Minhas irmãs, Clara e Paula, por me inspirarem, indireta e diretamente, a ser um espelho de ser humano, homem e de irmão.

Minhas tias Ellem, Telma, Selma e Delma, pelo apoio psicológico e financeiro nos momentos mais críticos. E minha avó, “Dona Lucia”, por sempre compartilhar sábios conhecimentos sobre a vida e me orientar na tomada de decisões corretas. In memoriam ao meu casal de “tios do coração”, Luzimar e Sebastião, que foram a centelha da minha jornada no mundo acadêmico.

A todos os amigos de infância, especialmente minha melhor amiga e irmã de alma, Larissa, que, apesar da distância, nunca deixou a luz dos meus olhos se apagarem ajudando a enxergar as respostas mais escuras. A meus amigos e colegas de trabalho que construí ao longo do mestrado.

A Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Biologia Vegetal, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal e aos meus amigos de fora e de dentro do ambiente de trabalho na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP), pela oportunidade de crescimento profissional e pelo apoio na concretização dos meus objetivos.

Ao meu orientador, Dr. Wagner L. Araújo, ao meu professor, Dr. Adriano N. Nesi, e ao meu coorientador, Dr. Daniel, por toda a compreensão e paciência em acompanhar meu processo de evolução dentro da pós-graduação.

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

Em apoio, o CNPq e FAPEMIG.

"Apenas viva e lembre-se que: nem todo dia é bom, mas sempre existe algo bom
todos os dias."
(*in memoriam* a Ana Carolina Cardoso Carvalho)

RESUMO

NETO, José Pires de Araujo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2024. **Importância dos mecanismos de respostas de danos ao DNA na tolerância ao Arsênio em Plantas.** Orientador: Wagner Luiz Araujo.

A manutenção da integridade do DNA é um desafio vital para os organismos. Estudos sugerem que a exposição ao arsênio (As) induz efeitos genotóxicos em células eucarióticas. Em plantas, um dos principais efeitos fenotípicos da toxicidade por As é a inibição do crescimento radicular, que pode ocorrer por meio da interrupção das divisões celulares. Todavia, ainda não está claro se, e em que extensão, essa inibição está relacionada a danos ao DNA e aos mecanismos de reparo. Tais mecanismos são induzidos por reações de fosforilação dependentes e independentes do fator de transcrição Suppressor of Gamma-response 1 (SOG1), culminando na interrupção de fases do ciclo celular. Com efeito, a toxicidade causada pelo As interfere no metabolismo energético pela substituição do fosfato por arsenato, desestabilizando o ATP e, assim, diminuindo a carga de adenilato. Nossa hipótese é que vias de reparo e checagem do DNA interrompem o ciclo celular e o crescimento associado à redução da disponibilidade energética provocada pelo As, bem como pelo dano ao DNA, em vias associadas ao integrador central de resposta SOG1. Foram utilizados mutantes de *Arabidopsis thaliana* para as vias do ciclo celular e de resposta ao dano ao DNA SOG1 (*sog1-101*), CDK (*cdkb1*) e E2F(*e2fb1*), todas no mesmo background selvagem (ecótipo Columbia 0). Em condições de As[0], o genótipo *sog1* apresentou maior massa fresca de parte aérea em comparação aos demais genótipos. Na presença do As, todos os genótipos apresentaram redução significativa na biomassa. Observa-se que os mutantes para *cdkb1* e *e2fb1* apresentam uma redução na concentração de todos os pigmentos na presença de As. Os diferentes genótipos exibem concentrações de aminoácidos totais similares em condições ótimas; todavia, na presença de As, com exceção de *cdkb1*, todos os outros genótipos apresentaram aumentos significativo nos níveis de aminoácidos totais. Os genótipos *cdkb1* e *e2fb1* apresentaram maiores concentrações de proteínas e de amido; entretanto, na presença de As, todos os genótipos sofreram reduções significativas. A presença de As resultou em redução dos açúcares solúveis totais (sacarose, glicose e frutose) em todos os genótipos. Malato, fumarato e prolina, em situação de controle, apresentaram pequenas diferenças. No entanto, na presença de As, todos os genótipos mostraram acréscimos significativos, destacando-se malato e fumarato para *cdkb1* e *e2fb1*, com

os maiores acréscimos, enquanto prolina foi mais expressiva para *sog1*. Em presença de As, os genótipos mutantes (*sog1*, *cdkb1* e *e2fb1*) apresentam coloração mais intensa associada à presença de superóxido na parte aérea. Nos ápices radiculares, todos os genótipos apresentam comportamento semelhante, sem apresentar coloração intensa para o marcador de espécies reativas de oxigênio (ROS) na ausência de estresse. Já na presença do poluente, todos os genótipos exibiram intensa marcação de superóxido. O número de núcleos na parte aérea foi semelhante na situação controle; entretanto, em presença de As, ocorreu uma redução significativa em todos os genótipos, sendo *dkb1* e *e2fb1* os mais afetados. O índice de endopoliploidia, avaliado na parte aérea, não foi alterado pela presença de As. Tomados em conjunto, os resultados indicam que os efeitos inibitórios no crescimento em presença do As estão fortemente relacionados à homeostase do metabolismo energético, o que resulta na paralização do ciclo celular. Além disso, danos ao DNA nas condições aqui analisadas não foram evidentes.

Palavras-chave: estresse por arsênio; metabolismo primário; ciclo celular; reparo de dna

ABSTRACT

NETO, José Pires de Araujo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2024.
Importance of DNA damage response mechanisms in plant arsenic tolerance.
Adviser: Wagner Luiz Araujo.

The maintenance of DNA integrity is a vital challenge for organisms. Studies suggest that arsenic (As) exposure induces genotoxic effects in eukaryotic cells. In plants, one of the primary phenotypic effects of As toxicity is the inhibition of root growth, which occurs through the disruption of cell division. However, it remains unclear whether, and to what extent, this inhibition is related to DNA damage and repair mechanisms. These mechanisms are induced by both phosphorylation-dependent and -independent reactions involving the transcription factor *sog1*, leading to the disruption of cell cycle phases. Consequently, As toxicity interferes with energy metabolism by substituting phosphate with arsenate, destabilizing ATP and reducing adenylate charge. In this context, energy depletion triggers mechanisms for sensing energy status, which play a crucial role in cell cycle phase transition and As tolerance. We hypothesise that DNA repair and checkpoint pathways disrupt the cell cycle and growth due to reduced energy availability caused by As and DNA damage, through pathways associated with the central response integrator *sog1*. *Arabidopsis thaliana* mutants were used to study DNA damage response pathways (*sog1-101*, *cdkb1*, and *e2fb1*) all in the same wild-type background (ecotype Columbia 0). In control conditions, the genotypes showed minimal differences, with the *sog1* mutant standing out in the shoot. In the presence of the pollutant, all plants exhibited a significant reduction in biomass. Pigments differences were only observed under specific comparisons. Under both control and As-treated conditions, the Chlorophyll *a/b* ratio remained similar across genotypes, as did carotenoid concentration. However, mutants for *cdkb1* and *e2fb1* displayed reduced pigment concentration in the presence of As. In control conditions total amino acid concentration were similar among genotypes. However, all genotypes, except for *cdkb1*, showed a significant increase in total amino acids. Regarding proteins, *cdkb1* and *e2fb1* exhibited higher concentration under control conditions, but all genotypes experienced reductions in protein levels when exposed to As. *cdkb1* and *e2fb1* mutants also displayed higher starch concentrations under both conditions, despite the reductions caused by As, while Col-0 and *sog1* showed the lowest concentrations. Total soluble sugars (sucrose, glucose, and fructose) followed similar trends under both situations, except for fructose. As presence resulted in reduced sugars concentration across all genotypes.

In

control conditions, *sog1* had the highest fructose levels, while Col-0 stood out for increases in other sugars under As stress. Malate, fumarate, and proline concentrations showed minor differences in control conditions. However, under As stress, all genotypes exhibited significant increases, with *cdkb1* and *e2fb1* displaying the highest increases in malate and fumarate, and *sog1* in proline. Histochemical assays for superoxide revealed that *sog1* mutants were the most sensitive under control conditions. In the presence of As, all genotypes displayed intense staining for superoxide in the shoots, with Col-0 showing the least staining. In root tips, all genotypes behaved similarly under control conditions, showing no significant reactive oxygen species (ROS) staining. However, under As exposure, all genotypes exhibited intense superoxide staining. Peroxide staining in the aerial parts was similar across genotypes under control conditions, but As exposure caused a significant reduction, with *cdkb1* and *e2fb1* being the most affected. The endopolyploidy index in aerial parts was highest in *cdkb1* under control conditions and was unaffected by As exposure. In the presence of As, genotypes do not show differences. Signals of genotoxicity were not observed in the aerial parts or in the root parts under control conditions. Similarly, under As stress, genotoxic damage was not evident, except in the *e2fb1* mutant, which displayed damage in aerial parts. In summary, the inhibitory effects on growth due to As are strongly associated with the disruptions in energy metabolism, which lead to cell cycle arrest.

Keywords: arsenic stress; primary metabolism; cell cycle; dna repair

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
2.1 Material vegetal e condições de cultivo.....	13
2.2 Descarte de resíduos	13
2.3 Avaliações de crescimento.....	13
2.4 Citometria de fluxo	13
2.5 Avaliação do dano ao DNA por ensaio cometa.....	14
2.6 Detecção de ROS in vivo	14
2.7 Respiração no escuro	15
2.8 Análise metabólicas	15
2.9 Delineamento experimental e análise estatística	15
3.1 Efeitos do As em parâmetros biométricos.....	16
3.2 Metabolismo primário	19
3.3 Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) in vivo	23
3.4 Respiração no Escuro	26
3.4 Impactos do As no número de núcleos, endopoliploidia e genotóxicidade	27
.....	29
3.5 Índice de endopoliploidia e genotóxicidade	29
5. DISCUSSÃO	30
6. CONCLUSÕES	37
7. REFERÊNCIAS	38

1. INTRODUÇÃO

A demanda global por alimentos de alta qualidade cresce a cada ano. No entanto, a contaminação do ambiente por metais pesados e metaloides, como o Arsênio (As), está reduzindo o potencial de áreas agricultáveis. Esse problema é agravado em decorrência de atividades industriais e mineradoras, liberando resíduos desse contaminante no solo e na água. Em virtude disso, a produção de alimentos e a segurança alimentícia é afetada, intensificando os desafios para suprir a necessidade alimentícia global (GALANAKIS, 2024; SHAJI et al., 2024).

Segundo Guerra et al. (2023) discorre que, no Brasil, a contaminação por arsênio (As) constitui um problema significativo, especialmente em regiões com intensa atividade mineradora voltada à exploração de ouro, como os estados do Pará, Mato Grosso, Paraná e Minas Gerais. Esse cenário tem se tornado ainda mais crítico na última década, agravado por desastres relacionados ao rompimento de barragens de rejeitos, com destaque para ocorrências em Minas Gerais (TEIXEIRA et al., 2020).

Tecnologias promissoras, como a fitorremediação, têm sido amplamente exploradas para a remoção de metais pesados e metaloides de solos contaminados. No entanto, essa abordagem apresenta limitações, especialmente em relação ao tempo necessário para a remediação, à eficácia da bioacumulação dos poluentes e ao material vegetal adequado (KHALID et al, 2017; COELHO et al, 2020; LIN et al., 2022). A dificuldade em encontrar plantas que possam crescer em ambientes altamente contaminados é um desafio crescente, pois concentrações elevadas de poluentes resultam na inibição do crescimento das plantas (INDRIOLO et al, 2010; BOUZIDI e KROUMA, 2024).

A progressão do ciclo celular depende do consumo de metabólitos energéticos gerados pela fotossíntese e pela respiração celular, além de uma comunicação mediada por proteínas que sinalizam o status energético, como TOR e SnRK1 (NUNES-NESI et al, 2010; ALVARENGA et al, 2020; SIQUEIRA et al., 2018). No entanto, fatores como metais pesados e metaloides podem causar um desequilíbrio energético, levando à inibição do crescimento vegetal (NUNES-NESI et al, 2014; FENG e NI., 2024). Além da comunicação entre o status energético derivado dos metabólitos e a maquinaria responsável pela regulação do ciclo celular, as plantas possuem um mecanismo amplamente estudado, conhecido como Resposta a Danos ao DNA (DNA Damage Response - DDR), que atua na regulação do ciclo celular, na

verificação da integridade do DNA e na preservação do genoma (MARÉCHAL et al, 2013; SAKAMOTO et al., 2021).

Em todos os eucariotos, o início da via DDR depende do tipo de dano ao DNA para que DDR seja totalmente funcional e eficiente para responder a quebras de fita simples (SSBs) e quebras de fita dupla (DSBs) ou defeitos de replicação (HERBST; LI; DE VEYLDER, 2024).

De primeira estância, o DNA danificado gera um estresse de replicação que rapidamente, é reconhecido por RAD9–RAD1–HUS1 (Complexo 9-1-1) ou pela proteína de replicação A (RPA) e RAD17 juntamente pelo complexo MRE11–RAD50–NBS1MRN. O recrutamento do Complexo 9-1-1 e MRE11–RAD50–NBS1 MRN ativam Ataxia-Telangiectasia, Mutated (ATM) em caso de danos a fita dupla e ou ATM and Rad3-related (ATR) em caso de danos a fita simples (ESCHBACH e KOBBE, 2014;AKLILU; SODERQUIST;CULLIGAN, 2013;HERBST; LI; DE VEYLDER, 2024).

ATM e ou ATR são proteínas que quanto ativos, fosforilam o fator de transcrição SUPRESSOR DE RADIAÇÃO GAMA 1 (SOG1), resultando na interrupção do ciclo celular em fases distintas, para que a maquinaria do DDR atue na verificação da integridade do DNA (NISA et al., 2019; HERBST; LI; DE VEYLDER, 2024). Uma das atuações de SOG1 se dá principalmente no gene *WEE1*, que pode causar paralização do ciclo celular, uma vez que a presença de *WEE1*, inibe as Cyclin-Dependent Kinases (CDKs), uma família de enzimas recrutadas em diferentes fases do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose) (HERBST; LI; DE VEYLDER, 2024; JIANG et al., 2024; BRAAT; HAVAUX, 2024; CHEN et al., 2023). Compilado a isto, os fatores de transcrição E2F e SOG1 controlam antagonista ou sinergicamente a expressão gênica DDR sob estresse de replicação. Em geral, os membros da família dos E2F, E2FA e E2FB são considerados ativadores transcricionais, enquanto E2FC é geralmente considerado um repressor da proliferação celular. Em contrapartida, SOG1 regula a expressão de genes da família das CDKs relacionados a paralização e ou repressão do ciclo celular, podendo induzir processos de endureduplicação. (HERBST; LI; DE VEYLDER, 2024; CASATI, 2023; SABLOWSKI E GUTIERREZ, 2022; FINNEGAN et al, 2012).

Neste contexto, este estudo teve como objetivo, explorar a relação entre o metabolismo energético e os mecanismos de resposta ao dano ao DNA frente à toxicidade causada pelo arsênio (As). Para isso, foram analisados os papéis dos mecanismos de reparo de danos ao DNA e sua interação com o metabolismo energético, utilizando plantas mutantes expostas a esse poluente.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e condições de cultivo

Com o intuito de entender o papel do ciclo celular na inibição do crescimento durante toxicidade por As em função das vias de respostas de dano ao DNA de plantas, serão utilizadas linhas mutantes para *CDK* (*cdkb1*), *SOG1* (*sog1-101*), *E2F* (*e2fb-1*), todas no mesmo background selvagem (ecótipo Columbia 0 – Col-0). As sementes foram esterilizadas e semeadas em placas de Petri contendo meio MS $\frac{1}{2}$ força (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 0,1% sacarose, e deixadas no escuro por 2 dias a 4 °C. Posteriormente, as sementes foram cultivadas a 20°C e 150 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sob fotoperíodo 16 horas luz e 8 horas escuro com. Após cinco dias, as plântulas foram transferidas para placas contendo meio MS $\frac{1}{2}$ suplementado com 0,1% sacarose com Arsênio na concentração de [200 μM] e sem As [0], na forma de As^{V} ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, onde as plantas permaneceram por dez dias.

2.2 Descarte de resíduos

Os resíduos sólidos e líquidos contaminados foram coletados e devidamente rotulados, lacrados e encaminhados para a Divisão de Gerenciamento de Resíduos da UFV, a qual lidaram os meios adequados para tratamento e disposição segura.

2.3 Avaliações de crescimento

O crescimento das plantas foi mensurado pela massa fresca, o comprimento da raiz principal, por meio da avaliação das imagens com o auxílio do software Imagem. Dados de comprimento foram coletados a cada dois dias após o transplante das plântulas para o meio com e sem As.

2.4 Citometria de fluxo

Fragmentos foliares de aproximadamente de 1 cm, foram excisados e picados em 500 μL de tampão de extração nuclear OTTO-I (ácido cítrico 0,1 M, ditioneitol (DTT) 2,0 mM, 0,5% v/v Tween 20®, pH 2,3). Após 3 minutos, 500 μL do mesmo tampão foram adicionados. As suspensões foram filtradas e centrifugada a 100 $\times g$ por 5 min. O sobrenadante foi descartado, 100 μL de tampão OTTO I foi adicionado ao pellet, agitado em vórtex e incubado por 10 minutos. As suspensões de núcleos

foram coradas com 500 µL de tampão OTTO-II (0,4 M Na₂HPO₄·2H₂O, 2,0 mM ditiotreitól, 50 g mL⁻¹ RNase, 75 µM de iodeto de propídio, pH 7,8) no escuro por 30 minutos (PRAÇA-FONTES et al., 2011). As suspensões foram filtradas em um tubo de citometria e analisadas em um citômetro de fluxo BD Accuri C6 (Accuri Cytometers) equipado com um laser de 488 nm (50 mW), dispersão direta (FSC), dispersão lateral (SSC) e quatro detectores de fluorescência. Com base no nível de ploidia de DNA, foi medido o número de núcleos em G0/G1 (nível de ploidia de DNA 2C), S e G2/M (nível de ploidia de DNA 4C), bem como o número total de núcleos das suspensões. As suspensões de núcleos foram analisadas no software BD Csample (Citometria de fluxo ao alcance) e o número de núcleos foram medidos considerando os dados fornecidos por histogramas monoparamétricos (fluorescência de iodeto de propídio × contagem de núcleos) e biparamétricos (fluorescência de iodeto de propídio × granularidade de núcleos e/ou densidade – SSC × contagem de núcleos) (FIORESI et al., 2020).

2.5 Avaliação do dano ao DNA por ensaio cometa

Para o ensaio cometa, foram coletados pontas das raízes e folhas (1cm) e imediatamente submetidas às etapas do protocolo descritas por Quadros et al. (2021). Três lâminas preparadas, coradas com 100 µL de laranja de acridina 50 µM por 15 min, foram observadas em fotomicroscópio Olympus™ BX60, campo claro e iluminação fluorescente. As imagens foram capturadas usando objetiva de 20x e uma câmera de vídeo CCD de 12 bits (Olympus™ DP71) acoplada ao fotomicroscópio Olympus™ BX60 e um computador equipado com uma placa de digitalização. O efeito genotóxico foi avaliado com base na comparação estatística da porcentagem de nucléolos exibindo danos no DNA (nucléolos exibindo danos no DNA/número total de nucleóides).

2.6 Detecção de ROS *in vivo*

A localização histoquímica de H₂O₂ foi realizada conforme Thordal-Christensen et al. (1997). Resumidamente, as plântulas foram tratadas com solução de 3,3'- diaminobenzidina (DAB) (0,03% *p/v*), por 10 min, e subsequentemente incubadas por 10 h. As raízes e folhas coradas serão enxaguadas em água destilada, seguida de ebulição em etanol a 90% (v / v), por 10 min para remover manchas adicionais. O ânion superóxido será detectado usando tampão fosfato 50 mM pH 7,5

contendo NBT 0,05% (p/v), por 20 minutos, sob iluminação (FRYER *et al.*, 2002). A reação foi interrompida pela imersão das raízes coradas com NBT em etanol 96% (p/v). Em ambos os procedimentos, as folhas e raízes serão observadas em microscópio fotônico equipado com sistema U-photo, acoplado a câmera digital.

2.7 Respiração no escuro

A respiração foi determinada por meio da quantificação do consumo de oxigênio, de acordo com Tomaz *et al.* (2010), utilizando eletrodo de Clark, em meio líquido contendo solução tampão composta por HEPES 10mM, MES 10mM, e CaCl_2 2mM, pH 7.2. Foram utilizadas 10 duplicatas de cada genótipo para ambos os cenários (As [0] e As [200 μM]).

2.8 Análise metabólicas

Os açúcares solúveis (glicose, frutose e sacarose) e o amido foram extraídos com a maceração de 50 mg de folhas e raízes (plântula inteira), homogeneizados em 1,5 mL de etanol 98%. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 10.000 xg por 5 minutos e o sobrenadante coletado. Ao pellet foram adicionados 1,5 mL de etanol 80% e o homogenato foi novamente centrifugado a 10.000 xg por 5 min. O sobrenadante foi coletado e o pellet foi submetido a nova homogeneização com 1,5 mL de etanol 50%, seguido de centrifugação a 10.000 xg, por 5 minutos. Por fim, o sobrenadante foi novamente coletado e adicionado aos sobrenadantes coletados anteriormente, compondo o extrato solúvel, que foi utilizado para a determinação dos açúcares solúveis, de acordo com Fernie *et al.* (2001) e aminoácidos de acordo com Yemm *et al.* (1955). O amido foi determinado a partir do pellet, conforme descrito por Fernie *et al.* (2001).

2.9 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), com pelo menos 10 repetições (placas), constituídas por 3 plântulas de cada genótipo por placa. Para as avaliações de crescimento. Os dados foram examinados usando o teste de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$) para verificar a distribuição normal dos dados e o teste de Bartlett ($p > 0,05$) para verificar se há variâncias iguais entre as amostras. Quando os dados falharam no teste de Shapiro-Wilk, uma transformação Box- Cox $T(Y) = (Y\lambda - 1) / \lambda$ passaram realizada para obter os dados de distribuição normal padrão. Os

dados transformados Box-Cox que passem no teste de normalidade ($p > 0,05$) juntamente com os dados não transformados foram submetidos à ANOVA e as médias serão comparadas pelo teste post-hoc de Tukey ($p \leq 0,05$). Os dados não paramétricos (não normais e/ou não homogêneos) foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$). Realizados pelo Software Rbio e SpeedStat, bem como o software SiGO1plot para confecção de gráficos.

3. RESULTADOS

3.1 Efeitos do As em parâmetros biométricos

Na ausência do estresse por As, plantas do tipo selvagem (Col-0) apresentaram massa fresca da raiz similar à de plantas mutante *sog1* que são significativamente maiores que a massa fresca de raiz das plantas mutante *e2fb1* e *cdkb1*. Com efeito, na presença de As, houve uma redução significativa (entre 44-47%) para todos os genótipos (Figura 1A). A massa fresca da raiz em todos os genótipos aqui avaliados sofreram redução com poluente (As [200 μ M]) e foram significativamente diferentes estatisticamente entre plantas controle (As [0]). Registre-se, também, que na presença de As, não houve diferenças significativas entre os genótipos (Figura 1A)

Em situação controle, plantas *sog1* apresentaram a maior massa fresca da parte aérea, seguida, em ordem decrescente, por *cdkb1*, Col-0 e *e2fb1*, que são estatisticamente semelhantes. Em presença de As, todos os genótipos apresentaram reduções significativas na massa fresca da parte aérea quando comparamos às condições controle. O genótipo mais afetado foi *cdkb1*, com uma redução de aproximadamente 59,6%, seguido por Col-0 com $\cong 47,9\%$, *sog1* com $\cong 40,5\%$ e *e2fb1* com $\cong 35,94\%$ (Figura 1B).

Nas condições ótimas (As [0]), o genótipo *sog1* apresentou a maior biomassa fresca total entre os genótipos estudados, seguido por Col-0, *cdkb1* e *e2fb1*. Em presença de As, todos os genótipos apresentaram redução na biomassa e diferença estatística quando comparado a condições controle. Registre-se, também, que *sog1* teve a maior redução ($\cong 56\%$), seguido por *cdkb1* (52%), Col-0 (42%) e *e2fb1* com a menor redução ($\cong 28\%$) (Figura 1C).

Para condições controle, o genótipo *sog1* exibiu o maior índice de crescimento radicular entre os genótipos avaliados seguido por *cdkb1*, Col-0 e *e2fb1*. Sob condições de exposição ao poluente, todos os genótipos apresentaram redução no

índice de crescimento radicular. Plantas do tipo selvagem apresentaram redução de $\cong 35\%$, ao passo que *sog1* apresentou uma redução de $\cong 56\%$; *e2fb1* $\cong 30\%$; e *cdkb1* uma redução de $\cong 56\%$. Com efeito, os genótipos não diferiram significativamente entre si em presença de As, todos apresentando uma média inferior quando comparado a condições controle (Figura 1D).

O genótipo *sog1* exibiu o maior índice de crescimento da parte aérea entre os genótipos avaliados, seguido por *cdkb1*, Col-0 e *e2fb1* em condições controle (Figura 1E). Após exposição ao As, todos os genótipos apresentaram reduções no índice de crescimento da parte aérea, *sog1* manteve o maior crescimento, seguido agora por *e2fb1*, Col-0 e *cdkb1*. Com efeito, todos os genótipos apresentaram diferença estatística quando comparados na situação controle para a com presença do As (Figura 1E).

Em condições controle, o genótipo *sog1* apresentou o maior índice de crescimento da plântula, calculado através da massa total da plântula, pelo tempo de exposição ao ambiente, entre os genótipos avaliados, seguido por *cdkb1*, Col-0 e *e2fb1* (Figura 1F). Em presença de As, todos os genótipos apresentaram reduções no índice de crescimento da plântula. A comparação entre as situações -As e +As mostra que a redução percentual do índice de crescimento foi de $\cong 35\%$ para Col-0, $\cong 55\%$ para *sog1*, $\cong 56\%$ para *cdkb1* e $\cong 30\%$ para *e2fb1*. Registre-se que não houve diferença significativa entre os genótipos em presença de As (Figura 1F).



Figura 1: As [0] é o meio livre de Arsênio / controle onde as plantas de *Arabidopsis thaliana*, sendo Col-0 o tipo selvagem e as demais, plantas mutantes cresceram durante o período de 10 dias. As[200µM] representa o meio com a presença do poluente, onde as plantas cresceram durante o período de 10 dias.

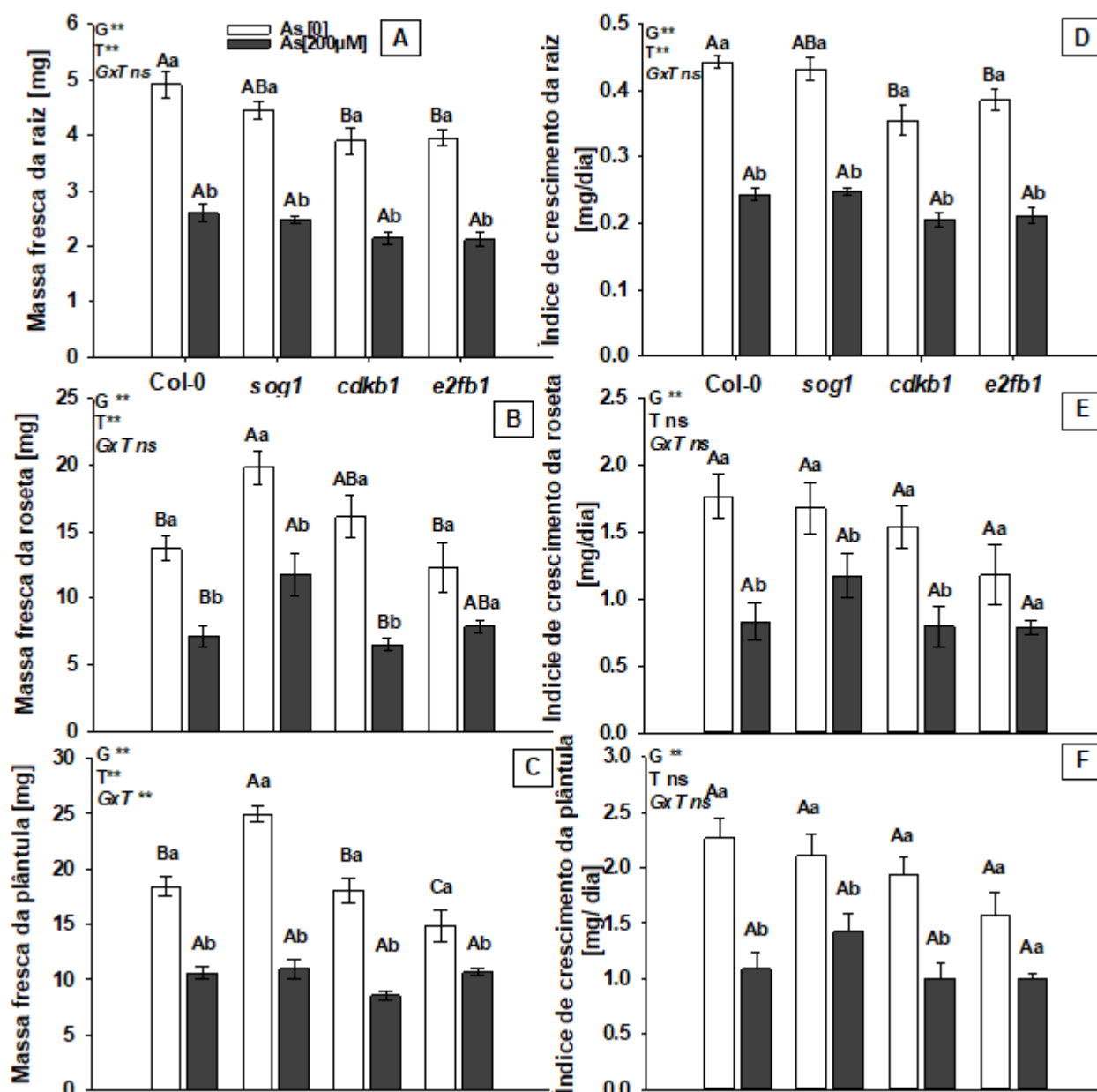


Figura 2: A), [B] e [C] foram utilizadas 12 replicadas de cada genótipo, onde o valor representa a média da massa. O eixo Y dos gráficos refere-se a variável analisada, já no eixo X do gráfico refere-se aos genótipos do estudo. A na ordem é sempre Col-0, sog1, cdkb1 e e2fb1. * = significativo a um nível de 5% de erro estatístico, ** = significativo a um nível de 1% de erro estatístico, ns = não significativo a um nível estatístico, G = genótipo, T = tratamentos, GxT = interação entre genótipo e tratamentos, As [0] = controle, barras brancas. As [200 μM] = tratamento com Arsênio, barra em cinza escura; Letras maiúsculas compara os genótipos entre eles, letras minúsculas os ambientes estudados. Letras semelhantes não diferem estatisticamente.

3.2 Metabolismo primário

Pequenas diferenças na concentração de clorofila entre os genótipos foram observadas em condições de controle (Figura 2A). Por outro lado, a presença de As

promoveu reduções em clorofila para os mutantes *e2fb1* ($\cong 27\%$) e *cdkb1* ($\cong 36\%$), ao passo que para Col-0 e *sog1* pouco ou nada foi alterado. Na comparação entre as duas situações, somente *sog1* não foi estatisticamente impactado pela presença de As (Figura 2 A).

Um padrão semelhante ao observado para a clorofila a foi também observado para a clorofila b (Figura 2B). Assim, não se observaram diferenças no conteúdo de clorofila entre os genótipos quando em situações controle; por outro lado, a presença de As ocasionou reduções em clorofila para os genótipos *e2fb1* ($\cong 30\%$) e *cdkb1* ($\cong 34\%$), confirmando que os pigmentos fotossintéticos foram pouco ou nada afetados nos genótipos Col-0 e *sog1* em presença de As. Novamente na comparação entre as duas condições, somente *sog1* não apresentou diferença estatística (Figura 2B). Não foram observadas alterações entre genótipos e tratamentos para a razão clorofila a/clorofila b (Figura 2C).

Em relação aos carotenoides, na ausência de estresse pelo poluente, o mutante *e2fb1* exibiu a maior concentração de carotenoides entre os genótipos avaliados, seguido por *cdkb1*, *sog1* e Col-0 (Figura 2D), com *e2fb1* e *cdkb1* destacando-se dos demais e se assemelhando estatisticamente ($\cong 2,29$ e $2,18$, respectivamente), enquanto *sog1* e Col-0 apresentaram concentrações estatisticamente semelhantes e inferiores aos outros genótipos (Figura 2 D). Sob condições de exposição ao As, todos os genótipos apresentaram alterações na concentração de carotenoides (Figura 2D). Col-0 exibiu um aumento ($\cong 23,9\%$), seguido por *sog1* com um aumento ($\cong 6,1\%$), enquanto *e2fb1* e *cdkb1* sofreram reduções significativas de $\cong 26,2\%$ e $\cong 28,9\%$, respectivamente. Na presença de As, Col-0 e *sog1* mantiveram-se estatisticamente semelhantes entre si, e agora, destacando-se de *cdkb1* e *e2fb1*, que também foram semelhantes entre si, todavia, menores em comparação com os demais genótipos (Figura 2D).

Ao se analisar o conteúdo de aminoácidos totais, na ausência do estresse por As, não se observaram diferenças significativas entre os genótipos sob condições de controle (Figura 3 A). Sob condições de exposição ao poluente, o mutante *sog1* apresentou o maior aumento na concentração de aminoácidos totais $\mu\text{mol/ massa seca [mg]}$, em sequência, *e2fb1* ($\cong 497$), Col-0 ($\cong 434,48$) e *cdkb1* que exibiu a menor concentração de aminoácidos totais ($\cong 268,75$). Na comparação entre as condições de controle e poluente, todos os genótipos apresentaram aumentos significativa na concentração de aminoácidos totais (entre $21,2\%$ a $182,3\%$) (Figura 3 A).

Legenda 1 Biometria

Em condições controle, o maior conteúdo de proteínas foi observado em *e2fb1* ($\cong 67,91 \mu\text{mol}$) e *cdkb1* ($\cong 56,58 \mu\text{mol}$), que foram significativamente maiores que em *sog1* ($\cong 48,81 \mu\text{mol}$) e Col-0 ($\cong 46,59 \mu\text{mol}$) (Figura 3 B). Sob condições de exposição ao poluente, os genótipos não se diferenciaram estatisticamente, embora todos os genótipos apresentaram redução no conteúdo de proteínas (Figura 3 B).

Em condições controle o maior conteúdo de amido foi observado para o mutante *cdkb1* ($\cong 61,38 \mu\text{mol}$), seguido por *e2fb1* ($\cong 34,07 \mu\text{mol}$), ao passo que Col-0 ($\cong 19,45 \mu\text{mol}$) e *sog1* ($\cong 11,16 \mu\text{mol}$) foram similares (Figura 3 C). Sob condições de exposição ao poluente, reduções significativas foram observadas para *cdkb1* ($\cong 37,45 \mu\text{mol}$), seguido por *e2fb1* ($\cong 30,98 \mu\text{mol}$), *sog1* ($\cong 16,49 \mu\text{mol}$) e Col-0 ($\cong 9,38 \mu\text{mol}$). Na comparação entre as duas condições, com exceção do mutante *sog1* que apresentou um aumento ($\cong 47,7\%$) os demais genótipos apresentaram reduções na concentração de amido (entre $9,1\%$ e $51,8\%$), cuja diferença estatística significativa só foi observada para o genótipo *cdkb1* (Figura 2 C).

Em condições de controle, não se observaram diferenças estatísticas entre os genótipos para os níveis de sacarose (Figura 3 D). Sob condições de exposição ao poluente, todos os genótipos apresentaram aumentos, ainda que significativos apenas para Col-0, no teor de sacarose (entre $\cong 8,1\%$ e $\cong 176,1\%$). Cabe registrar que plantas Col-0 em presença de As apresentaram aumento de $\cong 176,1\%$ nos teores de sacarose (Figura 3 D).

Em condições controle, os teores de glicose não diferiram significativamente entre os genótipos (Figura 3 E). Sob condições de exposição ao poluente, todos os genótipos foram caracterizados por aumento nas concentrações de glicose, com Col-0 obtendo maior acréscimo de açúcar ($\cong 109,3\%$), seguido por *e2fb1* ($\cong 88,9\%$), *sog1* ($\cong 49,2\%$) e *cdkb1* (único não significativo) com o menor aumento ($\cong 31,8\%$) (Figura 3 E).

Em condições de controle, plantas mutantes *sog1* apresentaram a maior concentração de frutose, diferindo significativamente dos outros genótipos que foram semelhantes entre si (Figura 3 F). Sob condições de exposição ao poluente, não se observaram diferenças estatísticas entre os genótipos. Ao se comparar condições controle com a presença de As, todos os genótipos apresentaram redução no conteúdo de frutose, embora apenas no mutante *sog1* essa diferença tenha sido estatisticamente significativa (Figura 3 F).

Em condições controle, os genótipos *cdkb1* e *e2fb1* apresentaram as maiores concentrações de malato, sendo estatisticamente similares ao passo que Col-0 e

sog1, ambos são semelhantes estatisticamente, não obstante, o genótipo *sog1* tem proximidade estatísticas com *cdkb1* e *e2fb1* (Figura 3 G). Em presença de As, *cdkb1* ($\cong 34,29 \mu\text{mol}$) seguido por *e2fb1* ($\cong 31,99 \mu\text{mol}$) apresentaram as maiores médias, ao passo que *sog1* ($\cong 28,26 \mu\text{mol}$) e Col-0 ($\cong 24,28 \mu\text{mol}$) foram menores (Figura 2 G). Comparando as duas condições, todos os genótipos apresentaram aumentos significativos na concentração de malato, Col-0 ($\cong 43,5\%$) seguido por *sog1* um ($\cong 27,8\%$), *cdkb1* ($\cong 23,1\%$) e *e2fb1* ($\cong 24,2\%$) (Figura 3 G).

Em condições controle, não se observaram diferenças estatísticas para os teores de fumarato entre os genótipos aqui avaliados (Figura 3 H). Após exposição ao As, diferenças estatísticas entre os genótipos foram observadas com *cdkb1* apresentou a maior média ($\cong 52,64 \mu\text{mol}$), estatisticamente superior a *e2fb1* ($\cong 28,77 \mu\text{mol}$), *sog1* ($\cong 20,34$) e Col-0 ($\cong 22,36 \mu\text{mol}$) (Figura 3 H). Comparando as duas situações, todos os genótipos apresentaram aumentos significativos nas concentrações de fumarato, exceto para *sog1* (Figura 3 H).

Em condições controle, não se observou diferenças estatísticas significativas entre os genótipos para os teores de prolina (Figura 3 I). Sob condições de exposição ao poluente, todos os genótipos foram caracterizados por aumentos significativos na concentração de prolina onde plantas mutantes *sog1* se destacou significativamente, com valores superiores aos demais genótipos, enquanto Col-0, *cdkb1* e *e2fb1* não diferiram significativamente entre si (Figura 3 I). Todos os genótipos apresentaram aumentos significativos na concentração de prolina em resposta a presença de As e assim Col-0 teve um aumento de $\cong 262,0\%$, *sog1* $\cong 783,9\%$, *cdkb1* $\cong 501,9\%$ e *e2fb1* $\cong 382,4\%$ (Figura 3 I).

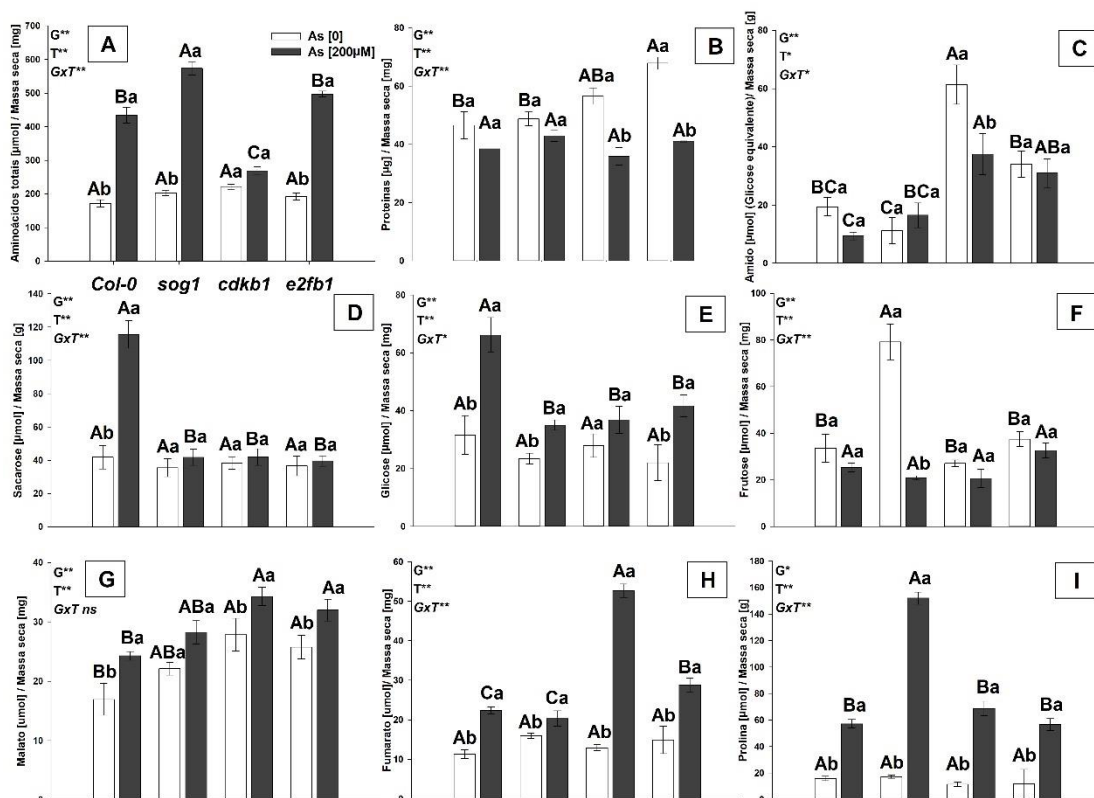


Figura 3: Para cada variável analisada, foram utilizadas 5 amostras de 5[mg] de material liofilizado de cada genótipo. As plântulas foram coletadas no final da tarde, início da noite (17:00). O eixo Y dos gráficos refere-se a variável analisada, já no eixo X do gráfico refere-se aos genótipos do estudo. A na ordem é sempre Col-0, *sog1*, *cdkb1* e *e2fb1*. * = significativo a um nível de 5% de erro estatístico, ** = significativo a um nível de 1% de erro estatístico, ns = não significativo a um nível estatístico, G = genótipo, T = tratamentos, GxT = interação entre genótipo e tratamentos, As [0] = controle, barras brancas. As [200 µM] = tratamento com Arsênio, barra em cinza escura;

3.3 Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) *in vivo*

Em condições controle todos os genótipos apresentaram reação positiva para superóxido tanto na parte aérea quanto como nos ápices radiculares (Figura 5). Ao se analisar as pequenas diferenças entre os genótipos na situação controle notou-se em Col-0 e nos mutantes *cdkb1* e *e2fb1* a presença de pequenas pontuações de baixa intensidade de coloração nas extremidades da folha ou nenhuma coloração. Com efeito, o mutante *sog1* apresentou uma dispersão maior e mais intensa da coloração que nas folhas dos demais genótipos. Registre-se que uma coloração mais intensa foi observada nos ápices radiculares de Col-0 quando comparado aos demais mutantes (*sog1*, *cdkb1* e *e2fb1*) (Figura 5).

Em presença de As, plantas Col-0 apresentaram uma intensidade de coloração para superóxido maior que as dos mutantes (*sog1*, *cdkb1*, *e2fb1*), coloração essa concentrada em grande parte nas áreas periféricas da folha (Figura 5). Nos mutantes *sog1*, *cdkb1* e *e2fb1* foi visualizada uma maior dispersão do marcador de superóxido ao longo da folha embora a intensidade dessa coloração tenha sido menor que em Col-0 (Figura 5). Com efeito, análises histoquímicas realizadas nos ápices radiculares revelam que *sog1* apresenta menor intensidade de coloração para o marcador de superóxido que os demais genótipos mutantes (*cdkb1* e *e2fb1*), que foram bastante similares, ao passo que Col-0 foi o genótipo com a maior intensidade de coloração do marcador (Figura 3).

Cabe ressaltar também que ao se analisar reações histoquímicas para peróxido de hidrogênio pouco ou nada foi detectado na parte aérea ao passo que para as raízes pequenas intensificações de coloração nos ápices radiculares foram visualizadas em condições ótimas para todos os genótipos (Figura 4). Cumpre mencionar que em condições controle, os ápices radiculares dos genótipos *sog1*, *cdkb1* e *e2fb1* apresentaram colorações extremamente sutis do corante marcador de peróxido ao passo que Col-0 não apresentou nenhuma coloração significativa (Figura 4). Padrão similar foi também observado para todos os genótipos em presença do As (Figura 4).

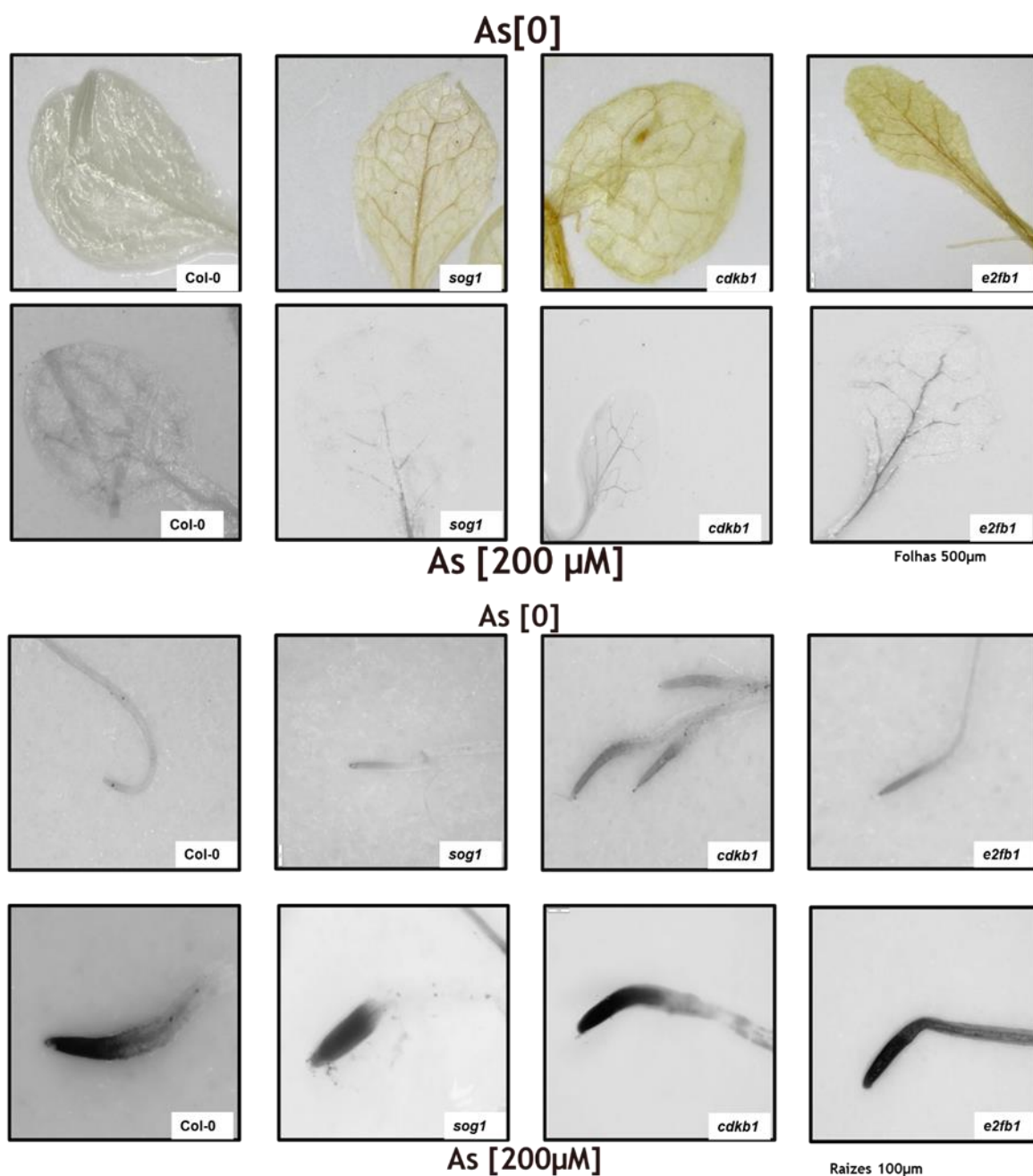


Figura 4: A atividade de peróxido foi detectada com DAB, que é apresentada pela cor marrom, onde, quanto maior a intensidade do marrom, maior a histolocalização da atividade de peróxido. Para folhas e raízes se fez a necessidade de um contraste de cores para melhor visualização, onde, quanto maior a intensidade da cor, maior a presença de peróxido.

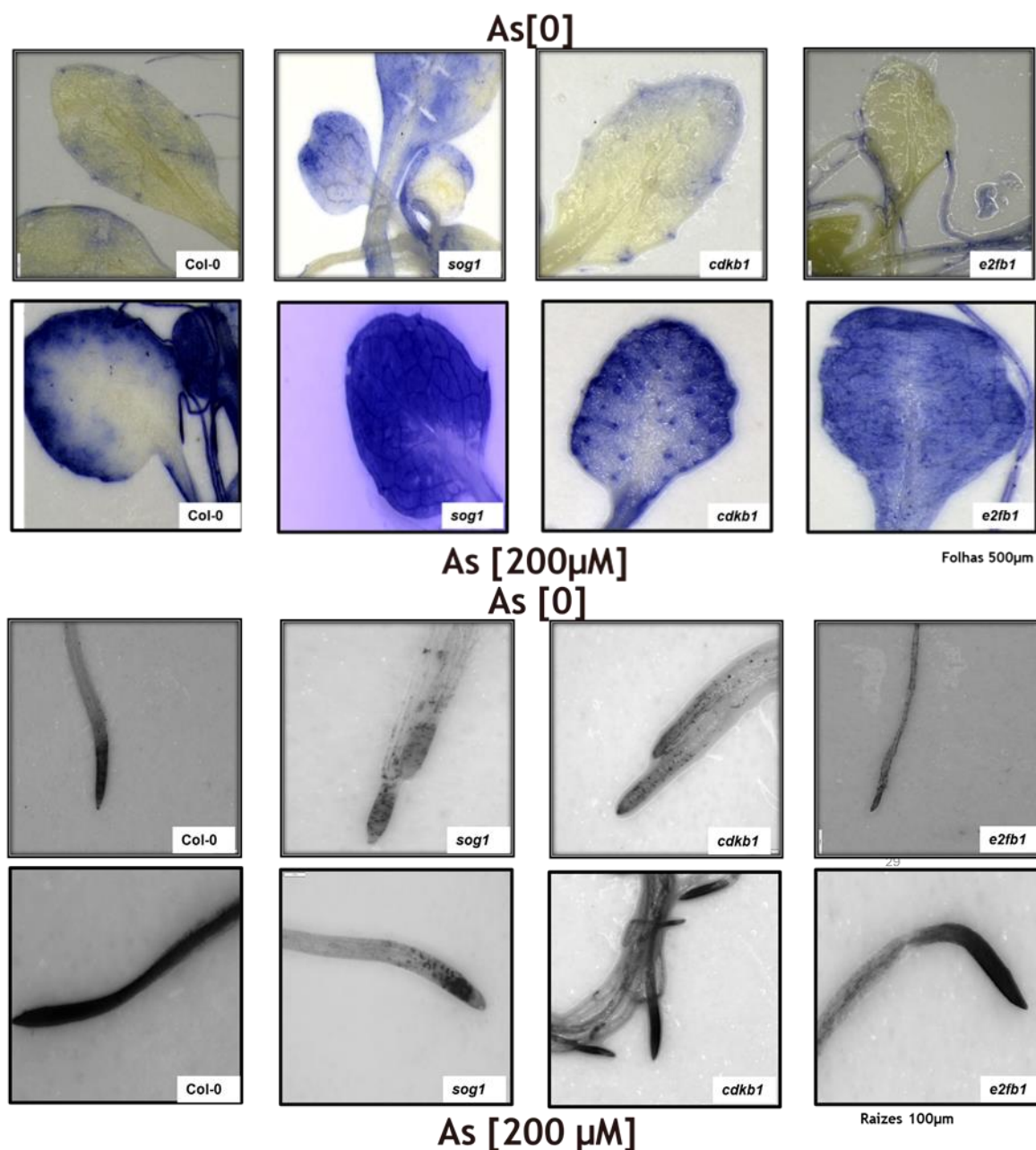


Figura 5: A atividade de superóxido foi detectada com NBT, que é apresentada pela cor azul, onde, quanto maior a intensidade do azul, maior a histolocalização da atividade de peróxido. Para folhas e raízes se fez a necessidade de um contraste de cores para melhor visualização, onde, quanto maior a intensidade da cor, maior a presença de superóxido.

3.4 Respiração no Escuro

Em condições de controle, a respiração no escuro foi estatisticamente diferente entre os genótipos aqui investigado. De modo resumido, plantas mutantes *cdkb1* apresentaram os maiores valores de respiração no escuro ($\cong 367,67 \text{ nmol}$) ao passo que *sog1* ($\cong 198,93 \text{ nmol}$), *Col-0* ($\cong 149,88 \text{ nmol}$) e *e2fb1* ($\cong 146,23 \text{ nmol}$) apresentaram valores mais baixos e semelhantes entre si (Figura 6). Sob condições de exposição ao As, *Col-0* ($\cong 273,32 \text{ nmol}$) e *sog1* ($\cong 256,34 \text{ nmol}$) foram semelhantes

entre si e superiores a *cdkb1* ($\cong 185,54\text{nmol}$) e *e2fb1* ($\cong 226,21\text{nmol}$), que também não diferiram significativamente entre si (Figura 6). Ao se comparar a condição controle com a presença do As, o mutante *cdkb1* foi o único genótipo que apresentou redução ($\cong 49,5\%$) na respiração no escuro; por outro lado, os demais genótipos apresentam aumento significativo na respiração no escuro (entre 28,9-82,4%) (Figura 6).

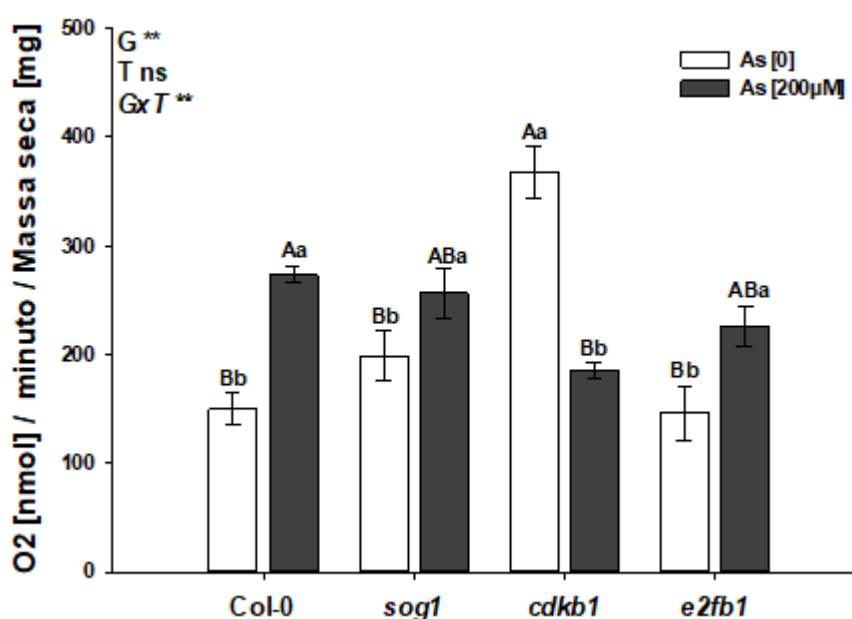


Figura 6: Foram utilizadas 10 replicatas de plântulas inteiras de cada genótipo de ambas as situações. Onde, as plântulas foram previamente aclimatadas no escuro e analisadas individualmente por 5 minutos na câmara do eletrodo de Clark alternando os genótipos e tratamentos. * = significativo a um nível de 5% de erro estatístico, ** = significativo a um nível de 1% de erro estatístico, ns = não significativo a um nível estatístico, G = genótipo, T = tratamentos, GxT = interação entre genótipo e tratamentos, As [0] = controle, barras brancas. As [200 µM] = tratamento com Arsênio, barra em cinza escura; Letras maiúsculas compara os genótipos entre eles, letras minúsculas os ambientes estudados. Letras semelhantes não diferem estatisticamente.

3.4 Impactos do As no número de núcleos, endopoliploidia e genotóxicidade

De modo geral, em situação controle, os genótipos apresentaram variações significativas no número total de núcleos. Assim, plantas *cdkb1* apresentaram o maior número de núcleos (9.723 núcleos) seguidas por Col-0 (9.298 núcleos), *sog1* (9.184 núcleos) e *e2fb1* (8.115) na ausência de estresse (Figura 7 A). Em presença de arsênio, todos os genótipos apresentaram uma redução no número total de núcleos em que *sog1* registrou o maior número de núcleos (6.810 núcleos), seguido por Col-0

(5.840 núcleos), *e2fb1*(4.234 núcleos) e *cdkb1* (3.816 núcleos) (Figura 7 A). Cumpre mencionar que plantas mutantes *cdkb1* apresentaram a maior redução (60,7%), seguido por Col-0 (37,2%) *e2fb1* (47,8%) e o mutante *sog1* (25,9%) que apresentou a menor redução percentual (Figura 7 A).

Em condições ótimas, os genótipos apresentaram distintos padrões de distribuição de ploidia dos núcleos (Figura 7 B). Assim, *e2fb1* destacou-se com a maior proporção núcleos 2C ($\cong 30,54\%$) seguido por Col-0 ($\cong 25,72\%$), *sog1*($\cong 21,50\%$) e *cdkb1* ($\cong 14,12\%$). Plantas mutante *sog1* apresentaram a maior proporção de núcleos 4C ($\cong 51,15\%$) acompanhado por Col-0 ($\cong 49,13\%$), *cdkb1* ($\cong 44,68\%$) e *e2fb1* ($\cong 40,99\%$). Em relação aos núcleos 8C, o mutante *cdkb1* apresentou a maior porcentagem ($\cong 33,15\%$), seguido por *sog1* ($\cong 23,58\%$), *e2fb1* ($\cong 22,77\%$) e Col-0 ($\cong 21,95\%$). Em adição, o mutante *cdkb1* apresentou a maior porcentagem de núcleos 16C ($\cong 7,28\%$) seguido por *e2fb1*($\cong 5,18\%$), *sog1*($\cong 3,53\%$) e Col-0($\cong 3,02\%$). As proporções de núcleos 32C foram geralmente muito baixas, com o mutante *cdkb1* com a maior porcentagem ($\cong 0,77\%$) seguido por *e2fb1* ($\cong 0,54\%$), *sog1* ($\cong 0,23\%$) e Col-0, $\cong 0,18\%$ (Figura 7 B).

Em resposta ao As, houve uma redistribuição dos núcleos entre as ploidias. Assim, Col-0 apresentou a maior proporção de núcleos 2C ($\cong 27,84\%$) seguido por *e2fb1*, ($\cong 22,32\%$), *sog1*($\cong 20,75\%$) e *cdkb1* ($\cong 20,28\%$). Com efeito, *sog1* apresentou a maior porcentagem de núcleos 4C ($\cong 56,56\%$) acompanhado pelo mutante *cdkb1* ($\cong 56,37\%$), *e2fb1* ($\cong 52,08\%$) e Col-0 ($\cong 48,58\%$). As proporções de núcleos 8C foram mais similares e o mutante *cdkb1* ($\cong 21,31\%$), seguido por *e2fb1* ($\cong 21,28\%$), Col-0 ($\cong 20,86\%$) e *sog1* ($\cong 20,54\%$). Plantas mutante *e2fb1* apresentou a maior proporção de núcleos 16C ($\cong 3,80\%$), enquanto o Col-0 ($\cong 2,72\%$), *sog1* ($\cong 2,14\%$) e *cdkb1* ($\cong 2,04\%$) apresentaram valores mais baixos. Em presença de As, apenas o mutante *e2fb1* apresentou núcleos 32C ($\cong 0,54\%$), para os demais genótipos, *cdkb1*, *sog1* e Col-0 não se obteve núcleos com esse nível de endopoliploidia (Figura 7 B). Ao se comparar as condições controle com a de tratamento foi observado que todos os genótipos apresentaram redução nos diferentes graus de endopoliploidia em resposta ao As (Figura 7 B).

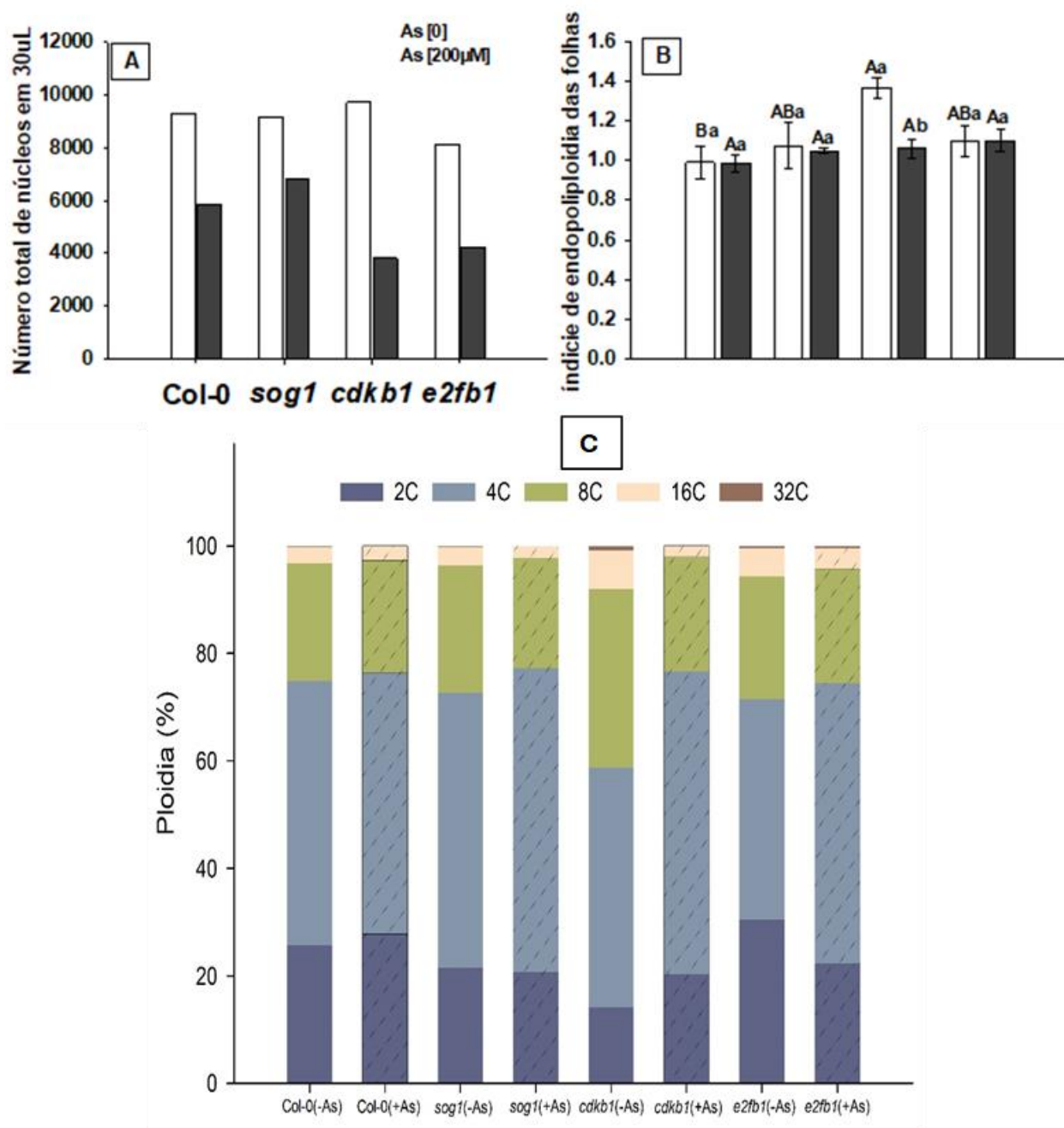


Figura 7: [A] Refere-se ao número total de núcleos das folhas contabilizados em 30µL. Foram utilizados 1cm das folhas de 3 rosetas de cada genótipo. [B] Refere-se ao índice de atividade celular ocorrente nos núcleos contabilizados em 1cm de folha. Onde, quanto maior o número do índice, maior a atividade de celular. [C] Refere-se a distribuição em percentagem do nível de endopoliploidia dos núcleos das folhas contabilizados.

3.5 Índice de endopoliploidia e genotóxicidade

Em relação ao índice de endopoliploidia das folhas observou-se que, em condições controle, o maior valor foi observado para o mutante *cdkb1*, diferindo-se significativamente dos demais genótipos. Sob condições de exposição ao As, os genótipos não apresentaram diferença estatística no índice de endopoliploidia (Figura 6). Ao se comparar as condições +As e -As, diferenças significativas foram

observadas somente para o mutante *cdkb1* revelando pequenos impactos do As sobre a endopoliploida (Figura 8).

Os efeitos genotóxicos em resposta ao As foram também investigados pelo ensaio cometa (Figura 7). De modo geral, tanto em condições controle quanto em presença de As, não foram observados danos genotóxicos em nenhum dos genótipos tanto na parte radicular quanto na parte aérea. Cabe ressaltar, no entanto, que em presença do As, somente plantas mutantes *e2fb1* apresentaram efeitos genotóxicos em resposta ao As nas folhas, verificados pelos limitados arrastes observados no ensaio realizado (Figura 7).

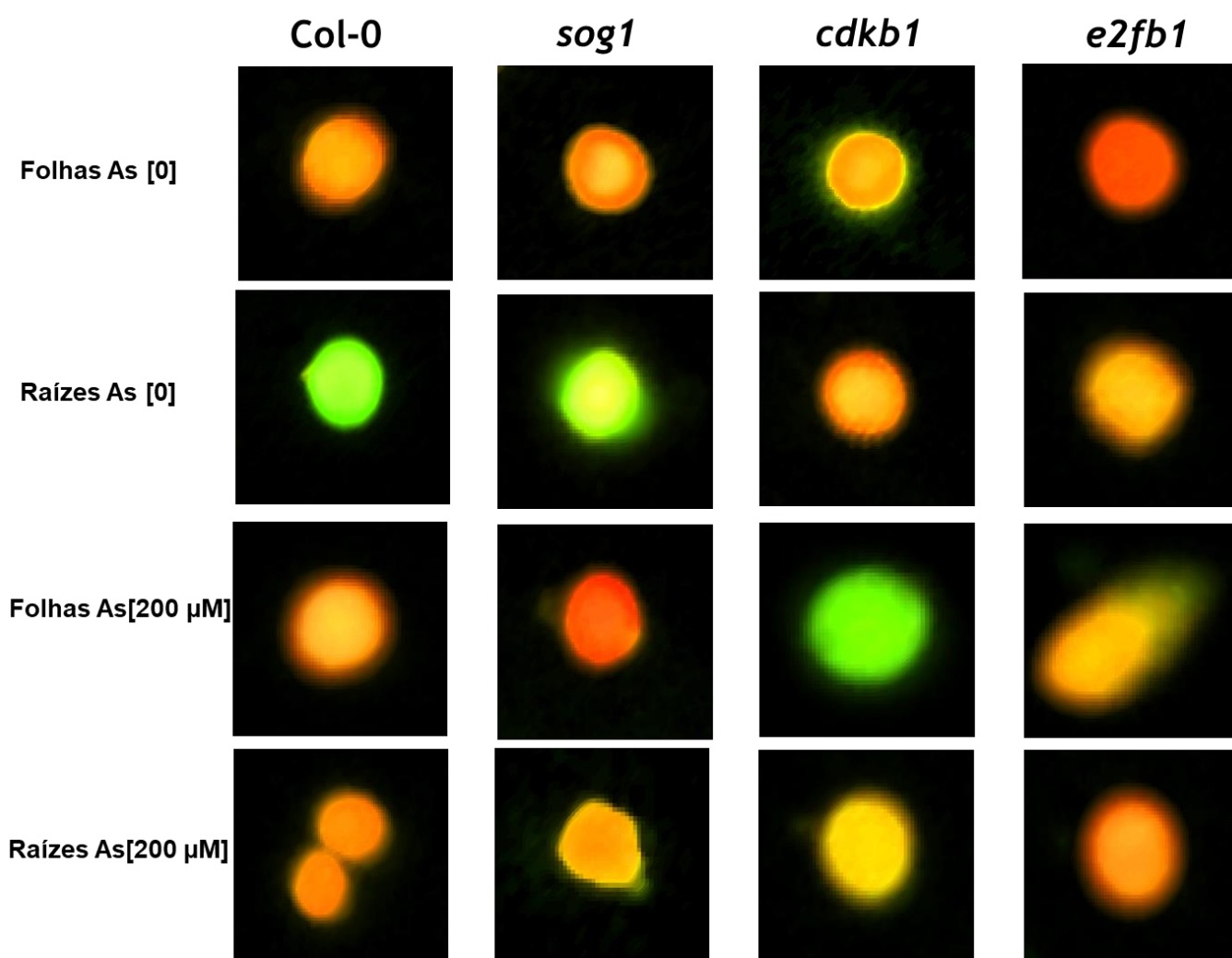


Figura 8: Representa os núcleos extraídos das folhas e raízes. Foram coletados 1cm de raiz e 1 cm de folha (dos ápices). Onde, núcleos íntegros possuem formação sem arraste ou calda, indicando integridade do genoma. Já núcleos que possuem arraste, indicam que houve danos a nível genômico. Se vez a necessidade de contraste de cores para melhor visualização dos núcleos, logo, independente das cores, todas as imagens são núcleos.

5. DISCUSSÃO

O sistema radicular e a arquitetura foliar das plantas, desempenham funções cruciais, aumentando a plasticidade das plantas, consequentemente, promovendo uma adaptabilidade fundamental para o seu crescimento e desenvolvimento (GIEHL et al., 2014; TIAN et al., 2014; RELLAN-ALVAREZ et al., 2016; OGURA et al., 2019). Em situações controle (As [0]) as plantas tiveram desenvolvimento pleno, destacando-se *sog1* em todos os parâmetros biométricos (Figura 1). Resultados semelhantes são discutidos por Nisa et al., 2023 relatando que, mutantes para *SOG1* e *E2FB* pouco se diferenciam fenotipicamente entre eles, bem como para *Col-0*. Já em duplos e triplos mutantes para *SOG1*, *EF2B* e *E2FA* (*sog1-e2fb1* e *sog1-e2fb-e2fa*) são praticamente letais para a planta, sugerindo que a perda *SOG1* e *E2FB1* paralelamente, limitam a capacidade de lidar com os estresses de replicação. Curiosamente, mutantes simples (somente em um alvo) não alterou a sensibilidade das plantas. Sugerindo que plantas com mutações em somente um dos componentes do DDR, conseguem lidar com o estresse de replicação (NISA et al., 2023). Para *CDK* (*cdkb1*), os mutantes tendem a ter uma menor biomassa comparados a *Col-0* (Figura 1). A ausência de um ponto chave para progressão do ciclo celular aparenta diminuir a biomassa e consequentemente tende a aumentar a endoreplicação, uma vez que a coordenação de expressão genica para indução do processo de mitose não ocorre (Jiang et al. 2022). Na presença do poluente (As[200µM]) todos os genótipos apresentaram drásticas reduções na biomassa (Figura 1). Os resultados apresentados condizem com a literatura, cujo um dos efeitos ocasionado por metais e metaloides, como o Arsênio (As) resulta na inibição do crescimento e desenvolvimento em plantas, uma vez que o As acarreta um desbalanço na biossíntese de auxina e consequentemente, afeta a comunicação existente entre na maquinária de transporte de auxina, via proteínas PIN, acarretando uma inibição do crescimento radicular (TU et al., 2021; YOON, LEE e NA.,2015; SCHMÖGER, OVEN e GRILL, 2000).

Em As [0], os genótipos apresentaram baixas marcação histoquímica para atividades de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em ambas as partes analisadas (folhas e raízes). A produção de ROS é necessária para a comunicação basal da maquinária celular para progressão do crescimento, no entanto, na presença do As, bem como para outros poluentes, acarreta um descontrole na produção de ROS (Figura 3) desfavorecendo a homeostase celular, bem como o crescimento vegetal (MANSOOR et al., 2024; MANSOOR et al., 2022; ZHANG et al., 2020). Uma vez que alta presença de ROS, induz à peroxidação lipídica, oxidação de proteínas,

inativação de enzimas, ácidos nucleicos e consequentemente morte celular (ANSARI et al., 2021).

O estresse oxidativo é um dos vários componentes que integra respostas ligadas a maquinaria celular. Peck & Mittler, 2020 discutem que os estresses bióticos e abióticos desencadeiam uma sinalização entre diferentes compartimentos da célula (citossol, mitocôndrias, cloroplastos e membrana plasmática) e essa sinalização é conectada via alterações hormonais, de ROS, metabolitos e por fim, uma regulação de expressão genética (LIU et al, 2020).

Baseado nisso, observa-se nos resultados que além do As impactar o crescimento, esse impacto resulta em diferentes respostas na produção dos metabolitos especializados como a prolina (Figura 2). A prolina fornece tolerância contra As, principalmente fornecendo osmorregulação, estabilizando macromoléculas e membranas celulares, mantendo o estado redox da célula e eliminando espécies reativas de oxigênio (ROS) por meio da estimulação de atividades de enzimas antioxidantes (SINHA et al., 2023). Os resultados sugerem que as plantas na ausência SOD1, investem mais em prolina como alternativa para ativação de enzimas da via de reparo do DNA, bem como para manutenção da maquinaria celular (SINHA et al., 2023)

Em *Arabidopsis thaliana*, amplamente é estudado que, o estresse oxidativo pode induzir alterações no metabolismo central sob diferentes condições de estresse afim de otimizar o fluxo de metabolitos, para lidar com estresses (SAVCHENKO, T., & TIKHONOV, K., 2023; OBATA et al., 2011).

Existe uma forte relação com aumento descontrolado na produção de ROS associado com o acúmulo de diferentes metabolitos que são refletidos em diferentes alterações, seja nos parâmetros biométricos (Figura 1) (redução da biomassa vegetal), bioquímicos (Figura 2) (alterações nos pigmentos, proteínas, aminoácidos, açúcares), paralisação do ciclo celular (Figura 5), bem como danos ao DNA (Figura 8) e morte celular. (SEVCENKO, T. & TIKHONOV, K., 2023; OBATA et al., 2011; Batista-Silva et al., 2019; Sevcenko et al., 2019; Shackelford et al., 2000).

Outro fator essencial para homeostase celular é a respiração, que tende aumentar em decorrência de estresses, bem como os resultados apresentados para respiração, que aumentou em decorrência da presença do As (Figura 4). O aumento da respiração em decorrência de estresses é bem estabelecida na literatura. A respiração celular é intensificada para fornecer ATP, que é essencial para o funcionamento de bombas iônicas e manutenção do potencial osmótico bem como

para suprimir o funcionamento da maquinaria celular (BATISTA-SILVA ET AL., 2019; ALIYARI RAD et al., 2022, CENTENO et al., 2011). Em conjunto, uma parte dos metabólitos produzidos pela respiração é desviada também para a produção de metabólitos especializados, como a prolina (Figura 2), que desempenham papéis importantes na defesa e neutralizando ROS em excesso durante o estresse (CENTENO et al., 2011).

Arelados, o aumento da respiração com o metabolismo (Figura 4 e 2), os intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) tendem a aumentar, como por exemplo, malato e fumarato (CENTENO et al., 2011; SWEETLOVE et al., 2019; LEHMANN et al., 2019). Os resultados encontrados na pesquisa mostram que para todos os genótipos houve um aumento dos intermediários, destacando-se *cdkb1* e *e2fb1* para malato e *cdkb1* para fumarato (Figura 2). Amplamente discutido na literatura, que aumento desses intermediários serve como substratos diretos para o TCA, bem como para outras diversas vias alternativas, portanto, esses intermediários apresentam uma dinâmica, que reflete nos processos de formação e consumo dos metabólitos provenientes da respiração celular e fotossíntese (DASTOGEER et al., 2017; ALIYARI RAD et al., 2022; OBATA et al., 2011; HILDEBRANDT et al., 2015).

Com essa dinâmica dos substratos no ciclo TCA, os açúcares estão envolvidos na regulação do (TCA), uma vez que o redirecionamento do fluxo de carbono para a via oxidativa da pentose fosfato pode acarretar mudanças no perfil de açúcares e carboidratos solúveis com propriedades antioxidantes. Que pode explicar o aumento significativo dos açúcares sob efeito do As (Figura 2). Em *Arabidopsis thaliana* foi sugerido que a sacarose, além de ser o principal açúcar transportado nas plantas, em conjunto a glicose e frutose, tem funções antioxidantes e regulações osmóticas, uma vez que, células de *Arabidopsis thaliana* após serem tratadas com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), resultou em um acúmulo desses açúcares (LEHMANN et al., 2009; CHEN & HOEHENWARTER, 2015; SIPARI et al., 2020; ISHIKAWA et al., 2010)

A síntese e o catabolismo de proteínas e aminoácidos são bem elucidados na literatura. Segundo Hildebrandt et al. 2015; Araújo et al. 2011, além de atuarem como as unidades monoméricas que constituem as proteínas, os aminoácidos desempenham um papel crucial em diversas reações celulares, agindo em inúmeros processos fisiológicos. Além de auxiliarem o crescimento e desenvolvimento das plantas, ajudam no controle do pH intracelular, participam na geração de energia metabólica e no equilíbrio do poder redox, além de incrementarem a resistência da

planta a estresses abióticos e bióticos. Os resultados para as concentrações de proteínas e aminoácidos (Figura 2), corroboram com a literatura, baseando-se em que para condições sem estresse as plantas tendem a acumular mais proteínas, em contrapartida, ocorre uma tendencia significativa de aumento dos aminoácidos. Com isso, o carbono dos aminoácidos é convertido em intermediários ou precursores do TCA, contribuindo também com as atividades do metabolismo mitocondrial auxiliando na homeostase energética (HILDEBRANDT et al., 2015)

É bem estabelecido na literatura, que os eventos relacionados a progressão do ciclo celular requerem ativações via energia, para sustentar o crescimento da célula, bem como o processo de divisão (SIQUEIRA ET AL., 2018; VAN'T HOF, 1966). Assim como existe uma sinalização para o status energético, é existente uma via de respostas de dano ao DNA (DDR). Em grande parte, o DDR e a progressão do ciclo celular andam de mãos dadas. Essa conexão é através de sinalizações via status energéticos (via Snrk1, TOR por exemplo), recrutamento de proteínas (ATM e ATR) bem como, complexos proteicos catalizadores de reações (CDKB), regulação de expressão de genes por fatores de transcrição de repressão (SOG1) e fatores de transcrição, como E2FB que induzem a continuidade do ciclo (Herbst, Li, & De Veylder, 2024 (SIQUEIRA et al., 2018; OGITA et al., 2018; WANG et al., 2020; BERCKMANS et al., 2011, BERCKMANS et al, 2009). Os mutantes *cdkb1* e *e2fb1* apresentaram as menores concentrações para todos os pigmentos (Clorofila a e B e Carotenoides). analisados em comparação a Col-0 e *sog1* (Figura 2). Os pigmentos presentes no cloroplasto, fazem desta organela, um importante sinalizador das mudanças ambientais, os cloroplastos são bastante sensíveis a danos no DNA induzidos por ROS que podem acarretar a disfunção da organela (HERBST, LI e DE VEYLDER, 2024; TRIPATHI, OLDENBURG e BENDICH, 2023; TRIPATHI, OLDENBURG e BENDICH, 2014). Uma menor concentração dos pigmentos (Figura 2), entende-se que as plantas mutantes para *cdkb1* e *e2fb1*, além de não terem fatores positivos para progressão do ciclo, elas têm o repressor *sog1*. Com isso, as plantas podem estar perdendo essa comunicação do status energético com a maquinaria do ciclo celular, junto a isso, potencializando o fator de transcrição *sog1* que induz genes de paralisação (*WEE1*) do ciclo celular, assim, reduzindo a biomassa mesmo em situações controle, em razão da não continuidade do ciclo celular (Figura 5)

Na presença do As, os genótipos apresentaram variadas respostas nos metabólitos, destacando-se os níveis aminoácidos (Figura 2). Reforçando que, os aminoácidos estão diretamente ligados em resposta a estresses, bem como auxiliam

na tolerância ao Arsênio. Os aminoácidos aparentemente atuam como substrato para a produção de açúcares, intermediários do TCA, proteínas onde esses metabolitos possivelmente estão sendo realocados para manutenção da continuidade do ciclo, bem como a integridade do genoma sob presença do As. (HILDEBRANDT et al. 2015; ARAÚJO et al. 2011; HERBST, LI E DE VEYLDER, 2024; SIQUEIRA et al., 2018; LEHMANN et al., 2012; CHEN & HOEHENWARTER, 2015)

Curiosamente, quando analisado o efeito genotóxico do As, somente o mutante *e2fb1* apresentou sensibilidade genotóxica ao poluente (Figura 6). É estudado que o DDR é ativado pelas quebras de fita dupla de DNA (DSBs) ou estresse de replicação. Essa quebra é reconhecida por ATM e ATR (Marechal e Zou, 2013). A partir da ativação coletiva entre ATM e ATR, fatores chave (E2Fs e SOG1) em processos regulatórios, compartilham alvos em comum (WEE1), desencadeando em uma cascata de sinalização ativando pontos de verificação, otimizados pela fosforilação das quinase dependente de ciclina do tipo B1 (CDKB1), com isso, induzem a parada do ciclo celular até que seja reparado o DNA danificado. (NISA et al., 2023; HERBST; LI; DE VEYLDER, 2024). É discutido que o SOG1 ajuda a superar os defeitos de replicação de plantas deficientes em *E2FA* / *E2FB*. No entanto, a perda de *E2FB* agrava o estresse de replicação acarretando por danos ao DNA (NISA et al., 2023; HERBST; LI; DE VEYLDER, 2024).

Outro ponto é que *E2FB* está fortemente associado aos complexos DREAM, um complexo proteico que está envolvido a repressão de genes ligados ao ciclo celular, assim auxiliando também na via de reparo (MAGYAR et al., 2016; LANG et al., 2021). Portanto, os resultados observados para efeitos genotóxicos do As para a concentração usada na pesquisa, sugere que a perda de *E2F* é mais prejudicial do que a perda de *SOG1* para a integridade do genoma. Uma vez que plantas que possuem *E2FB1* mativeram a integridade do genoma na condição de 200µM de As, bem como plantas que eram mutantes apenas para *CDKB1*.

Amplamente é estudado na literatura que o ciclo celular é dividido em G1, S e G2 e essas fases são dependentes do consumo de energia, onde fatores chave participam da regulação do ciclo, como as *CDKB1*, que regulam transições G1→S e G2→M. Bem como é presente fatores de transcrição que induzem a progressão do ciclo (*E2FB1*) e fatores de transcrição (*SOG1*) que induzem genes para paralização, como por exemplo o *WEE1* (HU et al, 2015; WANG et al., 2020; SAKAMOTO et al., 2018; BERCKMANS et al., 2011). É coerente que haja uma diminuição no número total de núcleos (Figura 5) em condições sob a presença do As, em especial para os

mutantes *cdkb1* e *e2fb1* com o menor número de núcleos. Uma vez que o metabolismo energético foi afetado consequentemente, a maquinária do ciclo celular não tem energia para suprir as atividades de divisão celular, assim paralisando o ciclo (WANG et al., 2020; SIQUEIRA et al., 2018). A discussão sobre a paralização do ciclo celular, torna-se mais coerente ao observamos índice de endopoliploidia (Figura 5), a varivel fornece a informação sobre o estado de ploidia do núcleo. Onde, as plantas mutantes para a CDKB1 são as que apresentam os maiores índices de endopoliploidia em situação controle.

A literatura aborda que, existem variadas formas de CDK, onde a do tipo B é exclusiva em plantas adicionalmente, CDKB possui um homólogo (CDKA), ambos atuam na transição das fases, $G1 \rightarrow S$ e $G2 \rightarrow M$. CDKA atuando na fosforilação de repressores do ciclo celular (E2Fc / DP / RBR), mais relacionados as fases a , $G1 \rightarrow S$ e CDKB1 fazendo um controle fino das CYCB1, proteínas relacionadas a trasição $G2 \rightarrow M$, consequentemente, regulando negativamente a endooreplicação, é explorado tambem que, em Arabidopsis, SOG1 regula diretamente a expressão dos CDK (CARNEIRO et al., 2021; INZÉ e De Veylder (2006); FERREIRA et al., 1991; SHIMOTOHNO et al. 2021; BANERJEE et al, 2020)

Com isso, entende-se que plantas mutantes de CDKB1, aparentemente, perdem essa regulação fina das CYB1, consequentemente, aumentando os endoclicos, fato este que não é ocorrente nos demais genótipos que possuem CDKB1 (Figura 5). Curiosamente, sob a presença do poluente, não ocorreu diferença entre no índice de endopoliploidia. Os resultados sugerem que a alteração o metabolismo energético alterado está sendo utilizado para manter atividades basais e reparo da maquinária celular, sem que ocorra divisão e endoreduplicação em decorrência da indisponibilidade de energia (INZÉ E DE VEYLDER, 2006)

6. CONCLUSÕES

O arsênio afeta o crescimento das plantas em decorrência do desbalanço energético, conseqüentemente, interrompe o ciclo celular para que os metabólitos produzidos, agora sejam remobilizados para a manutenção e continuidade da maquinaria já existente, sem que haja endoreduplicação. Com isso, a tolerância As apresentada pelos genótipos estudados, está mais relacionada com a plasticidade no realojamento dos metabolitos, do que com os reguladores do ciclo celular. Estudos adicionais como o monitoramento dos transcritos e verificação de anomalias no ciclo celular são de suma importância para melhor compreensão da comunicação da maquinaria energética com o ciclo celular.

7. REFERÊNCIAS

- AKLILU, Behailu B.; SODERQUIST, Ryan S.; CULLIGAN, Kevin M.** Genetic analysis of the Replication Protein A large subunit family in *Arabidopsis* reveals unique and overlapping roles in DNA repair, meiosis and DNA replication. *Nucleic Acids Research*, v. 42, n. 5, p. 3104–3118, 2014. Publicado online em: 13 dez. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1292>
- Aliyari Rad, S.; Dehghanian, Z.; Asgari Lajayer, B.; Nobaharan, K.; Astatkie, T.** Mitochondrial Respiration and Energy Production Under Some Abiotic Stresses. *Journal of Plant Growth Regulation*, 41: 3285-3299, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10512-1>
- Alvarenga, I. F. S.; dos Santos, F. E.; Silveira, G. L.; Andrade-Vieira, L. F.; Martins, G. C.; Guilherme, L. R. G.** Investigating arsenic toxicity in tropical soils: A cell cycle and DNA fragmentation approach. *Science of the Total Environment*, 698. 134272, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134272>
- ANSARI, Mohammad Israil; JALIL, Syed Uzma; ANSARI, Shamim Akhtar; HASANUZZAMAN, Mirza.** GABA shunt: a key-player in mitigation of ROS during stress. *Plant Growth Regulation*, v. 94, p. 131–149, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10725-021-00710-y>.
- Araújo, W. L.; Nunes-Nesi, A.; Fernie, A. R.** On the role of plant mitochondrial metabolism and its impact on photosynthesis in both optimal and sub-optimal growth conditions. *Photosynthesis Research*, 119(1–2): 141–156, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11120-013-9807-4>.
- Araújo, W. L.; Tohge, T.; Ishizaki, K.; Leaver, C. J.; Fernie, A. R.** Protein degradation – an alternative respiratory substrate for stressed plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 16(9): 489-498, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.05.007>
- Banerjee, G.; Singh, D.; Sinha, A. K.** Plant cell cycle regulators: Mitogen-activated protein kinase, a new regulating switch? *Plant Science*, 301: 110660, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110660>
- Batista-Silva, W.; Heinemann, B.; Rugen, N.; Nunes-Nesi, A.; Araújo, W. L.; Braun, H. P.; Hildebrandt, T. M.** The role of amino acid metabolism during abiotic stress release. *Plant, Cell & Environment*, 42(5): 1630-1644, 2019. <https://doi.org/10.1111/pce.13518>
- Berckmans, B.; De Veylder, L.** Transcriptional control of the cell cycle. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(5): 599–605, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.07.005>
- Berckmans, B.; Lammens, T.; Van Den Daele, H.; Magyar, Z.; Bögre, L.; De Veylder, L.** Light-Dependent Regulation of DEL1 Is Determined by the Antagonistic Action of E2Fb and E2Fc. *Plant Physiology*, 157(3): 1440–1451, 2011. <https://doi.org/10.1104/pp.111.183384>

BOUZIDI, Amal; KROUMA, Abdelmajid. Impact of lead and zinc heavy metal pollution on the growth and phytoremediation potential of *Sulla carnosa* in Sebkha el Kalbia, Tunisia. *Environmental Science and Pollution Research*. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-024-32350-w>

BRAAT, Jeanne; HAVAUX, Michel. The SIAMESE family of cell-cycle inhibitors in the response of plants to environmental stresses. *Frontiers in Plant Science*, v. 15, 15 fev. 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1362460>.

Carneiro, A. K.; Montessoro, P. F.; Fusaro, A. F.; Araújo, B. G.; Hemerly, A. S. Plant CDKs—Driving the Cell Cycle through Climate Change. *Plants*, 10(9): 1804, 2021. <https://doi.org/10.3390/plants10091804>

CASATI, Paula. E2F transcription factors and their complementary roles during DNA damage responses. *Molecular Plant*, v. 16, n. 9, p. 1373–1375, 4 set. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molp.2023.06.007>

Centeno, D. C.; Osorio, S.; Nunes-Nesi, A.; Bertolo, A. L. F.; Carneiro, R. T.; Araújo, W. L.; Steinhauser, M. C.; Michalska, J.; Rohrmann, J.; Geigenberger, P.; Oliver, S. N.; Stitt, M.; Carrari, F.; Rose, J. K. C.; Fernie, A. R. Malate plays a crucial role in starch metabolism, ripening, and soluble solid content of tomato fruit and affects postharvest softening. *The Plant Cell*, 23(1): 162–184, 2011. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.078691>

CHEN, Hanchen; PAN, Ting; ZHENG, Xueao; HUANG, Yongchi; WU, Chong; YANG, Tongbin; GAO, Shan; WANG, Lili; YAN, Shunping. The ATR–WEE1 kinase module promotes SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE 1 translation to activate replication stress responses. *The Plant Cell*, v. 35, n. 8, p. 3021–3034, ago. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1093/plcell/koad126>

Chen, Y.; Hoehenwarter, W. Changes in the Phosphoproteome and Metabolome Link Early Signaling Events to Rearrangement of Photosynthesis and Central Metabolism in Salinity and Oxidative Stress Response in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 169(4): 3021–3033, 2015. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01486>

Clark, R. B. Characterization of phosphatase of intact maize roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23(3): 458–460, 1975. <https://doi.org/10.1021/jf60199a002>

Coelho, D. G.; Marinato, C. S.; De Matos, L. P.; et al. Is arsenite more toxic than arsenate in plants? *Ecotoxicology*, 29(2): 196–202, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02152-9>

Dastogeer, K. M. G.; Li, H.; Sivasithamparam, K.; Jones, M. G. K.; Du, X.; Ren, Y.; Wylie, S. J. Metabolic responses of endophytic *Nicotiana benthamiana* plants experiencing water stress. *Environmental and Experimental Botany*, 143: 59–71, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.08.005>

ESCHBACH, Verena; KOBBE, Daniela. Different Replication Protein A Complexes of *Arabidopsis thaliana* Have Different DNA-Binding Properties as a Function of

Heterotrimer Composition. *Plant and Cell Physiology*, v. 55, n. 9, p. 1460–1472, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu076>

FENG, Jin-Ru; NI, Hong-Gang. Effects of heavy metals and metalloids on the biodegradation of organic contaminants. *Environmental Research*, v. 246, p. 118069, abr. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.118069>

Fernie, A. R.; Roscher, A.; Ratcliffe, R. G.; Kruger, N. J. Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta*, 212(2): 250-263, 19 Jan. 2001. <https://doi.org/10.1007/s004250000386>

Ferreira, P. C. G.; Hemerly, A. S.; Villarroel, R.; Van Montagu, M.; Inzé, D. The Arabidopsis Functional Homolog of the p34 cdc2 Protein Kinase. *The Plant Cell*, 3(5): 531-540, Maio 1991. <https://doi.org/10.2307/3869358>

Finnegan, P. M.; Chen, W. Arsenic toxicity: The effects on plant metabolism. *Frontiers in Physiology*, 3(June): 1–18, 2012. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00182>

Fioresi, V. S.; De Cássia Ribeiro Vieira, B.; De Campos, J. M. S.; Da Silva Souza, T. Cytogenotoxic activity of the pesticides imidacloprid and iprodione on *Allium cepa* root meristem. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(22): 28066–28076, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09201-5>

Fryer, M. J.; Oxborough, K.; Mullineaux, P. M.; Baker, N. R. Imaging of photo-oxidative stress responses in leaves. *Journal of Experimental Botany*, 53(372): 1249–1254, 2002. <https://doi.org/10.1093/jxb/53.372.1249>

GALANAKIS, Charis M. The future of food. *Foods*, v. 13, n. 4, p. 506, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods13040506>.

Giehl, R. F. H.; Gruber, B. D.; Von Wirén, N. It's time to make changes: modulation of root system architecture by nutrient signals. *Journal of Experimental Botany*, 65(3): 769-778, 2014. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert421>

GUERRA, Marcelo Braga Bueno; OLIVEIRA, Cynthia de; CARVALHO, Mariana Rocha de; SILVA, Aline Oliveira; ALVARENGA, Ingrid Fernanda Santana; BARBOSA, Marisângela Viana; FEITOSA, Marina Monteiro; PENIDO, Evanise Silva; SANTOS, Jessé Valentim dos; CARNEIRO, Marco Aurélio Carbone; BUNDSCHUH, Jochen; GUILHERME, Luiz Roberto Guimarães. Increased mobilization of geogenic arsenic by anthropogenic activities: The Brazilian experience in mining and agricultural areas. *Health*, v. 33, jun. 2023, art. 100472. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2023.100472>.

Herbst, J.; Li, Q.-Q.; De Veylder, L. Mechanistic insights into DNA damage recognition and checkpoint control in plants. *Nature Plants*, 2024. <https://doi.org/10.1038/s41477-024-01652-9>

HERBST, Josephine; LI, Qian-Qian; DE VEYLDER, Lieven. Mechanistic insights into DNA damage recognition and checkpoint control in plants. *Nature Plants*, 19 mar. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41477-024-01652-9>

Hildebrandt, T. M.; Nunes Nesi, A.; Araújo, W. L.; Braun, H.-P. Amino Acid Catabolism in Plants. *Molecular Plant*, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.09.005>

Hu, Z.; Cools, T.; Kalhorzadeh, P.; Heyman, J.; Veylder, L. Deficiency of the Arabidopsis helicase RTEL1 triggers a SOG1-dependent replication checkpoint in response to DNA cross-links. *Plant Cell*, 27(1): 149–161, 2015. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.134312>

Indriolo, E.; Na, G.; Ellis, D.; Salt, D. E.; Banks, J. A. A vacuolar arsenite transporter necessary for arsenic tolerance in the arsenic hyperaccumulating fern *Pteris vittata* is missing in flowering plants. *The Plant Cell*, 22: 2045–2057, June 2010. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.069773>

Inzé, D.; De Veylder, L. Cell cycle regulation in plant development. *Annual Review of Genetics*, 40: 77-105, 2006. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.40.110405.090431>

Ishikawa, T.; Takahara, K.; Hirabayashi, T.; Matsumura, H.; Fujisawa, S.; Terauchi, R.; Uchimiya, H.; Kawai-Yamada, M. Metabolome Analysis of Response to Oxidative Stress in Rice Suspension Cells Overexpressing Cell Death Suppressor Bax Inhibitor-1. *Plant and Cell Physiology*, 51(1): 9–20, 2010. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp162>

Jiang, S.; Wei, J.; Li, N.; Wang, Z.; Zhang, Y.; Xu, R.; Zhou, L.; Huang, X.; Wang, L.; Guo, S.; Wang, Y.; Song, C.; Qian, W.; Li, Y. The UBP14-CDKB1;1-CDKG2 cascade controls endoreduplication and cell growth in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 34(7): 1308-1325, 2022. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac002>

JIANG, Zhishu; WANG, Xin; ZHOU, Zhiwei; PENG, Limei; LIN, Xiaoli; LUO, Xiaowei; SONG, Yongping; NING, Huaying; GAN, Cong; HE, Xiaopeng; ZHU, Changlan; OUYANG, Linjuan; ZHOU, Dahui; CAI, Yicong; XU, Jie; HE, Haohua; LIU, Yantong. Functional characterization of D-type cyclins involved in cell division in rice. *BMC Plant Biology*, v. 24, p. 157, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12870-024-04828-9>

Khalid, S.; Shahid, M.; Niazi, N. K.; Murtaza, B.; Bibi, I.; Dumat, C. A comparison of technologies for remediation of heavy metal contaminated soils. *Journal of Geochemical Exploration*, 182: 247–268, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2016.11.021>

Lang, L.; Pettkó-Szandtner, A.; Elbasi, H. T.; Takatsuka, H.; Nomoto, Y.; Zaki, A.; Dorokhov, S.; De Jaeger, G.; Eeckhout, D.; Ito, M.; Magyar, Z.; Bögre, L.; Heese, M.; Schnittger, A. The DREAM complex represses growth in response to DNA damage in Arabidopsis. *Life Science Alliance*, 28 Sept. 2021. <https://doi.org/10.26508/lsa.202101141>

Lehmann, M.; Laxa, M.; Sweetlove, L. J.; Fernie, A. R.; Obata, T. Metabolic recovery of Arabidopsis thaliana roots following cessation of oxidative stress. *Metabolomics*, 8(2): 143-153, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11306-011-0312-2>

Lehmann, M.; Schwarzländer, M.; Obata, T.; Laxa, M.; Sirikantaramas, S.; Burrow, M.; Olsen, C. E.; Tohge, T.; Fricker, M. D.; Møller, B. L.; Fernie, A. R.; Sweetlove,

L. J. The Metabolic Response of Arabidopsis Roots to Oxidative Stress is Distinct from that of Heterotrophic Cells in Culture and Highlights a Complex Relationship between the Levels of Transcripts, Metabolites, and Flux. *Molecular Plant*, 2(3): 390-406, 2009. <https://doi.org/10.1093/mp/ssn080>

LIN, Hai; WANG, Ziwei; LIU, Chenjing; DONG, Yingbo. Technologies for removing heavy metal from contaminated soils on farmland: A review. *Chemosphere*, v. 305, p. 135457, out. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135457>

Lisec, J.; Schauer, N.; Kopka, J.; Willmitzer, L.; Fernie, A. R. Gas chromatography-mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols*, 1(1): 387–396, 2006. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.59>

Liu, Q.; Liu, M.; Wu, S.; Xiao, B.; Wang, X.; Sun, B.; Zhu, L. Metabolomics reveals antioxidant stress responses of wheat (*Triticum aestivum* L.) exposed to chlorinated organophosphate esters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(6): 6520-6529, 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02430>

Magyar, Z.; Bögre, L.; Ito, M. DREAMs make plant cells to cycle or to become quiescent. *Current Opinion in Plant Biology*, 34: 100-106, Dec. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.09.005>

Mansoor, S.; Ali, A.; Kour, N.; Bornhorst, J.; Alharbi, K.; Rinklebe, J.; El Moneim, D. A.; Ahmad, P.; Chung, Y. S. Heavy Metal Induced Oxidative Stress Mitigation and ROS Scavenging in Plants. *Plants*, 12(6): 3003, 2024. <https://doi.org/10.3390/plants12063003>

Mansoor, S.; Wani, O. A.; Lone, J. K.; Manhas, S.; Kour, N.; Alam, P.; Ahmad, A.; Ahmad, P. Reactive oxygen species in plants: From source to sink. *Antioxidants (Basel)*, 11(2): 225, 2022. <https://doi.org/10.3390/antiox11020225>

Maréchal, A.; Zou, L. DNA Damage Sensing by the ATM and ATR Kinases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(9): a012716, 2013. <https://doi.org/10.1101/cshperspecta012716>

Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3): 473–497, 1962. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

Nisa, M. U.; Huang, Y.; Benhamed, M.; Raynaud, C. The plant DNA damage response: Signaling pathways leading to growth inhibition and putative role in response to stress conditions. *Frontiers in Plant Science*, 10(May): 1–12, 2019. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00653>

Nisa, M.; Eekhout, T.; Bergis, C.; Pedroza-Garcia, J. A.; He, X.; Mazubert, C.; Vercauteren, I.; Cools, T.; Brik-Chaouche, R.; Drouin-Wahbi, J.; Chmaiss, L.; Latrasse, D.; Bergounioux, C.; Vandepoele, K.; Benhamed, M.; De Veylder, L.; Raynaud, C. Distinctive and complementary roles of E2F transcription factors during plant replication stress responses. *Molecular Plant*, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2023.07.002>

Nunes-Nesi, A.; Brito, D. S.; Inostroza-Blancheteau, C.; Fernie, A. R.; Araújo, W. L. The complex role of mitochondrial metabolism in plant aluminum resistance. *Trends in Plant Science*, 19(6): 399–407, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.12.006>

Nunes-Nesi, A.; Fernie, A. R.; Stitt, M. Metabolic and signaling aspects underpinning the regulation of plant carbon nitrogen interactions. *Molecular Plant*, 3(6): 973–996, 2010. <https://doi.org/10.1093/mp/ssq049>

Obata, T.; Matthes, A.; Koszior, S.; Lehmann, M.; Araújo, W. L.; Bock, R.; Sweetlove, L. J.; Fernie, A. R. Alteration of mitochondrial protein complexes in relation to metabolic regulation under short-term oxidative stress in Arabidopsis seedlings. *Phytochemistry*, 72(10): 1081-1091, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.11.003>

Ogita, N.; Okushima, Y.; Tokizawa, M.; Yamamoto, Y. Y.; Tanaka, M.; Seki, M.; Makita, Y.; Matsui, M.; Okamoto-Yoshiyama, K.; Sakamoto, T.; Kurata, T.; Hiruma, K.; Saijo, Y.; Takahashi, N.; Umeda, M. Identifying the target genes of SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE 1, a master transcription factor controlling DNA damage response in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 94(4): 439–453, 2018. <https://doi.org/10.1111/tpj.13866>

Ogura, T.; Goeschl, C.; Filiault, D.; Wolhrab, B.; Satbhai, S. B.; Busch, W. Root system depth in Arabidopsis is shaped by EXOCYST70A3 via the dynamic modulation of auxin transport. *Cell*, 178(2): 400-412.e16, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.06.021>

Peck, S.; Mittler, R. Plant signaling in biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 71(5): 1649–1651, 2020. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa051>

Praça-Fontes, M. M.; Carvalho, C. R.; Clarindo, W. R.; Cruz, C. D. Revisiting the DNA C-values of the genome size-standards used in plant flow cytometry to choose the “best primary standards.” *Plant Cell Reports*, 30(7): 1183–1191, 2011. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1026-x>

Quadros, I. P. S.; Madeira, N. N.; Loriato, V. A. P.; et al. Cadmium-mediated totradexicity in plant cells is associated with the DCD/NRP-mediated cell death response. *Plant Cell and Environment*, 45(2): 556–571, 15 Feb. 2021. <https://doi.org/10.1111/pce.14218>

RAD, Shiva Aliyari; DEGHANIAN, Zahra; LAJAYER, Behnam Asgari; NOBAHARAN, Khatereh; ASTATKIE, Tess. Mitochondrial respiration and energy production under some abiotic stresses. *Journal of Plant Growth Regulation*, v. 41, p. 3285–3299, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10481-4>.

Rellán-Álvarez, R.; Lobet, G.; Dinneny, J. R. Environmental control of root system biology. *Annual Review of Plant Biology*, 67: 619-642, 2016. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-111848>

SABLOWSKI, Robert; GUTIERREZ, Crisanto. Cycling in a crowd: Coordination of plant cell division, growth, and cell fate. *The Plant Cell*, v. 34, n. 1, p. 193–208, jan. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1093/plcell/koab222>

SAKAMOTO, Ayako N.; SAKAMOTO, Tomoaki; YOKOTA, Yuichiro; TERANISHI, Mika; YOSHIYAMA, Kaoru O.; KIMURA, Seisuke. SOG1, a plant-specific master regulator of DNA damage responses, originated from nonvascular land plants. *Plant Direct*, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/pld3.370>.

Sakamoto, Ayako N.; Sakamoto, Tomoaki; Yokota, Yuichiro; Teranishi, Mika; Yoshiyama, Kaoru O.; Kimura, Seisuke. SOG1, um regulador mestre específico da planta das respostas a danos no DNA, originou-se de plantas terrestres não vasculares. *Plant Direct*, 2021. <https://doi.org/10.1002/pld3.370>

Savchenko, T.; Tikhonov, K. Oxidative Stress-Induced Alteration of Plant Central Metabolism. *Life*, 13(1): 100, 2023. <https://doi.org/10.3390/life13010100>

Schmöger, M. E. V.; Oven, M.; Grill, E. Detoxification of arsenic by phytochelatins in plants. *Plant Physiology*, 122: 793–801, 2000. <https://doi.org/10.1104/pp.122.3.793>

Shackelford, R. E.; Kaufmann, W. K.; Paules, R. S. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(9): 1387-1404, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00224-0](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00224-0)

SHAJI, E.; SANTOSH, M.; SARATH, K. V.; PRAKASH, Pranav; DEEPCHAND, V.; DIVYA, B. V. Arsenic contamination of groundwater: a global synopsis with focus on the Indian Peninsula. *Geoscience Frontiers*, v. 12, n. 3, p. 101079, maio 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gsf.2020.08.015>.

Shimotohno, Akie; Aki, Shiori S.; Takahashi, Naoki; Umeda, Masaaki. Regulation of the Plant Cell Cycle in Response to Hormones and the Environment. *Annual Review of Plant Biology*, 72: 273-296, 2021. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-080720-103739>

SINHA, Dwaipayan; DATTA, Soumi; MISHRA, Reema; AGARWAL, Preeti; KUMARI, Tripti; ADEYEMI, Sherif Babatunde; MAURYA, Arun Kumar; GANGULY, Sharmistha; ATIQUE, Usman; SEAL, Sanchita; GUPTA, Laxmi Kumari; CHOWDHURY, Shahana; CHEN, Jen-Tsung. Negative Impacts of Arsenic on Plants and Mitigation Strategies. *Plants*, v. 12, n. 9, p. 1815, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants12091815>.

Sipari, N.; Lihavainen, J.; Shapiguzov, A.; Kangasjärvi, J.; Keinänen, M. Primary Metabolite Responses to Oxidative Stress in Early-Senescing and Paraquat Resistant *Arabidopsis thaliana* rcd1 (Radical-Induced Cell Death1). *Frontiers in Plant Science*, 11: 194, 2020. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00194>

Siqueira, J. A.; Hardoim, P.; Ferreira, P. C. G.; Nunes-Nesi, A.; Hemerly, A. S. Unraveling interfaces between energy metabolism and cell cycle in plants. *Trends in Plant Science*, 23(8): 731-747, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.05.00>

SIQUEIRA, João Antonio; HARDOIM, Pablo; FERREIRA, Paulo C. G.; NUNES-NESEI, Adriano; HEMERLY, Adriana S. Unraveling Interfaces between Energy Metabolism and Cell Cycle in Plants. *Trends in Plant Science*, v. 23, n. 8, p. 731–747, ago. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.05.005>

Sweetlove, L. J.; Lytovchenko, A.; Morgan, M.; Nunes-Nesi, A.; Taylor, N. L.; Baxter, C. J.; Eickmeier, I.; Fernie, A. R. Mitochondrial uncoupling protein is required for efficient photosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(51): 19587-19592, 2006. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607751103>

Teixeira, M. C.; Santos, A. C.; Fernandes, C. S.; Ng, J. C. Arsenic contamination assessment in Brazil – Past, present and future concerns: A historical and critical review. *Science of the Total Environment*, 730: 138217, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138217>

TEIXEIRA, Mônica Cristina; SANTOS, Alcylane Caldeira; FERNANDES, Carla Silva; NG, Jack Chakmeng. Arsenic contamination assessment in Brazil – Past, present and future concerns: A historical and critical review. *Science of The Total Environment*, v. 730, 15 ago. 2020, art. 138217. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138217>.

Thordal-Christensen, H.; Zhang, Z.; Wei, Y.; Collinge, D. B. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *The Plant Journal*, 11(6): 1187–1194, 1997. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113X.1997.11061187.x>

Tian, H.; De Smet, I.; Ding, Z. Shaping a root system: regulating lateral versus primary root growth. *Trends in Plant Science*, 19(7): 426-431, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.01.007>

Tomaz, T.; Bagard, M.; Pracharoenwattana, I.; et al. Mitochondrial malate dehydrogenase lowers leaf respiration and alters photorespiration and plant growth in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 154(3): 1143–1157, 2010. <https://doi.org/10.1104/pp.110.161612>

Tripathi, Diwaker; Oldenburg, Delene J.; Bendich, Arnold J. Changes in DNA damage, molecular integrity, and copy number for plastid DNA and mitochondrial DNA during maize development. *Journal of Experimental Botany*, 65(22): 6425–6439, Dec. 2014. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru359>

Tripathi, Diwaker; Oldenburg, Delene J.; Bendich, Arnold J. Oxidative and glycation damage to mitochondrial DNA and plastid DNA during plant development. *Antioxidants (Basel)*, 12(4): 891, Apr. 2023. <https://doi.org/10.3390/antiox12040891>

Tu, Tianli; Zheng, Shuangshuang; Ren, Panrong; Meng, Xianwen; Zhao, Jiuhai; Chen, Qian; Li, Chuanyou. Coordinated cytokinin signaling and auxin biosynthesis mediates arsenate-induced root growth inhibition. *Plant Physiology*, 185(3): 1166-1181, 2021. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiaa072>

Van't Hof, J. Experimental control of DNA synthesizing and dividing cells in excised root tips of Pisum. *American Journal of Botany*, 53(9): 1049-1055, 1966. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1966.tb06860.x>

Wang, K.; Ndathe, R. W.; Kumar, N.; Zeringue, E. A.; Kato, N.; Larkin, J. C. The CDK Inhibitor SIAMESE Targets Both CDKA;1 and CDKB1 Complexes to Establish

Endoreplication in Trichomes. *Plant Physiology*, 184(1): 165–175, 2020. <https://doi.org/10.1104/pp.20.00271>

Wang, Kai; Ndathe, Ruth W.; Kumar, Narender; Zeringue, Elizabeth A.; Kato, Naohiro; Larkin, John C. The CDK Inhibitor SIAMESE Targets Both CDKA;1 and CDKB1 Complexes to Establish Endoreplication in Trichomes. *Plant Physiology*, 184(1): 165-175, 2020. <https://doi.org/10.1104/pp.20.00271>

Yoon, Youngdae; Lee, Woo-Mi; An, Youn-Joo. Phytotoxicity of arsenic compounds on crop plant seedlings. *Environmental Science and Pollution Research*, 22: 11047–11056, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4317-x>

Zhang, H.; Li, X.; Xu, Z.; et al. Toxic effects of heavy metals Pb and Cd on mulberry (*Morus alba* L.) seedling leaves: Photosynthetic function and reactive oxygen species (ROS) metabolism responses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 195: 110469, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110469>

Zhang, H.; Li, X.; Xu, Z.; Wang, Y.; Teng, Z.; An, M.; Zhang, Y.; Zhu, W.; Xu, N.; Sun, G. Toxic effects of heavy metals Pb and Cd on mulberry (*Morus alba* L.) seedling leaves: Photosynthetic function and reactive oxygen species (ROS) metabolism responses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 195: 110469, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110469>