

REGIANE KELLY GONZAGA E SILVA

**A SINALIZAÇÃO DIFERENCIAL DE AUXINA MEDIADA POR *DIAGEOTROPICA*
E *ENTIRE* MODULA A TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM TOMATE (*Solanum*
lycopersicum L.)**

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

Orientador: Wagner L. Araújo
Coorientadora: Auxiliadora O. Martins

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2020**

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

T

S586s
2020
Silva, Regiane Kelly Gonzaga e, 1994-
A sinalização diferencial de auxina mediada por
diageotropica e entire modula a tolerância ao alumínio em
tomate (*Solanum lycopersicum* L.) / Regiane Kelly Gonzaga e
Silva. – Viçosa, MG, 2020.
53 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Wagner Luiz Araújo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.46-52.

1. Hormônios vegetais. 2. Raízes (Botânica) - Crescimento.
3. Metabolismo. 4. Alumínio. 5. Solos ácidos. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa
de Pós-Graduação em Botânica. II. Título.

CDD 22. ed. 575.76

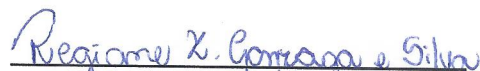
REGIANE KELLY GONZAGA E SILVA

A SINALIZAÇÃO DIFERENCIAL DE AUXINA MEDIADA POR *DIAGEOTROPICA*
E *ENTIRE* MODULA A TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM TOMATE (*Solanum*
lycopersicum L.)

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

APROVADA: 13 de novembro de 2020.

Assentimento:


Regiane Kelly Gonzaga e Silva
Autora


Wagner L. Araújo
Orientador

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por me conceder saúde e força necessária para encerrar esse ciclo. Pela sua luz divina, me guiando em todos os momentos que julguei impossíveis, não me permitindo desistir diante das dificuldades encontradas ao longo do caminho. Grata pelas pessoas iluminadas que colocou em minha vida por compartilharem comigo essa trajetória.

Em especial, minha **família**, pai e mãe, pelo amor incondicional de sempre, por nunca medirem esforços para minha formação e realizações dos meus sonhos. Aos meus irmãos, Lidiane e Cristiano, por me proporcionarem tranquilidade e conforto sempre com palavras de incentivos e carinho. Sem vocês ao meu lado nada disso se tornaria possível! A Vivi e Hugo, por todo carinho e incentivo, minha querida tia Eliane, por estar sempre tão presente em minha vida apoiando meus sonhos. Ao meu avô, Sr. João (*in memoriam*), foi nada fácil perdê-lo no meio dessa trajetória, minha eterna gratidão por ter sido sempre meu exemplo de inspiração e força.

A todos os meus **amigos**, em especial, João, Gabriel “privi”, Robson, Marcelle e Roberto, além da amizade e momentos de cafés no laboratório, me auxiliaram na realização dos experimentos, sempre com disposição e alegria. Ao grupo das “Sandy’s”: Fran, Pablo e Karla, obrigada pelo companheirismo e pela amizade sincera e linda que construímos. Ao Joninhas, pela amizade, apoio, paciência, risadas, conselhos e conhecimentos compartilhados que, principalmente no final dessa etapa, foram essenciais para eu chegar até aqui, feliz com toda essa experiência. Ao meu amigo, Christian, com suas palavras de incentivo e orgulho que sempre me encorajou nos momentos de desespero, agradeço por continuar se fazendo tão presente e contribuindo na realização das minhas conquistas.

Ao meu **orientador**, Prof. Wagner, pela competência, profissionalismo, por ter sido sempre tão compreensível e humano, acima de tudo, em todos os momentos que precisei. Gratidão por compartilhar sua sabedoria, seu tempo e, principalmente, pela confiança dedicada a mim para a realização desse trabalho.

Ao Willian, por ter sido sempre tão solícito, auxiliando diretamente na elaboração e realização desse trabalho, por todo conhecimento e experiências compartilhadas durante essa minha trajetória acadêmica.

A todos os **professores**, em especial, Aristeia e Wellington, pela parceria e suporte nas análises de anatomia e citometria de fluxo. Ao Prof. Cleberson, pela disponibilização da sala de crescimento e materiais para realização dos experimentos.

A banca examinadora, Prof. Adriano e Willian, por aceitarem o convite e pelas contribuições no trabalho.

A **CAPES**, pela concessão do apoio financeiro. Este trabalho foi parcialmente financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001.

E a todos colegas da UCP, e demais amigos e familiares, que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desse trabalho.

Minha gratidão!

RESUMO

SILVA, Regiane Kelly Gonzaga e, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2020. **A sinalização diferencial de auxina mediada por *diageotropica* e *entire* modula a tolerância ao alumínio em tomate (*Solanum lycopersicum* L.).** Orientador: Wagner Luiz Araújo. Coorientadora: Auxiliadora Oliveira Martins.

Solos ácidos ($\text{pH} \leq 5,5$), associados a limitações nutricionais e hídricas são as maiores restrições à produção agrícola. Em solos ácidos o alumínio (Al) destaca-se como um dos maiores problemas por se encontrar solubilizado em sua forma catiônica rizotóxica Al^{3+} . Essa forma, tóxica para a maioria das plantas, leva à inibição do alongamento radicular e, conseqüentemente, reduz a absorção de água e nutrientes. A auxina é um hormônio vegetal de importância crucial para diferentes aspectos do crescimento vegetal, apresentando influência direta no crescimento radicular. Tem sido demonstrado também que a inibição do crescimento radicular modulada por Al parece interagir com as vias de sinalização de auxina. Nesse contexto, a modulação das vias de biossíntese e/ou sinalização de auxina apresenta-se como uma oportunidade para modular o desempenho vegetal em resposta ao Al^{3+} . Assim, o papel da percepção/sinalização diferencial de auxina em respostas à toxicidade por Al foi investigado em tomateiro (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom). Para tanto, plantas com baixa percepção de auxina, *diageotropica* (*dgt*) e com sinalização aumentada de auxina, *entire* (*AUX/IAA9*), foram submetidas a diferentes doses de Al^{3+} (25 e 100 μM) e sua resposta analisada em detalhes. Foi possível observar que a redução na percepção de auxina (*dgt*) levou a uma maior sensibilidade ao Al, ao passo que o aumento na sinalização (*entire*) promoveu uma maior tolerância ao Al^{3+} . Tais respostas foram mediadas, em larga extensão, por mudanças no metabolismo central, observadas por alterações na capacidade de usar reservas (e.g. açúcares, proteínas e aminoácidos) que, em última instância, afetaram o crescimento radicular. Plantas *entire* (tolerantes ao Al^{3+}) foram caracterizados por pequenos distúrbios no metabolismo central (e.g. fotossíntese e respiração), ao passo que plantas selvagem (Micro-Tom) e *dgt* (genótipos sensíveis Al^{3+}) foram caracterizadas por impactos significativos no metabolismo primário e no ciclo celular após exposição ao Al. Os resultados aqui obtidos sugerem que a modulação das vias de sinalização de auxina pode, portanto, fornecer uma oportunidade para melhorar o desempenho de culturas de importância agrícola em resposta ao estresse por Al^{3+} , e que as alterações

fisiológicas e metabólicas observadas parecem estar relacionadas, em larga escala, com a disponibilidade de energia para o reparo do DNA e o ciclo celular.

Palavras-chave: Hormônios vegetais. Crescimento radicular. Metabolismo central. Toxidez.

ABSTRACT

SILVA, Regiane Kelly Gonzaga e, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2020. **Differential auxin signaling mediated by *diageotropica* and *entire* modulates aluminum tolerance in tomato (*Solanum lycopersicum* L.)**. Adviser: Wagner Luiz Araújo. Co-adviser: Auxiliadora Oliveira Martins.

Acidic soils ($\text{pH} \leq 5,5$) promote the release of aluminum (Al) cation, imposing serious constraints for root development in farmland soils around the world by impairing not only nutrient and water uptake but also compromising food safety in developing countries. Auxin, an important phytohormone for different aspects of plant growth, play a key role on the regulation of root growth. It has been also demonstrated that Al-inhibition of root growth interact with auxin signaling pathways. Thus, the modulation of the auxin signaling pathways provide an opportunity to modify plant performance in response to Al^{3+} . Here, I investigated the role of differential auxin perception/signaling in response to Al in tomato plants (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom). To this end, plants with either increased (*entire*) or reduced (*diageotropica* - *dgt*) auxin signaling were submitted to different doses of Al^{3+} (25 and 100 μM) in an attempt to investigate the connections between auxin signaling and Al responses. It was observed that the reduced auxin perception (*dgt*) led to a higher Al sensitivity, whereas the increased signaling (*entire*) culminated with higher Al tolerance. Such responses were largely mediated by changes in central metabolism as revealed by the alterations in the ability to mobilize reserves (e.g. sugars, proteins, and amino acids) that, ultimately, negatively impacted root growth. *Entire* mutant plants (Al tolerant) were characterized by minor disturbances in central metabolism (e.g. photosynthesis and respiration), whereas wild type plants (Micro-Tom) and *dgt* (Al sensitive genotypes) were characterized by significant impacts in both central metabolism and cell cycle following Al stress. The results obtained suggest that the modulation of auxin signaling pathways may provide an opportunity to improve crop performance in response to Al stress. Furthermore, both physiological and metabolic changes observed following Al stress are seemingly related to the energy availability for DNA repair and cell cycle.

Keywords: Plant hormones. Root growth. Central metabolism. Toxicity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. MATERIAIS E MÉTODOS	14
2.1. Material vegetal e condições de cultivo	14
2.2. Crescimento radicular	15
2.3. Ensaio histoquímico de hematoxilina	15
2.4. Ensaio anatômico e histolocalização do Al	15
2.5. Parâmetros fotossintéticos	16
2.6. Análises de metabólitos e ensaios bioquímicos	16
2.7. Ensaio histoquímico do estresse oxidativo (ROS).....	17
2.8. Ensaio de citometria de fluxo.....	17
2.9. Análises estatísticas	18
3. RESULTADOS	19
3.1. Alterações no crescimento radicular em resposta ao estresse por Al..	19
3.2. Acúmulo diferencial de Al nas raízes de plantas jovens em mutantes da sinalização por auxina.....	22
3.3. Alterações na anatomia de raiz de genótipos com sinalização diferencial a auxina em resposta ao Al	24
3.4. O estresse por Al afeta parâmetros de trocas gasosas.....	26
3.5. Impactos do Al no metabolismo plantas com sinalização diferencial de auxina.....	28
3.6. Alterações na coloração histoquímica de ROS em genótipos de plantas de tomate sob estresse por Al	35
3.7. Influência do Al no ciclo celular em genótipos de planta de tomate	37
4. DISCUSSÃO	39
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
APÊNDICE	53

1. INTRODUÇÃO

Ao longo da história da humanidade, o estabelecimento das civilizações deu-se, preferencialmente, em regiões com solos férteis de modo a possibilitar a produção de alimentos. Entretanto, com o intenso uso destes solos e pelo acentuado crescimento populacional, novas civilizações foram estabelecidas em regiões com solos de baixa fertilidade. Tal fato foi devido, dentre outros fatores, a possibilidade de correção de solos ácidos com o uso de calcário. Neste contexto, em solos ácidos ($\text{pH} \leq 5,5$) e sem a aplicação de calcário, é frequente a solubilização de cátions de alumínio (Al^{3+}), os quais são responsáveis por reduzir a absorção de água e nutrientes pelas raízes das plantas (KOCHIAN et al., 2015; NUNES-NESI et al., 2014). Registre-se que o Al^{3+} é um elemento reconhecido pelos seus diversos efeitos tóxicos e causador da redução da produção agrícola. Isso ocorre, pois, a presença de Al^{3+} disponível promove a inibição do crescimento radicular (BORGIO et al., 2020). Registre-se que os primeiros danos são causados no apoplasto, onde o alongamento celular é inibido devido à ligação do Al^{3+} às paredes celulares da rizoderme e à parte externa do córtex radicular, induzindo o endurecimento e impedindo essas células de realizar o processo de remodelação, necessário para o alongamento celular (KOPITTKKE et al., 2015). Cumpre mencionar também que a presença de Al^{3+} promove não apenas a inibição do crescimento radicular, mas também uma redução na eficiência de absorção de água e nutrientes (e.g. cátions Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , e NH_4^+), além de induzir danos às membranas celulares e alterações enzimáticas (BORGIO et al., 2020). Em adição, o estresse por Al^{3+} altera, diretamente e de forma irreversível, a estrutura física do DNA e, de modo secundário, afeta também o ciclo celular impedindo o crescimento radicular (EEKHOUT; LARSEN; DE VEYLDER, 2017; HORVATH et al., 2017).

O maior efeito inibitório do alongamento radicular promovido pelo Al^{3+} ocorre nas células da epiderme e no córtex externo (JONES et al., 2006). Nessas células, um impacto negativo do Al^{3+} foi demonstrado sobre as camadas de pectina e hemicelulose nas paredes celulares (NAGAYAMA et al., 2019). As células da coifa da raiz, revestidas por mucilagem, envolvem os ápices radiculares na maioria das espécies vegetais. Tais células foram também sugeridas como capazes de aumentar a tolerância ao Al^{3+} por atuarem como uma barreira à entrada do Al^{3+} e por estarem também envolvidas na produção de exsudatos radiculares (NAGAYAMA et al., 2019). Ademais, o ápice radicular tem sido reconhecido como um local de percepção e

resposta à sinalização endógena de hormônios vegetais e estímulos ambientais exógenos, sendo a zona mais ativa para a ação de fitohormônios incluindo auxina (Aux), citocinina (CKs), etileno (ET), giberelinas (GAs) e brassinosteróides (BRs) (BALUSKA et al., 2010). Todavia, a zona de transição da raiz (TZ), localizada entre o meristema apical e a região de alongamento basal, é também considerada um local de percepção para vários estímulos ambientais como, por exemplo, o estresse induzido por Al^{3+} e a baixa disponibilidade de fosfato inorgânico (Pi) (KONG et al., 2018).

Têm sido demonstrado que a inibição do crescimento radicular regulada pelo Al^{3+} pode interagir com a sinalização e transporte do hormônio auxina (KOLLMEIER; FELLE; HORST, 2000; KOPITTKKE, 2016; WANG et al., 2016b; ZHANG et al., 2018). A auxina, foi o primeiro hormônio vegetal a ser descoberto e identificado com base na sua capacidade de estimular o crescimento diferencial em resposta a diferentes estímulos, incluindo embriogênese, organogênese e desenvolvimento de brotos e raízes (DAVIES, 2004). Apesar da existência de diversas formas químicas da auxina, o ácido indol-3-acético (IAA) é a mais abundante e de maior relevância fisiológica (ENDERS; STRADER, 2015). Cabe ressaltar também que inúmeros processos podem ser afetados pelo IAA incluindo a expansão celular, formação de órgãos florais, diferenciação do tecido vascular, dominância apical, ramificação lateral, supressão da abscisão foliar, padrão de crescimento, dentre outros (BATISTA-SILVA et al., 2018; ENDERS; STRADER, 2015).

A auxina é produzida nos meristemas de brotos e raízes podendo ser transportadas de forma não polar por longas distâncias, da vasculatura para outras partes da planta, via floema ou através do transporte polar de auxina célula-a-célula (do inglês, *Polar Auxin Transport*; PAT), empregando transportadores na membrana plasmática (KRAMER; BENNETT, 2006). A distribuição da auxina pelo corpo da planta parece controlar uma variedade de processos associados ao desenvolvimento dos tecidos vegetais (VANNESTE; FRIML, 2009). Diversos transportadores atuam em conjunto para controlar a distribuição de auxina pelo corpo da planta, bem como as concentrações locais e a homeostase das auxinas, incluindo as proteínas de efluxo PIN FORMED (PIN) (BILLOU et al., 2005; PAPONOV et al., 2005; TEALE; PAPONOV; PALME, 2006), bem como o transportador de influxo AUXIN RESISTANT 1 (AUX1), que promove o transporte polar de auxina ao ápice da raiz (SWARUP et al., 2005).

Vários estudos têm demonstrado que o Al^{3+} é capaz de interagir com as vias de sinalização da auxina. Em *Arabidopsis*, a auxina altera a expressão do gene *Al sensitive 1 (ALS1)* influenciando o padrão de distribuição de Al^{3+} nas células vegetais (ZHU et al., 2013). A aplicação exógena de auxina, na zona de alongamento da raiz em milho (*Zea mays*), diminui a inibição do crescimento radicular induzida por Al^{3+} (KOLLMEIER; FELLE; HORST, 2000). Em soja (*Glycine max*), a auxina aumenta a exsudação de citrato induzida pelo Al^{3+} na raiz, através da regulação positiva de transportadores da família gênica MATE (Multidrug and toxic compound extrusion) e também aumenta a fosforilação da membrana plasmática (H^+ -ATPase) (WANG et al., 2016a). Já em alfafa (*Medicago sativa*), essa inibição induzida por Al, parece estar associada à inibição tanto da síntese de auxina nas gemas apicais quanto do transporte de IAA nas raízes (WANG et al., 2016b). Registre-se, também, que Al^{3+} apresenta como possíveis alvos os sistemas de transporte polar da auxina, levando a alterações no acúmulo e distribuição desse hormônio vegetal nas raízes (SUN et al., 2010). Neste contexto, foi observado em plantas expostas a Al^{3+} uma regulação dinâmica da transcrição de genes relacionados à auxina, provavelmente ajustando o acúmulo efetivo de Al^{3+} dentro da planta de modo a garantir a sobrevivência dessa espécie (KONG et al., 2018). Adicionalmente, maiores níveis de auxina são encontrados sob condições de estresse por Al^{3+} , principalmente no meristema apical radicular, desempenhando um papel importante na inibição do crescimento radicular (KONG et al., 2018). Cabe mencionar também que o estresse provocado pelo excesso de Al^{3+} é, potencialmente, genotóxico e o tratamento com auxina exógena confere, ao menos em parte, tolerância aos danos no DNA e no meristema apical radicular (HASEGAWA et al., 2018). Deste modo, um maior acúmulo de auxina pode atuar como uma resposta protetora contra a genotoxicidade, prevenindo o ciclo celular de danos no DNA em células filhas durante a proliferação celular em resposta ao Al^{3+} (HASEGAWA et al., 2018).

Registre-se que investigar possíveis mecanismos fisiológicos e moleculares da inibição do crescimento radicular modulada pelo Al^{3+} interagindo com auxina, não apenas aumentaria a nossa compreensão sobre a plasticidade do crescimento radicular sob várias condições ambientais, mas também apresenta-se como potencial uso para o melhoramento de culturas em solos ácidos, onde a disponibilidade desse elemento na solução do solo é naturalmente aumentada (YANG et al., 2017). Uma vez que o Al^{3+} causa grandes impactos no desenvolvimento vegetal, as plantas

desenvolveram diferentes mecanismos de tolerância e vários desses mecanismos, externos e internos à estrutura da raiz, impedem o acesso do Al^{3+} nas células, bem como os processos de complexação e compartimentação celular (BIAN et al., 2013). Uma estratégia que minimiza a entrada de Al^{3+} nas células radiculares é a exsudação de ácidos orgânicos (e.g. malato, citrato e oxalato), complexando o Al^{3+} na rizosfera e reduzindo sua absorção, acúmulo e danos celulares (BORGIO et al., 2020). Todavia, os mecanismos envolvidos na tolerância e os danos causados por Al^{3+} são altamente variáveis dependendo das espécies e genótipos (ARUNAKUMARA; WALPOLA; YOON, 2013; FURLAN et al., 2018; SMITH; NAIK; CUMMING, 2011), ainda que plantas consideradas resistentes ao Al apresentem, de modo geral, menor acúmulo de Al^{3+} do que plantas sensíveis (MA et al., 2005).

Diante do exposto, este estudo buscou analisar como, e em que extensão, alterações na percepção da sinalização da auxina estariam associadas a mecanismos envolvidos na tolerância ao Al^{3+} e suas conexões moleculares com o ciclo celular e a danos a estrutura do DNA e replicação do mesmo. Para tanto, foram utilizados dois genótipos de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) com alterações no balanço de sinalização de auxina submetidos a diferentes doses de Al^{3+} , buscando-se elucidar o envolvimento da sinalização mediada por auxina nos mecanismos de respostas fisiológica, anatômica e genética ao Al^{3+} . Em plantas de tomateiro, a regulação negativa do gene AUXIN/ INDOLE ACETIC 9 (AUX/IAA9) (*SIIAA9*), também conhecido como *entire*, gera uma resposta constitutiva de auxina associada a fenótipos específicos, como morfogênese foliar, em que as folhas compostas de tomate são convertidas em folhas simples e as plantas produzem frutos partenocárpicos (WANG et al., 2005). Em contraste, o mutante *diageotropica* (*dgt*) é caracterizado por sensibilidade reduzida à auxina causada pela perda de função em uma proteína, ciclofilina A. Plantas mutantes *dgt* foram caracterizadas por fenótipos pleiotrópicos, incluindo resposta gravitropica prejudicada (RICE; LOMAX, 2000), ausência de ramificação lateral radicular (MUDAY; LOMAX; RAYLE, 1995), redução do transporte de auxinas polares e dominância apical (IVANCHENKO et al., 2015) e desenvolvimento vascular alterado (ZOBEL, 1973). Em adição, plantas *dgt* foram caracterizadas por uma gama de alterações morfológicas e anatômicas, bem como capacidade fotossintética reduzida ao passo que plantas *entire* foram caracterizadas por mudanças nos níveis de intermediários do ciclo dos ácidos tricarbóxicos (Ciclo TCA) e metabólitos relacionados ao nitrogênio (BATISTA-SILVA et al., 2019).

Tomados em conjunto, os resultados descritos acima indicam que ambos os genes modulam a sinalização à auxina promovem alterações não apenas no desenvolvimento, mas também uma extensa reprogramação metabólica intimamente conectada as mudanças climáticas. Ademais, as alterações na sinalização da auxina parecem modular também respostas importantes ao estresse por Al, mediando não apenas alterações morfofisiológicas, mas também mudanças no processo de divisão celular particularmente, na região de alongamento radicular. Os resultados aqui obtidos demonstram que a redução na percepção de auxina (*dgt*) culminou com uma maior sensibilidade ao Al, ao passo que o aumento na percepção (*entire*) promoveu uma maior tolerância ao Al³⁺. Tais respostas foram mediadas, em larga extensão, por alterações no metabolismo central incluindo o uso de reservas (e.g., açúcares, proteínas e aminoácidos) que, em última instância, afetaram o crescimento radicular. Em síntese, a modulação das vias de sinalização de auxina pode, portanto, fornecer uma oportunidade para alterar o desempenho da cultura em resposta ao Al³⁺.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e condições de cultivo

Sementes de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) do tipo selvagem (WT) e linhagens com baixa percepção à auxina, *diageotropica* (*dgt*) e com aumento na sinalização da auxina, *entire* (*AUX/IAA9*), no mesmo background genético, foram obtidas conforme descrito anteriormente (CARVALHO et al., 2011). Os fenótipos das plantas *dgt* e *entire* no background genético Micro-Tom se assemelham aos publicados anteriormente para as mesmas mutações em outras cultivares de tomate (BALBI; LOMAX, 2003; IVANCHENKO et al., 2015; WANG et al., 2005). As sementes foram desinfestadas em solução contendo hipoclorito de sódio a 0,5% (p/v) por 5 min, seguida de três lavagens com água destilada e posteriormente semeadas em rolos de papel “Gertmitest” umedecidos diariamente com água destilada. As sementes permaneceram nessas condições durante 8 dias, cobertas por sacos pretos para evitar a entrada de luz, e após foram mantidas por três dias na luz antes da implementação da hidroponia. As plantas foram cultivadas em salas de crescimento com temperatura controlada em torno de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16/8 horas com intensidade da luz de $330 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Foram implementados dois experimentos de hidroponia com tempos e exposições ao Al^{3+} distintos. No primeiro experimento utilizando plântulas com 10 dias (5 a 8 cm) transferidas para vasos plásticos com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) modificada para tomate, contendo 500 mmol L^{-1} de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 500 mmol L^{-1} de KNO_3 , 100 mmol L^{-1} $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mmol L^{-1} KH_2PO_4 , $47,8 \text{ mmol L}^{-1}$ H_3BO_3 , $14,38 \text{ mmol L}^{-1}$ $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $1,36 \text{ mmol L}^{-1}$ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $0,12 \text{ mmol L}^{-1}$ $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e $420 \mu\text{mol L}^{-1}$ Fe-EDTA, pH 4.5, e a força iônica total. As plântulas foram mantidas com aeração forçada constante, utilizando uma bomba de pressão positiva. Após três dias de aclimação, as plântulas foram transferidas para uma nova solução nutritiva, como descrito anteriormente, com os seguintes tratamentos em pH 4.5 (-Al) e duas doses de AlCl_3 uma menor dose com poucos efeitos de toxidez e uma maior que não levasse a morte da planta, $25 \mu\text{M}$ e $100 \mu\text{M}$, respectivamente, foram baseadas em outros estudos utilizando as mesmas concentrações de Al^{3+} para outras espécies (KOPITKE, 2016; WANG et al., 2016b),

onde permaneceram por quatro dias até a coleta. Nesse momento foram realizadas as seguintes análises: análises biométricas, citometria de fluxo, análises histoquímica de hematoxilina e do estresse oxidativo (ROS), descritas, em detalhes, abaixo.

Um segundo experimento, utilizando plantas adultas, sob as mesmas condições descritas acima, foi também realizado. Brevemente, plântulas de 10 dias (8 a 10 cm) após germinação, foram transferidas para solução nutritiva. Após a aclimação por sete dias, as plântulas foram submetidas, por seis dias, aos tratamentos: pH 4.5 (-Al) e duas doses de Al³⁺ (25 µM e 100 µM), até a coleta do material. Nesse momento foram realizadas as seguintes análises: análises biométricas, anatomia, parâmetros fotossintéticos, análises de metabólitos e ensaios bioquímicos, descritas, em detalhes, abaixo.

2.2. Crescimento radicular

A medição diária do comprimento da raiz foi realizada, do hipocótilo até o ápice da raiz principal, com régua graduada, até o final de ambos os experimentos. Além da avaliação da taxa de crescimento radicular, foi caracterizado o número de folhas e altura da parte aérea, sob as mesmas condições.

2.3. Ensaios histoquímicos de hematoxilina

Ápices radiculares (~5 cm) foram mergulhados em solução de ferro hematoxilina a 0,2% (m/v) com iodeto de sódio (NaIO₃) por 15 min (SOUZA et al., 2016). Posteriormente, as raízes foram lavadas em água deionizada com aeração constante por 15 min para remover o excesso de corante e as amostras foram observadas e fotografadas sob estereomicroscópio (Zeiss modelo Stemi 2000-C).

2.4. Ensaios anatômicos e histolocalização do Al

Amostras de ápices de raiz (~1 cm) foram coletados e fixadas em FAA 50% (formaldeído 37%, ácido acético glacial e álcool etílico 50%, 1:1:18 v/v/v) por 72 horas e posteriormente armazenadas em álcool etílico 70% (KRAUS; ARDUIN, 1997). Em seguida, as amostras foram desidratadas, em série etílica crescente, e incluídas em resina metacrilato (Historesin, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha).

Posteriormente, cortes transversais e longitudinais (5 μm) foram realizados em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA) e submetidos à coloração com azul-de-toluidina e para detecção do Al foram corados com Chrome Azurol'S 0,5% (KUKACHKA; MILLER, 1980). Após 1 min de incubação no corante azul-de-toluidina e 60 min no corante Chrome Azurol'S, os cortes foram lavados em água destilada e confeccionadas lâminas permanentes em Permunt, para documentação em fotomicroscópio (modelo AX70 TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) equipado com câmera AxioCam Zeiss.

2.5. Parâmetros fotossintéticos

Os parâmetros de trocas gasosas foram determinados utilizando a terceira folha totalmente expandida a partir do ápice com um analisador portátil de gás no infravermelho de fluxo aberto (Li 6400XT, Li - Cor, Inc., Lincoln, NE, EUA). As trocas gasosas instantâneas, incluindo a taxa líquida de assimilação de CO_2 (A_n), a condutância estomática ao vapor de água (g_s), a concentração interna de CO_2 (C_i) e a transpiração (E) foram medidas após 1 hora de iluminação durante o período de luz sob 330 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidade luz ao nível da folha. A concentração de referência de CO_2 estabelecida foi de 400 $\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1} \text{ar}$. Todas as medidas foram realizadas utilizando-se câmara foliar de 2 cm^2 a 25°C, bem como uma relação estomática de 0,5 com fluxo de 300 $\mu\text{mol s}^{-1}$ e o déficit de pressão de vapor de ar da folha mantido em 1,2 kPa, ao passo que a quantidade de luz azul foi ajustada em 10% de PPF (Photosynthetic Photon Flux Density) para otimizar a abertura estomática.

A respiração (R_d) foi determinada usando o mesmo sistema de troca de gases descrito acima, após 1 hora no escuro, utilizando a mesma folha usada anteriormente para determinar A_n .

2.6. Análises de metabólitos e ensaios bioquímicos

Amostras de folhas e ápices radiculares (~5 cm) foram coletadas ao final do experimento após seis dias de exposição ao Al^{3+} , congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C até análises posteriores. A extração metanólica foi realizada por trituração rápida em nitrogênio líquido e adição do tampão de extração apropriado.

Os níveis de glicose, frutose e sacarose foram determinados como descrito anteriormente (FERNIE et al., 2001), enquanto malato foi quantificado como descrito por Nunes-Nesi et al. (2007) e os níveis de clorofila determinados conforme descrito por Porra et al. (1989). Além disso, os níveis totais de aminoácidos foram determinados como descrito anteriormente (YEMM; COCKING; RICKETTS, 1955) e proteínas totais como descrito por Bradford (1976).

A análise do perfil metabólico foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS), conforme descrito anteriormente por Lisec et al., (2006). Brevemente, a extração foi realizada com 1 ml de metanol e agitação (800 rpm) a 70°C durante 15 min com a adição de 60 µl de Ribitol (0.2 mg ml⁻¹) como padrão interno. Em seguida, a derivatização foi realizada exatamente como descrito em Roessner et al., (2001). Os cromatogramas foram avaliados usando o software TagFinder (ALLWOOD et al., 2012), e a biblioteca de referência disponível no Golm Metabolome Database (KOPKA et al., 2004), seguindo as recomendações de descrição (FERNIE et al., 2011).

2.7. Ensaios histoquímicos do estresse oxidativo (ROS)

Amostras de parte aérea e ápice de raiz foram coletadas para a avaliação qualitativa do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e superóxido (O₂⁻), por coloração histoquímica, conforme descrito anteriormente por Kong et al., (2011) com modificações no tempo de exposição e na concentração dos reagentes. De modo resumido, para a identificação de espécies de O₂⁻ foi utilizado nitrobluetetrazólio (NBT) a 0,1 mg mL⁻¹, enquanto para H₂O₂, foi utilizada a 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) a 1,0 mg mL⁻¹, com exposição 1 e 3 h, respectivamente. Posteriormente, a solução de coloração (DAB ou NBT) foi retirada e adicionada uma solução de coloração (etanol: ácido acético: glicerol 3:1:1) cobrindo todas as amostras e permitindo o armazenamento até que as amostras fossem analisadas e fotografadas sob um estereomicroscópio (Modelo Zeiss Stemi 2000-C).

2.8. Ensaio de citometria de fluxo

Para a análise do ciclo celular utilizando um citômetro de fluxo, foram utilizadas amostras de parte aérea e meristemas radiculares. Para cada combinação

experimental, foram analisados, aproximadamente, 1 a 2 folíolos e 6 meristemas radiculares.

As suspensões nucleares foram obtidas por corte (GALBRAITH, 1983) de fragmentos de folíolos e meristemas radiculares excisados de cada amostra (PRAÇA-FONTES et al., 2011). Amostras e fragmentos de folhas foram cortados simultaneamente com lâmina em uma placa de Petri contendo 0,5 ml de tampão de extração nuclear OTTO-I (OTTO, 1990), suplementado com ditioneitol (DTT) 2 mM e 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de RNase (PRAÇA-FONTES et al., 2011). Após, 0,5 ml do tampão OTTO-I foram adicionados e as suspensões filtradas através de uma malha de nylon de 30 μm , acondicionadas em microtubos e centrifugadas a 1100 rpm por 5 min. O precipitado foi ressuspensão em 100 μl de tampão OTTO-I e incubado por 10 min (PRAÇA-FONTES et al., 2011). As suspensões dos núcleos foram coradas com 1,5 ml de solução OTTO-I: OTTO-II (1: 2 LOUREIRO et al., 2006; OTTO, 1990) suplementada com DTT 2 mM, 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de iodeto de propídio e 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de RNase (PRAÇA-FONTES et al., 2011). As suspensões de núcleos foram mantidas no escuro por 30 minutos e depois filtradas através de uma malha de nylon de 20 μm .

As amostras foram analisadas em um citômetro de fluxo Partec PAS II/III (Partec GmbH, Alemanha), e os histogramas foram analisados com as ferramentas do software Partec Flow Max para medir o conteúdo de DNA nuclear.

2.9. Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as diferenças estatísticas entre os tratamentos e entre os genótipos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$) utilizando-se o programa Genes (CRUZ, 2013).

3. RESULTADOS

3.1. Alterações no crescimento radicular em resposta ao estresse por Al

Os impactos fisiológicos e metabólicos do estresse por Al^{3+} foram investigados em plantas de tomate (*S. lycopersicum*) cv. Micro-Tom com alterações no balanço de percepção/sinalização de auxina e submetidas quando submetidas a diferentes doses de Al^{3+} . As análises foram efetuadas em plantas jovens com 18 dias após a germinação (dag) e em plantas adultas (35 dag). Primeiro, na ausência de Al^{3+} , foi possível observar que tanto em plantas com 18 dag (Fig. 1) quanto com 35 dag (Fig. 2), os mutantes apresentam um claro e distinto fenótipo. Assim, plantas com reduzida sinalização de auxina (*diageotropica*, *dgt*) apresentam menor crescimento de raiz e parte aérea ao passo que plantas com aumento na sinalização de auxina (*entire*) apresentam crescimento similar ao tipo selvagem (WT) (Fig. 1 e 2). Em presença de 25 μM de Al^{3+} , pouco efeito no crescimento de raiz e parte área dos genótipos utilizados foi observado (Fig. 1 e 2). No entanto, em presença de 100 μM de Al^{3+} , reduções claras no alongamento radicular em plantas WT foram observadas tanto em plantas jovens (40,4%) após 4 dias sob estresse (Fig.1B), quanto em plantas adultas (53,1%), após 7 dias de estresse (Fig. 2C). Ainda nessa concentração (100 μM de Al^{3+}), plantas com reduzida percepção/sinalização de auxina (*dgt*) apresentaram reduções significativas no crescimento radicular na ordem de 42,1% e 53% em plantas jovens (Fig. 1B) e plantas adultas (Fig. 2C), respectivamente. O menor efeito inibitório no alongamento radicular ocasionado pelo estresse por Al foi observado em plantas com maior percepção da sinalização de auxina (*entire*), visto que, em 100 μM de Al^{3+} , reduções no alongamento da raiz tanto em plantas jovens (30,8% - Fig. 1B) quanto em plantas adultas (18,1% - Fig. 2C) foram observadas, sugerindo, portanto, que este genótipo seja mais tolerante ao Al^{3+} .

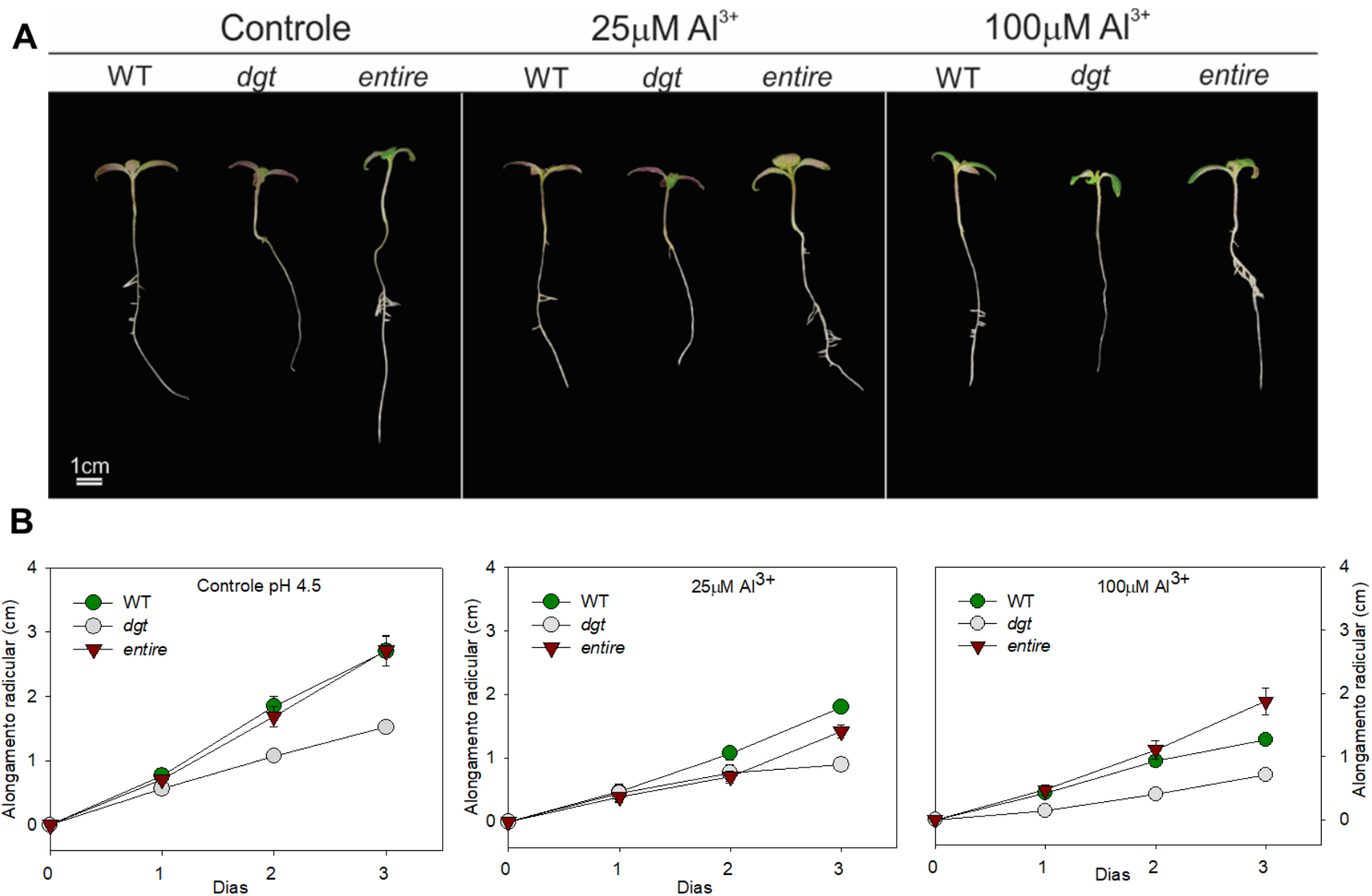


Figura 1: Caracterização fenotípica de plantas jovens mutantes na sinalização à auxina indica tolerância diferencial ao Al. **A)** Imagem representativa de plantas jovens (18 dag) de genótipos com sinalização de auxina com redução (*diageotropica*, *dgt*) ou aumento (*entire*), sob diferentes concentrações de Al^{3+} (25 e 100 μM), em comparação com o tipo selvagem (WT, tomate cv. Micro-Tom). **B)** Taxa do crescimento radicular ao longo do tempo de 4 dias sob estresse ao Al^{3+} . Os dados são médias \pm SE (n=8). Barra de escala, 1 cm.

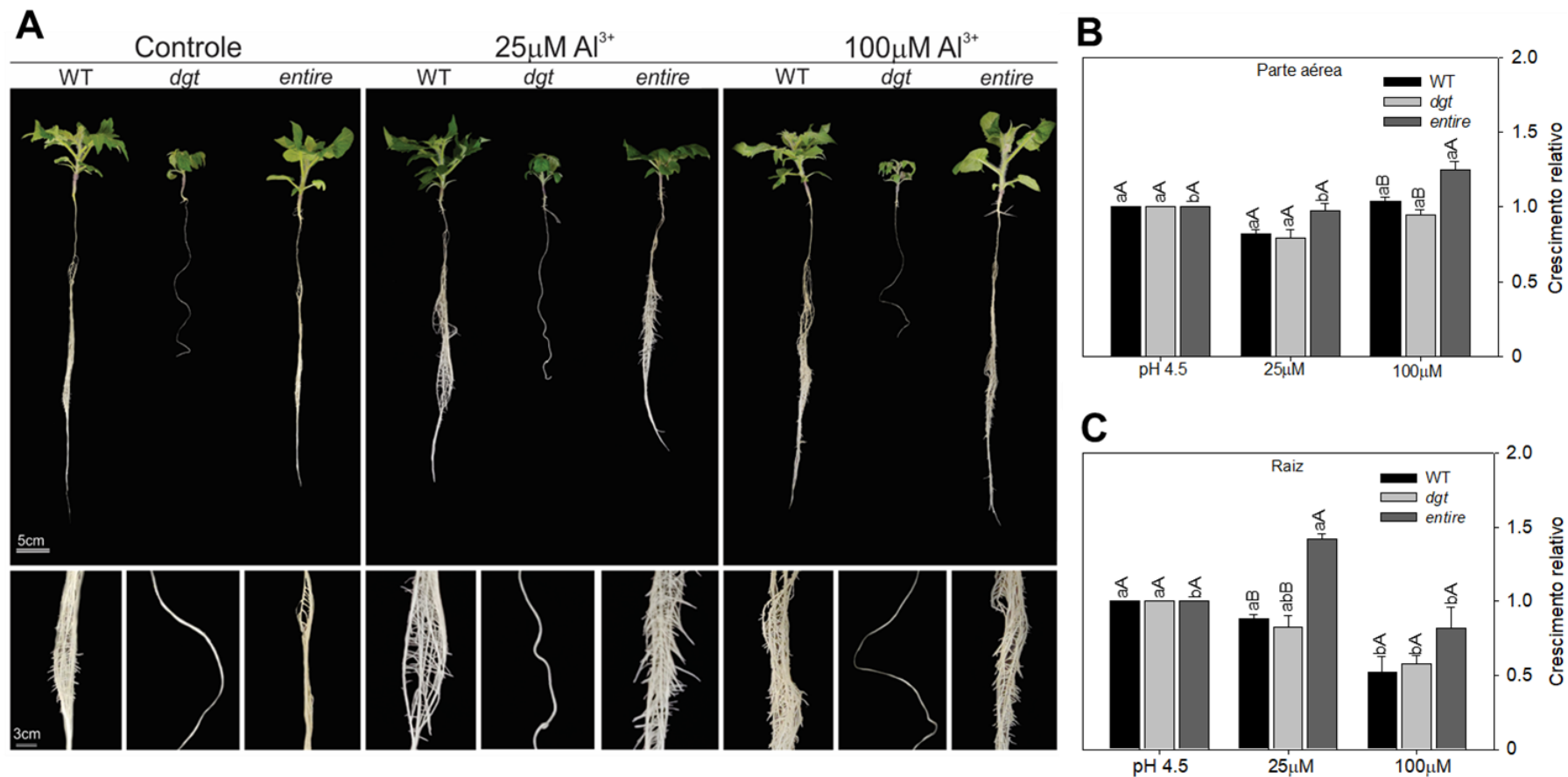


Figura 2: Caracterização fenotípica de plantas adultas mutantes na sinalização à auxina indica tolerância diferencial ao Al. **A)** Imagem representativa de plantas adultas (35 dag) de genótipos com sinalização de auxina com redução (*diageotropica*, *dgt*) ou aumento (*entire*), sob diferentes concentrações de Al³⁺ (25 e 100 μ M), em comparação com o tipo selvagem (WT, tomate cv. Micro-Tom). **B)** Crescimento relativo da parte aérea. **C)** Crescimento relativo da raiz. Os dados foram normalizados em relação à resposta média obtido para cada genótipo na condição controle (pH 4.5). Assim, as variações em presença de Al, refletem os impactos no crescimento (radicular e de parte aérea) causados pelo Al, em cada genótipo. Os dados são médias \pm SE (n=8). Barra de escala, 5 cm e 3 cm. Letras minúsculas comparam genótipos dentro do mesmo tratamento e letras maiúsculas comparam o mesmo genótipo sob diferentes tratamentos. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.2. Acúmulo diferencial de Al nas raízes de plantas jovens em mutantes da sinalização por auxina

A histolocalização de Al foi avaliada nas raízes por coloração de hematoxilina (GIAVENO; MIRANDA FILHO, 2000) em plantas de 18 dag (Fig. 3). Na ausência de estresse por Al^{3+} , não houve coloração efetiva em todos os genótipos o que é justificada pela ausência do Al^{3+} . Em adição, uma coloração mais intensa em maiores concentrações de Al foi observada em genótipos com baixa percepção da sinalização à auxina (*dgt*) e com aumento na sinalização da auxina (*entire*), quando comparados a plantas WT (Fig. 3). Cabe mencionar também que em plantas *dgt* acumulou grandes quantidades de Al^{3+} , mesmo em 25 μM de Al^{3+} e principalmente no ápice radicular (Fig. 3B), foi observada quando comparado aos outros genótipos. Plantas *entire*, no entanto, em resposta a mesma concentração não apresentaram coloração tão intensa (Fig. 3C), o que indica um reduzido acúmulo de Al na superfície radicular. Não obstante, foi possível perceber também que em plantas tratadas com 100 μM de Al^{3+} , até mesmo o genótipo com maior percepção de auxina (*entire*), apresentaram coloração intensa, indicando acúmulo de Al nas raízes, principalmente nos ápices radiculares. Tomados em conjunto, tais resultados indicam que maior percepção na sinalização da auxina (*entire*) promove uma maior mais tolerância ao estresse por Al^{3+} .

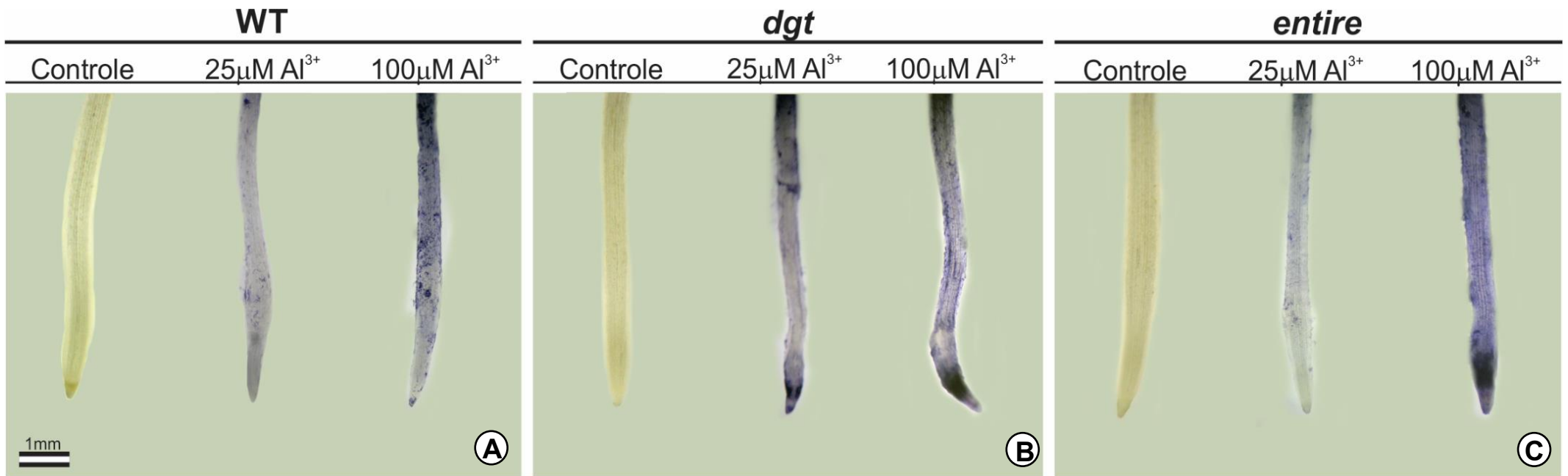


Figura 3: Ápices radiculares avaliados com coloração de hematoxilina apresentou localização diferencial de Al. Imagens representativas de plantas jovens (18 dag) com sinalização de auxina reduzida (*diageotropica*, *dgt*) ou aumentada (*entire*), sob diferentes concentrações de Al³⁺ (25 e 100 μ M), em comparação com o tipo selvagem (WT, tomate cv. Micro-Tom). **A)** WT; **B)** *dgt*; **C)** *entire*. Barra de escala = 1 mm.

3.3. Alterações na anatomia de raiz de genótipos com sinalização diferencial a auxina em resposta ao Al

Na ausência de estresse por Al^{3+} , foi possível observar que plantas adultas (35 dag) dos genótipos WT (Fig. 4A), plantas com reduzida sinalização de auxina (*dgt*- Fig. 4B) e plantas com aumento na sinalização de auxina (*entire*- Fig. 4C) apresentam meristemas apicais radiculares contendo pequenas células justapostas, com citoplasma denso e fileiras de células com núcleo bem definido e esférico; todavia, foi possível observar também que as células do procâmbio nos genótipos WT e *entire* apresentam vacúolos maiores, indicando o início da diferenciação celular na zona de maturação (Fig. 4A,C).

Na presença de 25 μM de Al^{3+} , observou-se ainda em plantas WT a presença tanto de células meristemáticas quanto de células já diferenciadas, demonstrando que o alongamento radicular continua ocorrendo (Fig. 4D). Na mesma concentração de Al, tal fato não foi observado no genótipo *dgt*, cujas células apresentaram-se, em sua maioria, não diferenciadas e com o núcleo menos evidente (Fig. 4F); em adição, plantas *entire* também expostas a essa concentração de Al, tiveram o seu processo de diferenciação celular interrompido, como visualizado pela presença de núcleos ainda menos evidentes (Fig. H). Quando submetidas a 100 μM de Al^{3+} , plantas WT foram caracterizadas pela presença de citoplasma colapsado e células meristemáticas (Fig. 4J), ao passo que a presença de vacúolos maiores foi observado em plantas *dgt*; no entanto, na zona de maturação de plantas *dgt*, as células se diferenciaram tornando visível o periciclo e a medula na região do córtex (Fig. 4L); de forma contrária, no genótipo *entire* nota-se ainda células meristemáticas com paredes achatadas e núcleo pouco evidente, grandes vacúolos com citoplasma colapsado, possivelmente devido ao acúmulo de Al, embora as células não se diferenciaram (Fig. 4N). Um maior conteúdo de Al^{3+} foi observado em todos os ápices das raízes tratadas com Al, principalmente nos núcleos celulares (Fig. 4E-O), no citoplasma (Fig. 4E,K,M), bem como nas paredes celulares na região do procâmbio (Fig.4K,M,O).

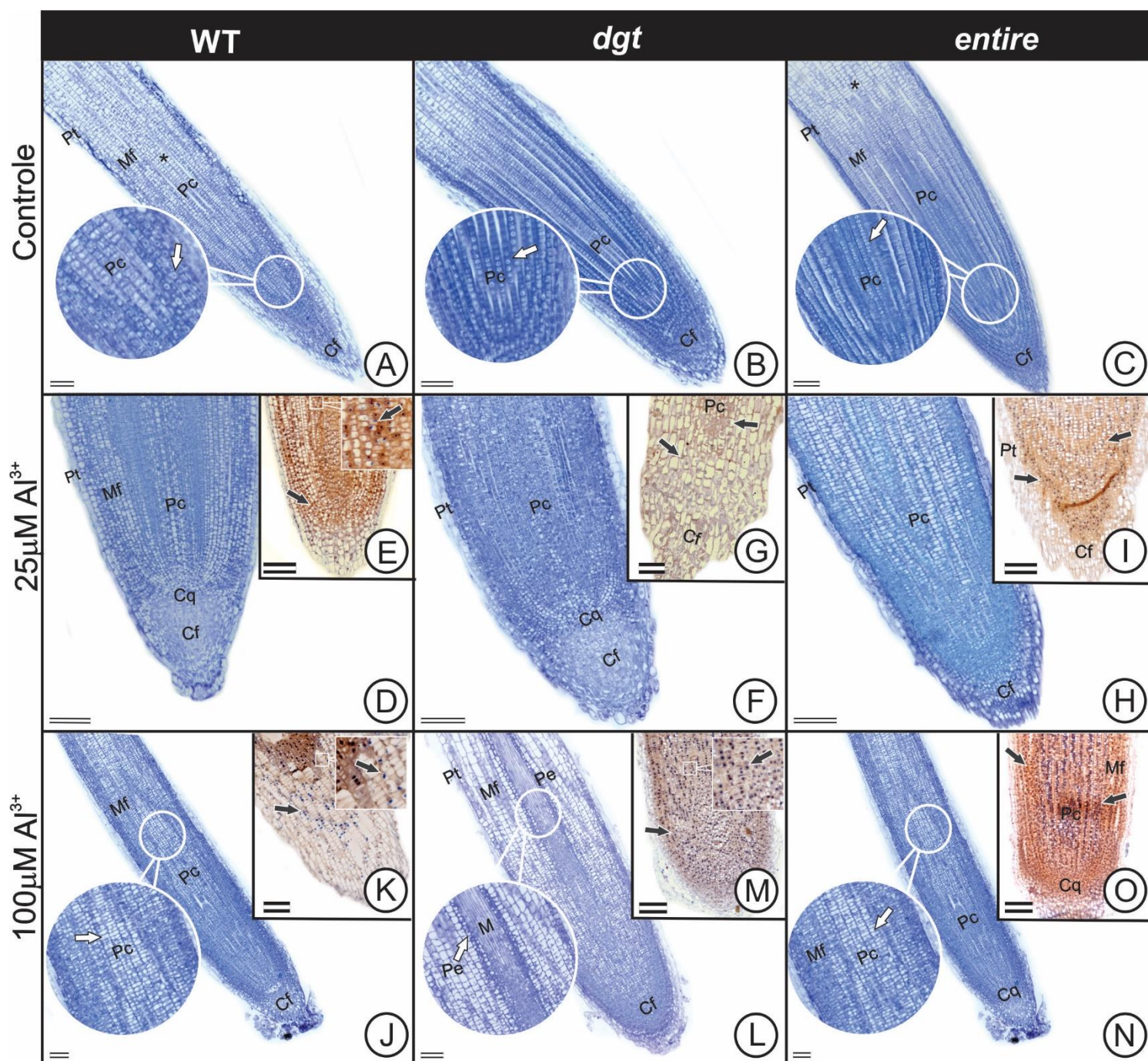


Figura 4: O estresse por Al induz alterações nas estruturas celulares dos ápices radiculares de plantas de tomate com sinalização diferencial de auxina. Imagem representativa da anatomia dos ápices radiculares de plantas adultas (35 dag) com sinalização de auxina com redução (*diageotropica*, *dgt*) ou aumento (*entire*), sob diferentes concentrações de Al^{3+} (25 e 100 μM), em comparação com o tipo selvagem (WT, tomate cv. Micro-Tom). **E,G,I,K,M,O** - Histolocalização do Al pelo corante Chrome Azurol'S nos ápices radiculares. A coloração azul indicada pelas setas pretas, mostra reação positiva com o corante Chrome Azurol'S. Cf - coifa; Cq - centro quiescente; Pc - procâmbio; Pt- protoderme; Mf – meristema fundamental; Pe- periciclo; M- medula; (*) asteriscos- vacúolos; Barra de escala: 100 μm .

3.4. O estresse por Al afeta parâmetros de trocas gasosas

Em função das alterações no crescimento e morfologia em resposta a presença de Al^{3+} em plantas adultas (35 dag) com sinalização diferencial de auxina, uma caracterização da capacidade fotossintética foi realizada. Embora pequenas diferenças foram evidenciadas em relação às variáveis de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* alguns padrões merecem ser destacados. Sob condições controle, o genótipo *dgt* apresenta menor taxa de fotossíntese líquida (A_N) em relação aos demais (Tabela I), como observado anteriormente (BATISTA-SILVA et al., 2019) além de uma menor taxa de transporte de elétrons (*ETR*), observado na mesma condição. Já plantas cultivadas a 100 μM de Al^{3+} a eficiência intrínseca no uso da água (WUE_i) foi maior em plantas *dgt* (Tabela I). Ao comparar o mesmo genótipo sob diferentes condições (controle, 25 μM e 100 μM), a R_d foi alterada apenas nos genótipos *dgt* e *entire*. Nota-se também que a medida que há aumento na concentração de Al^{3+} aumentos significativos em R_d são observados.

Tabela I. Comportamento de parâmetros de trocas gasosas e de fluorescência da clorofila *a* em plantas com sinalização diferencial à auxina em resposta ao estresse por alumínio (Al). Plantas adultas (35 dag) com sinalização de auxina reduzida (*diageotropica*, *dgt*) ou aumentada (*entire*) foram comparadas com plantas do tipo selvagem (WT) cultivadas em presença de Al³⁺ (25 e 100 μM). Valores representam médias ± SE (n=4). Letras minúsculas comparam genótipos dentro do mesmo tratamento e letras maiúsculas comparam o mesmo genótipo sob diferentes tratamentos. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente pelo teste de Tukey (*p*<0,05). (*A_N*, taxa líquida de fotossíntese; *g_s*, condutância estomática; *E*, transpiração; *WUE_i* (*A_N/g_s*) eficiência intrínseca ao uso da água; *R_d*, respiração no escuro; *ETR*, taxa de transporte de elétrons; *F_v/F_m*, eficiência máxima fotoquímica do PSII; *C_i*, concentração interna de CO₂).

Parâmetros	Tratamentos		
	Controle	25μM Al ³⁺	100μM Al ³⁺
<i>A_N</i> (mmol CO₂ m⁻² s⁻¹)			
WT	5,592 ± 0,44256 Aa	5,307 ± 0,392817 Aa	5,132 ± 0,8915 Aa
<i>dgt</i>	3,502 ± 0,41071 Ab	3,852 ± 0,351681 Aa	3,999 ± 0,81471 Aa
<i>entire</i>	5,405 ± 0,21932 Aa	5,182 ± 0,267066 Aa	5,707 ± 0,33977 Aa
<i>g_s</i> (mol H₂O m⁻² s⁻¹)			
WT	0,236 ± 0,02776 Aab	0,298 ± 0,02439 Aab	0,279 ± 0,0969 Aa
<i>dgt</i>	0,100 ± 0,01378 Ab	0,153 ± 0,01101 Ab	0,142 ± 0,06753 Aa
<i>entire</i>	0,269 ± 0,00639 Aa	0,326 ± 0,015588 Aa	0,284 ± 0,03141 Aa
<i>E</i> (mmol H₂O m⁻² s⁻¹)			
WT	2,076 ± 0,22601 Aab	2,522 ± 0,344945 Aa	2,612 ± 0,69998 Aab
<i>dgt</i>	1,086 ± 0,19536 Ab	1,473 ± 0,08568 Aa	1,498 ± 0,5239 Ab
<i>entire</i>	2,341 ± 0,19334 Aa	2,711 ± 0,314422 Aa	2,812 ± 0,15105 Aa
<i>WUE_i</i> (<i>A_N/g_s</i>)			
WT	24,143 ± 1,60717 Aa	18,159 ± 2,024377 Aa	23,310 ± 5,0994 Ab
<i>dgt</i>	35,680 ± 2,57095 Aa	25,770 ± 3,159418 Aa	39,458 ± 11,4808 Aa
<i>entire</i>	20,064 ± 0,40526 Aa	15,912 ± 0,613173 Aa	20,513 ± 1,25469 Ab
<i>R_d</i> (mmol CO₂ m⁻² s⁻¹)			
WT	2,572 ± 0,14761 Aab	3,253 ± 0,350651 Aab	3,100 ± 0,24713 Aa
<i>dgt</i>	1,971 ± 0,11029 Bb	2,653 ± 0,044408 ABb	3,067 ± 0,29193 Aa
<i>entire</i>	3,100 ± 0,38903 Ba	4,087 ± 0,277924 Aa	3,492 ± 0,34701 ABa
<i>ETR</i>			
WT	44,872 ± 0,38737 Aa	43,931 ± 0,44334 Aa	42,561 ± 1,39655 Aab
<i>dgt</i>	41,494 ± 1,14036 Ab	41,646 ± 0,680679 Aa	40,077 ± 1,1723 Ab
<i>entire</i>	44,439 ± 0,2605 Aa	43,883 ± 0,525302 Aa	43,304 ± 0,43285 Aa
<i>F_v/F_m</i>			
WT	0,783 ± 0,00226 Aa	0,780 ± 0,000808 Aa	0,779 ± 0,00282 Aa
<i>dgt</i>	0,759 ± 0,00375 Bb	0,763 ± 0,002184 Bb	0,780 ± 0,0028 Aa
<i>entire</i>	0,774 ± 0,00273 Aa	0,781 ± 0,002357 Aa	0,779 ± 0,00302 Aa
<i>C_i</i>			
WT	350,640 ± 2,50596 Aa	360,606 ± 3,624944 Aa	345,801 ± 9,59278 Aab
<i>dgt</i>	333,321 ± 3,57236 Aa	349,363 ± 5,634784 Aa	326,023 ± 18,5488 Ab
<i>entire</i>	357,503 ± 0,33832 Aa	364,279 ± 1,403033 Aa	355,496 ± 2,10194 Aa

3.5. Impactos do Al no metabolismo plantas com sinalização diferencial de auxina

Buscando explorar em detalhes as alterações metabólicas em resposta ao estresse por Al em genótipos de tomateiro (35 dag) com sensibilidade diferencial à auxina, uma detalhada análise metabólica da raiz e parte aérea foi realizada. Primeiro, os níveis totais de aminoácidos e proteínas, açúcares solúveis (glicose, frutose e sacarose), malato e amido foram determinados no meio do período de luz. De modo resumido, plantas *dgt* foram caracterizadas por um aumento significativo dos níveis de aminoácidos nas raízes em 25 μM de Al^{3+} , quando comparadas a plantas WT e ao mutante *entire* (Fig. 6A). Este fato à parte, não foram observadas variações significativas nos níveis de proteínas totais em raízes dos genótipos em resposta ao estresse com Al (Fig. 6B). De modo geral, não foram observadas alterações significativas nos níveis de aminoácidos e proteínas na parte aérea dos genótipos aqui utilizados (Fig. 6).

Foi possível observar também que a redução na sinalização de auxina (*dgt*) está associada ao acúmulo de glicose (Fig. 7A) e frutose (Fig. 7B) na parte aérea e de sacarose (Fig. 7C) na raiz em resposta ao estresse por Al. De modo interessante, não foram observadas diferenças entre os genótipos aqui utilizados no que diz respeito aos conteúdos de glicose (Fig. 7A) e frutose (Fig. 7B) no sistema radicular e de sacarose (Fig. 7C) na parte aérea em resposta ao estresse por Al. Observa-se também acúmulo de amido na parte aérea (Fig. 8A) e de malato na raiz (Fig. 8B) em plantas *dgt* em resposta ao estresse por Al. Registre-se também que reduções significativas nos níveis de malato na parte aérea de plantas *dgt* e *entire* em presença de 100 μM de Al^{3+} , quando comparados a WT (Fig. 8B), foram observadas.

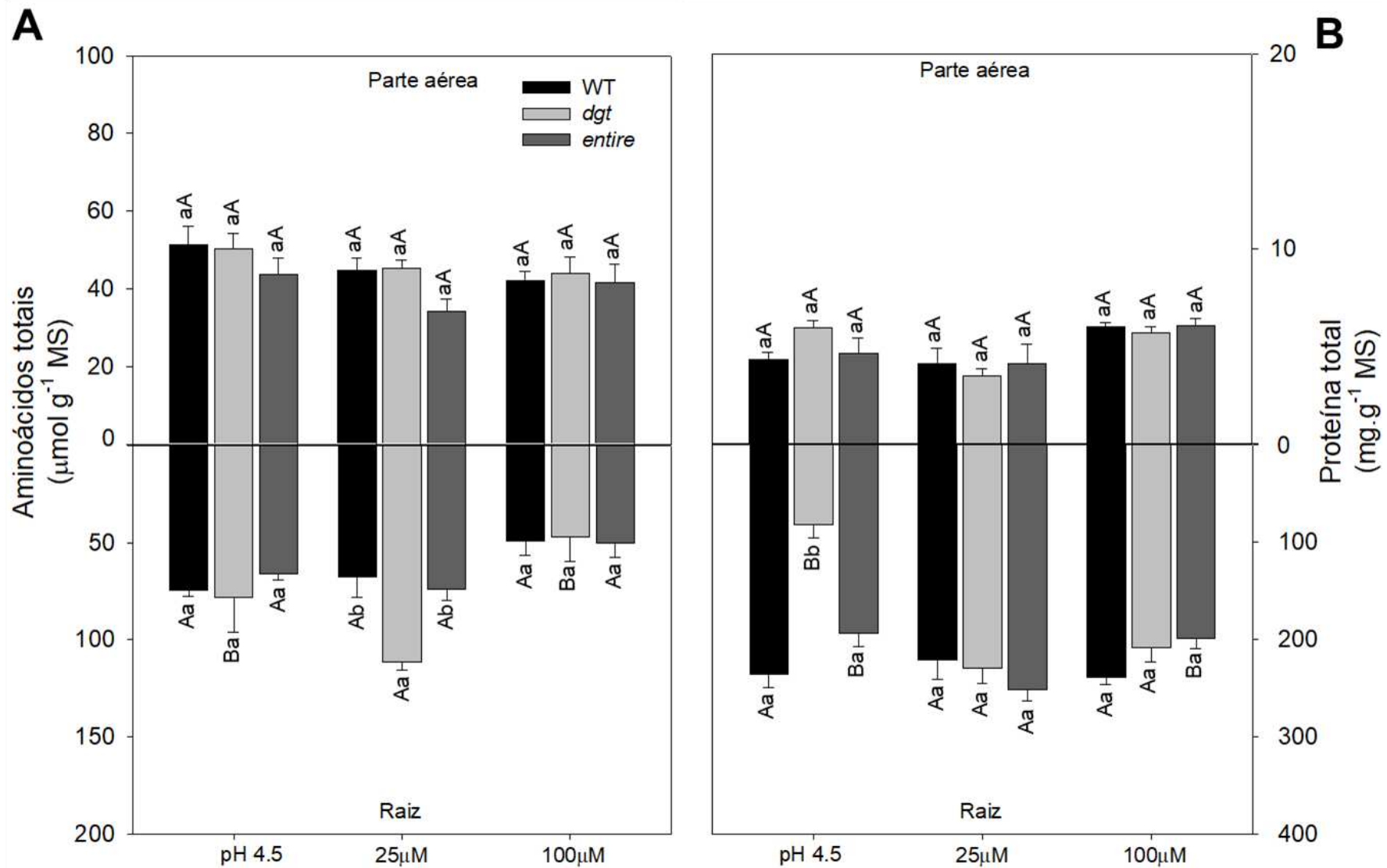


Figura 6: Impactos do Al^{3+} no conteúdo de aminoácido e proteínas totais em plantas com sinalização diferencial de auxina no meio do período de luz. Mudanças foram observadas em plantas adultas (35 dag) de tomate com sinalização de auxina aumentada (*entire*) ou reduzida (*diageotropica*, *dgt*) quando comparada com plantas de tipo selvagem (WT) em resposta a estresse por Al^{3+} (25 e 100 μM). **A**) aminoácidos totais e **B**) proteína solúvel total na parte aérea e na raiz. Os dados são médias \pm SE ($n = 6$). Letras minúsculas comparam genótipos dentro do mesmo tratamento e letras maiúsculas comparam o mesmo genótipo sob diferentes tratamentos. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

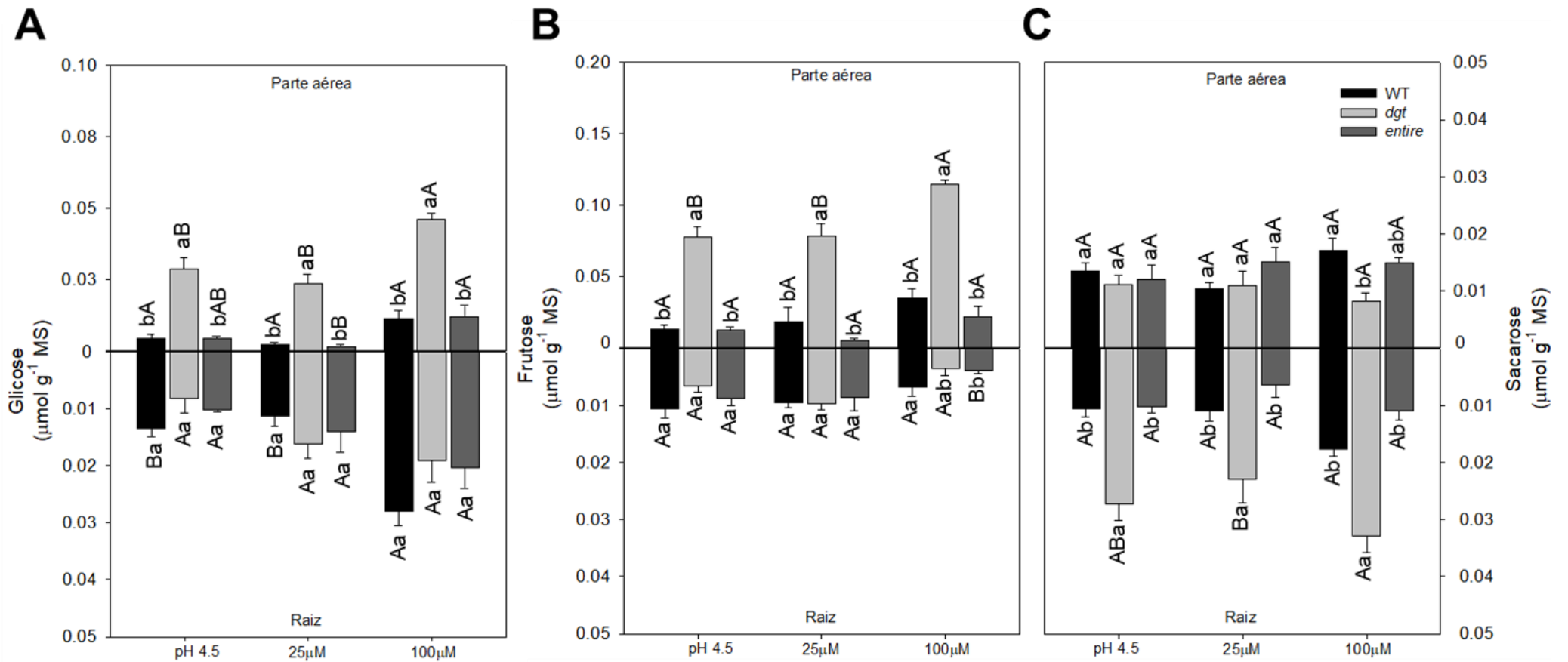


Figura 7: O estresse por Al induziu acúmulo de glicose e frutose na parte aérea e sacarose na raiz de *diageotropica* (*dgt*) no meio do período de luz. Mudanças nos níveis de açúcares foram observadas em plantas adultas (35 dag) de tomate com sinalização de auxina aumentada (*entire*) ou reduzida (*diageotropica*, *dgt*) quando comparada com plantas de tipo selvagem (WT) em resposta a estresse por Al³⁺ (25 e 100 µM). **A)** Glicose, **B)** Frutose e **C)** Sacarose em ambos, parte aérea e raiz. Os dados são médias ± SE (n = 6). Letras minúsculas comparam genótipos dentro do mesmo tratamento e letras maiúsculas comparam o mesmo genótipo sob diferentes tratamentos. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

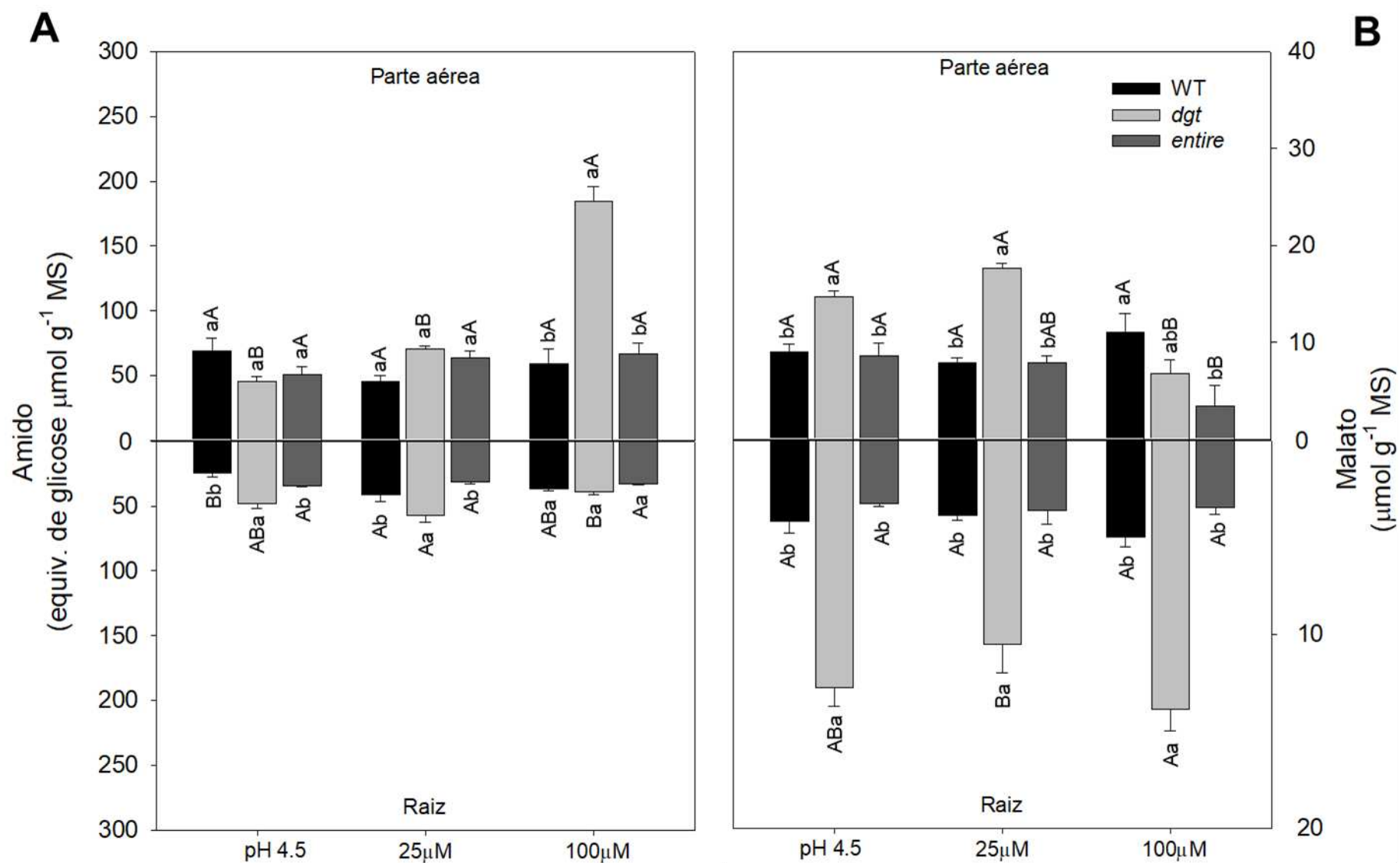


Figura 8 – *Diageotropica* é menos eficaz no uso de energia sob estresse por Al^{3+} , acumulando amido e malato no meio do período de luz. Mudanças nos níveis de amido e malato foram observadas em plantas adultas (35 dag) de tomate com sinalização de auxina aumentada (*entire*) ou reduzida (*diageotropica*, *dgt*) quando comparada com plantas de tipo selvagem (WT) em resposta a estresse por Al^{3+} (25 e 100 μM). **A**) Amido e **B**) Malato na parte aérea e raiz. Os dados são médias \pm SE ($n = 6$). Letras minúsculas comparam genótipos dentro do mesmo tratamento e letras maiúsculas comparam o mesmo genótipo sob diferentes tratamentos. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Com o intuito de melhor compreender o impacto da sinalização diferencial de auxina sobre o metabolismo do carbono e do nitrogênio em resposta às condições de estresse por Al^{3+} , foi realizada uma caracterização do perfil metabólico nas raízes dos genótipos utilizados (Fig.9 e Tabela S1). Para tanto, um protocolo estabelecido mediante a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) foi utilizado (LISEC et al., 2006). Esta análise revelou que, dentre os 43 compostos anotados com sucesso incluindo aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares e intermediários metabólicos, a maioria deles apresentou níveis alterados (Fig. 9 e Tabela S1). De modo geral, foram observadas alterações nos níveis de compostos associados ao metabolismo do carbono e do nitrogênio em função da sinalização diferencial de auxina e em função do estresse por Al aos quais as plantas foram submetidas (Fig. 9 e Tabela S1).

De maneira específica, pequenas diferenças foram observadas entre plantas WT e plantas *entire* na ausência de estresse; todavia, em plantas mutantes *dgt*, 13 dos aminoácidos individuais foram significativamente aumentados, a saber, alanina, arginina, aspartato, β -alanina, fenilalanina, GABA, glutamina, homoserina, lisina, metionina, tirosina, treonina e valina (Fig. 9 e Tabela S1). Da mesma forma, os níveis de aconitato, glicerato, gluconato, malato e succinato também foram maiores em *dgt* que nos outros genótipos, na ausência de estresse por Al^{3+} (Fig. 9 e Tabela S1). Os açúcares frutose, idose, glicose e sacarose, bem como os açúcares alcoólicos, glicerol, manitol, manose e mio-inositol seguiram o mesmo comportamento e foram maiores em *dgt* na ausência de estresse (Fig. 9 e Tabela S1). Não obstante, plantas *dgt* foram também caracterizadas por reduções significativas nos níveis de 7 aminoácidos (e.g. arginina, aspartato, β -alanina, fenilalanina, homoserina, lisina e metionina) quando expostas ao estresse por Al (Fig. 9 e Tabela S1). De modo similar, os níveis de maleato, aconitato, gluconato, lactato, malato e succinato foram reduzidos em plantas *dgt* submetidas ao estresse por Al (Fig. 9 e Tabela S1). Registre-se ainda as reduções significativas em frutose, glicose, manitol, mio-inositol e sacarose observadas em plantas *dgt* em resposta ao estresse por Al, principalmente na dose de 100 μM de Al^{3+} (Fig. 9 e Tabela S1). De maneira interessante, os níveis de prolina tendem a aumentar em plantas *dgt* em presença de 25 μM de Al^{3+} quando comparado aos outros genótipos (Fig. 9); em adição, plantas *dgt* em presença de 100 μM de Al^{3+} tendem a aumentar os níveis de serina e treonina (Fig. 9).

Cabe mencionar também que o genótipo *entire* foi caracterizado por um comportamento muito similar ao de plantas WT quando submetido ao estresse por Al e, com

exceção no aumento dos níveis de prolina, todos os demais metabólitos analisados no sistema radicular apresentaram comportamento semelhante entre plantas WT e *entire* (Fig. 9).

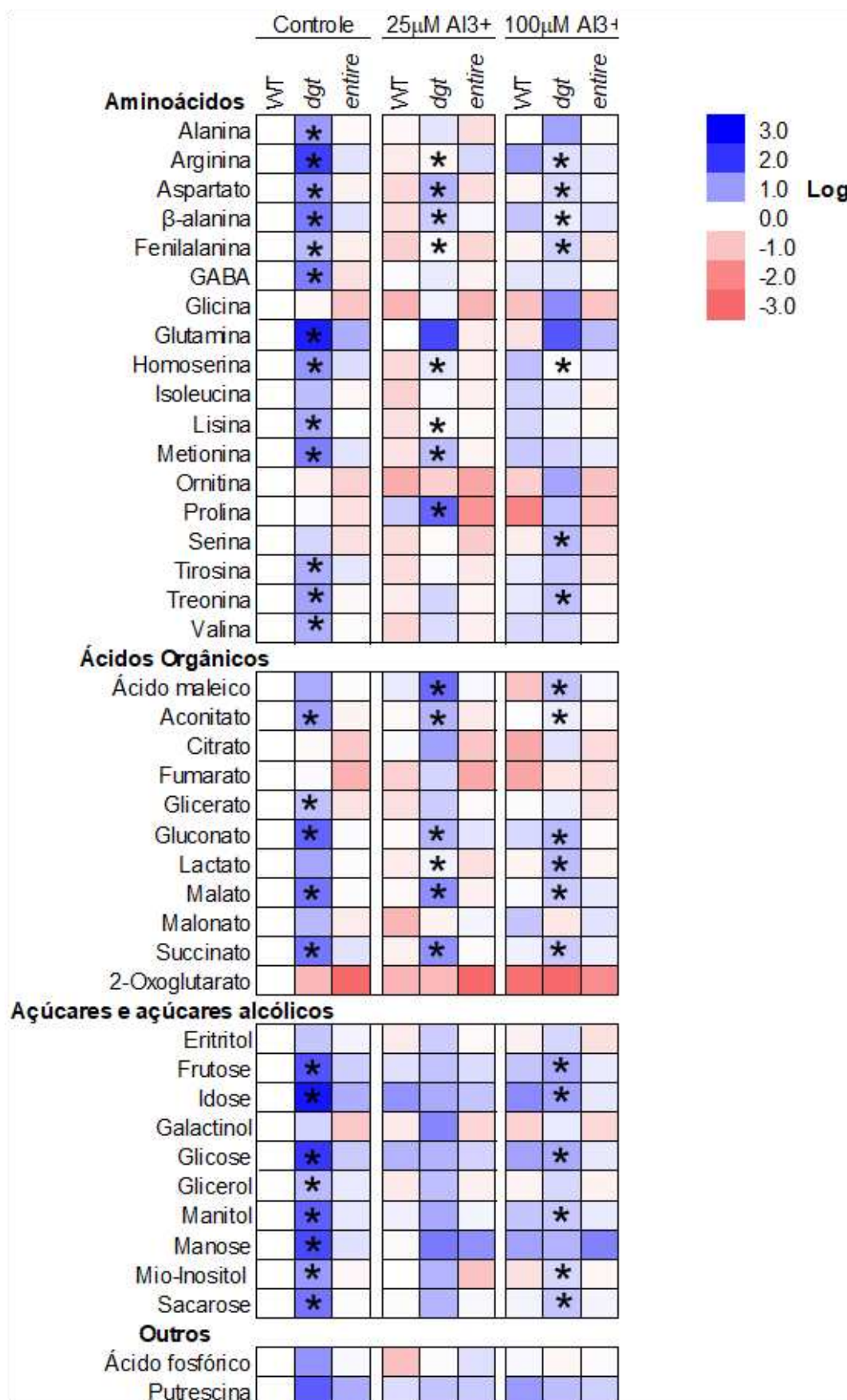


Figura 9: Heat map mostrando o comportamento metabólico em raízes de plantas adultas (35 dag) de tomate com sinalização de auxina reduzida (*diageotropica*, *dgt*) ou aumentada (*entire*) em comparação com o tipo selvagem (WT, tomate cv. Micro-Tom) submetidas a estresse por Al³⁺ (25 μM e 100 μM). Os conjuntos de dados completos desses estudos de perfis metabólicos estão adicionalmente disponíveis na Tabela S1. Os dados são normalizados com relação à resposta média calculada para o WT correspondente. Cores diferentes representam níveis de alteração do metabolito, onde o azul está aumentando e o vermelho está diminuindo. Os valores são apresentados como média ± SE (n = 6). Asteriscos (*) denotam alterações dos metabólitos no mesmo genótipo em diferentes tratamentos.

3.6. Alterações na coloração histoquímica de ROS em genótipos de plantas de tomate sob estresse por Al

Ensaio histoquímico permitiram observar uma coloração distinta com NBT e DAB como uma avaliação qualitativa de superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), respectivamente, na parte aérea e em raízes (Fig. 10A,B) em genótipos de tomateiro (18 dag) com sensibilidade diferencial à auxina. Em geral, em condições controle e em presença de $25 \mu M Al^{3+}$, apenas uma fraca e incipiente coloração após ensaio com NBT e DAB foi observada na parte aérea em todos os genótipos (Fig. 10). Não obstante, na maior concentração ($100 \mu M Al^{3+}$), uma forte e intensa coloração após ensaios com NBT e DAB foi observada em todos os genótipos, particularmente em plantas WT e *entire*, que apresentaram colorações ainda mais intensas (Fig. 10).

Ensaio histoquímico em amostras de raízes possibilitaram observar uma coloração intensa de NBT e DAB ao longo do ápice radicular, mesmo em condições controle (Fig. 10A,B). Todavia, quando expostas ao Al, a cor escura não se mostrou muito maior ao longo do ápice dessas raízes (Fig.10), sugerindo que o acúmulo de ROS (O_2^- e H_2O_2) foi menor em plantas cultivadas em presença de Al, particularmente em plantas *entire* (Fig. 10). Em relação à coloração com DAB, foi possível observar que o ápice radicular em todos os genótipos apresentou uma evidente e intensa coloração, particularmente em presença de $100 \mu M$ de Al^{3+} , indicando que as maiores doses de Al impostas às plantas induzem uma superprodução de ROS (Fig. 10B).

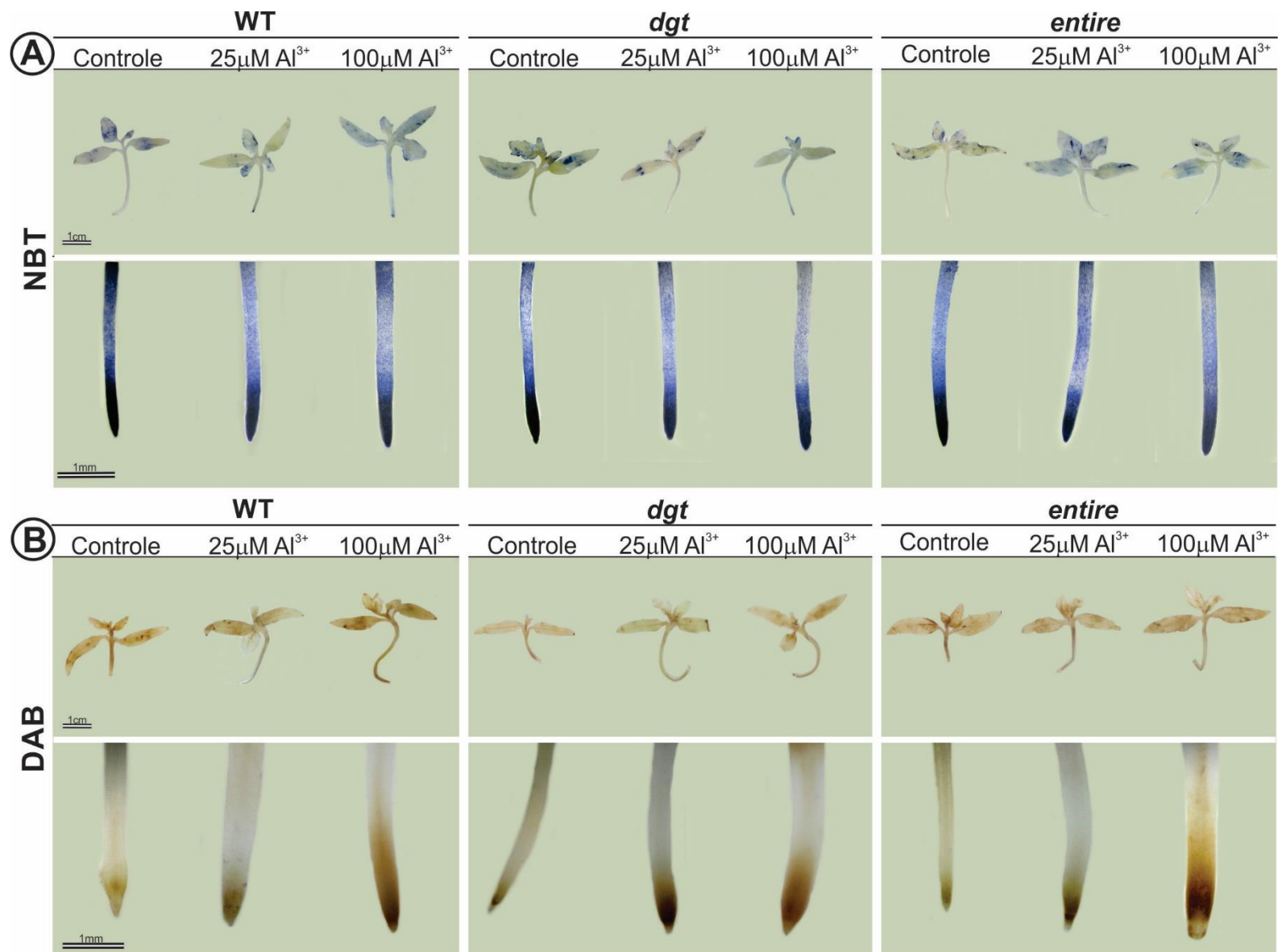


Figura 10: Ensaio histoquímico de espécies reativas de oxigênio (ROS) de plantas jovens (18 dag) de tomate com sinalização reduzida de auxina (*diageotropica*, *dgt*) ou aumentada (*entire*), sob diferentes concentrações de Al³⁺ (25 e 100 μ M), em comparação com o tipo selvagem (WT, tomate cv. Micro-Tom). **A)** Imagens de O₂⁻ (NBT) parte aérea e raiz; **B)** Imagens de H₂O₂ (DAB) parte aérea e raiz, coradas de plantas no controle e expostas ao estresse por Al por 4 dias. Barra de escala: 1 cm; 1 mm. DAB, tetrahydrocloroeto de diaminobenzidina; NBT, tetrazólio nitrozul.

3.7. Influência do Al no ciclo celular em genótipos de planta de tomate

A paralisação do ciclo celular e os danos ao DNA são as principais alterações resultantes da toxicidade do Al em nível celular. Neste contexto, proteínas associadas ao reparo de DNA são ativadas sob estresse por Al, mediando o bloqueio do ciclo celular e, em última instância, alterando a endoploidia do DNA radicular (EEKHOUT; LARSEN; DE VEYLDER, 2017; SJOGREN; BOLARIS; LARSEN, 2015). Embora diferenças no crescimento sejam observadas tanto na parte aérea quanto no sistema radicular entre os genótipos de tomateiro (18 dag) com sensibilidade diferencial à auxina utilizados, não se observaram diferenças no conteúdo de DNA nuclear (Fig. 11). Não obstante, na maior dose de Al (100 μ M), foi possível observar que todos os genótipos apresentaram uma diminuição do conteúdo percentual de DNA de núcleos 2C (Fig. 11). Cabe mencionar que núcleos 2C referem-se a núcleos de células diploides nas fases G0/G1 do ciclo celular. Ao mesmo tempo, foi possível observar um aumento dos núcleos 4C e 8C, quando comparado a condição controle (Fig. 11). Cumpre ressaltar que os núcleos 4C se referem a núcleos de células diploides em G2/M do ciclo celular e núcleos de células tetraploides nas fases G0/G1 do ciclo celular ao passo que núcleos 8C se referem a células tetraploides em G2/M do ciclo celular e núcleos de células octaploides nas fases G0/G1 do ciclo celular.

No entanto, os gráficos gerados a partir dos núcleos radiculares, foram observados conteúdo relativo de DNA 2C e 4C. Em todos os genótipos observamos um aumento de núcleos 2C e uma diminuição dos núcleos 4C quando exposto ao estresse em 100 μ M de Al (Fig. 11).

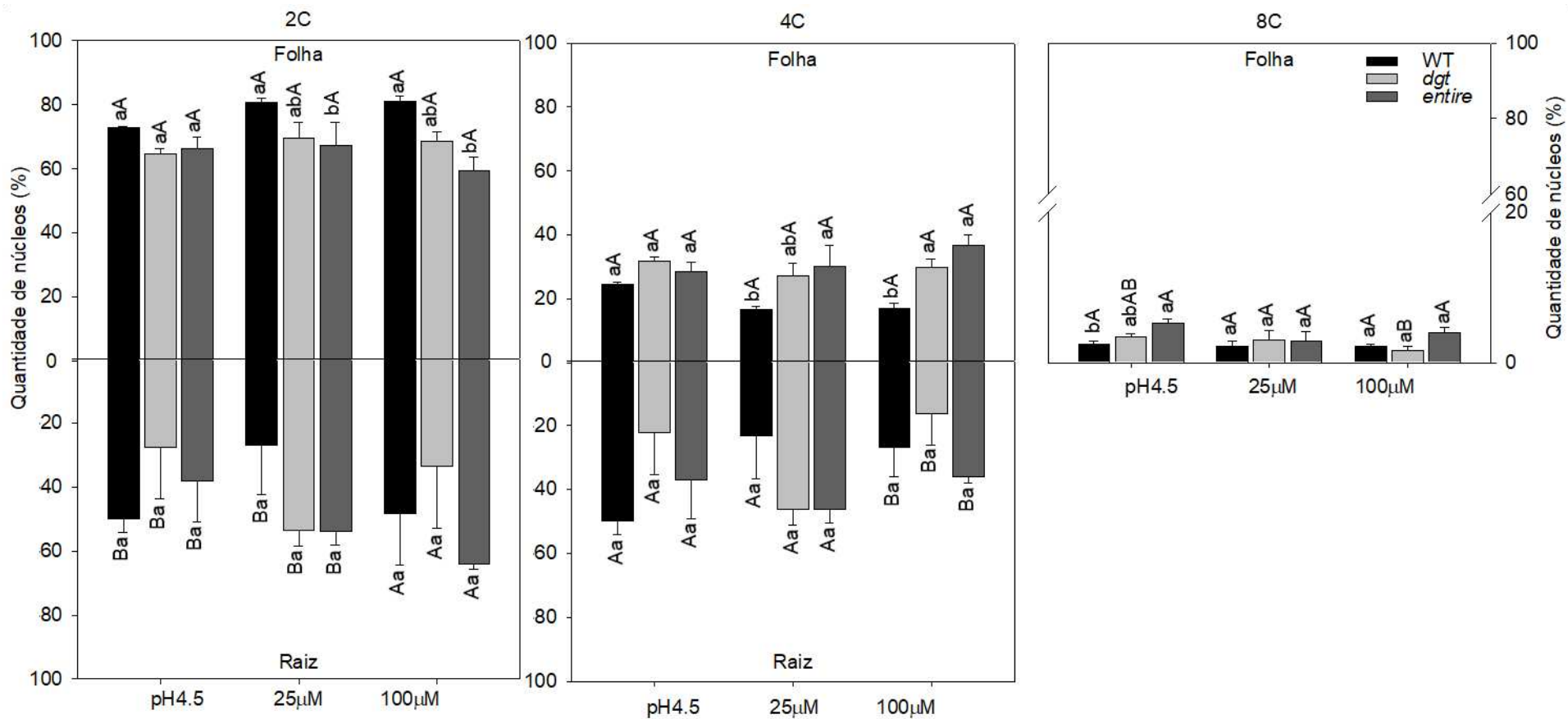


Figura 11: Análise de citometria de fluxo do conteúdo de DNA nuclear de folha e raiz de plantas jovens (18 dag) de tomate com sinalização reduzida de auxina (*diageotropica*, *dgt*) ou aumentada (*entire*), sob diferentes concentrações de Al^{3+} (25 e 100 μM), em comparação com o tipo selvagem (WT, tomate cv. Micro-Tom). Os dados são médias \pm SE (n=4). Letras minúsculas comparam genótipos dentro do mesmo tratamento e letras maiúsculas comparam o mesmo genótipo sob diferentes tratamentos. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

Embora a inibição do crescimento radicular modulada pelo Al^{3+} pareça interagir com a sinalização por auxina (KOLLMEIER; FELLE; HORST, 2000; KOPITTKE, 2016; ZHANG et al., 2018), os impactos metabólicos dessa interação não foram ainda demonstrados. Os resultados aqui obtidos demonstram que, em resposta ao estresse por Al, as mudanças no crescimento em dois genótipos exibindo sinalização diferencial de auxina (reduzida - *dgt* ou aumentada - *entire*), parecem ser mediadas por uma extensa reprogramação metabólica devido aos impactos diferenciais no crescimento radicular. Nesse contexto, o menor efeito inibitório no crescimento radicular observado no genótipo *entire* (Fig. 1 e 2) indica que a maior sinalização nos ápices radiculares mediada por auxina sustenta o crescimento radicular sob estresse por Al em tomateiro. Evidências adicionais sobre o papel do transporte polar de auxina na regulação do crescimento radicular induzida por Al são ainda necessárias.

A auxina modula o crescimento vegetal impactando vários processos, tais como fotossíntese e respiração (BATISTA-SILVA et al., 2018; IVANOVA et al., 2014; POONAM et al., 2015). O estresse por Al também afeta a fotossíntese em espécies distintas (AKAYA; TAKENAKA, 2001; MATTIELLO et al., 2014; ZHANG et al., 2007). Em consonância, os resultados aqui obtidos demonstram que parâmetros fotossintéticos foram afetados na presença de Al^{3+} (Tabela I). Assim, tanto em *dgt* quanto em *entire* aumentos na respiração no escuro (R_d) foram observados em função dos aumentos na concentração de Al^{3+} , provavelmente, numa tentativa de manutenção da produção de energia em presença de Al. Associado a redução do crescimento radicular e aos níveis de espécies reativas de oxigênio, levando danos principalmente a mitocôndria, é plausível sugerir que esse efeito tenha sido mediado, ao menos em parte, pela atividade das vias alternativas da respiração. Cumpre mencionar também que a oxidase alternativa afeta positivamente o crescimento e a tolerância à diversas condições de estresse, apesar de reduzir o rendimento energético e a eficiência do uso de carbono da respiração (VANLERBERGHE et al., 2020). Por outro lado, a auxina aumenta indiretamente a taxa respiratória, por meio do aumento do suprimento de ADP, promovendo uma rápida utilização de ATP (FRENCH; BEEVERS, 1953) tanto na expansão como na divisão celular (LEONOVA et al., 1985). Por sua vez, plantas *dgt* apresentaram menor taxa de fotossíntese líquida

(A_N), respiração no escuro (R_d) e taxa de transporte de elétrons (ETR) em condições controle, mas um aumento na eficiência intrínseca no uso da água (WUE_i) quando exposto a 100 μM de Al (Tabela I). Tais resultados corroboram com os de Batista-Silva et al. (2018), onde a sinalização reduzida de auxina (dgt) aumenta a densidade estomática em ambos os lados da superfície foliar, resultando em maior eficiência do uso da água.

O metabolismo respiratório está fortemente ligado à tolerância e resistência ao Al em uma variedade de contextos e de tecidos vegetais (NUNES-NESI et al., 2014). Ademais, a auxina atua diretamente como um repressor do acúmulo de amido, controlando negativamente a expressão da ADP-glicose pirofosforilase de maneira antagônica à citocinina (MIYAZAWA et al., 1999). Registre-se que plantas dgt parecem usar menos amido transitório durante a noite, levando ao acúmulo significativo de diferentes substratos respiratórios (por exemplo, açúcares e ácidos orgânicos), o que culmina em menor crescimento durante o estágio vegetativo (BATISTA-SILVA et al., 2018). Acúmulos de açúcares são usualmente observados concomitante com a inibição de crescimento (CASPAR; HUBER; SOMERVILLE, 1985; SMITH; STITT, 2007; STITT et al., 2007). Os resultados aqui obtidos demonstram aumentos nos níveis de açúcares redutores (Fig. 7) e de amido (Fig. 8A) na parte aérea de plantas dgt expostas ao Al, indicando que o menor crescimento observado nessas plantas possa estar associado, ao menos em parte, com uma menor capacidade de mobilização de carbono para o crescimento. Em adição, a toxicidade ao Al^{3+} prejudica o metabolismo do amido e dos açúcares e favorece o acúmulo de hexoses ao aumentar as atividades das enzimas hidrolíticas de sacarose em plântulas de arroz (MISHRA; DUBEY, 2008). Os resultados aqui descritos também demonstram que em raízes de plantas dgt , aumentos nos níveis de aminoácidos, proteínas, sacarose e malato (Fig. 6;7C;8B), dando suporte a hipótese de uma reduzida mobilização de carbono para sustentar o crescimento nessas plantas. Assim, alterações nos níveis de malato na parte aérea em ambos genótipos dgt e *entire*, quando expostos a 100 μM de Al (Fig. 8B), pode ser explicado, ao menos em parte, por uma redução na operação do ciclo TCA ou reações Biosintética dos aminoácidos (ARAÚJO et al., 2010).

As plantas apresentam vários mecanismos que possibilitam a tolerância e exclusão em resposta ao estresse por Al (KOCHIAN et al., 2015). Um desses

mecanismos de tolerância é associado à exclusão do Al mediado pela exsudação de ácidos orgânicos que promovem a quelatação do Al (DE LA FUENTE et al., 1997), evitando assim sua captação através da membrana plasmática. Todavia, a exsudação de ácidos orgânicos, por si só, não é um mecanismo de resistência ou tolerância, mas sim resultado das reações bioquímicas necessárias para a tolerância ao Al (NUNES-NESI et al., 2014). Nesse contexto, a análise do perfil metabólico demonstrou reduções significativas de alguns ácidos orgânicos (e.g. malonato, aconitato, gluconato, lactato, malato e succinato) (Fig. 9; Tabela S1), associadas à reduções de alguns aminoácidos e açúcares em raízes de plantas *dgt* expostas ao Al (Fig. 9; Tabela S1). Tomados em conjunto, tais resultados sugerem que plantas *dgt* possam estar consumindo aminoácidos (e.g. arginina, aspartato, β -alanina, fenilalanina, homoserina, lisina e metionina) e açúcares (e.g. frutose, glicose, manitol, mio-inositol e sacarose) para produzir ácidos orgânicos em uma tentativa de compensar o fluxo metabólico que é, aparentemente, essencial para a complexação extracelular do Al via exsudação de ácidos orgânicos (SINGH et al., 2009). Em contraste, as pequenas mudanças metabólicas observadas em plantas *entire* e WT podem ser explicadas, ao menos parcialmente, pela manutenção nos níveis dos intermediários do ciclo TCA ou mesmo nos aminoácidos envolvidos no metabolismo do nitrogênio, como também observado anteriormente (BATISTA-SILVA et al., 2018). No entanto, estes mesmos genótipos, apresentam aumentos em prolina em presença de 100 μ M de Al (Fig. 9; Tabela S1). Plantas sob estresse são usualmente caracterizadas por uma elevada produção de prolina que, além de conferir tolerância ao estresse *per se*, desempenha papel como quelante metálico e mantém concentrações de espécies reativas de oxigênio (ROS) dentro de intervalos aceitáveis evitando, assim, a explosão oxidativa nas plantas (HAYAT et al., 2012).

Diversas evidências tem demonstrado que mecanismos de toxicidade por Al associados à membrana plasmática da raiz e a parede celular afetam o arranjo dessas estruturas, causando danos significativos no sistema radicular (HORST; WANG; ETICHA, 2010; SUN et al., 2016; YANG et al., 2011). De fato, os resultados anatômicos aqui obtidos fornecem evidências que a toxicidade por Al promoveu desarranjos nos núcleos celulares bem como citoplasma colapsado em todos os genótipos em resposta à maior concentração de Al (Figura 4). Em adição, em presença de 100 μ M de Al^{3+} , tanto plantas WT quanto *entire* não apresentaram

diferenciação celular, indicando que a divisão celular está comprometida e prejudicando, assim, o alongamento radicular (Fig. 4J,N). Cabe mencionar também que para uma melhor compreensão dos impactos do estresse por Al tanto na divisão e diferenciação celular quanto no alongamento radicular em plantas com respostas diferenciais da sinalização de auxina estudos envolvendo um detalhamento anatômico aprofundado bem como análises de expressão gênica são ainda necessários.

A absorção de Al torna a parede celular mais rígida reduzindo a expansão celular e extensibilidade mecânica (LIU et al., 2019; YU et al., 2015). Nesse contexto, o acúmulo de Al observado principalmente nos núcleos celulares, citoplasma e na parede celular (Fig. 4E-O) indica uma expansão desigual das células culminando em estresse mecânico que, conseqüentemente, modifica a organização e estrutura dos tecidos periféricos da raiz. Registre-se, ainda, que após a exposição ao Al, em algumas espécies incluindo feijão-caupi (KOPITTKKE; BLAMEY; MENZIES, 2008), milho (SOUZA et al., 2016) e soja (KOPITTKKE et al., 2015), o acúmulo de Al também alterou a organização e estrutura das células da coifa radicular. Foi possível observar também que esse acúmulo de Al, observado após colorações com hematoxilina, ocorre principalmente nos ápices radiculares em todos os genótipos na maior concentração de Al (Fig. 3). Saliente-se também uma coloração menos intensa observada em plantas *entire* em presença de 25 μ M de Al (Fig. 3C), indicando que a maior sinalização de auxina nesse genótipo facilita, ao menos em parte, um menor acúmulo de Al na raiz ao mesmo tempo que sustenta um maior crescimento radicular e favorecendo, ainda que parcialmente, uma maior tolerância ao estresse por Al.

Em resposta a vários estresses, sejam bióticos ou abióticos, a ocorrência de estresse oxidativo é usualmente observada como consequência de um desbalanço entre a geração e a remoção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (KOHLENER et al., 2009). Em consonância, a maior coloração histoquímica com DAB e NBT tanto na parte aérea quanto na raiz, em todos os genótipos expostos ao Al (Fig. 10), indicam que o estresse oxidativo ocorre independentemente da sinalização de auxina. Não obstante, o metabolismo oxidativo parece estar provavelmente envolvido no alongamento da raiz (LISZKAY; VAN DER ZALM; SCHOPFER, 2004). Assim, foi também demonstrado que ROS, em conjunto com a auxina, têm papel importante na ativação do ciclo celular em células foliares diferenciadas (FEHER et al., 2008). Evidências adicionais obtidas nesse mesmo trabalho demonstram ainda que o

estresse oxidativo (ROS) acelera a entrada no ciclo celular (G0/G1) mediada por auxina e pode, portanto, ter um efeito positivo na maquinaria do ciclo celular vegetal (FEHER et al., 2008). Aqui, observou-se um aumento no conteúdo de DNA de núcleos foliares (4C e 8C) em todos os genótipos, quando expostos a 100 μ M de Al (Fig. 11). Uma vez que as ROS atuam também na resistência ao estresse por Al, esse aumento no conteúdo de DNA sugere um potencial envolvimento entre a sinalização de auxina e ROS nos mecanismos de defesa ao estresse induzido por Al na planta. No entanto, nossos dados gerados a partir dos núcleos radiculares, em que se observaram aumentos de núcleos celulares 2C e uma diminuição de 4C em todos genótipos quando exposto a 100 μ M de Al (Fig. 11) indicam que a significância da sinalização mediada por auxina na divisão celular e seus possíveis danos no processo de replicação do DNA permanecem ainda sobremodo obscuras. Portanto, estudos futuros são ainda necessários para um melhor entendimento desses comportamentos bem como da influência do Al em associação com a sinalização por auxina.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados aqui obtidos apresentam novas perspectivas sobre como a inibição do crescimento radicular modulada pela toxicidade ao Al interage com a sinalização de auxina, controlando não apenas o crescimento vegetal, mas também ajustando o metabolismo central e impactando, simultaneamente, o metabolismo fotossintético e respiratório bem como respostas anatômicas e o ciclo celular. Tomados em conjunto, os resultados ora apresentados indicam que a inibição do alongamento radicular em resposta ao Al acontece rapidamente após o estresse em plantas jovens (18 dag), ao mesmo tempo que culmina em impactos severos na produção de ROS e no ciclo celular comprometendo, em larga extensão, o crescimento dessas plantas. Registre-se, ainda, que tais efeitos são mantidos, ou mesmo exacerbados, em plantas adultas (35 dag), tendo em vista os impactos nos metabolismos fotossintéticos e respiratórios associados às mudanças no metabolismo central incluindo o uso de reservas (e.g. açúcares, aminoácidos, proteínas e amido). Saliente-se também que mesmo acumulando maiores níveis de Al, plantas *entire* (genótipo mais tolerante) minimizam os efeitos metabólicos negativos causados pelo Al³⁺ tanto em plantas jovens (18 dag) quanto adultas (35 dag).

Em resumo, os resultados ora apresentados demonstram que alterações na sinalização de auxina parecem modular também importantes respostas ao estresse por Al. Coletivamente, uma melhor compreensão dos mecanismos utilizados pelos genótipos de tomate com sinalização diferencial de auxina para evitar, ou ao menos minimizar, a toxicidade do Al, principalmente na região do alongamento radicular, foram demonstrados. Não obstante, estudos visando elucidar os mecanismos de absorção de Al em resposta à sinalização diferencial de auxina, incluindo mudanças na expressão de genes envolvidos nas respostas ao Al (SOG1, ATR, ATM), bem como genes centrais do metabolismo de auxina (IAA9 e DGT) sob estresse, são ainda necessários. Ademais, tais aspectos devem ter importância crucial na regulação de aspectos anatômicos, moleculares e fisiológicos que são, aparentemente, importantes para mediar o crescimento e função das plantas particularmente para fins agrônômicos. Em síntese, a modulação das vias de sinalização de auxina parece, portanto, fornecer uma oportunidade para alterar o desempenho de culturas de

interesse agrônomo quando cultivadas em solos ácidos em resposta ao estresse por Al^{3+} .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKAYA, M.; TAKENAKA, C. Effects of aluminum stress on photosynthesis of *Quercus glauca* Thumb. **Plant and Soil**, v. 237, n. 1, p. 137–146, 2001.
- ALLWOOD, J. W. et al. Separating the Inseparable: The Metabolomic Analysis of Plant–Pathogen Interactions. **Methods in Molecular Biology**, v. 860, p. 31–49, 2012.
- ARAÚJO, W. L. et al. Identification of the 2-Hydroxyglutarate and Isovaleryl-CoA dehydrogenases as alternative electron donors linking lysine catabolism to the electron transport chain of Arabidopsis mitochondria. **Plant Cell**, v. 22, n. 5, p. 1549–1563, 2010.
- ARUNAKUMARA, K. K. I. U.; WALPOLA, B. C.; YOON, M. H. Aluminum toxicity and tolerance mechanism in cereals and legumes - A review. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 56, n. 1, p. 1–9, 2013.
- BALBI, V.; LOMAX, T. L. Regulation of early tomato fruit development by the Diageotropica gene. **Plant Physiology**, v. 131, n. 1, p. 186–197, 2003.
- BALUSKA, F. et al. Root apex transition zone: A signalling-response nexus in the root. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 7, p. 402–408, 2010.
- BATISTA-SILVA, W. et al. Self-pruning acts synergistically with diageotropica to guide auxin responses and proper growth form. **Plant Physiology**, v. 176, n. 4, p. 2904–2916, 2018.
- BATISTA-SILVA, W. et al. The role of amino acid metabolism during abiotic stress release. **Plant, Cell & Environment**, v. 42, n. 5, p. 1630–1644, 2019.
- BIAN, M. et al. Molecular approaches unravel the mechanism of acid soil tolerance in plants. **Crop Journal**, v. 1, n. 2, p. 91–104, 2013.
- BILLOU, I. et al. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. **Nature**, v. 433, n. 7021, p. 39–44, 2005.
- BORGO, L. et al. Antioxidant performance and aluminum accumulation in two genotypes of *Solanum lycopersicum* in response to low pH and aluminum availability and under their combined stress. **Scientia Horticulturae**, v. 259, p. 108813, 2020.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- CARVALHO, R. F. et al. Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: “Micro-Tom” as an effective toolkit for plant development research. **Plant methods**, v. 7, n. 1, p. 18, 2011.
- CASPAR, T.; HUBER, S. C.; SOMERVILLE, C. Alterations in Growth, Photosynthesis,

and Respiration in a Starchless Mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Deficient in Chloroplast Phosphoglucomutase Activity. **Plant Physiology**, v. 79, n. 1, p. 11–17, 1985.

CRUZ, C. D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 35, n. 3, p. 271–276, 2013.

DAVIES, P. J. **Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!** [s.l.] Springer, 2004.

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

EEKHOUT, T.; LARSEN, P.; DE VEYLDER, L. Modification of DNA Checkpoints to Confer Aluminum Tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 2, p. 102–105, 2017.

ENDERS, T. A.; STRADER, L. C. Auxin activity: Past, present, and future. **American Journal of Botany**, v. 102, n. 2, p. 180–196, 2015.

FEHER, A. et al. The involvement of reactive oxygen species (ROS) in the cell cycle activation (G0-to-G1 transition) of plant cells. **Plant Signaling & Behavior**, v. 3, n. 10, p. 823–826, 2008.

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

FERNIE, A. R. et al. Recommendations for reporting metabolite data. **Plant Cell**, v. 23, n. 7, p. 2477–2482, 2011.

FRENCH, R. C.; BEEVERS, H. Respiratory and Growth Responses Induced By Growth Regulators and Allied Compounds. **American Journal of Botany**, v. 40, n. 9, p. 660–666, 1953.

FURLAN, F. et al. Aluminum-induced stress differently modifies *Urochloa* genotypes responses on growth and regrowth: root-to-shoot Al-translocation and oxidative stress. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 30, n. 2, p. 141–152, 2018.

GALBRAITH, D. W. Rapid Flow Cytometric Analysis of the Cell Cycle in Intact Plant Tissues. **Laboratory Procedures and their Applications**, v. 220, p. 1049–1051, 1983.

GIAVENO, C. D.; MIRANDA FILHO, J. B. Rapid screening for aluminum tolerance in maize (*Zea mays* L.). **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p. 847–850, 2000.

HASEGAWA, J. et al. Auxin decreases chromatin accessibility through the TIR1/AFBs auxin signaling pathway in proliferative cells. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.

HAYAT, S. et al. Role of proline under changing environments: A review. **Plant**

Signaling and Behavior, v. 7, n. 11, p. 1–11, 2012.

HOAGLAND, D.; ARNON, D. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment Station**, n. Circular 347, p. 39, 1950.

HORST, W. J.; WANG, Y.; ETICHA, D. The role of the root apoplast in aluminium-induced inhibition of root elongation and in aluminium resistance of plants: A review. **Annals of Botany**, v. 106, n. 1, p. 185–197, 2010.

HORVATH, B. M. et al. Arabidopsis RETINOBLASTOMA RELATED directly regulates DNA damage responses through functions beyond cell cycle control. **The EMBO Journal**, v. 36, n. 9, p. 1261–1278, 2017.

IVANCHENKO, M. G. et al. The cyclophilin a DIAGEOTROPICA gene affects auxin transport in both root and shoot to control lateral root formation. **Development (Cambridge)**, v. 142, n. 4, p. 712–721, 2015.

IVANOVA, A. et al. A functional antagonistic relationship between auxin and mitochondrial retrograde signaling regulates alternative oxidase1a expression in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 165, n. 3, p. 1233–1254, 2014.

JONES, D. L. et al. Spatial coordination of aluminium uptake, production of reactive oxygen species, callose production and wall rigidification in maize roots. **Plant, Cell and Environment**, v. 29, n. 7, p. 1309–1318, 2006.

KOCHIAN, L. V. et al. Plant adaptation to acid soils: The molecular basis for crop aluminum resistance. **Annual Review of Plant Biology**, v. 66, p. 23.1–23.28, 2015.

KOHLER, J. et al. Induction of antioxidant enzymes is involved in the greater effectiveness of a PGPR versus AM fungi with respect to increasing the tolerance of lettuce to severe salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 65, n. 2–3, p. 245–252, 2009.

KOLLMEIER, M.; FELLE, H. H.; HORST, W. J. Genotypical differences in aluminum resistance of maize are expressed in the distal part of the transition zone. Is reduced basipetal auxin flow involved in inhibition of root elongation by aluminum? **Plant Physiology**, v. 122, n. 3, p. 945–956, 2000.

KONG, X. et al. ZmMKK4 regulates osmotic stress through reactive oxygen species scavenging in transgenic tobacco. **Plant Cell Reports**, v. 30, n. 11, p. 2097–2104, 2011.

KONG, X. et al. The Root Transition Zone: A Hot Spot for Signal Crosstalk. **Trends in Plant Science**, v. 23, n. 5, p. 403–409, 2018.

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

KOPITTKE, P. M. Role of phytohormones in aluminium rhizotoxicity. **Plant Cell and Environment**, v. 39, n. 10, p. 2319–2328, 2016.

KOPITTKE, P. M.; BLAMEY, F. P. C.; MENZIES, N. W. Toxicities of soluble Al, Cu, and La include ruptures to rhizodermal and root cortical cells of cowpea. **Plant and Soil**, v. 303, n. 1–2, p. 217–227, 2008.

KOPKA, J. et al. GMD@CSB.DB the Golm Metabolome Database. **Bioinformatics**, v. 21, n. 8, p. 1635–1638, 2004.

KRAMER, E. M.; BENNETT, M. J. Auxin transport: a field in flux. **Trends in Plant Science**, v. 11, n. 8, p. 382–386, 2006.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. In: **Edur**. [s.l.: s.n.]. p. 198.

KUKACHKA, B. F.; MILLER, R. B. A Chemical spot-test for aluminum and its value in wood identification. **IAWA Bulletin**, v. 1, n. 3, p. 104–109, 1980.

LEONOVA, L. A. et al. Promotion of Respiration by Auxin in the Induction of Cell Division in Suspension Culture. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 4, p. 169–176, 1985.

LISEC, J. et al. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 387–396, 2006.

LISZKAY, A.; VAN DER ZALM, E.; SCHOPFER, P. Production of reactive oxygen intermediates (O₂⁻, H₂O₂, and OH) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. **Plant Physiology**, v. 136, n. 2, p. 3114–3123, 2004.

LIU, W. et al. Transient silencing of an expansin HvEXPA1 inhibits root cell elongation and reduces Al accumulation in root cell wall of Tibetan wild barley. **Environmental and Experimental Botany**, v. 165, p. 120–128, 2019.

LOUREIRO, J. et al. Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. **Annals of Botany**, v. 98, n. 3, p. 679–689, 2006.

MA, J. F. et al. Isolation and characterization of a rice mutant hypersensitive to Al. **Plant and Cell Physiology**, v. 46, n. 7, p. 1054–1061, 2005.

MATTIELLO, L. 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, n. 12, p. 8107–8116, 2014.

MISHRA, P.; DUBEY, R. S. Effect of aluminium on metabolism of starch and sugars in growing rice seedlings. **Acta Physiol Plant**, v. 30, n. 3, p. 265–275, 2008.

MIYAZAWA, Y. et al. Auxin and cytokinin have opposite effects on amyloplast development and the expression of starch synthesis genes in cultured Bright Yellow-2 Tobacco cells. **Plant Physiology**, v. 121, n. 2, p. 461–469, 1999.

MUDAY, G. K.; LOMAX, T. L.; RAYLE, D. L. Characterization of the growth and auxin

physiology of roots of the tomato mutant, diageotropica. **Planta**, v. 195, n. 4, p. 548–553, 1995.

NAGAYAMA, T. et al. Changes in the Distribution of Pectin in Root Border Cells Under Aluminum Stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1–8, 2019.

NUNES-NESI, A. et al. Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. **Plant Journal**, v. 50, n. 6, p. 1093–1106, 2007.

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

OTTO, F. DAPI Staining of Fixed Cells for High-Resolution Flow Cytometry of Nuclear DNA. **Methods in Cell Biology**, v. 33, p. 105–110, 1990.

PAPONOV, I. A. et al. The PIN auxin efflux facilitators: Evolutionary and functional perspectives. **Trends in Plant Science**, v. 10, n. 4, p. 170–177, 2005.

POONAM et al. Role of various hormones in photosynthetic responses of green plants under environmental stresses. **Current protein & peptide science**, v. 16, n. 5, p. 435–449, 2015.

PORRA, R. J.; THOMPSON, W. 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**, v. 975, n. 3, p. 384–394, 1989.

PRAÇA-FONTES, M. M. et al. Revisiting the DNA C-values of the genome size-standards used in plant flow cytometry to choose the “best primary standards”. **Plant Cell Reports**, v. 30, n. 7, p. 1183–1191, 2011.

RICE, M. S.; LOMAX, T. L. **The auxin-resistant diageotropica mutant of tomato responds to gravity via an auxin-mediated pathway** *Planta*, 2000.

ROESSNER, U. et al. Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. **Plant Cell**, v. 13, n. 1, p. 11–29, 2001.

SINGH, R. et al. An ATP and oxalate generating variant tricarboxylic acid cycle counters aluminum toxicity in *Pseudomonas fluorescens*. **PLoS ONE**, v. 4, n. 10, p. 1–9, 2009.

SJOGREN, C. A.; BOLARIS, S. C.; LARSEN, P. B. Aluminum-dependent terminal differentiation of the Arabidopsis root tip is mediated through an ATR-, ALT2-, and SOG1-Regulated transcriptional response. **Plant Cell**, v. 27, n. 9, p. 2501–2515, 2015.

SMITH, A. M.; STITT, M. Coordination of carbon supply and plant growth. **Plant, Cell and Environment**, v. 30, n. 9, p. 1126–1149, 2007.

SMITH, E.; NAIK, D.; CUMMING, J. R. Genotypic variation in aluminum resistance, cellular aluminum fractions, callose and pectin formation and organic acid accumulation in roots of *Populus* hybrids. **Environmental and Experimental Botany**, v. 72, n. 2, p. 182–193, 2011.

SOUZA, L. T. et al. Effects of aluminum on the elongation and external morphology of root tips in two maize genotypes. **Bragantia**, v. 75, n. 1, p. 19–25, 2016.

STITT, M. et al. Multilevel genomics analysis of carbon signalling during low carbon availability: Coordinating the supply and utilisation of carbon in a fluctuating environment. **Functional Plant Biology**, v. 34, n. 6, p. 526–549, 2007.

SUN, C. et al. Decreasing methylation of pectin caused by nitric oxide leads to higher aluminium binding in cell walls and greater aluminium sensitivity of wheat roots. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 3, p. 979–989, 2016.

SUN, P. et al. Aluminium-induced inhibition of root elongation in *Arabidopsis* is mediated by ethylene and auxin. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 2, p. 347–356, 2010.

SWARUP, R. et al. Root gravitropism requires lateral root cap and epidermal cells for transport and response to a mobile auxin signal. **Nature Cell Biology**, v. 7, n. 11, p. 1057–1065, 2005.

TEALE, W. D.; PAPONOV, I. A.; PALME, K. Auxin in action: Signalling, transport and the control of plant growth and development. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 11, p. 847–859, 2006.

VANLERBERGHE, G. C. et al. Photosynthesis, respiration and growth: A carbon and energy balancing act for alternative oxidase. **Mitochondrion**, v. 52, n. February, p. 197–211, 2020.

VANNESTE, S.; FRIML, J. Auxin: A Trigger for Change in Plant Development. **Cell**, v. 136, n. 6, p. 1005–1016, 2009.

WANG, H. et al. The tomato Aux/IAA transcription factor IAA9 is involved in fruit development and leaf morphogenesis. **Plant Cell**, v. 17, n. 10, p. 2676–2692, 2005.

WANG, P. et al. Auxin enhances aluminium-induced citrate exudation through upregulation of GmMATE and activation of the plasma membrane H⁺-ATPase in soybean roots. **Annals of Botany**, v. 118, n. 5, p. 933–940, 2016a.

WANG, S. et al. Aluminium-induced reduction of plant growth in alfalfa (*Medicago sativa*) is mediated by interrupting auxin transport and accumulation in roots. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–13, 2016b.

YANG, J. L. et al. Cell wall hemicellulose contributes significantly to aluminum adsorption and root growth in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 155, n. 4, p. 1885–1892, 2011.

YANG, Z. et al. Synergistic action of auxin and cytokinin mediates aluminum-induced root growth inhibition in Arabidopsis . **EMBO reports**, v. 18, n. 7, p. 1213–1230, 2017.

YEMM, E. W.; COCKING, E. C.; RICKETTS, R. E. The determination of amino-acids with ninhydrin. **The Analyst**, v. 80, n. 948, p. 209–214, 1955.

YU, Y. et al. Elevation of arginine decarboxylase-dependent putrescine production enhances aluminum tolerance by decreasing aluminum retention in root cell walls of wheat. **Journal of Hazardous Materials**, v. 299, p. 280–288, 2015.

ZHANG, X. BIN et al. Effect of Al in soil on photosynthesis and related morphological and physiological characteristics of two soybean genotypes. **Botanical Studies**, v. 48, n. 4, p. 435–444, 2007.

ZHANG, M. et al. Auxin efflux carrier ZmPGP1 mediates root growth inhibition under aluminum stress. **Plant Physiology**, v. 177, n. 2, p. 819–832, 2018.

ZHU, X. F. et al. Coordination between apoplastic and symplastic detoxification confers plant aluminum resistance. **Plant Physiology**, v. 162, n. 4, p. 1947–1955, 2013.

ZOBEL, R. W. Some Physiological Characteristics of the Ethylene-requiring Tomato Mutant Diageotropica. **Plant Physiology**, v. 52, n. 4, p. 385–389, 1973.

APÊNDICE

Tabela S1- Mudança no perfil metabólico de raízes de plantas adultas (35 dag) de tomate com sinalização de auxina reduzida (*diageotropica*, *dgt*) ou aumentada (*entire*) em comparação com o tipo selvagem (WT, tomate cv. Micro-Tom) submetidas a estresse por Al³⁺ (25 µM e 100 µM). Os dados foram normalizados em relação à resposta média calculada a partir do WT. Os valores são apresentados como média ± SE (n = 6). Letras minúsculas comparam genótipos dentro do mesmo tratamento e letras maiúsculas comparam o mesmo genótipo sob diferentes tratamentos. As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Aminoácidos	Controle			25µM de AlCl			100µM de AlCl		
	WT	<i>dgt</i>	<i>entire</i>	WT	<i>dgt</i>	<i>entire</i>	WT	<i>dgt</i>	<i>entire</i>
Alanina	66.68 ± 6.70 Aab	132.51 ± 24.66 Aa	60.37 ± 7.57 Ab	63.64 ± 14.37 Aa	79.56 ± 10.83 Aa	46.57 ± 6.73 Aa	67.01 ± 7.65 Aa	125.60 ± 48.42 Aa	64.53 ± 8.77 Aa
Arginina	15.04 ± 5.78 Ab	55.45 ± 18.72 Aa	17.72 ± 2.85 Ab	13.93 ± 3.40 Aa	13.76 ± 4.80 Ba	19.68 ± 4.65 Aa	28.17 ± 6.74 Aa	18.75 ± 5.21 Ba	16.99 ± 6.30 Aa
Aspartato	38.14 ± 5.87 Ab	75.44 ± 8.27 Aa	32.24 ± 4.01 Ab	28.93 ± 5.48 Ab	63.46 ± 6.66 ABa	26.29 ± 4.68 Ab	33.59 ± 4.59 Aa	49.96 ± 15.01 Ba	41.74 ± 4.75 Aa
β-alanina	6.87 ± 1.23 Ab	16.98 ± 2.80 Aa	8.73 ± 1.45 Ab	5.32 ± 0.94 Aa	9.77 ± 1.35 Ba	7.32 ± 1.61 Aa	10.32 ± 1.77 Aa	7.85 ± 1.70 Ba	8.26 ± 0.72 Aa
Fenilalanina	17.31 ± 2.19 Ab	27.60 ± 1.71 Aa	14.12 ± 2.02 Ab	10.12 ± 1.01 Aa	18.08 ± 1.78 Ba	10.78 ± 1.62 Aa	15.22 ± 2.23 Aab	23.58 ± 6.06 ABa	12.70 ± 1.13 Ab
GABA	38.14 ± 5.87 Ab	241.40 ± 83.04 Aa	74.30 ± 10.72 Ab	92.68 ± 27.45 Aa	114.81 ± 29.69 Aa	85.85 ± 23.44 Aa	118.40 ± 22.11 Aa	123.27 ± 50.13 Aa	96.73 ± 22.73 Aa
Glicina	34.66 ± 10.78 Aa	31.73 ± 2.80 Aa	17.88 ± 2.68 Aa	14.68 ± 2.46 Aa	38.31 ± 13.14 Aa	14.67 ± 1.91 Aa	17.22 ± 0.91 Aa	76.01 ± 52.24 Aa	17.56 ± 1.63 Aa
Glutamina	1.02 ± 0.15 Ab	4.75 ± 0.68 Aa	1.68 ± 0.45 Ab	1.14 ± 0.19 Ab	3.61 ± 0.57 Aa	0.81 ± 0.26 Ab	0.74 ± 0.14 Ab	3.22 ± 1.05 Aa	1.61 ± 0.42 Aab
Homoserina	4.69 ± 1.07 Ab	9.71 ± 1.73 Aa	6.06 ± 1.57 Aab	3.36 ± 0.95 Aa	5.53 ± 0.78 ABa	3.93 ± 0.81 Aa	7.24 ± 1.34 Aa	4.80 ± 1.41 Ba	5.22 ± 0.94 Aa
Isoleucina	28.37 ± 5.00 Aa	44.23 ± 6.15 Aa	25.07 ± 6.30 Aa	18.16 ± 3.68 Aa	29.71 ± 2.64 Aa	23.85 ± 5.09 Aa	38.52 ± 9.67 Aa	33.70 ± 9.66 Aa	24.53 ± 4.30 Aa
Lisina	5.87 ± 1.11 Ab	10.56 ± 1.78 Aa	5.85 ± 1.47 Ab	4.39 ± 1.18 Aa	6.00 ± 1.06 Ba	5.55 ± 1.32 Aa	7.77 ± 1.24 Aa	6.31 ± 1.36 ABa	5.49 ± 0.91 Aa
Metionina	1.51 ± 0.37 Ab	3.62 ± 0.72 Aa	1.83 ± 0.37 Ab	1.20 ± 0.30 Aa	2.37 ± 0.38 ABa	1.34 ± 0.26 Aa	2.19 ± 0.33 Aa	2.01 ± 0.56 Ba	1.73 ± 0.28 Aa
Ornitina	4.59 ± 1.59 Aa	3.88 ± 0.49 Aa	2.70 ± 0.65 Aa	1.94 ± 0.49 Aa	2.67 ± 0.49 Aa	1.65 ± 0.30 Aa	2.62 ± 0.38 Aa	8.48 ± 5.65 Aa	2.29 ± 0.33 Aa
Prolina	181.03 ± 74.80 Aa	189.11 ± 72.85 Aa	111.68 ± 57.41 Aa	220.95 ± 131.84 Aab	515.01 ± 249.94 Aa	52.81 ± 11.25 Ab	44.40 ± 11.34 Aa	275.59 ± 125.71 Aa	92.70 ± 54.76 Aa
Serina	66.04 ± 12.36 Aa	87.82 ± 9.64 Aa	45.41 ± 5.37 Aa	44.23 ± 2.87 Aa	63.53 ± 8.73 Aa	36.67 ± 4.36 Aa	53.96 ± 8.39 Aab	105.10 ± 46.74 Aa	43.35 ± 3.81 Ab
Tirosina	24.38 ± 3.89 Aa	42.25 ± 7.65 Aa	28.00 ± 6.80 Aa	16.95 ± 4.32 Aa	25.48 ± 4.97 Aa	19.08 ± 4.12 Aa	28.38 ± 4.27 Aa	34.89 ± 10.61 Aa	18.48 ± 2.41 Aa
Treonina	28.73 ± 3.92 Ab	54.18 ± 3.29 Aa	26.37 ± 3.19 Ab	24.46 ± 3.70 Aa	38.30 ± 3.45 Aa	25.37 ± 4.29 Aa	33.90 ± 6.63 Aab	43.93 ± 10.54 Aa	25.92 ± 1.96 Ab
Valina	53.74 ± 9.14 Ab	92.72 ± 10.67 Aa	51.38 ± 10.52 Ab	36.89 ± 6.24 Aa	68.30 ± 5.71 Aa	45.34 ± 8.78 Aa	69.96 ± 15.84 Aa	70.76 ± 14.69 Aa	49.53 ± 5.53 Aa
Ácidos Orgânicos									
Ácido Maleico	13.73 ± 2.65 Aa	24.57 ± 3.13 ABa	11.90 ± 3.20 Aa	13.81 ± 5.44 Ab	37.74 ± 10.31 Aa	14.59 ± 3.74 Ab	6.90 ± 2.19 Aa	20.59 ± 3.68 Ba	14.55 ± 4.37 Aa
Aconitato	0.77 ± 0.18 Ab	1.48 ± 0.28 Aa	0.65 ± 0.05 Ab	0.67 ± 0.09 Ab	1.29 ± 0.32 ABa	0.61 ± 0.08 Ab	0.76 ± 0.08 Aa	0.86 ± 0.08 Ba	0.70 ± 0.12 Aa
Citrato	159.30 ± 60.94 Aa	150.50 ± 42.93 Aa	73.24 ± 50.57 Aa	139.68 ± 53.59 Aa	302.58 ± 140.35 Aa	83.18 ± 50.90 Aa	59.01 ± 20.17 Aa	194.35 ± 78.56 Aa	104.69 ± 67.74 Aa
Fumarato	7.15 ± 4.23 Aa	7.38 ± 0.73 Aa	2.73 ± 0.40 Aa	3.94 ± 1.33 Aab	9.53 ± 2.63 Aa	2.64 ± 0.26 Ab	2.57 ± 0.40 Aa	5.33 ± 1.25 Aa	4.91 ± 1.90 Aa
Glicerato	6.66 ± 2.10 Aab	10.18 ± 2.43 Aa	4.44 ± 1.03 Ab	5.06 ± 0.43 Aa	9.43 ± 2.25 Aa	6.18 ± 1.05 Aa	6.57 ± 1.17 Aa	7.48 ± 0.93 Aa	4.83 ± 0.98 Aa
Gluconato	0.47 ± 0.08 Ab	1.36 ± 0.31 Aa	0.48 ± 0.07 Ab	0.43 ± 0.05 Aa	0.78 ± 0.12 Ba	0.57 ± 0.13 Aa	0.62 ± 0.05 Aa	0.76 ± 0.14 Ba	0.45 ± 0.03 Aa
Lactato	48.21 ± 10.27 Ab	87.83 ± 11.50 Aa	44.12 ± 3.66 Ab	39.95 ± 5.02 Aa	52.37 ± 6.54 Ba	33.78 ± 5.47 Aa	42.74 ± 7.70 Ab	76.41 ± 13.01 ABa	42.54 ± 8.50 Ab
Malato	100.57 ± 17.03 Ab	260.20 ± 23.05 Aa	93.91 ± 11.51 Ab	95.67 ± 20.40 Ab	216.61 ± 33.82 Aa	84.68 ± 7.46 Aa	105.28 ± 11.01 Aa	144.08 ± 31.36 Ba	118.25 ± 14.41 Aa
Malonato	4.36 ± 1.14 Aa	7.03 ± 0.90 Aa	3.71 ± 0.62 Aa	3.04 ± 1.19 Aa	3.83 ± 0.73 Aa	4.69 ± 1.16 Aa	6.49 ± 1.51 Aa	3.32 ± 0.79 Aa	5.28 ± 1.81 Aa
Succinato	214.79 ± 32.83 Ab	545.25 ± 57.52 Aa	256.10 ± 20.53 Ab	204.51 ± 24.56 Ab	456.36 ± 57.00 Aa	208.44 ± 33.48 Ab	238.85 ± 20.05 Aa	307.96 ± 45.42 Ba	241.63 ± 34.63 Aa
2-Oxoglutarato	7.25 ± 5.99 Aa	3.19 ± 0.76 Aa	1.35 ± 0.13 Aa	2.67 ± 1.82 Aa	3.24 ± 0.83 Aa	0.94 ± 0.20 Aa	1.40 ± 0.38 Aa	0.96 ± 0.27 Aa	1.93 ± 0.56 Aa
Açúcares e açúcares alcóolicos									
Eritritol	0.76 ± 0.13 Aa	1.12 ± 0.05 Aa	0.77 ± 0.11 Aa	0.62 ± 0.08 Aa	1.07 ± 0.18 Aa	0.71 ± 0.10 Aa	0.65 ± 0.13 Aa	1.00 ± 0.30 Aa	0.54 ± 0.06 Aa
Frutose	244.19 ± 52.28 Ab	781.76 ± 210.46 Aa	337.03 ± 50.05 Ab	294.25 ± 62.31 Aa	369.66 ± 68.65 Ba	308.79 ± 54.18 Aa	360.08 ± 63.35 Aa	432.16 ± 74.74 Ba	280.67 ± 30.60 Aa
Idose	13.85 ± 3.84 Ab	68.07 ± 33.52 Aa	22.69 ± 10.62 Ab	25.35 ± 9.81 Aa	24.72 ± 5.80 Aa	20.74 ± 8.11 Aa	30.49 ± 8.18 Aa	26.19 ± 5.20 Aa	16.30 ± 2.83 Aa
Galactinol	13.45 ± 5.23 Aa	17.99 ± 7.20 Aa	6.11 ± 4.06 Aa	9.13 ± 4.40 Aa	30.74 ± 17.12 Aa	8.55 ± 4.60 Aa	8.00 ± 2.65 Aa	15.62 ± 6.07 Aa	8.61 ± 3.70 Aa
Glicose	97.74 ± 26.17 Ab	381.66 ± 154.78 Aa	137.47 ± 48.79 Ab	144.94 ± 44.41 Aa	164.54 ± 36.28 Ba	130.96 ± 42.48 Aa	182.87 ± 40.68 Aa	175.11 ± 34.37 ABa	114.59 ± 18.42 Aa
Glicerol	71.13 ± 6.00 Ab	113.60 ± 6.81 Aa	80.63 ± 6.70 Aab	62.97 ± 7.73 Ab	109.92 ± 19.37 Aa	60.15 ± 9.40 Ab	62.79 ± 8.15 Aa	92.82 ± 13.27 Aa	61.36 ± 6.00 Aa
Manitol	2.31 ± 0.33 Ab	6.87 ± 1.34 Aa	2.67 ± 0.29 Ab	2.46 ± 0.35 Aa	4.14 ± 0.63 Ba	2.49 ± 0.50 Aa	3.42 ± 0.45 Aa	3.37 ± 0.43 Ba	2.67 ± 0.42 Aa
Manose	5.09 ± 1.24 Ab	17.64 ± 3.98 Aa	6.72 ± 1.36 Ab	4.46 ± 1.48 Aa	12.59 ± 3.69 Aa	10.86 ± 4.17 Aa	9.52 ± 1.89 Aa	8.58 ± 3.59 Aa	12.01 ± 4.56 Aa
Mio-Inositol	135.77 ± 20.03 Ab	268.52 ± 54.78 Aa	116.61 ± 14.52 Ab	128.32 ± 28.66 Aab	227.33 ± 51.68 Aa	67.91 ± 6.62 Ab	95.04 ± 16.88 Aa	178.11 ± 20.55 Aa	121.54 ± 19.93 Aa
Sacarose	301.46 ± 20.16 Ab	770.86 ± 85.27 Aa	301.16 ± 25.46 Ab	288.02 ± 8.16 Ab	503.51 ± 58.29 Ba	317.62 ± 25.57 Ab	325.00 ± 23.72 Aa	450.03 ± 36.48 Ba	323.21 ± 18.11 Aa
Outros									
Ácido Fosfórico	227.79 ± 96.02 Ab	476.92 ± 96.09 Aa	252.46 ± 52.77 Aab	155.54 ± 61.67 Aa	231.03 ± 73.16 Ba	283.61 ± 82.23 Aa	240.86 ± 12.64 Aa	204.24 ± 71.20 Ba	233.19 ± 48.18 Aa
Putrescina	20.61 ± 7.15 Ab	62.21 ± 19.13 Aa	40.87 ± 9.56 Aab	25.12 ± 12.39 Aa	30.98 ± 8.68 Aa	29.59 ± 9.38 Aa	40.88 ± 9.24 Aa	32.43 ± 15.52 Aa	28.43 ± 5.51 Aa