

WELDER ALVES DA SILVA

**RELAÇÕES COORDENADAS ENTRE CICLO TCA E CICLO CELULAR EM
CÉLULAS ESPECÍFICAS EM RESPOSTA AO ALUMÍNIO EM *Arabidopsis thaliana***

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

Orientador: Wagner Luiz Araújo

VIÇOSA – MINAS GERAIS

2020

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

T

S586r
2020
Silva, Welder Alves da, 1992-
Relações coordenadas entre ciclo TCA e ciclo celular em
células específicas em resposta ao alumínio em *Arabidopsis
thaliana* / Welder Alves da Silva. – Viçosa, MG, 2020.
55 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Wagner Luiz Araújo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.38-46.

1. Plantas - Efeito do alumínio. 2. Alumínio - Toxicologia.
3. Plantas - Metabolismo. 4. Ciclo celular. 5. Histoquímica. 6.
Arabidopsis thaliana - Efeito do stress. I. Universidade Federal
de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de
Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22. ed. 572.475


WELDER ALVES DA SILVA


RELAÇÕES COORDENADAS ENTRE CICLO TCA E CICLO CELULAR EM
CÉLULAS ESPECÍFICAS EM RESPOSTA AO ALUMÍNIO EM *Arabidopsis thaliana*

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

APROVADA: 06 de novembro de 2020.

Assentimento:


Welder Alves da Silva
Autor


Wagner Luiz Araújo
Orientador

AGRADECIMENTOS

A Deus e à Nossa Senhora Aparecida, pelo caminho entregue a mim e por me abençoarem nele.

À Universidade Federal de Viçosa, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pelo apoio.

Aos meus pais, Célia e João Bosco, pelo amor, dedicação e por serem exemplos de luta e superação. A luta é por vocês e a vitória é de vocês!

Aos meus avós, Terezinha e Antônio, meus segundos pais, pelo imensurável apoio, carinho e dedicação. Sem vocês, o caminho teria sido muito mais árduo!

Aos amigos do futebol (pelada G.O.), especialmente Dalton, João Antônio, Carlos e Gabriel (privilegiado), pelos momentos inesquecíveis compartilhados (resenhas, churrascos, festas, despedidas, etc.). Vocês foram fundamentais nessa trajetória!

Aos companheiros de laboratório, Roberto, Marcelo, Thiago e Kaik, pela grande ajuda. Um agradecimento muitíssimo especial à Dora! Muito obrigado pelo fundamental apoio, pelo companheirismo e pelo exemplo de dedicação e caráter. “Você concorda comigo, Dora?”

Ao meu primeiro e atual orientador, professor Wagner L. Araújo, por me aceitar em seu grupo de pesquisa, pela orientação, pelo companheirismo, pelos momentos de descontração (ainda maiores com o Cruzeiro na série A2) e pela confiança. Foi uma honra para mim!

Ao professor Adriano Nunes Nesi, por ter aberto as portas da sua sala, no dia 20/01/2014, e assim permitido que a minha pequena história na Fisiologia Vegetal fosse iniciada.

Aos professores Cléberon Ribeiro, Fábio DaMatta, Samuel Martins, Adriano Nesi, Dimas Ribeiro, Denise Bazzolli e Wagner Araújo, pelos ensinamentos transmitidos durante as disciplinas.

À equipe do Núcleo de Microscopia e Microanálise e em especial à Christiane, pela ajuda no processo de genotipagem dos materiais vegetais.

Aos funcionários Claudedir, Rogério, Luciene, Reginaldo, Guilherme, Zé Antônio, Carlos, Toninho e Chiquinho, pelo grande suporte e carinho.

Ao meu tio Geraldo (Marreco), pela ajuda e, principalmente, pelos inúmeros momentos de alegria e descontração compartilhados.

A todos os demais (funcionários de limpeza, da parte elétrica, do fornecimento de água, do fornecimento dos materiais laboratoriais, da manutenção, do setor de alimentação, do

fornecimento de internet, porteiros, secretários, etc.) que, direta ou indiretamente, contribuíram com seus esforços para a realização da minha pesquisa.

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

RESUMO

SILVA, Welder Alves da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2020. **Relações coordenadas entre ciclo TCA e ciclo celular em células específicas em resposta ao alumínio em *Arabidopsis thaliana***. Orientador: Wagner Luiz Araújo.

A maioria dos estudos demonstrando os mecanismos pelos quais as plantas resistem à presença do alumínio (Al) estão associados à contribuição de ácidos orgânicos (AOs). Com efeito, pouco ou nada parece ter sido explorado acerca de como células radiculares específicas modulam sua expressão gênica para lidar com tal condição. Não obstante, trabalhos anteriores revelam que, na presença de Al, uma resposta central é a reprogramação do ciclo dos ácidos tricarbóxicos (ciclo TCA). Ademais, agentes genotóxicos, incluindo o Al, induzem pausas no ciclo celular para que as células tenham tempo para reparar o DNA danificado e não transmiti-lo às células-filha. No entanto, pouco ou nada se sabe acerca de como o Al conecta o reparo do DNA ao metabolismo mitocondrial, bem como e em que extensão essa conexão impacta nas divisões celulares na presença do Al. Portanto, o presente estudo avaliou aspectos-chaves dos ciclos TCA e celular em *Arabidopsis thaliana*, em um nível pós-transcricional e célula-específico de expressão gênica, responsáveis por conferir resistência ao Al. Buscou-se, também, investigar se o perfil de metabólitos na raiz inteira está mais intimamente correlacionado às análises de expressão gênica observadas nas células corticais, comprometidas com a proteção do órgão, ou nas células do centro quiescente, comprometidas com a sobrevivência e a manutenção da identidade das demais células. Para tanto, foram utilizadas plantas de *Arabidopsis thaliana* expressando a construção *p:GFP-FLAG-RPL18*, e com promotores individuais (i) *Cauliflower mosaic virus 35S (p35S:FLAG-RPL18)*, quase constitutivo; (ii) *plastid endopeptidase (pPEP:FLAG-RPL18)*, específico do córtex radicular das zonas de alongamento e maturação; e (iii) *SCARECROW (pSCR:FLAG-RPL18)*, específico do centro quiescente e endoderme radicular. Os resultados ora obtidos apontam que, nas linhas transgênicas *p35S* e *pSCR*, a presença de Al alterou a expressão de genes envolvidos com o ciclo celular, ao passo que foram verificadas alterações na expressão de genes envolvidos com o ciclo TCA em todas as linhas, especialmente na *pPEP*. Tais resultados estão em consonância com as mudanças verificadas nas três linhas no que tange ao perfil de metabólitos, destacadamente o de AOs. Em adição, ao se investigar o transloma de células com identidades distintas, foi possível observar que: (i) a expressão gênica é, aparentemente, regulada diferencialmente de acordo com essa identidade (*status* de diferenciação celular, função celular, etc.) e (ii) a expressão gênica célula-específica,

particularmente em células indiferenciadas (centro quiescente e endoderme) e diferenciadas (zona cortical das regiões de alongamento e maturação) explica, em larga extensão, como plantas de *Arabidopsis* respondem à presença de Al mediante uma reprogramação da expressão gênica em grupos específicos de células radiculares. Tomados em conjunto, estes resultados sugerem uma alta plasticidade, a nível metabólico e de expressão gênica célula-específica, como importante componente das respostas ao Al em *Arabidopsis thaliana*.

Palavras-chave: Alumínio. Translatoma. Célula-específico. Ciclo TCA. Ciclo celular.

ABSTRACT

SILVA, Welder Alves da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2020. **Coordinated relationships between TCA cycle and cell cycle in specific cells in response to aluminum in *Arabidopsis thaliana*.** Adviser: Wagner Luiz Araújo.

Although compelling evidence demonstrate the mechanisms by which plants cope with aluminum (Al), mostly associated with the contribution of organic acids (OAs), little is currently known concerning how specific root cells modulate their gene expression in response to such condition. It has been previously demonstrated that, in the presence of Al, a central response is the reprogramming of the tricarboxylic acid cycle (TCA cycle). In addition, genotoxic agents, including Al, usually induces cell cycle arrest so that the cells have time to repair the damaged DNA and do not transmit it to daughter cells. This fact aside, little or nothing is known about how Al connects DNA repair to mitochondrial metabolism, as well as and to what extent this connection interferes with cell divisions in the presence of Al. Here, we evaluated key aspects of both the TCA cycle and the cell cycle in *Arabidopsis thaliana*, at the post-transcriptional and cell-specific levels of gene expression, responsible for conferring Al resistance. We further aimed at investigating whether whole root metabolite profile is more closely correlated to gene expression observed in cortical cells, compromised with the organ protection, or in the quiescent center cells, compromised with the survival and identity maintenance of the other cells. To this end, we used transgenic *Arabidopsis* plants expressing tagged ribosomes, specifically, the constructs harboring coding sequences of direct cell-type specific expression of FLAG-tagged ribosomal protein L18 (RPL18) that are under the control of (i) cauliflower mosaic virus 35S promoter (*p35S* - near constitutive), (ii) *SCARECROW* (*pSCR* – targeting cells at root endodermis and quiescent center), and (iii) *endopeptidase* (*pPEP* – targeting cells at root cortex elongation and maturation zone). Our results demonstrated that in the presence of Al changes in the expression of genes involved in the cell cycle in both *p35S* and *pSCR* transgenic lines were observed, whereas changes in the expression of TCA cycle related genes were verified in all lines, especially in *pPEP*. These results are in good agreement with the changes in the metabolite profile verified in all lines, especially in OAs. By further analysing the translome of cells with different identities, we observe that: (i) gene expression is, apparently, differently regulated according to cell identity (cell differentiation status, cell function, etc.) and (ii) cell-specific gene expression, particularly in undifferentiated cells (quiescent center and endoderm) and differentiated cells (cortical zone of elongation and

maturation regions) explains, to a large extent, how *Arabidopsis* respond to the presence of Al by reprogramming the gene expression in specific groups of root cells. Collectively, these results suggest a high plasticity, at the metabolic level and of cell-specific gene expression, as important players of the responses to Al in *Arabidopsis thaliana*.

Keywords: Aluminum. Transcriptome. Cell-specific. TCA cycle. Cell cycle

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 MATERIAL E MÉTODOS	16
2.1 Material Vegetal e Condições de Crescimento	16
2.2 Confirmação da Expressão do Transgene	17
2.3 Crescimento Radicular	17
2.4 Detecção Histoquímica.....	17
2.5 Perfil Metabólico	18
2.6 Translatoma	18
2.6.1 Tampões	19
2.6.2 Extração do Tecido	20
2.6.3 Preparo das <i>Beads</i> de Agarose α -FLAG M2.....	20
2.6.4 Imunoprecipitação de Ribossomos	20
2.6.5 Extração de RNA.....	21
2.7 Análises de expressão gênica	22
2.8 Delineamento experimental e análises estatísticas.....	22
3 RESULTADOS	22
3.1 Confirmação da Expressão do Transgene	22
3.2 Detecção Histoquímica do Al	23
3.3 Comprimento Radicular	24
3.4 Perfil Metabólico	25
3.5 Translatoma	28
4 DISCUSSÃO	33
5 CONCLUSÕES	37
6 REFERÊNCIAS	38
7 INFORMAÇÕES SUPLEMENTARES	47

1 INTRODUÇÃO

Em função de sua natureza séssil, as plantas são repetidamente submetidas a vários estresses ambientais, tais como seca, radiação ou toxicidade por íons (Chen et al., 2019). Os solos ácidos, por exemplo, impõem múltiplos estresses às plantas, incluindo toxicidade por prótons, deficiências nutricionais (especialmente cálcio, magnésio e fósforo) e toxicidade por íons metálicos, especialmente alumínio (Al) e manganês (Nunes-Nesi et al., 2014). Junto à limitação hídrica, a fitotoxicidade causada pelo cátion Al trivalente (Al^{3+}), o mais abundante elemento metálico na crosta terrestre (Jin et al., 2020), representa uma séria restrição à produção agrícola, particularmente em solos ácidos (Poschenrieder et al., 2008; Ma, 2000; Kochian et al., 2004; Ryan et al., 2011), que compreendem uma grande proporção das terras aráveis em todo o mundo (Magalhães, 2010; Brunner & Sperisen, 2013).

Dois principais mecanismos fisiológicos de tolerância ao Al são, atualmente, reconhecidos: aquele que opera para minimizar o acesso do Al ao ápice radicular e aquele que permite à planta tolerar o acúmulo de Al no simplasma radicular ou de parte aérea (Nunes-Nesi et al., 2014; Kochian et al., 2015). O mecanismo de tolerância associado à exclusão de Al inclui a exudação de ácidos orgânicos (AOs), como citrato, malato e oxalato, ativada pela presença de Al no ápice radicular, e postula-se que esse exudado forme um quelato com o Al (de la Fuente et al., 1997), prevenindo, assim, a sua absorção através da membrana plasmática (Nunes-Nesi et al., 2014).

Os AOs acima mencionados (citrato, malato e oxalato) foram anteriormente identificados como os principais metabólitos liberados do ápice radicular em resposta ao Al^{3+} (Kochian et al., 2004, 2005). Incrementos na exudação de AOs seguidos à manipulação genética do metabolismo de AOs têm sido extensivamente testados como possíveis meios para aumentar a tolerância ao Al (Nunes-Nesi et al., 2014). Por exemplo, aumentos na síntese de citrato podem ser alcançados aumentando as atividades de enzimas envolvidas nas sínteses de citrato e malato, tais como citrato sintase (Deng et al., 2009; Barone et al., 2008; Han et al., 2009), malato desidrogenase (Wang et al., 2010; Tesfaye et al., 2001), enzima málica (Sun et al., 2013) e piruvato fosfato dicinase (Trejo-Tellez et al., 2010). Neste contexto, a reconstrução metabólica de uma nova via para a síntese de citrato pela superexpressão simultânea da citrato sintase e fosfoenolpiruvato carboxilase, em folhas, aumentou a resistência ao Al em plantas (Wang et al., 2012).

Modos não-cíclicos do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (*tricarboxylic acid cycle*, ciclo TCA) têm sido observados em diferentes organismos, levando ao acúmulo de metabólitos específicos, que parecem ser cruciais na adaptação a ambientes hostis (Rocha et al., 2010; Sweetlove et al., 2010; Singh et al., 2009; Lemire et al., 2010). De maneira particular, a operação de um ciclo TCA incompleto tem sido observada nos sistemas microbianos em resposta à toxicidade por Al (Singh et al., 2009; Lemire et al., 2010). Essa estrutura modular do ciclo TCA em *Pseudomonas fluorescens* facilita a produção de ATP, NADPH e oxalato, permitindo a sobrevivência de *P. fluorescens* quando desafiada pela toxicidade do Al (Nunes-Nesi et al., 2014). Ademais, um subconjunto de diferentes microrganismos parece reprogramar o metabolismo de AOs e, mais importante, o ciclo TCA, em resposta ao estresse por Al (Singh et al., 2009; Lemire et al., 2010; Chenier et al., 2008; Auger et al., 2013).

Em *Arabidopsis thaliana*, análises transcriptômicas das respostas de raízes revelaram, surpreendentemente, entre todos os genes relacionados ao ciclo TCA, apenas aumentos na expressão da malato desidrogenase mitocondrial após 48 horas de exposição ao Al (Kumari et al., 2008). No milho (*Zea mays*), os genes envolvidos na biossíntese de AOs não foram diferencialmente regulados após cultivo em solo ácido, sendo a única exceção a regulação negativa do gene que codifica para a citrato sintase na presença de Al em um genótipo sensível ao Al (Mattiello et al., 2010). Neste contexto, a tolerância ao Al em milho (Maron et al., 2008) e *Arabidopsis* (Kumari et al., 2008) parece não estar diretamente ligada a aumentos na expressão de genes que codificam enzimas responsáveis pela biossíntese de AOs, mas, possivelmente, a uma expressão diferencial de transportadores. Em conjunto, tais resultados indicam que a biossíntese de ânions orgânicos em resposta ao Al pode não necessariamente ser transcricionalmente regulada, e que a regulação do ciclo TCA é, provavelmente, o resultado de uma complexa interação de vários níveis regulatórios, como recentemente sugerido (Nunes-Nesi et al., 2014).

De modo geral, todos os organismos sofrem vários tipos de danos no DNA devido tanto a processos endógenos quanto à exposição aos estresses exógenos ou compostos tóxicos (Ciccina & Elledge, 2010; Manova & Gruszka, 2015). Dentre esses danos, quebras na dupla-fita do DNA (*double-strand breaks*, DSBs) são particularmente perigosas tendo em vista que nenhuma fita permanece intacta para guiar o reparo do DNA levando, potencialmente, a deleções e translocações cromossômicas (Aguilera & García-Muse, 2013; Rodgers & McVey, 2016). Para lidar com esse dano, existem mecanismos para detectar as lesões no DNA e iniciar a resposta ao dano no DNA (*DNA damage response*, DDR) (Ciccina & Elledge, 2010; Hu et al., 2016). Tal

resposta envolve a regulação transcricional e pós-transcricional de diversas vias celulares levando, finalmente, ao reparo do DNA através (i) da expressão e/ou direcionamento de fatores de reparo aos sítios de dano, (ii) à pausa do ciclo celular, que fornece tempo adicional para o reparo do DNA antes da replicação, ou (iii) à morte celular quando o dano é muito severo (Hu et al., 2016; Su, 2006). Dada a importância da manutenção da estabilidade do genoma para a adequada função celular e herança fiel da informação genética (Ciccía & Elledge, 2010; Manova & Gruszka, 2015; Aguilera & García-Muse, 2013; Hu et al., 2016), é fundamental entender como a DDR é iniciada, coordenada e executada.

Estudos em leveduras, plantas e mamíferos têm revelado muitos aspectos altamente conservados da DDR (Su, 2006; Amiard et al., 2013; Yoshiyama et al., 2013). No caso específico de DSBs, sensores conservados, nomeadamente os complexos MRN e Ku70/80, reconhecem o DNA danificado, ao passo que transdutores, incluindo as cinases *ATAXIA-TELANGIECTASIA MUTATED* (ATM) e *ATAXIA-TELANGIECTASIA MUTATED AND RAD3-RELATED* (ATR), iniciam as cascatas de sinalização através da modificação pós-traducional de proteínas-alvo (Ciccía & Elledge, 2010; Yoshiyama et al., 2013; Bleuyard et al., 2006; Shiloh & Ziv, 2013). Tais cascatas modulam as atividades de proteínas efetoras, compartilhadas e organismo-específicas, culminando na regulação do reparo de DSB, por meio de recombinação homóloga e várias vias de junção final não-homóloga, bem como a regulação da expressão gênica, pausa do ciclo celular, morte celular e endoreplicação (Ciccía & Elledge, 2010; Su, 2006; Yoshiyama et al., 2013; Knoll et al., 2014).

O fator de transcrição (FT) *SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE 1* (SOG1), específico de plantas, mostrou ser o principal regulador da DDR (Yoshiyama et al., 2009). SOG1 é um membro dos FTs NAC [*NO APICAL MERISTEM (NAM)*, *ARABIDOPSIS TRANSCRIPTION ACTIVATION FACTOR (ATAF)*, *CUP-SHAPED COTYLEDON (CUC)*], reconhecidos por apresentarem diversas funções no controle do desenvolvimento vegetal, incluindo manutenção de células-tronco, formação e senescência de parede celular, além de estar envolvido nas respostas aos estresses bióticos e abióticos (Aida et al., 1997; Kim et al., 2016; Kubo et al., 2005; Puranik et al., 2012). Na ausência de SOG1, plantas de *Arabidopsis* expostas a agentes genotóxicos exibiram defeitos na regulação de genes (Yoshiyama et al., 2009), na pausa no ciclo celular (Preuss & Britt, 2003), na morte celular programada (Furukawa et al., 2010), na endoreduplicação (Adachi et al., 2011), no reparo do DNA (Bourbousse et al., 2018) e na estabilidade do genoma (Yoshiyama et al., 2009; Preuss & Britt, 2003). Em *Arabidopsis*, SOG1 é fosforilado por ATM e ATR. ATM fosforila cinco motivos serina-

glutamina na região C-terminal de SOG1 após exposição às DSBs (Yoshiyama et al., 2013; Sjogren et al., 2015; Yoshiyama et al., 2017). A fosforegulação de SOG1 é importante para transmitir sinais de danos no DNA (Ogita et al., 2018). A inibição do crescimento radicular induzida pelo dano no DNA, a morte de células-tronco e a indução transcricional foram recuperadas pela introdução do gene *SOG1*, intacto, em mutantes *sog1-1*, mas não pela introdução de *SOG1* carregando substituições por alanina nos cinco motivos serina-glutamina (Yoshiyama et al., 2013, 2014).

Os danos no DNA interrompem o ciclo celular para permitir que o reparo do DNA ocorra antes da replicação do DNA ou início da mitose (Harper & Elledge, 2007; Ciccina & Elledge, 2010; Hu et al., 2016). A expressão de inibidores de cinases dependentes de ciclinas (*cyclins-dependent kinases*, CDKs), tais como *SIAMESE-RELATED 5 (SMR5)* e *SIAMESE-RELATED 7 (SMR7)*, é diretamente induzida por SOG1 (Yin et al., 2014; Ogita et al., 2018) (Figura 1). Entretanto, essa indução também ocorre em mutantes de *Arabidopsis* tolerantes às DSBs, sugerindo que a indução de *SMR5* e *SMR7* não seja suficiente para interromper o ciclo celular (Chen et al., 2017).

A supressão simultânea de um conjunto de genes G2/M-específicos é acompanhada pela interrupção na fase G2 induzida por dano no DNA (Adachi et al., 2011). Os genes G2/M-específicos, como aqueles que codificam ciclinas mitóticas, são controlados por FTs Myb, tipo R1R2R3, chamados R1R2R3-Myb ou MYB3R (Ito, 2005). Em *Arabidopsis*, cinco genes codificam para MYB3Rs, *MYB3R1* a *MYB3R5*, onde MYB3R4 atua como um ativador transcricional (*transcriptional activator*, Act-MYB), e MYB3R3 e MYB3R5 são repressores transcricionais (*transcriptional repressor*, Rep-MYB) (Haga et al., 2007, 2011; Kobayashi et al., 2015) (Figura 1). MYB3Rs se ligam aos promotores de genes alvos através de um elemento de ação *cis* chamado elemento ativador específico da mitose (*mitosis-specific activator*, MSA) e controlam a expressão de genes G2/M-específicos (Kobayashi et al., 2015) (Figura 1). Embora os Rep-MYBs sejam ativamente degradados através da via ubiquitina-proteossoma, sob condições de danos no DNA tornam-se estabilizados, suprimindo genes G2/M-específicos e causando interrupção na fase G2 (Chen et al., 2017) (Figura 1). A estabilidade das proteínas Rep-MYBs é dependente da atividade de CDK, que fosforila o domínio C-terminal de MYB3R3/5 e promove suas degradações (Takahashi et al., 2019) (Figura 1). Portanto, um modelo foi proposto em que o dano no DNA leva à fosforilação e ativação de SOG1, reduzindo a atividade de CDK, provavelmente pela indução de genes inibidores de CDK, e estabilizando Rep-MYBs (Chen et al., 2017) (Figura 1). Uma vez que Rep-MYBs reprimem a expressão de

ciclina mitótica, suas estabilizações diminuem ainda mais a atividade de CDK, resultando em pausa do ciclo celular (Takahashi et al., 2019). Foi também recentemente demonstrado que Rep-MYBs funcionam como os principais repressores de genes do ciclo celular na DDR (Bourbousse et al., 2018).

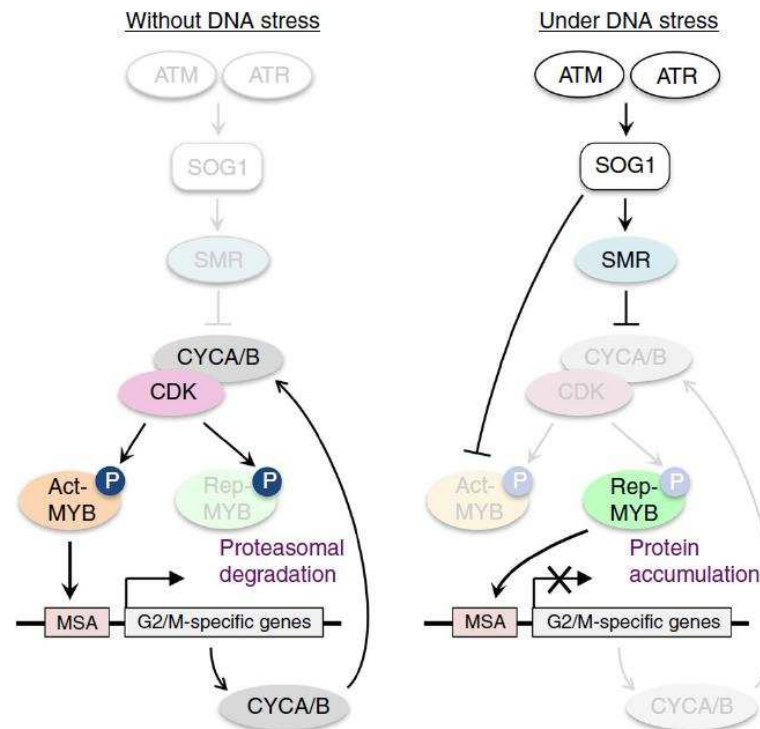


Figura 1: Modelo para a repressão de genes G2/M-específicos sob condições de dano no DNA. Em condições normais, CDK fosforila e ativa Act-MYB, ao passo que fosforila e “marca” Rep-MYB para a degradação proteossomal. Dessa forma, Act-MYB se liga na região promotora de genes do ciclo celular e induz a expressão desses genes. Em presença de dano no DNA, ATM e ATR fosforilam SOG, que por sua vez ativa a expressão de SMR. Assim, SMR bloqueia a ação de CDK, permitindo que Rep-MYB, não degradada, se ligue na região promotora de genes do ciclo celular e reprima a expressão desses genes. Além disso, a proteína Act-MYB, não fosforilada por CDK e, portanto, não ativada, é diretamente inibida por SOG. O nosso trabalho buscou demonstrar se, como e em que extensão o AI, um agente genotóxico, também regula, ao nível de tradução da expressão gênica, os genes envolvidos com essa complexa cascata regulatória. ATM: *ATAXIA-TELANGIECTASIA MUTATED*; ATR: *ATAXIA-TELANGIECTASIA MUTATED AND RAD3-RELATED*; SOG1: *SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE 1*; SMR: *SIAMESE-RELATED*; CYCA/B: *CYCLIN A/B*; CDK: *CYCLIN-DEPENDENT KINASE*; Act-MYB: *Activator-R1R2R3-MYB*; Rep-MYB: *Repressor-R1R2R3-MYB*. Ativação/indução: →; Inibição/repressão: ⊥. Modelo extraído de Chen et al. (2017).

Foi demonstrado também que os FTs ANAC044 e ANAC085, alvos diretos de SOG1, desempenham um papel crucial na interrupção na fase G2 em resposta ao dano no DNA (Takahashi et al., 2019). De maneira resumida, na ausência de ANAC044 ou ANAC085, Rep-

MYBs não se acumulam e, portanto, não podem inibir a progressão G2/M, e assim as plantas exibem tolerância ao dano no DNA. Tanto ANAC044 quanto ANAC085 não são necessários para a indução de genes de reparo do DNA ou inibidores de CDK, mas estão envolvidos no acúmulo de Rep-MYBs (Takahashi et al., 2019). Ambos FTs participam também da inibição, induzida após estresse por calor, da progressão da fase G2, sugerindo que uma via mediada por ANAC044 e ANAC085 desempenha papel central em orquestrar a pausa em G2, induzida por estresse, através do controle no acúmulo de Rep-MYB (Takahashi et al., 2019).

A expansão do entendimento da complexa e orquestrada cascata de respostas transcricionais aos danos no DNA para danos decorrentes das flutuações nos fatores ambientais é de suma importância. Nesse contexto, a construção da rede regulatória subjacente à DDR em plantas submetidas ao Al, um agente genotóxico (Chen et al., 2019), é fundamental para alavancar as pesquisas voltadas ao melhoramento das culturas, especialmente daquelas cultivadas usualmente em solos ácidos.

Na busca por um modelo de alta resolução no que tange à reprogramação da expressão gênica em condições sub-ótimas, dois aspectos devem ser considerados. Primeiro, vários estudos têm demonstrado diferenças quantitativas entre o transcriptoma – o *pool* de mRNAs totais (Mustroph et al., 2013) – e o translátoma – mRNAs associados aos ribossomos (Mustroph et al., 2013) – de plantas, especialmente durante condições de estresse (Kawaguchi et al., 2004; Kawaguchi & Bailey-Serres, 2005; Branco-Price et al., 2005; de Jong et al., 2006; Nicolai et al., 2006; Branco-Price et al., 2008; Piques et al., 2009). Segundo, os estudos de expressão gênica em tipos específicos de células são sobremodo limitados por dificuldades de isolamento sem substancial contaminação de outras células ou tecidos vizinhos (King & Gerber, 2016) (Figura 2). Neste contexto, o translátoma de células radiculares específicas é uma importante ferramenta para desvendar como o metabolismo mitocondrial, particularmente o ciclo TCA, e a via de DDR, com particular ênfase sobre o ciclo celular, são remodelados em células com distintas funções e padrões de expressão gênica, e que, logo, respondem diferencialmente aos diferentes tipos de estresse. Portanto, o presente estudo investigou o comportamento metabólico e transcricional particular em grupo de populações de células específicas visando a identificação de mecanismos para lidar com o estresse por Al. Os resultados obtidos indicam que não apenas o metabolismo de AOs mas também mecanismos de reparo de DNA em grupos específicos de células de raiz são importantes componentes das respostas ao Al em Arabidopsis.

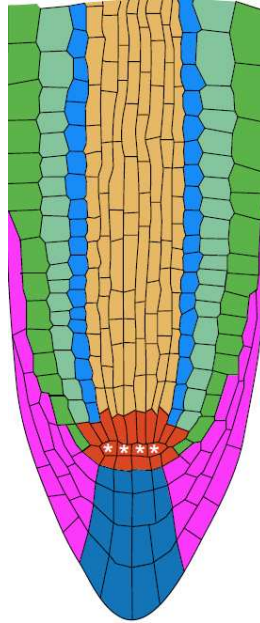


Figura 2: Distribuição espacial de células em raízes de *Arabidopsis thaliana*: diferentes identidades celulares (localização, anatomia, funções, padrões de expressão gênica, grau de diferenciação celular, metabolismo, etc.) sugerem comportamentos particulares, especialmente sob condições de estresse. Aqui, utilizamos promotores específicos [*Cauliflower mosaic virus 35S (p35S:FLAG-RPL18)*, quase constitutivo; *plastid endopeptidase (pPEP:FLAG-RPL18)*, específico do córtex radicular das zonas de alongamento e maturação; e *SCARECROW (pSCR:FLAG-RPL18)*, específico do centro quiescente e endoderme radicular] para elucidar como tipos celulares particulares se comportam, ao nível de expressão gênica, em resposta ao Al. Ênfase especial foi dada a genes associados com os ciclos celular e TCA. Azul escuro: columela (coifa); rosa: células laterais (coifa); vermelho com asterisco (*): centro quiescente; vermelho: população de células-tronco; laranja: procâmbio; azul: endoderme; verde: córtex; verde escuro: epiderme. Extraído de Zhang et al., (2019).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal e Condições de Crescimento

Plantas de *Arabidopsis thaliana*, ecótipo Columbia (Col-0), expressando a construção *p:GFP-FLAG-RPL18*, descritas anteriormente por Mustrup et al. (2009), foram usadas nesse estudo (Tabela Suplementar 1). Promotores individuais foram utilizados para direcionar a expressão da construção mencionada: (i) *Cauliflower mosaic virus 35S (p35S:FLAG-RPL18)*, quase constitutivo; (ii) *plastid endopeptidase (pPEP:FLAG-RPL18)*, específico do córtex radicular das zonas de alongamento e maturação; e (iii) *SCARECROW (pSCR:FLAG-RPL18)*, específico do centro quiescente e endoderme radicular.

As sementes foram esterilizadas em etanol 70% por 1 min e, em seguida, hipoclorito de sódio 2,5% (v/v) por 15 min. Todo o resíduo de hipoclorito de sódio foi removido por lavagens

repetidas (5x) em água estéril. Após essas etapas as sementes foram semeadas em placas de Petri, acondicionadas no escuro a 4°C por dois dias e crescidas verticalmente em meio de cultivo MS sólido (meio MS 0,43% (p/v) e ágar 0,7% (p/v), pH 4,0 (Murashige e Skoog, 1962). Plântulas foram cultivadas em câmara de crescimento em condições controladas, fotoperíodo longo (16 horas luz/8 horas escuro), temperatura de 22°C e 20°C (luz/escuro), umidade relativa de 60% e intensidade luminosa de 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, por dez dias em dois tratamentos impostos: ausência (0 μM) e presença (50 μM) de Al (AlCl_3). Após esse tempo, amostras foram imediatamente coletadas para detecção histoquímica da presença do Al, bem como material foi armazenado em ultrafreezer a -80°C para posteriores análises de perfil metabólico e translato, descritos em detalhes abaixo.

2.2 Confirmação da Expressão do Transgene

A confirmação da expressão das construções *p:GFP-FLAG-RPL18* (*p: promoter; GFP: green fluorescent protein; FLAG-RPL18: FLAG-epitope tagged ribosomal protein L18*) foi realizada através de um Microscópio Confocal de Varredura a Laser Zeiss, LSM510 META. Para tanto, amostras coletadas em plântulas de *Arabidopsis thaliana*, com 7 dias de idade, e crescidas verticalmente sobre meio MS (*Murashige and Skoog*) sólido (meio MS 0,43% (p/v) e ágar 0,7% (p/v), pH 5,7), foram excitadas a 488 nm, e a fluorescência emitida pela proteína fluorescente verde foi detectada a 510 nm. As imagens foram obtidas com o auxílio do Software ZEISS ZEN 3.1 (*blue edition*).

2.3 Crescimento Radicular

Para avaliar o crescimento radicular, imagens foram geradas através do Scanner HP Scanjet G2410 e processadas através do programa ImageJ. As imagens foram obtidas utilizando plântulas de *Arabidopsis thaliana* com 10 dias de idade.

2.4 Detecção Histoquímica

O acúmulo de Al nos ápices radiculares foi analisado pela coloração com hematoxilina férrica (Polle et al., 1978). Após exposição aos tratamentos, as raízes foram mergulhadas em solução de hematoxilina férrica 0,2% (p/v) em NaIO_3 0,02% (p/v) durante 15 min. Para eliminar o excesso de corante, as raízes foram transferidas para recipientes contendo água deionizada e

lavadas por 15 min. Finalmente, as raízes foram coletadas e fotografadas em estereomicroscópio. A reação positiva da hematoxilina com o Al é comprovada pela coloração arroxeada.

2.5 Perfil Metabólico

A extração de metabólitos foi realizada seguindo, essencialmente, um protocolo estabelecido de perfil metabólico baseado em cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (*gas chromatography-mass spectrometry*, GC-MS) (Lisec et al., 2006). Para tanto, aproximadamente 25 mg de tecido radicular homogeneizado foram extraídos em 1.400 μL de água, metanol e clorofórmio (1:2,5:1, v/v/v), e 60 μL de padrão interno (0,2 mg ribitol mL^{-1} água) foram subsequentemente adicionados como padrão de quantificação. As amostras foram incubadas, sob leve agitação, por 30 min a 4°C. Após, as amostras foram centrifugadas por 5 min, a 16.200 g e a 4°C. 1,0 mL do sobrenadante foi recuperado em um novo tubo e misturado com 750 μL de água ultrapura, seguindo uma rápida agitação (10 segundos) e centrifugação por 15 min, a 16.200 g e a 4°C. Após, 200 μL da camada superior (fase polar) foram transferidos para um novo tubo e secados a vácuo. Para derivatização, 40 μL de metoxiamina foram adicionados a cada amostra e agitados por 2 horas, a 16.200 g e a 37°C. Subsequentemente, 70 μL dos padrões de N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida e ésteres metílicos de ácidos graxos foram adicionados às amostras e agitados levemente por 30 min a 37°C. As amostras foram transferidas para frascos de vidro e analisadas utilizando GC-MS. Os cromatogramas e o espectro de massa gerado foram avaliados usando o software TAGFINDER (Luedemann et al., 2008). Os metabólitos foram identificados em comparação com bancos de dados de padrões autênticos (Kopka et al., 2005; Schauer et al., 2005). A identificação e anotação dos picos detectados seguiram as recomendações descritas previamente (Fernie et al., 2011).

2.6 Translatoma

Para analisar o translatoma de tipos específicos de células, o método da purificação de ribossomos por afinidade (*translating ribosome affinity purification*, TRAP), descrito anteriormente por Mustroph et al. (2013), foi empregado (Figura 3):

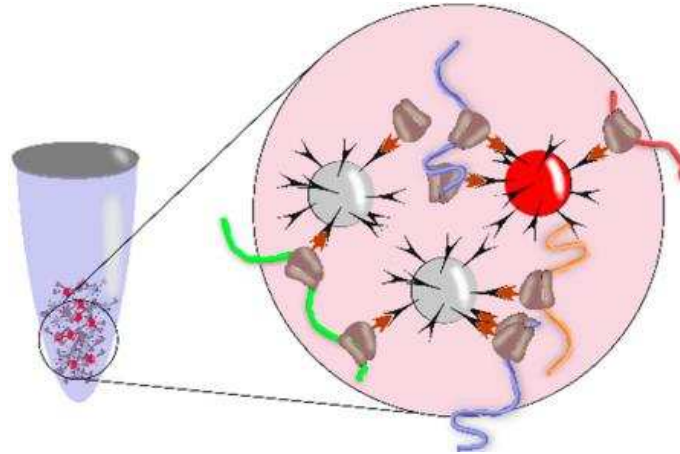


Figura 3: Princípio geral da separação seletiva, usando *beads* de agarose α -FLAG M2, dos transcritos ligados aos ribossomos carregando, na RPL18, o epítipo FLAG. Dessa forma, através da afinidade entre o FLAG, contido nas construções utilizadas, e o anti-FLAG, contido na agarose, conseguimos indiretamente capturar os transcritos associados a polissomos e que serão, portanto, efetivamente traduzidos. Círculos: *beads* de agarose; estruturas de cor preta: α -FLAG M2; blocos de cor marrom: ribossomos; setas de cor vermelha: epítipo FLAG. Extraído de Goldenkova-Pavlova et al., (2019).

2.6.1 Tampões

- Tampão de Extração de Polissomos (*Polysome Extraction buffer*, PEB)*: 0,2 M Tris-HCl, pH 9,0 (5 mL); 0,2 M KCl (5 mL); 0,025 M EGTA¹ (2,5 mL); 0,035 M MgCl₂ (1,75 mL); 1% da mistura de Detergentes² (2,5 mL); 1% DOC³ (5 mL); 1% PTE⁴ (2,5 mL); 5 mM DTT⁵ (0,5 mL); 1 mM PMSF⁶ (0,1 mL); 50 μ g/mL Cicloheximida (50 μ L); 50 μ g/mL Cloranfenicol (50 μ L); 0,5 mg/mL Heparina.
- Tampão de Lavagem (*Wash buffer*, WB)*: 0,2 M Tris-HCl, pH 9,0 (5 mL); 0,2 M KCl (5 mL); 0,025 M EGTA (2,5 mL); 0,035 M MgCl₂ (1,75 mL); 5 mM DTT (0,5 mL); 1 mM PMSF (0,1 mL); 50 μ g/mL Cicloheximida (50 μ L); 50 μ g/mL Cloranfenicol (50 μ L); 20 U/mL Inibidor de RNase (25 μ L).

¹ Etileno glicol-bis(2-aminoetiléter)-*N,N,N',N'*-ácido tetraacético; ² Polioxietileno(23)lauril éter (Brij-35), Triton X-100, Octilfenil-polietileno glicol (Igepal CA630) e Polioxietileno sorbitano monolaurato 20 (Tween 20); ³ Desoxicolato de sódio; ⁴ Polioxietileno 10 tridecil éter; ⁵ Ditioneitol; ⁶ Fenilmetilsulfonil fluoreto. * Quantidade de solução estoque para 50 mL de solução, à concentração final indicada, está mencionada entre parênteses.

2.6.2 Extração do Tecido

Inicialmente, foi adicionado PEB, preparado na hora, ao tecido radicular homogeneizado em uma razão 1:2 (tecido:PEB). A mistura foi mantida sobre gelo e cuidadosamente homogeneizada com um homogeneizador de vidro. Após 10 min, as amostras foram centrifugadas por 15 min, a 16.000 g e a 4°C. Em outro tubo estéril, o sobrenadante foi filtrado através de Miracloth. Uma outra centrifugação a 16.000 g, para garantir a remoção de materiais que formam *pellets*, foi realizada. Após, 10% do extrato clarificado foi armazenado para o isolamento de RNA total.

2.6.3 Preparo das *Beads* de Agarose α -FLAG M2

Inicialmente, o gel de agarose α -FLAG M2 foi ressuspensionado no próprio frasco do reagente, por agitação suave, para gerar uma suspensão uniforme. Usando uma ponteira cortada na ponta para facilitar, 150 μ L do gel de agarose foram transferidos para um novo tubo de 1,5 mL e centrifugados por 60 segundos, a 8.200 g e a 4°C. O sobrenadante foi removido com uma pipeta e 1,5 mL de WB foram adicionados, e as *beads* ressuspensionadas. Uma nova centrifugação por 60 segundos, a 8.200 g e a 4°C foi realizada, e o sobrenadante removido com o auxílio de uma pipeta.

2.6.4 Imunoprecipitação de Ribossomos

Procedeu-se a mistura de 5 mL do extrato clarificado com 150 μ L das *beads* de agarose α -FLAG M2, lavadas, em um tubo Falcon de 15 mL. Para ligar os ribossomos marcados com FLAG às *beads* de agarose, a mistura foi incubada por 4 horas, a 4°C e sob agitação suave sobre uma plataforma móvel. Uma centrifugação por 60 segundos, 8.200 g e a 4°C foi realizada, e o sobrenadante transferido para um novo tubo (o sobrenadante da imunoprecipitação ou fração livre). Às *beads* ligadas aos ribossomos, foram adicionados 6 mL de WB, misturados por suave inversão do tubo, incubados a 4°C, por 5 min e sob agitação suave em uma plataforma móvel, e centrifugados por 60 segundos, 8.200 g e a 4°C (primeira lavagem). O sobrenadante foi removido com o auxílio de uma pipeta, procedendo-se à adição de 6 mL de WB às *beads*. A mistura foi incubada a 4°C, por 5 min e sob agitação suave (segunda lavagem), e centrifugada por 60 segundos, 8.200 g e a 4°C. O sobrenadante foi removido com o auxílio de uma pipeta. Para eluir os ribossomos purificados por afinidade, o maior volume possível de sobrenadante

foi removido com o auxílio de uma pipeta de ponta fina. Após, 300 µL de WB contendo 200 ng/µL do peptídeo FLAG₃ e 20 U/mL do inibidor de RNase foram adicionados às *beads*. A mistura foi incubada por 30 minutos, a 4°C e sob agitação em uma plataforma móvel. Após, procedeu-se a uma centrifugação por 60 segundos, 8.200 g e a 4°C, e o sobrenadante transferido para um novo tubo. Caso o sobrenadante ainda apresentasse as *beads* (partículas brancas ou vermelhas), uma nova centrifugação foi realizada por 2 min, a 13.000 g e a 4°C, e o sobrenadante transferido a um novo tubo. Registre-se que é de extrema importância remover todas as *beads*. A solução resultante desse procedimento é o eluato do TRAP, que contém ribossomos liberados marcados com FLAG, incluindo RNAs e proteínas associados, e foi utilizado para isolar RNA.

2.6.5 Extração de RNA

Para a extração de RNA a partir do eluato, o *kit* Qiagen RNeasy foi usado. Assim, 2 volumes de guanidina-HCl 8 M foram adicionados ao eluato da imunoprecipitação e a mistura agitada em vórtex por 1 min. Após, 3 volumes de etanol 99% foram adicionados e a mistura agitada em vórtex por 1 min. Após o RNA ter sido precipitado “*overnight*” a -20°C, uma centrifugação por 45 min, 16.000 g e a 4°C foi realizada. O sobrenadante foi removido e o *pellet* deixado para secar por 20 min. O tampão de extração foi preparado adicionando 10 µL de β-mercaptoetanol a 1 mL do tampão RLT Qiagen (fornecido com o *kit* RNeasy e que contém tiocianato de guanidina). O *pellet* foi ressuscitado em 450 µL do tampão RLT, e a mistura agitada em vórtex por 1 min. Adicionaram-se 250 µL de etanol 99% e a mistura agitada gentilmente por inversão lenta do tubo, sem uso de vórtex. As amostras foram inseridas em uma coluna de mini-rotação RNeasy, incubadas por 3 min e centrifugadas por 15 segundos, a 16.000 g. Foram adicionados 700 µL de tampão RW1 (fornecido com o *kit* RNeasy e que contém tiocianato de guanidina) e uma centrifugação foi realizada por 15 segundos, a 9.000 g, descartando-se o fluxo. Foram adicionados 500 µL do tampão RPE Qiagen (fornecido com o *kit* RNeasy, sendo que 4 volumes de etanol foram adicionados ao tampão RPE antes do uso, conforme instruções do fabricante), e uma centrifugação realizada por 15 segundos, a 9.000 g, descartando-se o fluxo. Outros 500 µL do tampão RPE foram adicionados à coluna e uma centrifugação foi realizada por 2 min, a 9.000 g. A coluna foi transferida para um novo microtubo de 2 mL. Para remover o etanol remanescente, uma centrifugação foi realizada por 1 min, a 16.000 g. A coluna foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, 30-50 µL de água livre de RNase foram adicionados e uma incubação por 5 min foi realizada.

Para eluir o RNA, uma centrifugação foi realizada por 1 min, a 16.000 g e o RNA obtido foi usado para análises adicionais.

2.7 Análises de expressão gênica

O RNA obtido precisou ser amplificado através do *Complete Whole Transcriptome Amplification Kit*. Além da amplificação, esse *kit* também promoveu a síntese do cDNA. As reações de qRT-PCR foram realizadas no instrumento *Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System*, usando o cDNA sintetizado, *primers* gene-específicos (Tabela Suplementar 2) e o *kit Fast SYBR® Green Master Mix*. O gene que codifica a proteína F-box em *Arabidopsis thaliana* (At5g15710) foi usado como controle endógeno para normalizar os valores de qRT-PCR.

2.8 Delineamento experimental e análises estatísticas

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com cinco repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação entre médias realizada pelo teste *t* de Student a 5% de probabilidade ($P < 0,05$), comparando sempre os tratamentos dentro de cada genótipo. Essas análises foram realizadas com auxílio dos algoritmos presentes no programa Microsoft Excel® (Microsoft, Seattle). Os gráficos foram produzidos utilizando o software SigmaPlot 12.5.

3 RESULTADOS

3.1 Confirmação da Expressão do Transgene

Para acessarmos o transloma de células radiculares específicas, plantas transformadas de *Arabidopsis* expressando a construção *PROMOTOR-GFP-FLAG-RPL18*. Além do *p35S*, um promotor quase constitutivo, outros dois promotores anteriormente descritos (Mustroph et al., 2009), *pSCR* (*Scarecrow*) e *pPEP* (*Endopeptidase*), específicos para células indiferenciadas (centro quiescente e endoderme) e diferenciadas (zona cortical das regiões de alongamento e maturação), respectivamente, foram escolhidos visando à elucidação de como o Al afeta a reprogramação da expressão gênica em grupos específicos de células de raiz. A confirmação da expressão das construções *35S:GFP-FLAG-RPL18* (Figura 4A), *PEP:GFP-FLAG-RPL18* (Figura 4B) e *SCR:GFP-FLAG-RPL18* (Figura 4C), através da visualização de fluorescência

emitida pela proteína fluorescente verde (GFP), foi realizada possibilitando as análises, a posteriori, do translatoma de células específicas.

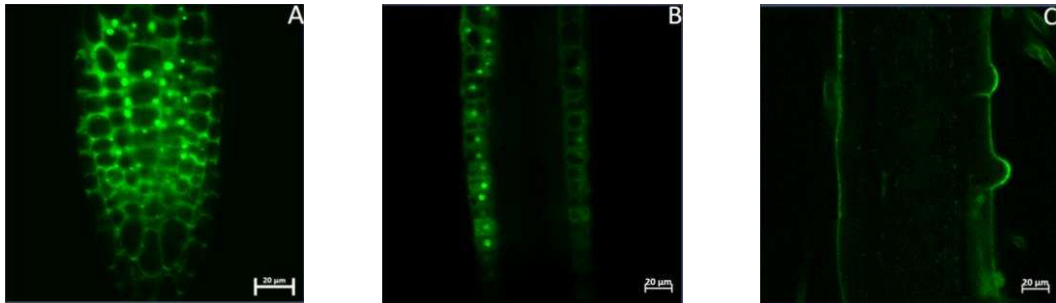


Figura 4: Confirmação da inserção do transgene *Promotor:GFP-FLAG-RPL18*. Através da visualização de fluorescência emitida pela proteína fluorescente verde (GFP), o transgene foi confirmado nas linhas (A) *p35S*, um promotor quase constitutivo, (B) *pPEP* (*Endopeptidase*), promotor específico para células diferenciadas (zona cortical das regiões de alongamento e maturação) e (C) *pSCR* (*Scarecrow*), promotor específico para células indiferenciadas (centro quiescente e endoderme) (Mustroph et al., 2009) (Figuras Suplementares 1). Imagens representativas demonstram a atividade específica dos promotores em plântulas de 7 dias de idade expressando os transgenes específicos *FLAG-GFP-RPL18*. Para tanto, amostras coletadas em plântulas de *Arabidopsis thaliana*, com 7 dias de idade, e crescidas verticalmente sobre meio MS (Murashige and Skoog) sólido (meio MS 0,43% (p/v) e ágar 0,7% (p/v), pH 5,7), foram excitadas a 488 nm, e a fluorescência emitida pela proteína fluorescente verde foi detectada a 510 nm. As imagens foram obtidas com o auxílio do Software ZEISS ZEN 3.1 (blue edition). Barras de escala: 20 µm.

3.2 Detecção Histoquímica do Al

A histolocalização ou detecção histoquímica do Al é realizada através da coloração arroxeada característica da reação positiva entre o corante hematoxilina e o Al (Figura 5). Foi possível observar que, na ausência de estresse por Al, não houve coloração efetiva devido à ausência de reação e, assim, a coloração arroxeada característica não foi exibida (Figura 5). Em adição, uma coloração mais intensa em presença de Al foi observada de forma similar e numa mesma extensão, indicando acúmulo de Al principalmente nos ápices radiculares, em todos os genótipos.

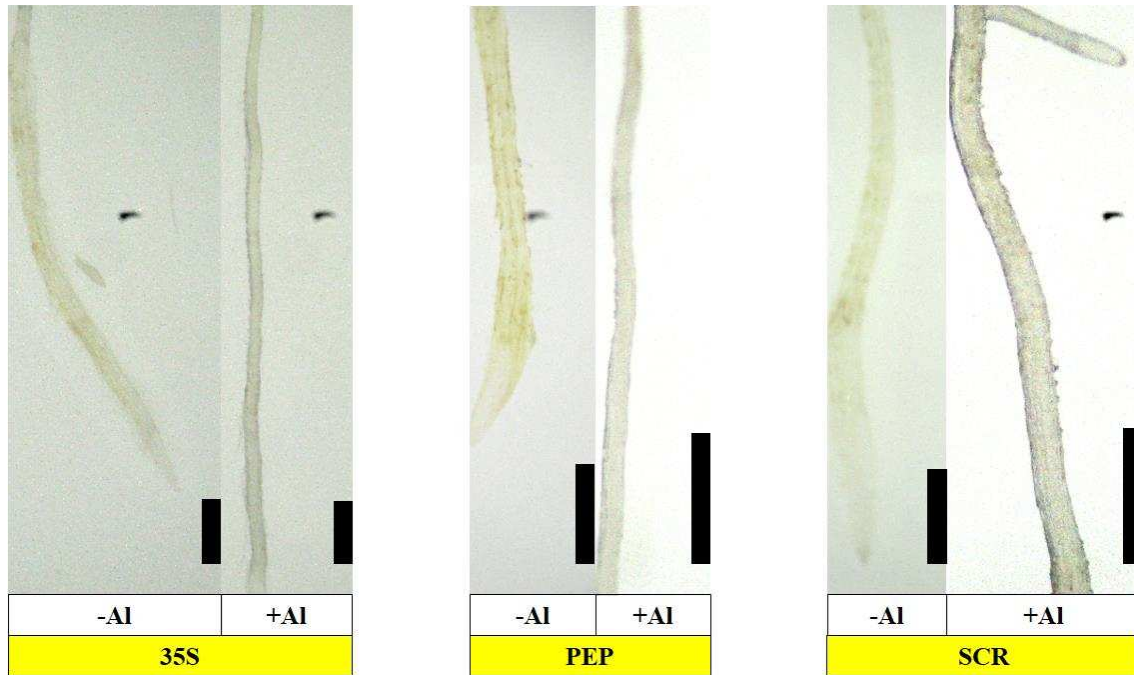


Figura 5: Localização diferencial de Al em ápices radiculares de *Arabidopsis thaliana*. Detecção histoquímica do alumínio (Al) foi obtida através do método de coloração com hematoxilina. Imagens representativas de raízes de plântulas (10 dias após germinação) expressando o transgene *Promotor:GFP-FLAG-RPL18*. As linhas *p35S*, um promotor quase constitutivo, *pPEP* (*Endopeptidase*), promotor específico para células diferenciadas (zona cortical das regiões de alongamento e maturação) e *pSCR* (*Scarecrow*), promotor específico para células indiferenciadas (centro quiescente e endoderme) foram cultivadas na ausência (-Al) ou presença (+Al) de 50 μ M Al. Barras de escala: 0,5 mm.

3.3 Comprimento Radicular

A rápida inibição do alongamento radicular é o sintoma inicial e mais dramático resultante da toxicidade por Al, levando a um sistema radicular reduzido e danificado que limita a absorção de água e nutrientes, e, eventualmente, leva à redução na produção (Kochian, 1995; Ma, 2007; Ryan et al., 2011; Liu et al., 2014). A Figura 6 mostra, de forma inesperada, um maior crescimento radicular das plântulas *p35S*, *pPEP* e *pSCR* após 10 dias na presença de Al. Assim, investigar o mecanismo molecular da resposta ao estresse por Al pode melhorar nossa compreensão sobre a plasticidade do crescimento radicular sob condições ambientais distintas.

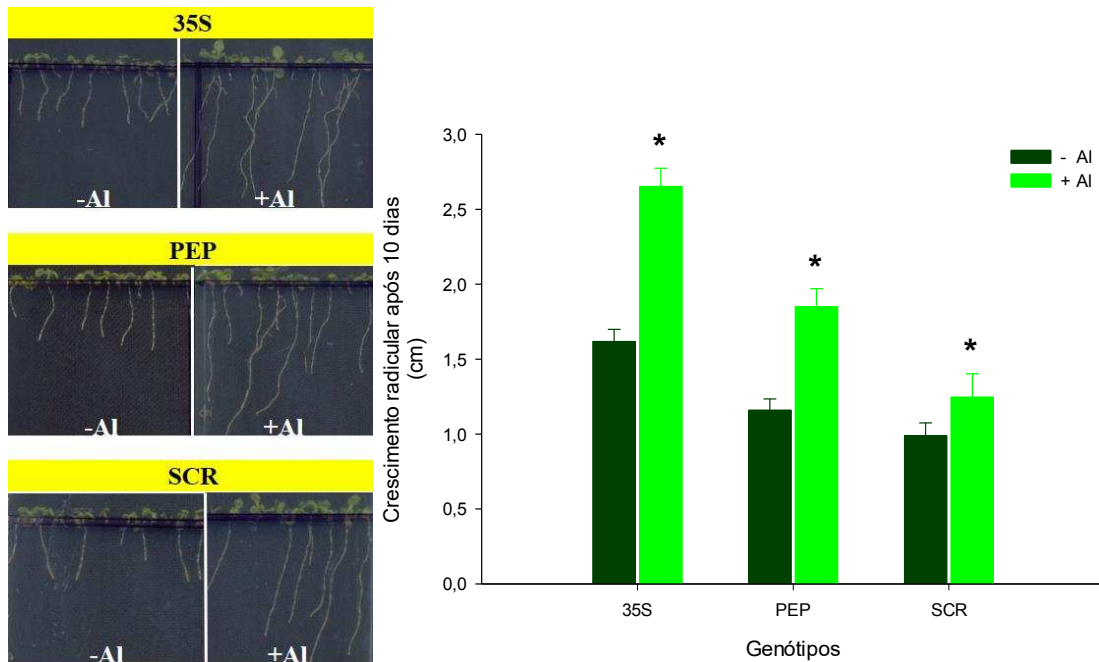


Figura 6: O comprimento radicular é afetado pelo Al em *Arabidopsis thaliana*. Imagens representativas de raízes de plântulas (10 dias após germinação) expressando o transgene *Promotor:GFP-FLAG-RPL18*. As linhas *p35S*, um promotor quase constitutivo, *pPEP* (*Endopeptidase*), promotor específico para células diferenciadas (zona cortical das regiões de alongamento e maturação) e *pSCR* (*Scarecrow*), promotor específico para células indiferenciadas (centro quiescente e endoderme) foram cultivadas na ausência (-Al) ou presença (+Al) de 50 μ M Al. O comprimento radicular foi obtido com imagens geradas pelo Scanner HP Scanjet G2410 e processadas com o uso do programa ImageJ. Valores representam médias \pm erro padrão (n=5). Asterisco (*) denota médias significativamente diferentes, encontradas pelo teste *t* de Student ($P < 0,05$), entre os tratamentos dentro de cada linha transgene.

3.4 Perfil Metabólico

Com o intuito de melhor compreender os impactos metabólicos à condição de estresse por Al, foi realizada uma caracterização do perfil metabólico nas raízes dos genótipos utilizados. Para tanto, um protocolo estabelecido para GC-MS (Lisec et al., 2006) foi utilizado.

Dentre os AOs envolvidos no ciclo TCA, a presença do Al resultou, de modo geral, em maiores níveis de citrato, malato e, de forma interessante, succinato (Figura 7), corroborando, em parte, com informações de que, em plantas, os mecanismos de exclusão e tolerância ao Al são intimamente relacionados à atividade mitocondrial, ao metabolismo mitocondrial e ao transporte de AOs (Nunes-Nesi et al., 2014). Sob efeito do Al, os níveis de 2-oxoglutarato foram maiores apenas na linha *pPEP*, enquanto nenhuma variação foi encontrada nos níveis de fumarato (Figura 7). Outros AOs, como glutarato, nicotinato, glicerato, glicolato, piroglutamato, piruvato e desidroascorbato não apresentaram variação nas três linhas

submetidas ao Al, mas um aumento nos níveis de malonato foi encontrado na linha *pSCR* em resposta a esse metal (Figura 7).

Dentre os aminoácidos, os níveis de GABA (4-aminobutirato), alanina, aspartato, histidina e glutamato foram significativamente elevados na linha *pSCR* em resposta ao Al, ao passo que apenas os níveis de citrulina foram maiores na linha *p35S* em resposta ao Al (Figura 7). Os aminoácidos glutamina, metionina, ornitina, fenilalanina, asparagina, glicina, β -alanina, guanidina, serina, homoserina, hidroxiprolina, isoleucina, treonina, leucina, triptofano, tirosina e valina não apresentaram variação nas três linhas em resposta ao Al (Figura 7).

Em relação aos açúcares, apenas os níveis de manose foram maiores nas três linhas expostas ao Al (Figura 7). Em presença de Al, os níveis de sacarose aumentaram consideravelmente (quase quatro vezes mais) nas linhas *pSCR* e *pPEP* (Figura 7), enquanto os níveis de mio-inositol, altrose, trealose e glicose foram maiores apenas na linha *pSCR* (Figura 7). Os açúcares frutose, fucose, galactose, maltose e manitol não apresentaram variação nas três linhas submetidas ao Al (Figura 7).

Registre-se também que outros metabólitos, como adenina, glicerol, glicerol-3-fosfato, putrescina, eritritol e uracil não apresentaram variações significativas nas três linhas em resposta ao Al (Figura 7).

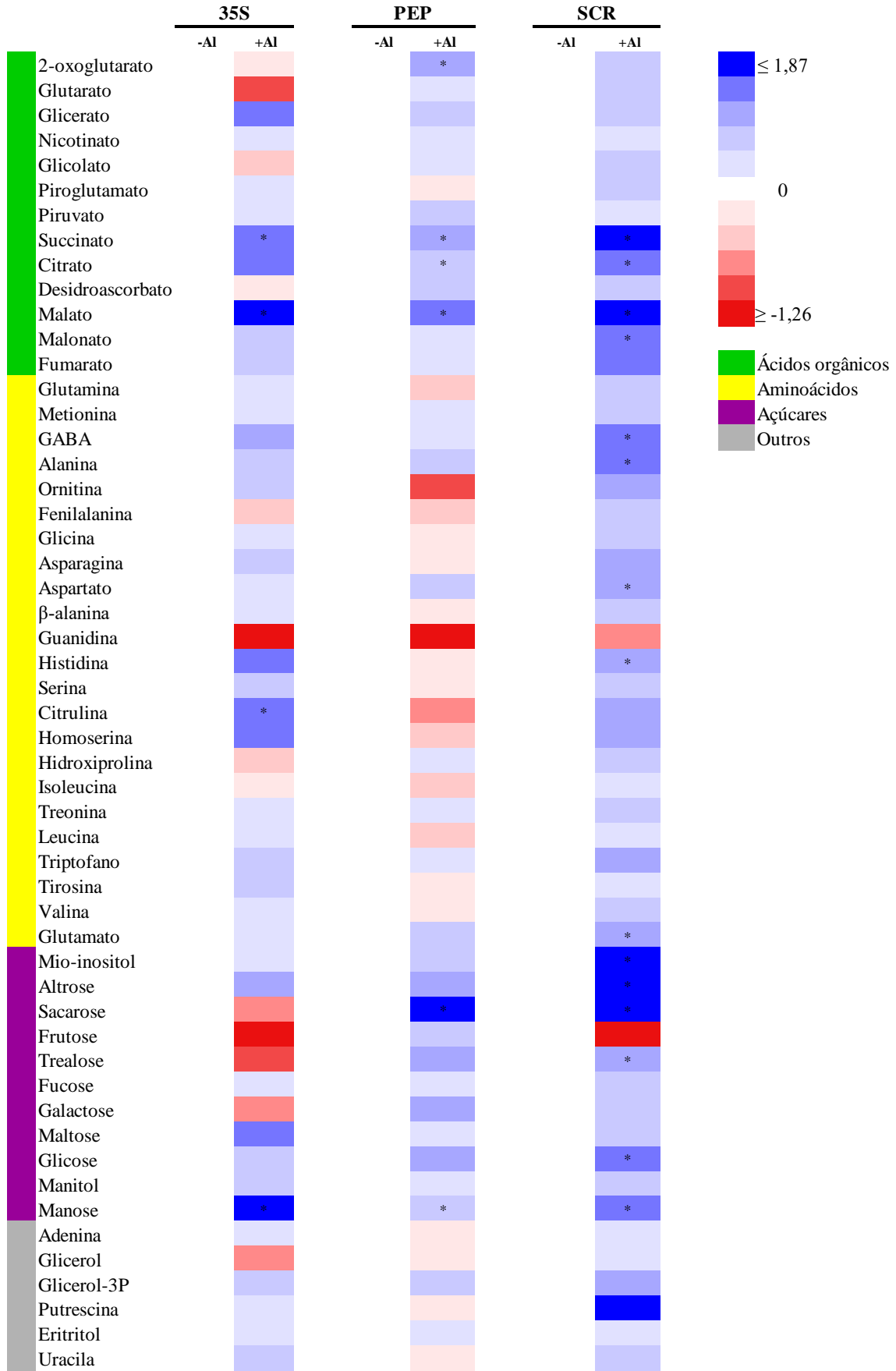
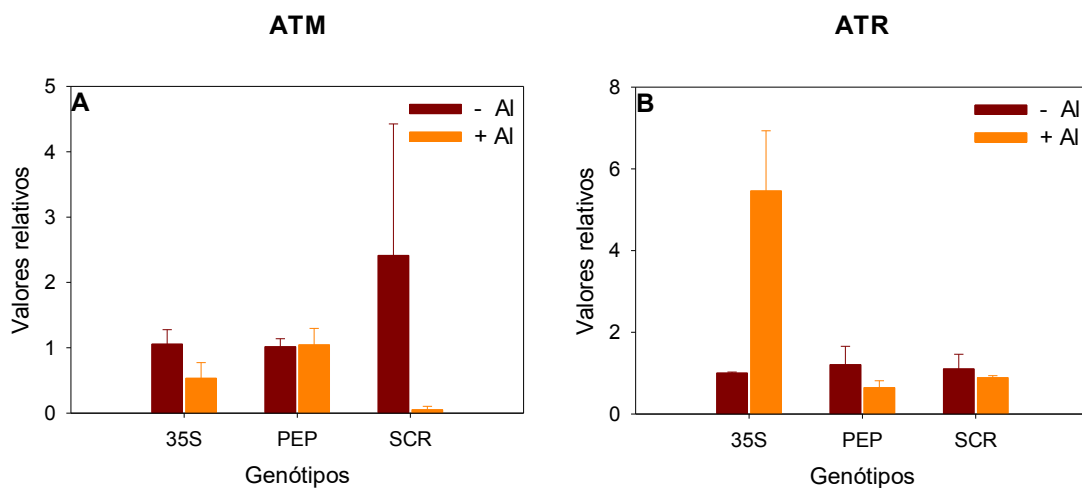
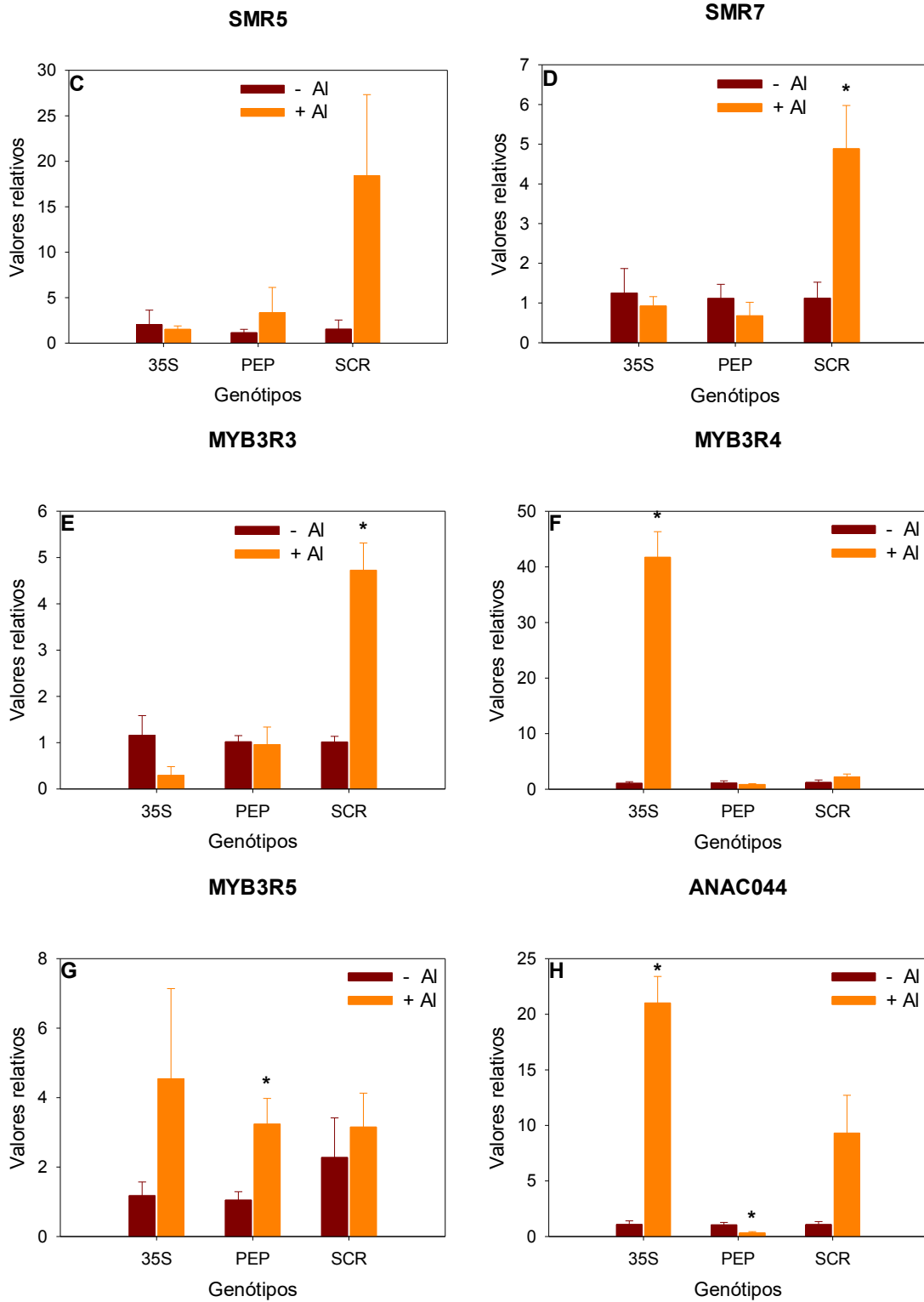


Figura 7: O perfil metabólico é afetado pelo Al em raízes de *Arabidopsis thaliana*. Metabólitos foram determinados conforme descrito em ‘Materiais e métodos’. Foram utilizadas amostras de raízes de plântulas (10 dias após germinação) expressando o transgene *Promotor:GFP-FLAG-RPL18*. As linhas *p35S*, um promotor quase constitutivo, *pPEP* (*Endopeptidase*), promotor específico para células diferenciadas (zona cortical das regiões de alongamento e maturação) e *pSCR* (*Scarecrow*), promotor específico para células indiferenciadas (centro quiescente e endoderme) foram cultivadas na ausência (-Al) ou presença (+Al) de 50 μ M Al. A escala de cores do mapa de calor foi obtida com os valores relativos normalizados em relação à resposta média calculada para as condições controle (-Al) de cada linha (para permitir uma avaliação estatística, as plantas individuais deste conjunto foram normalizadas da mesma maneira). Valores representam médias \pm erro padrão (n=4). Asterisco (*) representa variação significativa, de acordo com o teste *t* de Student ($P < 0,05$), em relação aos respectivos controles (-Al) para cada linha *p35S*, *pSCR* e *pPEP*. O conjunto de dados completo contendo o conteúdo relativo de metabólitos está adicionalmente disponível na Tabela Suplementar 3.

3.5 Translatoma

A imunopurificação de complexos mRNA-ribossomo associados (Mustroph et al., 2009) foi utilizada para se identificar genes responsivos ao Al. Para tanto, o mRNA associado aos ribossomos foi isolado de plantas cultivadas em presença de Al por 10 dias e o perfil de expressão determinado via qRT-PCR (Figuras 8 e 9).





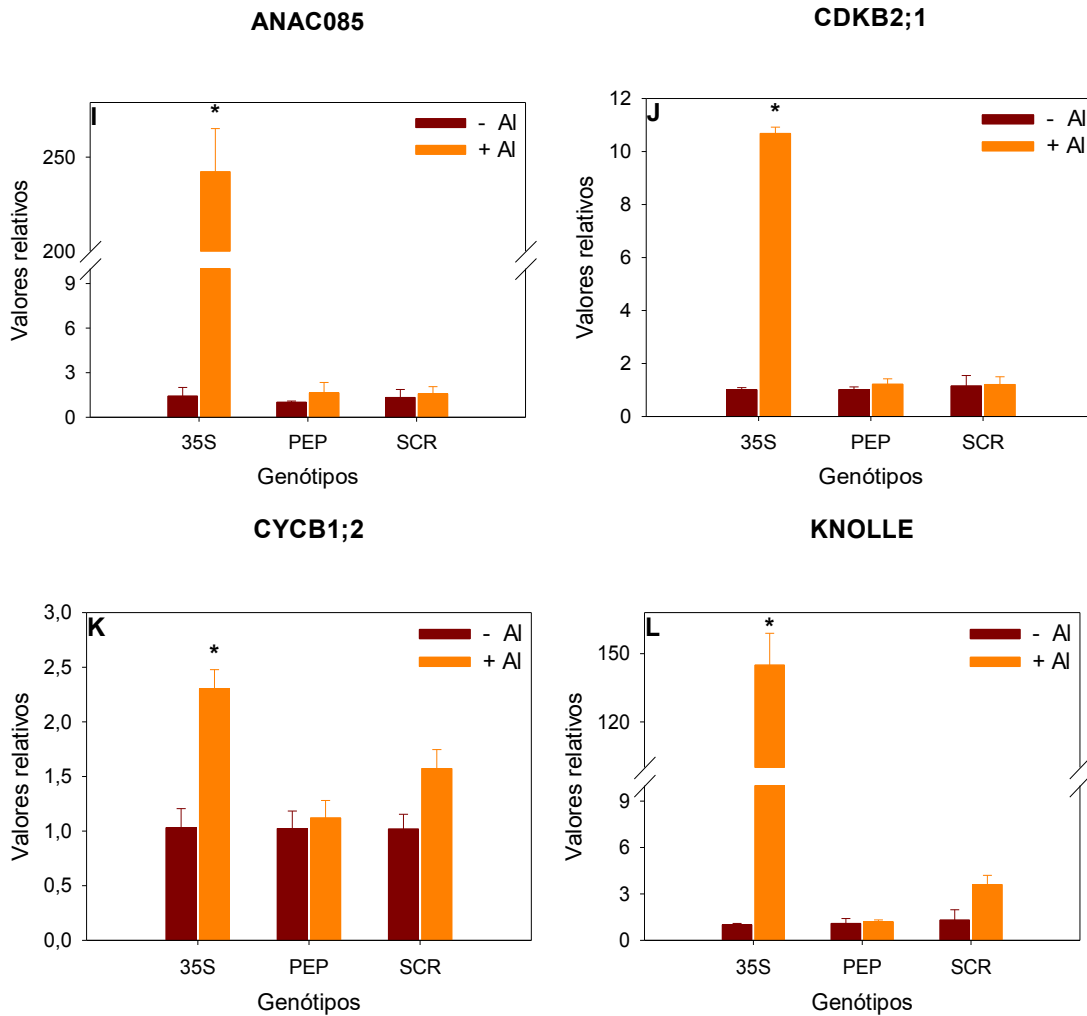


Figura 8: Níveis relativos da expressão de transcritos polissomais associados com o ciclo celular. Foram utilizadas amostras de raízes de plântulas (para o *p35S*) e de plântulas inteiras (para o *pPEP* e o *pSCR*) (10 dias após germinação) expressando o transgene *Promotor:GFP-FLAG-RPL18*. As linhas *p35S*, um promotor quase constitutivo, *pPEP* (*Endopeptidase*), promotor específico para células diferenciadas (zona cortical das regiões de alongamento e maturação) e *pSCR* (*Scarecrow*), promotor específico para células indiferenciadas (centro quiescente e endoderme) foram cultivadas na ausência (-AI) ou presença (+AI) de 50 μ M AI. Os valores representam a média entre os valores de $2^{-(\Delta\Delta C_t)} \pm$ erro padrão ($n = 3$). Asterisco (*) representa variação significativa, de acordo com o teste *t* de Student ($P < 0,05$), em relação aos respectivos controles (-AI) para cada linha (*p35S*, *pSCR* e *pPEP*).

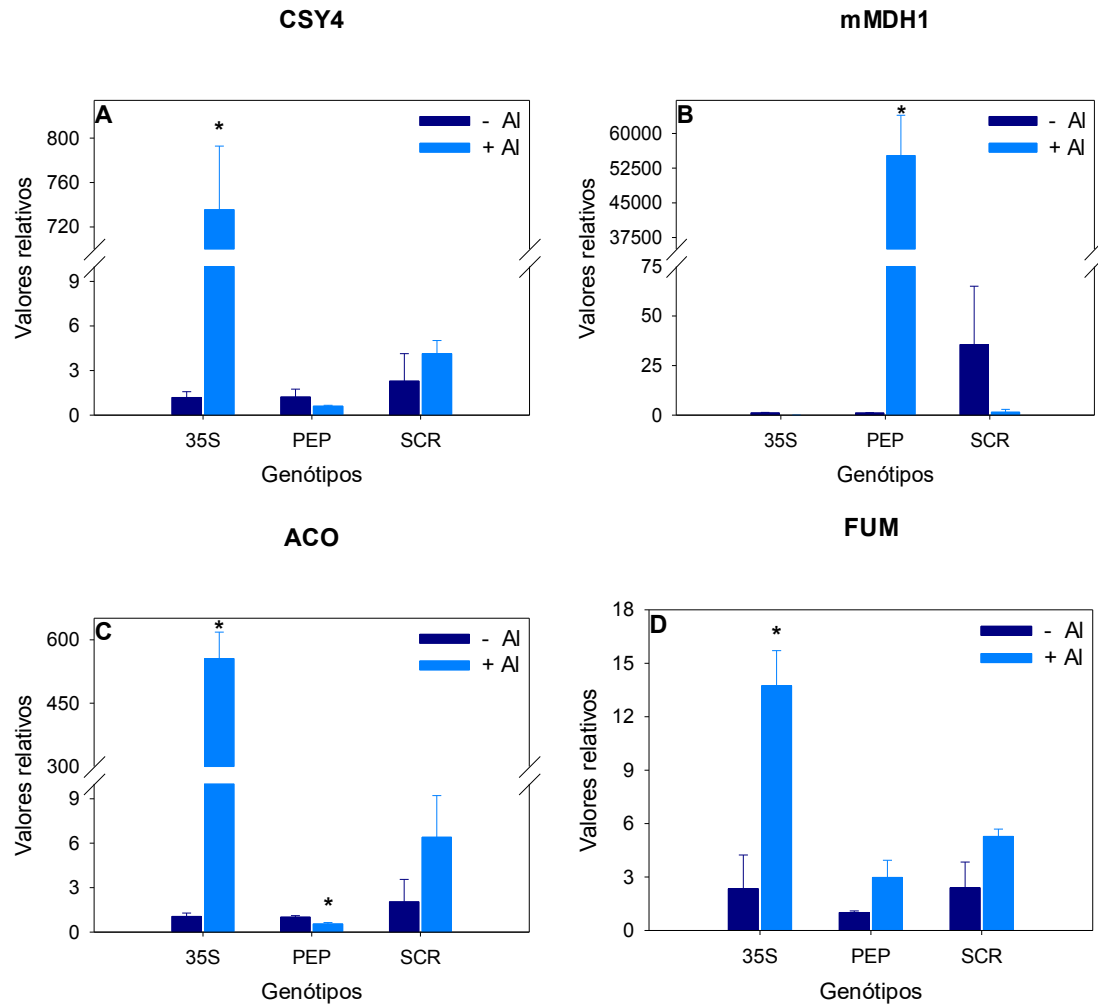


Figura 9: Níveis relativos da expressão de transcritos polissomais associados com o ciclo TCA. Foram utilizadas amostras de raízes de plântulas (para o *p35S*) e de plântulas inteiras (para o *pPEP* e o *pSCR*) (10 dias após germinação) expressando o transgene *Promotor:GFP-FLAG-RPL18*. As linhas *p35S*, um promotor quase constitutivo, *pPEP* (*Endopeptidase*), promotor específico para células diferenciadas (zona cortical das regiões de alongamento e maturação) e *pSCR* (*Scarecrow*), promotor específico para células indiferenciadas (centro quiescente e endoderme) foram cultivadas na ausência (-AI) ou presença (+AI) de 50 μ M AI. Os valores representam a média entre os valores de $2^{-(\Delta\Delta Ct)} \pm$ erro padrão ($n = 3$). Os valores representam a média entre os valores de $2^{-(\Delta\Delta Ct)} \pm$ erro padrão ($n = 3$). Asterisco (*) representa variação significativa, de acordo com o teste *t* de Student ($P < 0,05$), em relação aos respectivos controles (-AI) para cada linha (*p35S*, *pSCR* e *pPEP*).

Para determinar como o ciclo celular é orquestrado em resposta ao AI, foram determinados os níveis relativos de expressão de transcritos polissomais associados a componentes chaves da DDR (Figura 8). A expressão de *ATM* foi negativamente regulada pela presença do AI no genótipo *pSCR* (Figura 8A), enquanto a expressão de *ATR*, de modo global, foi positivamente regulada pela presença do AI, embora poucas mudanças significativas tenham sido verificadas nos conjuntos específicos de células ora trabalhados (Figura 8B). Tais

resultados corroboram com informações de que, ao menos em resposta ao estresse por Al, SOG funciona *downstream* de ATR, em vez de ATM (Sjogren et al., 2015).

Em resposta ao dano no DNA, a via ATM/ATR-SOG1 é ativada e, assim, SOG1 induz a expressão de supressores de CDKs, como SMRs, reduzindo, portanto, a atividade de CDKs (Adachi et al., 2011; Yi et al., 2014). Em consonância, ao menos parcial, com essas informações, as expressões de *SMR5* e *SMR7* foram positivamente reguladas no genótipo *pSCR* em resposta ao Al, ao passo que poucas mudanças nos demais genótipos (Figuras 8C e 8D) foram verificadas. Tais resultados sugerem uma atuação particular dessas proteínas nas células do centro quiescente e endoderme, onde, além disso, a expressão de *CDKB2;1* não foi afetada (Figura 8J).

Foi demonstrado também que CDKs podem fosforilar *in vitro* Rep-MYBs (*MYB3R3* e *MYB3R5*) e que as atividades de CDKs são necessárias para a degradação proteossomal desses FTs (Chen et al., 2017). Por outro lado, CDK é conhecida por fosforilar e ativar Act-MYBs (*MYB3R4*) (Haga et al., 2007; Araki et al., 2004). Os resultados aqui obtidos demonstram que, de fato, a expressão global positivamente regulada de *CDKB2;1* na presença de Al (Figura 8J) foi acompanhada por uma tendência de menor expressão de *MYB3R3* e uma elevada expressão de *MYB3R4* ao nível de raiz inteira (Figuras 8E e 8F). É importante destacar também o aumento na expressão de *MYB3R3* no genótipo *pSCR* (Figura 8E) em resposta ao Al, uma vez que foi demonstrado que Rep-MYBs desempenham papel crucial na divisão celular sob condições de danos no DNA (Chen et al., 2017; Bourbousse et al., 2018). Com efeito, os resultados apontam um papel importante para *MYB3R5*, haja visto que a sua expressão foi maior no genótipo *pPEP* e apresentou uma clara tendência de aumento nos demais genótipos em resposta ao Al (Figura 8G).

Os níveis de expressão dos genes *KNOLLE* e *CYCB1;2*, alvos de *MYB3R3*, apresentaram uma tendência de aumento no genótipo *pSCR* (Figuras 8K e 8L), sugerindo que outros genes associados ao ciclo celular estejam, possivelmente, sendo reprimidos em resposta ao Al. Outros genes alvos de *MYB3R3* (*PAKRP1*, *EHD2*, *PLE/MAP65-3*, *AUR2*, *PAKRP2* e *CDC20.1*) foram investigados em um experimento com zeocina, um agente genotóxico, concluindo-se que *MYB3R3*, altamente acumulado sob condições de dano no DNA, se liga de maneira eficiente aos promotores de alguns de seus genes alvos (Chen et al., 2017). De maneira interessante, ambos os genes, com destaque para *KNOLLE*, apresentaram elevada expressão em resposta ao Al, ao nível de raiz inteira (Figuras 8K e 8L).

Os FTs ANAC044 e ANAC085 desempenham papel crucial na paralisação em G2 em resposta ao dano no DNA (Takahashi et al., 2019). Na ausência de ANAC044 ou ANAC085, Rep-MYBs não se acumulam e, portanto, não há inibição da progressão G2/M e as plantas exibem tolerância ao dano no DNA (Takahashi et al., 2019). Verificou-se, aqui, a expressão positivamente regulada apenas em *ANAC044* no genótipo *pSCR* (Figura 8H), que pode estar associada à estabilização de MYB3R3 e, em menor extensão, de MYB3R5 nas células do centro quiescente e endoderme (Figuras 8E e 8G). Adicionalmente, a regulação positiva nas expressões de *ANAC044* e, de forma acentuada, *ANAC085*, foi observada ao nível de raiz inteira em resposta ao Al (Figuras 8H e 8I).

No que diz respeito aos genes relacionados com o ciclo TCA, aumentos acentuados nos níveis globais (*p35S*) de expressão da *CSY4*, *ACO* e *FUM* em resposta ao Al foram observados (Figuras 9A, 9C e 9D). Embora nenhuma mudança tenha sido encontrada para o gene *mMDHI* no genótipo *p35S*, um exorbitante aumento no nível de expressão desse gene foi verificado no genótipo *pPEP* (Figura 9B). De modo interessante, uma redução acentuada no nível de expressão do gene *mMDHI* foi observada nas demais células em resposta ao Al (Figura 9B). Com efeito, uma expressão negativamente regulada dos genes *CSY4* e *ACO*, atuantes *downstream* à *mMDHI*, foi observado nas células corticais em resposta ao Al (Figuras 9A e 9C). De modo geral, foram observadas tendências de aumentos no nível de expressão do gene *FUM* nas células corticais em presença de Al (Figura 9D), e dos genes *CSY4*, *ACO* e *FUM* nas células do centro quiescente e endoderme em presença de Al (Figuras 9A, 9C e 9D).

4 DISCUSSÃO

Solos ácidos ($\text{pH} \leq 5,5$) compreendem aproximadamente 30-40% das terras aráveis em todo mundo (von Uexkull & Mutert, 1995). Nesses solos ácidos, o Al é solubilizado e torna-se altamente tóxico às plantas. Consequentemente, a toxicidade do Al é um grave problema global para o crescimento das culturas sobre solos ácidos (Kochian, 1995), por impor sérias restrições ao desenvolvimento radicular, prejudicando não apenas a absorção de nutrientes e água, mas comprometendo também a segurança alimentar, particularmente nos países em desenvolvimento.

Em resposta ao estresse por Al, a manutenção do crescimento radicular ocorre através de três vias principais: (i) transportadores de AOs (malato e citrato), tais como *aluminum-activated malate transporter 1* (ALMT1) e *multidrug and toxic compound extrusion* (MATE1); (ii) regulação do afrouxamento da parede celular e (iii) ativação da expressão do FT SOG1, de

DDR, através dos genes de verificação do ciclo celular *ATR* e *ALUMINUM TOLERANT 2* (*ALT2*) (Yang et al., 2017). Com efeito, esses mesmos autores sugerem também que a rede regulatória fito-hormonal em resposta ao estresse por Al é também muito importante para a inibição do crescimento radicular induzida pelo Al. Neste contexto, o maior crescimento radicular verificado em plântulas na presença de Al (Figura 6), pode ser explicado, ao menos em parte, pela (i) concentração relativamente baixa de Al aqui utilizada; (ii) pelo maior tempo de exposição e (iii) pela regulação diferencial dessa rede regulatória em células distintas. Registre-se, pois, que o entendimento acerca da rede de regulação do crescimento radicular em resposta ao Al é, ainda, sobremodo incipiente e, assim, trabalhos futuros serão importantes para esclarecer esse fenótipo.

O dano no DNA promove uma resposta altamente conservada que coordena processos necessários para manter a integridade do genoma, incluindo a paralisação do ciclo celular, reparo do DNA e morte celular (Bourbousse et al., 2018). Registre-se que as expressões positivamente reguladas dos genes *SMR5* e *SMR7* nas células do centro quiescente e endoderme em resposta ao Al (Figuras 8C, 8D e 10A), estão em acordo com informações prévias de que a expressão de inibidores de CDKs, como *SMR5* e *SMR7*, seria diretamente induzida por *SOG1* (Yin et al., 2014; Ogita et al., 2018).

Em *Arabidopsis*, nos mutantes com perda de função *myb3r3* e *myb3r5*, os genes *SMR5* e *SMR7*, inibidores de CDK, e o gene *MYB3R4*, um Act-MYB, de modo rápido, foram positiva e negativamente regulados por zeocina, respectivamente, como no WT (Chen et al., 2017). Tais resultados indicam que, em mutantes *myb3r3* e *myb3r5*, uma redução inicial na atividade de CDK ocorre normalmente pela regulação positiva e negativa de genes para inibidores de CDK e Act-MYB, respectivamente, em uma maneira dependente de *SOG1*, mas que não é suficiente para paralisar o crescimento radicular (Chen et al., 2017). Os Rep-MYBs, que “fogem” da fosforilação por CDK e se acumulam sob estresse no DNA, desempenham papel indispensável na inibição da divisão celular e do crescimento radicular (Chen et al., 2017) (Figura 10). Cabe mencionar que os maiores níveis de expressões de *SMR5* e *SMR7* nas células do centro quiescente e endoderme (Figuras 8C, 8D e 10A), associados aos elevados níveis de expressão de *MYB3R3* nessas células em resposta ao Al (Figuras 8E e 10A), suportam esse modelo. Em adição, tendências de aumentos nas expressões dos genes *KNOLLE* e *CYCB1;2*, alvos de *MYB3R3*, no genótipo *pSCR* (Figuras 8K e 8L), podem ser, potencialmente, explicados de duas formas: (i) outros genes associados ao ciclo celular podem estar, de forma específica, sendo reprimidos; ou (ii) a proteína *MYB3R3* não foi acumulada em quantidades suficientemente

elevadas que a permitam atuar sobre genes alvos, visto que foi sugerido que o nível da proteína MYB3R3 determina sua ligação a promotores alvos e a extensão de repressão de genes alvos (Chen et al., 2017). Tomados em conjunto, esses resultados indicam que os efeitos na expressão são distintos em grupos de células específicos e que isso parece estar associado a uma necessária modulação para lidar com o estresse por AI.

Ao nível de raiz inteira, as expressões positivamente reguladas em resposta ao AI dos genes *MYB3R4*, um ativador transcricional de genes do ciclo celular (Chen et al., 2017) (Figuras 8F e 10B), *KNOLLE* e *CYCBI;2* (Figuras 8L e 8K) podem explicar, ao menos parcialmente, o maior crescimento radicular do genótipo *p35S* na presença do AI (Figura 6). Nas células do centro quiescente e endoderme, as expressões dos genes *KNOLLE* e *CYCBI;2* mostraram uma tendência de aumento em resposta ao AI (Figuras 8L e 8K), o que também pode estar associado ao maior crescimento radicular do genótipo *pSCR* em presença do AI (Figura 6). Trabalhos futuros são ainda necessários para elucidar os mecanismos por detrás desse intrigante fenótipo.

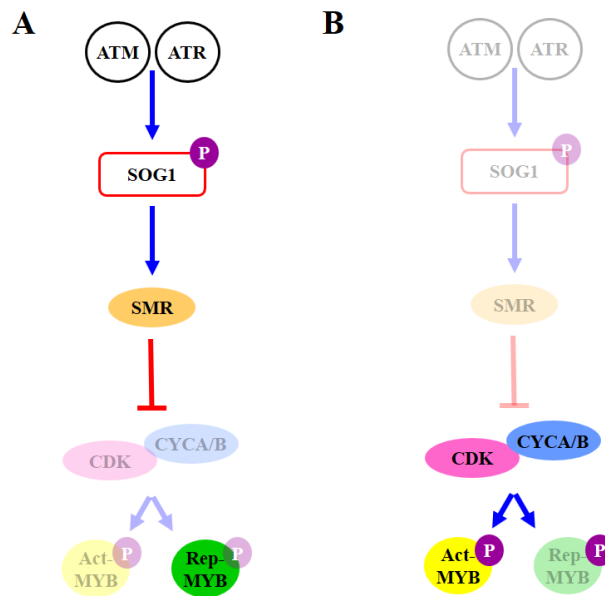


Figura 10: Modelo proposto para a regulação da via DDR em resposta ao AI. Nas células do centro quiescente e endoderme (A), ATR/ATM fosforila e ativa SOG1, que por sua vez induz a expressão de SMR. Após, SMR bloqueia a ação de CDK, permitindo que Rep-MYB se ligue na região promotora de genes associados ao ciclo celular e reprima a expressão desses genes. De modo global (B), a inativação de SOG1 impede que SMR seja induzida. Dessa forma, CDK, que não está bloqueada, fosforila Act-MYB, induzindo a sua expressão, e Rep-MYB, que é “marcada” para a degradação. Assim, Act-MYB se liga na região promotora de genes associados ao ciclo celular e ativa a expressão desses genes. ATM: *ATAXIA-TELANGIECTASIA MUTATED*; ATR: *ATAXIA-TELANGIECTASIA MUTATED AND RAD3-RELATED*; SOG1: *SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE 1*; SMR: *SIAMESE-RELATED*; CYCA/B: *CYCLIN A/B*; CDK: *CYCLIN-DEPENDENT KINASE*; Act-MYB: *Activator-R1R2R3-MYB*; Rep-MYB: *Repressor-R1R2R3-MYB*. Ativação/indução: \rightarrow ; Inibição/repressão: \perp .

Ao nível de raiz inteira, as elevadas expressões dos genes *FUM* e, principalmente, *CSY4* em resposta ao Al (Figuras 9A e 9D), corroboram com os maiores níveis de malato e citrato observados (Figura 7), bem como com informações prévias de que o ciclo TCA seria induzido por Al, modulando a biossíntese de AOs para quelar o Al no apoplasto ou citosol (Bojórquez-Quintal et al., 2017). Saliente-se que, em presença de Al, o drástico aumento na expressão de *mMDH1* no córtex radicular (cerca de 55.000 vezes) (Figura 9B e 11), foi associado com a clara tendência de redução no nível de expressão desse gene nas demais células (Figura 9B) e com pequenos aumentos (3X) na expressão de *FUM* nas células corticais (Figura 9D). Considerando-se que foi previamente demonstrado em *Arabidopsis*, que a exsudação do malato radicular, mediada por AtALMT1, é regulada especificamente pelo estresse por Al (Kobayashi et al., 2007), é plausível sugerir que o malato está sendo recrutado para as mitocôndrias das células corticais, onde uma pequena parte é metabolizada e a maior parte exsudada. De modo interessante, as expressões dos genes *CSY4* e *ACO* foram negativamente reguladas nas células corticais em resposta ao Al (Figuras 9A, 9C e 10), o que poderia favorecer o efluxo de malato e reduzir o fluxo desse metabólito ao longo do ciclo TCA.

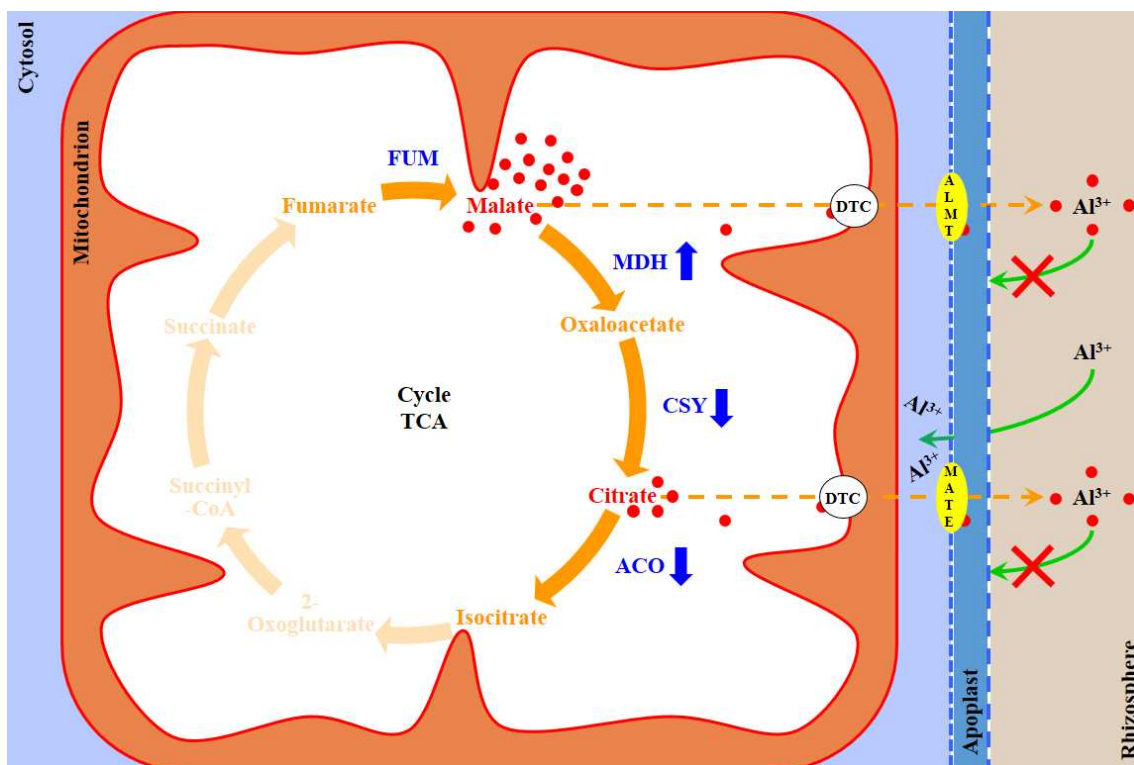


Figura 11: Regulação via modos não-cíclicos do ciclo TCA no córtex radicular em resposta ao Al. No córtex radicular, um aumento pronunciado na expressão de *mMDH* foi observado. Para que o efluxo de malato, mediado por AtALMT, seja favorecido, a expressão dos genes *CSY4* e *ACO* foi reduzida, promovendo uma possível diminuição do fluxo através do ciclo TCA. Com efeito, o aumento consideravelmente menor na expressão do gene

FUM, comparado ao gene *mMDH*, sugere que o aumento pronunciado na expressão do gene *mMDH* esteja associado, em larga extensão, a um maior direcionamento de malato para as mitocôndrias das células corticais. Registre-se que tal fato é corroborado por um nível consideravelmente mais baixo de expressão do gene *mMDH* nas demais células. MDH: *MITOCHONDRIAL MALATE DEHYDROGENASE*; FUM: *FUMARASE*; CSY: *CITRATE SYNTHASE*; ACO: *ACONITASE*; ALMT: *ALUMINUM-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER*; MATE: *MULTIDRUG AND TOXIC COMPOUND EXTRUSION FAMILY*; DTC: *DICARBOXYLATE/TRICARBOXYLATE CARRIER*; TCA: *TRICARBOXYLIC ACID*.

5 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados permitiram demonstrar como e em que extensão os genes associados aos ciclos celular e TCA, dois processos chaves envolvidos com a tolerância ao estresse por Al, são regulados em um nível ainda pouco explorado. Em resumo, os genótipos *p35S* e *pSCR* apresentaram as maiores alterações na expressão dos genes envolvidos com o ciclo celular: no primeiro, verificamos expressões mais elevadas de *ATR*, *CDKB2;1*, *MYB3R4*, *MYB3R5*, *KNOLLE*, *CYCBI;2*, *ANAC044* e *ANAC085*, bem como menor expressão de *MYB3R3* em resposta ao Al; no segundo, verificamos maiores expressões de *MYB3R3*, *KNOLLE*, *CYCBI;2* e *ANAC044*. No genótipo *pPEP*, embora pouca ou nenhuma variação tenha sido encontrada para os genes envolvidos com o ciclo celular, um drástico aumento na expressão da *mMDH1*, somado às reduzidas expressões dos genes *CSY4* e *ACO*, sugere que o malato esteja grandemente comprometido com a tolerância ao Al em *Arabidopsis*, como notado pela redução do fluxo através do ciclo TCA.

Em adição, considerando-se as respostas a nível de translatoma de células com distintas identidades, é plausível sugerir que: (i) a expressão gênica é, aparentemente, regulada diferencialmente de acordo com essa identidade (status de diferenciação celular, função celular, etc.) e (ii) que a expressão gênica célula-específica, particularmente em células indiferenciadas (centro quiescente e endoderme) e diferenciadas (zona cortical das regiões de alongamento e maturação) explica, em larga extensão, como plantas de *Arabidopsis* respondem à presença de Al mediante uma reprogramação da expressão gênica em grupos específicos de células radiculares. Concomitantemente, os resultados sugerem que, análises célula-específicas aqui realizadas, bem como as associações genótipo-fenótipo inferidas neste estudo, serão uma contribuição importante para os esforços atuais de melhoramento molecular com vistas ao incremento na tolerância ao Al. Ademais, os resultados indicam potenciais interações entre os mecanismos de resposta ao Al mediados pelo ciclo celular e TCA e, portanto, novas abordagens genéticas, bioquímicas e fisiológicas devem ser combinadas para maximizar a

compreensão dos impactos do Al nas raízes de plantas. É plausível sugerir que isso auxiliará nos esforços para melhorar a tolerância ao Al sem a ocorrência de penalidades de rendimento em plantas de interesse agrônomico contribuindo, em última instância, para uma agricultura sustentável.

6 REFERÊNCIAS

- Adachi S, Minamisawa K, Okushima Y, Inagaki S, Yoshiyama K, Kondou Y, Kaminuma E, Kawashima M, Toyoda T, Matsui M, Kurihara D, Matsunaga S, and Umeda M** (2011) Programmed induction of endoreduplication by DNA double-strand breaks in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**:10004–10009.
- Aguilera A, García-Muse T** (2013) Causes of genome instability. *Annual Review of Genetics* **47**:1–32.
- Aida M, Ishida T, Fukaki H, Fujisawa H, Tasaka M** (1997) Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of the cupshaped cotyledon mutant. *Plant Cell* **9**: 841–857.
- Amiard S, Gallego ME, White CI** (2013) Signaling of double strand breaks and deprotected telomeres in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* **4**:405.
- Araki S, Ito M, Soyano T, Nishihama R, Machida Y** (2004) Mitotic cyclins stimulate the activity of c-Myb-like factors for transactivation of G2/M phase-specific genes in tobacco. *The Journal of Biological Chemistry* **279**:32979-32988.
- Auger C, Han S, Appanna VP, Thomas SC, Ulibarri G, Appanna VD** (2013) Metabolic reengineering invoked by microbial systems to decontaminate aluminum: implications for bioremediation technologies. *Biotechnology Advances* **31**:266–273.
- Baerenfaller K, Grossmann J, Grobei MA, Hull R, Hirsch-Hoffmann M, Yalovsky S, Zimmermann P, Grossniklaus U, Gruissem W, Baginsky S** (2008) Genome-scale proteomics reveals *Arabidopsis thaliana* gene models and proteome dynamics. *Science* **320**:938–941.
- Barone P, Rosellini D, Lafayette P, Bouton J, Veronesi F, Parrott W** (2008) Bacterial citrate synthase expression and soil aluminum tolerance in transgenic alfalfa. *Plant Cell Reports* **27**:893–901.
- Bleuyard JY, Gallego ME, White CI** (2006) Recent advances in understanding of the DNA double-strand break repair machinery of plants. *DNA Repair (Amst)* **5**:1–12.

- Bojórquez-Quintal E, Escalante-Magaña C, Echevarría-Machado I, Martínez-Estévez M** (2017) Aluminum, a Friend or Foe of Higher Plants in Acid Soils. *Frontiers in Plant Science* **8**:1767.
- Bourbousse C, Vegesna N, Law JA** (2018) SOG1 activator and MYB3R repressors regulate a complex DNA damage network in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **115**:12453–12462.
- Branco-Price C, Kaiser KA, Jang CJH, Larive CK, Bailey-Serres J** (2008) Selective mRNA translation coordinates energetic and metabolic adjustments to cellular oxygen deprivation and reoxygenation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **56**:743–755.
- Branco-Price C, Kawaguchi R, Ferreira RB, Bailey-Serres J** (2005) Genome-wide analysis of transcript abundance and translation in *Arabidopsis* seedlings subjected to oxygen deprivation. *Annals of Botany* **96**:647–660.
- Brunner I, Sperisen C** (2013) Aluminium exclusion and aluminium tolerance in woody plants. *Frontiers in Plant Science* **4**:172.
- Chen P, Sjogren CA, Larsen PB, Schnittger A** (2019) A multi-level response to DNA damage induced by Aluminium. *The Plant Journal* **98**:479–491.
- Chen P, Takatsuka H, Takahashi N, Kurata R, Fukao Y, Kobayashi K, Ito M, Umeda M** (2017) *Arabidopsis* R1R2R3-Myb proteins are essential for inhibiting cell division in response to DNA damage. *Nature Communications* **8**:635.
- Chenier D, Beriault R, Mailloux R, Baquie M, Abramia G, Lemire J, Appanna V** (2008) Involvement of fumarase C and NADH oxidase in metabolic adaptation of *Pseudomonas fluorescens* cells evoked by aluminum and gallium toxicity. *Applied and Environmental Microbiology* **74**:3977–3984.
- Ciccia A, Elledge SJ** (2010) The DNA damage response: Making it safe to play with knives. *Molecular Cell* **40**:179–204.
- de Jong M, van Breukelen B, Wittink FR, Menke FLH, Weisbeek PJ, den Ackerveken GV** (2006) Membrane-associated transcripts in *Arabidopsis*; their isolation and characterization by DNA microarray analysis and bioinformatics. *The Plant Journal* **46**:708–721.
- de la Fuente JM, Ramírez-Rodríguez V, Cabrera-Ponce JL, Herrera-Estrella L** (1997) Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science* **276**:1566–1568.

- Deng W, Luo K, Li Z, Yang Y, Hu N, Wu Y** (2009) Overexpression of *Citrus junos* mitochondrial citrate synthase gene in *Nicotiana benthamiana* confers aluminum tolerance. *Planta* **230**:355–365.
- Fernie AR, Aharoni A, Willmitzer L, Stitt M, Tohge T, Kopka J, Carroll AJ, Saito K, Fraser PD, DeLuca V** (2011) Recommendations for reporting metabolite data. *The Plant Cell* **23**:2477–2482.
- Furukawa T, Curtis MJ, Tominey CM, Duong YH, Wilcox BW, Aggoune D, Hays JB, Britt AB** (2010) A shared DNA-damage-response pathway for induction of stem-cell death by UVB and by gamma irradiation. *DNA Repair (Amst)* **9**:940–948.
- Goldenkova-Pavlova IV, Pavlenko OS, Mustafaev ON, Deyneko IV, Kabardaeva KV, Tyurin AA** (2019) Computational and Experimental Tools to Monitor the Changes in Translation Efficiency of Plant mRNA on a Genome-Wide Scale: Advantages, Limitations, and Solutions. *International Journal of Molecular Sciences* **20**:33.
- Haga N, Kato K, Murase M, Araki S, Kubo M, Demura T, Suzuki K, Muller I, Voss U, Jurgens G, Ito M** (2007) R1R2R3-Myb proteins positively regulate cytokinesis through activation of KNOLLE transcription in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **134**:1101–1110.
- Haga N, Kobayashi K, Suzuki T, Maeo K, Kubo M, Ohtani M, Mitsuda N, Demura T, Nakamura K, Jurgens G, Ito M** (2011) Mutations in MYB3R1 and MYB3R4 cause pleiotropic developmental defects and preferential down-regulation of multiple G2/M-specific genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **157**:706–717.
- Han Y, Zhang W, Zhang B, Zhang S, Wang W, Ming F** (2009) One novel mitochondrial citrate synthase from *Oryza sativa* L. can enhance aluminum tolerance in transgenic tobacco. *Molecular Biotechnology* **42**:299–305.
- Harper JW, Elledge SJ** (2007) The DNA damage response: ten years after. *Molecular Cell* **28**:739–745.
- Hu Z, Cools T, De Veylder L** (2016) Mechanisms used by plants to cope with DNA damage. *Annual Review of Plant Biology* **67**:439–462.
- Ito M** (2005) Conservation and diversification of three-repeat myb transcription factors in plants. *Journal of Plant Research* **118**:61–69.
- Jin JF, Wang ZQ, He QY, Wang JY, Li PF, Xu JM, Zheng SJ, Fan W, Yang JL** (2020) Genome-wide identification and expression analysis of the NAC transcription factor family in tomato (*Solanum lycopersicum*) during aluminum stress. *BMC Genomics* **21**:288.

- Kawaguchi R, Bailey-Serres J** (2005) mRNA sequence features that contribute to translational regulation in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Research* **33**:955–965.
- Kawaguchi R, Girke T, Bray EA, Bailey-Serres J** (2004) Differential mRNA translation contributes to gene regulation under non-stress and dehydration stress conditions in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **38**:823–839.
- Kim HJ, Nam HG, Lim PO** (2016) Regulatory network of NAC transcription factors in leaf senescence. *Current Opinion in Plant Biology* **33**:48–56.
- King HA, Gerber AP** (2016) Translatome profiling: methods for genome-scale analysis of mRNA translation. *Briefings in Functional Genomics* **15**:22–31.
- Knoll A, Fauser F, Puchta H** (2014) DNA recombination in somatic plant cells: Mechanisms and evolutionary consequences. *Chromosome Research* **22**:191–201.
- Kobayashi K, Suzuki T, Iwata E, Nakamichi N, Suzuki T, Chen P, Ohtani M, Ishida T, Hosoya H, Muller S, Leviczky T, Pettkó-Szandtner A, Darula Z, Iwamoto A, Nomoto M, Tada Y, Higashiyama T, Demura T, Doonan JH, Hauser MT, Sugimoto K, Umeda M, Magyar Z, Bogre L** (2015) Transcriptional repression by MYB3R proteins regulates plant organ growth. *The EMBO Journal* **34**:1992–2007.
- Kobayashi Y, Hoekenga OA, Itoh H, Nakashima M, Saito S, Shaff JE, Maron LG, Pineros MA, Kochian LV, Koyama H** (2007) Characterization of *AtALMT1* expression in aluminum-inducible malate release and its role for rhizotoxic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **145**:843–852.
- Kochian LV** (1995) Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **46**:237–260.
- Kochian LV, Hoekenga AO, Pineros MA** (2004) How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorus efficiency. *Annual Review of Plant Biology* **55**:459–493.
- Kochian LV, Pineros MA, Hoekenga OA** (2005) The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. *Plant and Soil* **274**:175–195.
- Kochian LV, Piñeros MA, Liu J, Magalhaes JV** (2015) Plant adaptation to acid soils: The molecular basis for crop aluminum resistance. *Annual Review of Plant Biology* **66**:571–598.
- Kopka J, Schauer N, Krueger S, Birkemeyer C, Usadel B, Bergmüller E, Dörmann P, Weckwerth W, Gibon Y, Stitt M, Willmitzer L, Fernie AR, Steinhauser D** (2005) GMD@CSB.DB: the Golm Metabolome Database. *Bioinformatics* **21**:1635–1638.

- Kubo M, Udagawa M, Nishikubo N, Horiguchi G, Yamaguchi M, Ito J, Mimura T, Fukuda H, Demura T** (2005) Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. *Genes Development* **19**:1855–1860.
- Kumari M, Taylor GJ, Deyholos MK** (2008) Transcriptomic responses to aluminum stress in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Genetics and Genomics* **279**:339–357.
- Lemire J, Mailloux R, Auger C, Whalen D, Appanna VD** (2010) *Pseudomonas fluorescens* orchestrates a fine metabolic-balancing act to counter aluminium toxicity. *Environmental Microbiology* **12**:1384–1390.
- Lisec L, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR** (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols* **1**:387–396.
- Liu J, Piñeros MA, Kochian LV** (2014) The role of aluminum sensing and signaling in plant aluminum resistance. *Journal of Integrative Plant Biology* **56**:221–230.
- Luedemann A, Strassburg K, Erban A, Kopka J** (2008) TagFinder for the quantitative analysis of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)-based metabolite profiling experiments. *Bioinformatics* **24**:732–737.
- Ma JF** (2000) Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants. *Plant & Cell Physiology* **41**:383–390.
- Ma JF** (2007) Syndrome of aluminum toxicity and diversity of aluminum resistance in higher plants. *International Review of Cytology* **264**:225–252.
- Magalhaes JV** (2010) How a microbial drug transporter became essential for crop cultivation on acid soils: aluminium tolerance conferred by the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family. *Annals of Botany* **106**:199–203.
- Manova V, Gruszka D** (2015) DNA damage and repair in plants—From models to crops. *Frontiers in Plant Science* **6**:885.
- Maron LG, Kirst M, Mao C, Milner MJ, Menossi M, Kochian LV** (2008) Transcriptional profiling of aluminum toxicity and tolerance responses in maize roots. *The New Phytologist* **179**:116–128.
- Mattiello L, Kirst M, Silva FR, Jorge RA, Menossi M** (2010) Transcriptional profile of maize roots under acid soil growth. *BMC Plant Biology* **10**:196.
- Moeder W, del Pozo O, Navarre DA, Martin GB, Klessig DF** (2007) Aconitase plays a role in regulating resistance to oxidative stress and cell death in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Molecular Biology* **63**:273–287.

- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* **15**:473–497.
- Mustroph A, Zanetti ME, Girke T, Bailey-Serres J** (2013) Isolation and Analysis of mRNAs from Specific Cell Types of Plants by Ribosome Immunopurification. *Methods in Molecular Biology* **959**:277–302.
- Mustroph A, Zanetti ME, Jang CJH, Holtan HE, Repetti PP, Galbraith DW, Girke T, Bailey-Serres J** (2009) Profiling translomes of discrete cell populations resolves altered cellular priorities during hypoxia in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**:18843–18848.
- Nicolai M, Roncato MA, Canoy AS, Rouquié D, Sarda X, Freyssinet G, Robaglia C** (2006) Large-scale analysis of mRNA translation states during sucrose starvation in *Arabidopsis* cells identifies cell proliferation and chromatin structure as targets of translational control. *Plant Physiology* **141**:663–673.
- Nunes-Nesi A, Araújo WL, Obata T, Fernie AR** (2013) Regulation of the mitochondrial tricarboxylic acid cycle. *Current Opinion in Plant Biology* **16**:335–343.
- Nunes-Nesi A, Brito DS, Inostroza-Blancheteau C, Fernie AR, Araújo WL** (2014) The complex role of mitochondrial metabolism in plant aluminum resistance. *Trends in Plant Science* **19**:399–407.
- Ogita N, Okushima Y, Tokizawa M, Yamamoto YY, Tanaka M, Seki M, Makita Y, Matsui M, Okamoto-Yoshiyama K, Sakamoto T, Kurata T, Hiruma K, Saijo Y, Takahashi N, Umeda M** (2018) Identifying the target genes of SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE 1, a master transcription factor controlling DNA damage response in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **94**:439–453.
- Piques M, Schulze WX, Höhne M, Usadel B, Gibon Y, Rohwer J, Stitt M** (2009) Ribosome and transcript copy numbers, polysome occupancy and enzyme dynamics in *Arabidopsis*. *Molecular Systems Biology* **5**:314.
- Polle E, Konzak CF, Kittrick JA** (1978) Visual detection of aluminum tolerance leaves in wheat by hematoxylin staining of seedling roots. *Crop Science* **18**:823–827.
- Poschenrieder C, Gunsé B, Corrales I, Barceló J** (2008) A glance into aluminum toxicity and resistance in plants. *The Science of the Total Environment* **400**:356–368.
- Pracharoenwattana I, Cornah JE, Smith SM** (2005) *Arabidopsis* peroxisomal citrate synthase is required for fatty acid respiration and seed germination. *The Plant cell* **17**:2037–2048.

- Pracharoenwattana I, Zhou W, Keech O, Francisco PB, Udomchalothorn T, Tschoep H, Stitt M, Gibon Y, Smith SM** (2010) *Arabidopsis* has a cytosolic fumarase required for the massive allocation of photosynthate into fumaric acid and for rapid plant growth on high nitrogen. *The Plant Journal* **62**:785-795.
- Preuss SB, Britt AB** (2003) A DNA-damage-induced cell cycle checkpoint in *Arabidopsis*. *Genetics* **164**:323–334.
- Puranik S, Sahu PP, Srivastava OS, Prasad M** (2012) NAC proteins: regulation and role in stress tolerance. *Trends in Plant Science* **17**:369–381.
- Rocha M, Licausi F, Araújo WL, Nunes-Nesi A, Sodek L, Fernie AR, van Dongen JT** (2010) Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are linked by alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of *Lotus japonicus*. *Plant Physiology* **152**:501–1513.
- Rodgers K, McVey M** (2016) Error-prone repair of DNA double-strand breaks. *Journal of Cellular Physiology* **231**:15–24.
- Ryan PR, Tyerman SD, Sasaki T, Furuichi T, Yamamoto Y, Zhang WH, Delhaize E** (2011) The identification of aluminium-resistance genes provides opportunities for enhancing crop production on acid soils. *Journal of Experimental Botany* **62**:9–20.
- Ryu TH, Go YS, Choi SH, Kim JI, Chung BY, Kim JH** (2019) SOG1-dependent NAC103 modulates the DNA damage response as a transcriptional regulator in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **98**:83–96.
- Schauer N, Steinhauser D, Strelkov S, Schomburg D, Allison G, Moritz T, Lundgren K, Roessner-Tunali U, Forbes MG, Willmitzer L, Fernie AR, Kopka J** (2005) GC-MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. *FEBS Letters* **579**:1332–1337.
- Shiloh Y, Ziv Y** (2013) The ATM protein kinase: Regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **14**:197–210.
- Singh R, Lemire J, Mailloux RJ, Chénier D, Hamel R, Appanna VD** (2009) An ATP and oxalate generating variant tricarboxylic acid cycle counters aluminum toxicity in *Pseudomonas fluorescens*. *PLoS One* **4**:e7344.
- Sjogren CA, Bolaris SC, Larsen PB** (2015) Aluminum-Dependent terminal differentiation of the *Arabidopsis* root tip is mediated through an ATR-, ALT2-, and SOG1-Regulated transcriptional response. *The Plant Cell* **27**:2501–2515.
- Su TT** (2006) Cellular responses to DNA damage: One signal, multiple choices. *Annual Review of Genetics* **40**:187–208.

- Sun L, Liang C, Chen Z, Liu P, Tian J, Liu G, Liao H** (2014) Superior aluminium (Al) tolerance of *Stylosanthes* is achieved mainly by malate synthesis through an Al-enhanced malic enzyme, SgME1. *The New Phytologist* **202**:209–219.
- Sweetlove LJ, Beard KFM, Nunes-Nesi A, Fernie AR, Ratcliffe RG** (2010) Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle. *Trends in Plant Science* **15**:462–470.
- Takahashi N, Ogita N, Takahashi T, Taniguchi S, Tanaka M, Seki M, Umeda M** (2019) A regulatory module controlling stress-induced cell cycle arrest in *Arabidopsis*. *eLife* **8**:e43944.
- Tesfaye M, Temple SJ, Allan DL, Vance CP, Samac DA** (2001) Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic alfalfa enhances organic acid synthesis and confers tolerance to aluminum. *Plant Physiology* **127**:1836–1844.
- Tomaz T, Bagard M, Pracharoenwattana I, Lindén P, Lee CP, Carroll AJ, Ströher E, Smith SM, Gardeström P, Millar AH** (2010) Mitochondrial malate dehydrogenase lowers leaf respiration and alters photorespiration and plant growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **154**:1143–1157.
- Trejo-Téllez LI, Stenzel R, Gómez-Merino FC, Schmitt JM** (2010) Transgenic tobacco plants overexpressing pyruvate phosphate dikinase increase exudation of organic acids and decrease accumulation of aluminum in the roots. *Plant and Soil* **326**:187–198.
- von Uexkull HR, Mutert E** (1995) Global extent, development and economic-impact of acid soils. *Plant and Soil* **171**:1–15.
- Wang Q, Yi Q, Hu Q, Zhao YZ, Nian H, Li K, Yu Y, Izui K, Chen L** (2012) Simultaneous overexpression of citrate synthase and phosphoenolpyruvate carboxylase in leaves augments citrate exclusion and Al resistance in transgenic tobacco. *Plant Molecular Biology Reporter* **30**:992–1005.
- Wang Q-F, Zhao Y, Yi Q, Li K-Z, Yu Y-X, Chen L-M** (2010) Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic tobacco leaves: enhanced malate synthesis and augmented Al-resistance. *Acta Physiologiae Plantarum* **32**:1209–1220.
- Yang Z-B, Liu G, Liu J, Zhang B, Meng W, Müller B, Hayashi K, Zhang X, Zhao Z, De Smet I, Ding Z** (2017) Synergistic action of auxin and cytokinin mediates aluminum-induced root growth inhibition in *Arabidopsis*. *EMBO Reports* **18**:1213–1230.
- Yi D, Kamei CLA, Cools T, Vanderauwera S, Takahashi N, Okushima Y, Eekhout T, Yoshiyama KO, Larkin J, Van den Daele H, Conklin P, Britt A, Umeda M, De Veylder L** (2014) The *Arabidopsis* SIAMESE-RELATED cyclin-dependent kinase inhibitors SMR5 and

SMR7 regulate the DNA damage checkpoint in response to reactive oxygen species. *The Plant Cell* **26**:296-309.

Yin K, Ueda M, Takagi H, Kajihara T, Sugamata Aki S, Nobusawa T, Umeda-Hara C, Umeda M (2014) A dual-color marker system for in vivo visualization of cell cycle progression in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **80**:541–552.

Yoshiyama K, Conklin PA, Huefner ND, Britt AB (2009) Suppressor of gamma response 1 (SOG1) encodes a putative transcription factor governing multiple responses to DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**:12843–12848.

Yoshiyama KO, Kaminoyama K, Sakamoto T, Kimura S (2017) Increased phosphorylation of Ser-Gln sites on Suppressor of gamma response1 strengthens the DNA damage response in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* **29**:3255–3268.

Yoshiyama KO, Kimura S, Maki H, Britt AB, Umeda M (2014) The role of SOG1, a plant-specific transcriptional regulator, in the DNA damage response. *Plant Signaling Behavior* **9**:e28889.

Yoshiyama KO, Kobayashi J, Ogita N, Ueda M, Kimura S, Maki H, Umeda M (2013) ATM-mediated phosphorylation of SOG1 is essential for the DNA damage response in *Arabidopsis*. *EMBO reports* **14**:817–822.

Yoshiyama KO, Sakaguchi K, Kimura S (2013) DNA damage response in plants: Conserved and variable response compared to animals. *Biology (Basel)* **2**:1338–1356.

Zhang TQ, Xu ZG, Shang GD, Wang JW (2019) A Single-Cell RNA Sequencing Profiles the Developmental Landscape of *Arabidopsis* Root. *Molecular Plant* **12**:648–660.

7 INFORMAÇÕES SUPLEMENTARES

LINHAS TRANSGÊNICAS	CÉLULAS ALVO	LOCUS DA FONTE DO PROMOTOR	CROMOSSOMO DA INSERÇÃO DO T- DNA	LOCUS DA (OU PRÓXIMO DA) INSERÇÃO DO T- DNA	ORIENTAÇÃO DO TRANSGENE EM RELAÇÃO AO LOCUS PRÓXIMO DA INSERÇÃO
<i>p35S:FLAG-RPL18</i>	Quase constitutivo	-	5	3' de At5g60460	<i>Reverse</i>
<i>pSCR:FLAG-RPL18</i>	Centro quiescente e endoderme (raiz)	At3g54220	3	5' flanqueando At3g30842	<i>Reverse</i>
<i>pPEP:FLAG-RPL18</i>	Córtex radicular das zonas de alongamento e maturação	At1g09750	4	5' flanqueando At4g19925	<i>Reverse</i>

Tabela suplementar 1: Linhas transgênicas *p:FLAG-RPL18* utilizadas - *p35S*: Cauliflower mosaic virus 35S; *pSCR*: SCARECROW; *pPEP*: plastid endopeptidase.

GENE (LOCUS)	SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS (5'-3')	REFERÊNCIA
<i>F-box</i> (At5g15710)	(F) TTTCGGCTGAGAGGTTTCGAGT (R) GATTCCAAGACGTAAAGCAGATCAA	
<i>ANAC044</i> (At3g01600)	(F) GAGCGCTAGAAAGGGAACGA (R) CCCC GGAACTACTCTCACCTTC	Takahashi et al. (2019)
<i>ANAC085</i> (At5g14490)	(F) AGCACACCGAAAAGTAGTAC (R) CTTCAATAA CACTCACATTCCC	Takahashi et al. (2019)
<i>KN</i> (At1g08560)	(F) CTAATCAGAAGAGTGAAAAAGATG (R) TTCGTAGAAGCCATCTCAAGATC	Takahashi et al. (2019)
<i>CYCBI;2</i> (At5g06150)	(F) ATTACGACACCTTGACGTTCTGTC (R) TTTGAGCAGTCCATAATCTCAGAC	Takahashi et al. (2019)
<i>SMR5</i> (At1g07500)	(F) TTGCCGGATACCAGCATA C (R) GCGGCTGAAAATATCCCTTC	Takahashi et al. (2019)
<i>SMR7</i> (At3g27630)	(F) CCCACCGGTGTTGAAATG (R) CGTTGTATAAACACCAACTCGAA	Takahashi et al. (2019)
<i>MYB3R3</i> (At3g09370)	(F) TAAGGTCTTACCCGGCAGGACTGAT (R) CTGATGAGGTTTGAGCAACTGAACC	Takahashi et al. (2019)
<i>MYB3R4</i> (At5g11510)	(F) AATCGCTTGAGAAAGTAGACC (R) AGTAGACAGGACTGGCTTACCG	Takahashi et al. (2019)

<i>MYB3R5</i> (At5g02320)	(F) GCTAAGGTTTTACCAGGAAGGACTG (R) TTTCCTGAAGAGGTTTGGGTAAGCG	Chen et al. (2017)
<i>SOG1</i> (At1g25580)	(F) GAAGCTTAAAGGATAAACAACCATGT (R) TTCCAGTCCCCCAAGCGAGA	Ryu et al. (2019)
<i>ATM</i> (At3g48190)	(F) GCCTTGTCCCCCTTAAAGGC (R) CATCCAAGCTCCCCAGCCAG	Ryu et al. (2019)
<i>ATR</i> (At5g40820)	(F) GGTTGGGCACATTGTTGGGC (R) CTTATGGCCCGCTGAGCATG	Ryu et al. (2019)
<i>CDKB2;1</i> (At1g76540)	(F) CCAATGAAGAAGTATAACCCATGAGA (R) AATGGGTGGCACCAAGAAG	Adachi et al. (2011)
<i>mMDHI</i> (At1g53240)	(F) CAGCCTCTTGCTCTCCTCAT (R) TCAAGAACCTCCTCCACACC	Tomaz et al. (2010)
<i>FUM1</i> (At2g47510)	(F) CTCACACTCAAGATGCTACACC (R) GCACGCCTAAATTCAGAGCCGC	Prachoenwattana et al. (2010)
<i>CSY4</i> (At2g44350)	(F) AGCAGGACCGTCTGAAGAAA (R) CGGAATAACCTTGCCACTGT	Prachoenwattana et al. (2005)
<i>ACO1</i> (At4g35830)	(F) GAGTTCAATTTTAACGGGACCA (R) CCACTCATAGAGAGTACCTGA	Moeder et al. (2007)

Tabela suplementar 2: Primers utilizados para qRT-PCR – ***F-BOX***: *F-BOX*; ***ANAC044***: *NAC-TYPE TRANSCRIPTION FACTOR ANAC044*; ***ANAC085***: *NAC-TYPE TRANSCRIPTION FACTOR ANAC085*; ***KN***: *KNOLLE*; ***CYCB1;2***: *CYCLIN B1;2*; ***SMR5***: *SIAMESE-RELATED 5*; ***SMR7***: *SIAMESE-RELATED 7*; ***MYB3R3***: *R1R2R3-TYPE MYB TRANSCRIPTION FACTOR MYB3R3*; ***MYB3R4***: *R1R2R3-TYPE MYB TRANSCRIPTION FACTOR MYB3R4*; ***MYB3R5***: *R1R2R3-TYPE MYB TRANSCRIPTION*

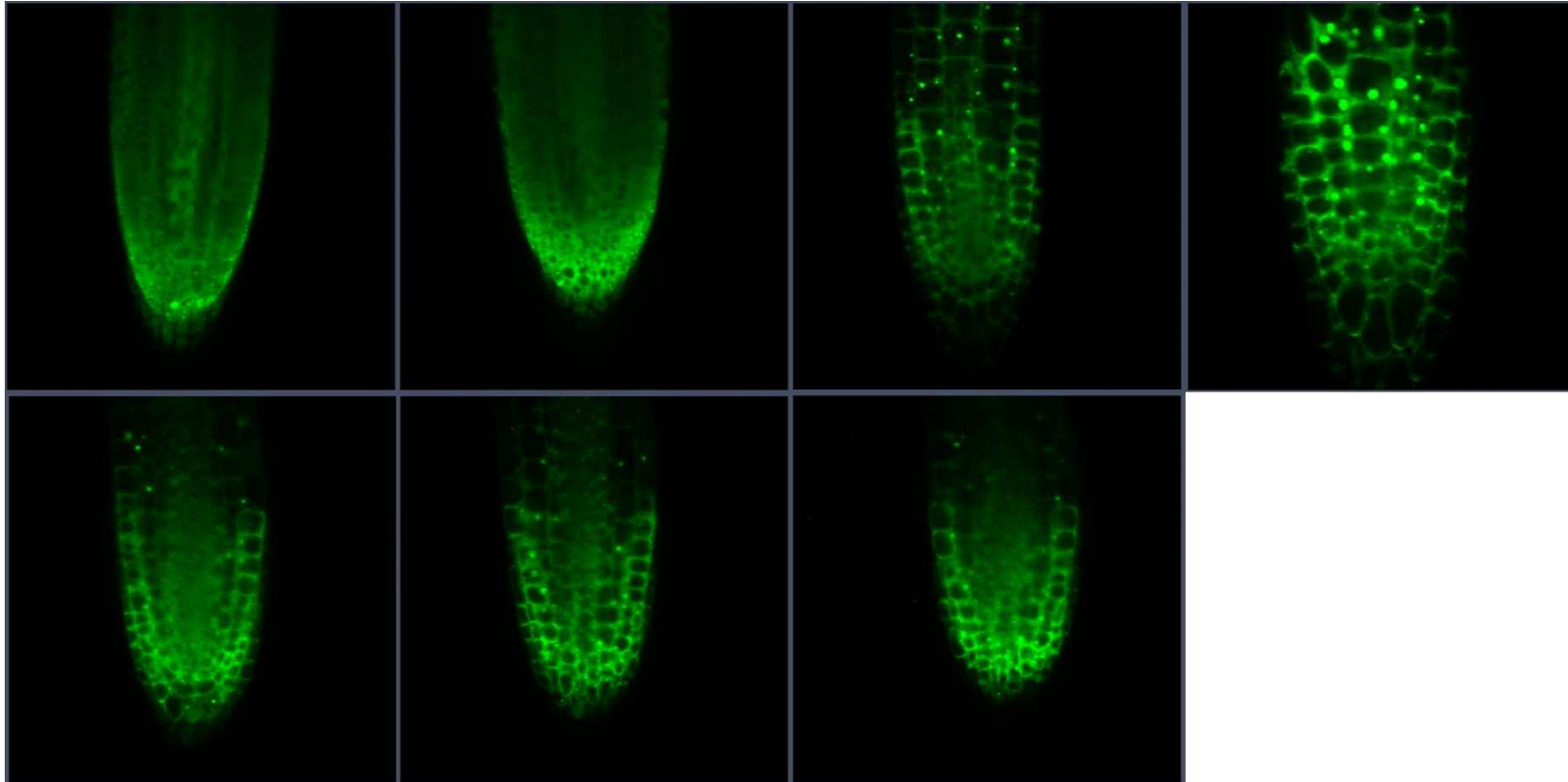
FACTOR MYB3R5; SOG1: SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE 1 (SOG1) TRANSCRIPTION FACTOR; ATM: ATAXIA-TELANGIECTASIA MUTATED; ATR: ATAXIA-TELANGIECTASIA MUTATED AND RAD3-RELATED; CDKB2;1: CYCLIN-DEPENDENT KINASE B2;1; mMDH1: MITOCHONDRIAL MALATE DEHYDROGENASE 1; FUM1: FUMARASE 1; CSY4: CITRATE SYNTHASE 4; ACO1: ACONITASE 1.

Metabólitos	Linhas x Tratamentos					
	35S		SCR		PEP	
	- Al	+ Al	- Al	+ Al	- Al	+ Al
2-oxoglutarato	1±0,3094	0,9315±0,1187	1±0,1615	1,5469±0,226	1±0,136	1,8642±0,2004
Glutarato	1±0,092	0,729±0,0988	1±0,2551	1,5342±0,176	1±0,1911	1,019±0,0474
Glicerato	1±0,34	1,9148±0,3776	1±0,3555	1,3962±0,3979	1±0,739	1,2984±0,5724
Nicotinato	1±0,0871	1,1488±0,0988	1±0,322	1,2169±0,1062	1±0,2086	1,049±0,0915
Glicolato	1±0,0482	0,8816±0,1482	1±0,1502	1,4102±0,1761	1±0,1722	1,2567±0,0981
Piroglutamato	1±0,206	1,1517±0,1197	1±0,2896	1,6011±0,1725	1±0,2448	0,9743±0,1004
Piruvato	1±0,2637	1,0285±0,1025	1±0,1851	1,2717±0,1208	1±0,1391	1,4035±0,1
Succinato	1±0,245	1,9809±0,2295	1±0,1852	3,0781±0,3566	1±0,2205	2,0482±0,1456
Citrato	1±0,3281	1,907±0,2501	1±0,2336	2,649±0,4989	1±0,1613	1,6197±0,0378
Desidroascorbato	1±0,1265	0,92±0,2503	1±0,3183	1,4763±0,5583	1±0,2829	1,3909±0,023
Malato	1±0,1159	2,3635±0,3351	1±0,2175	2,8584±0,6621	1±0,2358	2,7706±0,3053
Malonato	1±0,216	1,2479±0,1153	1±0,2035	2,3916±0,4054	1±0,1999	1,0934±0,0688
Fumarato	1±0,2176	1,3805±0,2875	1±0,244	2,638±0,7956	1±0,3554	1,1328±0,0539
Glutamina	1±0,165	1,1454±0,0946	1±0,2658	1,3899±1909	1±0,2768	0,8346±0,0922
Metionina	1±0,1462	1,1756±0,1696	1±0,159	1,5562±0,1758	1±0,2743	1,2455±0,3222
GABA	1±0,2807	1,646±0,1799	1±0,1417	2,2209±0,2467	1±0,2112	1,1208±0,0432
Alanina	1±0,1211	1,2308±0,1039	1±0,1922	2,4601±0,2918	1±0,4494	1,3903±0,5045
Ornitina	1±0,1783	1,4098±0,3119	1±0,1342	1,9758±0,544	1±0,3015	0,6372±0,1155
Fenilalanina	1±0,1634	0,8891±0,1821	1±0,1265	1,4987±0,3065	1±0,2901	0,8217±0,0853
Glicina	1±0,1765	1,1148±0,2185	1±0,1793	1,5669±0,2204	1±0,2276	0,9246±0,0878
Asparagina	1±0,2756	1,2522±0,12	1±0,2241	1,718±0,2179	1±0,2576	0,9144±0,0479
Aspartato	1±0,2342	1,1678±0,1657	1±0,2527	1,7546±0,1449	1±0,1972	1,3547±0,0887
β-alanina	1±0,1425	1,0942±0,1498	1±0,3085	1,3052±0,1699	1±0,2339	0,8995±0,1063
Guanidina	1±0,2654	0,6341±0,1456	1±0,4912	0,6901±0,0538	1±0,5536	0,475±0,0344
Histidina	1±0,388	1,8212±0,3493	1±0,2848	1,9292±0,1769	1±0,2575	0,9534±0,1181
Serina	1±0,2118	1,2035±0,2738	1±0,2715	1,4377±0,2206	1±0,252	0,917±0,1358
Citrulina	1±0,2491	1,7547±0,1743	1±0,2085	2,0651±0,4792	1±0,2725	0,7176±0,1403
Homoserina	1±0,2923	1,7703±0,2404	1±0,3002	1,881±0,2618	1±0,2675	0,8499±0,0948
Hidroxiprolina	1±0,1857	0,8731±0,0716	1±0,253	1,6019±0,2083	1±0,2099	1,058±0,0533
Isoleucina	1±0,2314	0,9477±0,2123	1±0,2325	1,0923±0,2336	1±0,2543	0,842±0,1072
Treonina	1±0,2193	1,1728±0,1751	1±0,2931	1,503±0,1727	1±0,206	1,1268±0,171
Leucina	1±0,171	1,0391±0,2191	1±0,2263	1,0042±0,1958	1±0,2394	0,8045±0,1108
Triptofano	1±0,0629	1,2515±0,3424	1±0,2076	1,8397±0,5127	1±0,2735	1,085±0,1892
Tirosina	1±0,2324	1,2318±0,3971	1±0,1878	1,2447±0,3188	1±0,3522	0,864±0,1216
Valina	1±0,2309	1,0754±0,2484	1±0,2262	1,395±0,2013	1±0,2318	0,8933±0,1053
Glutamato	1±0,2113	1,065±0,1285	1±0,2018	2,0361±0,25	1±0,2333	1,343±0,1299
Mio-inositol	1±0,2464	1,0671±0,2833	1±0,243	2,792±0,2803	1±0,2196	1,3805±0,1642
Altrose	1±0,2254	1,4315±0,197	1±0,3186	3,0275±0,76	1±0,2542	2,1197±0,7882
Sacarose	1±0,08	0,8048±0,0963	1±0,4426	3,3796±0,6897	1±0,4424	3,6662±0,8338
Frutose	1±0,1606	0,622±0,1114	1±0,484	0,4157±0,272	1±0,2178	1,6029±0,4487
Trealose	1±0,1313	0,7159±0,1134	1±0,25	1,9593±0,2653	1±0,2345	1,9363±0,6675
Fucose	1±0,1386	1,1859±0,1228	1±0,3247	1,5789±0,2371	1±0,2366	1,2608±0,1897
Galactose	1±0,3377	0,7537±0,0522	1±0,4918	1,4262±0,3703	1±0,2495	1,8329±0,4649
Maltose	1±0,0767	1,6758±0,2667	1±0,206	1,3185±0,05	1±0,1578	1,1128±0,0376
Glicose	1±0,2146	1,3837±0,1841	1±0,275	2,6084±0,5965	1±0,2267	1,9096±0,6867
Manitol	1±0,1082	1,3391±0,4655	1±0,2378	1,4597±0,2304	1±0,4734	1,2418±0,3286
Manose	1±0,3187	2,2212±0,3375	1±0,1857	2,6382±0,2807	1±0,2168	1,5528±0,057
Adenina	1±0,0731	1,0737±0,0842	1±0,1446	1,0512±0,138	1±0,2293	0,9407±0,0593
Glicerol	1±0,0397	0,7837±0,0902	1±0,1594	1,1225±0,0556	1±0,1733	0,9147±0,1086
Glicerol-3P	1±0,1902	1,2472±0,2714	1±0,2984	1,7836±0,3552	1±0,2553	1,4727±0,2771
Putrescina	1±0,1247	1,0944±0,3387	1±0,4028	3,4824±1,727	1±0,2794	0,8946±0,1433
Eritritol	1±0,1614	1,01±0,1463	1±0,3039	1,0385±0,0975	1±0,188	1,124±0,083
Uracila	1±0,09	1,2114±0,0916	1±0,24	1,4366±0,113	1±0,1576	0,9613±0,0351

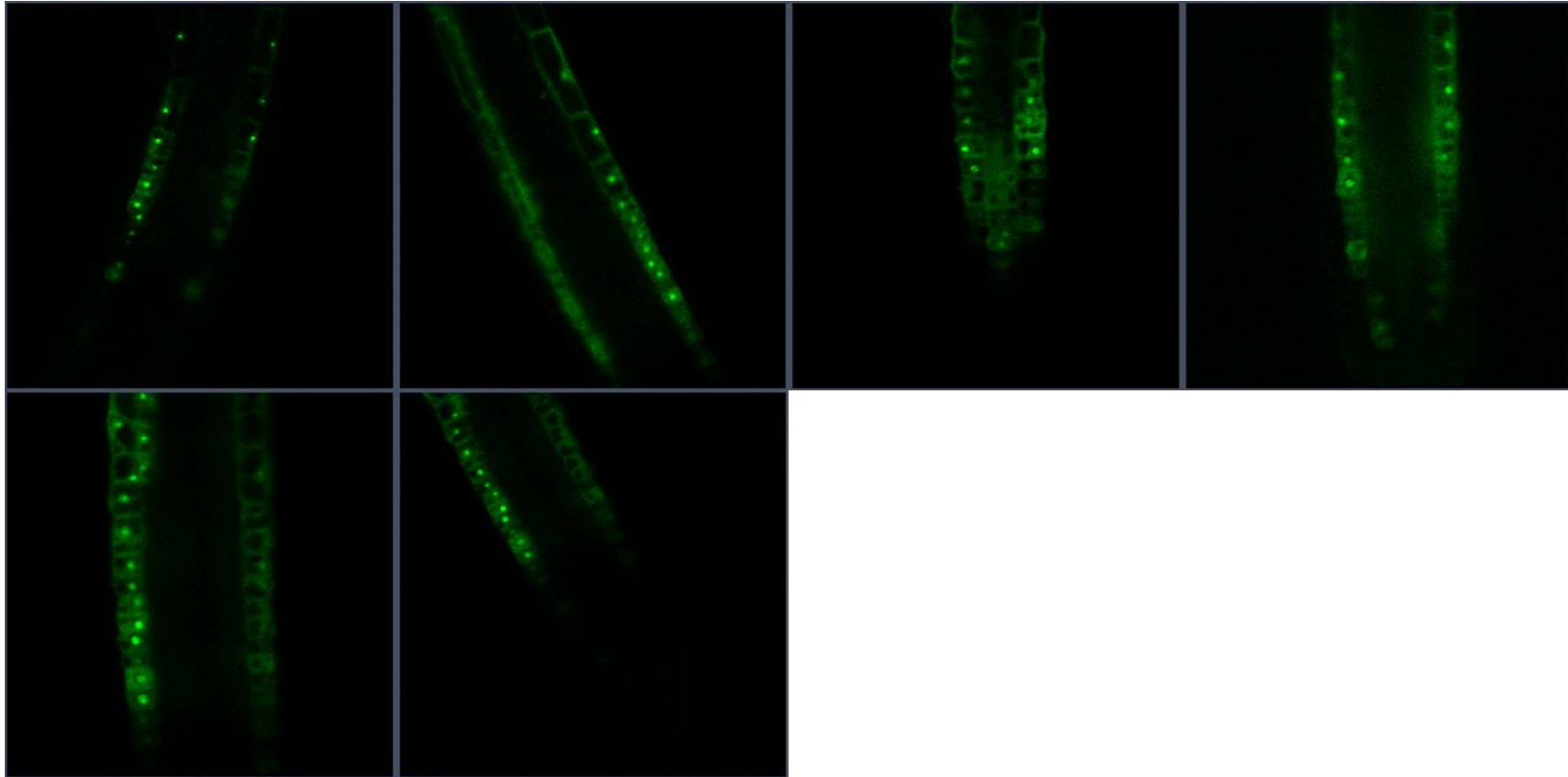
Tabela Suplementar 3: Conteúdo relativo de metabólitos (azul – AOs; vermelho – aminoácidos; verde – açúcares e cinza – outros). Os valores representam a média ± erro padrão (n = 4). Os valores em negrito

representam variação significativa, de acordo com o teste t de Student ($P < 0,05$), em relação aos respectivos controles (linhas *p35S*, *pSCR* e *pPEP* sem

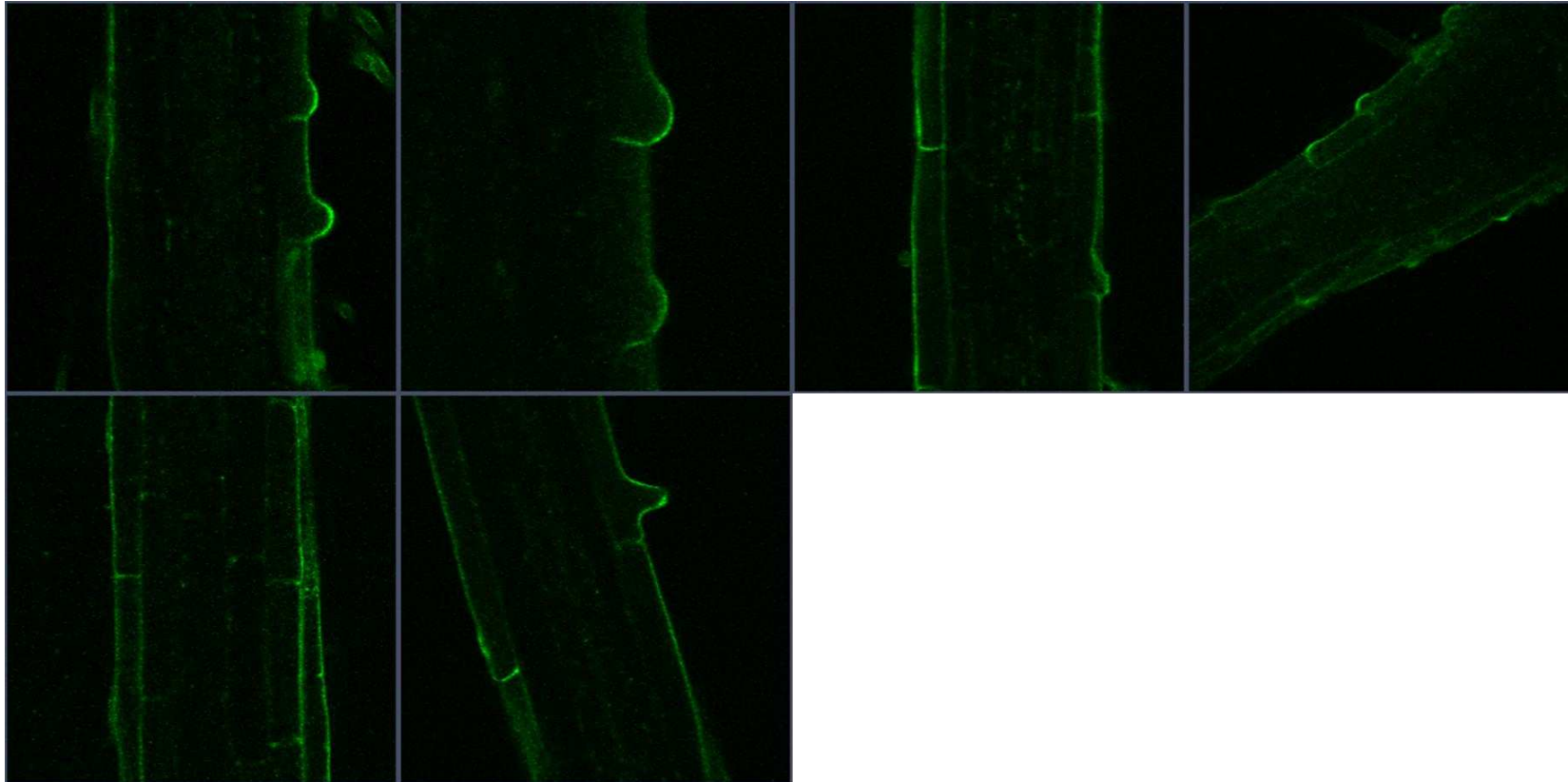
35S



PEP



SCR



Figuras Suplementares 1: Visualização de GFP nas linhas *p35S*, *pPEP* e *pSCR*.