

JULIANNA XAVIER DE BRITO SILVA

**O PAPEL DO CARREADOR MITOCONDRIAL CITRATO/ISOCITRATO (SFC1)
NAS RESPOSTAS A ESTRESSES ABIÓTICOS EM *Arabidopsis thaliana***

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

Orientador: Adriano Nunes Nesi

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2023**

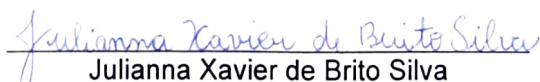
JULIANNA XAVIER DE BRITO SILVA

**O PAPEL DO CARREADOR MITOCONDRIAL CITRATO/ISOCITRATO (SFC1)
NAS RESPOSTAS A ESTRESSES ABIÓTICOS EM *Arabidopsis thaliana***

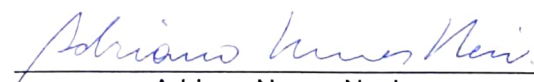
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 31 de julho de 2023.

Assentimento:



Julianna Xavier de Brito Silva
Autora



Adriano Nunes Nesi
Orientador

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

T

S586p
2023
Silva, Julianna Xavier de Brito, 1993-
O papel do carreador mitocondrial citrato/isocitrato (SFC1)
nas respostas a estresses abióticos em *Arabidopsis thaliana* /
Julianna Xavier de Brito Silva. – Viçosa, MG, 2023.
1 dissertação eletrônica (49 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndice.

Orientador: Adriano Nunes Nesi.

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

Referências bibliográficas: f. 41-47.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.500>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Arabidopsis thaliana*. 2. Ácidos orgânicos - Transporte.
3. Estresse (Fisiologia). 4. Metabolismo. 5. Respiração. I. Nesi,
Adriano Nunes, 1975-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-Graduação
em Fisiologia Vegetal. III. Título.

CDD 22. ed. 583.64

Dedico essa dissertação à minha mãe, que sempre entoou seu mantra:
“só o estudo liberta”.

AGRADECIMENTOS

Sem o apoio da minha família a caminhada teria sido mais árdua, obrigada pelo amparo amoroso e acolhedor durante essa trajetória. Em especial à minha mãe, Suely e à minha irmã, Luisa, amo vocês!

Gratidão às amigadas que tenho e àquelas que o mestrado me presenteou. Maria Carolina, Ana Luiza e Bárbara, mulheres que me ampararam em momentos difíceis, mas que também compartilharam de momentos de alegria.

Muito obrigada aos mestres professores, pelos ensinamentos científicos e da vida. Em especial, ao meu orientador Adriano, o qual atendeu prontamente aos meus pedidos de aconselhamento. Acredito que conseguimos construir um laço científico e de confiança, obrigada!

A Unidade de Crescimento de Plantas (UCP), espaço físico que possibilitou os ensaios experimentais e análises necessárias, e a todas(os) que fazem parte desse espaço, meus colegas de trabalho diário, muito obrigada por todo o apoio e dúvidas sanadas.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo fomento que viabilizou a realização do projeto de pesquisa.

“Se for de paz pode entrar.”

— Jorge Amado.

RESUMO

SILVA, Julianna Xavier de Brito, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2023. **O papel do carreador mitocondrial de citrato/isocitrato (SFC1) nas respostas a estresses abióticos em *Arabidopsis thaliana***. Orientador: Adriano Nunes Nesi.

O transportador mitocondrial SFC1 catalisa o transporte de citrato do citosol para a matriz mitocondrial através da membrana interna em troca de isocitrato. Este carreador é o único transportador conhecido capaz de realizar o transporte de citrato/isocitrato em plantas. Apesar da função bioquímica ser conhecida a importância do SFC1 para o crescimento e desenvolvimento de plantas sob condições de estresses abióticos ainda é desconhecida. Em solos ácidos, o alumínio (Al^{3+}) torna-se disponível para as plantas em concentrações tóxicas afetando negativamente o crescimento e desenvolvimento das raízes e da planta como um todo. Como o citrato e o isocitrato são importantes para os mecanismos de tolerância ao Al^{3+} e são produzidos principalmente pelo ciclo TCA na matriz mitocondrial, o transporte desses ácidos orgânicos via carreador SFC1 nos tecidos radiculares pode ser essencial nas respostas fisiológicas da planta ao Al^{3+} em níveis tóxicos. Também se espera que o transportador SFC1 tenha um papel relevante em situações de restrição do fornecimento de carbono, como durante a senescência induzida por escuro. Nesta situação o metabolismo do carbono e do nitrogênio passam a fornecer substratos alternativos para o processo respiratório que talvez envolva transporte de ácidos orgânicos via SFC1. Em condições ideais para *Arabidopsis*, a baixa expressão do SFC1 altera o metabolismo do nitrogênio sugerindo que o transporte adequado de citrato via SFC1 também pode desempenhar uma função importante durante períodos de baixa disponibilidade de carbono. Tendo em conta todas estas informações este trabalho teve como hipótese principal que o transporte de citrato/isocitrato via SFC1 é importante para as respostas fisiológicas de *Arabidopsis* cultivadas na presença de Al em níveis tóxicos, bem como durante o processo de senescência induzida pelo escuro prolongado. Portanto, neste trabalho realizou-se experimentos com raízes, por ser o órgão mais afetado pelo Al e por ter alta expressão de SFC1; e experimento de escuro prolongado para induzir deficiência de carbono e o processo de senescência, ativando processos de autofagia celular associados com degradação de proteínas e de aminoácidos. Para isso, linhagens de *Arabidopsis* com reduzida expressão de SFC1

foram utilizadas nos experimentos com Al^{3+} em níveis tóxicos. Parâmetros biométricos e respostas histoquímicas ao Al^{3+} e a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) foram avaliadas nos tecidos radiculares. No experimento de senescência induzida foram usados os mesmos genótipos e parâmetros biométricos, fisiológicos e bioquímicos foram determinados e utilizados para avaliar as repostas à esta condição. O nível de redução na expressão de SFC1 obtido nas linhas antisense não influenciou o crescimento radicular na presença de Al^{3+} , porém aumentou a produção de ROS nessa condição. Ao passo que sua deficiência na condição de escuro aumentou a degradação de proteínas e consumo de aminoácidos, bem como de amido; retardou a senescência e acelerou a recuperação das plantas após o estresse. Em conjunto os resultados sugerem que o transporte de citrato/isocitrato pelo transportador SFC1 não tem um papel fundamental no crescimento radicular sob estresse por Al^{3+} . Adicionalmente, os resultados referentes aos experimentos com deficiência de carbono, indicam que o transporte de citrato/isocitrato via SFC1 mantêm a atividade mitocondrial pela via clássica, usando em menores proporções de intermediários provenientes das vias alternativas.

Palavras-chave: Transportadores. Ácidos orgânicos. Estresses abióticos. Metabolismo mitocondrial. Respiração.

ABSTRACT

SILVA, Julianna Xavier de Brito, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2023. **The role of mitochondrial citrate/isocitrate carrier (SFC1) in abiotic stress responses in *Arabidopsis thaliana*.** Advisor: Adriano Nunes Nesi.

The mitochondrial transporter SFC1 catalyzes the transport of citrate from the cytosol into the mitochondrial matrix across the inner membrane in exchange for isocitrate. This carrier is the only known carrier capable of carrying out citrate/isocitrate transport in plants. Although the biochemical function is known, the importance of SFC1 for plant growth and development under abiotic stress conditions is still unknown. In acidic soils, aluminum (Al^{3+}) becomes available to plants in toxic concentrations, negatively affecting the growth and development of roots and the plant as a whole. As citrate and isocitrate are important for Al^{3+} tolerance mechanisms and are mainly produced by the TCA cycle in the mitochondrial matrix, the transport of these organic acids via the SFC1 carrier in root tissues may be essential in the plant's physiological responses to Al^{3+} at toxic levels. The SFC1 transporter is also expected to play a relevant role in situations of restricted carbon supply, such as during dark-induced senescence. In this situation, carbon and nitrogen metabolisms provide alternative substrates for the respiratory process, which perhaps involves the transport of organic acids via SFC1. Under ideal conditions for *Arabidopsis*, low SFC1 expression alters nitrogen metabolism suggesting that adequate citrate transport via SFC1 may also play an important role during periods of low carbon availability. Taking into account all this information, this work had as its main hypothesis that the transport of citrate/isocitrate via SFC1 is important for the physiological responses of *Arabidopsis* cultivated in the presence of Al^{3+} at toxic levels, as well as during the process of senescence induced by prolonged dark. Therefore, in this work, experiments were carried out with roots, as this is the organ most affected by Al and because it has a high expression of SFC1; and prolonged dark experiment to induce carbon deficiency and the senescence process, activating cellular autophagy processes associated with protein and amino acid degradation. For this, *Arabidopsis* strains with reduced SFC1 expression were used in experiments with Al^{3+} at toxic levels. Biometric parameters and histochemical responses to Al^{3+} and the formation of reactive oxygen species (ROS) were evaluated in root tissues. In the induced senescence experiment the same genotypes were used

and biometric, physiological and biochemical parameters were determined and used to evaluate the responses to this condition. The level of reduction in SFC1 expression obtained in antisense lines did not influence root growth in the presence of Al^{3+} , but increased ROS production in this condition. Whereas its deficiency in the dark condition increased protein breakdown and consumption of amino acids as well as starch; delayed senescence and accelerated plant recovery after stress. Taken together, the results suggest that citrate/isocitrate transport by the SFC1 transporter does not play a key role in root growth under Al^{3+} stress. Additionally, the results referring to the experiments with carbon deficiency indicate that the transport of citrate/isocitrate via SFC1 maintains the mitochondrial activity through the classical pathway, using smaller proportions of intermediates from the alternative pathways.

Keywords: Transporters. Organic acids. Abiotic stress. Mitochondrial metabolism. Respiration.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	11
2.MATERIAL E MÉTODOS	19
3.RESULTADOS	24
4.DISSCUSSÃO	34
5.CONCLUSÕES	40
REFERÊNCIAS	41
MATERIAL SUPLEMENTAR	48

1. INTRODUÇÃO

Plantas por serem organismos sésseis estão constantemente expostas às mudanças que podem ocorrer no ambiente. Portanto, desde o seu estágio inicial à maturidade, as plantas experenciam uma variedade de estresses abióticos (BULGARI et al., 2019; SACHDEV et al., 2021). Os efeitos desencadeados por estresses abióticos nas plantas envolvem alterações na atividade metabólica e fisiológica (BULGARI et al., 2019; HE et al., 2019). O comprometimento dessas atividades reflete na produtividade de cultivares agrícolas, com percas de produção que chegam até 50% (SAINI et al., 2018).

Sob estresse abiótico, as células vegetais geralmente encontram privação ou excesso de energia, acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) e desequilíbrio redox (FUJITA et al., 2006; LEE et al., 2009; POTTERS et al., 2010; STAEL et al., 2015). Entretanto, o metabolismo central ajusta-se rapidamente as demandas metabólicas em resposta a condições adversas (XU & FU, 2022). Assim, as organelas vegetais precisam alterar seu metabolismo para apoiar a aclimação das plantas a essas condições (STAEL et al., 2011; CHEN & BRANDIZZI, 2013; WANG et al., 2018).

A mitocôndria é considerada *the powerhouse* da célula, visto que sua principal função é a geração de energia em forma de adenosina trifosfato (ATP) por meio da fosforilação oxidativa (MILLAR et al., 2011; ZHANG & FERNIE, 2023). Além da produção de ATP, uma série de outros processos biológicos ocorrem na mitocôndria, incluindo a síntese de intermediários metabólicos para biossíntese de aminoácidos, ácidos graxos, cofatores vitamínicos, bem como a degradação de aminoácidos de cadeia ramificada, lipídios e fitol (MILLAR et al., 2011; ARAÚJO et al., 2012, ZHANG & FERNIE, 2023).

As funções auxiliares desempenhadas pelas mitocôndrias incluem a participação em vários outros processos celulares essenciais, incluindo a otimização fotossintética (NUNES-NESEI et al., 2008), interações carbono-nitrogênio (NAGUCHI & TERASHIMA, 2006), respostas bióticas ao estresse (AMIRSADEGHI et al., 2006), homeostase redox da célula vegetal e sinalização (SCHEIBE et al., 2005). Considerando todos os papéis diretos e auxiliares exercidos pelas mitocôndrias, pode-

se considerar que essa organela é de fundamental importância para o funcionamento celular (ARAÚJO, et al. 2012).

O ciclo dos ácidos tricarboxílicos (ciclo TCA) é composto por reações catalisadas por oito enzimas que oxidam o malato e o piruvato (produzidos no citosol) para produzir o NADH necessário para a geração de ATP pela cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (mETC) e intermediários metabólicos (MILLAR et al., 2011; ZHANG & FERNIE, 2023). Os níveis dos ácidos orgânicos intermediários do ciclo TCA na mitocôndria variam entre os estágios de desenvolvimento da planta, tipos de tecidos, espécies e em resposta a alterações em fatores ambientais (BATISTA-SILVA et al., 2018). Dessa maneira, indicando que as enzimas relacionadas à interconversão desses ácidos orgânicos do ciclo TCA são estritamente reguladas *in vivo* (ZHANG & FERNIE, 2023).

A abundante variedade de substratos alternativos torna a respiração das plantas notavelmente flexível, especialmente em resposta às mudanças ambientais (ARAÚJO et al, 2012). As alterações metabólicas são componentes importantes da estratégia de sobrevivência, já que prolongam consideravelmente o período de estresse que uma planta pode suportar (van DONGEN et al., 2011). Para atender a diferentes demandas metabólicas decorrentes de variações no ambiente modos não cíclicos do ciclo TCA em resposta a situações de estresse em plantas têm sido observados (SWEETLOVE et al., 2011). O acúmulo de metabólitos específicos parece ser a chave na adaptação em tais situações (ROCHA et al., 2010; LEMIRE et al., 2010). Em *Pseudomonas fluorescens*, por exemplo, nas células estressadas por Al, o aumento da atividade da succinil-CoA sintetase e oxalato CoA-transferase proporcionou uma rota eficaz para a síntese de ATP a partir de oxalil-CoA via fosforilação no nível do substrato (SINGH et al., 2009). Em plantas, estudos de fluxo do ciclo TCA revelam excesso de algumas enzimas do ciclo, como fumarase e malato desidrogenase em diferentes condições ambientais (GIBON et al., 2006; SIENKIEWICZ-PORZUCEK et al., 2010) e acúmulo de alanina e succinato sob anoxia (ROCHA et al., 2010).

Visto a possibilidade de atuação dos ácidos orgânicos em condições ideais e de estresse, o metabolismo dos ácidos orgânicos é importante em duas situações principais: (i) metabolismo dos ácidos orgânicos em estágios iniciais do desenvolvimento de tecidos heterotróficos sob influência de alumínio em níveis tóxicos (NUNES-NESI et al, 2014); (ii) e, na mobilização de reservas para a geração de

energia e redistribuição eficiente de nitrogênio no processo de senescência (WAGNER et al., 2014).

Função dos transportadores de ácidos orgânicos localizados na membrana mitocondrial interna

Para que ocorra a integração das vias metabólicas supracitadas, os transportadores de ácidos orgânicos orquestram a exportação e importação de ácidos orgânicos entre os compartimentos celulares (PALMIERI, et al. 2011). Em plantas, já foram identificados três transportadores de ácidos orgânicos: carreador ácido dicarboxílico (DICs) (PALMIERI et al., 2008), carreador ácido dicarboxílico/tricarboxílico (DTCs) (PICAULT et al., 2002) e carreador succinato/fumarato (SFC1) (CATONI et al., 2003).

Transportadores mitocondriais fazem a integração entre o metabolismo mitocondrial e celular (PALMIERI, et al. 2011) e, a expressão em diversos tecidos indica a importância na manutenção de funções celulares básicas (NUNES-NESI et al., 2020). Essas proteínas transportadoras são encontradas em diferentes organismos eucarióticos e a sua maioria pertencem à Família dos Carreadores Mitocondriais (MCF) (PICAULT et al., 2004; NUNES-NESI et al., 2020). Dentre os substratos transportados estão os ácidos orgânicos intermediários do ciclo TCA, indicando uma relevância destes transportadores na atividade dessa via e reações ocorrendo em outras organelas (NUNES-NESI et al., 2020).

Inicialmente um destes transportadores de ácidos orgânicos, um homólogo do transportador de succinato/fumarato mitocondrial de levedura (ACR1) (PALMIERI et al., 1997) foi identificado no genoma de *Arabidopsis* e nomeado como *AtmSFC1* (CATONI et al., 2003). Estudos iniciais de caracterização verificaram que *AtmSFC1* é expresso em folhas fonte e dreno, flores, botões florais, hastes e raízes, com uma moderada elevação dos níveis nesse último órgão (CATONI et al., 2003). Este resultado sugere um potencial elo do transportador entre o ciclo do glioxilato, o ciclo TCA e a gliconeogênese, permitindo a mobilização de lipídios de armazenamento durante a germinação (CATONI et al., 2003).

Recentemente, a função bioquímica do *SFC1* na membrana foi estudada em proteoliposomos (BRITO et al., 2020). Dentre os resultados obtidos, observou-se

elevada especificidade de substrato para citrato, aconitato e isocitrato do que fumarato e succinato (BRITO et al., 2020). Esses ácidos orgânicos são transportados preferencialmente por meio de um sistema antiporte e em menor extensão por transporte uniporte (BRITO et al., 2020). Assim, *SFC1* difere do carreador *ACR1* (PALMIERI et al., 1997) no que diz respeito à sua afinidade com o substrato e mecanismo de transporte (BRITO et al., 2020).

A redução na expressão do transportador *SFC1* impacta não apenas a germinação de sementes, mas também o estabelecimento de plântulas (BRITO et al., 2020). Esse resultado conflui para a proposta inicial do papel fisiológico feito por Catoni et al. (2003) na mobilização de lipídios de armazenamento durante a germinação. Portanto, *SFC1* pode desempenhar um papel importante como transportador de ácido orgânico durante a mobilização de lipídios em sementes (BRITO et al., 2020). Dadas as características de transporte e a concentração citosólica dos intermediários do ciclo TCA, é provável que o papel principal do *SFC1* em tecidos heterotróficos seja catalisar a importação do citrato citosólico e exportação de isocitrato intramitocondrial e, em menor grau, a troca succinato/fumarato (BRITO et al., 2020).

Uma troca de citrato/fumarato mediada por *SFC1* pode ocorrer através da membrana mitocondrial interna quando o citrato está presente em alta concentração no citosol (BRITO et al. 2020). Como os glioxissomos vegetais não possuem atividade de aconitase (COURTOIS-VERNIQUE et al., 1993; de BELLIS et al., 1993), a conversão de citrato em isocitrato ocorre no citosol, exigindo o transporte de isocitrato para o peroxissomo para ser convertido em succinato pela isocitrato liase, como parte do ciclo do glioxilato durante a mobilização de lipídios de armazenamento em sementes (BRITO et al., 2020). Com base nas atividades da aconitase, foi proposto que o metabolismo do citrato citosólico pode ser igual ou superior ao observado nas mitocôndrias (COURTOIS-VERNIQUE et al., 1993; de BELLIS et al., 1993). Nesse contexto metabólico, o citrato citosólico ou isocitrato pode ser importado para a mitocôndria ou metabolizado pelo ciclo do glioxilato (PRACHAROENWATTANA et al., 2005; THEODOULOU et al., 2012). Adicionalmente, verificou-se que a redução na expressão de *SFC1* leva ao menor crescimento radicular em plântulas, o que pode estar associado a uma alteração no desenvolvimento e estabelecimento da plântula (BRITO et al., 2020). Essa observação corrobora com a expressão constitutiva de

SFC1 nesse órgão e sua importância na manutenção de funções celulares básicas (CATONI et al. 2003; NUNES-NESI et al., 2020; BRITO et al. 2020).

Em plantas deficientes na expressão de SFC1 verificou-se nas raízes um decréscimo dos principais substratos e intermediários da respiração concomitantemente a um aumento de compostos de armazenamento de carbono, como amido e fumarato (BRITO et al., 2020). Estes resultados sugerem que a baixa expressão do SFC1 restringe a taxa de respiração na raiz e reduz seu crescimento. Esses resultados sugerem, deste modo, que uma importação eficiente de citrato citosólico, proveniente do ciclo do glioxilato ou sintetizado no próprio citosol, via SFC1 em tecidos radiculares é importante para a respiração, conversão de energia e crescimento (BRITO et al, 2020). Dessa forma acredita-se que a função primária desse transportador em tecidos radiculares é catalisar a troca entre o citrato citosólico e o isocitrato ou os ácidos orgânicos dicarboxílicos, como fumarato ou succinato (BRITO et al., 2020).

Parte da caracterização bioquímica feita por Brito et al. (2020) também envolveu a observação do metabolismo primário em folhas expandidas iluminadas. Altos níveis de proteínas e aminoácidos foram observadas nas linhas antisense SFC1, indicando mudanças no metabolismo do nitrogênio, as quais foram acompanhadas por mínima alteração nos níveis de citrato e aumento nos níveis de amido (BRITO et al., 2020). Dessa forma, foi sugerido que o transporte adequado de citrato via atividade do SFC1 pode desempenhar alguma função no metabolismo do nitrogênio (BRITO et al., 2020).

O papel dos transportador de ácidos orgânicos em respostas a estresses abióticos

Em concordância com o que foi posto acima, o carreador SFC1 é o único transportador conhecido em plantas capaz de transportar citrato/isocitrato pela membrana mitocondrial interna. Assim, visto o papel bioquímico desse transportador no metabolismo dos ácidos orgânicos e a interação com outras vias metabólicas, espera-se que SFC1 também tenha um papel relevante em respostas a estresses abióticos.

O alumínio (Al) é considerado o segundo maior fator de estresse abiótico, responsável por quedas na produção de cultivos em solos brasileiros. Estima-se que

50% das áreas potenciais para agricultura possuem solos ácidos e com Al^{3+} em níveis tóxicos (HAJIBOLAND et al., 2022). Na presença de Al^{3+} , a respiração mitocondrial é reprimida devido aos danos causados pelo estresse oxidativo, o qual eleva os níveis de atividade das enzimas responsáveis pela peroxidação de lipídios e produção de ROS (RAHMAN & UPADHYAYA, 2021).

Ácidos orgânicos predominam nos exsudatos radiculares no mecanismo de exclusão do Al^{3+} e são intermediários do ciclo TCA (PANCHAL et al., 2021). Citrato, malato e oxalato são os principais ácidos orgânicos envolvidos nos mecanismos de tolerância ao Al^{3+} na interface raiz-solo (PANCHAL et al., 2021). Nesses mecanismos, a carga negativa do grupo carboxílico permite aos ácidos orgânicos reagir com cátions como o Al^{3+} e magnésio, formando complexos insolúveis com fósforo (P) na solução do solo (ZHANG et al., 2018) e assim não são absorvidos pelas raízes.

A liberação de ácidos orgânicos pelos tecidos radiculares pode ser devido à ativação do sistema de transporte pré-existente ou de genes relacionados ao metabolismo e transporte de ácidos orgânicos por estresse (MA et al., 2000). O transporte mediado pelos canais de ânions é conduzido pela voltagem da membrana e pelo gradiente químico dos ácidos orgânicos, através da membrana plasmática (PANCHAL et al., 2021). Duas famílias de transportadores de ácidos orgânicos foram identificadas: família de transportadores de malato ativados por Al^{3+} (ALMT) (SASAKI et al., 2004) e extrusão de compostos tóxicos e multidroga (MATE) (HVORUP et al., 2003; MAGALHAES et al., 2007).

Estudos de coexpressão gênica sugerem que o transportador SFC1 participe em respostas ao estresse causado por Al (NUNES-NESE et al., 2014). Considerando essa análise de coexpressão e que citrato e isocitrato, metabólitos importantes em mecanismos de tolerância de Al^{3+} , são principalmente produzidos pelas reações do ciclo TCA na matriz mitocondrial, espera-se que o transporte desses compostos via SFC1 em tecidos radiculares seja importante nas respostas das plantas expostas à níveis tóxicos de Al^{3+} .

Uma outra condição de estresse em que o transportador SFC1 pode ter um papel fisiológico relevante é durante a restrição do fornecimento de carbono induzida por período prolongado de escuro. Nesta situação reservas alternativas de carbono e nitrogênio passam a fornecer intermediários para o processo respiratório (HORTENSTEINER et al., 2011). Em situação ideal, a baixa expressão do SFC1

apresentou mudanças no metabolismo do nitrogênio (BRITO et al., 2020), sugerindo que o transporte adequado de citrato via atividade do SFC1 também pode desempenhar uma função importante na restrição do fornecimento de carbono.

Tanto a restrição no fornecimento de carbono pela fotossíntese quanto a entrada a senescência podem levar à ativação de vias que irão fornecer substratos alternativos para manter a atividade da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (ARAÚJO et al., 2011). Verifica-se o aumento na degradação de proteínas e no metabolismo de aminoácidos, os quais serão utilizados como substratos alternativos (HORTENSTEINER et al., 2011). A regulação da degradação de proteínas envolve três principais vias: ubiquitinação, autofagia e via de sinalização TOR (ARAÚJO et al., 2011)

A ubiquitinação ocorre direcionando proteínas ao proteossoma para degradação (SMALLE & VIERSTRA, 2004; VIERSTRA, R.D., 2009). O processo de autofagia envolve a degradação dos compartimentos subcelulares através da maquinaria lisossômica (BASSHAM, D.C., 2007). A via de sinalização TOR envolve a interação de sinais derivados de nutrientes e fatores de crescimento para controlar a maquinaria de crescimento celular e a síntese de proteínas (DEPROST et al., 2007; LEIBER et al., 2010). Uma vez degradadas as proteínas, o metabolismo dos aminoácidos produzidos pode ocorrer por duas vias: conversão em ácido pirúvico ou acetil-CoA antes de ser utilizado pelas reações do ciclo TCA; ou serem convertidos em um dos intermediários dessa via metabólica, como o 2-oxoglutarato para então serem utilizados pelo mesmo ciclo (ARAÚJO et al., 2011).

Os três processos indicados acima são proeminentes durante condições de estresse e provavelmente também desempenham papéis importantes durante a homeostase celular (ARAÚJO et al., 2011). A compreensão da regulação das respostas das vias clássicas e alternativa de respiração ligada à degradação de proteínas durante a deficiência de substrato é limitada (ARAÚJO et al. 2011). Portanto, estudos de restrição de carbono vinculados ao fornecimento de intermediários do ciclo TCA e ativação dessas vias alternativas em plantas são importantes tanto em condições ótimas quando adversas.

Hipótese do trabalho e objetivos

Embora vários transportadores mitocondriais já tenham sido identificados, muitos ainda não foram totalmente caracterizados em plantas, principalmente em condições de estresses biótico e abiótico. Da mesma forma, a importância do metabolismo mitocondrial sob estresse ainda não é bem compreendida em plantas. Logo, obter informações sobre o papel do SFC1 em repostas a situações de estresse envolvendo o metabolismo de ácidos orgânicos, é importante para a compreensão dos mecanismos de resposta a estresses, visto que são compostos essenciais tanto a nível celular como para a planta inteira.

Tendo em conta todas essas informações, incluso a preferência do SFC1 para citrato e isocitrato e juntamente com sua expressão constituinte em tecidos autotróficos e heterotróficos em *Arabidopsis*, este trabalho teve como hipótese principal que o transporte de citrato/isocitrato via SFC1 é importante para as respostas fisiológicas de *Arabidopsis* cultivadas em níveis tóxicos de Al, bem como durante o processo de senescência induzida pelo escuro. Portanto, para avaliar a importância do transportador SFC1 em condição de estresse, realizou-se experimentos com raízes, por ser o órgão mais afetado pelo Al³⁺ e por ter alta expressão de SFC1; e experimento de escuro prolongado para simular a deficiência de carbono e induzir o processo de senescência, ativando os processos de degradação de reservas alternativas a serem utilizadas como substratos respiratórios.

Para esse propósito, linhas de *A. thaliana* com redução na expressão de SFC1 foram usadas para realizar experimentos contendo Al³⁺ em níveis tóxicos. Para avaliar as respostas das linhas antisense SFC1 nesta condição foram avaliados crescimento radicular, arquitetura de raiz e formação de espécies reativas de oxigênio. No experimento de escuro prolongado foram usadas as mesmas linhagens antisense SFC1 e análises fisiológicas e bioquímicas foram realizadas para avaliar a importância do transportador na condição de deficiência de carbono.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Vegetal

Plantas de *A. thaliana* foram usadas como material vegetal dos experimentos propostos. O ecótipo Columbia (Col-0) foi usado como tipo selvagem juntamente com linhas transgênicas com baixa expressão do transportador SFC1 (BRITO et al., 2020). Três linhagens antisense *sfc1-12*, *sfc1-10*, *sfc1-08* com 40, 55 e 75% dos níveis de expressão observados no tipo selvagem, respectivamente, foram obtidas por transformação usando a reação Gateway LR com o vetor de destino pH2WG7. A sequência codificante do SFC1 foi clonada na orientação antisense sob o controle do promotor 35S (ver detalhes em BRITO et al., 2020). A construção possui um fragmento de 930pb do gene SFC1 (At5g01340), um promotor 35S, um gene marcador de resistência à higromicina (Hyg^R) e um terminador *nos* (Figura 1).

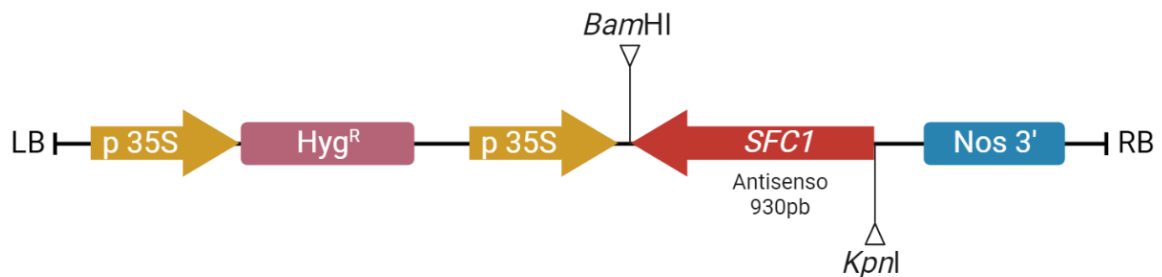


Figura 1. Representação esquemática da construção antisense utilizada para obter as linhas com baixa expressão de SFC1 em *Arabidopsis thaliana*.

2.2. Genotipagem e Expressão Gênica

2.2.1. Genotipagem

Como visto na Figura 1, as linhas transgênicas tem o gene marcador de higromicina, o qual é utilizado para selecionar as plântulas transgênicas após o processo de transformação. A fim de confirmar a alteração genética nas linhas usadas nos ensaios foi conduzida uma genotipagem das mesmas amplificando o gene marcador de higromicina e visualização do mesmo em gel de eletroforese.

Primeiramente, as plantas transgênicas foram selecionadas em placas de ágar contendo o agente seletivo (higromicina) e cultivadas em vasos com capacidade de 0.1L contendo substrato comercial, Carolina Soil Padrão EC 0,7-8kg. Em seguida,

amostras de folhas das linhagens resistentes foram colhidas, o DNA foi isolado e verificado por análise de PCR usando primers específicos para o agente seletivo. O kit Dream Taq foi usado para o PCR e os *primers forward* (CTCTCGGAGGGCGAAGAATC) e *reverse* (ATTTGTGTACGCCCGACAGT) para o gene marcador de higromicina. Por fim, o gel de agarose recebeu as amostras amplificadas de DNA e ao fim do tempo de corrida o gel foi revelado.

2.3. Ensaio de estresse

2.3.1. Avaliação do crescimento radicular na presença de Alumínio

Sementes de *A. thaliana* selvagem (Col-0) e das linhas mutantes (sfc1-12, sfc1-10 e sfc1-8) passaram por um processo de desinfestação usando etanol 70 % e hipoclorito de sódio 2,5 % (v/v). Em seguida, as sementes foram distribuídas em placas de Petri contendo meio de cultivo Murashige e Skoog (MS) (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com metade da força iônica, suplementado com 1 % de sacarose. As sementes colocadas nas placas de Petri passaram pelo processo de vernalização a temperatura de 4 °C por 72 horas no escuro. Posteriormente, as placas foram transferidas para câmara de crescimento com fotoperíodo neutro, temperatura de 20±2 °C, umidade relativa de 70±5 % e irradiância de 150 µmol photons.m⁻². s⁻¹, durante três dias.

Posteriormente as plântulas foram transferidas para placas de Petri quadradas contendo meio de cultivo nutritivo MS com metade da força iônica e 8 % ágar. Foram preparadas soluções de cultivo com dois valores de pH: pH 5.7 (condição ideal de crescimento), pH 4.0 (condição ácida), caracterizando dois tratamentos. A terceira solução também teve pH 4.0, porém, houve adição do sal Cloreto de Alumínio, obtendo-se uma solução com pH 4.0 e concentração de 300 µM de Cloreto de Alumínio. Essa concentração é considerada tóxica para *Arabidopsis* (SUN et al., 2010), dessa forma, simulamos uma condição de estresse sob Al. Após a adição de todos os componentes na solução, foi feito o ajuste de pH das soluções com HCl, para acidificação do meio, e NaOH para alcalinização.

Após dez dias na câmara de crescimento com fotoperíodo neutro, temperatura de 20±2 °C, umidade relativa de 70±5 % e irradiância de 150 µmol photons.m⁻². s⁻¹, as

placas foram escaneadas e as plantas coletadas para posterior análise do crescimento radicular (Image J) e arquitetura de raiz (WhinRhizo). Análises histoquímicas foram feitas para detecção de ROS e de Al no ápice radicular.

2.3.1.1. Análises histoquímicas

Testes histoquímicos foram usados para avaliar a formação de ROS nos tecidos heterotróficos das amostras provenientes do ensaio com Al. Os sais 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) (1mg mL^{-1}) e Nitrobluetetrazólio (NBT) ($0,1\text{ mg mL}^{-1}$) foram usados no teste para detecção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e superóxido (O_2^-), respectivamente, como descrito em Kong *et al.* (2011) com modificação do tempo de exposição ao reagente DAB que foi aumentado para 24 horas. Em seguida, a solução de coloração (DAB e NBT) foi removida e uma solução de descoloração (etanol: ácido acético: glicerol 3:1:1) foi adicionada até que todas as amostras estivessem completamente cobertas, permitindo o armazenamento das mesmas até que fossem observadas e fotografadas em um estereomicroscópio (Zeiss modelo Stemi 2000-C).

O ensaio histoquímico com corante hematoxilina é uma análise qualitativa usada para detecção de Al em tecidos radiculares e a intensidade dessa coloração é relacionado aos níveis de íons de Al acumulado no tecido (BAKER, 1962; POLLE, 1978). Para isso, as plântulas foram imersas em hematoxilina férrica 0,2 % (m/v) com iodeto de sódio (NaIO_3) por 15 min. (SOUZA *et al.*, 2016). Em seguida, as plântulas foram lavadas em água deionizada com aeração constante por 15 min para retirar o excesso de corante, e então as amostras foram fotografadas em estereomicroscópio (Zeiss modelo Stemi 2000-C).

2.3.2. Caracterização fenotípica e metabólica sob senescência induzida

A desinfestação de sementes e o processo de vernalização foi realizado como descrito acima. Posteriormente, as placas permaneceram por 10 dias em fotoperíodo neutro. Ao final desse período, as plântulas foram transplantadas para vasos com capacidade de 0.1L contendo substrato comercial, Carolina Soil Padrão EC 0,7-8kg, e mantidas por 4 semanas na câmara de crescimento sob fotoperíodo de dias curtos, 08h/16h (luz/escuro), temperatura de $20\pm 2\text{ }^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70\pm 5\%$ e

irradiância de $150 \mu\text{mol photons.m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Durante esse período as plantas foram irrigadas com intervalos de dois dias e fertilizadas semanalmente com 1 mL de solução nutritiva contendo sais de MS em meia força.

Ao final da quarta semana as plantas foram realocadas dentro da sala de crescimento para uma prateleira sem luminosidade. Durante 13 dias as plantas permaneceram nessa condição e em seguida foi restabelecido o fotoperíodo de dias curtos para processo de recuperação por outros 13 dias.

Durante o período de escuro, foram realizadas coletas para análises metabólicas. As amostras foram coletadas no dia 0, 3, 7 e 13 de escuro. Rosetas foram coletadas e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C . Posteriormente, as mesmas amostras foram liofilizadas, maceradas e aliqüotadas em cerca de 5 mg de matéria seca. A extração metanólica foi realizada conforme descrito por GIBON *et al.* (2004).

Após a extração metanólica, uma fração solúvel e uma insolúvel foram formadas. A fração solúvel e o pellet resultante da extração foram armazenados a -20°C . Utilizou-se um leitor de microplacas (OptiMax Tunable Microplate Reader) para quantificação dos metabólitos do metabolismo primário: amido, proteínas e aminoácidos. A fração solúvel, antes da lavagem com clorofórmio e água MilliQ, foi utilizada para quantificar os teores de clorofilas *a* e *b*. Após lavagem da fração solúvel então, foi quantificado aminoácidos livres totais (GIBON *et al.*, 2004). Os níveis de amido e proteína foram determinados na fração insolúvel de acordo com Bradford *et al.* (1976) e Fernie *et al.* (2001), respectivamente.

Durante o período de escuro foram coletadas amostras de rosetas e raízes nos mesmos dias de coleta acima citado. As rosetas foram cortadas na base da conexão com a raiz e pesadas imediatamente. Em seguida as raízes foram lavadas com água destilada e pesadas. Tanto roseta quanto raiz foram armazenadas em sacos de papel e colocadas na estufa de secagem a 65°C por dois dias. Então, as rosetas e raízes foram pesadas mais uma vez para realizar o cálculo da biomassa desses órgãos.

Tanto no período de escuro quanto no de recuperação foi avaliado o rendimento quântico máximo do fotossistema II utilizando o equipamento MINI-PAM II ou fluorômetro portátil. Para F_v/F_m , uma radiação de $0,5 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ foi aplicada para determinar F_0 . Para obter a fluorescência máxima (F_m) um pulso saturante de $8500 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ foi aplicado. A razão F_v/F_m foi então calculada como $(F_m -$

F_0/F_m). A eficiência fotossintética do PSII (Φ_{PSII}) foi estimada como $\Phi_{PSII} = (F_m' - F_s)/F_m'$ (GENTY et al., 1989).

2.4. Delineamento Experimental

Todos os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com seis repetições para cada genótipo. Os resultados obtidos foram expressos como a média de cada genótipo, as mesmas foram testadas para diferenças significativas usando o teste-*t*, em nível de 5% de significância ($P < 0,05\%$). Os dados foram analisados usando o software R Studio (R CORE TEAM, 2022).

3. RESULTADOS

3.1 Crescimento radicular em linhas com baixa expressão do transportador SFC1 sob condição de estresse por Al

Afim de acessar o efeito da redução da expressão do transportador SFC1 em tecidos heterotróficos de *Arabidopsis* em resposta a acidez da solução externa à raiz e da presença do Al, avaliou-se o crescimento radicular e arquitetura de raiz (Figura 2). Verificou-se que em pH 5.7 (Figura 2D) existe uma pequena tendência de redução no crescimento do sistema radicular nas plantas antisense SFC1 em comparação ao genótipo selvagem (WT). Em pH 4.0 observou-se uma diferença no crescimento radicular nos dias 3, 5 e 7 apresentando raízes mais longas nas linhas antisense (Figura 2E). Curiosamente, esse crescimento das raízes de plântulas com baixa expressão de SFC1 não é mais aparente quando pH 4.0 é combinado com a presença de Al (Figura 2F).

3.2 Modificação na arquitetura de raiz em diferentes condições de crescimento das linhas antisense SFC1

Durante o desenvolvimento do experimento de crescimento radicular observou-se expressiva diferença fenotípica na arquitetura de raiz tanto para WT quanto para as plantas com baixa expressão do transportador SFC1 na presença de Al na solução com pH 4.0 (Figura 2A-C). A partir dessa observação, avaliou-se parâmetros relacionados com a arquitetura de raiz. Essa análise revelou uma tendência de aumento no que diz respeito ao número de ápices e bifurcações nas linhas antisense SFC1 no meio com pH 4.0 (Figura 3B e 3E) em comparação com o tratamento contendo Al (Figura 3C e 3F).

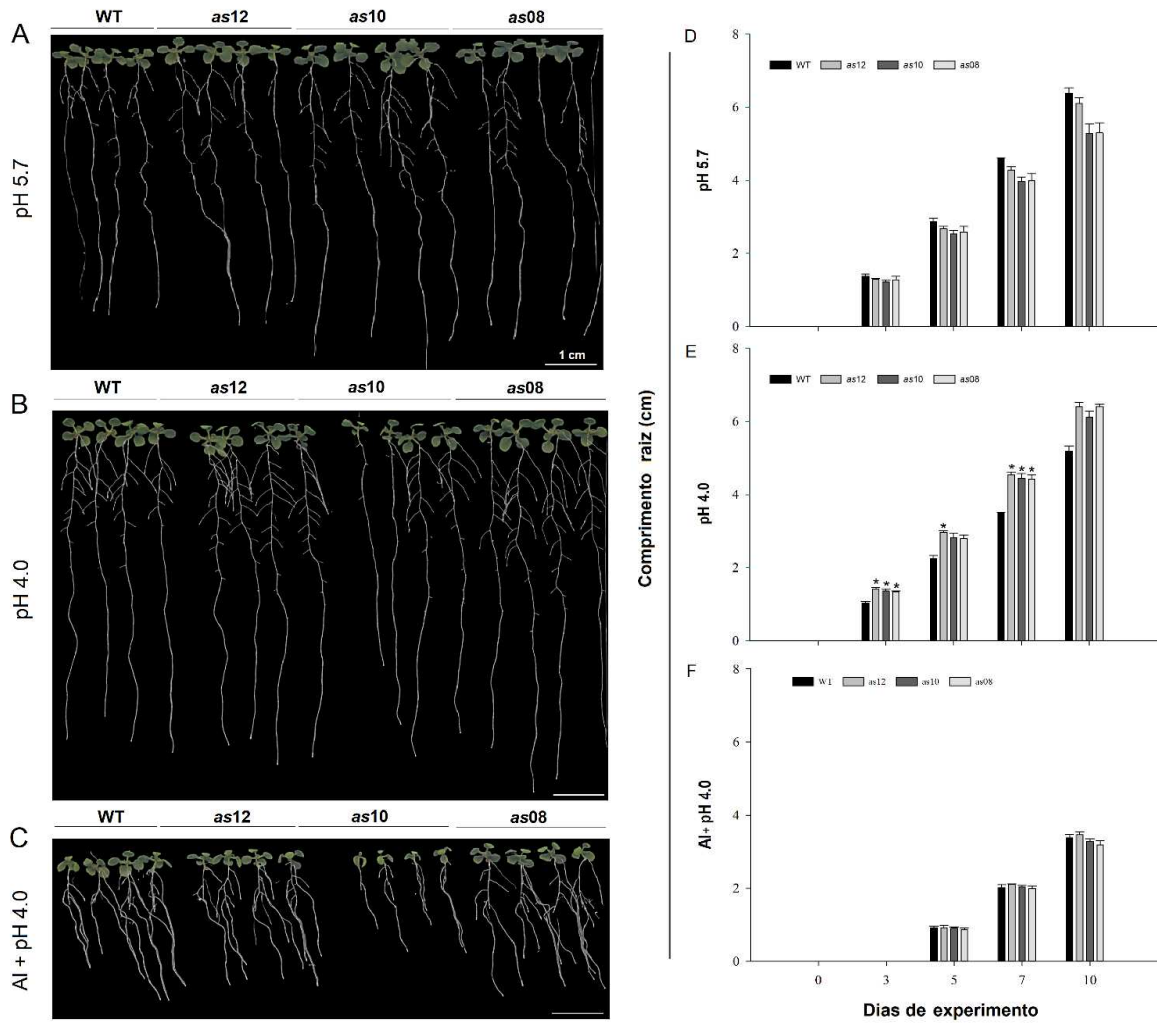


Figura 2. Caracterização do crescimento radicular do transportador mitocondrial SFC1 sob condição de estresse por Al. (A, B, C) Imagens das plântulas de *A. thaliana* depois de 10 dias em diferentes condições de crescimento. (D, E, F) Comprimento de raiz do genótipo selvagem (WT) e linhas antisense SFC1 nos dias 0, 3, 5, 7 e 10 em (D) condição ideal, (E) meio ácido e (F) meio ácido com adição de Al. As sementes dos genótipos foram germinadas em meio MS e ágar 8%, permaneceram 2 dias no escuro e então foram transferidas para regime de dia neutro durante 3 dias. No terceiro dia foram transferidas para placas de Petri verticais onde cresceram por 10 dias. Os valores representam as médias \pm erro padrão de quatro medidas de seis repetições biológicas. Os asteriscos indicam diferenças significativas pelo teste t ($p < 0.05$) em comparação com o WT.

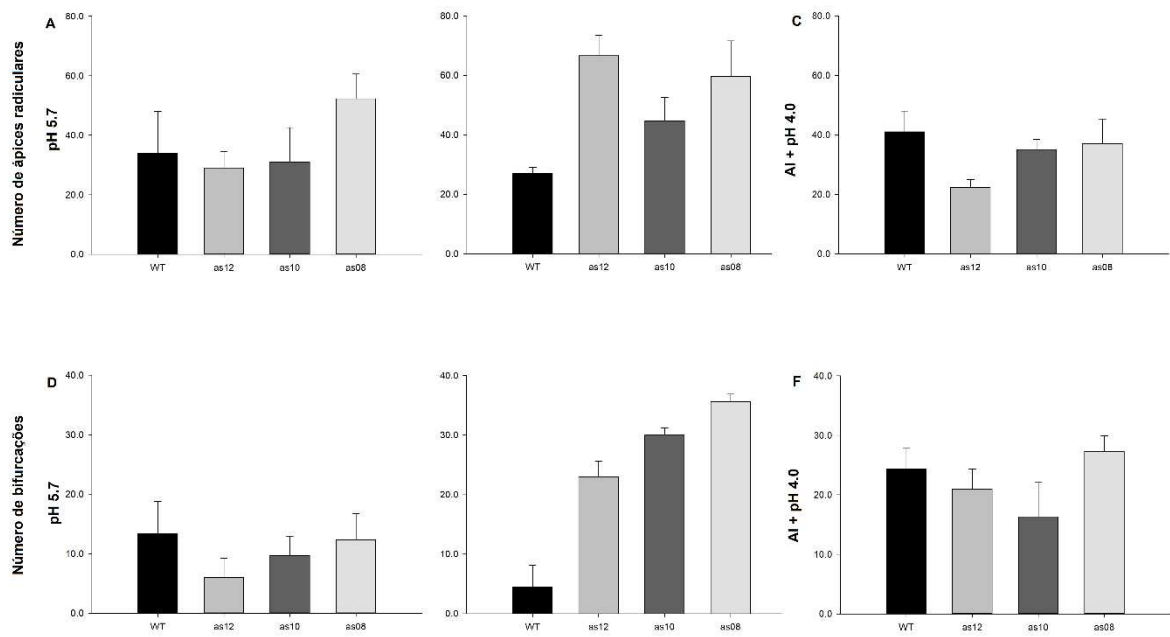


Figura 3. Arquitetura de raiz das plântulas antisense SFC1 de *A. thaliana*. (A, B, C) Número de ápices radiculares e (D, E, F) número de bifurcações em plântulas do genótipo selvagem (WT) e linhas antisense SFC1 ao final do décimo dia de crescimento. As plântulas foram coletadas da placa de Petri vertical e armazenadas individualmente em tubo contendo álcool 30 %. Posteriormente foram feitas as medições usando o software WhinRhizo. Os valores representam as médias \pm erro padrão de três repetições biológicas. Os asteriscos indicam diferenças significativas pelo teste t ($p < 0.05$) em comparação com o genótipo selvagem (WT).

3.3 Detecção de ROS e AI em raízes de plântulas com baixa expressão de SFC1

Tanto as raízes de plantas WT quanto as linhas antisense SFC1 apresentaram coloração intensa no meio ácido com AI (Figura 4A).

Observa-se ápices radiculares com coloração mais intensa nas plantas antisense SFC1 no meio ácido com AI, diferente do que é observado no meio ácido e ideal no ensaio histoquímico usando NBT e DAB (Figura 4B e 4C). Entretanto, no meio ácido nota-se uma coloração mais intensa na linha antisense *sfc1-08* com o corante NBT e DAB (Figura 4B e 4C). Além disso, no ensaio histoquímico com DAB, a linha antisense *sfc1-08* e *sfc1-10* apresentam coloração mais intensa no meio de crescimento com condição ideal (pH5.7) (Figura 4C). Assim sendo, a produção de ROS é maior em plantas das linhas com baixa expressão de SFC1 em meio ácido com AI comparado ao WT. Em plantas da linha *assfc1-08* o aparecimento de ROS também é recorrente no meio ácido e ideal de crescimento.

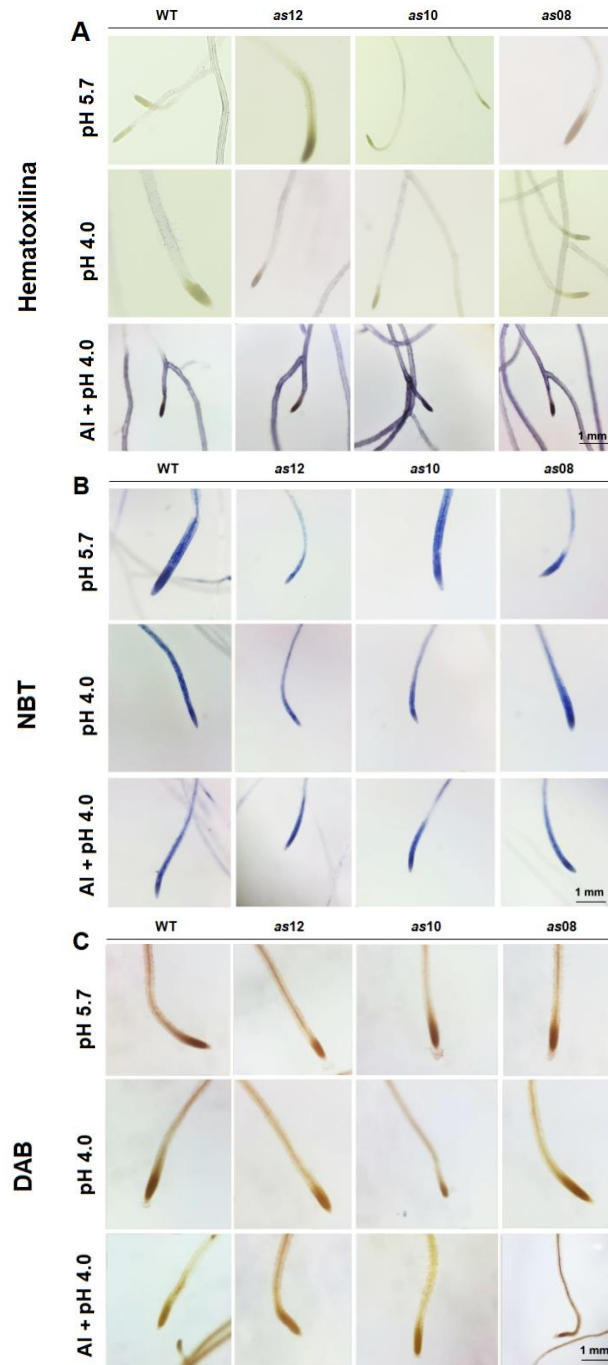


Figura 4. Ensaio histoquímicos para detecção de alumínio (Al) e espécies reativas de oxigênio (ROS) em plantas com baixa expressão de SFC1. (A, B, C) Imagens das plântulas de *A. thaliana* expostas aos corantes (A) hematoxilina, (B) nitroblue tetrazólio (NBT) e (C) 3,3'-diaminobenzidina (DAB). (A) Ensaio histoquímico feito com hematoxilina nas raízes de plântulas para detecção de Al e localização de deposição nos tecidos radiculares. (B e C) Ensaio histoquímicos para detecção de ROS nas raízes de plântulas. (B) Detecção no ânion superóxido e (C) peróxido de hidrogênio. As plântulas foram expostas aos corantes ao final do décimo dia do experimento de crescimento radicular.

3.4 Caracterização fenotípica de plantas com baixa expressão do transportador SFC1 durante senescência induzida por escuro

Para a caracterização fenotípica e posterior análises bioquímicas, após quatro semanas de cultivo em dia curto 08h/16h (luz/escuro), as linhas antisense foram transferidas para condições de escuro ao lado de plantas WT (Figura 5). A linha antisense *sfc1-08* apresentou os primeiros sintomas de senescência, como folhas amareladas e murchas, após sete dias de escuro (Figura 5A), ao passo que *sfc1-12*, *sfc1-10* e WT apresentaram os mesmos sintomas a partir do décimo dia de escuro e de forma pronunciada no décimo terceiro dia (Figura 5A). Após 13 dias de escuro contínuo, as plantas da linha *assfc1-08* estavam mortas (Figura 5A) enquanto que as plantas das linhas *assfc1-12*, *assfc1-10* e WT tinham apenas poucas folhas amareladas (Figura 5A).

Como a maioria das plantas *assfc1-08* estavam mortas, houve uma substituição por plantas da mesma linha do grupo de registro fotográfico 1 (Figura S1) afim de acompanhar o fenótipo de recuperação desta linhagem. Então, as linhas antisense e WT foram realocadas para luz e os fenótipos durante a recuperação foram registrados (Figura 5B). A partir do terceiro dia de recuperação, nota-se um reestabelecimento da turgidez foliar em todos os genótipos (Figura 5B) e no sétimo dia a emissão de novas folhas, tanto para WT quanto para as linhas antisense *sfc1-12* e *sfc1-10*. Enquanto que para *assfc1-08* a partir do décimo dia fica evidente o aparecimento de novas folhas (Figura 5B).

Para avaliar essa senescência aparentemente tardia na maioria das linhas antisense, avaliou-se o conteúdo de clorofila e a eficiência fotoquímica (Fv/Fm), dois parâmetros relacionados à função dos cloroplastos como diagnóstico de senescência foliar (OH et al., 1996). Durante escuridão prolongada, o teor de clorofila apresenta uma tendência de decaimento nas linhas antisense em relação ao WT a partir do décimo dia no escuro (Figura 5E). Quanto a eficiência fotoquímica do fotossistema II, observou-se uma tendência consistente na manutenção dos valores de Fv/Fm na linha *assfc1-12* acima dos valores de WT durante o período de escuro. No décimo terceiro dia de escuro a linha *assfc1-10* também tem valores maiores de eficiência fotoquímica em relação ao WT (Figura 5C) apesar de não significativo. Os dados de eficiência fotoquímica sugerem que as plantas antisense *sfc1-12* e *sfc1-10* com expressão reduzida de SFC1 retardam a senescência (Figura 5C), embora não significativo, e se

recuperam mais rápido do que WT no terceiro dia de luz (Figura 5D). Na linha *assfc1-08* observa-se um comportamento diferenciado do que foi observado nas outras duas linhas antisense, apresentando eficiência fotoquímica (Figura 5C) menor do que WT no décimo e décimo terceiro dia de escuro e são mais lentas no processo de recuperação (Figura 5D).

Do mesmo modo foi avaliado a taxa de sobrevivência no período de escuro e a taxa de recuperação após o período no escuro. A taxa de sobrevivência no período de escuro tem os mesmos valores tanto para o WT quanto para as linhas antisense *sfc1-12* e *sfc1-10* de 75 % (Figura 5F). Na taxa de recuperação observa-se valores iguais para WT e *assfc1-12* de 50 % (Figura 5G), à medida que *assfc1-10* tem uma taxa de recuperação de 66 % (Figura 5G). Ao passo que para a linha antisense *sfc1-08* a taxa de sobrevivência é de apenas 41 % após os treze dias de escuro (Figura 5F) e de 33 % de recuperação após tal condição (Figura 5G).

Também se avaliou o papel do transportador SFC1 em resposta ao escuro prolongado em rosetas e raízes. Independentemente de não apresentar diferença estatística no peso seco da roseta (Figura S2A), nota-se um aumento da biomassa em todos os genótipos a partir do terceiro dia de escuro. Entre as linhas antisense SFC1, a linha *assfc1-12* apresenta biomassa superior ao WT, a qual se mantém sempre acima dos valores de WT e as linhas *assfc1-10* e *assfc1-08*. Também se nota um aumento da biomassa de raiz na linha *assfc1-12* no terceiro dia, similar a WT, ao passo que para as demais linhas antisense acontece uma redução, sendo significativa para a linha *assfc1-08* (Figura S2B). A partir do sétimo dia ocorre uma tendência de redução nessa biomassa de raiz em todos os genótipos (Figura S2B).

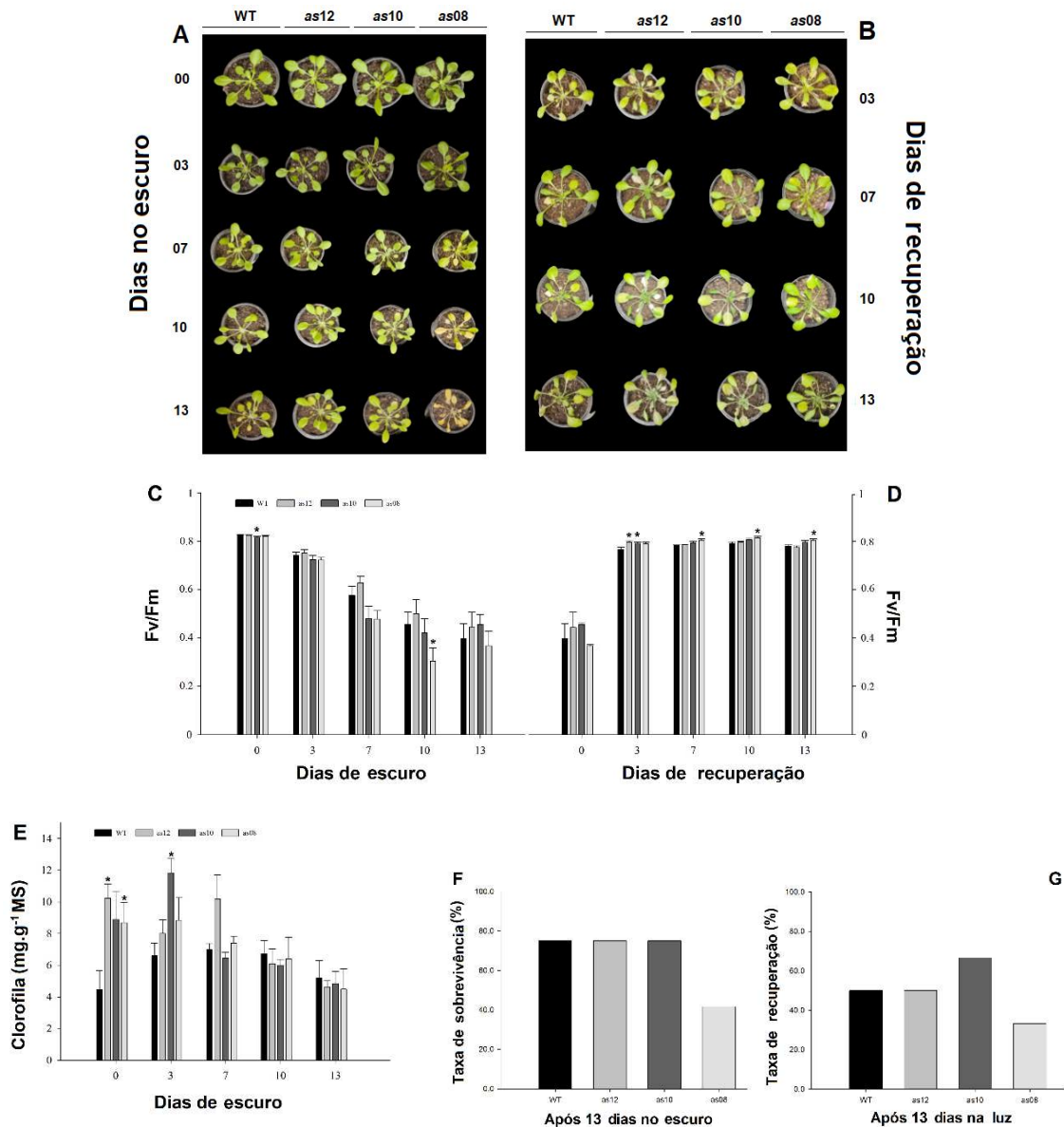


Figura 5. Caracterização fenotípica dos genótipos de *A. thaliana* com baixa expressão do transportador SFC1 sob escuro prolongado. (A) Imagens de plantas de *A. thaliana* cultivadas em dias curtos com 4 semanas de idade imediatamente (dia 0) e após 3, 7, 10 e 13 dias em condição de escuridão e ao lado (B) as plantas em processo de recuperação na luz. (C e D) Fv/Fm, rendimento quântico máximo do transporte de elétrons no fotossistema II, sob (C) tratamento prolongado de escuro e (D) período de recuperação na luz. (E) Teor de clorofila de folhas expandidas na condição de escuridão. (F) Taxa de sobrevivência das plantas de *Arabidopsis* ao fim do período de escuro e (G) a taxa de recuperação após o tratamento de escuro. Os valores representam as médias \pm erro padrão de (C e D) doze e (E) seis repetições biológicas. Os asteriscos indicam diferenças significativas pelo teste t ($p < 0.05$) em comparação com o genótipo selvagem (WT). Abreviação: MS, matéria seca.

3.5 Variações nos teores de amido, proteína e aminoácidos em folhas durante o período de escuro prolongado

Para uma caracterização mais detalhada da função do SFC1, análises bioquímicas foram feitas em folhas expandidas de plantas coletadas em diferentes períodos de escuro. Foram determinados os níveis de amido, aminoácidos livres totais e proteína total. Os níveis de amido no primeiro dia estavam elevados e mais constante do que nas linhas antisense (Figura 6C). No terceiro dia, houve um decréscimo marcante nos níveis de amido tanto para as linhas antisense quanto para o WT (Figura 6C). Porém, os níveis de amido voltaram a aumentar nas linhas antisense no sétimo dia de escuro, seguido do aumento dos níveis no WT no décimo dia (Figura 6C). Essas variações no teor de amido são marcantes apesar de não serem significativas.

Os níveis de proteínas totais apresentaram uma tendência de redução ao longo do período de escuro em folhas de plantas WT e de linhas antisense (Figura 6A). Coerentes com a redução dos níveis de proteínas totais, os níveis de aminoácidos livres totais aumentaram (Figura 6B). No terceiro dia de escuro houve um menor acúmulo de aminoácidos livres totais nas linhas antisense (Figura 6B).

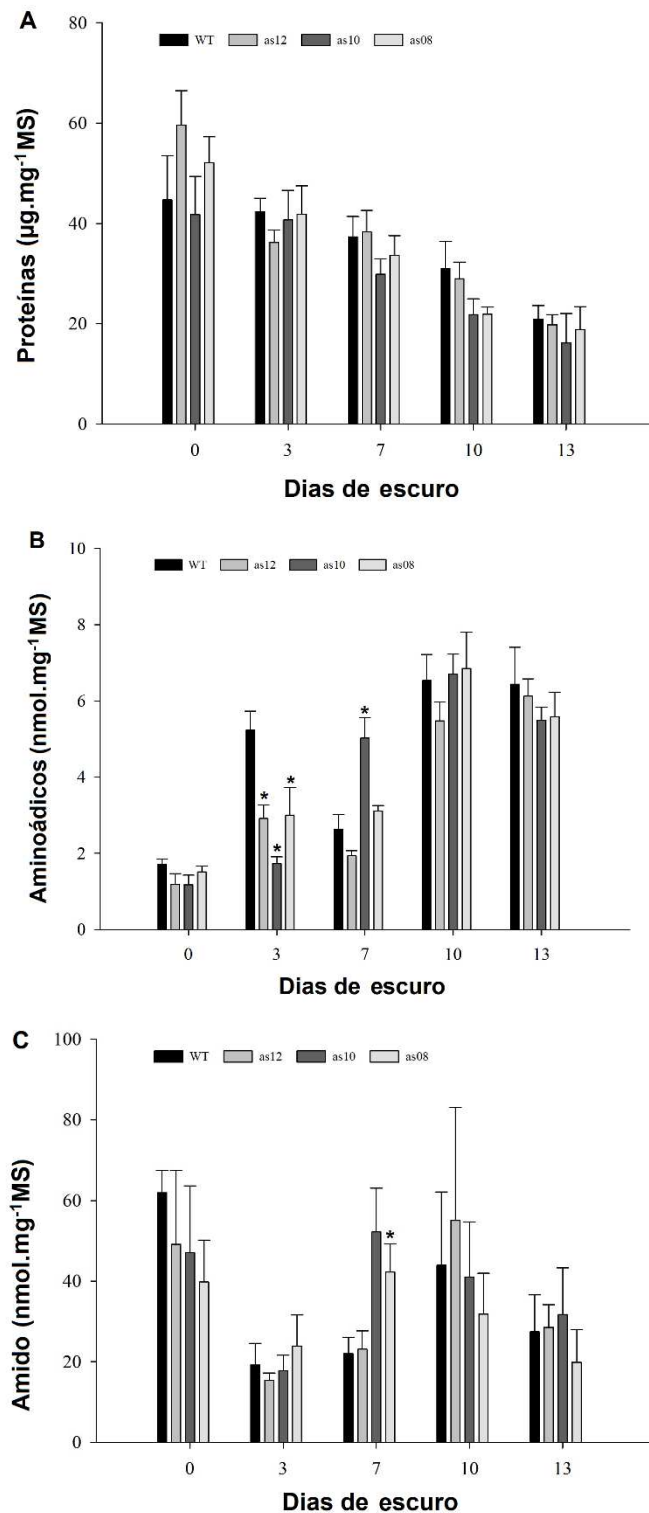


Figura 6. Níveis relativos de proteínas totais, aminoácidos livres totais e amido em folhas de plantas das linhas antisense SFC1 cultivadas sob período de escuro prolongado. (A) Níveis de proteínas totais, (B) níveis de aminoácidos totais e (C) níveis de amido de folhas expandidas de *Arabidopsis* na condição de escuridão. Os valores representam as médias \pm erro padrão de seis repetições biológicas. Os asteriscos indicam diferenças significativas pelo teste t ($p < 0.05$) em comparação com o genótipo selvagem (WT). Abreviação: MS, matéria seca.

4. DISCUSSÃO

Neste trabalho, investigou-se a importância do transportador mitocondrial SFC1, previamente caracterizado por transportar citrato e isocitrato na membrana mitocondrial interna (Brito et al., 2020), em plantas de *Arabidopsis* sob condição de estresses abióticos. Foi observado que a redução da expressão de SFC1 não desencadeou mudanças significativas no crescimento radicular de *Arabidopsis* na presença de Al (Figura 2F) mas sim em meio com pH ácido (Figura 2E). Entretanto, sob deficiência de carbono promovida por escuro prolongado, a deficiência na expressão de SFC1 promoveu alterações transitórias na eficiência da etapa fotoquímica (Figura 5C), níveis de clorofila (Figura 5E) e nos níveis de aminoácidos e amido (Figura 6B e 6D). Os resultados obtidos são discutidos tanto no contexto da função do transporte de ácidos orgânicos mitocondrial no processo de exclusão do Al quanto em relação aos modelos atuais de mudanças metabólicas que ocorrem durante a senescência induzida pelo escuro.

4.1. O papel do transporte de citrato/isocitrato via SFC1 em respostas ao pH ácido e Al em níveis tóxicos

A expressão do SFC1 é pronunciada nos tecidos radiculares (CATONI et al., 2003; BRITO et al., 2020). Neste e em prévio estudo, verificou-se que redução na expressão do SFC1 promove uma moderada redução do crescimento radicular em condições ótimas para o crescimento de *Arabidopsis* (Figura 2D). Acredita-se que a baixa expressão do SFC1 restringe a taxa de respiração de células de tecidos radiculares, reduzindo a produção de energia nas raízes limitando o crescimento deste órgão (BRITO et al., 2020). Portanto, uma importação eficiente de citrato à matriz mitocondrial parece ser importante para o crescimento radicular. Em pH 4,0 as linhas antisense para SFC1 apresentaram raízes mais longas (Figura 2E), com moderado aumento no número de ápices e bifurcações nas linhas antisense SFC1 (Figura 3B e 3E). Curiosamente, plântulas com baixa expressão do SFC1 em pH 4.0 com Al na solução não apresentaram diferenças em relação ao tipo selvagem. Ao contrário do esperado, a presença do Al não teve seu efeito negativo intensificado em plantas com baixa atividade de SFC1 (Figura 2E). Este resultado sugere que a atividade residual

de SFC1 nas plantas transgênicas é suficiente para manter o transporte de citrato/isocitrato necessário para as respostas ao Al^{3+} (Figura 7A). Alternativamente, a deficiência na atividade de SFC1 pode ter sido compensada pela atividade de outros transportadores de ácidos orgânicos na membrana mitocondrial interna. Além do SFC1, o transportador mitocondrial dicarboxílico/tricarboxílico (DTC), considerado o mais abundante na membrana mitocondrial interna, é capaz de transportar inúmeros intermediários do ciclo TCA e fazer transportes de homotroca como citrato/citrato (PICAULT et al., 2002). A homotroca de citrato/citrato é dependente de pH, a qual aumenta ao diminuir o pH em *AtDTC* e *NtDTC1* (PICAULT et al., 2002). Embora, não existam relatos sobre a importância desses transportadores em resposta ao Al^{3+} , teoricamente os mesmos poderiam estar assumindo o papel do SFC1 (Figura 7B). SFC1 poderia estar importando citrato citosólico proveniente do ciclo do glioxilato (BRITO et al., 2020) e dessa forma mantendo a respiração mitocondrial e permitindo o crescimento da raiz tanto no pH 4.0 quanto no pH 4.0 associados à presença de Al.

Como indicado acima, devido as linhas antisense não serem nulas para a expressão de SFC1, a atividade residual desse transportador pode ser suficiente para atender as demandas energéticas necessárias as respostas ao Al. Ao que diz respeito aos danos que podem ser causados no crescimento da raiz na presença de Al^{3+} , é possível que o citrato produzido no ciclo do glioxilato (BRITO et al., 2020) supra a demanda de exportação de citrato via extrusão de compostos tóxicos e multidrogas (*AtMATE*) (HVORUP et al., 2003; MAGALHAES et al., 2007) para rizosfera impedindo a entrada de Al^{3+} no apoplasto ou de se fixar na parede celular (ZHANG et al., 2018). Alternativamente, mesmo que o Al^{3+} seja absorvido pela célula, o mesmo pode estar sendo quelado pelo citrato proveniente do ciclo do glioxilato e subsequentemente sequestrado para o vacúolo (KOCHIAN et al., 2005).

Nos ensaios histoquímicos, os ápices radiculares das linhas com baixa expressão do SFC1 apresentam coloração mais intensa indicando maior produção de ROS do que em WT (Figura 4B e 4C). Na presença de Al^{3+} , a respiração mitocondrial é reprimida devido aos danos oxidativos intensificados pela produção de ROS (LI & XING, 2011). O estresse oxidativo eleva os níveis de atividade das enzimas responsáveis pela peroxidação de lipídios e produção de ROS (RAHMAN & UPADHYAYA, 2021). Sendo assim, esses resultados suportam os possíveis danos causados à cadeia transportadora de elétrons mitocondrial na presença de Al^{3+} .

A importância do metabolismo dos ácidos orgânicos em plantas parece estar mais focada na relação da absorção de nutrientes como nitrogênio (SARASKETA et al., 2016) e fósforo (LYNCH, J. P., 2019) em solos ácidos, e especialmente nos processos de tolerância aos íons fitotóxicos de Al^{3+} (MARSCHNER, H., 1991; LÓPEZ-BUCIO et al., 2000; CHAO et al. 2015). Os estudos em sua maioria para análises de crescimento radicular também estão vinculados a esses fatores (LÓPEZ-BUCIO et al., 2000; LYNCH, J. P., 2019), enquanto há uma variedade de fatores edáficos do solo ácido (MARSCHNER, H., 1991) e estratégias de adaptação aos solos ácidos a serem considerados (LYNCH, J. P., 2019). A exploração do solo tornou-se uma função primária das plantas terrestres, uma função que incorre em custos metabólicos substanciais (LAMBERS et al., 2002). Por exemplo, um componente negligenciado da adaptação ao solo ácido é a captura eficiente de K, Ca e Mg (LYNCH, J. P., 2019), uma possível adaptação utilizada pelas plantas antisenso do SFC1 para o crescimento radicular em pH 4.0 (FIGURA 2B e 2E), considerando que a solução não tinha restrições de nutrientes, apenas seu pH foi ajustado para ácido. Melhoramento de culturas para adaptação a solos ácidos, além dos esforços já em andamento para tolerância de Al^{3+} , é um aspecto negligenciado, mas importante objetivo para a agricultura global (LYNCH, J. P., 2019). No momento em que direcionamos as buscas em estudos anteriores na tentativa de elucidar o ajuste metabólico no metabolismo dos ácidos orgânicos na raiz em pH baixo, o foco apresenta-se em enzimas do ciclo TCA como citrato sintase (CS) (ANOOP et al., 2003), glutamina sintase (GS) e NADH-glutamato desidrogenase (GDH) (SARASKETA et al., 2016) mediando tolerância ao Al^{3+} . Não são muito claros os mecanismos de atuação do metabolismo mitocondrial em condições de solo ácido, portanto é difícil concluir qual seria a função do SFC1 nessa condição e o que transcende da sua ausência para um maior crescimento radicular das linhas antisenso em comparação ao WT em pH ácido.

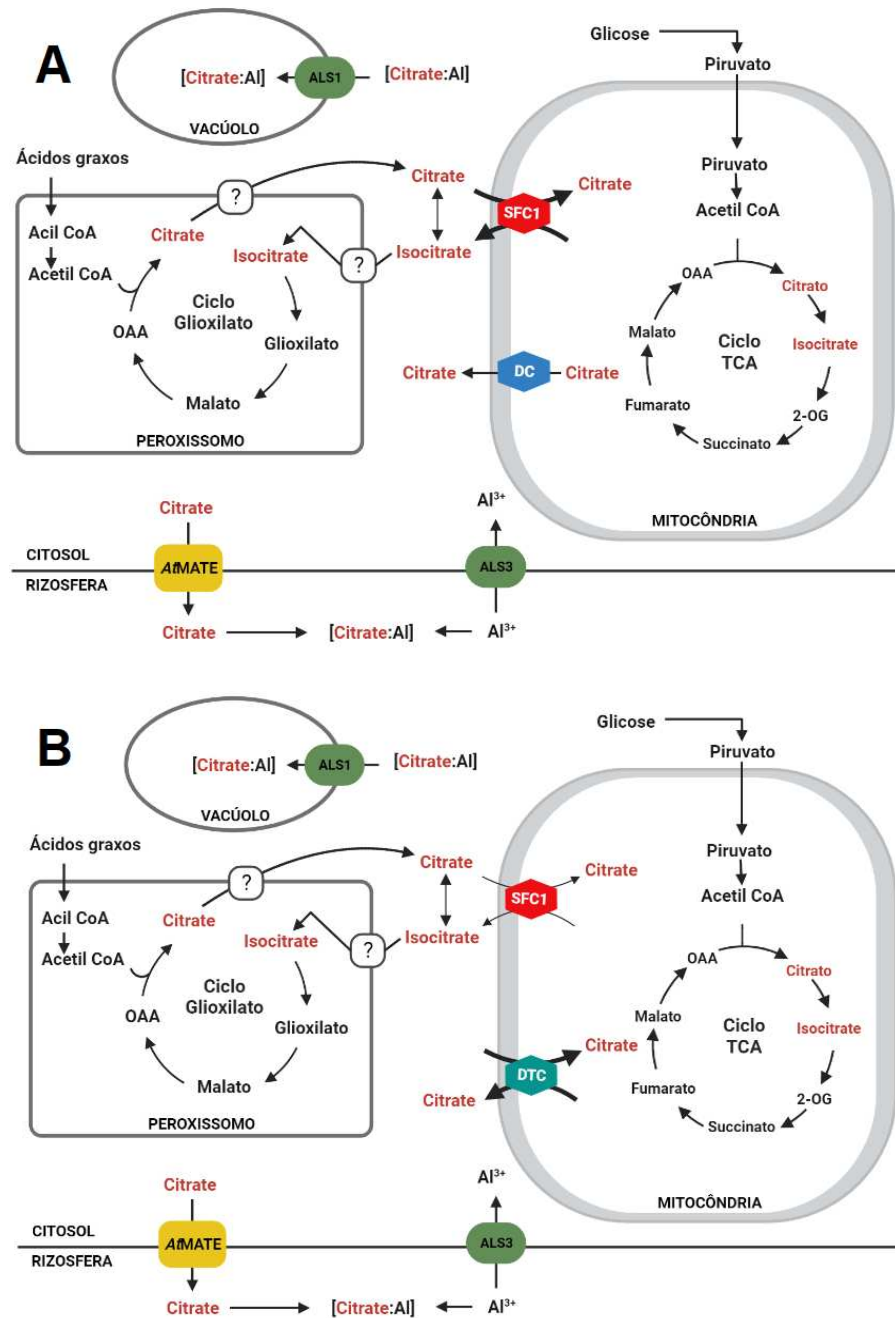


Figura 7. Modelo do metabolismo respiratório sob estresse por alumínio (Al) na presença e redução da expressão do SFC1. (A) Papel do SFC1 sob condição de Al^{3+} . (B) Resposta metabólica a condição de estresse de Al^{3+} com baixa expressão do SFC1. Abreviações: SFC1, transportador citrato/isocitrato; DC, transportador dicarboxílico; DTC, transportador dicarboxílico/tricarboxílicos; MATE, extrusão de compostos tóxicos e multidrogas; ALS1, alumínio-sensitivo 1; ALS3, alumínio-sensitivo 3; TCA, ciclo dos ácidos tricarbóxicos; 2-OG, 2-oxoglutarato; OAA, oxalacetato; Pontos de interrogação (?) denotam rotas metabólicas desconhecidas.

4.2. O papel do transporte de citrato/isocitrato via SFC1 durante a senescência induzida por escuro prolongado

Durante o processo de senescência induzida pelo escuro, há um aumento na atividade catabólica (SCHIPPERS et al., 2015). As reservas de carbono na forma de açúcares solúveis são rapidamente utilizadas e posteriormente clorofilas e macromoléculas, como amido e proteínas, e aminoácidos são degradados (ARAÚJO et al., 2011). Os produtos desse catabolismo fornecem elétrons para a cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria para manter a atividade do Complexo-ATP sintase e a síntese de ATP (ARAÚJO et al., 2011; SCHIPPERS et al., 2015; BARROS et al., 2021). Nesse processo, as mitocôndrias desempenham um papel fundamental no fornecimento de energia e coadunam os processos catabólicos durante o desenvolvimento (CHROBOK et al., 2016) e senescência induzida pelo escuro (LAW et al., 2018). Recentemente, verificou-se a relação entre a atividade do peroxissomo e expressão de SFC1 no processo de mobilização de reservas lipídicas durante a germinação e estabelecimento de plântulas de *Arabidopsis* (BRITO et al., 2020). Além disso, também se observou alterações no metabolismo do nitrogênio foliar em condições ótimas nas linhas com baixa expressão do SFC1 (BRITO et al., 2020). Entretanto, em plantas de *Arabidopsis* com baixa expressão do SFC1, o escuro prolongado não promoveu drásticas alterações no consumo das principais reservas de carbono e proteínas das folhas quando comparadas com plantas do tipo selvagem (Figura 6A e 6C). No geral, níveis de clorofila (Figura 5E) e a eficiência máxima do fotossistema II (Figura 5C) apresentaram apenas uma tendência de redução no decorrer do período de escuro. Em conjunto, os resultados obtidos não deixam claro se SFC1 está associado ou não a um maior consumo de substratos respiratórios alternativos durante a senescência induzida pelo escuro (Figura 8).

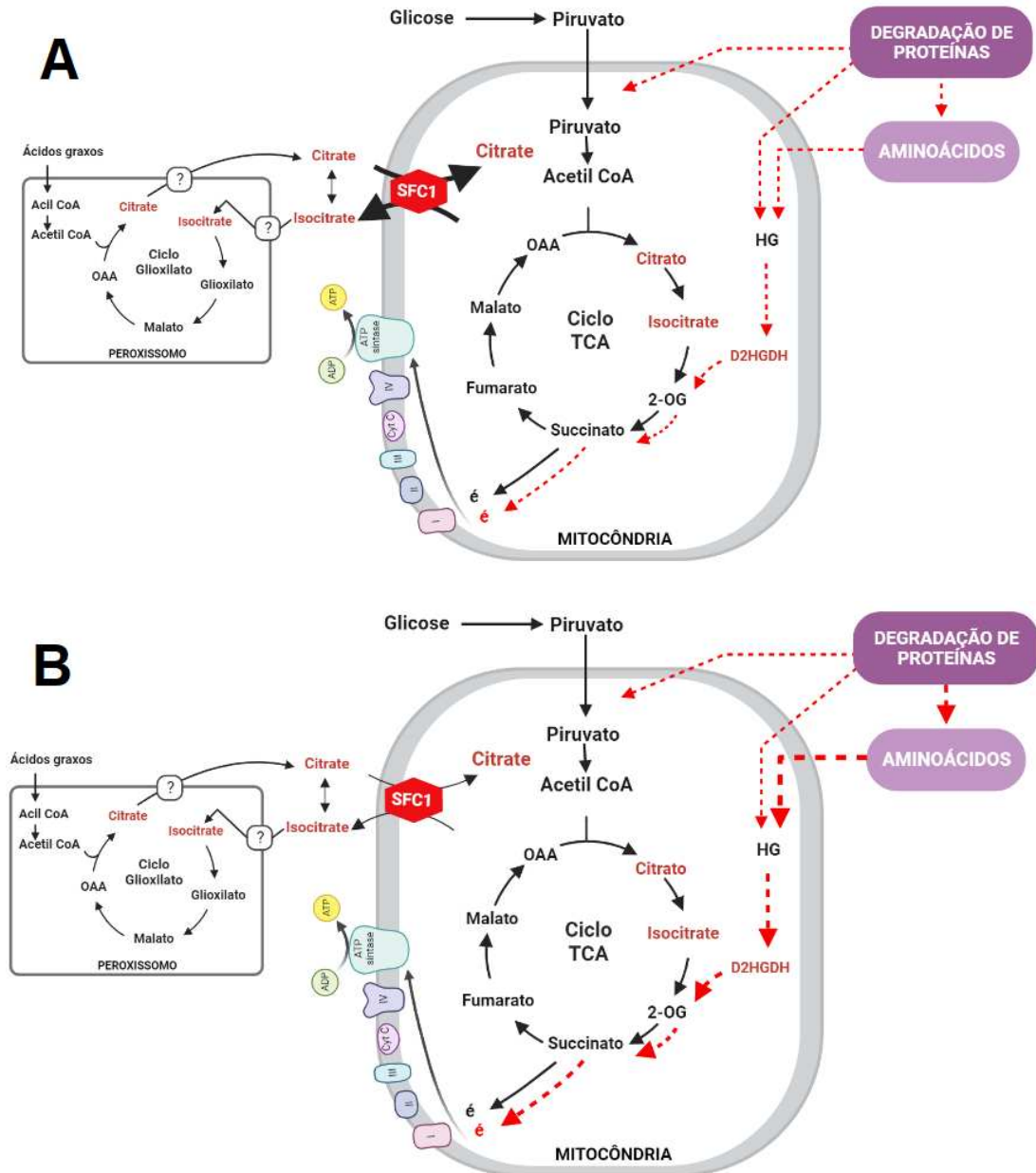


Figura 8. Modelo do metabolismo respiratório sob escuro prolongado na presença e redução da expressão do SFC1. (A) Papel do SFC1 na condição de escuro prolongado. (B) Resposta metabólica a condição de escuro prolongado com baixa expressão do SFC1. Abreviações: SFC1, transportador citrato/isocitrato; TCA, ciclo dos ácidos tricarbóxicos; 2-OG, 2-oxoglutarato; OAA, oxalacetato; HG, hidroxiglutarato; D2HGDH, D-2-hidroxiglutarato desidrogenase; é, elétrons; I, II, III e IV, complexo da cadeia mitocondrial de elétrons; Pontos de interrogação (?) denotam rotas metabólicas desconhecidas.

5. CONCLUSÕES

Em resumo ao que foi observado nos dois experimentos de estresses abióticos, o papel exato do SFC1 nessas condições continua desconhecido. Estudos futuros com linhas mutantes onde a expressão e atividade de SFC1 sejam nulas ou SFC1 seja superexpresso, associados com análises do perfil metabólico ao longo do período de senescência são fundamentais para o entendimento da função do SFC1. Tendo visto a possibilidade do funcionamento do DTC na importação de citrato, futuros experimentos com mutantes para DTC e outros transportadores mitocondriais sob as mesmas condições de estresses são necessários para esclarecer a função do SFC1. Também seria interessante que futuros estudos verificassem a função do SFC1 em outras espécies, essencialmente sob estresse de Al^{3+} , uma vez que a toxicidade do Al^{3+} continua sendo um dos problemas agrícolas mais importantes em todo o mundo. Portanto, averiguar a função do mesmo tanto em plantas cultivadas quanto em espécies resistentes ao Al, como aquelas encontradas no cerrado brasileiro, é fundamental.

A partir dos resultados obtidos nesse estudo, também se nota uma necessidade de estudos voltados para as características intrínsecas dos solos ácidos sem envolver a toxicidade por Al^{3+} ou absorção de nutrientes como nitrogênio e fósforo, afim de compreender o metabolismo mitocondrial em condições ácidas.

REFERÊNCIAS

- ANOOP, V. M. *et al.* Modulation of Citrate Metabolism Alters Aluminum Tolerance in Yeast and Transgenic Canola Overexpressing a Mitochondrial Citrate Synthase1. **Plant Phy.** n. 132, p. 2205-2217, 2003.
- ARAÚJO, W. L *et al.* Protein degradation – an alternative respiratory substrate for stressed plants. **Trends in Plant Science.** v. 16, n. 19, p. 489-498, 2011.
- ARAÚJO, W. L *et al.* Metabolic control and regulation of the tricarboxylic acid cycle in photosynthetic and heterotrophic plant tissues. **Plant, Cell & Env.** n. 35, p. 1-21, 2012.
- BAKER, J. R. Experiments on the action of mordants. 2. Aluminium-hematein. **Q J Microsc Sci.** n.103, p. 493–517, 1962.
- BARROS, J. A. S. *et al.* Autophagy is required for lipid homeostasis during dark-induced senescence. *Plant Physiol.* n. 185, p. 1542–1558., 2021.
- BASSHAM, D.C. Plant autophagy-more than a starvation response. **Curr. Opin. Plant Biol.** n. 10, p. 587–593, 2007.
- BRITO, D.S *et al.* Biochemical and functional characterization of a mitochondrial citrate carrier in *Arabidopsis thaliana*. **Biochem. J.** n. 447, p. 1759–1777, 2020.
- BRADFORD *et al.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem,** n. 72, p. 248–254, 1976.
- CATONI, E. *et al.* Identification of an Arabidopsis mitochondrial succinate-fumarate translocator. **Febs Lett.** n. 534, p. 87–92, 2003.

- CHAO, A. *et al.* The alleviation of acid soil stress in rice by inorganic or organic ameliorants is associated with changes in soil enzyme activity and microbial community composition. **Biol. Fertil Soils**. n. 51, p. 465-477, 2015.
- de BELLIS *et al.* Purification and characterization of aconitase isoforms from etiolated pumpkin cotyledons. **Physiol. Plant**. 88, 485–492, 1993. Disponível em: <<https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1993.880314.x>>.
- DENG, W. *et al.* Molecular cloning and characterization of a mitochondrial dicarboxylate/tricarboxylate transporter gene in Citrus junos response to aluminum stress. **Mitochondrial DNA**, n. 19, p. 376–384, 2008.
- DEPROST, D. *et al.* The Arabidopsis TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. **EMBO Rep**. n. 8, p. 864–870, 2007.
- GIBON, Y. *et al.* Integration of metabolite with transcript and enzyme activity profiling during diurnal cycles in Arabidopsis rosettes. **Genome Biol**. n. 7, p.76, 2006.
- GIEGÉ, P. *et al.* Enzymes of glycolysis are functionally associated with the mitochondrion in *Arabidopsis* cells. **Plant Cell**. n. 15, p. 2140–51, 2003.
- GENTY, B.; BRIANTAIS, J. M.; BAKER N. R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochim Biophys Acta**. n. 990, p. 87–92, 1989.
- HAJIBOLAND *et al.* Aluminum Toxicity in Plants: Present and Future. **Journal of Plant Growth Regulation**. Disponível em <<https://doi.org/10.1007/s00344-022-10866-0>>. Acesso em março de 2023.
- HAYWARD, A.P. *et al.* Autophagy and plant innate immunity: defense through degradation. **Semin. Cell Dev. Biol**. n. 20, p. 1041–1047, 2009.

- HORTENSTEINER, S *et al.* Chlorophyll breakdown in higher plants. **Biochim. Biophys. Acta**. n. 1807, p. 977–988, 2011.
- HVORUP, R.N. *et al.* The multidrug/oligosaccharidyl-lipid/polysaccharide (MOP) exporter superfamily. **Eur. J. Biochem**. n. 270, p. 799–813, 2003.
- IGAMBERDIEV, A.U. & EPRINTSEV, A.T. Organic acids: the pools of fixed carbon involved in redox regulation and energy balance in higher plants. **Frontiers in Plant Science**. n. 7, p. 1042, 2016.
- KOCHIAN, L.V. *et al.* The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. **Plant Soil**. n. 274, p. 175– 195, 2005.
- KONG, X. *et al.* ZmMKK4 regulates osmotic stress through reactive oxygen species scavenging in transgenic tobacco. **Plant Cell**. n. 30, p. 2097–2104, 2011.
- LAMBERS, H. *et al.* Respiratory patterns in roots in relation to their functioning. In: Waisel Y, Eshel A, Kafkaki K, eds. **Plant roots: the hidden half**. New York, NY, USA: Marcel Dekker Inc, 521–552.
- LAW, S. R. *et al.* Darkened leaves use different metabolic strategies for senescence and survival. **Plant Physiol**. n. 177, p. 132–150, 2018.
- LEIBER, R.M. *et al.* The TOR pathway modulates the structure of cell walls in Arabidopsis. **Plant Cell**. n. 22, p. 1898–1908, 2010.
- LEMIRE, J. *et al.* *Pseudomonas fluorescens* orchestrates a fine metabolic-balancing act to counter aluminum toxicity. **Environ. Microbiol**. n. 12, p. 1384–1390, 2010.
- LEE, C.P.; TAYLOR, N.L.; MILLAR, A.H. Recent Advances in the Composition and Heterogeneity of the Arabidopsis Mitochondrial Proteome. **Front Plant Sci**. n. 4, p. 4, 2013.

- LI, X.F.; *et al.* Pattern of aluminum-induced secretion of organic acids differs between rye and wheat. **Plant Physiol.** n. 123, p. 1537–1544, 2000.
- LI, Z.; XING, D. Mechanistic study of mitochondria dependent programmed cell death induced by aluminum phytotoxicity using fluorescence techniques. **J. Exp. Bot.** n. 62, p. 331–343, 2011.
- LOPÉZ-BUCIO, J. *et al.* Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. **Plant Sci.** n. 160, p. 1-13, 2000.
- LYNCH, J. P. Root phenotypes for improved nutrient capture: an underexploited opportunity for global agriculture. **New Phyto.** n. 223, p. 548-564.
- MA, J.F. *et al.* Aluminum tolerance genes on the short arm of chromosome 3R are linked to organic acid release in triticale. **Plant Physiol.** n. 122, p. 687–694, 2000.
- MAGALHAES, J.V *et al.* A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. **Nature Genet.** n. 39, p. 1156–1161, 2007.
- MARSCHNER, H. Mechanisms of adaptation of plants to acid soils. **Plant and Soil.** n. 134, p. 1-20, 1991.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum.** v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962.
- NUNES-NESI, A *et al.* Characterization of In Vivo Function(s) of Members of the Plant Mitochondrial Carrier Family. **Biomolecules.** v. 10, n. 1226, p. 1 - 20, 2020.
- OH, S. *et al.* A senescence-associated gene of *Arabidopsis thaliana* is distinctively regulated during natural and artificially induced leaf senescence. **Plant Mol. Biol.** n. 30, p. 739–754, 1996.

- PALMIERI, L. *et al.* Molecular identification of three *Arabidopsis thaliana* mitochondrial dicarboxylate carrier isoforms: Organ distribution, bacterial expression, reconstitution into liposomes and functional characterization. **Biochem. J.** n. 410, p. 621–629, 2008.
- PALMIERI, F. *et al.* Evolution, structure and function of mitochondrial carriers: A review with new insights. **Plant J.** n. 66, p. 161–181, 2011.
- PANCHAL, P.; MILLER, A. J.; GIRI, J. Organic acids: versatile stress-response roles in plants. **J. Exp. Bot.** v. 72, n. 11, 2021.
- PANDA, S.K. *et al.* Mitochondrial alterations related to programmed cell death in tobacco cells under aluminum stress. **C. R. Biol.** n. 331, p. 597–610, 2008.
- PICAULT, N. *et al.* Identification of a novel transporter for dicarboxylates and tricarboxylates in plant mitochondria—bacterial expression, reconstitution, functional characterization, and tissue distribution. **J. Biol. Chem.** n. 277, p. 24204–24211, 2002.
- PICAULT, N.; *et al.* The growing family of mitochondrial carriers in *Arabidopsis*. **Trends Plant Sci.** n. 9, p. 138–146, 2004.
- PRACHAROENWATTANA *et al.* Arabidopsis peroxisomal citrate synthase is required for fatty acid respiration and seed germination. **Plant Cell.** n. 17, p. 2037–2048, 2005. Disponível em: < <https://doi.org/10.1105/tpc.105.031856>>.
- R COR TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Áustria, 2022. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>.
- RAHMAN, R. & UPADHYAYA, H. Aluminum Toxicity and Its Tolerance in Plant: A Review. **Journal of Plant Biology**, n. 64, p. 101-121, 2021.

- ROCHA, M. *et al.* Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are linked by alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of *Lotus japonicus*. **Plant Physiol.** n. 152, p. 1501–1513, 2010.
- SARASKETA, A. *et al.* Nitrogen Source and External Medium Ph Interaction Differentially Affects Root and Shoot Metabolism in *Arabidopsis*. **Front. Plant. Sci.** DOI: 10.3389/fpls.2016.00029. 2016
- SASAKI, T. *et al.* A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. **Plant J.** n. 37, p. 645–653, 2004.
- SCHIPPERS *et al.* Topical review on leaf senescence living to die and dying to live: the survival strategy behind leaf senescence. **Plant Physiol.** n. 169, p. 914–930., 2015.
- SIENKIEWICZ-PORZUCEK, A. *et al.* Mild Reductions in mitochondrial NAD-dependent isocitrate dehydrogenase activity result in altered nitrate assimilation and pigmentation but do not impact growth. **Mol. Plant.** n. 3, p. 156–173, 2010.
- SINGH, R. *et al.* An ATP and oxalate generating variant tricarboxylic acid cycle counters aluminum toxicity in *Pseudomonas fluorescens*. **PLoS ONE.** n. 4, p. 7344, 2009.
- SMALLE, J. & VIERSTRA, R.D. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. **Annu. Rev. Plant Biol.** n. 55, p. 555–590, 2004.
- SUN, P. *et al.* Aluminium-induced inhibition of root elongation in *Arabidopsis* is mediated by ethylene and auxin. **J Exp Bot.** n. 61, v. 2, p. 347-356. 2010.
- SWEETLOVE, L.J. *et al.* Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle. **Trends Plant Sci.** n. 15, p. 462–470, 2010.

THEODOULOU, F. L. *et al.* Seed storage oil catabolism: a story of give and take. **Curr. Opin. Plant Biol.** n. 15, p. 322–328, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.03.017>>.

VIERSTRA, R.D. The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** n. 10, p. 385–397, 2009.

XIANG, G. *et al.* Transcriptomic and phosphor proteomic profiling and metabolite analyses reveal the mechanism of NaHCO₃-induced organic acid secretion in grapevine roots. **BMC Plant Biology.** n. 19, p. 383, 2019.

YIN, L. *et al.* The involvement of lipid peroxide-derived aldehydes in aluminum toxicity of tobacco roots. **Plant Physiol.** n. 152, p. 1406–1417, 2010.

ZHANG, Y. *et al.* Isolation and characterization of two phosphate solubilizing fungi from rhizosphere soil of moso bamboo and their functional capacities when exposed to different phosphorus sources and pH environments. **PLoS One.** n. 13, p. 1–14, 2018.

ZHANG, Y. & FERNIE, A. R. The Role of TCA Cycle Enzymes in Plants. **Adv. Bio.** 2023. DOI: 10.1002/adbi.202200238.

MATERIAL SUPLEMENTAR

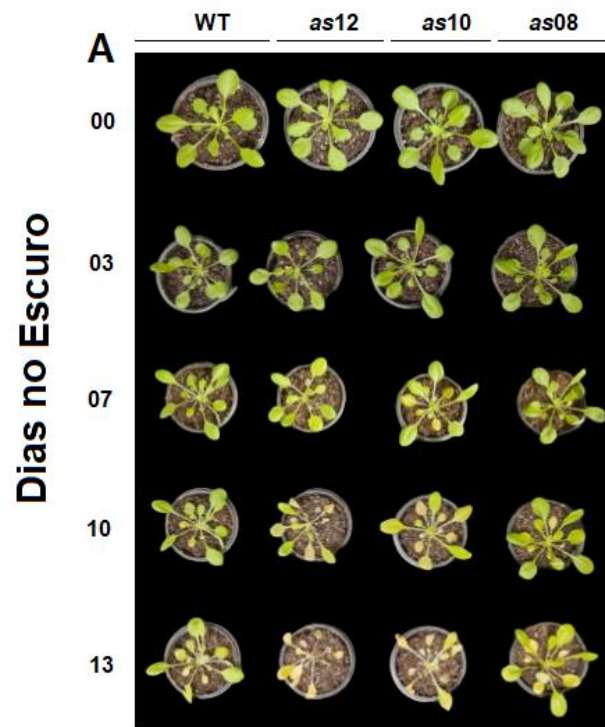


Figura suplementar 1. Caracterização fenotípica dos genótipos de *A. thaliana* com expressão reduzida de SFC1 sob tratamento de escuro prolongado. (A) Imagens de plantas de *A. thaliana* cultivadas em dias curtos com 4 semanas de idade imediatamente (dia 0) e após 3, 7, 10 e 13 dias em condição de escuridão. Grupo 1 do registro fotográfico complementando o fenótipo visto nas linhas antisense *sfc1-12* e *sfc1-10*.

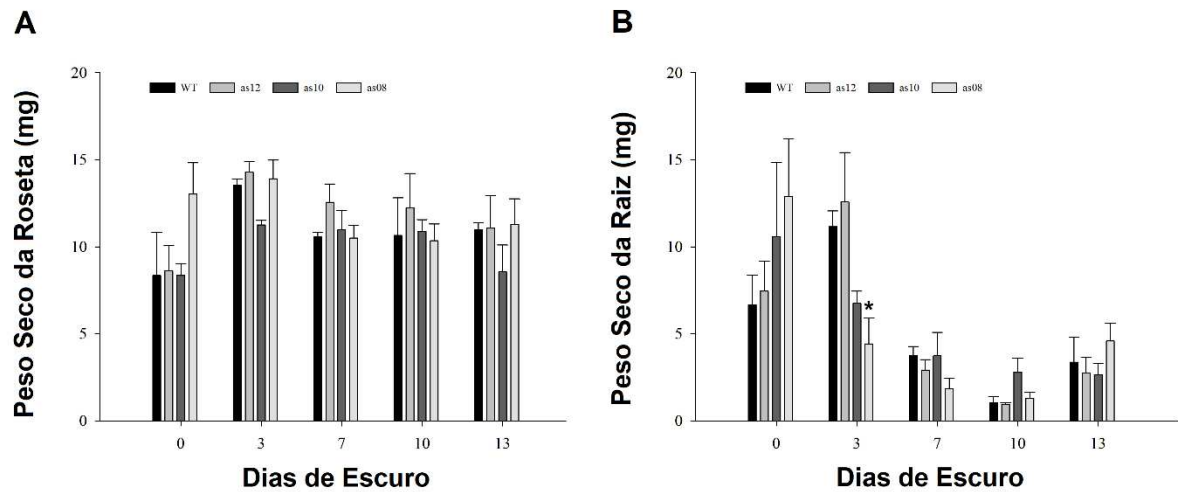


Figura suplementar 2. Influência da redução do transportador SFC1 em rosetas e raízes sob tratamento de escuro prolongado. (A) Peso seco da roseta e (B) peso seco da raiz ao longo dos dias de escuro. Os valores representam as médias \pm erro padrão de seis repetições biológicas. Os asteriscos indicam diferenças significativas pelo teste t ($p < 0.05$) em comparação com o genótipo selvagem (WT).