

MARIA HELENA FAUSTINONI BRUNO

**ENVOLVIMENTO DE ENZIMAS NADP-DESIDROGENASES NA TOLERÂNCIA
AO ALUMÍNIO EM PLÂNTULAS DE SOJA**

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: Cleberson Ribeiro

Coorientadores: Laércio Junio da Silva
Maximiller Dal Bianco Lamas Costa

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

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

T

B898e
2022

Bruno, Maria Helena Faustinoni, 1997-

Envolvimento de enzimas NADP-desidrogenases na
tolerância ao alumínio em plântulas de soja / Maria Helena
Faustinoni Bruno. – Viçosa, MG, 2022.

1 dissertação eletrônica (39 f.): il.

Orientador: Cleberson Ribeiro.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Geral, 2022.

Referências bibliográficas: f. 35-39.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.377>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Soja - Efeito do alumínio. 2. Desidrogenases. 3. Soja -
Efeito do stress. 4. NADP. I. Ribeiro, Cleberson, 1980-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Geral. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal.
III. Título.

CDD 22. ed. 633.34

Bibliotecário(a) responsável: Bruna Silva CRB6/2552

MARIA HELENA FAUSTINONI BRUNO

ENVOLVIMENTO DE ENZIMAS NADP-DESIDROGENASES NA TOLERÂNCIA
AO ALUMÍNIO EM PLÂNTULAS DE SOJA

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: 19 de abril de 2022.

Assentimento:



Maria Helena Faustinoni Bruno
Autora



Cleberson Ribeiro
Orientador

*Aos meus pais, meus irmãos e meus avós, Paulo e Ercília,
que quando eu disse que queria tocar a lua me motivaram,
me ajudaram, me ensinaram e me abraçaram, dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e através dela poder chegar até aqui. Aquele que fez da minha fé toda força que precisei ao longo dessa jornada, por ter me concebido sabedoria e discernimento para a caminhada. A Deus toda honra e toda Glória.

Agradeço a minha irmã Maria Isabel, que divide o mundo comigo desde o primeiro segundo de vida, que me motivou, escutou e aconselhou durante todo esse tempo. Não importa a distância que nos separa, nosso laço transcende tempo e espaço. Sem você eu não seria nada, eu nem existiria. Você faz parte de mim. Obrigado por todo companheirismo nesses 24 anos de vida e, como você costuma dizer, nós somos a maior dupla e parceria desde Romário e Bebeto na Copa de 94.

Agradeço ao meu pai, José Carlos. Agradecer a você é pouco por tudo que fez por mim, não mediu esforços para me motivar e fazer o impossível para que isso pudesse acontecer. É digno este lugar a mesa para você, pois é preciso pessoas que tornem os nossos sonhos possíveis. Obrigado por todo carinho de sempre, por todo o amor e a alegria que você transfere para mim. Você ilumina meus dias e sempre esteve ao meu lado quando mais precisei, o meu mais sincero obrigado.

Aos meus avós, Paulo e Ercília, que hoje não estão mais presentes, mas que fizeram muito por mim, me motivaram e foram fundamentais para eu estar aqui hoje. Sinto saudades hoje, amanhã e sempre.

Agradeço a minha mãe, Gilvanes, e a minha irmã, Ana Flávia, pelo apoio.

Agradeço ao meu irmão Paulo Vitor, que fez e faz meus dias mais alegres e divertidos, que é um ombro amigo e companheiro. Que também me apoiou quando precisei e esteve comigo em toda essa jornada, obrigado por tudo Paulo.

A minha amada e eterna República 180/301 Mundial Azul o meu muito obrigado. As minhas amigas e companheiras de República Bárbara, Ju, Helô, Ana, Fernanda, Thaís e Lari, sem vocês eu não teria conseguido, vocês não foram apenas as minhas colegas de casa nesses dois anos, vocês foram a minha família. Eu não poderia ter encontrado lugar melhor para morar e nem melhores companheiras, Viçosa não era Viçosa sem vocês. Obrigado pelo companheirismo, motivação e, principalmente, amizade. Nunca me esquecerei de vocês, obrigado por tudo e os meus mais sinceros agradecimentos a todas. Vocês estão para sempre no meu coração.

Agradeço ao meu Orientador Prof. Cleberson que me ajudou todo esse tempo, que permitiu que eu trabalhasse com algo que eu gostasse e que pudessemos realizar este trabalho.

Pela paciência e instrução, o meu profundo e eterno agradecimento. Sou grata pelos ensinamentos, compartilhamento, amizade e conselhos. Elas foram fundamentais para o resultado final desse projeto. O senhor está em meu coração e será levado para sempre em minha memória.

Agradeço ao Professor Max por toda ajuda, auxílio e paciência nas análises moleculares, o meu mais sincero obrigado. Estendo meus agradecimentos as alunas de seu laboratório, Jéssica, Brizza, Teresinha, Maria Fernanda e Marina, que também me auxiliaram nessas análises, além das conversas, companheirismo e amizade, muito obrigado meninas vocês são sensacionais e sinto saudades de todas.

Agradeço também ao Professor Laércio, que cedeu seu laboratório para condução do experimento, disponibilizou as sementes e sempre nos auxiliou no que foi preciso, obrigado Professor. Também agradeço a todos do Laboratório de Sementes pela ajuda.

Agradeço a Dani pela amizade e conselhos, além da ajuda na escrita, e que sempre procurou estar presente. Agradeço aos colegas do Laboratório de Genética Molecular de Plantas.

Um agradecimento especial ao Bruno e Renata, que não são apenas colegas de laboratório, são meus amigos e me ajudaram muito para que esse trabalho acontecesse. Obrigado pelo companheirismo e amizade, pelos conselhos e conversas, por terem deixado essa jornada um pouco mais leve e divertida, e por também me ajudarem a ser uma pessoa melhor.

Agradeço a todos os meus amigos de longa data, Nara, Lau, Gih, Leonardo, Alayane, Karol, Ranieri, Mathilde, Juh, Mirella, Evelyn e todas os outros que sempre e fizeram o possível para sempre estarem presentes de alguma forma, além de todo o apoio.

Agradeço a minha Professora Con, minha orientadora da graduação, que foi quem me fez apaixonar pelas plantas, que me inspirou e me motivou a seguir na Fisiologia Vegetal. Ela foi muito mais que uma professora, foi amiga e conselheira, uma pessoa que tenho admiração e carinho. Obrigado, Prof Con, se não fosse você isso jamais teria sido possível, estás no meu coração sempre. Agradeço também a Prof. Cidinha, da graduação também, que foi uma grande motivadora, uma pessoa sensacional, obrigado pelos conselhos Cidinha, você também foi fundamental para eu chegar até aqui.

Agradeço a todo o Programa de Pós Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, obrigado pela oportunidade e por me permitir fazer parte deste programa. Obrigado a todos os Professores do Programa pelos ensinamentos e aprendizados. Agradeço

também a Luciene por toda a ajuda desde a inscrição até matrícula, plano de estudo, disciplinas e por sanar todas as nossas dúvidas quando preciso, Luciene você é sensacional.

Agradeço a Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade também, e por toda a estrutura oferecida. Estendo meus agradecimentos ao Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária, o Bioagro, por toda a infraestrutura, laboratórios e equipamentos, que permitiram a realização deste trabalho.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos, pois sem ela isto não seria possível.

Meus agradecimentos também as outras agências de fomento, CNPq e Fapemig, pelo auxílio financeiro para condução e desenvolvimento do projeto.

*“Reze e trabalhe, fazendo de conta que esta vida é
um dia de capina com sol quente, que às vezes custa
muito a passar, mas que sempre passa.
E você ainda pode ter um muito pedaço bom de alegria (...)
Cada um tem a sua hora e a sua vez: você há de ter a sua.”*
Guimarães Rosa

RESUMO

BRUNO, Maria Helena Faustinoni, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2022. **Envolvimento de enzimas NADP-desidrogenases na tolerância ao alumínio em plântulas de soja.** Orientador: Cleberson Ribeiro. Coorientadores: Maximiller Dal Bianco Lamas Costa e Laercio Junio Silva.

Um dos maiores limitantes das culturas são os solos ácidos com prevalência de íons biodisponíveis de alumínio (Al^{3+}), o qual causa danos ao crescimento e desenvolvimento das raízes. Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH), malato desidrogenase (NADP-ME) e isocitrato desidrogenase (ICDH) são enzimas NADP-desidrogenases responsáveis pela produção de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), molécula essencial para a modulação do *status* redox celular. Adicionalmente, o aumento na atividade dessas enzimas está relacionado a respostas a agentes estressores. A molécula de NADPH é utilizada pelo Ciclo Ascorbato-Glutationa (Ciclo AsA-GSH) na destoxificação celular do H_2O_2 . No presente trabalho, avaliamos o desempenho de dois genótipos de soja NEO610 (Al-tolerante) e M5917I (Al-sensível) na ausência (0 mM) e presença do alumínio (1,5 mM) na fase de desenvolvimento VE/VC analisando seu sistema radicular. Neste estudo avaliamos a atividade e expressão das enzimas NADP-desidrogenases, produção de NADPH, atividade das enzimas do Ciclo Asc-GSH e seus metabólitos. Encontramos no genótipo de soja NEO610 (Al-tolerante) aumento na expressão e na atividade das enzimas NADP-desidrogenases, G6PDH, 6PGDH, ICHD, NADP-ME, bem como aumento no conteúdo de NADPH. O genótipo Al-tolerante aumentou a atividade da enzima MDHAR e manteve elevado a atividade da enzima GR, sendo acompanhado do aumento nos níveis de seus respectivos metabólitos antioxidantes, AsA e GSH. Além disso, o genótipo Al-tolerante manteve menores valores da peroxidação lipídica e do teor de H_2O_2 e não apresentou redução no crescimento radicular frente ao estresse por Al. Dessa forma, concluímos que o aumento na expressão de genes e na atividade das enzimas NADP-desidrogenases contribuiu para a tolerância do genótipo de soja NEO610 ao Al, através do fornecimento de equivalentes redutores na forma de NAD(P)H para os componentes do Ciclo Ascorbato-Glutationa, resultando em menores danos oxidativos e melhor desenvolvimento desse genótipo frente a esse metal.

Palavras-chave: Alumínio. Desidrogenases. NADPH. Soja. Tolerância.

ABSTRACT

BRUNO, Maria Helena Faustinoni, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2022. **Involvement of the NADP-dehydrogenases enzymes in the aluminum tolerance in soybean seedlings.** Advisor: Cleberson Ribeiro. Co-advisors: Maximiller Dal Bianco Lamas Costa and Laercio Junio Silva.

One of the biggest limiting factors for crops are acidic soils with a prevalence of bioavailable aluminum ions (Al^{3+}), which damages the growth and development of roots. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGDH), malate dehydrogenase (NADP-ME) and isocitrate dehydrogenase (ICDH) are NADP-dehydrogenase enzymes responsible for the production of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), an essential molecule for modulating cellular redox status. Additionally, the increase in the activity of these enzymes is related to responses to stressors. The NADPH molecule is used by the Ascorbate-Glutathione Cycle (AsA-GSH Cycle) in the cellular detoxification of H_2O_2 . In the present work, we evaluated the performance of two soybean genotypes NEO610 (Al-tolerant) and M5917I (Al-sensitive) in the absence (0 mM) and presence of aluminum (1.5 mM) in the VE/VC development phase, analyzing their root system. In this study we evaluated the activity and expression of NADP-dehydrogenase enzymes, NADPH production, activity of Asc-GSH Cycle enzymes and their metabolites. We found in the soybean genotype NEO610 (Al-tolerant) an increase in the expression and activity of the enzymes NADP-dehydrogenases, G6PDH, 6PGDH, ICHD, NADP-ME, as well as an increase in the content of NADPH. The Al-tolerant genotype increased the activity of the MDHAR enzyme and maintained the elevated activity of the GR enzyme, being accompanied by an increase in the levels of their respective antioxidant metabolites, AsA and GSH. In addition, the Al-tolerant genotype maintained lower values of lipid peroxidation and H_2O_2 content and showed no reduction in root growth in the face of Al stress. Thus, we conclude that the increase in the expression and activity of NADP-dehydrogenase enzymes contributed to the tolerance of the soybean NEO610 genotype to Al, through the supply of reducing equivalents in the form of NAD(P)H for the components of the Ascorbate-Glutathione, resulting in less oxidative damage and better development of this genotype against this metal.

Keywords: Aluminum. Dehydrogenases. NADPH. Soybean. Tolerance.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. Introdução | 11 |
| 2. Material e Métodos..... | 14 |
| 2.1. Material vegetal e tratamentos..... | 14 |
| 2.3. Extração das enzimas NADP-Desidrogenases | 14 |
| 2.6. Determinação do conteúdo de NADP e NADPH..... | 17 |
| 2.7. Determinação da atividade das enzimas envolvidas no metabolismo do Ascorbato e da Glutationa: GPX, GR, DHAR, MDHAR e APX..... | 17 |
| 2.8. Determinação do conteúdo de Ascorbato e Glutationa | 18 |
| 2.9. Determinação da peroxidação lipídica e conteúdo de H ₂ O ₂ | 19 |
| 2.10. Análises Estatísticas | 20 |
| 3. Resultados | 21 |
| 3.1. Crescimento radicular e Teor de Alumínio | 21 |
| 3.2. Expressão Gênica das enzimas NADP-Desidrogenases | 22 |
| 3.3. Atividade das enzimas NADP-Desidrogenases | 22 |
| 3.4. Conteúdo de NADP e NADPH | 23 |
| 3.5. Atividade das Enzimas do Ciclo Ascorbato-Glutationa..... | 24 |
| 3.6. Conteúdo de metabólitos antioxidantes | 25 |
| 3.7. Danos oxidativos e acúmulo de H ₂ O ₂ | 28 |
| Referências | 35 |

1. Introdução

A soja é uma das culturas mais importantes do mundo, principalmente devido ser uma fonte relevante de proteínas e óleos para a alimentação humana e animal. Na safra 2020/2021, o Brasil se manteve como o maior produtor mundial da soja (CONAB, 2021), sendo a principal commodity do país. Por ser cultivada em diferentes regiões do mundo, a soja está exposta a diferentes agentes estressores, como por exemplo os solos ácidos. Os solos ácidos representam cerca de 40% dos solos com potencial agrícola ao redor do mundo e nesses solos, a toxicidade causada pelo alumínio (Al) figura como o principal fator limitante da produção das culturas (Inostroza-Blancheteau et al. 2012; Sade et. al., 2016). No Brasil, cerca de 67% de seu território é formado por solos ácidos (Crespo-Mendes et. al., 2018).

O Al é o metal mais abundante nos solos e o terceiro elemento que possui a maior presença na crosta terrestre (Kochian et. al., 2015). Em solos ácidos o Al é encontrado na forma de cátion trivalente (Al^{3+}), sendo a forma mais biodisponível para as plantas e, portanto, responsável pelos danos (Simões et. al., 2012; Yang et. al., 2013; Sade et. al., 2016). Mesmo em baixas concentrações (próximo a 50 μM), este metal pode inibir o alongamento da raiz, bloqueando os processos de divisão e alongamento celular, e conseqüentemente, reduzir a absorção de água e nutrientes essenciais às plantas (Inostroza-Blancheteau et al. 2012; Yang et. al., 2019a; Zhang et. al., 2019).

O estresse causado pelo Al, além de prejudicar o desenvolvimento radicular, pode gerar um desbalanço metabólico e alteração na homeostasia celular, resultando em aumento na síntese e no acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Gill e Tuteja, 2010; Sharma et. al., 2012; Sofó et. al., 2015). O acúmulo de ROS pode levar a oxidação de importantes componentes celulares, como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, além da inibição enzimática, comprometendo o desenvolvimento da planta (Keunen et. al., 2011; Ma et. al., 2012; Zhang et. al., 2019). Para remover essas ROS, as plantas apresentam eficientes sistemas de defesa que podem ser enzimáticos ou não enzimáticos, que necessitam de poder redutor, como por exemplo a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), como substrato das reações (Zhao et. al., 2020).

A Via das Pentoses Fosfatadas (*Pentose Phosphate Pathway* (PPP)) e o Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (TCA) exercem papel chave no metabolismo de carboidratos e nas respostas aos estresses, produzindo poder redutor na forma de NAD(P)H através das enzimas NADP-desidrogenases (Corpas e Barroso, 2014; Nunes-Nesi et al., 2014; Zhao et. al., 2020). As duas enzimas desidrogenases da PPP, glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH, EC 1.1.1.49) e 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH, EC 1.1.1.44), utilizam $NADP^+$ para

gerar NADPH durante a conversão da glicose-6-fosfato a pentose, e essa catalise está envolvida no controle e manutenção da razão $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$. A atividade da enzima G6PDH está envolvida nas respostas a estresses abióticos, como seca (Liu et. al, 2013), salinidade (Wang et. al., 2008a, Wang et. al, 2008b) e metais tóxicos (De Lillo et. al, 2018). A atividade da enzima 6PGDH aumentou após exposição a ao alumínio em plantas de alfafa, fornecendo intermediários, como açúcares e aminoácidos para a planta (Fan et. al., 2011).

Enzimas do TCA, como a isocitrato desidrogenase (ICDH; EC 1.1.1.42), também fornecem NADPH para o metabolismo, sendo crucial para o balanço redox vegetal (Liu et. al., 2010; Mhamdi et. al., 2010). Outra enzima desidrogenase que se destaca é a enzima málica (NADP-ME, EC. 1.1.1.40). Sua atividade é fundamental para prover poder redutor (NADPH) para a síntese de metabólitos de defesa, como lignina e flavonoides, além disso, tem importante papel no metabolismo das espécies reativas de oxigênio auxiliando nas respostas a estresses abióticos e bióticos (Zhou et. al., 2012; Sun et. al., 2019). O aumento da atividade da enzima NADP-ME foi associado com o melhor desempenho das plantas frente a estresses, como ataque de patógenos (Voll et. al., 2012), estresse salino, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e manitol (Zhou et. al., 2012) e seca (Babayev et. al., 2014).

O poder redutor do NAD(P)H é de grande importância para a atuação do Ciclo Ascorbato-Glutationa, e conseqüentemente para a remoção do H_2O_2 (Letierrier et. al., 2012; Wang et. al., 2016). Duas importantes enzimas do Ciclo Ascorbato-Glutationa, glutaciona redutase (GR) e monodehidroascorbato redutase (MDHAR), utilizam o poder redutor do NADPH para regenerar a glutaciona (GSH) e o ascorbato (AsA), respectivamente, que posteriormente irão desintoxicar o H_2O_2 do metabolismo celular (Liu et. al., 2013; Yang et. al., 2019a). Sob estresse por Al, ápices de raízes de trigo aumentaram a atividade e os níveis de transcritos para as enzimas ascorbato peroxidase (APX), GR e desidroascorbato redutase (DHAR), além de aumentos nos níveis de AsA e GSH, o que contribuiu para a tolerância do genótipo frente a este estresse (Sun et. al., 2015).

No Brasil, o maior produtor de soja mundial, cerca de 67% da área do país apresenta solos ácidos ($\text{pH} < 5,5$) (Crespo-Mendes et. al., 2018) e não há registros de programas de melhoramento para a tolerância ao alumínio para tal cultura. Além do mais as regiões Norte e Nordeste, que apresentam extensas áreas com presença de solos ácidos, vem apresentando uma crescente expansão do cultivo da soja e as projeções agrícolas apontam para um aumento ainda maior na produtividade da cultura devido a expansão agrícola na região do Cerrado (Embrapa, 2020), porém uma de suas principais limitações são os solos ácidos que acarretam prejuízos à produtividade.

O aumento na atividade das enzimas NAD(P)H-desidrogenases e sua relação com o aumento na atividade do Ciclo Ascorbato-Glutationa garantiu maior tolerância aos genótipos de trigo (Slaski et. al., 1996a; Slaski et. al., 1996b), de milho (Liu et. al, 2010) e de arabidopsis (Zhao et. al., 2020), diminuindo os danos oxidativos causados por agentes estressores. No entanto, poucos são os estudos que demonstram o papel dessas enzimas no combate ou mitigação do estresse causado pelo Al em soja. O objetivo de nosso trabalho foi investigar a atividade de enzimas desidrogenases geradoras de NADPH para a tolerância ao estresse gerado pelo Al em raízes de genótipos de soja, através da ativação de componentes do Ciclo Ascorbato-Glutationa.

2. Material e Métodos

2.1. Material vegetal e tratamentos

Sementes dos genótipos de soja (*Glycine max*) NEO610 (Al-tolerante) e M5917I (Al-sensível) foram obtidas das empresas Neogen e Monsoy, respectivamente, e utilizadas neste estudo. Esses genótipos foram classificados com tolerância diferencial ao Al após um *screening* com 69 genótipos de soja conduzido em nosso laboratório. As sementes foram desinfetadas em solução de hipoclorito de sódio 5% durante 2 minutos, e posteriormente lavadas com água destilada. Em seguida, foram semeadas em papel germitest e umedecidas com solução de AlCl_3 pH 4,0 nas concentrações de 0 e 1,5 mM durante 5 dias. O material vegetal foi mantido em germinador (modelo Mangelsdorf) com fotoperíodo de 16/8h (luz/escuro), intensidade luminosa de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de $25^\circ\text{C} (\pm 2)$. A unidade experimental foi composta por 4 repetições constituída por 20 sementes.

Ao final do período experimental, as plântulas se encontravam entre o estágio de emergência (VE) e estágio cotilédone (VC), foram realizadas avaliações fenotípicas nas plantas e as raízes foram coletadas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer (-80°C), e posteriormente destinadas para análises bioquímicas e moleculares.

2.2. Extração das enzimas NADP-Desidrogenases

Amostras de 0,1 g de raízes foram homogeneizadas em 1 mL de meio de extração constituído de tampão Hepes-Tris 50 mM, pH 7,8, MgCl_2 3mM, EDTA 1mM e PMSF 1 mM (Wang et. al. 2017). Em seguida, o meio de extração foi centrifugado a 12.000 g a 4°C por 20 minutos, e o sobrenadante coletado para a determinação da atividade das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH, EC 1.1.1.49), 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH, EC 1.1.1.44), isocitrato desidrogenase (ICDH, EC 1.1.1.42) e enzima málica desidrogenase (NADP-ME, EC 1.1.1.37).

2.3. Ensaio da atividade das enzimas G6PDH, 6PGDH, ICDH e NADP-ME

Para a determinação da atividade das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH), 10 μl do extrato enzimático foi adicionado ao meio de reação constituído de tampão Hepes-Tris 50mM, pH 7,8, MgCl_2 3,3 mM e NADPNa_2 0,5 mM. Adicionalmente, foram adicionados substratos específicos para ambas enzimas, sendo glicose-6-fosfato 0,5 mM (D-glucose 6-phosphate disodium salt

hydrate, Sigma Aldrich G7250) para a enzima G6PDH e ácido 6-fosfogluconico trissódico 5 mM (6-phosphogluconic acid trisodium salt, Sigma Aldrich P7877) para a enzima 6PGDH.

Para a determinação da atividade da enzima málica desidrogenase (NADP-ME), o meio de incubação, adaptado de Muñoz-Vargas et. al. (2020), foi composto por tampão Hepes-Tris 50 mM, pH 7,8, MgCl₂ 2mM, NADPNa₂ 0,8 mM e ácido L-málico dissódico 1mM (L-(-)-malic acid disodium salt, Sigma Aldrich M9138).

Para a enzima isocitrato desidrogenase (IDCH), o meio de reação foi constituído de tampão Hepes-Tris 50 mM, pH 7,8, MgCl₂ 2mM, NADPNa₂ 0,8 mM e isocitrato trissódico 10mM (DL-Isocitric acid trisodium salt hydrate, Sigma Aldrich I1252), conforme Leterrier et. al. (2012).

As atividades das enzimas foram mensuradas a 25°C pela redução do NADP a NADPH com leitura a 340 nm em espectrofotômetro (Leitora de Elisa e Fotômetro de Microplacas Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific).

Proteínas totais foram determinadas, a partir do extrato bruto, pelo método de Bradford (1976), utilizando BSA como padrão e determinadas em espectrofotômetro a 595 nm.

2.4. Extração de RNA e síntese de cDNA e análise da expressão de genes via qRT-PCR

Cerca de 100 mg de raízes de soja foram maceradas em nitrogênio líquido e adicionados 750 µL de Trizol® LS Reagent (Invitrogen- Thermo Fisher Scientific ,52915514) para a extração de RNA. Posteriormente as amostras de RNA foram tratadas com DNase I-RNase free (Invitrogen- Thermo Fisher Scientific, 00729032). Para a síntese de cDNA foi utilizado o RNA tratado com DNase I-RNase free e adicionado oligoDT, dNTP (Invitrogen- Thermo Fisher Scientific,1530552), DTT (Invitrogen- Thermo Fisher Scientific, 1502352), RNase-OUT (Invitrogen- Thermo Fisher Scientific, 1847321) e Transcriptase Reversa (M-MVL, Invitrogen- Thermo Fisher Scientific,1213830). PCR-real time quantitativo foi performado utilizando iTaq Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, L006363 B), cDNA e primers desenhados para PCR real time.

Os genes selecionados foram *GmG6PDH* (LOC100806107-Glyma.19G077300), *Gm6PGDH* (LOC100799034-Glyma.19G038400, *GmNADP-ME* (LOC100801564-Glyma.06G087800) e *GmICDH* (LOC100791166-Glyma.4G211000) (Tabela 1). Os primers foram desenhados utilizando o Primer Express Software Version 3.0 e alinhados na

plataforma SoyBase (<https://www.soybase.org/>). Os conjuntos de primers utilizados foram *GmG6PDH* Forward (FW) 5'-AATGAATCCCCTCTATCG-3' e Reverse (RV) 5'-ACCTCATCTGGTAGTAGG-3', *Gm6PGDH* FW 5'-CAAAACCTTGCTCTCAACATTGC-3' e RV 5'-CGCGGTCCGGTTGTAGAC-3', *GmNADP-ME* FW 5'-GACAAAAGTTGTTGGCAGTCAT-3' e RV 5'-ACCACCGTTCCTCATCTCCTT-3', *GmICDH* FW 5'-GCCCTGATGGAAAGACTATTGAA-3' e RV 5'-CCCTAAAATGGCGGGTAACTG-3'. O gene normalizador utilizado foi o *GmActina* FW 5'-TGGACTCTGGTGATGGTGTG-3' e RV 5'-CTCAGCAGAGGTGGTGAACA-3'.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Applied Biosystems Real-Time PCR, de acordo o seguinte programa: 5 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 58°C e 30 segundos a 72°C e em seguida, 10 minutos a 72°C. A expressão relativa foi normalizada pelo tratamento controle usando níveis de $\Delta\Delta C_t$ ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), de acordo com Livak e Schmittgen (2001).

Tabela 1. Genes analisados via PCR em tempo real.

| Gene | Nome | Reação Catalisada | Função |
|-------------------------|--|---|---|
| <i>GmG6PDH</i> | <i>Glycine max</i> Glucose-6-phosphate dehydrogenase | Glicose-6-fosfato +NADP→ 6- Fosfoglucosato+NADPH | Oxida a glicose-6-fosfato a 6-fosfoglucosato com redução NADP ⁺ |
| <i>Gm6PGDH</i> | <i>Glycine max</i> 6-phosphoglucosato dehydrogenase | 6- fosfoglucosato + NADP→ Ribulose-5-fosfato + NADPH+CO ₂ | Oxida a molécula de 6-fosfoglucosato com liberação de dióxido de carbono e geração de Ribulose 5-fosfato e NADPH |
| <i>GmICDH</i> | <i>Glycine max</i> Isocitrate dehydrogenase | Isocitrato + NADP → Alfa-cetoglutarato+ NADPH+CO ₂ | Catalisa a descarboxilação do Isocitrato a alfa-cetoglutarato, convertendo NADP a NADPH e liberando CO ₂ |
| <i>GmNADP-ME</i> | <i>Glycine max</i> Malic Enzyme e/ou Malate dehydrogenase | Malato+NADP→ Oxaloacetato+NADPH | Catalisa a oxidação reversível de malato em oxaloacetato na presença de NADP reduzindo o a NADPH |

2.5. Determinação do conteúdo de NADP e NADPH

Os conteúdos de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) e sua forma reduzida (NADPH) foram quantificados conforme Zhang et. al. (2020). Para a extração de NADP foi utilizado 0,1 M de HClO₄ seguido de centrifugação a 14000 rpm por 10 minutos a 4°C, e depois adicionado ao sobrenadante 0,1 M de KOH em 0,2 M de tampão Tris-HCl pH 8,4. Já para a quantificação de NADPH, o meio de extração foi constituído de 0,1M de KOH seguido de centrifugação a 14000 rpm por 10 minutos a 4°C, e depois adicionado ao sobrenadante 0,1 M de HClO₄ em 0,2 M de Tris-HCl pH 8,4.

O mix de detecção, para ambos, foi constituído de tampão Tricina/KOH 0,3 M, pH 9,0, EDTA 12mM, glicose-6-fosfato 9 mM (D-glucose 6-phosphate disodium salt hydrate, Sigma Aldrich G7250), 0,45 unidades/reacção de glicose-6-fosafato desidrogenase (Glucose-6-phosphate dehydrogenase [G6P-DH], grade II, Roche 10127671001), etosulfato de fenazina 0,3 mM (Phenazina ethosulfate, Sigma Aldrich P4544) e brometo tiazolil azul de tetrazólio (Thiazolyl Blue tetrazolium bromide [MTT], Sigma Aldrich M2128). A absorbância foi determinada a 570 nm a 30°C.

Os conteúdos de NADP e NADPH foram estimados com base em curva de calibração preparada com padrões autênticos de NADP e NADPH.

2.6. Determinação da atividade das enzimas envolvidas no metabolismo do Ascorbato e da Glutationa: GPX, GR, DHAR, MDHAR e APX

Para determinar as atividades enzimáticas, amostras de aproximadamente 50mg de raízes foram moídas em nitrogênio líquido e homogeneizadas nos seguintes meios: tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetanossulfonilfluoreto (PMSF) 1 mM e 1% (p/v) polivinilpolipirrolidona (PVPP) para a enzima superóxido dismutase ascorbato peroxidase (APX - EC 1.11.1.11) (Ribeiro et al., 2012); tampão Tris-HCl 0.1 M, pH 7.5, 1 mM EDTA e 10 mM cloreto de magnésio (MgCl₂) (Nagalakshmi e Prasad, 2001) para glutaciona peroxidase (GPX - EC 1.11.1.9); 0.1 M tampão fosfato de potássio, pH 7.5, 1 mM EDTA, 2 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM PMSF e 1% PVPP para glutaciona redutase (GR - EC 1.6.4.2) (Carlberg and Mannervik, 1985); 50 mM tampão fosfato de potássio, pH 7.8 e 1 mM ascorbato para monodesidroascorbato redutase (MDHAR – EC 1.6.5.4) (Hossain et al., 1984), e 50 mM tampão Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM

NaCl, 2 mM EDTA e 1 mM MgCl₂ para desidroascorbato redutase (DHAR – EC 1.8.5.1) (Chen e Gallie, 2006).

Posteriormente os homogeneizados foram centrifugados a 12.000 g por 15 min a 4°C para todas as enzimas, e os sobrenadantes foram utilizados como fonte de enzima. As atividades enzimáticas foram determinadas pela adição de extrato enzimático bruto ao meio de reação que consiste em: 50 mM tampão fosfato de potássio, pH 6.0, 0.8 mM ascorbato e 1 mM H₂O₂ para APX; 50 mM tampão fosfato de potássio, pH 7.0, 1 mM EDTA, 0.1 mM NaCl, 1 mM glutationa (GSH), 0.2 mM NADPH, 0.25 mM H₂O₂ e 1 unidade de glutationa redutase para GPX; 0.1 M tampão fosfato de potássio, pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM glutationa oxidada (GSSG) e 0.1 mM NADPH para GR; 50 mM tampão Tris-HCl, pH 7.6, 0.1 mM NADH, 2.5 mM ascorbato, 0.4 unidades de ascorbato oxidase para MDHAR e 50 mM tampão fosfato de potássio, pH 7.0, 2 mM desidroascorbato e 5 mM glutationa reduzida para DHAR. As atividades das enzimas foram estimadas pela mensuração da mudança de absorvância durante o primeiro minuto de reação, a 30°C.

A atividade das enzimas foi estimada utilizando o coeficiente de extinção molar: APX (290 nm, $\epsilon = 2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); GPX (340 nm, $\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); GR (340 nm, $\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); MDHAR (340 nm, $\epsilon = 6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e DHAR (265 nm, $\epsilon = 14 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

O teor de proteína dos extratos enzimáticos foi determinado pelo método de Bradford (1985) usando BSA como padrão.

2.7.Determinação do conteúdo de Ascorbato e Glutaciona

Para determinar os conteúdos de ascorbato (AsA) e dehidroascorbato (DHA), 50 mg de raízes foram homogeneizadas em 6% (w/v) TCA e centrifugadas a 15,000 g por 5 min a 4°C (Kampfenkel et al. 1995). O conteúdo total de ascorbato (AsA+DHA) foi determinado em alíquotas de extrato tratadas com 0.5 mM DTT e 0.02 M Tampão fosfato de potássio, pH 7.4, a 42°C por 15 min. 0.025% N-ethylmaleimide (w/v), 2.5% TCA (w/v), 8.4% H₃PO₄ (v/v), 0.8% 2,2'-dipyridyl (w/v), and 0.3% cloreto férrico (FeCl₃) (w/v) foram adicionados, e as amostras foram incubadas novamente a 42°C por 40 min. Após parar a reação em gelo, a absorvância foi medida em 525 nm. O teor de AsA foi determinado como descrito acima, mas omitindo DTT e N-etilmaleimida. O teor de DHA foi calculado como a diferença entre o teor de ascorbato total (AsA + DHA) e o teor de forma reduzida. Os teores de AsA e DHA foram determinados com base na curva de calibração usando padrões de ascorbato.

O conteúdo total de glutatona (GSH + GSSG) foi mensurado de acordo com Griffith (1980). Cerca de 50 mg de raízes foram homogeneizadas em 0.1 M HCl e 1 mM EDTA, e centrifugadas a 12,000 g por 10 min a 4°C. Para determinação do conteúdo total de glutatona, alíquotas de 10 µL de extrato enzimático foram adicionados em meio de reação composto por 25 mM tampão fosfato de sódio, pH 7.5, 30 µM NADPH, e 0.6 mM DTNB [5,5'-dithiobis acid (2-nitrobenzoic)]. Depois foram incubadas a 30°C por 5 min, 10 µL de glutatona redutase (50 U mL⁻¹) foi adicionado e a absorbância foi determinada a 412 nm. Para determinar o conteúdo de GSSG, 200 µL do sobrenadante foi derivatizado com 10 µL de 2-vinylpyridine (2-VP) por 60 min a 30°C. Depois da derivatização da GSH com 2-VP, o conteúdo de GSSG foi determinado como previamente descrito para o conteúdo total de glutatona. O conteúdo de GSH foi estimado através da diferença entre o conteúdo de glutatona total e GSSG. O conteúdo de glutatona foi determinado baseado em curva de calibração utilizando se glutatona reduzida como padrão.

2.8.Determinação da peroxidação lipídica e conteúdo de H₂O₂

Para a determinação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂), 50 mg de raízes foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,1% (p/v). Após filtração, o extrato foi centrifugado a 12.000 g por 15 min a 4°C. Alíquotas do sobrenadante foram adicionadas em um meio de reação consistindo em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,5 e iodeto de potássio 1 M, e subsequentemente lidas a 390 nm. O teor de H₂O₂ foi estimado com base em uma curva de calibração preparada com padrões autênticos de H₂O₂.

A peroxidação lipídica foi estimada pelo conteúdo de malondialdeído (MDA) produzido após a reação com ácido tiobarbitúrico (TBA) (Cakmak e Horst 1991). Amostras de 50 mg de raízes foram homogeneizadas em 1% (p/v) de ácido tricloroacético (TCA) e centrifugadas a 12.000 g por 15 min a 4°C. Alíquotas de 150 µL de sobrenadante foram adicionadas em uma solução de TBA 0,5% (p/v) em TCA 20% e incubadas em banho-maria a 95°C. Após 30 min, a reação foi interrompida, os tubos foram centrifugados a 10.000 g por 10 min, e a absorbância do sobrenadante foi determinada em 532 e 600 nm. O conteúdo do complexo MDA-TBA foi estimado usando um coeficiente de absorvidade molar de 155 mM⁻¹ cm⁻¹ (Heath e Packer, 1968).

2.9. Análises Estatísticas

Os dados coletados foram submetidos a análise estatística pelo programa SASM-AGRI (Canteri et. al., 2001) e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

3. Resultados

3.1. Crescimento radicular

O crescimento radicular do genótipo NEO610 não foi alterado após o tratamento com Al (Figs. 1 e 2). Já no genótipo M5917I, o tratamento com Al reduziu em 14,54% o crescimento radicular em relação ao controle (Figs. 1 e 2). No tratamento com Al, o crescimento radicular do genótipo NEO610 foi 25,37% maior que no genótipo M9517I (Fig. 1 e 2).

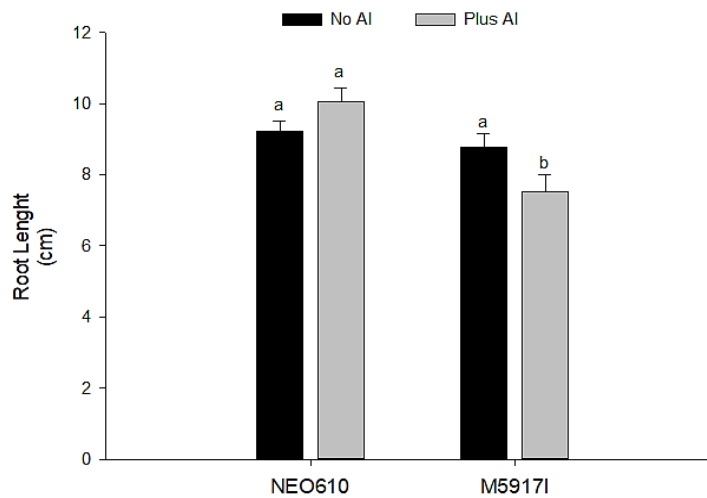


Figura 1.: Root growth of soybean genotypes NEO610 and M5917I germinated in control treatment 0 mM Al (No Al) e 1,5 mM de AlCl_3 (Plus Al). Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) among the treatments. Bars represent standard error.

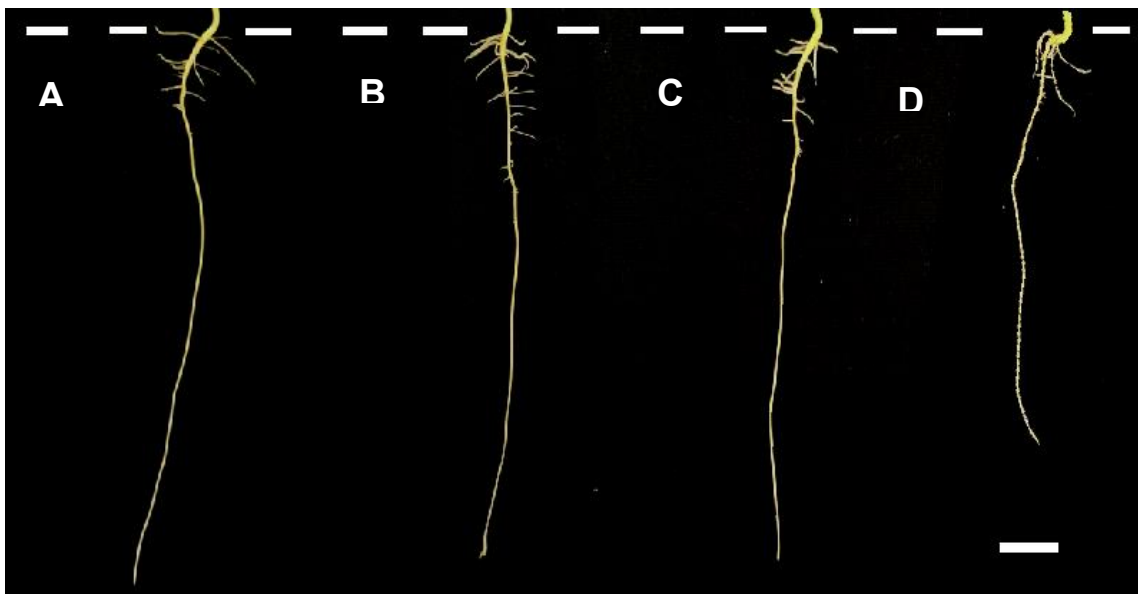


Figura 2: Visual aspect of root system of two soybean genotypes NEO610 and M5917I of seedlings germinated in control treatment 0 mM (No Al) and 1,5 mM of AlCl_3 (Plus Al). (A) NEO610 No Al; (B) NEO610 Plus Al; (C) M5917I No Al; (D) M5917I Plus Al. Bar: 1 cm.

3.2. Expressão Gênica das enzimas NADP-Desidrogenases

A expressão do gene *GmG6PDH* e *GmICDH* (Fig 3) aumentou de maneira significativa no genótipo sensível na presença do Al (Fig. 3). Já a expressão do gene *Gm6PGDH* (Fig 3) teve aumento de sua expressão em ambos os genótipos no tratamento com Al e aumentou apenas no genótipo Al-tolerante (NEO610). Já a expressão do gene *GmNADP-ME*, aumentou em ambos os genótipos no tratamento com Al, contudo os maiores aumentos foram observados no genótipo Al-sensível (Fig. 3).

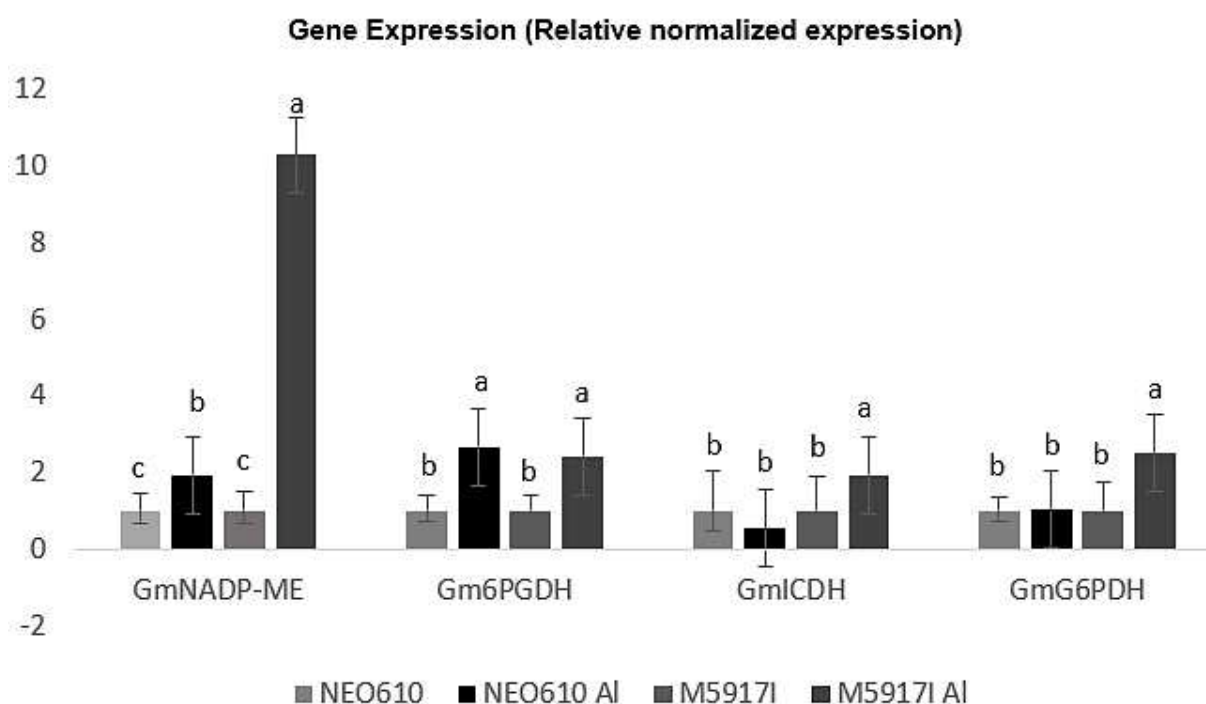


Figure 3: Gene expression NADP-dehydrogenases enzymes in roots of two soybean genotypes NEO610 and M5917I germinated in control treatment 0 mM Al (No Al) and 1,5 mM de $AlCl_3$ (Plus Al). Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGDH), Isocitrate dehydrogenase (ICDH), Malic dehydrogenase enzyme (NADP-ME). Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) among the treatments. Bars represent standard error.

3.3. Atividade das enzimas NADP-Desidrogenases

A atividade das enzimas desidrogenases, glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH), isocitrato desidrogenase (ICDH) e enzima málica desidrogenase (NADP-ME) aumentou nas raízes do genótipo NEO 610 após tratamento com Al, resultando nos maiores valores de atividade entre os genótipos (Fig. 4). No genótipo M5917I, apenas as enzimas 6PGDH e NADP-ME apresentaram aumento na atividade após tratamento com Al (Fig. 4. B, D).

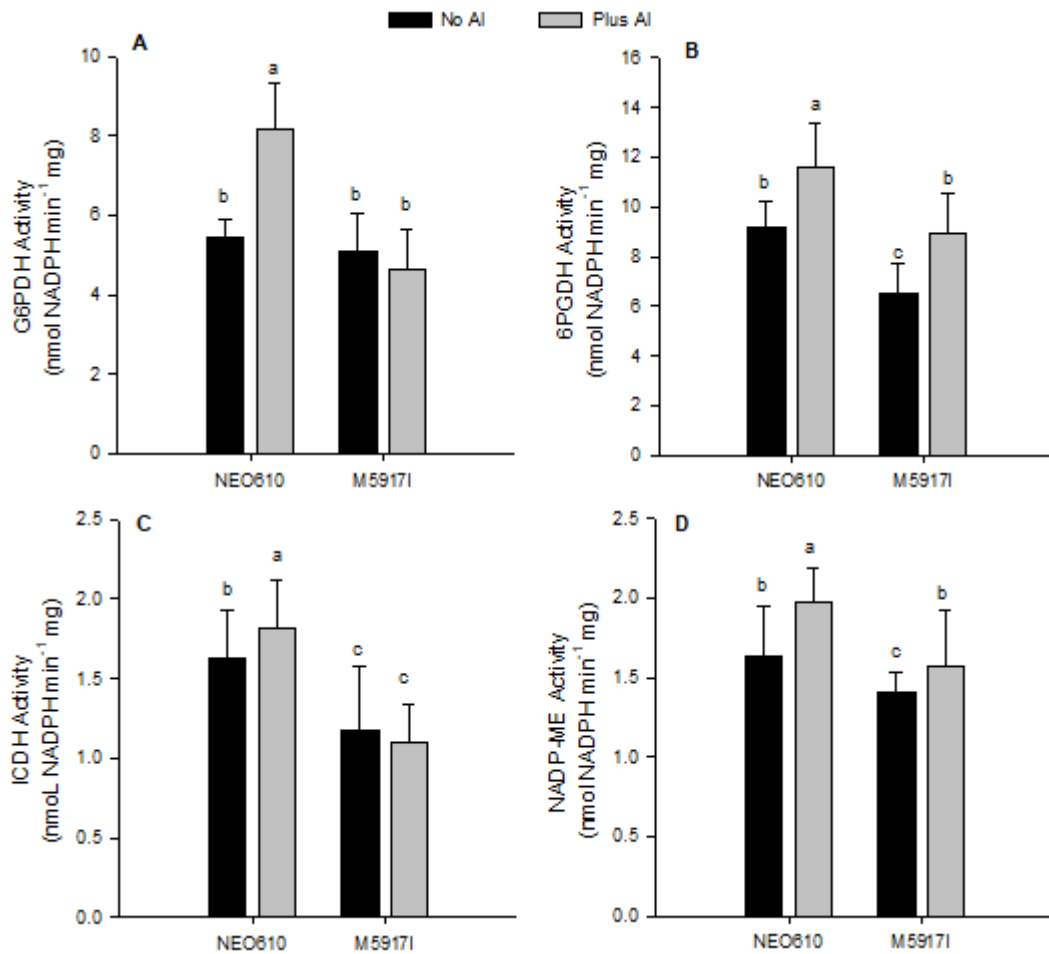


Figure 4: Activity NADP-dehydrogenases enzymes in roots of two soybean genotypes NEO610 and M5917I germinated in control treatment 0 mM Al (No Al) and 1,5 mM de AlCl₃ (Plus Al). **A:** Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH). **B:** 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGDH). **C:** Isocitrate dehydrogenase (ICDH) e **D:** Malic dehydrogenase enzyme (NADP-ME). Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) among the treatments. Bars represent standard error.

3.4. Conteúdo de NADP e NADPH

O conteúdo de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP⁺) reduziu em ambos os genótipos após exposição ao Al (Fig. 5 A). Já para o conteúdo da forma reduzida (NADPH), houve acréscimo apenas no genótipo NEO610 (Fig. 5 B) o que resultou em maior aumento na razão NADPH/NADP⁺ (Fig. 5 C).

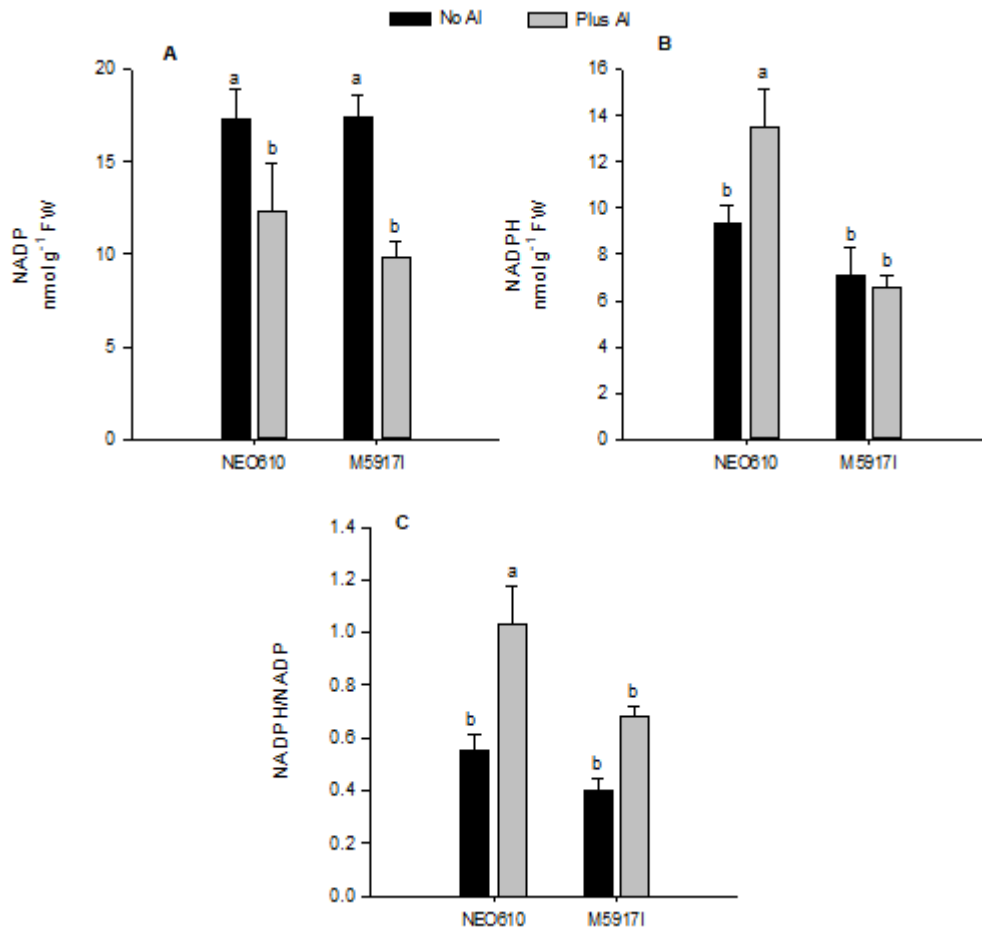


Figure 5: **A:** NADP content. **B:** NADPH content. **C:** NADPH/NADP ratio in roots of two soybean genotypes NEO610 and M5917I germinated in control treatment 0 mM Al (No Al) and 1,5 mM de AlCl₃ (Plus Al). Different letters indicate significant differences (p < 0.05) among the treatments. Bars represent standard error.

3.5. Atividade das Enzimas do Ciclo Ascorbato-Glutationa

A atividade das enzimas envolvidas diretamente com o metabolismo da glutaciona, como a glutaciona redutase (GR) e glutaciona peroxidase (GPX), não foi alterada pelo tratamento com Al e foi sempre maior no genótipo NEO610 (Fig. 6. A, B).

A atividade das enzimas envolvidas diretamente com o metabolismo do ascorbato, como a monodesidroascorbato redutase (MDHAR), desidroascorbato redutase (DHAR) e ascorbato peroxidase (APX) aumentou apenas nas raízes do genótipo NEO610 após tratamento com Al, e por outro lado reduziu no genótipo N5917I (Fig. 6. C, D, E).

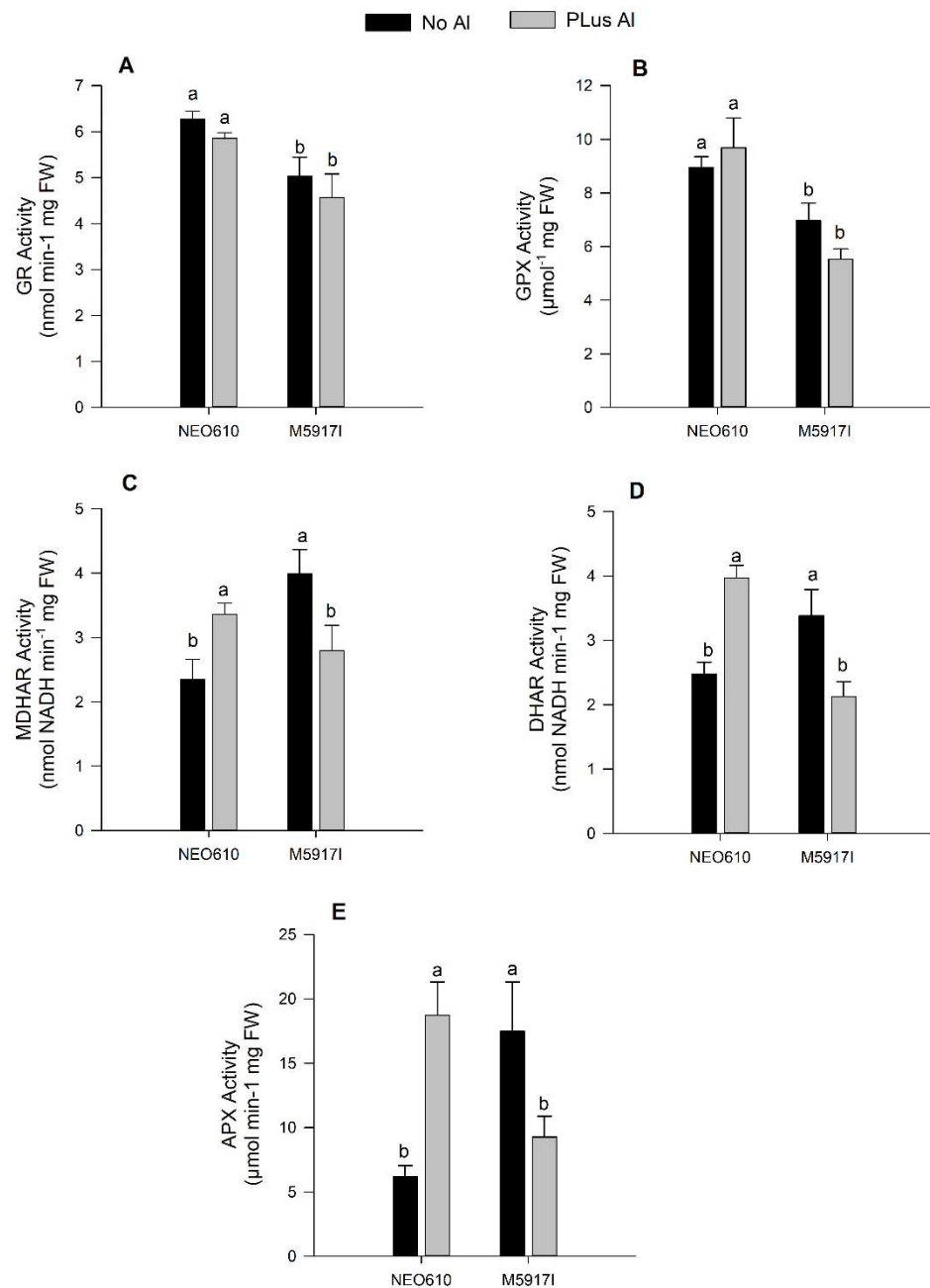


Figure 6: Enzymes activity of antioxidant system in roots of two soybean genotypes NEO610 and M5917I germinated in control treatment 0 mM Al (No Al) and 1,5 mM de AlCl₃ (Plus Al). **A:** glutathione reductase (GR), **B:** glutathione peroxidase (GPX), **C:** monodehydroascorbate reductase (MDHAR), **D:** dehydroascorbate reductase (DHAR) and **E:** ascorbate peroxidase (APX). Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) among the treatments. Bars represent standard error.

3.6. Conteúdo de metabólitos antioxidantes

A exposição ao Al alterou a concentração de ascorbato (AsA) apenas nas raízes do genótipo NEO610 (Fig. 7. A). Já para o teor de desidroascorbato (DHA), o Al resultou em um

efeito antagônico, aumentando a concentração de DHA no genótipo NEO610 e reduzindo no M5917I (Fig. 7. B). Assim, o teor de DHA foi 43% maior no genótipo NEO610. A razão AsA/DHA aumentou apenas nas raízes do genótipo M5917I após tratamento com Al, possivelmente pela redução no teor de DHA (Fig. 7. C).

O teor de glutathiona reduzida (GSH) aumentou apenas no genótipo NEO610 após tratamento com Al, com acréscimo de 48% (Fig 7. D). Por outro lado, o tratamento com Al reduziu o teor de glutathiona oxidada (GSSG) apenas no genótipo NEO610, com redução de 20% (Fig. 7. E). Ambos os genótipos apresentaram alterações na razão GSH/GSSG. O genótipo NEO610 apresentou a maior razão e o genótipo M5917I a menor razão (Fig. 7. F).

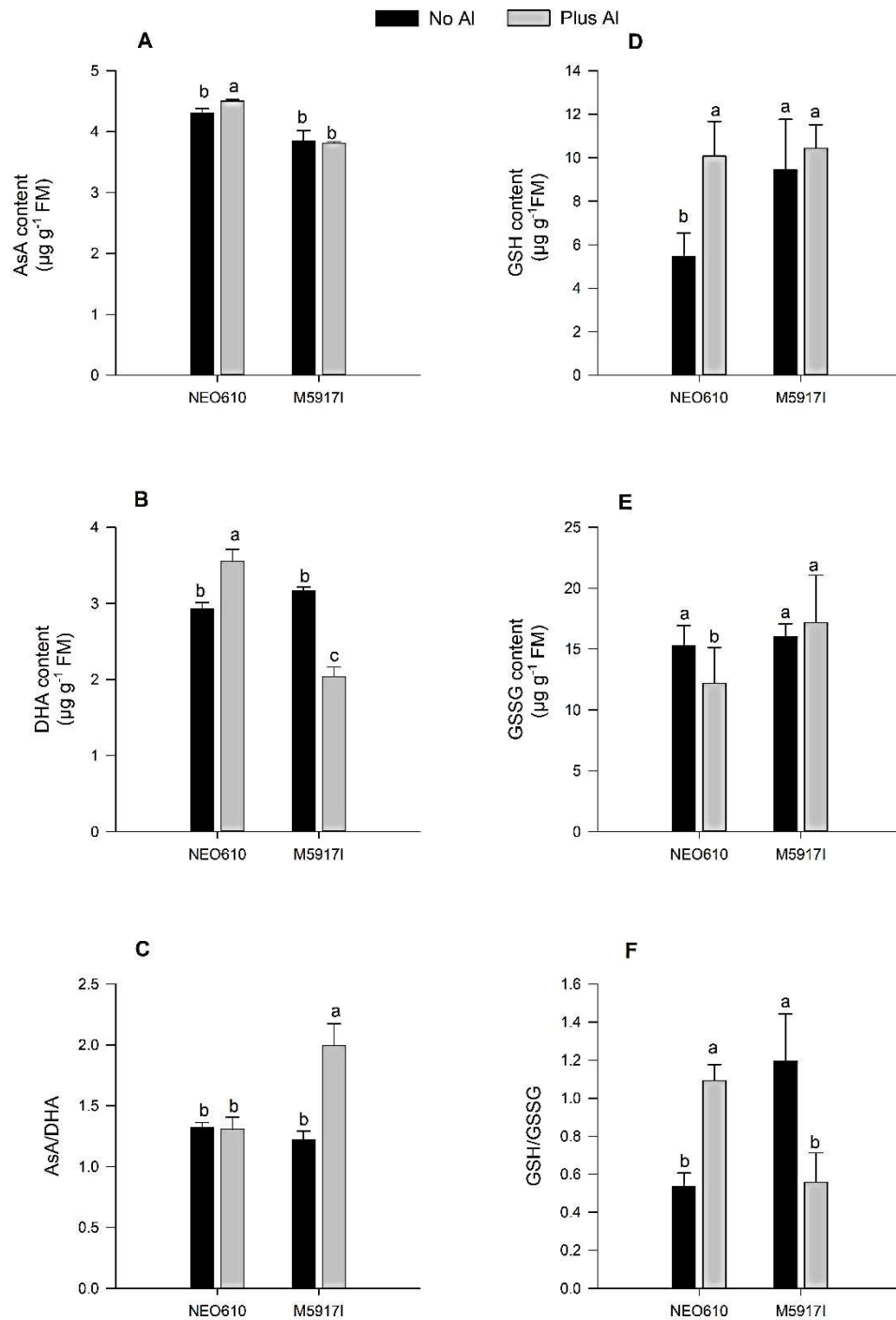


Figure 7: Ascorbate and glutathione metabolism in roots of two soybean genotypes NEO610 and M5917I germinated in control treatment 0 mM Al (No Al) and 1,5 mM de AlCl_3 (Plus Al). **A:** Ascorbate content (AsA), **B:** dehydroascorbate content (DHA), **C:** AsA/DHA ratio, **D:** reduced glutathione content (GSH), **E:** oxidized glutathione content (GSSG) and **F:** GSH/GSSG ratio. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) among the treatments. Bars represent standard error.

3.7. Danos oxidativos e acúmulo de H₂O₂

O teor de malondialdeído (MDA) aumentou apenas no genótipo M5917I após exposição ao Al, com aumento de 30% em relação ao controle (Fig. 8A). Na presença de Al houve aumento no teor de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) apenas nas raízes do genótipo M5917I, Al-sensível (Fig. 8B), o genótipo NEO610 manteve seus níveis de H₂O₂.

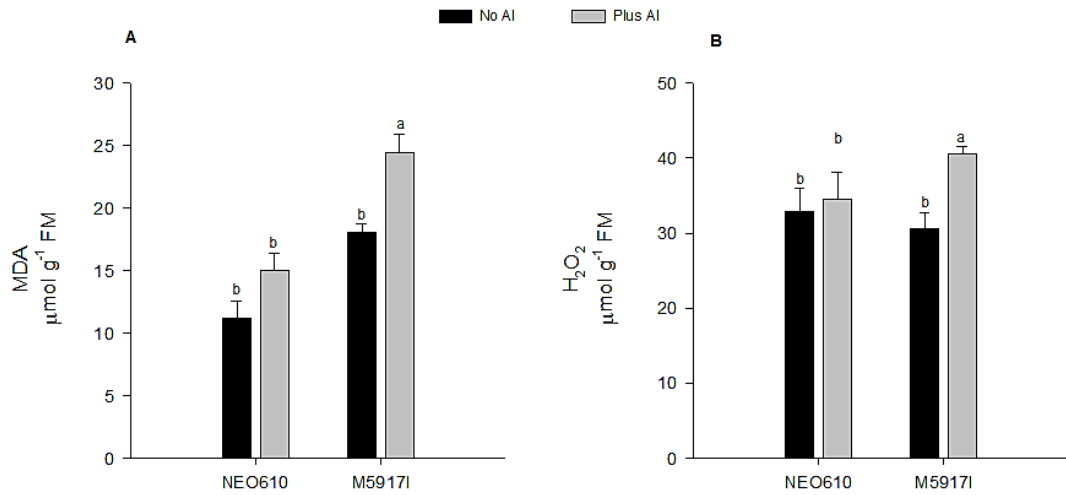


Figure 8: **A:** Maloaldehyde Content (MDA). **B:** Hyrogen peroxide content (H₂O₂) in roots of two soybean genotypes NEO610 and M5917I germinated in control treatment 0 mM Al (No Al) and 1,5 mM de AlCl₃ (Plus Al). Different letters indicate significant differences (p < 0.05) among the treatments. Bars represent standard error.

4. Discussão

As enzimas NADP-desidrogenases auxiliam nas respostas aos estresses em diferentes espécies de plantas, como arroz (*Oryza sativa*), trigo (*Triticum aestivum*) e soja (*Glycine max*) (Liu et al., 2013; Zhang et al., 2013; Yang et al., 2019b). Incrementos de suas atividades são relatados em situações de estresse, fornecendo intermediários e poder redutor na forma de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) para as diferentes vias biossintéticas (Wang et al. 2017; De Lillo et al., 2018; Chen et al., 2020), inclusive para o sistema de defesa antioxidante (Liu et al., 2010; Zhao et al., 2020). Assim, o aumento da capacidade de defesa antioxidante da planta pode resultar em tolerância ao agente estressor, como por exemplo o alumínio (Sunt et al., 2014). No presente trabalho, observamos para o genótipo de soja NEO610 (Al-tolerante), uma relação entre o aumento na expressão e na atividade das enzimas NADP-desidrogenases (Figs. 3 e 4) e o aumento na atividade dos componentes que constituem o sistema de defesa do Ciclo Ascorbato-Glutationa (Figs. 6, 7, 9), resultando em menores danos oxidativos (Fig. 8) e conseqüentemente um melhor desenvolvimento da planta frente ao estresse (Figs. 1 e 2).

A atividade das enzimas desidrogenases aumentou, principalmente no genótipo NEO610 após exposição ao Al (Fig. 4). Uma dessas enzimas é a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) (Fig. 4. A), sendo a primeira enzima da via das pentoses fosfatadas, importante na produção de NADPH que pode contribuir para a adaptação a situações de estresse em plantas (Yang et al., 2019bc). Para outros agentes estressores, a atividade da G6PDH também aumentou após exposição ao NaCl, NaHCO₃, PEG e manitol (Yang et al., 2019 b). Também é relatado que cultivares de soja tolerantes a seca demonstraram maior atividade da G6PDH quando comparadas com cultivares sensíveis (Liu et al., 2013; Wang et al., 2016). Em nosso trabalho, o aumento da atividade de G6PDH na presença do metal pode contribuir para fornecer poder redutor na forma de NADPH (Fig. 5. B), para as vias metabólicas e contribuir com a tolerância ao alumínio. Já a expressão gênica desta enzima alterou após tratamento com Al no genótipo sensível, M5917I (Fig. 3). A atividade total da G6PDH é a resultante da atividade de suas várias isoformas. Contudo, no presente trabalho a análise da expressão foi realizada com apenas uma isoforma, a *GmG6PDH* (LOC100806107-Glyma.19G077300). Os principais relatos do aumento da expressão de *GmG6PDH* foram em condições salinas, contribuindo para o combate ao estresse salino (Yang et al., 2019b; Zhao et al., 2020). Zhao et al. (2020) observaram que plantas transgênicas de soja com alta atividade de G6PDH apresentaram aumento da tolerância ao estresse salino, com aumento no comprimento e no peso fresco da raiz e baixo dano oxidativo, sugerindo que a superexpressão

do gene *GmG6PDH* alivie o acúmulo de ROS e, conseqüentemente, minimize os danos na membrana.

A enzima 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH), presente também na via das pentoses fosfatadas, apresentou resultado similar a enzima G6PDH para o genótipo NE610 (Fig. 4B) e aumento em sua expressão (Fig. 3). O aumento na atividade da 6PGDH em alfafa induzido por Al se mostrou eficiente para a regulação da via das pentoses (Fan et. al., 2010). Em plantas transgênicas de soja, foi encontrado que o gene *Gm6PGDH* está envolvido no desenvolvimento do sistema radicular e na maior eficiência do sistema antioxidante enzimático, contribuindo para o combate ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio e menores danos oxidativos (Li et. al., 2021). Além disso, o aumento na atividade da 6PGDH em situações de estresse abiótico, pode fornecer intermediários como açúcares e aminoácidos para as plantas (Fan et. al., 2011; Kaur e Asthir, 2015).

Outra importante enzima desidrogenase é a isocitrato desidrogenase (ICDH), que semelhantes as enzimas G6PDH e 6PGDH apresentou aumento na sua atividade após tratamento com Al para o genótipo NEO610 (Fig. 4C). Houve também aumento em sua expressão neste mesmo genótipo na presença do agente estressante (Fig. 3). A ICDH é uma enzima do Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (TCA) que possui isoformas cloroplastídicas, citosólicas e mitocondriais, e sua forma citosólica está envolvida no fornecimento de poder redutor para as reações do *status redox* (Niazi et. al., 2019). É relatado que a atividade da NADP-ICDH é maior em situação de estresse oxidativo induzido por salinidade (Leterrier et. al., 2012), e sua atividade pode contribuir para a manutenção dos níveis de NADPH quando plantas de *Arabidopsis* são submetidas ao ataque de patógenos (Mhamdi et. al. 2010). Nosso resultado indica que o aumento da expressão seguido de aumento na atividade da ICDH pode ser um eficiente mecanismo de combate ao estresse causado pelo Al, além de uma importante fonte fornecedora de NADPH, e, portanto, crucial para o balanço redox vegetal.

A enzima málica NADP-dependente (NADP-ME) apresentou aumento na sua atividade e expressão nas raízes de ambos os genótipos, NEO610 e M5917I, quando na presença do alumínio (Figs 3 e 4D). A enzima NADP-ME está envolvida na defesa das plantas, fornecendo poder redutor e energia para as vias biossintéticas e manutenção do balanço redox através do Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (Sun et. al., 2019; Begara-Morales et. al., 2019). A superexpressão de NADP-ME em *Arabidopsis* aumentou a resistência a estresses abióticos, como NaCl, NaHCO₃, manitol e H₂O₂ (Zhou et. al., 2012), e em folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) a atividade da NADP-ME aumentou em resposta a seca (Doubnerová-Hısková et al., 2014).

O aumento na expressão e na atividade das enzimas desidrogenases (Figs. 3 e 4) resultou em acréscimo no teor de NADPH e conseqüentemente na razão NADPH/NADP, principalmente nas raízes do genótipo NEO610 após tratamento com Al (Fig. 5). As principais enzimas produtoras de NADPH no metabolismo vegetal são G6PDH e 6PGDH (Yang et. al, 2019bc). Em nosso trabalho observamos aumento na atividade de ambas enzimas na presença da Al (Fig. 4A e B), evidenciando que as desidrogenases podem contribuir com o fornecimento de NADPH para a planta em situações de estresse. Já para o conteúdo de NADP⁺ houve decréscimo em ambas as cultivares na presença do metal (Fig. 5A). Por outro lado, a razão NADPH/NADP⁺ aumentou no genótipo NEO610 com valores próximos a 1 (Fig.5.C). Assim mesmo em condições de estresse esse genótipo consegue manter o suprimento de poder redutor necessário para suas reações metabólicas. Portanto, o Al pode modular os níveis desse poder redutor entre as formas oxidada e reduzida, mantendo maiores conteúdos de NADPH em genótipos Al-tolerantes para serem utilizados em rotas de defesa.

Além da regulação no nível transcricional, a regulação redox e a razão NADPH/NADP⁺ celular modulam a atividade das diferentes isoformas de G6PDH (Zhao et. al., 2020), além da inibição pela competição com NADPH (Esposito, 2016). Em nossos resultados, observamos que o aumento na expressão e na atividade das NADP-desidrogenases foi acompanhado do aumento do conteúdo de NADPH no genótipo Al-tolerante com uma razão NADPH/NADP próxima a 1 (Fig. 5C), além de um melhor sistema antioxidante. Dessa forma, a atividade das enzimas desidrogenases foi suficiente para fornecer os equivalentes redutores para o sistema antioxidante, no qual o equilíbrio da razão NADPH/NADP não inibiu a atividade das NADP-desidrogenases, resultando em teores ótimos de metabólitos para a manutenção da homeostase celular e do balanço redox.

As NADP-desidrogenases geram poder redutor na forma de NADPH que é um substrato essencial para importantes rotas metabólicas, como por exemplo os sistemas de defesa antioxidante enzimático e não enzimático, como por exemplo o Ciclo Ascorbato-Glutationa (AsA-GSH) (Corpas e Barroso, 2014; Wang et. al., 2016). O maior conteúdo de NADPH em raízes do genótipo NEO610 (Fig. 5B) pode ter contribuído para uma melhor eficiência do Ciclo AsA-GSH frente ao estresse por Al (Figs. 6 e 7). Nesse genótipo foram observados aumentos nas atividades das enzimas APX, MDHAR e DHAR além de maiores atividades das enzimas GR e GPX (Fig. 7). Conseqüentemente, a regeneração das formas reduzidas do ascorbato (AsA) e da glutationa (GSH) foram mais eficientes, resultando em acréscimo nos teores desses metabólitos na presença de Al (Fig. 7A, D). No Ciclo AsA-GSH, o metabolismo do ascorbato é direcionado pela atividade de três enzimas, APX, MDHAR e

DHAR (Sousa et. al., 2016). As enzimas MDHAR (Fig. 6C) e DHAR (Fig. 6D), estão diretamente envolvidas com a regeneração do ascorbato em sua forma reduzida (AsA) (Hasanuzzaman et. al., 2019). A atividade da MDHAR necessita diretamente do poder redutor do NADPH para converter DHA a AsA (Sun et. al., 2014; Zhou et. al., 2020). Assim, o aumento no teor de NADPH (Fig. 5B) gerado pelas maiores atividades das desidrogenases (Fig. 4) pode ter contribuído para a ativação dessa rota no genótipo NEO610, podendo ser comprovado pelo acréscimo no teor de AsA (Fig. 7A). Adicionalmente, a enzima DHAR converte desidroascorbato em AsA utilizando o poder redutor da molécula de GSH, e o aumento de sua atividade é relatada como um mecanismo de tolerância ao Al (Sun et. al., 2014). Uma das vias para a formação da molécula de GSH é a reação catalisada pela enzima GR (Gill et. al., 2013). Para isso, a enzima GR utiliza como substrato da reação as moléculas de glutathiona oxidada (GSSG) e de NADPH (Hasanuzzaman et. al., 2019). Portanto, os maiores teores de GSH encontrados nas raízes do genótipo NEO610 após tratamento com Al (Fig. 7D) está relacionado as maiores atividades da enzima GR (Fig. 6. A) e, concomitantemente com os maiores teores de NADPH gerado pelas desidrogenases (Fig. 5B).

Concomitante a atividade das enzimas envolvidas com a regeneração da GSH e do AsA, estão as enzimas consumidoras desses metabolitos como a GPX e a APX, respectivamente (Sun et. al., 2014). Para o genótipo NEO610, a APX apresentou aumento na atividade após tratamento com Al (Fig. 6E) e a GPX manteve sua atividade, contudo com valor superior ao do genótipo sensível (Fig. 6B). Ambas as enzimas estão envolvidas no consumo de espécies reativas de oxigênio, eliminando H_2O_2 do metabolismo celular (Wang et. al, 2008a; Zhou et. al., 2021). A maior regeneração dos metabolitos AsA e GSH pelo genótipo NEO610 (Fig. 7A, D), que são substratos das enzimas APX e GPX (Fig. 6E, B), respectivamente, permitiu atividades elevadas dessas enzimas, o que resultou em manutenção nos teores de H_2O_2 e na taxa da peroxidação lipídica (Fig. 8). Por outro lado, no genótipo M5917I a baixa atividade das enzimas APX e GPX resultou em acréscimos nos teores de H_2O_2 e na peroxidação lipídica (Fig. 8). Assim, nossos resultados indicam que o metabolismo de ascorbato e de glutathiona atuam na prevenção a danos oxidativos causados pelo Al em genótipos de soja Al-tolerante.

No genótipo M5917I a falta de um sistema de defesa eficiente resultou em danos oxidativos (Fig. 8) e no menor crescimento radicular (Figs. 1 e 2). Por outro lado, essa resposta não foi observada no genótipo NEO610, o qual manteve o crescimento radicular mesmo na presença de Al. Assim, mudanças fisiológicas, bioquímicas e moleculares neste genótipo decorrentes de um sistema antioxidante e bioquímico mais eficiente, garantem que

mesmo na presença de Al o genótipo Al-tolerante consegue manter uma boa performance frente ao estresse.

5. Conclusão

Nossos resultados sugerem que o aumento na expressão e na atividade das enzimas NADP-desidrogenases (G6PDH, 6PGDH, ICDH e NADP-ME) contribuiu para a tolerância do genótipo de soja NEO610 ao Al, através do fornecimento de equivalentes redutores na forma de NAD(P)H para os componentes do Ciclo Ascorbato-Glutationa, resultando em menores danos oxidativos e melhor desenvolvimento desse genótipo frente a esse metal.

Nosso estudo traz a elucidação da conexão de vias bioquímicas na tolerância e um possível mecanismo de tolerância ao alumínio na soja, no entanto são precisos mais estudos em outros diferentes estádios de desenvolvimento para compreender ainda mais esses mecanismos. Além do mais fornece novos resultados que contribuem cientificamente para programas de melhoramento da soja na tolerância ao alumínio auxiliando desse modo no desenvolvimento de cultivares tolerantes a esse metal.

Referências

- Babayev, H., et al. 2014. The study of NAD-malic enzyme in *Amaranthus cruentus* L. under drought, **Plant Physiology and Biochemistry**. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.12.022>
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** 72: 248–254
- Canteri, M. G.; Althaus, R. A.; Virgens Filho, J. S.; Giglioti, E. A. e Godoy, C. V. 2001. SASM - Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott - Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v.1, n.2, p.18-24.
- Chen, L.; Kuai, P.; Ye, M.; Zhou, S.; Lu, J. and Lou, Y. Overexpression of a Cytosolic 6-Phosphogluconate Dehydrogenase Gene Enhances the Resistance of Rice to *Nilaparvata lugens*. **Plants (Basel)**. 2020 Nov 10;9(11):1529. doi: 10.3390/plants9111529.
- Chen, Q.; Wang, B.; Ding, H.; Zhang, J.; Li, S. 2019. The role of NADP-malic enzyme in plants under stress. **Plant Science**.
- Corpas, F. J. and Barroso, B. B. NADPH-generating dehydrogenases: their role in the mechanism of protection against nitro-oxidative stress induced by adverse environmental conditions. **Frontiers Environmental Science**, December. 2014. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00055>
- Crespo-Mendes, N., Laurent, A. and Hauschild, M. Z. 2018. Effect factors of terrestrial acidification in Brazil for use in Life Cycle Impact Assessment. **The International Journal of Life Cycle Assessment**. doi:10.1007/s11367-018-1560-7
- De Lillo, A.; Cardi, M.; Landi, S. and Esposito, S. Mechanism(s) of action of heavy metals to investigate the regulation of plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Scientific Reports**, 2018. DOI:10.1038/s41598-018-31348-y
- Dghim, A. A., Mhamdi, A., Vaultier, M. N., Hasenfratz-Sauder, M. P., Le Thiec, D., Dizengremel, P., et al. (2013). Analysis of cytosolic isocitrate dehydrogenase and glutathione reductase 1 in photoperiod-influenced responses to ozone using *Arabidopsis* knockout mutants. **Plant Cell Environ**. 36, 1981–1991. doi: 10.1111/pce.12104
- Doubnerová-Hísková, V., Miedzińska, L., Dobrá, J., Vankova, R., and Ryšlavá, H. (2014). Phosphoenolpyruvate carboxylase, NADP-malic enzyme, and pyruvate, phosphate dikinase

- are involved in the acclimation of *Nicotiana tabacum* L. to drought stress. **J. Plant Physiol.** 171, 19–25. doi: 10.1016/j.jplph.2013. 10.017
- Fan, F.; Li, X. W.; Wu, Y. M.; Xia, Z. S.; Li, J. J.; Zhu, W. and Liu, J. X. Differential expression of expressed sequence tags in alfalfa roots under aluminum stress. *Acta Physiologiae Plant*, vol. 33, p. 539–546, 2011. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0577-8>
- Gill, S. S. and Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, vol. 48, p. 909-- 930. doi:10.1016/j.plaphy.2010.08.016
- Griffith, O. W. (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. **Anal Biochem** 106: 207–12
- Hasanuzzaman, M.; Bhuyan, M. H. M. B.; Zulfiqar, F.; Raza, A.; Mohsin, S. M.; Mahmud, J. A.; Fujita, M.; Fotopoulos, V. 2020. Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants under Abiotic Stress: Revisiting the Crucial Role of a Universal Defense Regulator. **Antioxidants**, 9, 681. <https://doi.org/10.3390/antiox9080681>
- Heath, R. L. and Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Arch Biochem Biophys** 125: 189–198
- Inostroza-Blancheteau, C.; Rengel, Z.; Alberdi, M.; de LA Luz Mora, M.; Aquea, F.; Arce-Johnson, P. and Reyes-Díaz, M. Molecular and physiological strategies to increase aluminum resistance in plants. **Mol Biol Rep**, vol. 39, p. 2069–2079, 2012. Doi: 10.1007/s11033-011-0954-4
- Kaur, G. and Asthir, B. Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. **Biologia Plantarum**, vol. 59, n.4, p. 609-619, 2015. DOI: 10.1007/s10535-015-0549-3
- Keunen, E.; Remans, T.; Bohler, S.; Vangronsveld, J. and Cuypers, A. Metal-Induced Oxidative Stress and Plant Mitochondria. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 12, p. 6894-6918, 2011. doi:10.3390/ijms12106894
- Kochian, L. V.; Piñeros, M. A.; Liu, J. and Magalhaes, J. V. Plant Adaptation to Acid Soils: The Molecular Basis for Crop Aluminum Resistance. **Annual Review of Plant Biology**, 2015
- Leterrier, M.; Barroso, J. B.; Valderrama, R.; Palma, J. M. and Corpas, F. J. NADP-dependent isocitrate dehydrogenase from *Arabidopsis* roots contributes in the mechanism of defence against the nitro-oxidative stress induced by salinity. **Scientific World Journal**. 2012; 2012:694740. doi:10.1100/2012/694740

- Liu, J., Wang, X., Hu, Y., Hu, W., and Bi, Y. (2013). Glucose-6-phosphate dehydrogenase plays a pivotal role in tolerance to drought stress in soybean roots. **Plant Cell Rep.** 32, 415–429. doi: 10.1007/s00299-012-1374-1
- Liu, J.; Wang, X.; Hu, Y.; Hu, W. and Bi, Y. Glucose-6-phosphate dehydrogenase plays a pivotal role in tolerance to drought stress in soybean roots. **Plant Cell Reports**, vol. 32, p. 415–429, 2013. DOI 10.1007/s00299-012-1374
- Liu, Y.; Shi, Y.; Song, Y.; Wang, T. and Li, Y. Characterization of a Stress-induced NADP-isocitrate Dehydrogenase Gene in Maize Confers Salt Tolerance in Arabidopsis. **Journal Plant Biololy**, vol. 53, p. 53-107, 2010. DOI 10.1007/s12374-009-9091-1
- Ma, B.; Gao, L.; Zhang, H.; Cui, J. and Shen, Z. Aluminum-induced oxidative stress and changes in antioxidant defenses in the roots of rice varieties differing in Al tolerance. **Plant Cell Reports**, 31, p. 687–696, 2012. DOI 10.1007/s00299-011-1187-7
- Mhamdi, A., Mauve, C., Gouia, H., Saindrenan, P., Hodges, M., and Noctor, G. (2010). Cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase contributes to redox homeostasis and the regulation of pathogen responses in Arabidopsis leaves. **Plant Cell Environ.** 33, 1112–1123. doi: 10.1111/j.1365- 3040.2010.02133.x
- Muñoz-Vargas, M. A.; González- Gordo, S.; Palma, J. M. and Corpas, F. J. 2020. Inhibition of NADP-malic enzyme activity by H₂S and NO in Sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) fruits. **Physiologia Plantarum**, 168, p. 278–288. doi:10.1111/ppl.13000
- Nunes-Nesi, A. Brito, D.S, Inostroza- Blancheteau, C. Fernie, A.R, Araújo, W.L. (2014) The complex role of mitochondrial metabolism in plant aluminum resistance. **Trends Plant Sci** 19:399-407.
- Sade, H.; Meriga, B.; Surapu, V.; Gadi, J.; Sunita, M. S. L.; Suravajhala, P. and Kishor, P. B. K. Toxicity and tolerance of aluminum in plants: tailoring plants to suit to acid soils. **Biometals**, 2016. DOI 10.1007/s10534-016-9910-z
- Sharma,P.; Jha, A. B.; Dubey, R. S. and Mohammad Pessaraki. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany**, 2012. doi:10.1155/2012/217037
- Simões, C. C.; Melo, J. O.; Magalhães, J. V. and Guimarães, C. T. Genetic and molecular mechanisms of aluminum tolerance in plants. **Genetics and Molecular Research**, vol. 11, n. 3, p. 1949-1957, 2012.
- Slaski, J. J.; Archambault, D. J. and Taylor, G, J. 1996b. Aluminum-induced alterations in lipid composition of microsomal membranes from an aluminum-resistant and an aluminum-sensitive cultivar of *Triticum aestivum*. **Physiology Plant**, vol. 96, p. 683-691

- Slaski, J. J.; Zhang, G.; Basu, U.; Stephens, J. L. and Taylor, G. J. 1996a. Aluminum resistance in wheat (*Triticum aestivum*) is associated with rapid, Al-induced changes in activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in root apices. **Physiologia Plantarum**, vol. 98, p.477-484.
- Sofo, A.; Scopa, A.; Nuzzaci, M. and Vitti, A. Ascorbate Peroxidase and Catalase Activities and Their Genetic Regulation in Plants Subjected to Drought and Salinity Stresses. (2015). **International Journal of Molecular Sciences**. Doi: 13561-13578; doi:10.3390/ijms160613561
- Sun, C.; L.; Yu, Y.; Liu, W.; Lu, L.; Jin, C. and Lin, X. 2014. Nitric oxide alleviates aluminum-induced oxidative damage through regulating the ascorbate glutathione cycle in roots of wheat. **Journal of Integrative Plant Biology**, vol. 57, n. 6, p. 550–561.
- Voll, L.M.; Zell, M.B.; Engelsdorf, T.; Saur, A.; Wheeler, M.G.; Drincovich, M.F.; Weber, A.P.M.; Maurino, V.G. Loss of cytosolic NADP-malic enzyme 2 in *Arabidopsis thaliana* is associated with enhanced susceptibility to *Colletotrichum higginsianum*. **New Phytologist**. 2012, 195, 189–202.
- Wang, H.; Hou, J.; Li, Y.; Zhang, Y.; Huang, J. and Liang, W. Nitric oxide-mediated cytosolic glucose-6-phosphate dehydrogenase is involved in aluminum toxicity of soybean under high aluminum concentration. **Plant Soil**, vol. 52, p. 416-439, 2017. DOI 10.1007/s11104-017-3197-x
- Wang, H.; Hou, J.; Li, Y.; Zhang, Y.; Huang, J. and Liang, W. Nitric oxide-mediated cytosolic glucose-6-phosphate dehydrogenase is involved in aluminum toxicity of soybean under high aluminum concentration. **Plant Soil**, vol. 52, p. 416-439, 2017. DOI 10.1007/s11104-017-3197-x
- Wang, X.; Ma, Y.; Huang, C.; Li, J.; Wan, Q. and Bi, Y. 2008b. Involvement of glucose-6-phosphate dehydrogenase in reduced glutathione maintenance and hydrogen peroxide signal under salt stress. **Plant Signaling e Behavior**, vol. 3, n. 6, p. 394-395.
- Wang, X.; Ma, Y.; Huang, C.; Wan, Q.; Li, N. and Bi, Y. 2008a. Glucose-6-phosphate dehydrogenase plays a central role in modulating reduced glutathione levels in reed callus under salt stress. **Planta**, 227, 611–623. doi.org/10.1007/s00425-007-0643-7
- Yang, J. L.; Fan, W. and Zheng, S. J. 2019a. Mechanisms and regulation of aluminum-induced secretion of organic acid anions from plant roots. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)**, vol. 20, p. 513-527.

- Yang, L. T.; Jianga, H. X.; Tanga, N. and Chen, L. S. Mechanisms of aluminum-tolerance in two species of citrus: Secretion of organic acid anions and immobilization of aluminum by phosphorus in roots. **Plant Science**, vol. 180, p. 521–530, 2011.
- Yang, L., Wang, S., Sun, L., Ruan, M., Li, S., He, R., et al. (2019c). Involvement of G6PD5 in ABA response during seed germination and root growth in *Arabidopsis*. **BMC Plant Biol.** 19:44. doi: 10.1186/s12870-019-1647-8
- Yang, L., Wang, X., Chang, N., Nan, W., Wang, S., Ruan, M., et al. (2019b). Cytosolic glucose-6-phosphate dehydrogenase is involved in seed germination and root growth under salinity in *Arabidopsis*. **Front. Plant Sci.** 10:182. doi: 10.3389/fpls.2019.00182
- Zhang, L., Liu, J., Wang, X., and Bi, Y. (2013). Glucose-6-phosphate dehydrogenase acts as a regulator of cell redox balance in rice suspension cells under salt stress. **Plant Growth Regul.** 69, 139–148. doi: 10.1007/s10725-012-9757-4
- Zhang, X.; Long, Y.; Huang, J. and Xia, J. Molecular Mechanisms for Coping with Al Toxicity in Plants. **International Journal Molecular of Sciences**, 2019. Doi: 10.3390/ijms20071551
- Zhang, Y.; Krahnert, I.; Bolze, A.; Gibos, Y. and Fernie, A. R. 2020. Adenine Nucleotide and Nicotinamide Adenine Dinucleotide Measurements in Plants. **Current Protocols in Plant Biology**. doi.org/10.1002/cppb.20115
- Zhao, Y.; Cui, Y.; Huang, S.; Yu, J.; Wang, X.; Xin, D.; Li, X.; Liu, Y.; Dai, Y.; Qi, Z. and Chen Q (2020) Genome-Wide Analysis of the Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Family in Soybean and Functional Identification of GmG6PDH2 Involvement in Salt Stress. **Front. Plant Sci.** 11:214. doi: 10.3389/fpls.2020.00214
- Zhou H, Liu SK, Yang CP. (2012). Over-expression of a NAD-Malic enzyme gene from rice in *Arabidopsis thaliana* confers tolerances to several abiotic stresses. **Adv Mater Res.** P. 393:863–866.
- Zhou, F.; Zheng, B.; Wang, F.; Cao, A.; Xie, S.; Chen, X.; Schick, J.A.; Jin, X.; Li, H. Genome-Wide Analysis of MDHAR Gene Family in Four Cotton Species Provides Insights into Fiber Development via Regulating AsA Redox Homeostasis. 2021. **Plants**, 10, 227. [https:// doi.org/10.3390/plants10020227](https://doi.org/10.3390/plants10020227)