

**JEFFERSON BARBOSA DA SILVA**

**ASPECTOS MORFOANATÔMICOS, FISIOLÓGICOS E MOLECULARES  
ASSOCIADOS À TOLERÂNCIA DIFERENCIAL AO ALUMÍNIO EM LINHAGENS  
DE MILHO (*Zea mays* L.)**

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

Orientador: Wagner L. Araújo

Coorientadora: Auxiliadora Oliveira Martins

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2022**

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

T

S586a  
2022  
Silva, Jefferson Barbosa da, 1997-  
Aspectos morfoanatômicos, fisiológicos e moleculares  
associados à tolerância diferencial ao alumínio em linhagens de  
milho (*Zea mays* L.) / Jefferson Barbosa da Silva. – Viçosa, MG,  
2022.

1 dissertação eletrônica (50 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndices.

Orientador: Wagner Luiz Araújo.

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

Referências bibliográficas: f. 39-46.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.582>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Indução enzimática. 2. Milho - Melhoramento genético.  
3. Plantas - Efeito do alumínio. I. Araújo, Wagner Luiz, 1980-.  
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia  
Vegetal. Programa de Pós-Graduação em Botânica. III. Título.

CDD 22. ed. 572.74

Bibliotecário(a) responsável: Euzébio Luiz Pinto CRB-6/3317

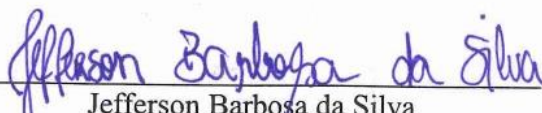
**JEFFERSON BARBOSA DA SILVA**

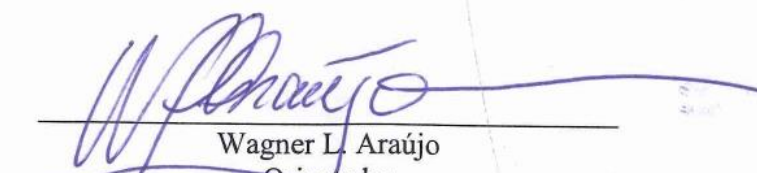
**ASPECTOS MORFOANATÔMICOS, FISIOLÓGICOS E MOLECULARES  
ASSOCIADOS À TOLERÂNCIA DIFERENCIAL AO ALUMÍNIO EM LINHAGENS  
DE MILHO (*Zea mays* L.)**

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

APROVADA: 24 de agosto de 2022

Assentimento:

  
Jefferson Barbosa da Silva  
Autor

  
Wagner L. Araújo  
Orientador

## AGRADECIMENTOS

Esta fase da minha vida é muito especial e não posso deixar de agradecer primeiramente a Deus por toda força, ânimo e coragem que me ofereceu para ter alcançado minha meta e conduzido ao sucesso.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação. quero deixar uma palavra de gratidão por ter me recebido de braços abertos e com todas as condições que me proporcionaram dias de aprendizagem muito ricos.

À minha mãe (*in memoriam*), que infelizmente não pode estar presente neste momento tão feliz da minha vida, mas que não poderia deixar de dedicar a ela, pois se hoje estou aqui, devo muitas coisas a ela e por seus ensinamentos e valores passados. Obrigado por tudo! Saudades eternas!

À minha vó, que não descansou na torcida, e que certamente orou dias e noites para que Deus estivesse sempre comigo. À minha madrinha e ao meu padrinho, que sempre estiveram ao meu lado nas minhas escolhas, apoiando-me e incentivando-me a ser sempre melhor. Aos primos e tias que sempre me incentivaram a não desistir sempre de alçar novos voos.

Aos muitos colegas e amigos que conheci na UFV/UCP, foi muito bom passar um pouco do meu tempo ao lado de pessoas como vocês. Muito obrigado.

Ao meu orientador, Wagner Araújo, pela paciência, confiança, força, e apoio sempre. Obrigado por ter contribuído com mais essa minha conquista. E à minha coorientadora, AuxiliaDora, por todos os puxões de orelha, e ensinamentos, principalmente na hora do cafezinho.

É difícil agradecer todas as pessoas que de algum modo, nos momentos serenos e ou apreensivos, fizeram ou fazem parte da minha vida, por isso primeiramente agradeço a todos de coração. Obrigado a todos que, mesmo não estando citados aqui, tanto contribuíram para a conclusão desta etapa e para o Jefferson que sou hoje.

Agradeço também a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos. O presente trabalho foi realizado com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

## RESUMO

DASILVA, Jefferson Barbosa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2022. **Aspectos morfoanatômicos, fisiológicos e moleculares associados à tolerância diferencial ao alumínio em linhagens de milho (*Zea mays* L.)**. Orientador: Wagner L. Araújo. Coorientadora: Auxiliadora Oliveira Martins.

Solos pertencentes a zonas tropicais são frequentemente acometidos de estresses múltiplos, destacando-se a acidez do solo. Cerca de 30% dos solos no mundo manifestam problemas de cultivo de plantas relacionados a toxidez instigada pelo alumínio ( $Al^{3+}$ ). As plantas possuem mecanismos defensivos e utilizam uma variedade de estratégias bioquímicas para evitar danos causados pelas espécies reativas de oxigênio (EROs). As enzimas envolvidas no metabolismo intermediário também são alteradas pelo teor tóxico de Al. As atividades dessas enzimas estão, direta ou indiretamente, envolvidas no ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Neste estudo, foram utilizados cinco genótipos derivados dos genótipos com tolerância intermediária ao Al (L3) e sensível (L53) com expressão diferencial do gene *MATE*, que culmina com tolerância diferencial ao Al nesses genótipos. De modo geral, na ausência de estresse os genótipos foram bastante similares, mas em presença de  $Al^{3+}$  maior conteúdo de malondialdeído (MDA) foi observado no genótipo tolerante L3TT e no genótipo sensível L53, com pequena diferença entre os demais genótipos em resposta ao estresse por  $Al^{3+}$ . Os genótipos tolerantes (L3, L3MATE e L3TT) apresentaram aumento na atividade das enzimas antioxidantes em resposta ao estresse por  $Al^{3+}$  destacando-se o genótipo L3, que apresentou uma atividade até três vezes superior quando comparado ao seu controle. Após a exposição ao  $Al^{3+}$  por 24h, a atividade da piruvato desidrogenase (PDH) é aumentada, independente do genótipo, em relação à condição controle. Na ausência de  $Al^{3+}$ , os genótipos apresentam comportamento similar, com a maior proporção de células 2C poliploides (4C) nos meristemas apicais. Os genes *ZmMATE3* e *ZmMATE6* tiveram sua expressão positivamente regulada em plantas dos genótipos tolerantes (L3MATE e L3TT) expostas ao  $Al^{3+}$ , com pequena ou nenhuma variação para os demais genótipos independentes da presença de Al. Diferentemente do verificado para os genes *MATE*, a expressão do *ZmNrat* foi induzida em folhas de plantas dos genótipos sensíveis expostos ao  $Al^{3+}$  (L53 e NIL5). Com efeito, os resultados sugerem também que uma combinação de mecanismos, incluindo metabólicos, moleculares e antioxidantes, seja também parte fundamental dessa resposta.

**Palavras-chave:** Ciclo TCA. Histolocalização. Sistema antioxidante. Expressão gênica.

## ABSTRACT

DASILVA, Jefferson Barbosa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2022. **Morphanatomic, physiological, and molecular aspects associated with differential aluminium tolerance in maize lines (*Zea mays* L.)**. Adviser: Wagner L. Araújo. Co-adviser: Auxiliadora Oliveira Martins.

Soils belonging to tropical zones are frequently affected by multiple stresses, especially acidity. About 30% of the world's soils manifest plant growth problems related to aluminum ( $Al^{3+}$ ) toxicity. Plants possess defensive mechanisms and use a variety of biochemical strategies to avoid damage caused by reactive oxygen species (ROS). The enzymes involved in the intermediate metabolism are also altered by the toxic content of Al. The activities of these enzymes are directly or indirectly involved in the tricarboxylic acid cycle. In this study, five maize genotypes derived from genotypes with intermediate Al tolerance (L3) and sensitive (L53) were used with differential expression of the *MATE* gene culminating in differential Al tolerance in these genotypes. Overall, in the absence of stress the genotypes were quite similar but in the presence of  $Al^{3+}$  higher malondialdehyde (MDA) content was observed in the tolerant genotypes L3TT and the sensitive genotype L53, with little difference among the other genotypes in response to  $Al^{3+}$  stress. The tolerant genotypes (L3, L3MATE and L3TT) showed increased activity of oxidative enzymes in response to  $Al^{3+}$  stress, with the genotype L3 standing out, which showed up to three times higher activity when compared to its control. After exposure to  $Al^{3+}$  for 24h, the activity of pyruvate dehydrogenase (PDH) is increased, independent of genotype, when compared to the control condition. In the absence of stress, the genotypes show similar behavior, with the highest proportion of 2C polyploid (4C) cells in the apical meristems. The expression of *ZmMATE3* and *ZmMATE6* genes were positively regulated in plants of the tolerant genotypes (L3MATE and L3TT) exposed to  $Al^{3+}$ , with little or no variation for the other genotypes independent of the presence of Al. Unlike what was found for the *MATE* genes, *ZmNrat* expression was induced in the leaves of plants of the sensitive genotypes exposed to  $Al^{3+}$  (L53 and NIL5). Indeed, the results also suggest that a combination of mechanisms, including metabolic, molecular and antioxidant, is also a key part of this response in maize.

**Keywords:** TCA cycle. Histolocalization. Antioxidant system. Gene expression.

## SUMÁRIO

1.	Introdução .....	8
2.	Materiais e Métodos .....	11
2.2.	Genótipos de milho e condições de crescimento.....	11
2.3.	Histolocalização do Al .....	12
2.4.	Peroxidação lipídica .....	13
2.5.	Quantificação de peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	14
2.6.	Atividade das enzimas do sistema antioxidante .....	14
2.6.1.	Extração .....	14
2.6.2.	Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD – EC 1.15.1.1).....	14
2.6.3.	Atividade enzimática da catalase (CAT – EC 1.11.1.6).....	15
2.6.4.	Atividade enzimática da peroxidase (POX – EC 1.11.1.7) .....	15
2.6.5.	Atividade enzimática da peroxidase do ascorbato (APX – EC 1.11.1.11).....	15
2.6.6.	Determinação de proteína solúvel total .....	15
2.7.	Ensaio das atividades das enzimas do metabolismo do carbono.....	15
2.7.1.	Extração .....	15
2.7.2.	Atividade da citrato sintase (CS – EC 2.3.3.1).....	16
2.7.3.	Atividade da isocitrato desidrogenase dependente de NADP <sup>+</sup> (IDH-NADP – EC 1.1.1.42).....	16
2.7.4.	Atividade da isocitrato desidrogenase dependente de NAD <sup>+</sup> (IDH-NAD – EC 1.1.1.41).....	16
2.7.5.	Atividade da malato desidrogenase dependente de NADP <sup>+</sup> (MDH-NADP – EC 1.1.1.82).....	17
2.7.6.	Atividade da malato desidrogenase dependente de NAD <sup>+</sup> (MDH-NAD – EC 1.1.1.37).....	17
2.7.7.	Atividade da fumarase (FUM – EC 4.2.1.2).....	17
2.7.8.	Atividade da aconitase (ACO – EC 4.2.1.3).....	17
2.7.9.	Atividade da piruvato desidrogenase (PDH – EC 1.2.4.1).....	18
2.8.	Citometria de fluxo.....	18
2.9.	Expressão gênica .....	19
2.10.	Análises estatísticas.....	19
3.	Resultados .....	20
3.1.	O acúmulo de Al ocorre em diferentes tecidos radiculares.....	20
3.2.	Estresse oxidativo é dependente do tempo de exposição ao Al <sup>3+</sup> .....	22
3.3.	Respostas antioxidantes de plantas de milho na presença de Al <sup>3+</sup> .....	23

3.4.	Atividade do ciclo TCA é modificada pela presença do Al <sup>3+</sup> .....	25
3.5.	Exposição ao alumínio tóxico e alterações na ploidia de células radiculares .....	29
3.6.	Expressão de genes codificando transportadores de ácidos orgânicos e enzimas em resposta ao Al <sup>3+</sup> .....	29
4.	Discussão .....	32
4.1.	O acúmulo de Al <sup>3+</sup> ocorre de forma diferencial nos tecidos radiculares .....	32
4.2.	O tempo de exposição ao Al <sup>3+</sup> impacta as respostas antioxidantes .....	32
4.3.	Metabolismo dos ácidos orgânicos é modificada pela presença do Al <sup>3+</sup> .....	33
4.4.	Alumínio promove alterações na ploidia de células radiculares .....	34
4.5.	O padrão de expressão de transportadores e enzimas importantes na tolerância ao Al <sup>3+</sup> é modificado .....	35
5.	Conclusões .....	37
6.	Referências .....	39
7.	Material Suplementar .....	47

## 1. INTRODUÇÃO

Grandes perdas na agricultura mundial ocorrem devido aos diferentes estresses (bióticos e abióticos) que impactam o desenvolvimento das plantas. Condições extremas de temperatura (calor e frio/geada), inundações, salinidade, seca e toxicidade por metais/minerais são alguns dos estresses abióticos que influenciam a produtividade vegetal (Ahn et al, 2004). Com efeito, em função da sua natureza sésil, as plantas foram capazes de desenvolver estratégias, ao longo do processo evolutivo, para sobreviverem em locais estressantes (Chen et al, 2019).

Solos tropicais são frequentemente acometidos de estresses múltiplos, destacando-se a acidez ( $\text{pH} < 5,0$ ). Cerca de 30% dos solos no mundo, sendo 60% destes pertencentes a regiões tropicais e subtropicais, apresentam problemas de cultivo de plantas relacionados a toxidez pelo alumínio e seu íon tóxico  $\text{Al}^{3+}$  (Kochian et al, 2004; Zheng et al, 2010). Cabe mencionar que muitos países em desenvolvimento estão localizados onde se encontra a maioria dos solos ácidos (América do Sul, África Central e Sudeste Asiático) e, assim, a toxicidade por  $\text{Al}^{3+}$  limita a produção agrícola onde a segurança alimentar é mais tênue e a produção de alimentos é crítica (Bot et al, 2000). Cerca de 85% do território sul-americano é composto por solos ácidos e, no caso específico do Brasil, pouco mais de 2 milhões de  $\text{km}^2$  do território são cobertos por solos ácidos, principalmente em áreas de Cerrado (Chen et al, 2019). Independentemente das limitações químicas, os solos do Cerrado demonstram inúmeras vantagens com potencial agrônomo exercendo, portanto, papel muito importante para a agricultura nacional, representando aproximadamente 68% do território brasileiro (Zheng et al, 2010).

Dentre os elementos encontrados na crosta terrestre,  $\text{Al}^{3+}$  é o elemento metálico mais abundante (Singh et al, 2017). Sendo um componente natural do solo, o Al é normalmente encontrado em sua forma precipitada de aluminossilicatos não fitotóxicos (Kochian, 1995). Registre-se que a solubilização do Al se dá a partir da acidificação do solo ( $\text{pH} < 5,0$ ), possibilitando que silicatos de alumínio sejam solubilizados nas formas de hidróxido de alumínio  $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$  e na forma catiônica trivalente  $\text{Al}^{3+}$  (Ryan e Delhaize, 2010), culminando em sua forma fitotóxica, que inibe o crescimento e função radicular (Silva, 2012; Kochian et al, 2015). A forma fitotóxica  $\text{Al}^{3+}$  tem a capacidade de interferir, de forma rápida (de 30 minutos a 2 horas de exposição) e em concentrações micromolares, no desenvolvimento de raízes de várias espécies vegetais (Vitarello et al, 2005). Neste contexto, o principal fator limitante na produção agrícola mundial em solos ácidos é provocado pelo  $\text{Al}^{3+}$  (Jones, 1998;

Kochian et al, 2015). Atualmente, existem várias hipóteses para explicar as diferenças intra e interespecíficas em relação ao estresse por Al (Kochian et al, 2004; Sweetlove et al, 2010; Kochian et al, 2015). Com efeito, dois mecanismos fisiológicos possibilitam que as plantas tolerem níveis tóxicos de Al em solos ácidos: (i) mecanismo de tolerância, no qual a planta possui a capacidade de crescer e desenvolver mesmo com a entrada de Al nas células via simplasma (Kochian, 1995), e (ii) mecanismo de exclusão do Al do ápice radicular, impedindo que o mesmo entre nos tecidos e acumule-se no simplasma (Ryan e Delhaize, 2010). Cabe ressaltar também que os mecanismos de resistência são, usualmente, classificados em uma dessas categorias, ambas relacionadas ao metabolismo mitocondrial. Ademais, ao integrar alterações moleculares e metabólicas que ocorrem em resposta ao estresse por Al com estudos fisiológicos têm sido demonstrado que o metabolismo respiratório está fortemente ligado à tolerância e resistência ao Al em uma variedade de contextos e em uma variedade de tecidos vegetais (Nunes-Nesi et al, 2007; Nunes-Nesi et al, 2014).

Estresses ambientais (e.g. seca, acidez, temperatura e salinidade, dentre outros) induzem o acúmulo rápido e excessivo de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células vegetais (Sunkar et al, 2003). Diversos trabalhos tem demonstrado que o estresse por Al aumenta a produção EROs, ao passo que essa maior produção de EROs ativa diversas enzimas e compostos do sistema antioxidante nas células vegetais (Yu et al, 2019; Yang et al, 2021). Com efeito, as plantas possuem mecanismos defensivos e utilizam uma variedade de estratégias bioquímicas para minimizar os danos causados pelas EROs (Alscher et al, 2002; Sunkar et al, 2003).

Em resposta à estresses, as raízes liberam diversos ácidos orgânicos, com destaque para os ácidos cítrico, málico e oxálico, cujas concentrações dependem tanto de fatores genéticos quanto das condições de estresse as quais as plantas e são submetidas (Jones, 1998; Silva et al, 2001). Ácidos orgânicos são biomoléculas que atuam nos processos metabólicos tanto em células vegetais quanto células animais, particularmente no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (ciclo TCA). O ciclo TCA é constituído por reações catabólicas que suportam não apenas a síntese de ATP, mas também está, ao mesmo tempo, claramente incorporado em uma rede metabólica mais ampla que permite que a sua atividade contribua para diversos aspectos do metabolismo, incluindo a tolerância à estresses vários (Sweetlove et al, 2010).

A maior compreensão sobre bioquímica, fisiologia e respostas envolvidas nos estresses abióticos colaboram para identificar novos genes e a cadeia de sinalização da qual as plantas utilizam para tolerar/resistir aos estresses, sendo primordial para o aperfeiçoamento de

novas variedades de culturas com maior tolerância aos mais diversos estresses (Kotchoni et al, 2004; Kotchoni et al, 2015). Neste contexto, genes responsáveis pela secreção de malato induzida por Al (*ALMT1*: transportador de malato ativado por Al) e citrato (*HvMATE*: multidrogas e compostos tóxicos) e *SbMATE* foram clonados a partir de trigo (*ALMT1*; Sasaki et al, 2004), cevada (*HvMATE*; Furukawa et al, 2007) e sorgo (*SbMATE*; Magalhães et al, 2007). Registre-se que a superexpressão desses genes confere tolerância ao Al em plantas transgênicas de sorgo (Magalhaes et al, 2007), *Arabidopsis* (Liu et al, 2009), cevada (Delhaize et al, 2004) e trigo (Pereira et al, 2010).

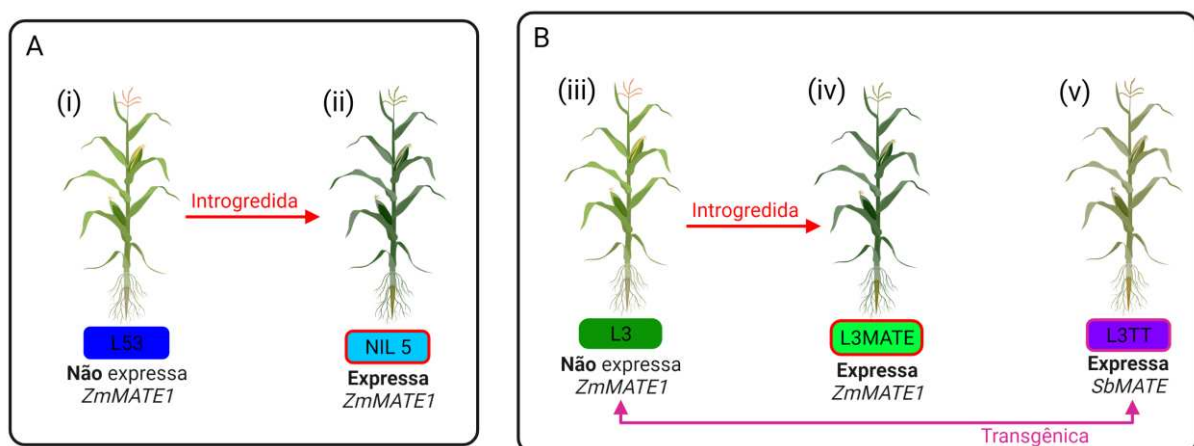
Em adição, foi demonstrado que o gene Aldeído desidrogenase (*ALDH*), que pode funcionar como um aldeído desidrogenase primária, é importante na resposta à diversos estresses ambientais, protegendo as plantas contra estresses oxidativos (Kotchoni et al, 2006; Xia et al, 2014; Ke et al, 2020). Em arroz (*OsALDH2B1*), essa enzima, além de proteger contra diversos estresses também regula o crescimento e a reprodução (Kotchoni et al, 2006). Ademais, em *Arabidopsis*, o *Ath-ALDH3* aumenta a tolerância a seca, salinidade e ao estresse por metais pesados como  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Cd}^{2+}$  (Ke et al, 2020). Ainda, no milho, o gene *ZmALDH9* foi induzido em resposta à vários estresses ambientais, além de desempenhar um papel na desintoxicação de aldeídos (Zhou et al, 2012). Cabe mencionar também que esse gene parece atuar na resposta a toxicidade por Al, uma vez que a expressão de um homólogo (*ALDH2*) foi regulada, de forma positiva, em um genótipo de mirtilo (*Vaccinium corymbosum*) em resposta ao estresse por Al (Inostroza-Blancheteau, 2011).

A toxidez causada pelo Al é um fator limitante à produção vegetal e, assim, o desenvolvimento de plantas tolerantes representa uma importante alternativa visando aumentar a produtividade agrícola, principalmente na região do Cerrado, que representa um importante fronteira agrícola para o estado de Minas Gerais. Assim, o presente estudo investigou o comportamento metabólico, o padrão de expressão de genes associados aos transportadores de citrato e a morfoanatomia em linhagens de milho com tolerância diferencial ao Al. Tais informações foram utilizadas para a identificação de mecanismos envolvidos em respostas ao estresse por Al em linhagens de milho e também compreender como a tolerância diferencial poderia ser explicada pelos aspectos investigados.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.2. Genótipos de milho e condições de crescimento

Cinco genótipos de milho foram utilizados (Figura 1), sendo eles: (i) L53 linhagem padrão de sensibilidade ao AI (Maron et al, 2008; Guimaraes et al, 2014; Matonyei et al, 2020) e (ii) NIL5, que é uma linhagens semi-isogênicas (NIL – Near Isogenic Lines) e apresenta o background genético de L53 e a região qALT6, QTL que contém o gene *ZmMATE1* e confere tolerância ao AI (Guimaraes et al, 2014). Registre-se que NIL5 foi desenvolvida a partir do retrocruzamento assistido com marcadores moleculares (Tinoco et al, 2010). Com efeito, foram ainda utilizadas (iii) L3, linhagem elite de milho com tolerância intermediária ao AI; (iv) L3MATE, que é a linhagem L3 introduzida com o gene *ZmMATE1* derivado da linhagem tolerante Cateto AI237 (Guimaraes et al, 2014) através de retrocruzamento assistido e, (v) L3TT tem o background genético de L3, exibindo superexpressão do gene *SbMATE*, que confere tolerância a AI no sorgo (Magalhaes et al, 2007).



**Figura 1: Representação esquemática dos genótipos utilizados.** (A) L53, linhagem padrão sensível ao AI (i) usada como background no retrocruzamento para a introgressão de *ZmMATE1* na linhagem NIL 5 (ii). (B) L3, linhagem elite de milho com tolerância intermediária ao AI – (iii), usada como background genético tanto no retrocruzamento para introgressão de *ZmMATE1* na linhagem L3MATE (iv), quanto para a inserção transgênica do gene MATE de sorgo para obtenção da linhagem L3TT (v).

As sementes foram esterilizadas superficialmente com hipoclorito de sódio 0,85% (p/v) durante 5 minutos a 150 rpm, enxaguadas em água destilada e germinadas em rolos de papel germitest úmido. Plântulas de sete dias com radícula de aproximadamente 3,0 cm de comprimento foram transferidas para vasos plásticos com capacidade de aproximadamente de três litros preenchidos com solução nutritiva, como descrito anteriormente (Magnavaca et al, 1987; Piñeros et al, 2002) sob aeração constante e por um período de adaptação de 120h em solução nutritiva completa em pH 4,0. Posteriormente, os tratamentos foram impostos pela

substituição da solução nutritiva por solução de composição idêntica, mas sem (-Al – controle) ou com Al (+Al) contendo {39}  $\mu\text{M Al}^{3+}$  (chaves indicam atividade de  $\text{Al}^{3+}$  livre, visto que o Al interage com os demais minerais disponíveis na solução nutritiva, ficando disponível para absorção apenas 39  $\mu\text{M Al}^{3+}$  dos 325  $\mu\text{M Al}^{3+}$  utilizados em solução nutritiva) fornecida como  $\text{AlCl}_3$  e pH 4,0. A atividade livre de  $\text{Al}^{3+}$  foi calculada usando o software de especiação GEOCHEM-EZ (Shaff et al, 2010). As plantas foram cultivadas em câmaras com temperatura controlada (27/21 °C durante todo o ciclo dia/noite) sob intensidade luminosa de 330  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , 80% de umidade relativa e fotoper\u00edodo de 12/12h dia/noite. As amostras de ra\u00edzes (meristema apical da raiz com aproximadamente 1cm) para anatomia foram coletadas ap\u00f3s 72h de estresse e imediatamente imersas em FAA (formalde\u00eddo, \u00e1cido ac\u00e9tico glacial, \u00e1lcool et\u00edlico absoluto). A coleta das amostras de ra\u00edzes (meristema apical da raiz com aproximadamente 1cm) para citometria de fluxo foi realizada ap\u00f3s 72h de estresse, as quais foram imersas em \u00e1gua destilada e logo em seguida analisadas. Amostras de ra\u00edzes (raiz completa) utilizadas para metabolismo e express\u00e3o g\u00eanica foram coletadas no meio do fotoper\u00edodo ap\u00f3s 24h e 72h de estresse e, imediatamente congeladas em nitrog\u00eanio l\u00edquido e armazenadas a -80 °C sendo as amostras, posteriormente, liofilizadas.

### **2.3. Histolocaliza\u00e7\u00e3o do Al**

Para a confec\u00e7\u00e3o de lâminas permanentes, as ra\u00edzes foram fixadas em FAA (propor\u00e7\u00e3o de 1:1:18) e estocadas em \u00e1lcool 70%, posteriormente desidratadas em s\u00e9rie etan\u00f3lica crescente (70%, 85% e 95%, sendo 30 min em cada) (Johansen, 1940), inclu\u00eddas em historesina (etileno-glicol-metacrilato, Historesin, Leica), e armazenadas at\u00e9 a an\u00e1lise

Sec\u00e7\u00f5es transversais de 7  $\mu\text{m}$  de espessura foram obtidas em micr\u00f3tomo rotativo de avan\u00e7o autom\u00e1tico (modelo RM2155, Leica Microsystems, Deerfiels, Illinois, USA). As sec\u00e7\u00f5es foram coradas, sendo posteriormente montados segundo t\u00e9cnicas usuais de anatomia vegetal (Kraus & Arduin, 1997). As an\u00e1lises anat\u00f4micas e a documenta\u00e7\u00e3o fotogr\u00e1fica referentes a microscopia de luz foram realizadas em fotomicrosc\u00f3pio Olympus AX 70 com sistema U-Photo. Os reagentes utilizados para detec\u00e7\u00e3o de Al e a colora\u00e7\u00e3o da rea\u00e7\u00e3o positiva para este elemento est\u00e3o descritos na Tabela 1.

**TABELA 1.** Reagentes utilizados para detecção do alumínio nas amostras foliares e colorações obtidas quando da presença do elemento em contato com o reagente.

Reagente	Coloração positiva para alumínio	Referência
Aluminon 0,1%	Vermelho	Haridasan et al (1986)
Chrome azurol S 0,5%	Azul	Kukachka e Miller (1980)
Hematoxilina 0,2%	Roxo	De Andrade et al (2011)
Solochrome azurine 1%	Azul	Denton e Oughton (1993)

O preparo dos reagentes seguiu as etapas abaixo discriminadas.

O aluminon (ácido aurintricarboxílico amoníaco) foi preparado a 0,1%, em tampão acetato de amônio 3,2 N, pH 5,2 (24,64 g de acetato/100 mL de solução e 10 mL de HCl 32%), sob temperatura de 60 a 80 °C. Após filtragem do reagente, também sob temperatura de 60 a 80 °C, as secções radiculares foram submetidas à solução de aluminon por 60 min e, posteriormente, lavadas em água destilada por 5 min em temperatura ambiente (Haridasan et al, 1986).

O chrome azurol S foi preparado a 0,5% (0,5 g de chrome azurol S e 5,0 g de acetato de sódio, completando o volume para 100 mL com água destilada). As secções foliares foram submetidas a essa solução por 60 min (Kukachka e Miller, 1980).

A hematoxilina foi preparada a 0,2% (0,2 g de hematoxilina e 0,02 g de IO3K (iodato de potássio), completando o volume para 100 mL com água destilada). As secções radiculares foram submetidas à solução por 40 min, sendo, posteriormente, lavadas em água destilada por 2 min (De Andrade et al, 2011).

O solochrome azurine foi preparado a 1% em pH 5,0 (1 g de solochrome azurine para 100 mL de solução em água destilada). Para ajuste do pH, utilizou-se solução de ácido acético a 25% (v/v) em água destilada. As secções radiculares permaneceram por 60 min no reagente e, em seguida, foi realizada a diferenciação em álcool etílico 95% por 5 min (Denton e Oughton, 1993).

#### **2.4. Peroxidação lipídica**

A peroxidação lipídica foi estimada pela concentração de malondialdeído (MDA) produzida após a reação com ácido tiobarbitúrico (TBA) (Cakmak e Horst, 1991). Cerca de 10 mg de raízes liofilizadas foram homogeneizados em 1,5 mL de ácido tricloroacético a 1% (p/v) e centrifugados a 12.000 g por 15 min a 4 °C. Alíquotas de 0,5 mL do sobrenadante foram adicionadas a 1,5 mL de uma solução de 0,5% (p/v) de TBA em 10% de TCA e incubadas em banho-maria a 95 °C. Após 30 min, a absorbância da amostra foi determinada a

532 e 600 nm. A concentração do complexo MDA-TBA foi estimada usando o coeficiente de absorvidade molar de  $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

## **2.5. Quantificação de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )**

Para a determinação da concentração de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), 10 mg de amostras liofilizadas foram homogeneizadas em meio de extração constituído de TCA 0,1% e polivinilpolipirrolidona (PVPP), e centrifugados a 12.000 g, por 15 min a 4 °C. Alíquotas do sobrenadante foram adicionadas em meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 2,5 mM, pH 7,0 e iodeto de potássio (KI) 1M com leituras a 390 nm realizadas em espectrofotômetro (UV/Visível Multiskan GO®). As concentrações de peróxido de hidrogênio foram estimadas de acordo com uma curva de calibração preparada com padrões de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Velikova et al, 2000).

## **2.6. Atividade das enzimas do sistema antioxidante**

### **2.6.1. Extração**

As atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e peroxidase (POX) foram determinadas como descrito anteriormente por Ribeiro et al, (2012). Para determinar as atividades enzimáticas, cerca de 10 mg de material liofilizado foi homogeneizado em meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetanossulfonilfluoreto 1 mM (PMSF) e 1% (w/v) polivinilpolipirrolidona (PVPP) e centrifugados a 12.000 g por 15 min a 4 °C.

### **2.6.2. Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD – EC 1.15.1.1)**

A atividade da SOD foi determinada pela adição de 20  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático bruto a um meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,8, metionina 50 mM, cloreto de nitro azul de tetrazólio (NBT) 1 mM, EDTA 5 mM e riboflavina 100  $\mu\text{M}$ . A reação foi conduzida a 25 °C em uma câmara de reação sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W. Após 5 min de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul produzida por fotoredução de NBT foi mensurada a 560 nm (Giannopolitis e Ries, 1977; Alscher et al, 2002). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a fotoredução de NBT em 50%.

### **2.6.3. Atividade enzimática da catalase (CAT – EC 1.11.1.6)**

A atividade da catalase foi mensurada pela adição de 20  $\mu\text{L}$  de amostra a meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8 e  $\text{H}_2\text{O}_2$  12,5 mM. A absorbância da amostra foi determinada a 30  $^\circ\text{C}$  e foi estimada usando o coeficiente de absorvidade molar de CAT (240 nm,  $\epsilon = 36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Sudhakar et al, 2001).

### **2.6.4. Atividade enzimática da peroxidase (POX – EC 1.11.1.7)**

A atividade da catalase foi mensurada pela adição de 20  $\mu\text{L}$  de amostra a meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8 e  $\text{H}_2\text{O}_2$  12,5 mM. A absorbância da amostra foi determinada a 30  $^\circ\text{C}$  e foi estimada usando o coeficiente de absorvidade molar de CAT (240 nm,  $\epsilon = 36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Sudhakar et al, 2001).

### **2.6.5. Atividade enzimática da peroxidase do ascorbato (APX – EC 1.11.1.11)**

A atividade da APX foi medida pela adição de 40  $\mu\text{L}$  de amostra ao meio de reação consistindo em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, ácido ascórbico 0,8 mM e  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM. A absorbância da amostra foi determinada a 30  $^\circ\text{C}$  e foi estimada usando o coeficiente de absorvidade molar de APX (290 nm,  $\epsilon = 2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Ribeiro et al, 2012).

### **2.6.6. Determinação de proteína solúvel total**

O teor de proteína dos extratos enzimáticos foi determinado pelo método de Bradford et al, (1976) usando Albumina de Soro Bovina (BSA) como padrão.

## **2.7. Ensaio das atividades das enzimas do metabolismo do carbono**

### **2.7.1. Extração**

As atividades das enzimas citrato sintase (CS – EC 2.3.3.1), aconitase (ACO – EC 4.2.1.3), isocitrato desidrogenase dependente de NADP (IDH-NADP – EC 1.1.1.37), isocitrato desidrogenase dependente de NAD (IDH-NAD – EC 1.1.1.41), fumarase (EC 4.2.1.2), malato desidrogenase dependente de NADP (MDH-NADP – EC 1.1.1.82) e malato desidrogenase dependente de NAD (MDH-NAD – EC 1.1.1.37) foram extraídas conforme descrito por Das et al. (2022). Para a extração das enzimas, 10 mg de raízes liofilizadas e homogeneizados em tampão 10X composto por HEPES 500 Mm,  $\text{MgCl}_2$  100 mM, EDTA 10 Mm, EGTA 10 Mm, benzamidina 10 mM, ácido  $\epsilon$ -aminocaproico 10 mM, 2,5% (p/v) de BSA, com pH 7,5 ajustado com KOH 10M, centrifugado a 15.000 g durante 5 min a 4  $^\circ\text{C}$ . O

sobrenadante foi reservado para adição do mix de determinação correspondente a cada enzima.

### **2.7.2. Atividade da citrato sintase (CS – EC 2.3.3.1)**

A atividade da CS foi determinada pela adição do mix de ensaio composto por tricine/KOH 500 mM pH 8,5, malato 1,5 mM, triton X-100 0,25% (v/v), malato desidrogenase 100 U/mL<sup>-1</sup> em tricine/KOH 200 mM pH 8 e MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NAD<sup>+</sup> em tricine/KOH 200 mM pH 8 e MgCl<sub>2</sub> 10 mM, acil-CoA 20 mM em tricine/KOH 200 mM pH 8 e MgCl<sub>2</sub> 10 mM, seguida por incubação a temperatura ambiente por 40 min, e adição do mix de reação composto por tricine/KOH 1 M pH 9, MTT 10 mM, EDTA 200 mM, etanol 50%, álcool desidrogenase 2.000 U/mL<sup>-1</sup> em tricine/KOH 200 mM pH 9 e MgCl<sub>2</sub> 10 mM, PES 4 mM. A atividade da CS foi medida espectrofotometricamente a 570 nm e expressa como nmol min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> (Srere et al, 1969).

### **2.7.3. Atividade da isocitrato desidrogenase dependente de NADP+ (IDH-NADP – EC 1.1.1.42)**

A atividade da IDH-NADP foi determinada pela adição do mix de ensaio composto por tricine/KOH 500 mM pH 8,5, MgCl<sub>2</sub> 40 mM, triton X-100 0,25% (v/v), isocitrato 20 mM em NaOH pH 8,5 e NADP<sup>+</sup> 20 mM em tricine/KOH 200 mM pH 9 e MgCl<sub>2</sub> 10 mM, seguida por incubação a 25 °C por 20 min, e adição do mix de reação composto por tricine/KOH 1 M pH 9, MTT 10 mM, EDTA 200 mM, G6P 250 mM, G6PDH grade I 500 U mL<sup>-1</sup> em tricine/KOH 200 mM pH 9 e MgCl<sub>2</sub> 10 mM, PES 4 mM. A atividade da IDH-NADP foi medida espectrofotometricamente a 340 nm e expressa como nmol min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> (Fieuw et al, 1995).

### **2.7.4. Atividade da isocitrato desidrogenase dependente de NAD+ (IDH-NAD – EC 1.1.1.41)**

A atividade da IDH-NAD foi determinada pela adição do mix de ensaio composto por MOPS 500 mM pH 7,5, MgSO<sub>4</sub> 25 mM, triton X-100 0,25% (v/v), isocitrato 20 mM em NaOH pH 7,5 e NAD<sup>+</sup> 25 mM em MOPS 500 mM pH 7,5, seguida por incubação a 25 °C por 40 min, e adição do mix de reação composto por tricine/KOH 1 M pH 9, MTT 10 mM, EDTA 200 mM, etanol 50%, álcool desidrogenase 2.000 U mL<sup>-1</sup> em Tricine/KOH 200 mM pH 9 e MgCl<sub>2</sub> 10 mM, PES 4 mM. A atividade da IDH-NADP foi medida espectrofotometricamente a 570 nm e expressa como nmol min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> (Zhou et al, 2012).

### **2.7.5. Atividade da malato desidrogenase dependente de NADP+ (MDH-NADP – EC 1.1.1.82)**

A atividade da MDH-NADP foi determinada pela adição do mix de ativação composto por tricine/KOH 100 mM pH 8, KCl 180 mM, triton X-100 0,5% (v/v) e DTT 150 mM. Após a adição do mix de ativação, a placa foi incubada a temperatura ambiente por 2h e em seguida foi adicionado o mix de ensaio composto por tricine/KOH 500 mM pH 8, Triton X-100 0,25% (v/v), EDTA 0,5 mM, NADPH 50 mM em NaOH 50 mM e oxaloacetato 2,5 mM. A atividade MDH-NADP foi medida espectrofotometricamente a 340 nm a 25 °C e expressa como  $\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1}$  (Kagawa and Bruno, 1988).

### **2.7.6. Atividade da malato desidrogenase dependente de NAD+ (MDH-NAD – EC 1.1.1.37)**

A atividade da MDH-NAD foi determinada pela adição do mix de ativação composto por tricine/KOH 100 mM pH 8, KCl 180 mM, triton X-100 0,5% (v/v) e DTT 150 mM. Em seguida foi adicionado NADH 60 mM em NaOH 50 mM e oxaloacetato 2,5 mM. A atividade MDH-NAD foi medida espectrofotometricamente a 340 nm a 25 °C até estabilizar e expressa como  $\text{nmol.min}^{-1} \text{g}^{-1}$  (Kumar et al, 2000).

### **2.7.7. Atividade da fumarase (FUM – EC 4.2.1.2)**

A atividade da Fumarase foi determinada pela adição do mix de ensaio 5X composto por tricine/KOH 500 mM pH 8,  $\text{MgCl}_2$  25 mM, triton X-100 0,25% (v/v), fumarato 100 mM em tricine/KOH 500 mM pH 8, citrato sintase 100  $\text{U/mL}^{-1}$  em tricine/KOH 200 mM pH 9 e  $\text{MgCl}_2$  10 mM, acetil-CoA em tricine/KOH 200 mM pH 9 e  $\text{MgCl}_2$  10 mM e fosfato 1 M, seguida por incubação a 25 °C por 20 min, e adição do mix de reação composto por tricine/KOH 1 M pH 9, MTT 10 mM, EDTA 200 mM, etanol 50%, álcool desidrogenase 2.000  $\text{U mL}^{-1}$  em tricine/KOH 200 mM pH 9 e  $\text{MgCl}_2$  10 mM, PES 4 mM. A atividade da IDH-NADP foi medida espectrofotometricamente a 340 nm e expressa como  $\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1}$  (Bergmeyer et al, 1974).

### **2.7.8. Atividade da aconitase (ACO – EC 4.2.1.3)**

A atividade da ACO foi determinada pela adição do mix de ensaio composto por HEPES/KOH 500 mM pH 7,5,  $\text{MnCl}_2$  5 mM, triton X-100 0,25% (v/v), aconitase 35  $\text{U mL}^{-1}$  em HEPES/KOH 50 mM pH 7,5 e  $\text{MgCl}_2$  10 mM, isocitrato desidrogenase dependente de NADP 50  $\text{U mL}^{-1}$  em HEPES/KOH 50 mM pH 7,5 e  $\text{MgCl}_2$  10 mM,  $\text{NADP}^+$  20 mM em

HEPES/KOH 50 mM pH 7,5, seguida por incubação a 25 °C por 20 min, e adição do mix de reação composto por tricine/KOH 1 M pH 9, MTT 10 mM, EDTA 200 mM, G6P 250 mM, G6PDH grade I 500 U mL<sup>-1</sup> em tricine/KOH 200 mM pH 9 e MgCl<sub>2</sub> 10 mM, PES 4 mM. A atividade da ACO foi medida espectrofotometricamente a 570 nm e expressa como nmol min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> (Kennedy et al, 1983).

#### **2.7.9. Atividade da piruvato desidrogenase (PDH – EC 1.2.4.1)**

A PDH foi extraída como descrito por Williams e Randall (1979), 10 mg de raízes liofilizadas e homogeneizados em tampão TES-KOH 20 mM pH 7,2, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM, 0,1% BSA, manitol 300 mM, e 1,4-ditiotreitol (DTT) 2 mM. O ensaio da PDH foi determinado pelo monitoramento da formação de NADH a 340 nm. O mix de determinação era composto de TES-NaOH 75 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM, NAD<sup>+</sup> 2 mM, lítio 0,2 mM, TPP 0,2 μM, cisteína-HCl 2,5 mM. O início da reação ocorreu pela adição de piruvato de sódio a 1 mM após 10 min de medidas. A atividade da PDH foi medida espectrofotometricamente a 340 nm e expressa nmol min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> (Srere et al, 1969).

#### **2.8. Citometria de fluxo**

Raízes de plântulas (~1 cm) foram coletadas e os meristemas apicais excisados em 0,5 mL de tampão de extração nuclear OTTO-I (Otto, 1990) suplementado com 2 mM de ditiotreitol e 50 μg mL<sup>-1</sup> RNase (Praça-Fontes et al, 2011). Em seguida, 0,5 mL do mesmo tampão foi adicionado e as suspensões foram filtradas através de uma malha de nylon de 30 μm, colocada em um microtubo, e centrifugada a 100 g durante 5 min. O precipitado foi ressuspenso em 100 μL de tampão OTTO-I e incubado por 10 min. As suspensões foram coradas com 1,5 mL de tampão OTTO-I:OTTO-II (1:2) suplementado com 2 mM de ditiotreitol, 75 μg mL<sup>-1</sup> de propidium iodide, e 50 μg mL RNase (Praça-Fontes et al, 2011). As suspensões foram incubadas no escuro por 30 min, filtradas através de uma malha de nylon 20 μm, e analisada usando um citômetro de fluxo (BD Accuri C6, Accuri Cytometers, Bélgica) equipado com uma fonte laser de 488 nm para promover o iodeto de propídio a FL2 (615 - 670 nm) e FL3 (>670 nm) e realizar análises de histograma para determinar o nível de ploidia de DNA de cada pico G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. Para isso, foram considerados apenas os histogramas com picos G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> exibindo um coeficiente de variação abaixo de 5% para o G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> pico e pelo menos 5000 núcleos foram contados para cada suspensão de núcleos.

## 2.9. Expressão gênica

A análise quantitativa de PCR em tempo real (qRT-PCR) foi realizada com RNA total isolado de raízes inteiras coletadas após 60 min de tratamento sem e com {39}  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$  atividade. A extração do RNA foi realizada com o reagente TRizol® (Ambion, Life Technology) seguindo o manual do fabricante. A integridade do RNA foi verificada em géis de agarose a 1% (p/v) e a concentração medida antes e após a digestão com DNase I usando um espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (<http://www.nanodrop.com/>). A digestão com DNase I (Ambion; <http://www.ambion.com/>) foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA foi sintetizado a partir de 1  $\mu\text{g}$  de RNA total usando a transcriptase reversa SuperScript III (Invitrogen; <http://www.invitrogen.com/>) de acordo com as instruções do fabricante. PCR quantitativa foi realizada utilizando o kit Power Syber Green, master mix. As amostras foram amplificadas segundo o programa: 94 °C por 10 min, seguidos de 40 ciclos de 94 °C por 15 s, 56 °C por 15 s e 72 °C por 15 s. Para confirmar a presença de um único produto de amplificação, específico para cada reação, uma curva de desnaturação foi realizada imediatamente após a amplificação. Os primers para cada gene alvo foram desenhados usando a ferramenta Primer-Blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)) e 18S foi usado como gene referência e os genes selecionados e seus respectivos primers estão descritos na Tabela Suplementar 1. As leituras foram realizadas no equipamento Applied Biosystem StepOnePlus™ Software v2.0. O cálculo das expressões gênicas relativas foi realizado usando o método  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  (Livak & Schmittgen, 2001), com três réplicas biológicas.

## 2.10. Análises estatísticas

Todos os dados foram analisados pelos testes de Shapiro-Wilk a 0,05 de probabilidade. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) por meio do teste F ( $P \leq 0,05$ ). Quando significativas, os resultados foram submetidos ao teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Toda a análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se protocolos desenvolvidos no software R. Dados expressos como médias  $\pm$  erro padrão (EP) apresentadas nas tabelas e figuras foram obtidas de cinco réplicas independentes por genótipo.

### 3. RESULTADOS

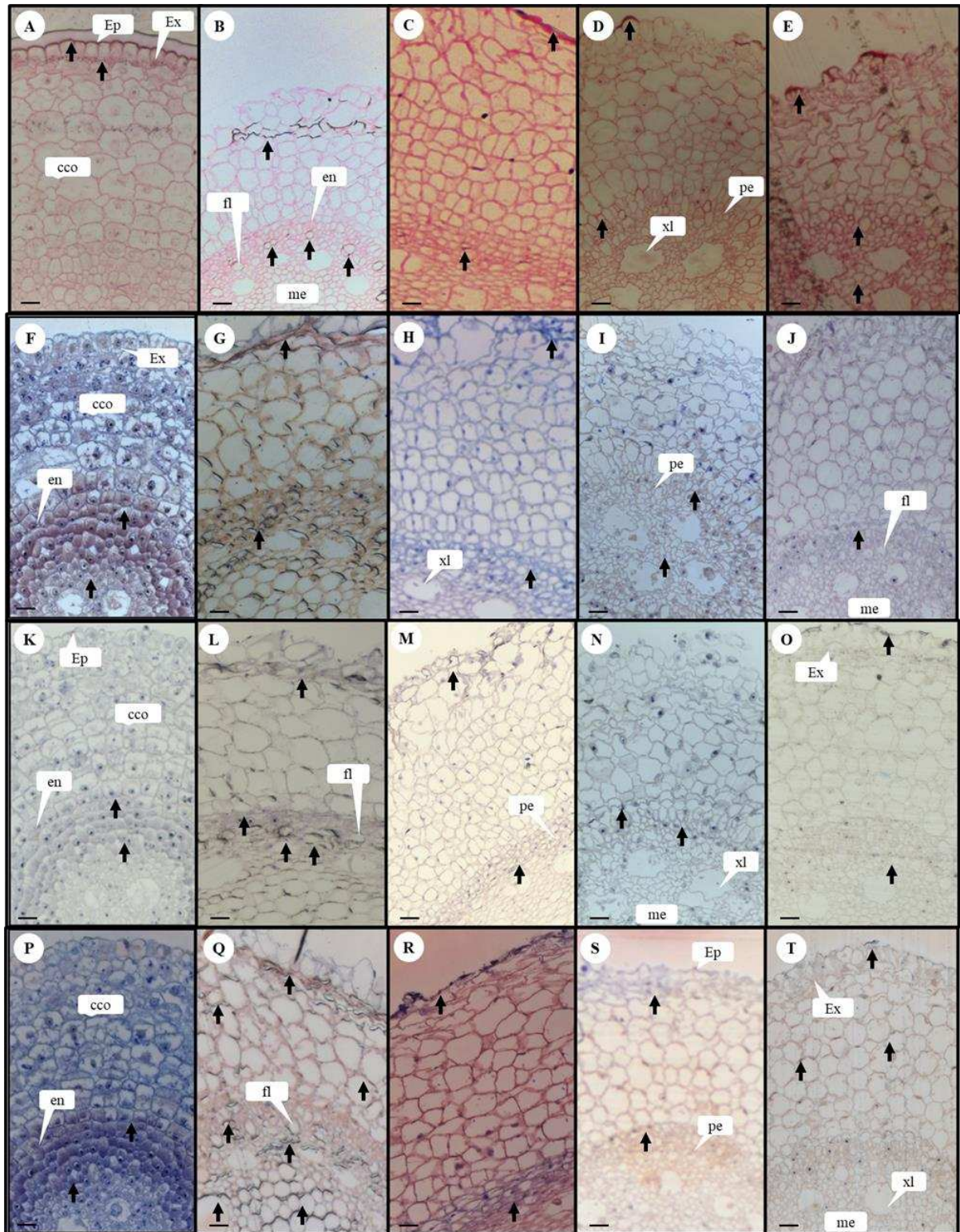
#### 3.1. O acúmulo de Al ocorre em diferentes tecidos radiculares

Para investigar as respostas impostas pela presença do Al em linhagens de milho com tolerância diferencial ao Al, cortes anatômicos radiculares submetidos à diferentes corantes, conforme descritos na Tabela 1, foram analisados. Na Figura 2, podemos observar que, em presença do corante Aluminun, os principais sítios de acúmulo de  $Al^{3+}$  foram epiderme (Figura 2A, C, D e E), exoderme (Figura 2A e B), floema (Figura 2B), periciclo (Figura 2C e E) e medula (Figura 2E). Micrografias de raízes na presença do corante Chrome Azurol S são apresentadas na Figura 2F-J. Os principais sítios de acúmulo evidenciados foram periciclo (Figura 2F, G e I), medula (Figura 2F e I), exoderme (Figura 2G e H) e endoderme (Figura 2I e J). Também foi utilizada a Hematoxilina, onde verificou-se que a endoderme (Figura 2K, L e N), periciclo (Figura 2K, M, N e O), células do floema (Figura 2L) e exoderme (Figura 2M e O) foram os locais de maior acúmulo deste metal, sobretudo no genótipo NIL5. Por último, utilizou-se ainda o Solochrome Azurine, verificando-se que, independentemente do genótipo avaliado, os principais sítios de acúmulo foram endoderme (Figura 2P e S), periciclo (Figura 2P, Q e R), células do córtex (Figura 2Q e S), exoderme (Figura 2Q e S), células do floema e medula (Figura 2Q) e epiderme (Figura 2R e T). Cabe ressaltar também que todos os genótipos apresentam sítios de acúmulo de  $Al^{3+}$ , já que estes foram reativos a todos os corantes utilizados, tendo variado apenas quanto à intensidade de reação (Tabela 2). O genótipo NIL5 foi o que apresentou o maior número de sítios de acúmulo de  $Al^{3+}$ , sobretudo reações positivas fortes para os corantes utilizados, em especial para Chrome Azurol S e Hematoxilina. Por outro lado, os genótipos tolerantes (L3, L3MATE e L3TT) apresentaram quantidade de sítios menores, tornando as diferenças bem menos evidentes. Tomados em conjunto, os resultados obtidos confirmam que o milho não é uma espécie acumuladora de Al, visto que nas análises realizadas e com os reagentes utilizados não se observa uma coloração intensa nos sítios de acúmulo de Al.

**Tabela 2.** Eficiência de reagentes na identificação de sítios de acúmulo de alumínio.

Reagente	Número de sítios identificados por genótipo e intensidade da reação														
	L53			NIL5			L3			L3MATE			L3TT		
	+	++	Total	+	++	Total	+	++	Total	+	++	Total	+	++	Total
Aluminun	1	1	2	0	2	2	0	2	2	1	1	2	2	1	3
Solochrome Azurine	0	2	2	0	2	2	0	2	2	2	0	2	1	0	1
Chrome Azurol S	0	2	2	1	5	6	0	2	2	1	1	2	3	0	3
Hematoxilina	0	2	2	0	4	4	0	2	2	0	2	2	2	0	2

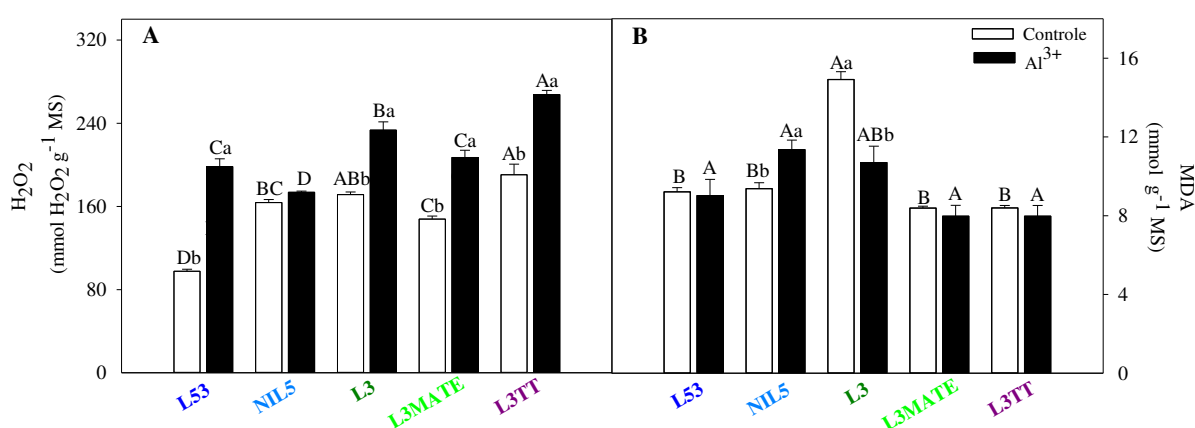
\*Legenda: ++ Reação positiva forte; + Reação positiva fraca



**Figura 2.** Histolocalização do acúmulo de alumínio em cinco genótipos de milho (*Z. mays*) com tolerância diferencial ao alumínio em ápices radiculares. Linhagem L53, sensível ao Al; NIL5, linha introgridida do gene *ZmMATE1* em L53; L3, linhagem elite de milho com tolerância intermediária ao Al; L3MATE, linhagem L3 introduzida com o gene *ZmMATE1* e; L3TT, inserção transgênica do gene *SbMATE* na linhagem L3. Foram utilizados os reagentes Aluminon (A-E), Chrome Azurol S (F-J), Hematoxilina (K-O) e Solochrome Azurine (P-T) em amostras de raiz (secções transversais) de plantas tratadas com  $\{39\} \mu\text{M Al}^{3+}$ . L53: A, F, K, P; NIL5: B, G, L, Q; L3: C, H, M, R; L3MATE: D, I, N, S; e L3TT E, J, O, T Escala= 50  $\mu\text{m}$ . Ep, epiderme; ex, exoderme; cco, células do córtex; fl, floema; en, endoderme; pe, periciclo; xl, xilema e me, medula.

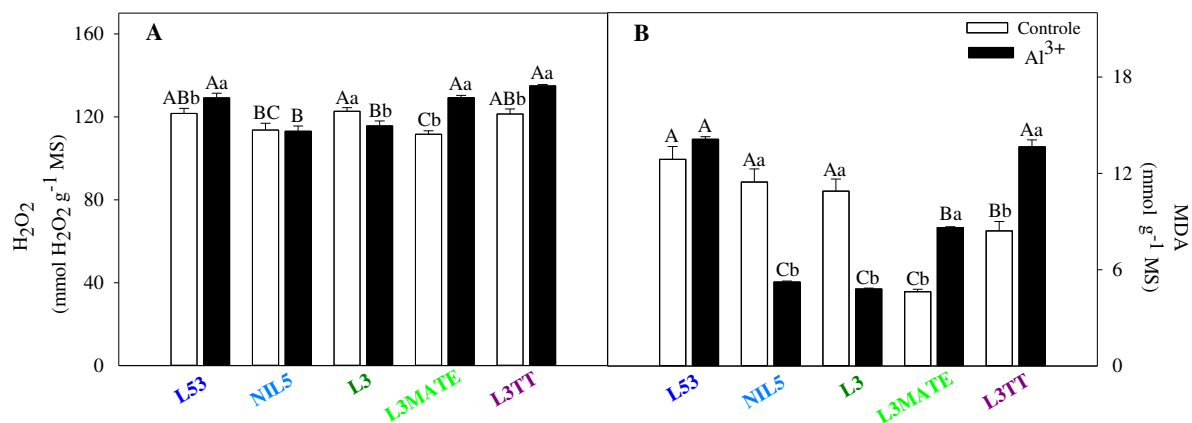
### 3.2. Estresse oxidativo é dependente do tempo de exposição ao $\text{Al}^{3+}$

Foi possível observar que os níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , após 24h em presença de  $\text{Al}^{3+}$  (Figura 3A), foram maiores nos genótipos tolerantes (L3, L3MATE e L3TT) e não se observaram diferenças significativas entre genótipos sensíveis (L53 e NIL5). Para MDA, após 24h em presença de  $\text{Al}^{3+}$  (Figura 3B), não foram observadas diferenças no conteúdo entre genótipos; registre-se, também, um maior conteúdo (significativamente diferente) no genótipo L3 em condições controle.



**Figura 3.** Alteração no conteúdo de compostos do sistema oxidativo em cinco genótipos de milho (*Z. mays*) com tolerância diferencial ao alumínio em raízes. **A.** Teor de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; **B.** Teor de MDA. A determinação foi realizada após 24 horas de tratamento com 0 e  $\{39\} \mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$  em solução nutritiva. Linhagem L53, sensível ao Al; NIL5, linha introgridida do gene *ZmMATE1* em L53; L3, linhagem elite de milho com tolerância intermediária ao Al; L3MATE, linhagem L3 introduzida com o gene *ZmMATE1* e; L3TT, inserção transgênica do gene *SbMATE* na linhagem L3. As barras representam a média + EP de cinco réplicas biológicas. As letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre genótipos dentro de um mesmo tratamento e, as letras minúsculas denotam diferenças significativas entre os tratamentos para um mesmo genótipo pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

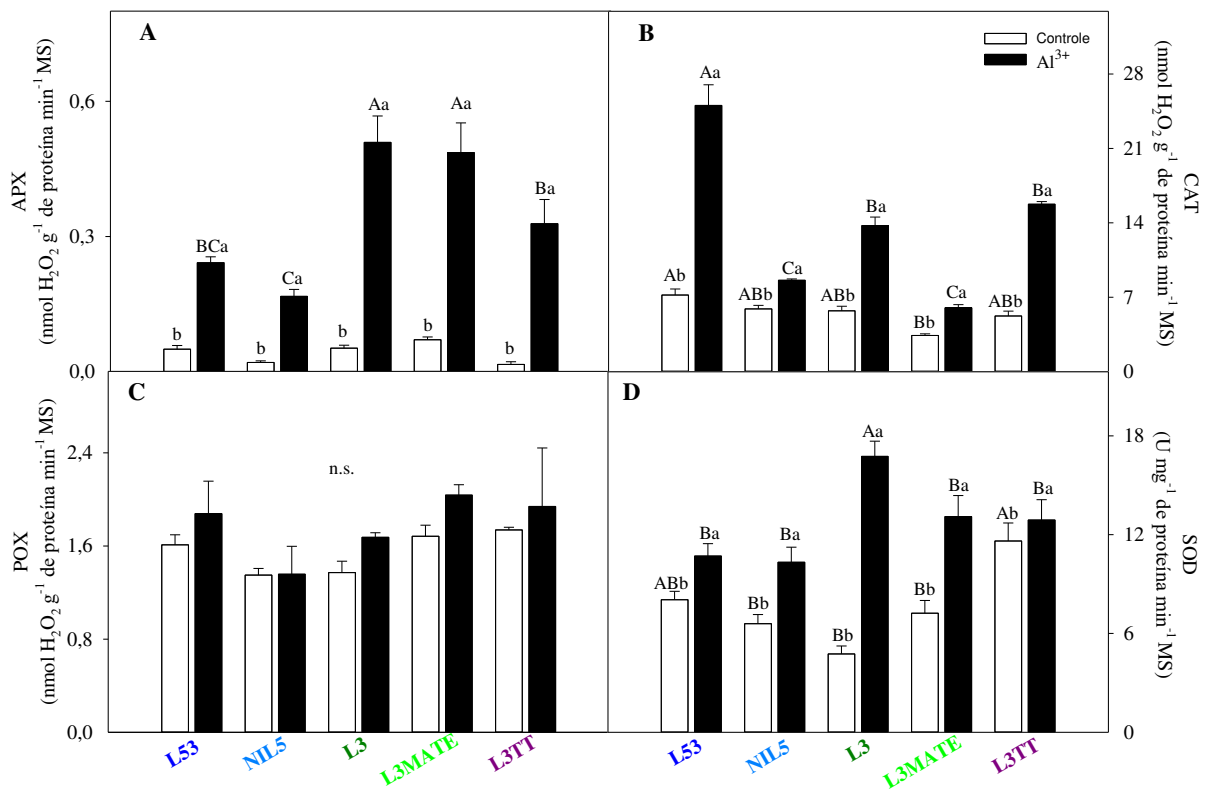
O teor de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , após 72h de estresse por  $\text{Al}^{3+}$  (Figura 4A), apresentou reduções (~50%) em relação às plantas após 24h de exposição (Figura 3A). Cabe ressaltar que, embora os resultados tenham sido, em larga escala, semelhantes entre os genótipos, não se observou a ocorrência de um padrão determinado pela tolerância entre os genótipos. Em relação ao conteúdo de MDA (Figura 4B), após 72 horas de estresse por  $\text{Al}^{3+}$ , foi possível observar um comportamento diferencial entre os genótipos. De modo geral, na ausência de estresse os genótipos foram bastante similares, porém, em presença de  $\text{Al}^{3+}$  maior conteúdo de MDA foi observado no genótipo tolerante L3TT e no genótipo sensível L53, com pequena diferença entre os demais genótipos em resposta ao estresse por  $\text{Al}^{3+}$ .



**Figura 4.** Alteração no conteúdo de compostos do sistema oxidativo em cinco genótipos de milho (*Z. mays*) com tolerância diferencial ao alumínio em raízes. **A.** Teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; **B.** Teor de MDA. A determinação foi realizada após 72 horas de tratamento com 0 e {39} μM de Al<sup>3+</sup> em solução nutritiva. Linhagem L53, sensível ao Al; NIL5, linha introgridida do gene *ZmMATE1* em L53; L3, linhagem elite de milho com tolerância intermediária ao Al; L3MATE, linhagem L3 introduzida com o gene *ZmMATE1* e; L3TT, inserção transgênica do gene *SbMATE* na linhagem L3. As barras representam a média + EP de cinco réplicas biológicas. As letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre genótipos dentro de um mesmo tratamento e, as letras minúsculas denotam diferenças significativas entre os tratamentos para um mesmo genótipo pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

### 3.3. Respostas antioxidantes de plantas de milho na presença de Al<sup>3+</sup>

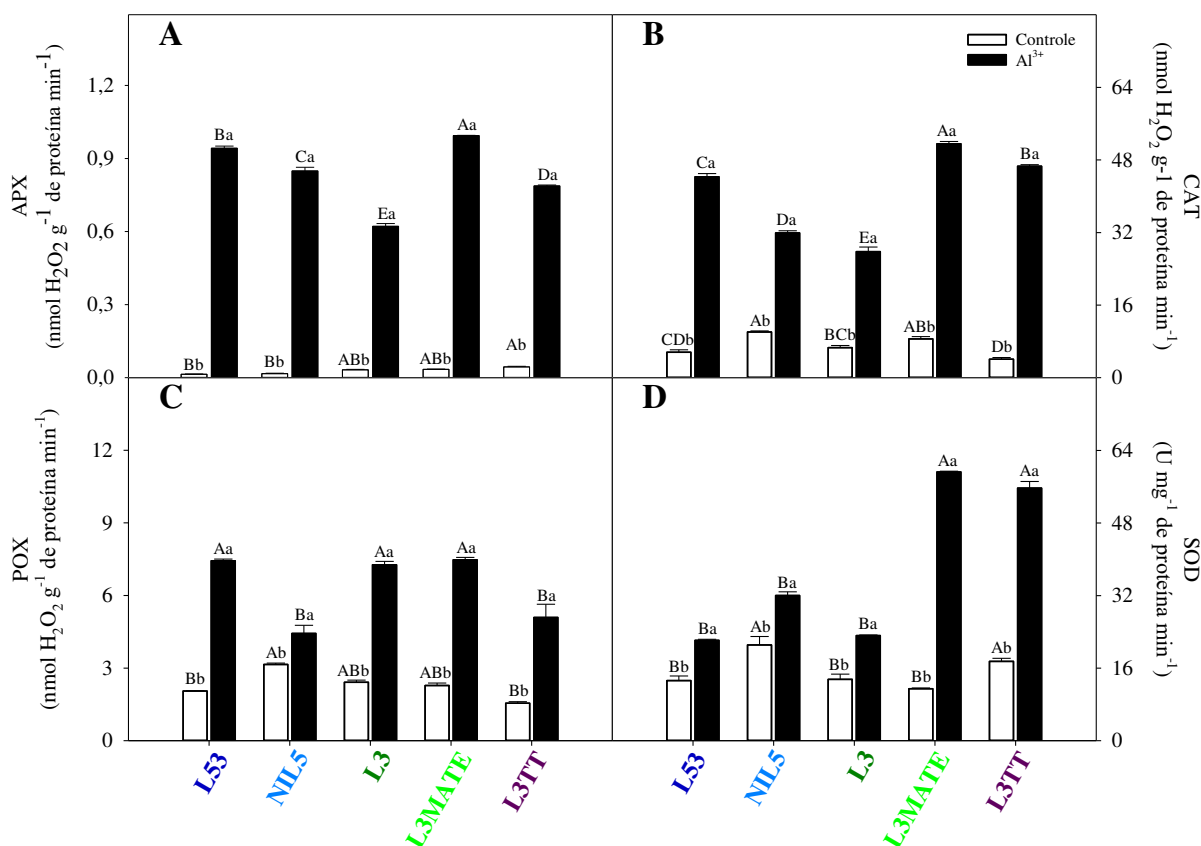
A partir do conteúdo de compostos do sistema oxidativo, fica evidente que as plantas submetidas ao estresse por Al<sup>3+</sup> apresentam um certo desbalanço no sistema antioxidante. Portanto, a atividade de quatro enzimas do sistema antioxidante foi investigada. Foi observado que, após 24h de estresse por Al<sup>3+</sup>, os genótipos tolerantes (L3, LEMATE e L3TT) apresentaram maior atividade da APX que os genótipos sensíveis (L53 e NIL5), ao passo que, em condições controle, não se observaram diferenças entre genótipos (Figura 5A). Não se observaram diferenças para a atividade da CAT em condições controle (Figura 5B), ao passo que, em resposta ao estresse por Al<sup>3+</sup>, a linhagem sensível L53 e as linhagens tolerantes L3 e L3TT também foram caracterizadas por maior atividade da CAT, com pouca ou nenhuma diferença entre presença e ausência de Al<sup>3+</sup> para as linhagens NIL5 e L3MATE (Figura 5B). Após 24h de estresse por Al<sup>3+</sup>, as linhagens investigadas diferem pouco entre controle e estresse no que respeita a atividade da POX. Respostas similares entre plantas sensíveis (L53 e NIL5) foram observadas tanto no tratamento controle quanto para o estresse, com pequeno aumento da atividade da SOD em resposta ao estresse por Al<sup>3+</sup> (Figura 5D). Os genótipos tolerantes (L3, L3MATE e L3TT) apresentaram aumento significativo na atividade dessa enzima em resposta ao estresse por Al<sup>3+</sup> destacando-se o genótipo L3, que apresentou uma atividade quase três vezes superior quando comparado ao seu controle.



**Figura 5.** Atividade das enzimas antioxidantes, **A.** APX; **B.** CAT; **C.** POX; **D.** SOD, em cinco genótipos de milho (*Z. mays*) com tolerância diferencial ao alumínio em raízes. A determinação foi feita após 24 horas de tratamento com 0 e {39}  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$  em solução nutritiva. Linhagem L53, sensível ao Al; NIL5, linha introgridida do gene *ZmMATE1* em L53; L3, linhagem elite de milho com tolerância intermediária ao Al; L3MATE, linhagem L3 introduzida com o gene *ZmMATE1* e; L3TT, inserção transgênica do gene *SbMATE* na linhagem L3. As barras representam a média + EP de cinco réplicas biológicas. As letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre os genótipos dentro de um mesmo tratamento e, as letras minúsculas denotam diferenças significativas do genótipo entre os tratamentos pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Assim como ocorreu após 24h de exposição ao  $\text{Al}^{3+}$ , a atividade de APX apresentou incrementos em plantas após 72h de estresse, fato este verificado para todos os genótipos, com pequena variação na ausência de estresse (Figura 6A). Semelhantemente ao encontrado para a enzima APX, a atividade da CAT não variou em condições ótimas entre os genótipos; todavia, após 72h de estresse, a atividade da CAT foi maior quando comparado com 24h de estresse para todos os genótipos, sendo que os genótipos tolerantes (L3MATE e L3TT) apresentaram maiores valores quando comparados com as linhagens sensíveis (Figura 6B). A atividade de POX foi também invariante na ausência de estresse entre os genótipos (Figura 6C). Após 72h de exposição ao  $\text{Al}^{3+}$ , as plantas sob estresse apresentam maiores atividades que plantas controle, principalmente as linhagens tolerantes (L3, L3MATE e L3TT) (Figura 6B). A atividade da SOD (Figura 6D), após 72h de estresse, foi caracterizada por aumentos

consideráveis em comparação com as plantas sob estresse por 24h, sobretudo nos genótipos tolerantes (L3MATE e L3TT).



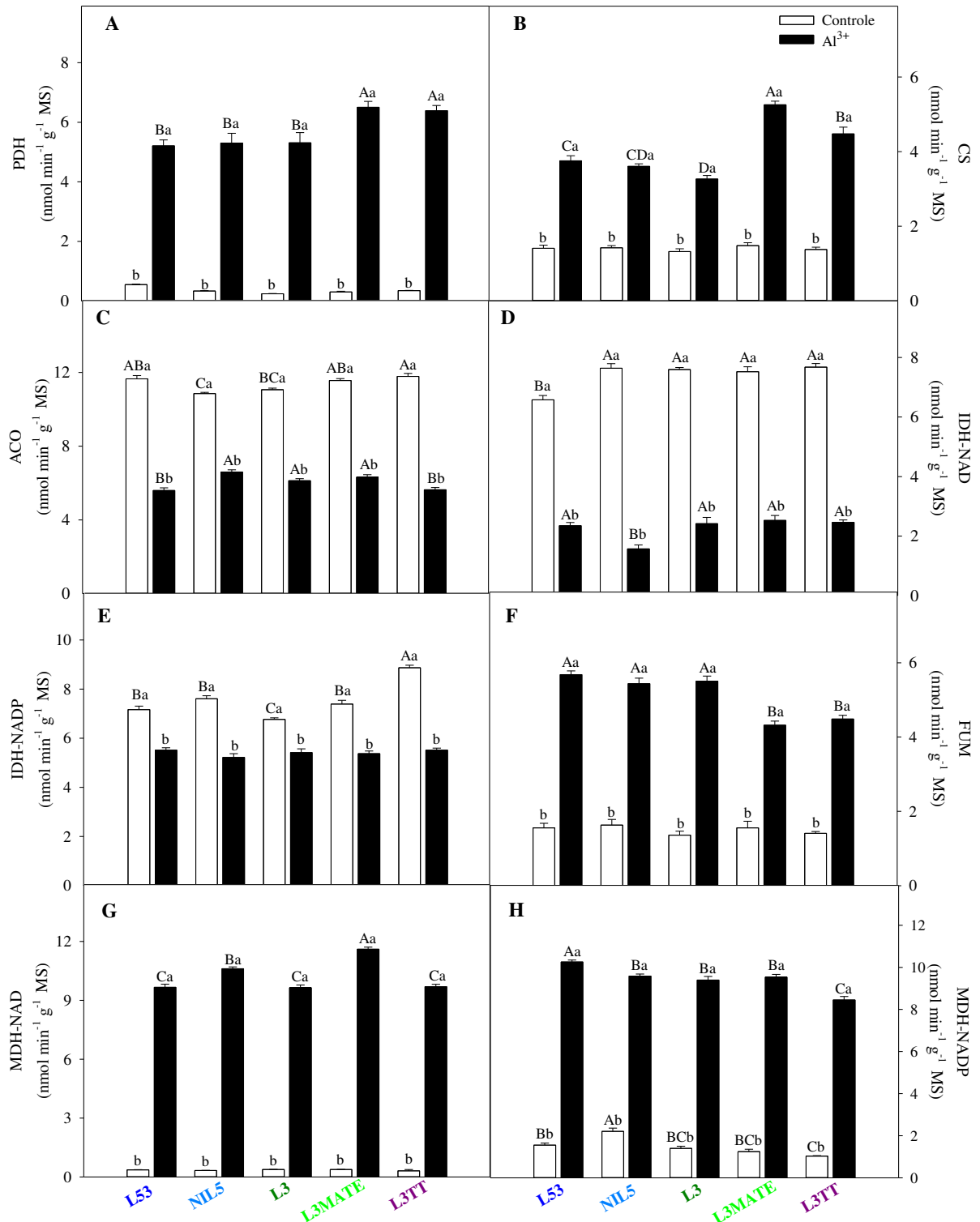
**Figura 6.** Atividade das enzimas antioxidantes, **A.** APX; **B.** CAT; **C.** POX; **D.** SOD, em cinco genótipos de milho (*Z. mays*) com tolerância diferencial ao alumínio em raízes. A determinação foi feita após 72 horas de tratamento com 0 e {39}  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$  em solução nutritiva. Linhagem L53, sensível ao Al; NIL5, linha introgridida do gene *ZmMATE1* em L53; L3, linhagem elite de milho com tolerância intermediária ao Al; L3MATE, linhagem L3 introduzida com o gene *ZmMATE1* e; L3TT, inserção transgênica do gene *SbMATE* na linhagem L3. As barras representam a média + EP de cinco réplicas biológicas. As letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre os genótipos dentro de um mesmo tratamento e, as letras minúsculas denotam diferenças significativas do genótipo entre os tratamentos pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

### 3.4. Atividade do ciclo TCA é modificada pela presença do $\text{Al}^{3+}$

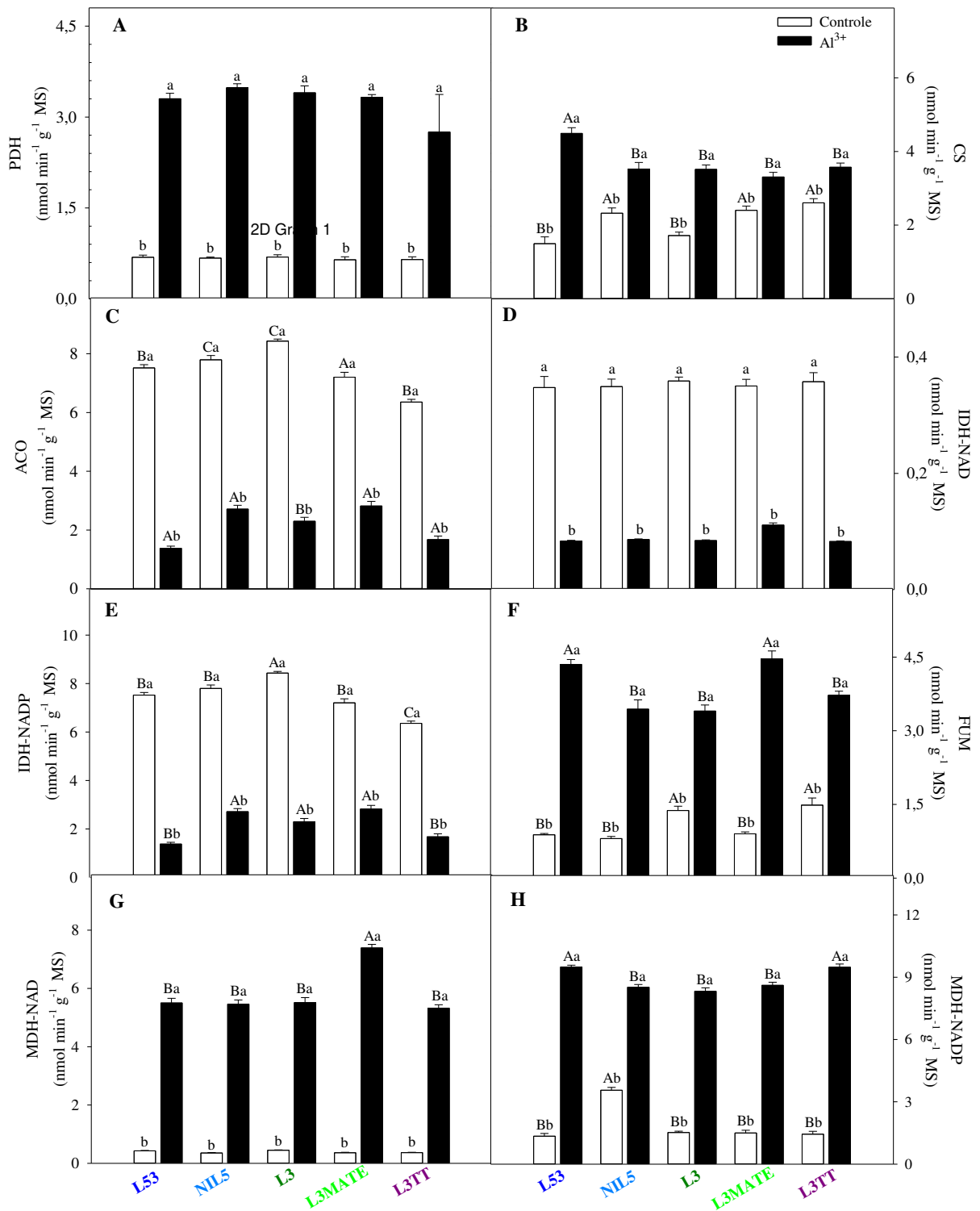
Na tentativa de elucidar ainda mais o papel do  $\text{Al}^{3+}$  na tolerância diferencial observada em genótipos de milhos, a atividade de algumas enzimas envolvidas no metabolismo de ácidos orgânicos (Figura 7) foi também investigada. De modo geral, não foram observadas diferenças entre os genótipos na ausência de estresse. Após a exposição ao  $\text{Al}^{3+}$  por 24h, a atividade da PDH aumentou significativamente, independente do genótipo, em relação à condição controle (Figura 7A). Padrão similar foi observado para a CS (Figura 7B), com os genótipos tolerantes (L3MATE e L3TT) apresentando incrementos na atividade dessa enzima. Diferentemente do verificado para outras enzimas, a atividade das enzimas ACO (Figura 7C),

IDH-NAD (Figura 7D) e da IDH-NADP (Figure 7E) foi reduzida nos genótipos em resposta ao estresse em comparação com o tratamento controle. Embora pequenas diferenças entre os genótipos, seja na condição controle ou após tratamento, tenham sido observados, chama-se atenção o fato de que a redução da atividade dessas enzimas foi superior a 50% (Figura 7C-E). Os genótipos sensíveis (L53 e NIL5) apresentaram maiores incrementos na atividade da FUM após a exposição ao  $Al^{3+}$  por 24h (Figura 7F). O padrão de atividade enzimática de MDH-NAD e MDH-NADP (Figura 7G e H, respectivamente) foi consideravelmente aumentada após a exposição ao  $Al^{3+}$ , independente do genótipo avaliado.

Após exposição ao  $Al^{3+}$  por 72h, a atividade da PDH (Figura 8A) se manteve muito próxima da observada as 24h (Figura 7A). A atividade da CS parece seguir um padrão entre os genótipos após exposição ao  $Al^{3+}$ , com ênfase para o L53, que apresenta uma maior atividade em relação ao demais genótipos (Figura 8B). Em presença de  $Al^{3+}$  uma diminuição acentuada na atividade da ACO foi observada após 72h estresse (Figura 8C), embora uma maior atividade tenha sido observada nas linhagens tolerantes L3MATE e L3TT (Figura 8C). Apesar da relativamente baixa atividade da IDH-NAD, é possível observar, independentemente do genótipo, uma redução acentuada na atividade desta enzima após a exposição ao  $Al^{3+}$  (Figura 8D). A atividade da IDH-NADP é significativamente menor, em todos os genótipos, após a exposição ao  $Al^{3+}$ , destacando-se as linhagens sensíveis L53 e NIL5 (Figura 8E). A atividade da FUM aumentou em resposta ao estresse, com destaque, novamente, para das linhagens tolerantes L3MATE e L3TT e a linhagem sensível L53 (Figura 8F). A atividade das enzimas MDH-NAD e MDH-NADP (Figura 8G-H) foram também aumentadas em presença do  $Al^{3+}$ .



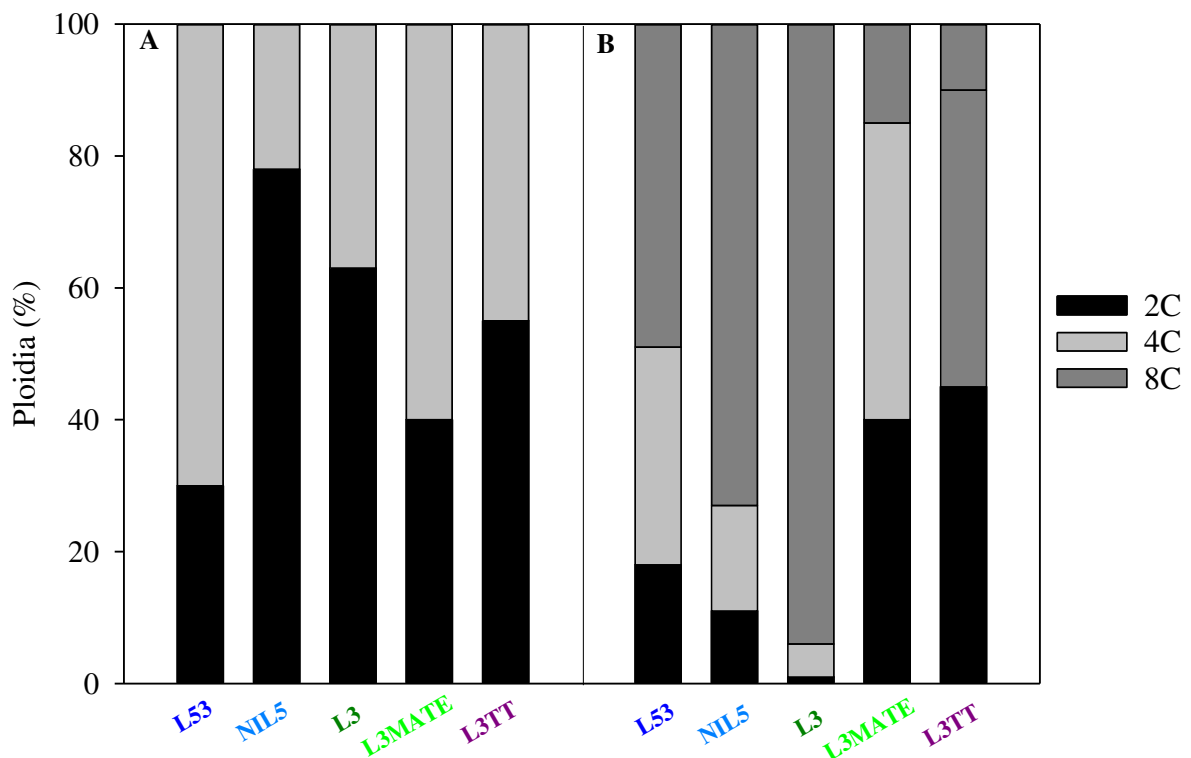
**Figura 7.** Atividade das enzimas do metabolismo de ácidos orgânicos em raízes em resposta a exposição ao Al<sup>3+</sup>. **A.** PDH; **B.** CS; **C.** ACO; **D.** IDH-NAD; **E.** IDH-NADP; **F.** FUM; **G.** MDH-NAD; **H.** MDH-NADP, em cinco genótipos de milho (*Z. mays*) com tolerância diferencial ao alumínio. Linhagem L53, sensível ao Al; NIL5, linha introgridida do gene *ZmMATE1* em L53; L3, linhagem elite de milho com tolerância intermediária ao Al; L3MATE, linhagem L3 introduzida com o gene *ZmMATE1* e; L3TT, inserção transgênica do gene *SbMATE* na linhagem L3. A determinação foi feita após 24 horas de tratamento com 0 e {39}  $\mu\text{M}$  de Al<sup>3+</sup> em solução nutritiva. As barras representam a média + EP de cinco réplicas biológicas. As letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre os genótipos dentro de um mesmo tratamento e, as letras minúsculas denotam diferenças significativas do genótipo entre os tratamentos pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ).



**Figura 8.** Atividade das enzimas do metabolismo de ácidos orgânicos em raízes em resposta a exposição ao Al<sup>3+</sup>. **A.** PDH; **B.** CS; **C.** ACO; **D.** IDH-NAD; **E.** IDH-NADP; **F.** FUM; **G.** MDH-NAD; **H.** MDH-NADP, em cinco genótipos de milho (*Z. mays*) com tolerância diferencial ao alumínio. Linhagem L53, sensível ao Al; NIL5, linha introgridida do gene *ZmMATE1* em L53; L3, linhagem elite de milho com tolerância intermediária ao Al; L3MATE, linhagem L3 introduzida com o gene *ZmMATE1* e; L3TT, inserção transgênica do gene *SbMATE* na linhagem L3. A determinação foi feita após 72 horas de tratamento com 0 e {39}  $\mu\text{M}$  de Al<sup>3+</sup> em solução nutritiva. As barras representam a média + EP de cinco réplicas biológicas. As letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre os genótipos dentro de um mesmo tratamento e, as letras minúsculas denotam diferenças significativas do genótipo entre os tratamentos pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

### 3.5. Exposição ao alumínio tóxico e alterações na ploidia de células radiculares

Os ápices radiculares foram isolados com o intuito de se avaliar a ploidia em resposta ao estresse por  $Al^{3+}$ . Assim, as divisões celulares nos ápices radiculares de plantas jovens foram monitoradas utilizando o citômetro de fluxo. Essa análise permitiu observar que, na ausência de  $Al^{3+}$ , os genótipos apresentaram comportamento similar, com a maior proporção de células 2C poliploides (4C) nos meristemas apicais (Figura 9A). Foi também observado que, em resposta ao estresse por  $Al^{3+}$ , os genótipos se caracterizaram pela manutenção da capacidade proliferativa potencial (células 2C-8C) (Figura 9B). Cabe mencionar também que, além de aumentar a proporção de células 8C, a presença do  $Al^{3+}$  suprimiu o aparecimento de células poliploides (4C) nos meristemas apicais, em especial dos genótipos tolerantes (Figura 9B). Esses resultados sugerem que a tolerância ao  $Al^{3+}$  está, provavelmente, associada à regulação negativa da endorreduplicação.

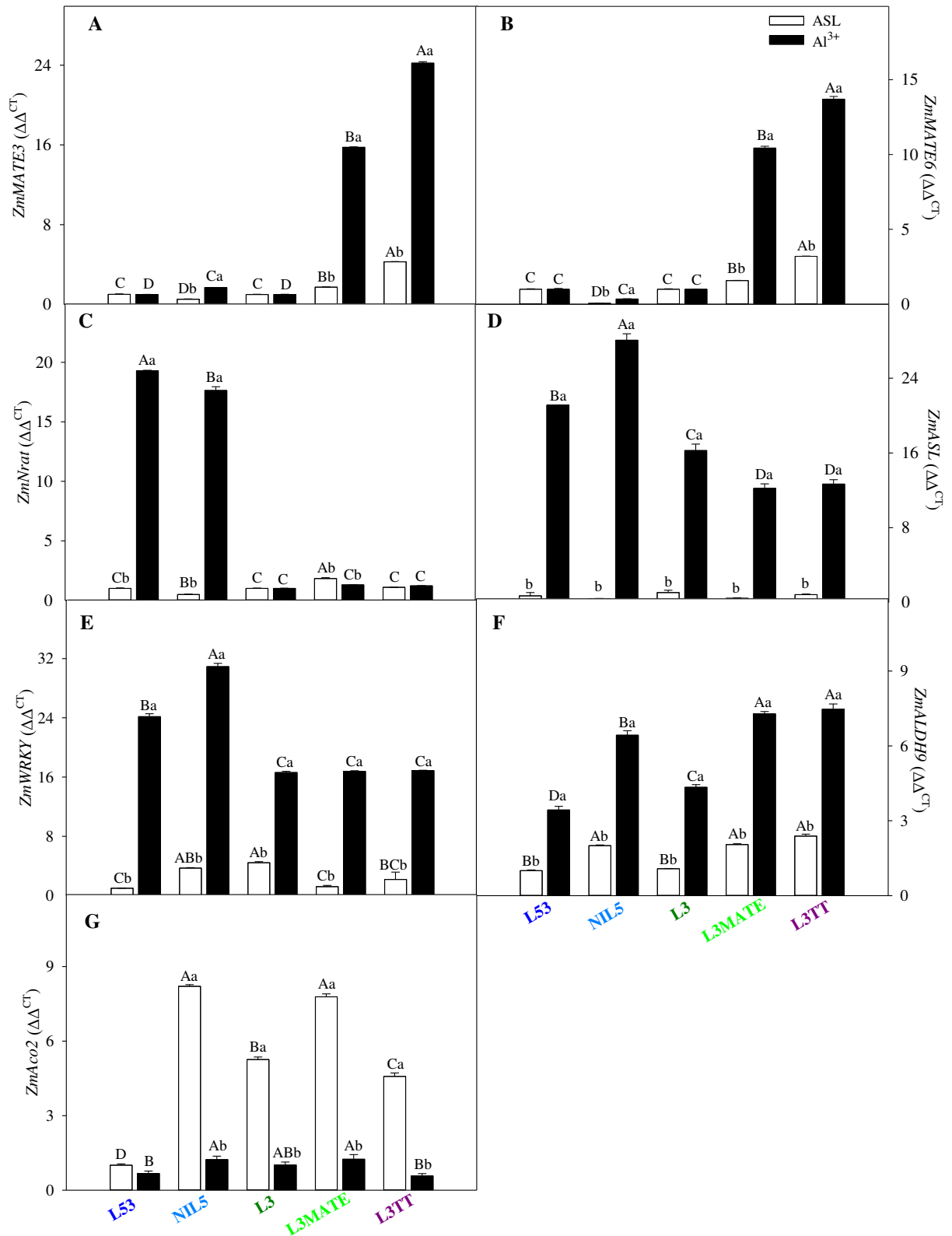


**Figura 9.** Nível de ploidia do DNA (%) de cinco genótipos de milho (*Z. mays*) com tolerância diferencial ao alumínio em raízes. **A.** Controle; **B.**  $Al^{3+}$ . A determinação foi feita após 72 horas de tratamento com 0 e {39}  $\mu M$  de  $Al^{3+}$  em solução nutritiva. Linhagem L53, sensível ao Al; NIL5, linha introgridida do gene *ZmMATE1* em L53; L3, linhagem elite de milho com tolerância intermediária ao Al; L3MATE, linhagem L3 introduzida com o gene *ZmMATE1* e; L3TT, inserção transgênica do gene *SbMATE* na linhagem L3.

### 3.6. Expressão de genes codificando transportadores de ácidos orgânicos e enzimas em resposta ao $Al^{3+}$

A expressão de alguns genes candidatos, cuja função tem sido amplamente associada a tolerância diferencial ao Al, foi também investigada. De modo simplificado, dois genes da

família *MATE*, envolvidos na resposta a exsudação de citrato na raiz: *ZmMATE3* (Figura 13A) e *ZmMATE6* (Figura 13B), tiveram sua expressão positivamente regulada nos genótipos tolerantes (L3MATE e L3TT) expostos ao  $Al^{3+}$ , com pequena ou nenhuma variação para os demais genótipos independentes da presença de  $Al^{3+}$ . Diferentemente do verificado para os genes *MATE*, a expressão do *ZmNrat* (Figura 13C) foi induzida nos genótipos sensíveis expostos ao  $Al^{3+}$  (L53 e NIL5). A expressão dos genes *ZmASL* (Figura 13D) e o *ZmWRKY* (Figura 13E) mostrou-se elevada em todos os genótipos em resposta ao  $Al^{3+}$ , tendo as linhagens sensíveis (L53 e NIL5) apresentado maior expressão. A expressão do gene *ZmALDH9* (Figura 13F) foi maior no tratamento com  $Al^{3+}$ , em especial nos genótipos tolerantes L3MATE e L3TT. A expressão do gene *ZmAco2* (Figura 13G) foi a única em que a expressão foi maior na ausência de  $Al^{3+}$ , seguindo o mesmo padrão da atividade enzimática da aconitase do ciclo TCA (Figura 7C e Figura 8C).



**Figura 13.** Expressão de genes relacionados com a tolerância ao Al<sup>3+</sup> de cinco genótipos de milho (*Z. mays*) com tolerância diferencial ao alumínio em raízes. **A.** *ZmMATE3*; **B.** *ZmMATE6*; **C.** *ZmNrat*; **D.** *ZmASL*; **E.** *ZmWRKY*; **F.** *ZmALDH9*; **G.** *ZmAco2*. A determinação foi feita após 1 hora de tratamento com 0 e {39}  $\mu\text{M}$  de Al<sup>3+</sup> em solução nutritiva. Linhagem L53, sensível ao Al; NIL5, linha introgridida do gene *ZmMATE1* em L53; L3, linhagem elite de milho com tolerância intermediária ao Al; L3MATE, linhagem L3 introduzida com o gene *ZmMATE1* e; L3TT, inserção transgênica do gene *SbMATE* na linhagem L3.

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1. O acúmulo de $Al^{3+}$ ocorre de forma diferencial nos tecidos radiculares

A comparação entre reagentes usados para a detecção de alumínio tem sido pouco estudada. Não obstante, De Andrade et al, (2011) observaram variações importantes trabalhando com *Magonia pubescens* (Sapindaceae) e *Palicourea rigida* (Rubiaceae), ambas espécies de Cerrado, ainda que utilizando diferentes reagentes. Segundo esses autores, as discrepâncias observadas poderiam ser explicadas, ao menos em parte, por diferenças na permeabilidade de membranas a determinado reagente.

A utilização dos reagentes hematoxilina e chrome azurol S, em materiais não incluídos, ou seja, material não emblocado, tem sido recomendada devido a facilidade no preparo, obtenção e estoque das respectivas soluções em laboratório (Andrade et al, 2011; Carvalho Júnior, 2012 e Malta et al, 2016). Os resultados aqui obtidos indicam a presença de sítios de acúmulo de  $Al^{3+}$  em todos os genótipos utilizados, embora a intensidade de reação (Tabela 2) tenha sido variável entre os genótipos. De modo simplificado, maior número de sítios de acúmulo de  $Al^{3+}$ , sobretudo reações positivas fortes para os corantes utilizados, foram observados em genótipos sensíveis ao passo que os genótipos tolerantes (L3, L3MATE e L3TT) apresentaram menor acúmulo aparente de  $Al^{3+}$ . Tomados em conjunto, os resultados obtidos que a histolocalização de sítios de acúmulo de Al apresenta-se como uma ferramenta promissora na delimitação de tolerância diferencial ao Al em plantas de milho.

### 4.2. O tempo de exposição ao $Al^{3+}$ impacta as respostas antioxidantes

O impacto fitotóxico de  $Al^{3+}$  no milho pode ser uma consequência coletiva não apenas da síntese reduzida de componentes da parede celular mas também da menor aquisição de nutrientes essenciais, como por exemplo o fósforo (Mohnish e Nikhil, 2016). A maior atividade de CAT (Figuras 5/6B e Tabela Suplementar 2), provavelmente em resposta à elevada produção de  $H_2O_2$  (Figuras 3/4A), bem como as mudanças nas atividades de APX (Figuras 5/6A), POX (Figuras 5/6C) e SOD (Figuras 5/6D) indicam consideráveis danos celulares por  $Al^{3+}$ . Em consonância com os resultados aqui obtidos, níveis aumentados da atividade de SOD (Zhou et al, 2021), CAT (Youssef et al, 2020) e POX (Akdemir, 2021) em tecidos de milho tem sido associados à maiores concentrações intracelulares de Al (Zhou et al, 2021).

Em resposta ao estresse por Al, a maquinaria de defesa das plantas de milho parece aumentar a atividade de enzimas antioxidantes (Figura 5 e 6). Tais enzimas protegem, até certo ponto, as plantas dos impactos negativos das espécies reativas de oxigênio (EROs) e da

peroxidação lipídica ao (i) manter o equilíbrio osmótico e a homeostase e também ao (ii) extinguir o oxigênio singlete e os radicais livres (Wang et al, 2015). Tais resultados explicam, ao menos em parte, a tolerância diferencial observada nos genótipos de milho ora utilizados.

De modo geral, as plantas geralmente controlam os níveis de EROs e mantêm um delicado equilíbrio entre a geração e eliminação de ROS nas células para evitar a explosão oxidativa celular. Cabe ressaltar também que, a atividade de todas as enzimas antioxidantes, aqui mensuradas, foi caracterizada por apresentar tendências de aumento nas plantas expostas ao  $Al^{3+}$ . Com efeito, as atividades enzimáticas foram significativamente menores em plantas controle (ausência de estresse) e elevadas as 72h em comparação com 24h de exposição ao  $Al^{3+}$ , particularmente nos genótipos considerados tolerantes. Em síntese, os resultados aqui obtidos indicam que, mesmo nos genótipos tolerantes, o Al é absorvido e para evitar danos oxidativos a atividade do sistema antioxidante é incrementada, mesmo após apenas 24hs de exposição ao Al.

#### **4.3. Metabolismo dos ácidos orgânicos é modificada pela presença do $Al^{3+}$**

O ciclo TCA é uma via contendo oito enzimas cujas funções são oxidar acetil-CoA em  $CO_2$  e produzir NADH,  $FADH_2$ , ATP, além de produzir intermediários importantes para processos metabólicos vários, tais como assimilação de nitrogênio, fotossíntese, regulação de enzimas e fotorrespiração (Nunes-Nesi et al, 2014). A atividade das enzimas do ciclo TCA também está relacionada aos mecanismos de resistência ao Al em plantas, tendo em vista sua relação com a biossíntese de ácidos orgânicos capazes de complexar o Al (Nunes-Nesi et al, 2014).

Entre as enzimas envolvidas no metabolismo de ácidos orgânicos, a PDH é considerada um dos principais alvos da toxicidade por Al, levando ao estresse oxidativo (Samanta et al, 2020). Os resultados aqui obtidos sugerem maior atividade da PDH em resposta à exposição ao Al. Tais resultados estão associados aos distúrbios metabólicos que ocorrem durante o estresse, resultando em efeitos adversos no metabolismo respiratório. Com efeito, a maior atividade de PDH após a submissão ao  $Al^{3+}$  provavelmente converteu o piruvato de forma mais eficiente em Acetil-CoA, que serve como substrato para a próxima etapa do ciclo TCA, catalisada por CS. Registre-se também que a CS catalisa a primeira etapa efetivamente comprometida no ciclo TCA (Wang et al, 2017), além de atuar também como um índice para o status saudável da mitocôndria. Em consonância, a resposta diferencial do CS após exposição de Al demonstra elevação da atividade dessa enzima sob condição de estresse (Tabela Suplementar 3).

A ACO é uma proteína multifuncional que pode catalisar a isomerização reversível de citrato a isocitrato, a ACO também é uma enzima muito sensível a estresse oxidativo. (Wang et al, 2017). Em nosso estudo, Al promove uma diminuição drástica da atividade da ACO, inibindo a produção de isocitrato (Tabela Suplementar 3). As diversas NADP desidrogenases vegetais (NADP-DHs) estão presentes nos principais compartimentos subcelulares onde podem estar envolvidas em processos e mecanismos de resposta a uma grande variedade de estresses abióticos, como aquelas desencadeadas pelos metais pesados (Corpas et al, 2021). A IDH converte, de maneira reversível, isocitrato em 2-oxoglutarato, conectando assim os metabolismos de carbono e nitrogênio (Zhou et al, 2012). No metabolismo do nitrogênio, a IDH participa na assimilação de amônio e biossíntese de aminoácidos (Samanta et al, 2020). Aqui, observa-se um acentuado declínio na atividade de IDH-NAD e IDH-NADP após a exposição ao Al (Figura 7D e 7E e Figura 8D e 8E). É plausível sugerir que a reduzida atividade de IDH em plantas sob estresse impactem drasticamente a produção de ácidos orgânicos e, em última instância, perturbem o metabolismo como um todo durante condições de estresse (Tabela Suplementar 3). Trabalhos futuros serão necessários para identificar como o perfil metabólico é afetado nesses distintos genótipos.

López-Millán et al, (2009) realizaram um trabalho com meristemas apicais de tomate (*Solanum lycopersicon*) e perceberam que a atividade da FUM aumenta progressivamente à medida que a concentração de Al na solução nutritiva aumenta. Essa enzima apresenta maior atividade na mitocôndria e, portanto, é um marcador conveniente para a matriz mitocondrial (Bergmeyer et al, 1974). Observou-se aqui que materiais mais tolerantes não aumentaram tanto a atividade da FUM quanto aqueles menos tolerantes (Figura 7F e Figura 8F). Em adição, MDH-NAD e MDH-NADP apresentaram maior atividade nas plantas expostas ao Al (Figura 7G e 7H e Figura 8G e 8H). Assim, as isoformas de MDH localizadas no plastídio e que podem ser reguladas por alterações no redox, podem representar um sistema estratégico para equilibrar o status redox em células vegetais e cloroplastos, contribuindo para os mecanismos de resistência ao Al.

Em conjunto, esses resultados sugerem que a produção (e potencial exsudação) de ácidos orgânicos seja parte fundamental, mas não única, da resposta diferencial ao Al observada em genótipos de milho.

#### **4.4. Alumínio promove alterações na ploidia de células radiculares**

A interrupção do ciclo celular e os danos no DNA resultantes da toxicidade do Al são duas das principais alterações celulares que comprometem o crescimento de plantas

submetidas a tal estresse. De modo simplificado, o estresse por Al culmina no bloqueio do ciclo celular e altera a endoploidia do DNA, induzindo a diferenciação das células meristemáticas apicais (RAM) da raiz, em um processo conhecido como exaustão do meristema (Siqueira, et al, 2022). O controle espaço-temporal da endoploidia do DNA foi demonstrado nos tecidos radiculares, indicando uma endoploidia elevada nas raízes que lidam com baixo pH (4) (Siqueira, et al, 2022). Com efeito, os resultados aqui obtidos sugerem que a endorreducação promove um aumento no nível de ploidia do DNA em vários tipos celulares devido, provavelmente, à alterações no controle do ciclo celular em resposta ao estresse por Al. Cabe mencionar, também, que esse fenômeno ocorre apenas em células metabolicamente ativas e altamente especializadas e permite a replicação do DNA na ausência de mitose, aumentando os níveis de endoploidia do DNA e regulando o destino das células radiculares (Praça-Fontes et al, 2011). A endorreducação é, portanto, uma via alternativa que evita a interrupção do ciclo celular ou a morte celular devido a danos no DNA (Otto, 1990). Neste contexto, é plausível sugerir que a maior endorreducação observada em genótipos mais tolerantes ao Al garanta a manutenção do ciclo celular e, logicamente, do crescimento radicular ao mesmo tempo que minimiza a morte celular em presença de Al.

#### **4.5. O padrão de expressão de transportadores e enzimas importantes na tolerância ao Al<sup>3+</sup> é modificado**

A expressão do *ZmMATE3*, que foi regulada positivamente na linhagem tolerante (L3MATE e L3TT) após 60 min de tratamento com Al<sup>3+</sup> sendo também observado a expressão em níveis mais altos deste gene na linha tolerante ao Al (Figura 13A). A expressão de *ZmNrat1* foi induzida pelo Al no ápice radicular da linhagem tolerante ao Al após 6 horas, atingindo um platô entre 12 e 24 horas de exposição ao Al (Figura 13C). A expressão de *ZmWRKY* foi maior na linhagem sensível ao Al do que na linhagem tolerante ao Al. É importante mencionar que os resultados aqui obtidos (Figura 13A, Figura 13C e Figura 13D; Tabela Suplementar 4) estão, em larga escala, em consonância com resultados anteriormente descritos por Matonyei et al, (2020).

Tem sido demonstrado que *ZmMATE6* é constitutivamente expresso em milho, com expressão variável em ápices radiculares, raízes maduras e folhas (Du et al, 2021). Em adição, esse padrão de expressão bem como a sua indução por Al<sup>3+</sup> foram confirmadas em plantas transgênicas de *Arabidopsis* expressando o promotor *ZmMATE6* (Du et al, 2021). Níveis mais elevados da expressão de *ZmMATE6* foram observados após 12h de tratamento com 60 µM de AlCl<sub>3</sub> (pH 4,2) e, decorrido este período, sua expressão diminui novamente (Du et al, 2021).

Cumpra mencionar que o fato do gene *ZmMATE6* ser amplamente expresso em toda a planta, e não apenas nos ápices radiculares, não o impede de estar diretamente envolvido na resistência ao Al. Em consonância com essa hipótese, os resultados aqui obtidos indicam uma maior tolerância ao Al em plantas de milho que expressam o gene *MATE*, seja oriundo de milho ou sorgo. Não obstante, os resultados sugerem ainda que uma combinação de mecanismos, incluindo metabólicos, moleculares e antioxidantes, seja também parte fundamental dessa resposta de tolerância em milho.

O aumento da expressão gênica do *ZmALDH* é uma estratégia de defesa eficiente para eliminar os aldeídos tóxicos causados por EROs (Rodrigues et al, 2006). Com efeito, os padrões de expressão de genes *ZmALDH* de diferentes plantas modelo foram investigados em resposta a diferentes estresses sendo possível demonstrar que a superexpressão de alguns genes *ZmALDH*, os quais são induzidos por estresse, aumenta a tolerância ao estresse em plantas transgênicas (Rodrigues et al, 2006). Ademais, o gene homólogo ao *AltSB*, o principal gene de tolerância ao Al em *Sorghum bicolor*, é referido como *ZmASL* (*Zea mays AltSB*-like) (Krill et al, 2010). No presente estudo, o gene *ZmASL* apresentou uma expressão elevada em respostas ao Al, diferentemente do encontrado por Krill et al, (2010), onde a expressão do gene foi inferior nas plantas sob estresse, sendo o oposto do observado aqui. Neste contexto, é plausível sugerir que futuros esforços sejam direcionados ao controle da expressão deste gene em resposta ao estresse por Alumínio.

## 5. CONCLUSÕES

Embora não exista relação direta entre a quantidade de Al acumulado e a intensidade de reação, a histolocalização com o uso de reagentes diversos possibilitou a identificação do acúmulo diferencial de Al tanto nos tecidos radiculares quanto nos genótipos aqui utilizados. Em adição, a histolocalização do Al esteve, em larga escala, associada com a tolerância diferencial dos genótipos de milho. Ademais, a tolerância diferencial ao Al está provavelmente associada a regulação negativa da endoreduplicação, promovendo um aumento no nível de ploidia do DNA em tipos celulares vários o que poderia ser explicado, ao menos em parte, devido a alterações no controle do ciclo celular. Na ausência da mitose, a endoreduplicação permite a replicação do DNA, aumentando os níveis de endoploidia do DNA e regulando o destino das células radiculares. Cabe ressaltar também que os resultados aqui obtidos indicam que os genótipos de milho tolerantes ao Al (e muito provavelmente plantas tolerantes ao Al em geral) usam de uma conectada rede de defesa antioxidante, composta por enzimas antioxidativas (e.g. SOD e POD) bem como moléculas antioxidantes, de forma a minimizar os danos oxidativos, controlar a meia vida das EROs, bem como prevenindo a oxidação descontrolada. É plausível sugerir também que esse controle fino permite que parte dessas EROs atue como mensageiros secundários em cascatas de transdução de sinal que auxiliam na resposta ao estresse por Al.

Os resultados aqui obtidos confirmam a maior tolerância ao Al em plantas de milho que expressam o gene *MATE*. Com efeito, os resultados sugerem também que uma combinação de mecanismos, incluindo metabólicos, moleculares e antioxidantes, seja também parte fundamental dessa resposta. Assim, o potencial papel dos genes *ZmALDH9* e *ZmASL* nas respostas ao estresse por Al em milho foi evidenciado, reforçando que a combinação de mecanismos é crucial para a resposta ao Al particularmente em culturas de interesse agrônomico. É possível que a elevada expressão de *ZmASL*, *ZmWRKY* e *ZmALDH9* seja, portanto, capaz de melhorar significativamente a tolerância ao Al no milho. Assim, podemos esperar que uma grande proporção das linhas modernas de milho, que variam de sensível ao Al (L53) a intermédio em termos de tolerância ao Al (L3), possam ser geneticamente melhoradas para a tolerância ao Al através da introgressão assistida por marcadores desta região genômica ou mesmo da engenharia genética. Neste contexto, os dados aqui discutidos sugerem um potencial papel dos genes *ZmALDH9* e *ZmASL* na resposta ao estresse por Al em milho, reforçando que a combinação de mecanismos é crucial para a resposta ao Al em culturas de interesse agrônomico.

Tomados em conjunto, os resultados aqui descritos sugerem ainda que a tolerância ao Al observada em plantas de milho não se restringe somente às raízes e à exsudação de ácidos orgânicos, estando também associada, em larga escala, à uma combinação de mecanismos. Nossos resultados fornecem, portanto, novas hipóteses sobre os mecanismos de tolerância ao Al no milho (e.g. atividade de enzimas do ciclo TCA, sistema antioxidante robusto, controle do ciclo celular e genes relacionados à tolerância ao Al), que se apresentam com implicações diretas para o desenvolvimento da planta mais tolerantes ao estresse por  $Al^{3+}$ . Embora os resultados aqui apresentados indiquem a existência de mecanismos distintos e complexos de resistência e/ou tolerância à Al, é plausível sugerir que, coletivamente, tais mecanismos sejam capazes de explicar a tolerância diferencial ao Al bem como proporcionar uma melhor compreensão dos mecanismos utilizados por esses genótipos do milho para evitar ou minimizar a toxicidade da Al. Trabalhos futuros são ainda necessários para combinar geneticamente tais mecanismos e aumentar o nosso conhecimento acerca da resposta de plantas em geral a esse tão importante estresse abiótico.

## 6. REFERÊNCIAS

- Ahmed B, et al** (2022) Understanding the phytotoxic impact of Al<sup>3+</sup>, nano-size, and bulk Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> on growth and physiology of maize (*Zea mays* L.) in aqueous and soil media. *Chemosphere*, **300**: 134555
- Ahn SJ, Rengel Z, Matsumoto H** (2004) Aluminum-induced plasma membrane surface potential and H<sup>+</sup>-ATPase activity in near-isogenic wheat lines differing in tolerance to aluminum. *New Phytologist* **162**(1): 71-79. doi:10.1111/j.1469-8137.2004.01009.x
- Akdemir H** (2021) Evaluation of transcription factor and aquaporin gene expressions in response to Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and ZnO nanoparticles during barley germination. *Plant Physiology and Biochemistry*, **166**: 466-476
- Alscher RG, Erturk N, Heath LS** (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of experimental botany*, **53**(372): 1331-1341
- Bergmeyer H, Gawwehn K, Grassl M** (1974) Enzymes as biochemical reagents. In: Bergmeyer H (ed) *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York, pp 425–556
- Bot A, Nachtergaele F, Young A** (2000) Land resource potential and constraints at regional and country levels. Food & Agriculture Org.
- 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
- Cakmak I, Horst WJ** (1991) Effect of aluminium on net efflux of nitrate and potassium from root tips of soybean (*Glycine max* L.). *Journal of plant physiology*, **138**: 400-403
- Carvalho Júnior. WGO** (2012) Analysis of histolocalization techniques of aluminum in leaves of Cerrado species. 50 f. Dissertação (Mestrado em Botânica estrutural; Ecologia e Sistemática) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Chance B, Maehly AC** (1955) [136] Assay of catalases and peroxidases
- Chen P, Sjogren CA, Larsen PB, Schnittger A** (2019) A multi-level response to DNA damage induced by Aluminium. *The Plant Journal* **98**: 479–491

**Chen Q, Wu K, Zhang Y, Xuan-Huyen P, Li K, Yu Y, Chen L** (2019) Physiological and molecular responses of broad bean (*Vicia faba* L.) to aluminum stress. *Acta Physiologiae Plantarum* **34**:2251–2263. doi:10.1007/s11738-012-1026-7

**Corpas FJ, González-Gordo S, Palma JM** (2021) Nitric oxide and hydrogen sulfide modulate the NADPH-generating enzymatic system in higher plants. *Journal of Experimental Botany*, **72**: 830-847

**Das S, Majumder B, Biswas AK** (2022) Comparative study on the influence of silicon and selenium to mitigate arsenic induced stress by modulating TCA cycle, GABA, and polyamine synthesis in rice seedlings. *Ecotoxicology* pp 1-22

**De Andrade LRM, et al** (2011). Al-hyperaccumulator Vochysiaceae from the Brazilian Cerrado store aluminum in their chloroplasts without apparent damage. *Environmental and Experimental Botany* **70**: 37-42

**De Noronha ALO, Guimarães L, Duarte HA** (2007) Structural and Thermodynamic Analysis of the First Mononuclear Aqueous Aluminum Citrate Complex Using DFT Calculations. *Journal of Chemical Theory and Computation* **3(3)**: 930-937

**Del Longo OT, González A, Pastori G, Trippi VS** (1993) Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. *Plant Cell Physiology*, **34**: 1023-1028

**Delhaize E, Ryan PR, Hebb DM, Yamamoto Y, Sasaki T, Matsumoto H** (2004) Engineering high-level aluminum tolerance in barley with the *ALMT1* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **101**: 15249-15254

**Denton J, Oughton DH** (1993) The use of an acid solochrome azurine stain to detect and assess the distribution of aluminum in Sphagnum moss. *Ambio* **22**: 19-21

**Du H, et al** (2021) *ZmMATE6* from maize encodes a citrate transporter that enhances aluminum tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, **311**: 111016

**Fieuw S, Muller-Rober B, Galvez S, Willmitzer L** (1995) Cloning and expression analysis of the cytosolic NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase from potato (implications for nitrogen metabolism). *Plant Physiology*, **107**: 905-913

**Furukawa J, et al.** (2007) An aluminum-activated citrate transporter in barley. *Plant Cell Physiol* **48**:1081–1091. doi: 10.1093/pcp/pcm091

**Giannopolitis CN, Ries SK** (1997) Superoxide dismutases: Occurrence in higher plants. *Plant Physiology* **59**: 309-314

**Guimaraes CT, et al** (2014) Genetic dissection of Al tolerance QTLs in the maize genome by high density SNP scan. *BMC Genomics* **15**: 1–14

**Haridasan M, Paviani TI, Schiavini I** (1986) Localization of aluminium in the leaves of some aluminium-accumulating species. *Plant and Soil* **94**: 435-437

**Hebbelmann I, et al** (2012) Multiple strategies to prevent oxidative stress in Arabidopsis plants lacking the malate valve enzyme NADP-malate dehydrogenase. *Journal of experimental botany*, **63**: 1445-1459

**Jansen S, Watanabe T, Caris P, Geuten, K, Lens F, Pyck N, Smets E** (2004) The distribution and phylogeny of aluminium accumulating plants in the Ericales. *Plant Biology* **6(04)**: 498-505

**Jones DL** (1998) Organic acids in the rhizosphere—a critical review. *Plant and soil*, **205(1)**: 25-44

**Kagawa T, Bruno PL** (1988) NADP-malate dehydrogenase from leaves of *Zea mays*: purification and physical, chemical, and kinetic properties. *Archives of biochemistry and biophysics* **260**: 674-695

**Ke Y, et al.** (2020) The versatile functions of OsALDH2B1 provide a genic basis for growth–defense trade-offs in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **117(7)**: 3867-3873

**Kennedy MC, Emptage MH, Dreyer JL, Beinert H** (1983) The role of iron in the activation-inactivation of aconitase. *Journal of Biological Chemistry*, **258**: 11098-11105

**Kochian L V., Piñeros MA, Liu J, Magalhaes J V** (2015) Plant Adaptation to Acid Soils: The Molecular Basis for Crop Aluminum Resistance. *Rev Adv* **11**: 1–28

**Kochian LV** (1995) Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Plant & Cell Physiology* **46**: 237–260

**Kochian LV, Hoekenga OA, Piñeros, MA** (2004) How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annual Review of Plant Biology*, **55**:459-493

**Kotchoni SO, Kuhns C, Ditzer A, Kirch HH, Bartels D** (2006) Over-expression of different aldehyde dehydrogenase genes in *Arabidopsis thaliana* confers tolerance to abiotic stress and protects plants against lipid peroxidation and oxidative stress. *Plant, cell & environment* **29(6)**: 1033-1048

**Kraus JE, Arduin M** (1997) Manual básico de métodos em morfologia vegetal

**Krill AM, Kirst M, Kochian LV, Buckler ES, Hoekenga OA** (2010) Association and linkage analysis of aluminum tolerance genes in maize. *Plos one*, **5**: e9958

**Kukachka BF, Miller RB** (1980) A chemical spot-test for aluminum and its value in wood identification. *IAWA Journal*, **1**: 104-109

**Kumar RG, Shah K, Dubey RS** (2000) Salinity induced behavioural changes in malate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase activities in rice seedlings of differing salt tolerance. *Plant Science* **156**: 23-34

**Liu PD, Xue, YB, Chen ZJ, Liu GD, Tian J** (2016) Characterization of purple acid phosphatases involved in extracellular dNTP utilization in *Stylosanthes*. *Journal of Experimental Botany* **67(14)**:4141-4154

**Livak KJ, Schmittgen TD** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *Methods*, **25**: 402-408

**López-Millán AF, Sagardoy R, Solanas M, Abadía A, Abadía J** (2009) Cadmium toxicity in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants grown in hydroponics. *Environmental and experimental botany*, **65**: 376-385

**Magalhaes JV, et al** (2007) A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (*MATE*) family confers aluminum tolerance in sorghum. *Nat Genet* **39**: 1156–1161

**Magnavaca R, Gardner CO, Clark RB** (1987) Inheritance of aluminum tolerance in maize. Genet. Asp. Plant Miner. Nutr. pp 201–212

**Malta PG, Arcanjo-Silva S, Ribeiro C, Campos NV, Azevedo AA** (2016) *Rudgea viburnoides* (Rubiaceae) overcomes the low soil fertility of the Brazilian Cerrado and hyperaccumulates aluminum in cell walls and chloroplasts. Plant and soil, **408**: 369-384.

**Maron LG, Kirst M, Mao C, Milner MJ, Menossi M, Kochian LV** (2008) Transcriptional profiling of aluminum toxicity and tolerance responses in maize roots. New Phytol **179**: 116–128

**Matonyei TK, et al** (2020) Aluminum tolerance mechanisms in Kenyan maize germplasm are independent from the citrate transporter *ZmMATE1*. Scientific reports, **10**: 1-10

**Nunes-Nesi A, Brito DS, Inostroza-Blancheteau C, Fernie AR, Araújo WL** (2014) The complex role of mitochondrial metabolism in plant aluminum resistance. Trends in Plant Science, **19**: 399-407

**Nunes-Nesi A, et al** (2007) Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. Plant J **50**:1096-1106.

**Otto F** (1990) DAPI Staining of Fixed Cells for High-Resolution Flow Cytometry of Nuclear DNA. Methods Cell Biol. **33**: 105–110. doi:10.1016/S0091-679X(08)60516-6

**Pereira JF, Zhou G, Delhaize E, Richardson T, Zhou M, Ryan PR** (2010) Engineering greater aluminium resistance in wheat by over-expressing TaALMT1. Annals of Botany **106**(1): 205-214

**Pineros MA, Magalhaes JV, Carvalho Alves VM, Kochian LV** (2002) The physiology and biophysics of an aluminum tolerance mechanism based on root citrate exudation in maize. Plant Physiology **129**: 1194-1206

**Praça-Fontes MM, Carvalho CR, Clarindo WR, Cruz CD** (2011) Revisiting the DNA C-values of the genome size-standards used in plant flow cytometry to choose the “best primary standards.” Plant Cell Rep. **30**: 1183–1191. doi:10.1007/s00299-011-1026-x

**Ribeiro C, Cambraia J, Peixoto PHP, Junior EMF** (2012) Antioxidant System response induced by Aluminum in Two Rice Cultivars. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **24**: 107-116

**Rodrigues SM, et al** (2006) Arabidopsis and tobacco plants ectopically expressing the soybean antiquitin-like ALDH7 gene display enhanced tolerance to drought, salinity, and oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*, **57**: 1909-1918. DOI: 10.1093/jxb/erj132

**Ryan PR, Delhaize E** (2010) The convergent evolution of aluminium resistance in plants exploits a convenient currency. *Functional Plant Biology* **37**(4): 275-284

**Samanta S, Singh A, Banerjee A, Roychoudhury A** (2020) Exogenous supplementation of melatonin alters representative organic acids and enzymes of respiratory cycle as well as sugar metabolism during arsenic stress in two contrasting indica rice cultivars. *Journal of Biotechnology*, **324**: 220-232

**Sasaki T, et al** (2004) A gene encoding an aluminum-activated malate transporter segregates with aluminum tolerance in wheat. *In Plant and Cell Physiology* **37**:645–653

**Shaff JE, Schultz BA, Craft EJ, Clark RT, Kochian LV** (2010) GEOCHEM-EZ: a chemical speciation program with greater power and flexibility. *Plant and soil* **330**: 207-214

**Silva FAM, Nogueira FD, Ribeiro LL, Godinho A, Guimarães PTG** (2001) Exsudação de ácidos orgânicos em rizosfera de plantas daninhas. *Planta Daninha*, **19**: 193-196

**Silva WA** (2020) Relações coordenadas entre ciclo TCA e ciclo celular em células específicas em resposta ao alumínio em *Arabidopsis thaliana*. 56 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

**Singh S, et al** (2017) Toxicity of aluminium on various levels of plant cells and organism: A review. *Environ Exp Bot* **137**: 177–193

**Siqueira JA, et al** (2022) A long and stressful day: Photoperiod shapes aluminium tolerance in plants. *Journal of Hazardous Materials*, **432**: 128704

**Srere PA** (1969) Citrate synthase: [EC 4.1.3.7. Citrate oxaloacetate-lyase (CoA-acetylating)]. *Methods Enzymol* **13**:3–11

**Sudhakar C, Lakshmi A, Giridarakumar S** (2001) Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. *Plant Science* **161**: 613-619

**Sweetlove LJ, Beard KF, Nunes-Nesi A, Fernie AR, Ratcliffe RG** (2010) Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle. *Trends in plant science*, **15**: 462-470

**Taylor GJ, et al** (2000) Direct measurement of aluminum uptake and distribution in single cells of *Chara corallina*. *Plant Physiology* **123**: 987–96

**Tinoco CF, et al** (2010) Obtenção de linhagens isogênicas para QTLs de tolerância ao alumínio em milho utilizando retrocruzamento assistido por marcadores. XXVIII Congr Nac Milho e Sorgo 90–96

**Velikova V, Yordanov I, Edreva A** (2000) Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. *Plant science* **151**: 59-66

**Wang T, Yeb C, Wang M, Chu G** (2017) Identification of cold-stress responsive proteins in *Anabasis aphylla* seedlings via the iTRAQ proteomics technique. *Journal of Plant Interactions*, **12**: 505-519

**Wu H, Tito N, Giraldo JP** (2017) Anionic cerium oxide nanoparticles protect plant photosynthesis from abiotic stress by scavenging reactive oxygen species. *ACS nano*, **11**: 11283-11297

**Xia AN, Duan FY, Song GUO, Chen FJ, Yuan LX, Gu RL** (2014) Transcriptional regulation of expression of the maize aldehyde dehydrogenase 7 gene (*ZmALDH7B6*) in response to abiotic stresses. *Journal of Integrative Agriculture* **13(9)**: 1900-1908

**Yang TY, et al** (2021) Raised pH conferred the ability to maintain a balance between production and detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal in aluminum-toxic *Citrus sinensis* leaves and roots. *Environmental Pollution* **268**: 115676

**Youssef O, et al** (2020) Hematite nanoparticles influence ultrastructure, antioxidant defenses, gene expression, and alleviate cadmium toxicity in *Zea mays*. *Journal of Plant Interactions*, **15**: 54-74

**Yu Y, Zhou W, Liang X, Zhou K, Lin X** (2019) Increased bound putrescine accumulation contributes to the maintenance of antioxidant enzymes and higher aluminum tolerance in wheat. *Environmental pollution* **252**: 941-949

**Zheng SJ** (2010) Crop production on acidic soils: overcoming aluminium toxicity and phosphorus deficiency. *Annals of Botany* **106**: 183–184

**Zhou J, Tian X, Qiao L, Qin P** (2012) Respiratory enzyme activity and regulation of respiration pathway in seashore mallow (*Kosteletzkya virginica*) seedlings under waterlogging conditions. *Aust J Crop Sci* **6**:756–762

**Zhou M, et al** (2012) Aldehyde dehydrogenase protein superfamily in maize. *Functional & integrative genomics*, **12**: 683-691. <https://doi.org/10.1007/s10142-012-0290-3>

**Zhou P, et al** (2020) Application of nanoparticles alleviates heavy metals stress and promotes plant growth: An overview. *Nanomaterials*, **11**: 26

## 7. MATERIAL SUPLEMENTAR

**Tabela Suplementar 1:** Primers utilizados para qRT-PCR

Gene (Locus)	Tipo de Gene	Sequência de Nucleotídeos (5' -3')	Referência
<i>ZmMATE3</i>	<i>Multidrug and Toxic Compound Extrusion</i>	Fw - ATGACGTCCAAGGTGGCATT Rv - TGATGGGCTGCAAGCGTTAT	Matonyei et al, 2020
<i>ZmMATE6</i>	<i>Multidrug and Toxic Compound Extrusion</i>	Fw - CAGTCCAAGGTATCTTTCCGG Rv - CAGCACCAGTTATGCCAAG	Du et al, 2021
<i>ZmNrat</i>	<i>Nramp aluminum transporter</i>	Fw - CGCGCTTCTGATCCAAACA Rv - GCGAGATGCTTGCCTGTCTT	Matonyei et al, 2020
<i>ZmWRKY</i>	Caracterizam-se estruturalmente pela ocorrência da sequência de aminoácidos WRKYGQK (W: triptofano; R: arginina; K: lisina; Y: tirosina; G: glicina; Q: Glutamina e K: Lisina)	Fw - AGCTCATCCCGGAGCCTAA Rv - GGAGAGCGACTCCATAG	Matonyei et al, 2020
<i>ZmALDH9</i>	Superfamília de Aldeído Desidrogenase	Fw - GTGCTGGATCCGATCCTGAT Rv - CACTGCCGAAGAACTCCA	Zhou et al, 2012
<i>ZmASL</i>	<i>Zea mays</i> AltSB-like	Fw - CAAGTTCTTCAGCCTTCCGG Rv - GCAAGGTCTACAAGTCTGG	Krill et al, 2010
<i>ZmAco2</i>	Aconitase 2	Fw - CATCTACGTGCAGGAAGGGAT Rv - TTGGCTGACTCGGGTTG	Ning et al, 2021
18S rRNA		Fw - CGTCCTAGTCTCAACCATAAACG Rv - CCCCAGAACCCAAAGACT	Matonyei et al, 2020

**Tabela Suplementar 2:** Resumo da análise de variância (ANOVA) entre os cinco genótipos de milho (*Z. mays*) com tolerância diferencial ao alumínio. A determinação foi feita após 24h e 72 horas de tratamento com 0 e {39}  $\mu\text{M}$  de Al em solução nutritiva. As letras maiúsculas denotam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os genótipos, as minúsculas denotam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos. O asterisco denota diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os tempos de exposição. Abreviaturas como descritas na Figura 3.

Genótipos	Tratamentos	Coleta	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	MDA	SOD	CAT	APX	POX
L53	Controle	24h	97,7 $\pm$ 1,84 Db	9,22 $\pm$ 0,21 Ba	8,05 $\pm$ 0,51 ABb	7,2 $\pm$ 0,57 Ab	0,05 $\pm$ 0,008 b	8,05 $\pm$ 0,51 ns
		72h	121,63 $\pm$ 2,46 ABb*	12,87 $\pm$ 0,8 A*	10,7 $\pm$ 0,75 Ba*	5,59 $\pm$ 0,55 CDb	0,01 $\pm$ 0,001 b*	13,26 $\pm$ 1,02 Bb
	Estresse	24h	198,33 $\pm$ 7,55 Ca*	9,02 $\pm$ 0,82B Cb	6,59 $\pm$ 0,56 Ba	25,04 $\pm$ 1,94 Aa	0,24 $\pm$ 0,013 BCa	10,7 $\pm$ 0,75 ns
		72h	129,2 $\pm$ 2,19 Aa	14,12 $\pm$ 0,16 A*	10,32 $\pm$ 0,92 B*	44,27 $\pm$ 0,72 Ca*	1,04 $\pm$ 0,23 ABa	22,14 $\pm$ 0,23 Aa*
NIL5	Controle	24h	163,67 $\pm$ 2,97 BC*	9,37 $\pm$ 0,3 Bb	4,75 $\pm$ 0,49 Bb	5,89 $\pm$ 0,33 ABb	0,02 $\pm$ 0,003 b	6,59 $\pm$ 0,56 ns
		72h	113,64 $\pm$ 3,28 BC	11,46 $\pm$ 0,82 A*	16,76 $\pm$ 0,92 Aa*	10,07 $\pm$ 0,24 Ab*	0,02 $\pm$ 0,002 b	21,12 $\pm$ 1,87 Ab*
	Estresse	24h	233,44 $\pm$ 7,97 Ba*	10,7 $\pm$ 0,84 BC*	7,23 $\pm$ 0,77 Bb	13,74 $\pm$ 0,8 Ba	0,51 $\pm$ 0,06 Ca	16,76 $\pm$ 0,92 ns
		72h	113,12 $\pm$ 2,48 B	5,23 $\pm$ 0,07 Cb	13,09 $\pm$ 1,29 ABa*	31,9 $\pm$ 0,49 Da*	0,81 $\pm$ 0,03 BCa*	32,01 $\pm$ 0,83 Ba*
L3	Controle	24h	171,38 $\pm$ 2,54 ABb*	14,92 $\pm$ 0,4 A*	11,62 $\pm$ 1,1 A	5,72 $\pm$ 0,44 ABb	0,05 $\pm$ 0,006 b	4,75 $\pm$ 0,49 ns
		72h	122,7 $\pm$ 1,73 Aa	10,89 $\pm$ 0,76 Aa	12,89 $\pm$ 1,24 B*	6,62 $\pm$ 0,47 BCb	0,03 $\pm$ 0,003 b	13,51 $\pm$ 1,17 Abb*
	Estresse	24h	207,05 $\pm$ 6,93 Ca*	7,98 $\pm$ 0,55 C*	13,26 $\pm$ 1,02 Bb	6 $\pm$ 0,3 Ca	0,49 $\pm$ 0,07 Aa	13,09 $\pm$ 1,29 ns
		72h	115,64 $\pm$ 2,43 Bb	4,79 $\pm$ 0,06 Cb	22,14 $\pm$ 0,23 Ca*	27,79 $\pm$ 1,02 Ea*	0,68 $\pm$ 0,06 Da*	23,17 $\pm$ 0,16 Aa*
L3MATE	Controle	24h	147,78 $\pm$ 3,01 Cb*	8,08 $\pm$ 2,2 B*	21,12 $\pm$ 1,87 Ab	3,4 $\pm$ 0,15 Bb	0,07 $\pm$ 0,006 b	7,23 $\pm$ 0,77 ns
		72h	111,6 $\pm$ 1,66 Cb	4,62 $\pm$ 0,15 Cb	32,01 $\pm$ 0,83 Ba*	8,56 $\pm$ 0,51 ABb*	0,03 $\pm$ 0,002 b	11,48 $\pm$ 0,17 ABb
	Estresse	24h	173,61 $\pm$ 1,2 D*	11,36 $\pm$ 0,49 Aa	13,51 $\pm$ 1,17 Bb	8,59 $\pm$ 0,13 Ca	0,17 $\pm$ 0,02 Aa	10,32 $\pm$ 0,92 ns
		72h	129,24 $\pm$ 1,14 Aa	67,22 $\pm$ 0,91 Ca	23,17 $\pm$ 0,16 Ca*	51,56 $\pm$ 0,52 Aa*	0,94 $\pm$ 0,14 Aa*	59,26 $\pm$ 0,16 Aa*
L3TT	Controle	24h	190,48 $\pm$ 10,13 Ab*	8,4 $\pm$ 0,13B	11,48 $\pm$ 0,17 Bb	5,23 $\pm$ 0,47 ABb	0,02 $\pm$ 0,006 b	11,62 $\pm$ 1,1 ns
		72h	121,38 $\pm$ 2,46 ABb	8,41 $\pm$ 0,59 Bb	59,26 $\pm$ 0,16 Aa*	4,09 $\pm$ 0,36 Db	0,04 $\pm$ 0,002 b	17,48 $\pm$ 0,68 Bb
	Estresse	24h	267,54 $\pm$ 4,05 Aa*	7,98 $\pm$ 0,54 C	17,48 $\pm$ 0,68 Ab	15,75 $\pm$ 0,25 Ba	0,33 $\pm$ 0,05 Ba	12,89 $\pm$ 1,24 ns
		72h	134,96 $\pm$ 0,66 Aa	13,66 $\pm$ 0,42 Aa*	55,68 $\pm$ 1,45 Aa*	46,62 $\pm$ 0,34 Ba*	0,79 $\pm$ 0,004 Ca*	55,68 $\pm$ 1,45 Ba*

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: atividade expressa em mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> MS (Matéria Seca); MDA: atividade expressa em nmol g<sup>-1</sup>; SOD: U min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>; CAT:  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$ ; APX: atividade expressa em  $\mu\text{mol AsA min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$ ; POX:  $\mu\text{mol purpurogallin min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$

**Tabela Suplementar 3:** Resumo da análise de variância (ANOVA) entre os cinco genótipos de milho (*Z. mays*) com tolerância diferencial ao alumínio. A determinação foi feita após 24h e 72 horas de tratamento com 0 e {39} µM de Al em solução nutritiva. As letras maiúsculas denotam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os genótipos, as minúsculas denotam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos. O asterisco denota diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os tempos de exposição. Abreviaturas como descritas na Figura 7.

Genótipos	Tratamentos	Coleta	PDH	CS	ACO	IDH-NAD	IDH-NADP	FUM	MDH-NAD	MDH-NADP
L53	Controle	24h	0,548 ± 0,017 b	1,405 ± 0,085 b	11,656 ± 0,177 ABa*	6,576 ± 0,147 Ba*	7,164 ± 0,142 Ba	1,553 ± 0,124 b*	0,36 ± 0,011 b	1,549 ± 0,099 Bb
		72h	0,687 ± 0,035 b	1,495 ± 0,184 Bb	7,103 ± 0,181 Da	0,348 ± 0,019	7,52 ± 0,108 Ba	0,882 ± 0,026 Bb	0,427 ± 0,012 b	1,347 ± 0,128 Bb
	Estresse	24h	5,21 ± 0,197 Ba*	3,755 ± 0,135 Ca	5,596 ± 0,146 Bb*	2,351 ± 0,108 Ab*	5,513 ± 0,098 b*	5,677 ± 0,1 Aa*	9,665 ± 0,158 Ca*	10,255 ± 0,094 Aa*
		72h	3,301 ± 0,091 a	4,493 ± 0,154 Aa*	3,401 ± 0,07 Ab	0,084 ± 0,001	1,379 ± 0,074 Bb	4,352 ± 0,1 Aa	5,503 ± 0,159 Ba	9,491 ± 0,088 Aa
NIL5	Controle	24h	0,335 ± 0,012 b	1,42 ± 0,058 b	10,856 ± 0,066 Ca	7,64 ± 0,155 Aa*	7,604 ± 0,124 Ba	1,627 ± 0,155 b*	0,331 ± 0,006 b	2,204 ± 0,156 Ab
		72h	0,673 ± 0,017 b	2,322 ± 0,144 Ab*	10,737 ± 0,18 Ca	0,349 ± 0,013	7,797 ± 0,145 Ba	0,804 ± 0,044 Bb	0,353 ± 0,017 b	3,557 ± 0,137 Ab*
	Estresse	24h	5,301 ± 0,328 Ba*	3,605 ± 0,07 CDa	6,6 ± 0,113 Ab*	1,571 ± 0,133 Bb*	5,22 ± 0,151 b*	5,434 ± 0,149 Aa*	10,613 ± 0,093 Ba*	9,586 ± 0,098 Ba*
		72h	3,483 ± 0,066 a	3,525 ± 0,177 Ba	3,532 ± 0,108 Ab	0,086 ± 0,001	2,715 ± 0,128 Ab	3,441 ± 0,188 Ba	5,461 ± 0,144 Ba	8,518 ± 0,13 Ba
L3	Controle	24h	0,24 ± 0,011 b	1,318 ± 0,077 b*	11,061 ± 0,086 BCa*	7,594 ± 0,071 Aa*	6,764 ± 0,066 Ca	1,359 ± 0,107 b	0,377 ± 0,006 b	1,397 ± 0,102 BCb
		72h	0,691 ± 0,037 b	1,715 ± 0,092 Bb	10,308 ± 0,141 Ca	0,359 ± 0,007	8,43 ± 0,068 Aa*	1,375 ± 0,089 Ab	0,446 ± 0,015 b	1,525 ± 0,059 Bb
	Estresse	24h	5,311 ± 0,344 Ba*	3,265 ± 0,095 Da	6,123 ± 0,114 Ab*	2,417 ± 0,211 Ab*	5,415 ± 0,153 b*	5,502 ± 0,137 Aa*	9,637 ± 0,147 Ca*	9,393 ± 0,176 Ba*
		72h	3,401 ± 0,114 a	3,516 ± 0,118 Ba	2,699 ± 0,152 Bb	0,084 ± 0,001	2,298 ± 0,136 Ab	3,401 ± 0,125 Ba	5,514 ± 0,171 Ba	8,321 ± 0,166 Ba
L3MATE	Controle	24h	0,302 ± 0,026 b	1,479 ± 0,076 b	11,56 ± 0,109 ABa	7,523 ± 0,167 Aa*	7,388 ± 0,151 Ba	1,553 ± 0,177 b*	0,379 ± 0,008 b	1,243 ± 0,114 BCb
		72h	0,645 ± 0,05 b	2,402 ± 0,117 Ab*	14,467 ± 0,1 Aa*	0,35 ± 0,011	7,202 ± 0,167 Ba	0,901 ± 0,039 Bb	0,362 ± 0,014 b	1,497 ± 0,137 Bb
	Estresse	24h	6,503 ± 0,196 Aa*	5,256 ± 0,097 Aa*	6,316 ± 0,136 Ab*	2,526 ± 0,168 Ab*	5,37 ± 0,107 b*	4,317 ± 0,111 Ba	11,608 ± 0,105 Aa*	9,534 ± 0,129 Ba*
		72h	3,326 ± 0,045 a	3,309 ± 0,125 Ba	3,455 ± 0,117 Ab	0,111 ± 0,004	2,819 ± 0,157 Ab	4,462 ± 0,166 Aa	7,388 ± 0,123 Aa	8,612 ± 0,148 Aa
L3TT	Controle	24h	0,348 ± 0,008 b	1,373 ± 0,064 b	11,784 ± 0,166 Aa	7,675 ± 0,122 Aa*	8,866 ± 0,103 Ca*	1,406 ± 0,052 b	0,311 ± 0,069 b	1,032 ± 0,023 Cb
		72h	0,65 ± 0,045 b	2,604 ± 0,115 Ab*	11,667 ± 0,137 Ba	0,357 ± 0,016	6,358 ± 0,092 Ca	1,486 ± 0,144 Ab	0,367 ± 0,012 b	1,445 ± 0,136 Bb*
	Estresse	24h	6,389 ± 0,174 Aa*	4,475 ± 0,183 Ba*	5,637 ± 0,125 Bb*	2,463 ± 0,082 Ab*	5,515 ± 0,083 b*	4,484 ± 0,1 Ba*	9,695 ± 0,119 Ca*	8,447 ± 0,167 Ca
		72h	2,752 ± 0,62 a	3,571 ± 0,116 Ba	3,38 ± 0,087 Ab	0,083 ± 0,001	1,676 ± 0,122 Bb	3,722 ± 0,085 Ba	5,323 ± 0,118 Ba	9,481 ± 0,153 Aa*

Atividade enzimática: atividade expressa em  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MS}$  (Matéria Seca)

**Tabela Suplementar 4:** Resumo da análise de variância (ANOVA) entre os cinco genótipos de milho (*Z. mays*) com tolerância diferencial ao alumínio. A determinação foi feita após 1 horas de tratamento com 0 e {39}  $\mu\text{M}$  de Al em solução nutritiva. As letras maiúsculas denotam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os genótipos, as minúsculas denotam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos. Abreviaturas como descritas na Figura 13.

Genótipos	Tratamentos	<i>ZmMATE3</i>	<i>ZmMATE6</i>	<i>ZmNrat</i>	<i>ZmASL</i>	<i>ZmWRKY</i>	<i>ZmALDH9</i>	<i>ZmAco2</i>
L53	Controle	1,004 $\pm$ 0,061 C	1,001 $\pm$ 0,032 C	1,002 $\pm$ 0,044 Bb	0,694 $\pm$ 0,36 b	1 $\pm$ 0,01 Cb	1,001 $\pm$ 0,03 Bb	1,003 $\pm$ 0,053 D
	Estresse	1 $\pm$ 0,012 D	1,003 $\pm$ 0,055 C	19,293 $\pm$ 0,045 Aa	21,112 $\pm$ 0,001 Ba	24,146 $\pm$ 0,405 Ba	3,432 $\pm$ 0,145 Da	0,669 $\pm$ 0,101 B
NIL5	Controle	0,522 $\pm$ 0,034 Db	0,057 $\pm$ 0,007 Db	0,487 $\pm$ 0,029 Cb	0,396 $\pm$ 0,023 b	3,708 $\pm$ 0,07 ABb	2 $\pm$ 0,031 Ab	8,206 $\pm$ 0,066 Aa
	Estresse	1,69 $\pm$ 0,004 Ca	0,35 $\pm$ 0,017 Da	17,636 $\pm$ 0,319 Ba	28,069 $\pm$ 0,695 Aa	30,916 $\pm$ 0,444 Aa	6,429 $\pm$ 0,184 Ba	1,229 $\pm$ 0,137 Ab
L3	Controle	1,001 $\pm$ 0,025 C	1,001 $\pm$ 0,028 C	1,001 $\pm$ 0,028 B	1,056 $\pm$ 0,246 b	4,434 $\pm$ 0,16 Cb	1,079 $\pm$ 0,011 Bb	5,256 $\pm$ 0,106 Ba
	Estresse	1 $\pm$ 0,02 D	1 $\pm$ 0,014 C	1,001 $\pm$ 0,023 C	16,253 $\pm$ 0,7 Ca	16,604 $\pm$ 0,168 Ca	4,34 $\pm$ 0,107 Ca	1,014 $\pm$ 0,119 ABb
L3MATE	Controle	1,737 $\pm$ 0,015 Bb	1,581 $\pm$ 0,017 Bb	1,83 $\pm$ 0,068 Aa	0,435 $\pm$ 0,058 b	1,207 $\pm$ 0,161 Cb	2,047 $\pm$ 0,036 Ab	7,783 $\pm$ 0,117 Aa
	Estresse	15,759 $\pm$ 0,052 Ba	10,436 $\pm$ 0,12 Ba	1,296 $\pm$ 0,006 Cb	12,202 $\pm$ 0,489 Da	16,757 $\pm$ 0,102 Ca	7,278 $\pm$ 0,102 Aa	1,246 $\pm$ 0,186 Ab
L3TT	Controle	4,277 $\pm$ 0,02 Ab	3,204 $\pm$ 0,013 Ab	1,094 $\pm$ 0,009 B	0,829 $\pm$ 0,064 b	2,188 $\pm$ 0,98 BCb	2,386 $\pm$ 0,075 Ab	4,578 $\pm$ 0,141 Ca
	Estresse	24,208 $\pm$ 0,146 Aa	13,708 $\pm$ 0,175 Aa	1,215 $\pm$ 0,024 C	12,659 $\pm$ 0,481 Da	16,873 $\pm$ 0,039 Ca	7,47 $\pm$ 0,211 Aa	0,573 $\pm$ 0,091 Bb

Expressão genica: expressão genica definida em  $\Delta\Delta^{\text{CT}}$  MS (Matéria Seca)