



DAWYSON DE LIMA

**INFLUÊNCIA DA PIRACLOSTROBINA E ATUAÇÃO DA
ENZIMA ACONITASE NO CONTROLE DO TEMPO DO
FLORESCIMENTO EM *Arabidopsis thaliana***

**LAVRAS-MG
2023**

DAWYSON DE LIMA

**INFLUÊNCIA DA PIRACLOSTROBINA E ATUAÇÃO DA ENZIMA ACONITASE
NO CONTROLE DO TEMPO DO FLORESCIMENTO EM *Arabidopsis thaliana***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Antonio Chalfun-Júnior, PhD.
Orientador

Dr. Manoel Viana Linhares Neto
Coorientador

**LAVRAS - MG
2023**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

de Lima, Dawyson.

Influência da piraclostrobina e atuação da enzima aconitase no controle do tempo do florescimento em *Arabidopsis thaliana* / Dawyson de Lima. - 2023.

105 p.

Orientador(a): Antonio Chalfun Júnior.

Coorientador(a): Manoel Viana Linhares Neto.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Genética reversa. 2. Indução do florescimento. 3. Metabolismo energético. I. Chalfun Júnior, Antonio. II. Linhares Neto, Manoel Viana. III. Título.

DAWYSON DE LIMA

**INFLUÊNCIA DA PIRACLOSTROBINA E ATUAÇÃO DA ENZIMA ACONITASE
NO CONTROLE DO TEMPO DO FLORESCIMENTO EM *Arabidopsis thaliana***

**INFLUENCE OF PIRACLOSTROBIN AND ACONITASE ENZYME IN THE
CONTROL OF FLOWERING TIME IN *Arabidopsis thaliana***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADO em 24/02/2023

Prof. Dr. João Domingos Rodrigues - UNESP
Prof. Dr. Antonio Paulino da Costa Netto - UNICAMP
Prof. Dr. Vagner Augusto Benedito -WVU
Prof. Dr. Paulo Eduardo Ribeiro Marchiori – UFLA

Prof. Antonio Chalfun-Júnior, PhD.
Orientador

Dr. Manoel Viana Linhares Netto
Coorientador

**LAVRAS - MG
2023**

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por toda oportunidade concedida.

Aos meus pais Maria Aparecida Fonseca Lima e Edilson Antônio de Lima por acreditarem no meu potencial, investindo na minha formação pessoal. A minha irmã Kathellen de Lima pelo apoio.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonino Chalfun-Júnior, por ter-me deixado fazer parte do grupo de pesquisa do LFMP e ter acreditado no meu potencial. Obrigado pela paciência, amizade e pela orientação para que este trabalho fosse concluído.

Ao meu coorientador Dr. Manoel Viana Linhares Neto pela amizade demonstrada e, pela ajuda preciosa nas revisões, correções e sugestões que contribuíram significativamente para este trabalho. Obrigado por toda paciência e apoio na execução do projeto.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal em especial a Elisa Monteze Bicalho, João Paulo Rodrigues Alves Delfino Barbosa, Luiz Edson Mota de Oliveira e Paulo Eduardo Ribeiro Marchiori pelo conhecimento transmitido, tanto profissional quanto pessoal.

A professora Dra. Letícia dos Anjos pela troca de conhecimento. Agradeço as técnicas Taís e Lidianny pelo auxílio nas análises laboratoriais.

A minha namorada Mayra por todo apoio dado durante o meu doutorado.

Aos meus amigos Hislander, Anderson, Italo, Lucão e Baby, quero agradecê-los pelos momentos de descontração e convívio na San Jamaica.

A todos os meus amigos do doutorado em especial a Aline, Andrea, Gabriel, Guilherme, Iasminy, Jober, Kauanne, Lillian, Rafael e Robert por compartilhar momentos bons e ruins, pela cumplicidade, troca de conhecimentos, amizade e conselhos.

Ao Joel pelo apoio na execução de alguns experimentos em campo.

Agradeço à Universidade Federal de Lavras pela oportunidade de fazer meu doutorado.

Enfim, a todos os familiares e amigos pelo apoio incondicional que me deram.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

O florescimento envolve uma cadeia de interações entre aspectos ambientais e sinais endógenos para desencadear a transcrição de uma complexa rede gênica. Em plantas comerciais o florescimento pode ser tanto benéfico promovendo a atração de polinizadores e servindo como uma ferramenta para o melhoramento genético, como também pode promover perda de produtividade e dificultar o manejo das lavouras. Assim, estudos que tenham como objetivo compreender os mecanismos do florescimento são essenciais para a comunidade acadêmica, científica comercial e produtora. Diante disso, no primeiro capítulo dessa tese abordamos sobre um gap existente na literatura que envolve o metabolismo energético e o florescimento. Neste trabalho, foram reunidas evidências e informações sobre a influência das enzimas do ciclo tricarboxílico no tempo de florescimento e as possíveis causas que levaram ao florescimento alterado. No segundo capítulo, foi estudado a influência da aplicação da piraclostrobina no tempo de florescimento de *Arabidopsis thaliana* mantidas em fotoperíodos indutivo (16 luz/ 8 escuro) e não indutivo (8 luz/ 16 escuro). Para isso, foi avaliado variáveis das expressões dos genes relacionado ao florescimento, giberelina, proteínas DELLAs e aconitase; teor de metabólitos e tempo de florescimento. Os resultados desse trabalho supõem que a piraclostrobina promove modificação na atividade da enzima aconitase e genes de giberelina sendo capaz de alterar o tempo de florescimento em plantas. No terceiro capítulo, foi investigado o papel da aconitase no tempo de florescimento em *Arabidopsis thaliana* mantidas em fotoperíodos indutivo (16 luz/ 8 escuro) e não indutivo (8 luz/ 16 escuro). Nesse trabalho também foi avaliado a expressão dos genes relacionados ao florescimento, giberelina, proteínas DELLA e aconitase; teor de metabólitos e tempo de florescimento. Os resultados desse trabalho mostraram que a enzima aconitase pode promover alterações na expressão de genes relacionados ao florescimento e giberelina, sendo capaz também de alterar o tempo de florescimento.

Palavras-Chaves: *Arabidopsis thaliana*. Genética reversa. Indução do florescimento. Metabolismo energético. Tecnologia de aplicação.

ABSTRACT

Flowering involves a chain of interaction between environmental aspects and endogenous signals to get the transcription of a complex gene network. In commercial plants, flowering can be both beneficial by promoting the attraction of pollinators and serving as a tool for genetic improvement, but it can also promote loss of productivity and make crop management difficult. Thus, studies that aim to understand the control of flowering are well accepted by the academic, scientific, commercial and productive community. Therefore, in the first chapter of this thesis we address a gap in the literature involving energy metabolism and flowering. In this work we gather evidence and information about the influence of tricarboxylic cycle enzymes on flowering time and the possible causes that led to altered flowering. In the second chapter, we analyzed the influence of pyraclostrobin application on the flowering time of *Arabidopsis thaliana* maintained in inductive (16 light/ 8 dark) and non-inductive (8 light/ 16 dark) photoperiods. For this, we evaluated the expression of genes related to flowering, gibberellin, DELLA proteins and aconitase; metabolite content and flowering time. The results of this work suggest that pyraclostrobin can promote changes in the activity of the enzyme aconitase and gibberellin genes, being able to alter the flowering time in plants. In the third chapter, we investigated the role of aconitase in flowering time in *Arabidopsis thaliana* maintained in inductive (16 light/ 8 dark) and non-inductive (8 light/ 16 dark) photoperiods. In this work we also evaluated the expression of genes related to flowering, gibberellin, DELLA proteins and aconitase; metabolite content and flowering time. The results of this work showed that the enzyme aconitase can promote changes in the expression of genes related to flowering and gibberellin is also able to change the time of flowering.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*. Reverse genetics. Flowering induction. Energy metabolism. Application technology.

LISTA DE FIGURAS

- Figure 1:** Possível regulação do metabolismo energético nas principais vias de indução do florescimento em plantas. adaptado de Bouché et al., 2015..... 22
- Figure 2:** Influência das enzimas do ciclo tricarboxílico no tempo de florescimento em plantas. Fonte: do autor (2023). 31
- Figure 3:** Ilustração do momento da aplicação de piraclostrobina e coleta das amostras em plantas cultivadas em dia longo e dia curto. 47
- Figure 4.** Expressão relativa dos genes relacionados ao florescimento em plantas de *A. thaliana* pulverizadas com água (controle) e piraclostrobina mantidas em fotoperíodo indutivo. A) expressão relativa de FLOWERING LOCUS T (FT); B) expressão relativa de SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1 (SOC1); C) expressão relativa de FLOWERING LOCUS C (FLC). Os dados são médias de $n = 3$. Letras maiúsculas, nas colunas, indicam diferença significativa entre os tratamentos e letras minúsculas, nas colunas, indicam diferença estatística significativa entre os tempos de coleta ($p < 0.05$). 50
- Figure 5.** Expressão relativa dos genes relacionados ao florescimento em plantas de *A. thaliana* pulverizadas com água (controle) e piraclostrobina mantidas em fotoperíodo indutivo. A) expressão relativa de GA3 OXIDASE (GA3); B) expressão relativa de GIBBERELLIN INSENSITIVE (GAI); C) expressão relativa de REPRESSOR OF GA1-3 (RGA). Os dados são médias de $n = 3$. As letras maiúsculas indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos e as letras minúsculas indicam diferença estatística significativa entre os tempos de coleta. Diferença entre as letras indicam diferença significativa igual $p < 0.05$ 51
- Figure 6.** Expressão relativa dos genes relacionados ao florescimento em plantas de *A. thaliana* pulverizadas com água (controle) e piraclostrobina mantidas em fotoperíodo indutivo. A) expressão relativa de ACONITASE 1 (ACO1); B) expressão relativa de ACONITASE 2 (ACO2); C) expressão relativa de ACONITASE 3 (ACO3). Os dados são médias de $n = 3$. As letras maiúsculas indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos e as letras minúsculas indicam diferença estatística significativa entre os tempos de coleta. Diferença entre as letras indicam diferença significativa igual $p < 0,05$ 52
- Figure 7.** Resultados das alterações do perfil metabólico em folhas de *A. thaliana* sob influência da aplicação de água (controle) e piraclostrobina em fotoperíodo indutivo, coletadas em 8, 32 e 104 HAA. A) análise de componentes principais (PCA); B) análise com heat map. Os * mostram os metabolitos que apresentaram diferença estatística significativa pelo teste t de Student com nível de significância de $p < 0,05$. As análises foram realizadas na plataforma Metaboanalyst com dados de médias $n = 9$ 53
- Figure 8.** Análise de componentes principais (PCA) dos perfis metabólicos de folhas de *A. thaliana* sob influência de aplicação de água (controle) e piraclostrobina em fotoperíodo indutivo. A) coleta às 8 HAA; B) coleta às 32 HAA e C) coleta às 104 HAA. As análises foram realizadas na plataforma Metaboanalyst com dados de médias $n = 3$ 54
- Figure 9.** Representação em heatmap das diferenças do teor de metabolitos nas folhas de *A. thaliana* sob aplicação de água (controle) e piraclostrobina em fotoperíodo indutivo. A) coleta

às 8 HAA; B) coleta às 32 HAA e C) coleta às 104 HAA. Os dados são médias de $n = 3$. As diferenças significativas entre os tratamentos são indicadas pelo * ($p < 0.05$ pelo teste t de Student). o agrupamento foi feito pela correlação de Pearson. As análises foram realizadas na plataforma Metaboanalyst. 55

Figure 10: Análise do tempo de florescimento em *A. thaliana* sob influência da aplicação de água (controle) e piraclostrobina em fotoperíodo indutivo. A) número de folhas na roseta que antecederam a abertura da primeira flor; B) dias após a semeadura que antecederam a abertura da primeira flor C) foto demonstrativa dos tratamentos após a abertura da primeira flor. Os valores das medias são $n = 10$. As diferenças significativas entre os tratamentos são indicadas pelas letras maiúsculas (teste t de Student - $p < 0.05$). 56

Figure 11. Expressão relativa dos genes relacionados ao florescimento em plantas de *A. thaliana* pulverizadas com água (controle) e piraclostrobina mantidas em fotoperíodo não indutivo. A) expressão relativa de SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1 (SOC1); B) expressão relativa de FLOWERING LOCUS C (FLC). Os dados são médias de $n = 3$. As letras maiúsculas indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos e as letras minúsculas indicam diferença estatística significativa entre os tempos de coleta. Diferença entre as letras indicam diferença significativa igual $p < 0,05$ 57

Figure 12. Expressão relativa dos genes relacionados ao florescimento em plantas de *A. thaliana* pulverizadas com água (controle) e piraclostrobina mantidas em fotoperíodo não indutivo. A) expressão relativa de GA3 OXIDASE (GA3OX); B) expressão relativa de GIBBERELLIN INSENSITIVE (GAI); C) expressão relativa de REPRESSOR OF GA1-3 (RGA). Os dados são médias de $n = 3$. As letras maiúsculas indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos e as letras minúsculas indicam diferença estatística significativa entre os tempos de coleta. Diferença entre as letras indicam diferença significativa igual $p < 0,05$ 58

Figure 13: Expressão relativa dos genes relacionados ao florescimento em plantas de *A. thaliana* pulverizadas com água (controle) e piraclostrobina mantidas em fotoperíodo não indutivo. A) expressão relativa de ACONITASE 1 (ACO1); B) expressão relativa de ACONITASE 2 (ACO2); C) expressão relativa de ACONITASE 3 (ACO3). Os dados são médias de $n = 3$. As letras maiúsculas indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos e as letras minúsculas indicam diferença estatística significativa entre os tempos de coleta. Diferença entre as letras indicam diferença significativa igual $p < 0,05$ 59

Figure 14: Resultados das alterações do perfil metabólico em folhas de *A. thaliana* nas três coletas 4, 28 e 100 HAA sob influência de aplicação de água (controle) e piraclostrobina em fotoperíodo não indutivo. A) análise de componentes principais (PCA); B) análise com heatmap. Os * mostram os metabolitos que apresentaram diferença significativa pelo teste t de Student com nível de significância de $p < 0,05$. As análises foram realizadas na plataforma Metaboanalyst com dados de médias $n = 9$ 60

Figure 15. Análise de componentes principais (PCA) dos perfis metabólicos de folhas de *A. thaliana* sob influência de aplicação de água (controle) e piraclostrobina em fotoperíodo não

indutivo. A) coleta às 4 HAA; B) coleta às 28 HAA e C) coleta às 100 HAA. As análises foram realizadas na plataforma Metaboanalyst com dados de médias $n = 3$ 61

Figure 16. Representação em heatmap das diferenças do teor de metabolitos nas folhas de *A. thaliana* sob aplicação de água (controle) e piraclostrobina em fotoperíodo não indutivo. A) coleta às 4 HAA; B) coleta às 28 HAA e C) coleta as 100 HAA. Os dados são médias de $n = 3$. As diferenças significativas entre os tratamentos são indicadas pelo * ($p < 0.05$ pelo teste t de Student). O agrupamento foi feito pela correlação de Pearson. As análises foram realizadas na plataforma Metaboanalyst. 62

Figure 17: Análise do tempo de florescimento em *A. thaliana* sob influência da aplicação de água (controle) e piraclostrobina em fotoperíodo não indutivo. A) número de folhas na roseta que antecederam a abertura da primeira flor; B) dias após a semeadura que antecederam a abertura da primeira flor C) foto demonstrativa dos tratamentos após a abertura da primeira flor. As medias são $n = 10$. As diferenças significativas entre os tratamentos são indicadas pelas letras maiúsculas (teste t de Student - $p < 0.05$). 63

Figure 18: Resultados das expressões dos genes alvos pelo modelo linear misto em plantas de *A. thaliana* sob influência da aplicação de piraclostrobina em fotoperíodo indutivo. A letra “A” representa o tratamento com aplicação de água; letra “C” representa o tratamento com aplicação de piraclostrobina; “t1” representa a coleta às 8 HAA; “t2” representa a coleta às 32 HAA; “t3” representa a coleta às 104 HAA. Médias que ultrapassam o limite de 1 e -1 do \log_2FC apresentam diferenças significativas a nível de 0,05%. 72

Figure 19: Resultados das expressões dos genes alvos pelo modelo linear misto em plantas de *A. thaliana* sob influência da aplicação de piraclostrobina em fotoperíodo não indutivo. A letra “A” representa o tratamento com aplicação de água; letra “C” representa o tratamento com aplicação de piraclostrobina; “t1” representa a coleta às 4 HAA; “t2” representa a coleta às 24 HAA; “t3” representa a coleta às 100 HAA. Médias que ultrapassam o limite 1 e -1 do \log_2FC apresentam diferenças significativas a nível de 0,05%. 73

Figure 20: Análise pelo teste t do perfil metabólico de folhas de *A. thaliana* sob influência de aplicação de piraclostrobina em fotoperíodo indutivo (16h claro/8h escuro). A) resultado das três coletas juntas; B) resultado da coleta 8 HAA; C) resultado da coleta 32 HAA; D) resultado da coleta 104 HAA. Os resultados foram selecionados com limite de 0,05% utilizando-se a plataforma MetaboAnalyst. Os círculos rosas representam metabolitos que apresentaram diferenças significativas. 74

Figure 21: Análise pelo teste t do perfil metabólico de folhas de *A. thaliana* sob influência de aplicação de piraclostrobina em fotoperíodo não indutivo (8h claro/16h escuro). A) resultado das três coletas juntas; B) resultado da coleta 28 HAA; C) resultado da coleta 100 HAA. Os resultados foram selecionados com limite de 0,05% utilizando-se a plataforma MetaboAnalyst. Os círculos rosas representam metabolitos que apresentaram diferenças significativas. 75

Figure 22: Ilustração do momento da aplicação de piraclostrobina e coleta das amostras em plantas cultivadas em dia longo e dia curto. 79

Figure 23: Mapa do vetor de entrada do sistema Gateway pENTR (Invitrogen™)..... 80

Figure 24: Mapa do vetor PK7GWIWG2(II). utilizado em experimentos de silenciamento gênico por RNAi..... 80

Figure 25: Gel de agarose (1,2%) da PCR do DNA para confirmação das linhagens mutantes de *A. thaliana*. **A)** PCR mostrando as linhagens com mutação no gene da ACO1. **B)** PCR mostrando as linhagens com mutação no gene da ACO2. Número de pares de base (pb); plantas com mutação na expressão do gene aconitase (aco1-L2, aco1-L4 e aco2-L1); plantas selvagens (WT) e vetor PK7GWIWG2 (II) (V)..... 85

Figure 26: Análises da expressão de genes envolvidos em respostas regulatórias do florescimento em plantas com mutação na expressão de ACO mantidas em fotoperíodo indutivo. **A)** Expressão relativa de FLOWERING LOCUS T (FT), **B)** Expressão relativa de SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1 (SOC1) e **C)** Expressão relativa de FLOWERING LOCUS C (FLC) (em linhagens de*). Os valores são apresentados como média \pm SD de cinco repetições. As letras diferentes entre as linhagens indicam diferença estatística significativa pelo modelo linear misto..... 86

Figure 27: Expressão relativa de genes envolvidos na rota da giberelina e conteúdo total de giberelinas em linhagens mutantes de ACO mantidas em fotoperíodo indutivo. **A)** expressão relativa de GA3 OXIDASE (GA3), **B)** expressão relativa de GIBBERELLIN INSENSITIVE (GAI) e **C)** expressão relativa de REPRESSOR OF GA1-3 (RGA). Os valores são apresentados como média \pm SD de cinco repetições. As letras diferentes entre as linhagens indicam diferença estatística significativa pelo modelo linear misto..... 87

Figure 28: Análise da abundância de mRNAs da aconitase por RT-PCR quantitativo nas linhagens de *A. thaliana* mantidas em fotoperíodo indutivo. **A)** Expressão relativa de aconitase 1 (ACO1), **B)** Expressão relativa de aconitase 2 (ACO2) e **C)** Expressão relativa de aconitase 3 (ACO3). Os valores são apresentados como média \pm SD de cinco repetições. As letras diferentes entre as linhagens indicam diferença estatística significativa. 88

Figure 29: Resultados das alterações metabólicas em folhas de plantas selvagens e linhagens ACO cultivadas em fotoperíodo indutivo. **A)** açúcares solúveis totais (AST), **B)** açúcares redutores (AR), **C)** sacarose, **D)** amido e **E)** aminoácidos totais. As letras maiúsculas indicam diferença estatística significativa entre as linhagens pelo teste Tukey com nível de significância de $p < 0,05$. Os dados são médias de $n = 5$ 89

Figure 30: Análise do fenótipo em plantas de *A. thaliana* mutantes em ACO mantidas em fotoperíodo indutivo. **A)** número de folhas na roseta que antecederam a abertura da primeira flor, **B)** dias após a semeadura que antecederam a abertura da primeira flor e **C)** foto demonstrativa dos tratamentos após a abertura da primeira flor. Os valores são apresentados como média \pm SD de dez repetições. As diferenças significativas entre os tratamentos são indicadas pelas letras maiúsculas (teste de Tukey - $P < 0.05$)..... 90

Figure 31: Análises da transcrição de genes envolvidos em respostas regulatórias do florescimento em plantas com mutação na expressão de ACO mantidas em fotoperíodo não indutivo. **A)** Expressão relativa de SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1 (SOC1) e **B)** Expressão relativa de FLOWERING LOCUS C (FLC). Os valores são apresentados como

média \pm SD de cinco repetições. As letras diferentes entre as linhagens indicam diferença estatística significativa pelo modelo linear misto..... 91

Figure 32: Expressão relativa de genes envolvidos na rota da giberelina e conteúdo total de giberelinas em linhagens mutantes de ACO mantidas em fotoperíodo não indutivo. **A)** expressão relativa de GA3 OXIDASE (GA3), **B)** expressão relativa de GIBBERELLIN INSENSITIVE (GAI) e **C)** expressão relativa de REPRESSOR OF GA1-3 (RGA). Os valores são apresentados como média \pm SD de cinco repetições. As letras diferentes entre as linhagens indicam diferença estatística significativa pelo modelo linear misto. 92

Figure 33: Análise da expressão relativa da aconitase por RT-PCR quantitativo nas linhagens de *A. thaliana* mantidas em fotoperíodo não indutivo. **A)** Expressão relativa de aconitase 1 (ACO1), **B)** Expressão relativa de aconitase 2 (ACO2) e **C)** Expressão relativa de aconitase 3 (ACO3). Os valores são apresentados como média \pm SD de cinco repetições. As letras diferentes entre as linhagens indicam diferença estatística significativa. 93

Figure 34: Resultados das alterações metabólicas em folhas de plantas selvagens e linhagens ACO cultivadas em fotoperíodo não indutivo. **A)** açúcares solúveis totais (AST), **B)** açúcares redutores (AR), **C)** sacarose, **D)** amido e **E)** aminoácidos totais. As letras maiúsculas indicam diferença significativa entre as linhagens pelo teste Tukey com nível de significância de $p < 0,05$. Os dados são médias de $n = 5$ 94

Figure 35: Análise do fenótipo em plantas de *A. thaliana* mutantes em ACO mantidas em fotoperíodo indutivo. **A)** número de folhas na roseta que antecederam a abertura da primeira flor, **B)** dias após a semeadura que antecederam a abertura da primeira flor e **C)** foto demonstrativa dos tratamentos após a abertura da primeira flor. Os valores são apresentados como média \pm SD de dez repetições. As diferenças significativas entre os tratamentos são indicadas pelas letras maiúsculas (teste de Tukey - $P < 0.05$)..... 95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Pares de primers dos genes alvos e referências que foram usados no presente estudo	71
Tabela 2: Identificação dos transcritos da aconitase em <i>Arabidopsis thaliana</i>	79
Tabela 3: Pares de primers dos genes alvos e referências que foram usados no presente estudo	103

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL.....	15
CAPÍTULO 2: FLORESCIMENTO EM PLANTAS: UMA ABORDAGEM ATRAVÉS DO METABOLISMO ENERGÉTICO.....	17
CAPÍTULO 3: A APLICAÇÃO DE PIRACLOSTROBINA ALTERA O TEMPO DE FLORESCIMENTO EM <i>Arabidopsis thaliana</i>	43
CAPÍTULO 4: A ACONITASE É CAPAZ DE MODULAR A EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À SINALIZAÇÃO DE GIBERELINAS E ALTERAR O TEMPO DE FLORESCIMENTO EM <i>Arabidopsis thaliana</i>.	76
CAPÍTULO 5: PERSPECTIVAS FUTURAS	105

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL

As plantas, durante o seu desenvolvimento, investem energia tanto para o crescimento vegetativo quanto para o reprodutivo e no momento da transição de fase que sérios prejuízos são ocasionados a algumas culturas agrícolas. Essas perdas podem ocorrer de diversas formas, como por exemplo na cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), o desenvolvimento da inflorescência é indesejável, pois, provoca perda de produtividade (Silva et al., 2003); no cafeeiro (*Coffea* spp.), a floração desuniforme é o principal obstáculo, uma vez que a maturação desigual dos frutos dificulta o manejo da colheita (Majerovicz e Sondahl, 2005); na cultura do abacaxizeiro (*Ananas comosus*), a floração também é desuniforme (Dass et al., 1975), sendo necessário a aplicação de reguladores vegetais para induzir a transição floral e garantir a uniformidade dos frutos (Cunha et al., 2003). O florescimento é um processo que pode promover perdas de produtividade e dificultar o manejo de algumas culturas agrícolas. Isso torna os estudos que visam compreender o processo de transição floral e/ou invistam em estratégias tecnológicas para potencializar a produtividade ou melhorar o manejo das culturas agrícolas, de grande relevância. Assim, esse trabalho de tese foi composto por três capítulos com foco na geração de dados e informações sobre o florescimento.

Durante a pesquisa de materiais para o referencial bibliográfico, foi verificado que há existência de um “gap” na literatura, que envolve o *link* entre o metabolismo energético e florescimento. Em resumo, é nítido na literatura que algumas enzimas do ciclo tricarboxílico (TCA) podem interferir diretamente e/ou indiretamente na indução do florescimento, podendo acelerar ou atrasar esse processo. Diante disso, no primeiro capítulo foram reunidas evidências e informações que resultaram na construção de um artigo de revisão com o objetivo de fazer *links* entre o metabolismo energético e o florescimento. Para isso, foram utilizados diversos artigos que tinham como objeto investigar a função das enzimas do ciclo TCA em plantas. Os resultados desses artigos foram usados como ponto de partida para demonstrar a influência de cada enzima do ciclo TCA no tempo de florescimento e as possíveis causas que levaram ao fenótipo observado.

No segundo capítulo, a finalidade do estudo foi avaliar a influência da piraclostrobina no tempo de florescimento em plantas de *A. thaliana* mantidas em fotoperíodos indutivo (16 luz/ 8 escuro) e não indutivo (8 luz/ 16 escuro). A hipótese deste trabalho surgiu após o grupo de pesquisa do Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas, da Universidade Federal de Lavras, ter desenvolvido diversas pesquisas na investigação e mapeamento do mecanismo de atuação da piraclostrobina em mitocôndrias e sua sinalização no crescimento e

desenvolvimento reprodutivo da cana de açúcar. Os resultados desses trabalhos supõem que a piraclostrobina pode promover modificação na atividade da enzima aconitase e no teor de giberelinas, sendo capaz de alterar o tempo de florescimento dessas plantas. Dessa forma, para testar essa hipótese, foi pulverizado piraclostrobina em *A. thaliana* e em seguida foi avaliado o modo de ação desse fungicida sobre a expressão dos genes relacionados ao florescimento, giberelinas, proteínas DELLA e aconitase; teor de metabólitos e tempo de florescimento.

Os resultados observados no experimento com pulverização de piraclostrobina em *A. thaliana* (capítulo 2), indicaram que a enzima aconitase (ACO) poderia ser um dos fatores envolvidos na regulação do tempo de florescimento em *A. thaliana*. Diante disso, no terceiro capítulo resolvemos investigar o papel da ACO no tempo de florescimento. Para isso, foram construídos vetores para promover o silenciamento dos genes da ACO mitocondrial e citosólica. Após a construção dos vetores que continham o fragmento do gene da ACO, plantas de *A. thaliana* foram transformadas. Em seguida, experimentos foram montados com as linhagens obtidas e, posteriormente, realizadas análises de expressão gênica, metabólitos e tempo de florescimento com o objetivo de comprovar a hipótese.

No geral, este trabalho de tese, buscou investigar a influência da piraclostrobina e da enzima ACO no tempo de florescimento da *Arabidopsis thaliana*. Os dados gerados nesses experimentos poderão servir como ponto de partida para futuras pesquisas, ajudar no entendimento do metabolismo energético e do florescimento e auxiliar na engenharia genética de plantas.

REFERÊNCIAS

- SILVA, F. C. DA.; CESAR, M. A. A.; SILVA, C. A. B. Pequenas Indústrias rurais de cana-de-açúcar: melado, rapadura e açúcar mascavo. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**, p. 155, 2003.
- MAJEROVICZ, N.; SONDAHL, M. R. Induction and differentiation of reproductive buds in coffee arabia L. **Braz J Plant Physiol**, v. 17, p. 247-254, 2005.
- DASS, H. C.; RANDHAWA, G. S.; NEGI, S. P. Flowering in pineapple as influenced by ethephon and its combinations with urea and calcium carbonate. **Scientia Horticulturae**, v. 3, p. 231–238, 1975.
- CUNHA, G. A. P.; COSTA, J. T. A.; REINHARDT, D. H. Natural flowering in pineapple: inhibition by growth regulators. **Fruits**, v. 58, p. 27-37, 2003.

CAPÍTULO 2: FLORESCIMENTO EM PLANTAS: UMA ABORDAGEM ATRAVÉS DO METABOLISMO ENERGÉTICO

RESUMO

A indução do florescimento é uma etapa extremamente importante que ocorre naturalmente nas plantas para garantir o sucesso reprodutivo e, consecutivamente, aumentar a produtividade das lavouras. Para que isso aconteça, as plantas necessitam de estímulos endógenos e exógenos, bem como, condições ambientais ideais. Os principais estímulos que interferem diretamente no florescimento são luz, temperatura, hormônios, condições intrínsecas dentre outras. No entanto, atualmente alguns trabalhos utilizando a técnica de genética reversa tem reportado adicionalmente o potencial de algumas enzimas do ciclo tricarbóxico para alterar o tempo de florescimento em plantas. Isso sugere um possível link entre o metabolismo energético e o florescimento, o qual tem sido pouco abordado e explorado. Diante disso, o objetivo desse trabalho de revisão é reunir evidências e informações que possam conectar esses dois fatores. Para isso, mostraremos nesta revisão qual a influência de cada enzimas do ciclo tricarbóxico no tempo de florescimento e as possíveis causas que levam a alteração do florescimento.

Palavras chaves: Mitocôndria. Metabolismo. Via de indução do florescimento.

INTRODUÇÃO

O florescimento é um processo do ciclo de vida vegetal decorrente da transição do desenvolvimento vegetativo para reprodutivo (MAC) (Huijser e Schmid, 2011). Esse processo ocorre naturalmente e é indispensável para a sobrevivência das plantas, pois, é através dos botões florais que as plantas atraem os polinizadores e garantem a perpetuação da espécie (Araki, 2001; Faheen et al., 2004). Além disso, o florescimento é uma importante ferramenta para o melhoramento genético, porque é através desse processo que se obtém variabilidade genética entre as progênes (Saxena, 2008). No entanto, para que ocorra o processo de florescimento é necessário que as plantas possam ter condições ideais, bem como, estímulos endógenos e exógenos.

Nas plantas, os estímulos exógenos e endógenos são os principais responsáveis por promoverem a sincronização do florescimento vegetal (Huijser e Schmid, 2011). Esses estímulos desencadeiam a transcrição de uma complexa rede gênica que induz a transição floral (Amasino, 2010). De modo geral, o fotoperíodo, vernalização, via autônomo e giberelinas são os principais estímulos que asseguram o sucesso reprodutivo das plantas (Suarez-Lopez et al., 2001; Amasino e Michaels, 2010; Yu et al., 2012; Sharma et al., 2020). Além disso, outros processos também podem promover a alteração no tempo de indução do florescimento, como por exemplo o estado metabólico interno, a concentração de nutriente no solo, o estresse hídrico, o estresse salino e os estresses bióticos, dentre outros (Blits e Gallagher, 1991; Dore, 2005; Wada e Takeno, 2010; Banday e Nandi, 2015). Sobre esses estímulos, atualmente existem na literatura diversos trabalhos de revisão e pesquisa fornecendo inúmeras informações sobre seu papel no florescimento. Entretanto, alguns estudos têm reportado que algumas enzimas do ciclo tricarboxílico (TCA) podem alterar o tempo de florescimento em plantas.

Nesse contexto, foi observado em alguns trabalhos, que utilizaram a técnica de genética reversa nas enzimas do ciclo TCA, alterações no tempo do florescimento em plantas (Carrari et al., 2003 ; Nunes-Nesi et al., 2005; Urbanczyk-Wochniak et al., 2006; Lemaitre et al., 2007 ; Studart-Guimarães et al., 2007; Van der Merwe et al., 2009; Araújo et al. 2012). Os resultados desses estudos indicaram a existência de um *link* entre o metabolismo energético e a indução do florescimento. Apesar da existência desse *link*, os trabalhos atuais não aprofundaram no assunto de modo a tentar elucidar o porquê e como ocorrem os fenótipos. Além disso, dentro do nosso conhecimento não existem artigos de pesquisa ou revisão que tenham como objetivo esclarecer a sinergia entre esses dois fatores.

Diante do que foi exposto, esse trabalho de revisão tem como objetivo mostrar a atuação de cada enzima do ciclo TCA no tempo de florescimento, bem como, tentar esclarecer quais fatores podem interferir no *link* entre metabolismo energético e florescimento. Para isso, foram utilizados dados já publicados para tentar explicar o fenótipo encontrado nas linhagens mutantes das enzimas do ciclo TCA. Entretanto, não será possível relacionar diretamente o metabolismo energético com os principais genes das vias de florescimento, pois atualmente não existem trabalhos que possam dar suporte neste contexto.

PRINCIPAIS VIAS DE REGULAÇÃO DO FLORESCIMENTO EM PLANTAS

Os estímulos ambientais e endógenos são responsáveis por promoverem a sincronização do florescimento vegetal durante condições favoráveis (Huijser e Schmid, 2011). Esses estímulos desencadeiam a transcrição de uma complexa rede gênica que induz a transição floral (Amasino, 2010). De modo geral, o fotoperíodo, vernalização, processo autônomo e giberelinas são os principais estímulos que asseguraram o sucesso reprodutivo das plantas (Suarez-Lopez et al., 2001; Amasino e Michaels, 2010; Yu et al., 2012; Sharma et al., 2020). A seguir será feita uma breve abordagem sobre os principais estímulos citados com a finalidade de apresentar e contextualizar a linha base de conhecimento sobre indução do florescimento.

Indução do florescimento pela via do fotoperíodo

Na via fotoperiódica de dias longos o florescimento em *A. thaliana* inicia-se após a estabilização da proteína CONSTANS promovida pelo GIGANTEA (Suarez-Lopez et al., 2001). Logo após esse processo ocorre a tradução da proteína FT que, subsequentemente, é transportada das folhas para o meristema apical caulinar, via floema, onde interage com a proteína 14-3-3 e um fator de transcrição conhecido como FD (Abe et al., 2005). Juntas essas proteínas formam um complexo que regula genes de identidade do meristema floral como: *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)*, que ativa diretamente o *LEAFY (LFY)* e *APETALA 1 (API)* (Lee et al., 2000). Quando *LFY* e *API* são estabelecidos, o desenvolvimento das flores ocorre (Irish, 2017). Por outro lado, em fotoperíodo curto, os principais genes dessa via são *OsGI*, *HEADING DATE 1 (Hd1)* e *HEADING DATE 3a (Hd3a)* (Hayama et al., 2003). Plantas de arroz (*Oryza sativa*) que são consideradas de dia curto possuem os genes *OsGi* e *Hd1* reportados como ortólogos dos genes *GI* e *CO* de *Arabidopsis thaliana*, respectivamente (Yano et al., 2000; Hayama et al., 2003). Nesse processo, o *OsGi* regula positivamente a expressão de *Hd1* que tem como função reduzir os níveis de mRNA de *Hd3a* para promover a indução do florescimento nessas plantas (Izawa et al., 2002; Hayama et al., 2003). Aqui discutimos apenas alguns pontos centrais sobre a via fotoperiódica, no entanto

esse assunto foi bem descrito em outras revisões (Shrestha et al., 2014; Lee et al., 2018; Kinoshita and Richter 2020; Shim et al., 2020).

Indução do florescimento pela vernalização

Algumas plantas para induzir o florescimento necessitam ser expostas a temperatura fria por um período prolongado, no qual esse processo é denominado vernalização (Helliwell et al., 2006; Whittaker e Dean, 2017). Nessas plantas, existem três genes chaves que regulam a vernalização: *FLOWERING LOCUS C (FLC)*, *FRIGIDA (FRI)* e *VERNALIZATION INSENSITIVE 3 (VIN3)* (Levy et al., 2002; Choi et al., 2011; Whittaker e Dean, 2017). O *FLC* é um repressor floral envolvido diretamente na resposta à vernalização e tem a função de reprimir a expressão dos genes integradores do meristema floral como *FT* e *SOC1*, promovendo atraso do florescimento (Helliwell et al., 2006; Deng et al., 2011). Já *FRI* regula positivamente a transcrição de *FLC* por meio da trimetilação de histonas H3 na lisina-4 em um grande complexo proteico (ver ref. Choi et al., 2011). Por outro lado, quando a planta é exposta ao frio ocorre a transcrição de *VIN3* que é responsável por reprimir a expressão de *FLC* promovendo, assim, o florescimento (Levy et al., 2002). Nesse parágrafo descrevemos resumidamente a via da vernalização, entretanto para mais informação sobre o assunto consultar a literatura Sharma et al., (2020).

Indução do florescimento pela via autônoma

A indução pela via autônoma promove a floração independentemente das condições ambientais (Amasino e Michaels, 2010). Nessa via foram identificados oito genes que supostamente estão ligados à indução do florescimento em *A. thaliana*: *FLOWERING CONTROL LOCUS*, *FLOWERING LOCUS D*, *FLOWERING LOCUS K*, *FLOWERING LOCUS Y*, *FPA*, *MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA1 4*, *LUMINIDEPENDENS* e *RELATIVE OF EARLY FLOWERING 6* (Simpson et al., 2003; Simpson, 2004; Marquardt et al., 2006; Liu et al., 2007; Cheng et al., 2017). As proteínas codificadas por esses genes têm a função de regular os níveis de *FLOWERING LOCUS C*, um repressor floral, por meio de modificações epigenéticas da cromatina (Simpson, 2004; Cheng et al., 2017). Aqui fizemos uma pequena introdução sobre a via autônoma, no entanto, esse assunto foi bem descrito em outras revisões (Cheng et al., 2017; Wu et al., 2020).

Indução do florescimento pelas giberelinas

As giberelinas (GAs) são hormônios que podem promover a floração por meio de interações entre SPL (SQUAMOSA-promoter binding protein-like), *miR172* e proteína

DELLA. Nessa interação as GAs promovem a redução da atividade da DELLA a qual se liga fisicamente às proteínas SPL e as impedem de executar sua função sob os genes-alvos (Yu et al., 2012). Os SPL são reguladores positivos do *miR172* que tem como função regular negativamente *APETALA 2 (AP2)* (Mathieu et al., 2007). Essa proteína *AP2*, por sua vez, controla negativamente a transcrição de *FT* que está diretamente ligada ao florescimento (Mathieu et al., 2007). Além disso, SPL 9/10 regula SPL 3/4/5 para promover a transcrição direta da expressão do gene florígeno e assim induzir o florescimento (Yu et al., 2012). Aqui apresentamos apenas um resumo sobre a via de indução por GAs, no entanto esse assunto foi bem descrito em outras revisões (Bao et al 2019; Izawa 2021).

Por outra perspectiva, bem distante das principais vias de indução do florescimento fotoperiódica, vernalização, autônoma e hormonal. Estudos têm mostrado que mutação em algumas enzimas chaves do ciclo TCA pode alterar o tempo do florescimento em plantas. Araújo et al. (2012), por exemplo, verificaram florescimento acelerado em plantas de tomateiro com deficiência na expressão da enzima 2-oxoglutarato desidrogenase. Outros resultados semelhantes também foram encontrados por Van der Merwe et al. (2009) ao avaliarem plantas de tomate com inibição das enzimas malato desidrogenase e fumarase. Apesar dessas evidências, atualmente não existem estudos que investigaram a fundo qual o real papel dessas enzimas na expressão dos genes chaves das vias do florescimento (Fig. 1). Nesse contexto, alguns questionamentos ainda não estão esclarecidos, tais como: essa alteração no tempo de florescimento é gerada por um desbalanço energético? a variação metabólica proveniente das mutações pode interferir diretamente ou indiretamente na transcrição de genes chaves do florescimento? Quais enzimas do ciclo TCA são capazes de manter, induzir ou retardar o florescimento? Como as enzimas do ciclo TCA promove modificação no tempo de florescimento? Tomando como base esses questionamentos, a seguir, serão pontuados alguns argumentos que auxiliam nessas respostas.

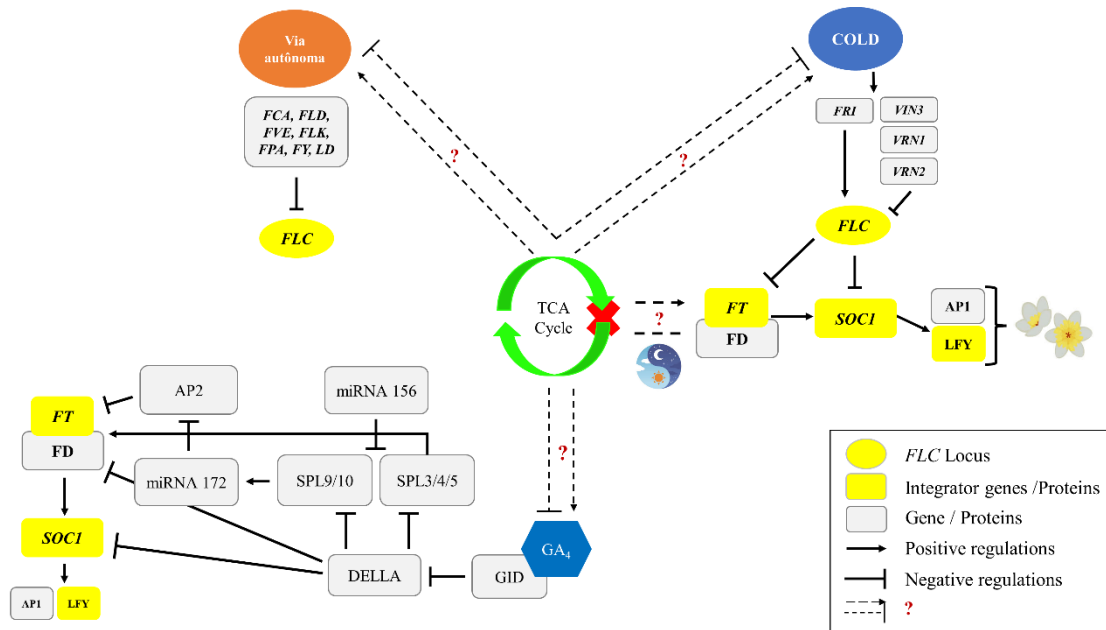


Figure 1: Possível regulação do metabolismo energético nas principais vias de indução do florescimento em plantas. adaptado de Bouché et al., 2015.

METABOLISMO ENERGÉTICO E SUA INFLUÊNCIA NO FLORESCIMENTO

As mitocôndrias são organelas extremamente complexas que são encontradas apenas nas células eucarióticas (Giezen, 2011). Sua principal função é produzir ATP a partir da respiração celular (Saraste, 1999). Esse processo metabólico envolve a oxidação de moléculas orgânicas com o objetivo de gerar saldo positivo de ATP que será utilizado nas diversas atividades celulares (Saraste, 1999; Giezen, 2011). Alterações nos metabolitos dessa organela podem promover interferência em processos fundamentais do crescimento e desenvolvimento das plantas tais como: germinação (Logan et al., 2001); fotossíntese (Nunes-Nesi et al, 2008); assimilação de nitrato (Sienkiewicz-Porzucek et al., 2010;); balanço energético (Xu et al., 2021); desenvolvimento de flores (Carlsson et al., 2008); amadurecimento de frutos (Sweetman et al., 2009); morte celular programada (Bras et al., 2005) e tolerância ao estresse (Liberatore et al., 2016). Além disso, as mitocôndrias podem fornecer esqueletos de carbono, através dos intermediários do ciclo TCA (Szal e Podgórska, 2012) e alterar a homeostase redox (Schwarzländer e Finkemeier, 2013). Atualmente, também existem estudos mostrando que algumas enzimas do ciclo TCA são capazes de alterar o tempo do florescimento, mas não está claro como e em que nível esse processo é afetado.

Vários estudos têm se concentrado no *knockout* das enzimas chaves do ciclo TCA, com o objetivo de revelarem o papel dessas enzimas no metabolismo e morfologia das plantas (Carrari et al., 2003; Studart-Guimarães et al., 2007; Sienkiewicz-Porzucek et al., 2008; Van der Merwe et al., 2009; Sienkiewicz-Porzucek et al., 2010; Araújo et al., 2011; Araújo et al.,

212a;). Esses estudos têm demonstrado que cada enzima possui especificidades diferentes durante o crescimento e desenvolvimento das plantas, ou seja, algumas enzimas possuem maior relevância no controle do fluxo metabólico do ciclo TCA (Araújo et al., 2012). Como é o caso das enzimas malato desidrogenase, aconitase e 2-oxoglutarato desidrogenase que controlam em aproximadamente 45, 25 e 20% do fluxo metabólico em plantas, respectivamente (Araújo et al., 2012). Diante desse contexto, abordaremos sobre o papel de cada enzima do ciclo TCA no processo de florescimento em plantas.

Citrato Sintase

A citrato sintase é responsável por catalisar o primeiro passo no ciclo de Krebs (Wiegand e Remington, 1986). Essa enzima é a única do ciclo TCA capaz de promover uma ligação carbono-carbono (Landschütze et al., 1995), ou seja, é responsável por catalisar acetil coenzima A (2C) e oxalacetato (4C) em citrato (6C) (Landschütze et al., 1995). Nas plantas, a citrato sintase está presente quase exclusivamente nas mitocôndrias (Wiegand e Remington, 1986). A exceção ocorre no ciclo do glioxilato durante a germinação, onde a enzima está presente nos peroxissomos (Tolbert, 1981).

Atualmente, alguns estudos estão sendo realizados com o objetivo de aumentar a compreensão do papel da citrato sintase em plantas. Esses estudos têm demonstrado que essa enzima tem grande influência durante a assimilação de nitrato (Scheible et al., 2008); tolerância ao alumínio e eficiência na absorção de fosforo (Anoop et al., 2003); além disso, pode alterar o crescimento das células (Koyama et al., 1999) e aumenta a secreção de ácido cítrico pelas raízes (Yi et al., 2022).

Em relação à indução floral, a restrição na expressão da citrato sintase tem promovido atraso no tempo de florescimento e má-formação dos botões florais (Landschütze et al., 1995). No entanto, em plantas de tomateiro com *knockout* desta enzima nenhuma alteração fenotípica visível foi observada quando comparada ao tipo selvagem (Sienkiewicz-Porzucek et al., 2008). Essa resposta do florescimento pode ser explicada pelo baixo coeficiente do controle de fluxo (FCC) desta enzima (Araújo et al., 2011). O FCC é um parâmetro utilizado na análise de controle dos metabolitos, a qual é muito utilizada para medir o grau de interferência que determinada enzima pode promover nas vias metabólicas em plantas (Kacser e Burns, 1973; Geigenberger et al., 2004). Além disso, Sienkiewicz-Porzucek et al., (2008) observaram pouca mudança nos parâmetros fotossintéticos e nos níveis de ácido orgânicos do ciclo TCA em plantas com restrição da enzima citrato sintase. Esses resultados encontrados corroboram com

a indicação de que a enzima citrato sintase tem baixo FCC. Ou seja, essa enzima interfere pouco nos processos fisiológicos.

Aconitase

A aconitase (ACO) é responsável por catalisar o segundo passo no ciclo de Krebs, através da isomerização reversível do citrato em isocitrato (Courtois-Verniquet e Dource, 1993). Essa enzima pode ser encontrada tanto no metabolismo mitocondrial onde participa do ciclo TCA, como no citosol onde auxilia no ciclo do glioxilato (Courtois-Verniquet e Dource, 1993). Em plantas essa enzima é capaz de alterar a taxa fotossintética e crescimento; modificar os níveis de teor de aminoácido, ácidos orgânicos, carboidratos e promover resistência a estresse abiótico e biótico; (Carrari et al., 2003; Moeder et al., 2007; Hooks et al., 2014).

Em relação ao florescimento, plantas de *Lycopersicon pennellii* e *Nicotina benthamiana* com perda da função de ACO apresentaram características de desenvolvimento atrofiado na fase inicial e atraso no tempo de floração (Carrari, 2003; Moeder et al., 2007). Além disso, um fato intrigante dessas linhagens mutantes foi que além de aumentar os níveis de citrato também aumentaram os níveis de isocitrato (Carrari, 2003), o que não era esperado, visto que essa enzima catalisa citrato em isocitrato (Courtois-Verniquet e Dource, 1993). Um dos fatores que pode ter promovido o atraso do florescimento nessas plantas pode estar relacionado com a redução do teor de aminoácidos. Uma vez que durante a indução e desenvolvimento da inflorescência pode haver uma alta demanda por aminoácidos, devido à remobilização de nitrogênio das folhas para o meristema apical (Imsande e Touraine 1994). Em consonância ao exposto foi demonstrado que aplicação foliar de aminoácidos pode promover florescimento precoce em plantas (Tanaka e Takimoto, 1977; Fuad Mondal et al., 2015).

Outro fator que pode ter promovido o atraso do florescimento em plantas com *knockout* na expressão do gene *ACO* é a redução de alguns ácidos orgânicos do ciclo TCA. Essa redução dos ácidos orgânicos pode promover alteração no balanço energético (Araújo et al., 2011). Nesse contexto, foi verificado em mutantes de tomateiro com restrição na expressão dos genes que codificam a ACO redução dos ácidos 2-oxaglutarato, succinato e fumarato (Carrari, 2003). Em plantas, essas moléculas estão diretamente interligadas na produção de poderes redutores (NADPH e FADH) que posteriormente serão utilizadas para formar ATP (Araújo et al., 2011). Além disso, a alteração dos níveis dos ácidos do ciclo TCA podem acarretar a redução de aproximadamente 33% da relação entre ATP/ADP, ocasionada principalmente pela queda no nível de ATP, o que induz a um desbalanço energético (Carrari, 2003). Outro argumento que

corroborar com o que foi exposto é que para uma melhor eficiência da indução floral é necessário maior quantidade de ATP antes e durante esse processo. (Kandeler et al., 1975).

Isocitrato Desidrogenase

Nas plantas existem dois tipos de isocitrato desidrogenase (IDH): as dependentes de NAD que participam do ciclo do ácido cítrico presentes exclusivamente nas mitocôndrias (Lancien et al., 1998) e as dependentes de NADP que estão presentes no citosol, mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos (Gálvez et al., 1994; Gálvez et al., 1996; Gálvez et al., 1998). A função da IDH nesses compartimentos é oxidar e descarboxilar o isocitrato para produzir 2-oxoglutarato e NADH ou NADPH, conforme sua dependência (Chen e Gadai, 1990). Devido à posição estratégica dessa enzima, vários estudos vêm sendo desenvolvidos para tentar elucidar as funções metabólicas e fisiológicas em plantas. Entretanto, mesmo com tanto esforço, os resultados obtidos são limitados, ou seja, essa enzima não promove nenhuma alteração no desenvolvimento e crescimento de plantas (Kruse et al., 1998; Hodges et al., 2003; Lemaitre e Hodges, 2006; Lemaitre et al., 2007).

Em relação ao florescimento, as plantas com *knockout* na expressão dos genes da IDH [NAD] também não apresentaram diferenças no tempo da floração quando comparadas com o tipo selvagem (Lemaitre et al., 2007; Sienkiewicz-Porzucek et al., 2010). Um motivo que pode ter contribuído para esta resposta fenotípica foi a assimilação do nitrogênio, que não foi alterada, pois esse nutriente é um fator limitante para o florescimento (Zhang et al., 2021). Nessa circunstância, a enzima IDH possui um papel importante na assimilação de amônio, pois é responsável por fornecer 2-oxoglutarato como esqueleto de carbono para produzir glutamato, através da via glutamina sintase e glutamato sintase (GS/GOGAT) (Ohyama e Jumazawa, 1980; Chen e Gadai, 1990). No entanto, a redução da atividade da enzima IDH dependente de NAD em plantas de *A. thaliana* não promoveu redução nos níveis de 2-oxoglutarato e, consecutivamente, não alterou a assimilação do nitrogênio (Lemaitre et al., 2007). Dessa forma, esses resultados sugerem que outra enzima IDH possa estar fazendo a função da IDH dependente de NAD ou os níveis dessa enzima não caiu do limiar ideal para promover alterações. Outro motivo que pode ter promovido esta resposta pode estar relacionado com a baixa FCC apresentada por esta enzima (Araujo et al., 2011). Ou seja, a IDH dependente de NAD interfere pouco em outras vias metabólicas em planta, o que fortalece os resultados fenotípicos observados nessas plantas.

2-Oxoglutarato Desidrogenase

A 2-oxoglutarato desidrogenase é um complexo enzimático constituído por três subunidades: 2-oxoglutarato desidrogenase (subunidade E1); dihidrolipomida succinil transferase (subunidade E2) e dihidrolipoamida desidrogenase (subunidade E3) (Millar et al., 1999). Juntas, essas enzimas são responsáveis por catalisar a reação de conversão de 2-oxoglutarato em succinil-coenzima A, liberando CO₂ e NADH (Bunik e Fernie, 2009). Por se tratar de um complexo multienzimático, os estudos com abordagem na manipulação genética são raros. Consequentemente, o entendimento da função do complexo enzimático sobre processos fisiológicos em plantas é pouco caracterizado.

Uma forma para compreender a função da 2-oxoglutarato desidrogenase em plantas foi aplicar fosfonato de succinil, um inibidor específico desta enzima, em tubérculos de batata. A aplicação desse produto além de promover redução na atividade da enzima 2-oxoglutarato desidrogenase também promoveu redução da respiração e alteração na assimilação de nitrogênio (Araújo et al., 2008). No entanto, esse resultado pode ser uma ação direta da aplicação, uma vez que esse produto pode interferir em outros processos na planta. Em contrapartida, em trabalhos que utilizaram plantas com *knockout* na expressão dos genes que codifica a subunidade E1 foi observado redução da respiração, teor de aminoácidos, concentração de proteínas; seguida por aumento dos níveis de malato, fumarato, glicose e frutose (Araújo et al., 2012; Condori-Apfata et al., 2019). Já os mutantes com *knockout* na subunidade E2 apresentaram fotossíntese inalterada; redução da respiração e aumento do crescimento das plantas (Condori-Apfata et al., 2021). Além disso, foi descrito que a subunidade E2 pode estar relacionada com as respostas à imunidade contra patógenos (Liao et al., 2015; Ma et al., 2020).

Em relação à característica fenotípica, as plantas de tomateiro com silenciamento na expressão dos genes da subunidade E1 apresentaram um desenvolvimento acelerado, exibindo floração precoce (Araújo et al., 2012). Essa resposta pode estar relacionada à redução de aproximadamente 40% no nível de GA₃ nas linhagens mutantes (Araújo et al., 2012). Nas plantas de tomateiro a redução da concentração de GAs é um fator importante para induzir o florescimento e promover o desenvolvimento da inflorescência (Silva et al., 2019). O aumento na concentração de açúcares, sobretudo sacarose, pode ser outro fator que contribui para o florescimento precoce nas linhagens mutantes de 2-oxoglutarato desidrogenase em tomateiro (Araújo et al., 2012). O aumento de sacarose, na maioria das plantas, promove o florescimento por atuar como um possível sinalizador para esse processo (Cho et al., 2018). Entretanto, em plantas de *A. thaliana* foi observado os dois extremos, enquanto os mutantes *e1-ogdh2*

apresentaram florescimento precoce, os mutantes *e2-ogdh2* mostraram atraso no início da floração (Condori-Apfata et al., 2019). Esses resultados demonstram que a caracterização fenotípica vai depender de cada gene que codificam as subunidades da 2-oxoglutarato desidrogenase.

Succinil CoA Ligase

Em tomateiro, três genes são responsáveis por codificar as duas subunidades da succinil CoA ligase (SCoAL) (Studart-Guimarães et al., 2005). Sendo essas: a subunidade α , que se presume estar relacionada com processos catalíticos; e a subunidade β que atua na regulação (Studart-Guimarães et al., 2005). Em plantas, essa enzima é encontrada tanto na mitocôndria quanto no citosol (Araújo et al., 2011). Nesses compartimentos, a SCoAL é responsável por catalisar reversivelmente succinil-CoA em succinil, formando uma molécula de ATP (Studart-Guimarães et al., 2005).

Até onde sabemos, existe apenas um único trabalho funcional para tentar compreender a função da SCoAL em plantas. Nesse estudo, foram utilizados mutantes que apresentavam redução da atividade da SCoAL, e foi observada pouca alteração na taxa fotossintética (Studart-Guimarães et al., 2007). Além disso, não apresentaram redução nas concentrações de sacarose, glicose, frutose e amido (Studart-Guimarães et al., 2007). Bem como, pouca alteração nos níveis dos ácidos do ciclo do ácido tri carboxílico, até mesmo succinato que é o produto desta enzima não foi alterado (Studart-Guimarães et al., 2007).

Em relação ao florescimento, as plantas mutantes na expressão do gene que codifica a subunidade β não apresentaram nenhuma alteração, mesmo em linhagens que reduziram cerca de 91% a expressão do gene (Studart-Guimarães et al., 2007). Segundo os mesmos autores, o fenótipo observado, pode estar atrelado à atividade do GABA. Ou seja, nessas linhagens o GABA foi utilizado como uma via alternativa para suprir a produção de succinato, podendo ser essa a causa da respiração pouco alterada nessas linhagens (Studart-Guimarães et al., 2007). Outros fatores que corroboram com esses resultados é a baixa FCC encontrado para essa enzima (Araújo et al., 2011). Assim, esses resultados demonstram que essa enzima possui baixo impacto no metabolismo das plantas promovendo nenhuma alteração metabólica e fenotípica.

Succinato Desidrogenase

A succinato Desidrogenase (SDH), também chamada de complexo II, está exclusivamente localizada na membrana mitocondrial (Araújo et al., 2011; Huang e Millar, 2013). Em planta, essa enzima é responsável tanto por catalisar succinato em fumarato, formando FADH₂ no ciclo TCA (Dudkina et al., 2006), como também, oxidar FADH₂ para

liberar dois hidrogênios na cadeia transportadora de elétrons (Dudkina et al., 2006). Até o momento, existem apenas três trabalhos que utilizaram estratégias genéticas com o objetivo de estudar a função da SDH em plantas. Esses trabalhos mostraram que o gene *SDH1-1* em *Arabidopsis* é essencial para o desenvolvimento gametófito (León et al., 2007); e que a inibição da expressão do gene *SDH2-3* em *Arabidopsis* pode inibir a germinação (Roschzttardtz et al., 2009); além disso, o *knockout* no gene *SDH2-2* em tomateiro é responsável por aumentar a fotossíntese, respiração e biomassa (Araújo et al., 2011a).

Em relação ao fenótipo, não houve alteração durante o tempo do florescimento tanto em tomateiro como em *A. thaliana* (León et al., 2007; Araújo et al., 2011a). Esse resultado pode ser explicado, pois, nos mutantes não houve diferença de aminoácidos totais, açúcares solúveis e amido quando comparada com a planta selvagem (Araújo et al., 2011a). Além disso, a SDH foi responsável por reduzir a taxa de respiração em apenas 15%, mesmo apresentando redução na expressão de aproximadamente 60% nas linhagens (Araújo et al., 2011a). Esse resultado corrobora como a baixa FCC encontrada para essa enzima, que é de apenas 7% (Araújo et al., 2011), indicando, assim, baixas interferências em outras vias metabólicas.

Fumarase

O papel da fumarase (FUM) é catalisar a hidratação reversível de fumarato em malato (Tseng et al., 2001). Essa é uma reação que ocorre exclusivamente no ciclo TCA na maioria das plantas (Araújo et al., 2011). Entretanto, a única planta apontada na literatura com duas FUM é a *A. thaliana* que apresenta uma mitocondrial (*FUM1*) e a outra citosólica (*FUM2*) (Pracharoenwattana et al., 2010).

Na atualidade, existem alguns estudos que foram realizados com o objetivo de tentar compreender o papel da FUM no metabolismo e fenótipo das plantas. Foi observado que tanto a fumarase como o ácido fumárico são elementos essenciais para as respostas ao dano no DNA (Yogev et al., 2010). Acredita-se também que o fumarato e o malato podem servir como contra-ânions durante a assimilação de nitrogênio em folhas (Smith e Raven, 1979; Tschoep et al., 2009). Além disso, utilizando planta mutante com *knockout* na expressão do gene FUM, foi verificado deficiência na abertura estomática; redução da respiração, fotossíntese e biomassa (Nunes-Nesi et al., 2007). Bem como, redução do comprimento radicular e alteração no conteúdo dos fitohormônios (van der Merwe et al., 2009).

Em plantas com inibição da expressão do gene *FUM* não houve diferença marcante no tempo de floração (Nunes-Nesi et al., 2007; van der Merwe et al., 2009). Mesmo essa inibição resultando em uma diminuição da atividade da FUM em aproximadamente 75% (Nunes-Nesi

et al., 2007). O curioso disso, foi que tanto fumarato como malato aumentaram nessas linhagens, o que pode ter contribuído para a falta de fenótipo (Nunes-Nesi et al., 2007). Nesse caso, o aumento de fumarato, que já era esperado, pode ser explicado pela baixa atividade dessa enzima, o qual é utilizado como substrato para produzir malato (Nunes-Nesi et al., 2007). Mas, o aumento de malato pode ser explicado pelo mecanismo do bombeamento de malato-aspartato. Resumindo esse processo, o aspartato é transformado em oxalacetato (OAA) que por conseguinte forma malato no citosol (Indiveri et al., 1987). O malato é então transportado através da membrana mitocondrial e reoxidado a OAA no ciclo TCA (Indiveri et al., 1987). Assim, esse processo pode auxiliar na regulação do ciclo TCA e promover a falta de fenótipo visível nessas linhagens.

Malato desidrogenase

A última etapa do ciclo TCA é finalizada pela ação da enzima malato desidrogenase (MDH) que tem como função catalisar a oxidação reversível do malato a oxalacetato (OAA) gerando redução do NAD^+ (Nunes-Nesi et al., 2005). Nas plantas, existem quatro tipos de MDH que são classificadas conforme sua localização subcelular e função biológica: mitocondriais (mMDH); peroxissomais (pMDH); citoplasmáticas (cMDH); cloroplásticas (chMDH) (Miller et al., 1998). Acredita-se que a mMDH parece ser importante não apenas para a oxidação do NADH, mas também opera no sentido inverso, reduzindo OAA a malato e aumentando o fornecimento de NAD^+ (Journet et al., 1981).

Nas plantas, estudos elucidaram algumas das funções da enzima MDH no metabolismo e fisiologia. Dentre essas funções, a enzima MDH pode promover o equilíbrio redox (Bykova et al., 2005); fornece malato para o metabolismo das plantas C4 (Rebeille e Hatch, 1986); promove tolerância ao estresse por metais pesados (Tesfaye et al., 2001; Wu et al., 2019); melhora a eficiência da assimilação de nitrogênio (Setién et al., 2014); promove o equilíbrio do pH (Miller et al., 1998); interfere no movimento estomático (Scheibe et al., 1990); altera a fotossíntese, respiração e biomassa (Nunes-Nesi et al., 2005); modifica a viabilidade e germinação das sementes (Beeler et al., 2014; Sew et al., 2016) e participa do processo de β -oxidação (Pracharoenwattana et al., 2007).

Em relação a indução do florescimento, a inibição da enzima mMDH em plantas de tomateiro promoveu florescimento precoce (Nunes-Nesi et al., 2005). Esse resultado pode estar relacionado à baixa concentração de GAs, mesmo mecanismo que foi descrito para a enzima 2-oxaglutarato desidrogenase. Ou seja, em tomateiros os níveis de GAs reduzidos promovem a indução do florescimento (Silva et al., 2019). Nesse sentido foi verificado em tomateiro com

limitação da atividade da enzima mMDH redução da expressão de *GA₅₃*, *GA₂₉*, *GA₂₀* e *GA₁* genes relacionados a biossíntese de GA (Van der Merwe et al., 2009). Além disso, essa enzima apresentou um valor elevado de FCC (Araújo et al., 2011), o qual confirma que a mMDH possui um papel importante no metabolismo das plantas, justificando o florescimento precoce.

CONCLUSÕES

Como vimos nos últimos anos, vários estudos têm utilizado da técnica de genética reversa com a finalidade de compreender a função das enzimas do ciclo TCA mitocondrial das plantas. Os trabalhos que utilizamos para escrever essa revisão revelaram que a inibição dos genes relacionados à maioria das enzimas do ciclo TCA promoveram alteração dos intermediários do próprio ciclo e redução da taxa de respiração. Bem como, cada enzima apresentou característica própria durante o crescimento e desenvolvimento das plantas. Como por exemplo, a redução da atividade da enzima aconitase atrasou o tempo do florescimento, enquanto as enzimas 2-oxaglutarato desidrogenase e malato desidrogenase apresentaram florescimento precoce em tomateiro (Fig. 2). Por outro lado, a manipulação genética das enzimas citrato sintase, isocitrato desidrogenase, succinil CoA ligase, succinato desidrogenase e fumarase não apresentaram nenhuma alteração no tempo de floração (Fig. 2). Essa alteração do tempo do florescimento pode estar ligada a diversos fatores como balanço energético e hormonal; teor de açúcares, aminoácidos, amido; assimilação de nitrogênio dentre outros. No entanto, os fatores discutidos aqui são apenas hipotéticos, pois, os dados apresentados para justificar o florescimento para cada enzima do ciclo TCA foram obtidos de plantas que se encontravam na fase vegetativa. Em vista disso, é necessário mais estudo com foco na fase reprodutiva e em outras espécies para compreender melhor a influência de cada enzima do ciclo TCA na expressão dos genes relacionados às vias de indução do florescimento das plantas.

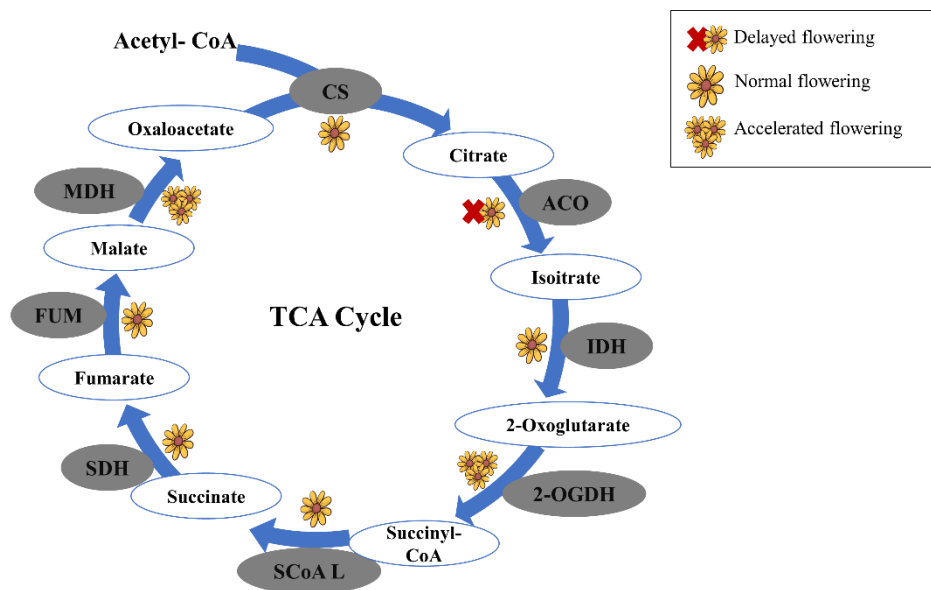


Figure 2: Influência das enzimas do ciclo tricarboxílico no tempo de florescimento em plantas. Fonte: do autor (2023).

REFERÊNCIAS

- ABE, M.; KOBAYASHI Y.; YAMAMOTO, S.; DAIMON, Y.; YAMAGUCHI, A.; IKEDA, Y.; ICHINOKI, H.; NOTAGUCHI, M.; GOTO, K.; ARAKI, T. FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. **Science**, v. 309, p. 1052–1056, 2005.
- AMASINO, R. M.; MICHAELS, S. D. The timing of flowering. **Plant Physiol**, v. 154, p. 516-520, 2010.
- ANOOP, V. M.; BASU, U.; MCCAMMON, M. T.; MCALISTER-HENN, L.; TAYLOR, G. J. Modulation of citrate metabolism alters aluminum tolerance in yeast and transgenic canola overexpressing a mitochondrial citrate synthase. **Plant Physiol**, v. 132, n. 4, p. 2205-17, 2003.
- ARAKI, T. Transition from vegetative to reproductive phase. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, n. 1, p. 63-68, 2001.
- ARASTE M. Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. **Science**, v. 283, p. 1488-1493. 1999.
- ARAUJO, W. L.; NUNES-NESI, A.; NIKOLOSKI, Z.; SWEETLOVE, L. J.; FERNIE, A. R. Metabolic control and regulation of the tricarboxylic acid cycle in photosynthetic and heterotrophic plant tissues. **Plant, Cell & Environment**, v. 35, n. 1, p. 1-21. 2011.
- ARAUJO, W. L.; NUNES-NESI, A.; NIKOLOSKI, Z.; SWEETLOVE, L. J.; FERNIE, A. R. Metabolic control and regulation of the tricarboxylic acid cycle in photosynthetic and heterotrophic plant tissues. **Plant Cell Environ**, v. 35, n. 1, p. 21, 2012.

ARAÚJO, W. L.; NUNES-NESEI, A.; OSORIO, S.; USADEL, B.; FUENTES, D.; NAGY, R.; BALBO, I.; LEHMANN, M.; STUDART-WITKOWSKI, C.; TOHGE, T. Antisense inhibition of the iron-sulphur subunit of succinate dehydrogenase enhances photosynthesis and growth in tomato via an organic acid mediated effect on stomatal aperture. **Plant cell**, v. 23, n. 2, p. 600-627, 2011.

ARAÚJO, W. L.; NUNES-NESEI, A.; OSORIO, S.; USADEL, B.; FUENTES, D.; NAGY, R.; BALBO, I.; LEHMANN, M.; STUDART-WITKOWSKI, C.; TOHGE, T.; MARTINOIA, E.; JORDANA, X.; DAMATTA, F. M.; FERNIE, A. R. Antisense inhibition of the iron-sulphur subunit of succinate dehydrogenase enhances photosynthesis and growth in tomato via an organic acid-mediated effect on stomatal aperture. **Plant Cell**, v. 23, n. 2, p. 600-27, 2011a.

ARAÚJO, W. L.; NUNES-NESEI, A.; TRENKAMP, S.; BUNIK, V. I.; FERNIE, A.R. Inhibition of 2-oxoglutarate dehydrogenase in potato tuber suggests the enzyme is limiting for respiration and confirms its importance in nitrogen assimilation, **Plant Physiol**, v. 148, n. 4, p. 1782-96, 2008.

ARAÚJO, W. L.; TOHGE, T.; OSORIO, S.; LOHSE, M.; BALBO, I.; KRAHNERT, I.; SIENKIEWICZ-PORZUCEK, A.; USADEL, B.; NUNES-NESEI, A.; FERNIE, A. R. Antisense inhibition of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex in tomato demonstrates its importance for plant respiration and during leaf senescence and fruit maturation. **Plant Cell**, v. 24, p. 2328–2351, 2012.

ARAÚJO, W. L.; TOHGE, T.; OSORIO, S.; LOHSE, M.; BALBO, I.; KRAHNERT, I.; SIENKIEWICZ-PORZUCEK, A.; USADEL, B.; NUNES-NESEI, A.; FERNIE, A. R. Antisense inhibition of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex in tomato demonstrates its importance for plant respiration and during leaf senescence and fruit maturation. **Plant Cell**, v. 24, n. 6, p. 2328-51, 2012.

ARAÚJO, W. L.; TOHGE, T.; OSORIO, S.; LOHSE, M.; BALBO, I.; KRAHNERT, I.; SIENKIEWICZ-PORZUCEK, A.; USADEL, B.; NUNES-NESEI, A.; FERNIE, A. R. Antisense Inhibition of the 2-Oxoglutarate Dehydrogenase Complex in Tomato Demonstrates Its Importance for Plant Respiration and during Leaf Senescence and Fruit Maturation, **The Plant Cell**, v. 24, n. 6, p. 2328-2351, 2012a.

BANDAY, Z. Z.; NANDI, A. K. Interconnection between flowering time control and activation of systemic acquired resistance. **Front Plant Sci**, v. 6, p. 174, 2015.

BAO, S.; HUA, C.; SHEN, L.; YU, H. New insights into gibberellin signaling in regulating flowering in *Arabidopsis*. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 60, n. 1, 118-131, 2019.

BEELE, S.; LIU, H. C.; STADLER, M.; SCHREIER, T.; EICKE, S.; LUE, W. L.; TRUERNIT, E.; ZEEMAN, S. C.; CHEN, J.; KÖTTING, O. Plastidial NAD-dependent malate dehydrogenase is critical for embryo development and heterotrophic metabolism in *Arabidopsis*. **Plant Physiol**, v. 164, n. 3, p. 1175-90, 2014.

BLITS, K. C.; GALLAGHER, J. L. Morphological and physiological responses to increased salinity in marsh and dune ecotypes of *Sporobolus virginicus* (L) Kunth. **Oecologia**, v. 87, p. 330-335, 1991.

- BOUCHÉ, F.; LOBET, G.; TOCQUIN, P.; PÉRILLEUX, C. Flor-id: an interactive database of flowering-time gene networks in *Arabidopsis thaliana*. **Nucleic Acids Research**, v. 44, p. 1167–1171, 2015.
- BRAS, M.; QUEENAN, B.; SUSIN, S. A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. **Biochemistry (Mosc)**, v. 70, n. 2, p. 231-9, 2005.
- BUNIK, V. I.; FERNIE, A. R. Metabolic control exerted by the 2-oxoglutarate dehydrogenase reaction: a cross-kingdom comparison of the crossroad between energy production and nitrogen assimilation. **Biochem J**, v. 27, n. 422, p. 405-21, 2009.
- BYKOVA, N. V.; KEERBERG, O.; PÄRNIK, T.; BAUWE, H.; GARDESTRÖM, P. Interaction between photorespiration and respiration in transgenic potato plants with antisense reduction in glycine decarboxylase. **Planta**, v. 222, n. 1, p. 130-40, 2005.
- CARLSSON, J.; LEINO, M.; SOHLBERG, J.; SUNDSTROEM, J. F.; GLIMELIUS, K. Mitochondrial regulation of flower development. **Mitochondrion**, v. 8, p. 74-86, 2008.
- CARRARI, F.; NUNES-NESI, A.; GIBON, Y.; LYTOVCHENKO, A.; LOUREIRO, M. E.; FERNIE, A. R.; Reduced expression of aconitase results in an enhanced rate of photosynthesis and marked shifts in carbon partitioning in illuminated leaves of wild species tomato. **Plant Physiol**, v. 133, n. 3, p. 1322-1335, 2003.
- CHEN, R. D.; GADAL, P. Structure, functions and regulation of NAD and NADP dependent isocitrate dehydrogenases in higher plants and in other organisms. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 28, n. 3, p. 411-427, 1990.
- CHENG, J. Z.; ZHOU, Y. P.; LY, T. X.; XIE, C. P.; TIAN, C. E. Research progress on the autonomous flowering time pathway in *Arabidopsis*. **Physiol. and Mol. Biol. of Plants**, v. 23, p. 477–485, 2017.
- CHO, L. H.; PASRIGA, R.; YOON, J. Roles of Sugar in controlling Flowering Time, **Plant Biol**, v. 61, p. 121-130, 2018.
- CHOI, K.; KIM, J.; HWANG, H. J.; KIM, S.; PARK, C.; KIM, S. Y.; LEE, I. The *FRIGIDA* complex activates transcription of *FLC*, a strong flowering repressor in *Arabidopsis*, by recruiting chromatin modification factors. **Plant Cell**, v. 23, p. 289–303, 2011.
- CONDORI-APFATA, J. A.; BATISTA-SILVA, W.; MEDEIROS, D. B.; VARGAS, J. R.; VALENTE, L. M. L.; HEYNEKE, E.; PÉREZ-DÍAZ, J. L.; FERNIE, A. R.; ARAÚJO, W. L.; NUNES-NESI, A. The *Arabidopsis* E₁ subunit of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex modulates plant growth and seed production. **Plant Mol Biol**, v. 101, n. 1, p. 183-202, 2019.
- CONDORI-APFATA, J. A.; BATISTA-SILVA, W.; MEDEIROS, D. B.; VARGAS, J. R.; VALENTE, L. M. L.; PÉREZ-DÍAZ, J. L.; FERNIE, A. R.; ARAÚJO, W. L.; NUNES-NESI, A. Downregulation of the E2 Subunit of 2-Oxoglutarate Dehydrogenase Modulates Plant Growth by Impacting Carbon-Nitrogen Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Physiol**, v. 62, n. 5, p. 798-814, 2021.

CUNHA, G. A. P.; COSTA, J. T. A.; REINHARDT, D. H. Natural flowering in pineapple: inhibition by growth regulators. **Fruits**, v. 58, p. 27-37, 2003.

DASS, H. C.; RANDHAWA, G. S.; NEGI, S. P. Flowering in pineapple as influenced by ethephon and its combinations with urea and calcium carbonate. **Scientia Horticulturae**, v. 3, p. 231–238, 1975.

DENG, W.; YING, H.; HELLIWELL, C. A.; TAYLOR, J. M.; PEACOCK, W. J.; DENNIS, E. S. *FLOWERING LOCUS C (FLC)* regulates development pathways throughout the life cycle of *Arabidopsis*. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 108, p. 6680–6685, 2011.

DORE, M. H. Climate change and changes in global precipitation patterns: what do we know? **Environ Int**, v.31, n. 8, p. 1167-81, 2005.

DUDKINA, N. V.; HEINEMEYER, J.; SUNDERHAUS, S.; BOEKEMA, E. J.; BRAUN, H. P. Respiratory chain supercomplexes in the plant mitochondrial membrane. **Trends Plant Sci**, v. 11, n. 5, p. 232-40, 2006.

FAHEEN, M.; ASLAM, M.; RAZAQ, M. Pollination ecology with special reference to insects. **Journal of Research**, v. 15, n. 4, p. 395-409, 2004.

FUAD MONDAL, M.; ASADUZZAMAN, M.; TANAKA, H.; ASAO, T. Effects of amino acids on the growth and flowering of *Eustoma grandiflorum* under autotoxicity in closed hydroponic culture. **Scientia Horticulturae**, v. 192, n.1, p. 453-459. 2015.

GALVEZ, S.; BISMUTH, E.; SARDA, C.; GADAL, P. Purification and Characterization of Chloroplastic NADP-Isocitrate Dehydrogenase from Mixotrophic Tobacco Cells (Comparison with the Cytosolic Isoenzyme). **Plant Physiol**, v. 105, n. 2, p. 593-600, 1994.

GÁLVEZ, S.; HODGES, M.; DECOTTIGNIES, P.; BISMUTH, E.; LANCIEN, M.; SANGWAN, R. S.; DUBOIS, F.; LEMARÉCHAL, P.; CRÉTIN, C.; GADAL, P. Identification of a tobacco cDNA encoding a cytosolic NADP-isocitrate dehydrogenase. **Plant Mol Biol**, v. 30, n. 2, p. 307-20, 1996.

GÁLVEZ, S.; ROCHE, O.; BISMUTH, E.; BROWN, S.; GADAL, P.; HODGES, M. Mitochondrial localization of a NADP-dependent [corrected] isocitrate dehydrogenase isoenzyme by using the green fluorescent protein as a marker. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 95, n. 13, p. 7813-8, 1998.

GEIGENBERGER, P.; STITT, M.; FERNIE, A. R. Metabolic control analysis and regulation of the conversion of sucrose to starch in growing potato tubers. **Plant Cell and Environment**, v. 27, n. 6, p. 655-673, 2004.

GIEZEN M, Mitochondria and the Rise of Eukaryotes, **BioScience**, v. 61, n. 8, p. 594–601, 2011.

GRAHL, N.; DINAMARCO, T. M.; WILLGER, S. D.; GOLDMAN, G. H.; CRAMER, R. A. *Aspergillus fumigatus* mitochondrial electron transport chain mediates oxidative stress homeostasis, hypoxia responses and fungal pathogenesis. **Mol Microbiol**, v. 84, n. 2, p. 383-99, 2012.

- GUPTA, K. J.; SHAH, J. K.; BROTMAN, Y.; JAHNKE, K.; WILLMITZER, L.; KAISER, W. M.; BAUWE, H.; IGAMBERDIEV, A. U. Inhibition of aconitase by nitric oxide leads to induction of the alternative oxidase and to a shift of metabolism towards biosynthesis of amino acids. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 1773–1784, 2012.
- HAYAMA, R.; YOKOI, S.; TAMAKI, S.; YANO, M.; SHIMAMOTO, K. Adaptation of photoperiodic control pathways produces short-day flowering in rice. **Nature**, v. 422, p. 719–722. 2003.
- HELLIWELL, C. A.; WOOD, C. C.; ROBERSTON, M.; PEACOCK, J. W.; DENNIS, E. S. The Arabidopsis FLC protein interacts directly in vivo with SOC1 and FT chromatin and is part of a high-molecular-weight protein complex. **Plant J**, v. 46, p. 183–192, 2006.
- HODGES, M.; FLESCHE, V.; GÁLVEZ, S.; BISMUTH, E. Higher plant NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenases, ammonium assimilation and NADPH production. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 6, p. 577–585, 2003.
- HOOKS, M. A.; ALLWOOD, J. W.; HARRISON, J. K. D.; KOPKA, J.; ERBAN, A.; GOODACRE, R.; BALK, J. Selective induction and subcellular distribution of *ACONITASE 3* reveal the importance of cytosolic citrate metabolism during lipid mobilization in Arabidopsis. **Biochemical Journal**, v. 463, p. 309–317, 2014.
- HUANG, S.; MILLAR, A. H. Succinate dehydrogenase: the complex roles of a simple enzyme. **Curr Opin Plant Biol**, v. 16, n. 3, p. 344–9, 2013.
- HUIJSER, P.; SCHMID, M. The control of developmental phase transitions in plants. **Development**, v. 138, p. 4117–4129, 2011.
- IMSANDE, J.; TOURAINÉ, B. N Demand and the Regulation of Nitrate Uptake. **Plant Physiol**, v. 105, n. 1, p. 3–7, 1994.
- INDIVERI, C.; KRÄMER, R.; PALMIERI, F. Reconstitution of the malate/aspartate shuttle from mitochondria. **J Biol Chem**, v. 262, n. 33, p. 15979–83, 1987.
- Irish V. The ABC model of floral development. **Current Biology**, 27: 887–890, 2017.
- IZAWA T. What is going on with the hormonal control of flowering in plants?, **The plant Journal**, v. 105, n. 2, p. 431–445, 2021.
- IZAWA, T.; OIKAWA, T.; SUGIYAMA, N.; TANISAKA, T.; YANO, M.; SHIMAMOTO, K. Phytochrome mediates the external light signal to repress FT orthologs in photoperiodic flowering of rice. **Genes and Development**, v.16, p. 2006–2020, 2002
- JOSEPH-HORNE, T.; HOLLOMON, D. W.; WOOD, P. M. Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. **Biochim Biophys Acta**, v. 1504, n. 2, p. 179–95, 2001
- JOURNET, E.P.; NEUBURGER, M.; DOUCE, R. Role of Glutamate-oxaloacetate Transaminase and Malate Dehydrogenase in the Regeneration of NAD for Glycine Oxidation by Spinach leaf Mitochondria. **Plant Physiol**, v. 67, n. 3, p. 467–9, 1981.

KACSER, H.; BURNS, J. A. The control of flux. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, v. 28, p. 65-104, 1973.

KANDELER, R.; HUGEL, B.; ROTTENBURG, T. Relations between photosynthesis and flowering in *Lemnaceae*. **Environmental and Biological Control of Photosynthesis**, v. 183, p. 161-169, 1975.

KAWAI, Y.; ONO, E.; MIZUTANI, M. Evolution and diversity of the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase superfamily in plants. **Plant J**, v. 78, n. 2, p. 328-43, 2014.

KINOSHITA, A.; RICHTER, R. Genetic and molecular basis of floral induction in *Arabidopsis thaliana*. **J Exp Bot**, v. 71, n. 9, p. 2490-2504, 2020.

KOYAMA, H.; TAKITA, E.; KAWAMURA, A.; HARA, T.; SHIBATA, D. Over expression of mitochondrial citrate synthase gene improves the growth of carrot cells in Al-phosphate medium. **Plant Cell Physiol**, v. 40, n. 5, p. 482-8, 1999.

KRUSE, A.; FIEUW, S.; HEINEKE, D.; MÜLLER-RÖBER, B. Antisense inhibition of cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase in transgenic potato plants. **Planta**, v. 205, n. 1, p. 82-91, 1998.

LANCIEN, M.; GADAL, P.; HODGES, M. Molecular characterization of higher plant NAD-dependent isocitrate dehydrogenase: evidence for a heteromeric structure by the complementation of yeast mutants. **Plant J**, v. 16, n. 3, p. 325-33, 1998.

LANDSCHÜTZE, V.; MÜLLER-RÖBER, B.; WILLMITZER, L. Mitochondrial citrate synthase from potato: predominant expression in mature leaves and young flower buds. **Planta**, v. 196, n. 4, p. 756-64, 1995.

LANDSCHÜTZE, V.; WILLMITZER, L.; MÜLLER-RÖBER, B. Inhibition of flower formation by antisense repression of mitochondrial citrate synthase in transgenic potato plants leads to a specific disintegration of the ovary tissues of flowers. **EMBO J**, v. 14, n. 4, p. 660-6, 1995.

LEE, B. D.; CHA, J. Y.; KIM, M. R.; PAEK, N. C.; KIM, W. Y. Photoperiod sensing system for timing of flowering in plants. **BMB Rep**, v. 51, n. 4, p. 163-164, 2018.

LEE, H.; SUH, S. S.; PARK, E.; CHO, E.; AHN, J. H.; KIM, S. G.; LEE, J. S.; KWON, Y. M.; LEE, I. The *AGAMOUS-LIKE 20* MADS domain protein integrates floral inductive pathways in *Arabidopsis*. **Genes and Development**, v. 14, p. 2366-2376, 2000.

LEMAITRE, T.; HODGES, M. Expression analysis of *Arabidopsis thaliana* NAD-dependent isocitrate dehydrogenase genes shows the presence of a functional subunit that is mainly expressed in the pollen and absent from vegetative organs. **Plant Cell Physiol**, v. 47, n. 5, p. 634-43, 2006.

LEMAITRE, T.; URBANCZYK-WOCHNIAK, E.; FLESCH, V.; BISMUTH, E.; FERNIE, A. R.; HODGES, M. NAD-dependent isocitrate dehydrogenase mutants of *Arabidopsis* suggest the enzyme is not limiting for nitrogen assimilation. **Plant Physiol**, v. 144, n. 3, p. 1546-58, 2007.

LEÓN, G.; HOLUIGUE, L.; JORDANA, X. Mitochondrial complex II Is essential for gametophyte development in Arabidopsis. **Plant Physiol**, v. 143, n. 4, p. 1534-46, 2007.

LEVY, Y. Y.; MESNAGE, S.; MYLNE, J. S.; GENDALL, A. R.; DEAN, C. Multiple roles of Arabidopsis *VRN1* in vernalization and flowering time control. **Science**, v. 297, p. 243–246. 2002.

LIAO, Y.; TIAN, M.; ZHANG, H.; LI, X.; WANG, Y.; XIA, X.; ZHOU, J.; ZHOU, Y.; YU, J.; SHI, K.; KLESSIG, D. F. Salicylic acid binding of mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase E2 affects mitochondrial oxidative phosphorylation and electron transport chain components and plays a role in basal defense against tobacco mosaic virus in tomato. **New Phytol**, v. 205, n. 3, p. 1296-1307, 2015.

LIBERATORE, K. L.; DUKOWIC-SCHULZE, S.; MILLER, M. E.; CHEN, C.; KIANIAN, S. F. The role of mitochondria in plant development and stress tolerance. **Free Radic Biol Med**, v. 100, p. 238-256, 2016.

LIU, F.; QUESADA, V.; CREVILLEN, P. B.; AURLE, I.; SWIEZEWSKI, S.; DEAN, C. The Arabidopsis RNA-binding protein FCA requires a lysine-specific demethylase 1 homolog to downregulate *FLC*. **Mol Cell**, v.28, p. 398–407, 2007.

LOGAN, D. C.; MILLAR, A. H.; SWEETLOVE, L. J.; HILL, S. A.; LEAVER, C. J. Mitochondrial biogenesis during germination in maize embryos. **Plant Physiol**, v. 125, n. 2, p. 662-72, 2001.

MA, Q.; LIU, Y.; FANG, H.; WANG, P.; AHAMMED, G. J.; ZAI, W.; SHI, K. An Essential Role of Mitochondrial α -Ketoglutarate Dehydrogenase E2 in the Basal Immune Response Against Bacterial Pathogens in Tomato. **Front Plant Sci**, v. 11, p. 579772, 2020.

MAJEROVICZ, N.; SONDAHL, M. R. Induction and differentiation of reproductive buds in coffee arabia L. **Braz J Plant Physiol**, v.17, p. 247-254, 2005.

MARQUARDT, S.; BOSS, P. K.; HADFIELD, J.; DEAN, C. Additional targets of the Arabidopsis autonomous pathway members, FCA and FY. **J Exp Bot**, v. 57, p. 3379–3386, 2006.

MILLAR, A. H.; HILL, S. A.; LEAVER, C. J. Plant mitochondrial 2-oxoglutarate dehydrogenase complex: purification and characterization in potato. **Biochem J**, v.343, n. 2, p. 327-34, 1999.

MILLER, S. S.; DRISCOLL, B. T.; GREGERSON, R. G.; GANTT, J. S.; VANCE, C. P. Alfalfa malate dehydrogenase (MDH): molecular cloning and characterization of five different forms reveals a unique nodule-enhanced MDH. **Plant J**, v. 15, n. 2, p. 173-84, 1998.

MOEDER, W.; DEL POZO, O.; NAVARRE, D. A.; MARTIN, G. B.; KLESSIG, D. F. Aconitase plays a role in regulating resistance to oxidative stress and cell death in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana. **Plant Molecular Biology**, v. 63, p. 273–287, 2007.

NUNES-NESE, A.; CARRARI, F.; GIBON, Y.; SULPICE, R.; LYTOVCHENKO, A.; FISAHN, J.; GRAHAM, J.; RATCLIFFE, R. G.; SWEETLOVE, L. J.; FERNIE, A. R.

Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. **Plant J**, v. 50, n. 6, p. 1093-106, 2007.

NUNES-NESE, A.; CARRARI, F.; LYTOVCHENKO, A.; SMITH, A. M.; LOUREIRO, M. E.; RATCLIFFE, R. G.; SWEETLOVE, L. J.; FERNIE, A. R. Enhanced photosynthetic performance and growth as a consequence of decreasing mitochondrial malate dehydrogenase activity in transgenic tomato plants. **Plant Physiol**, v. 137, n. 2, p. 611-22, 2005.

NUNES-NESE, A.; SULPICE, R.; GIBON, Y.; FERNIE, A. R. The enigmatic contribution of mitochondrial function in photosynthesis. **J Exp Bot**. v. 59, n. 7, p. 1675-84, 2008.

OHYAMA, T.; KUMAZAWA, K. Nitrogen assimilation in soybean nodules: I. The role of GS/GOGAT system in the assimilation of ammonia produced by N₂-fixation. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 26, n. 1, p. 109-115, 1980.

PRACHAROENWATTANA, I.; CORNAH, J. E.; SMITH, S. M. Arabidopsis peroxisomal malate dehydrogenase functions in beta-oxidation but not in the glyoxylate cycle. **Plant J**. v. 50, n. 3, p. 381-90, 2007.

PRACHAROENWATTANA, I.; ZHOU, W.; KEECH, O.; FRANCISCO, P. B.; UDOMCHALOTHORN, T.; TSCHOEP, H.; STITT, M.; GIBON, Y.; SMITH, S. M. Arabidopsis has a cytosolic fumarase required for the massive allocation of photosynthate into fumaric acid and for rapid plant growth on high nitrogen. **Plant J**, v. 62, n. 5, p. 785-95, 2010.

REBEILLE, F.; HATCH M. D. Regulation of NADP-malate dehydrogenase in C₄ plants: relationship among enzyme activity, NADPH to NADP ratios, and thioredoxin redox states in intact maize mesophyll chloroplasts. **Arch Biochem Biophys**, v. 249, n. 1, p. 171-9, 1986.

ROSCHZTTARDTZ, H.; FUENTES, I.; VÁSQUEZ, M.; CORVALÁN, C.; LEÓN, G.; GÓMEZ, I.; ARAYA, A.; HOLUIGUE, L.; VICENTE-CARBAJOSA, J.; JORDANA, X. A nuclear gene encoding the iron-sulfur subunit of mitochondrial complex II is regulated by B3 domain transcription factors during seed development in Arabidopsis. **Plant Physiol**, v. 150, n. 1, p. 84-95, 2009.

SAXENA, K. B. Genetic Improvement of Pigeon Pea. **Tropical plant Biology**, v.1, n. 5, p. 159-178, 2008.

SCHEIBE, R. Malate valves to balance cellular energy supply. **Physiol Plant**, v. 120, n. 1, p. 21-26, 2004.

SCHEIBE, R.; RECKMANN, U.; HEDRICH, R.; RASCHKE, K.; Malate Dehydrogenases in Guard Cells of *Pisum sativum*. **Plant Physiol**, v. 93, n. 4, p. 1358-64, 1990.

SCHEIBLE, W. R.; KRAPP, A.; STITT, M. Reciprocal diurnal changes of phosphoenolpyruvate carboxylase expression and cytosolic pyruvate kinase, citrate synthase and NADP-isocitrate dehydrogenase expression regulate organic acid metabolism during nitrate assimilation in tobacco leaves. **Plant, Cell e Environment**, v. 23, m. 11, p. 1155-1167, 2008.

SCHWARZLÄNDER, M.; FINKEMEIER, I. Mitochondrial energy and redox signaling in plants. **Antioxid Redox Signal**, v. 18, n.16, p. 2122-44, 2013.

SETIÉN, I.; VEGA-MAS, I.; CELESTINO, N.; CALLEJA-CERVANTES, M. E.; GONZÁLEZ-MURUA, C.; ESTAVILLO, J. M.; GONZÁLEZ-MORO, M. B. Root phosphoenolpyruvate carboxylase and NAD-malic enzymes activity increase the ammonium-assimilating capacity in tomato. **J Plant Physiol**, v. 171, n. 5, p. 49-63, 2014.

SEW, Y. S.; STRÖHER, E.; FENSKE, R.; MILLAR, A. H. Loss of Mitochondrial Malate Dehydrogenase Activity Alters Seed Metabolism Impairing Seed Maturation and Post-Germination Growth in Arabidopsis. **Plant Physiol**, v. 171, n. 2, p. 849-63, 2016.

SHARMA, N.; GEUTEN, K.; GIRI B. S.; VARMA, A. The molecular mechanism of vernalization in Arabidopsis and cereals: role of Flowering Locus C its homologs. **Physiologia Plantarum**, v. 170, n. 3, p. 373-383, 2020.

SHEN, T. Y.; ODEN, P. C. Relationship between seed vigour and fumarase activity in *Picea abies*, *Pinus contorta*, *Betula pendula* and *Fagus sylvatica*. **Seed Sci. Technol**, v. 30, p. 177– 186, 2002.

SHIM, J. S.; JANG, G. Environmental Signal-Dependent Regulation of Flowering Time in Rice. **Int. J. Mol. Sci**, v. 21, p. 6155, 2020.

SHRESTHA, R.; GÓMEZ-ARIZA, J.; BRAMBILLA, V.; FORNARA, F. Molecular control of seasonal flowering in rice, arabidopsis and temperate cereals. **Ann Bot**, v. 114, n. 7, p. 1445-58, 2014.

SIENKIEWICZ-PORZUCEK, A.; NUNES-NESE, A.; SULPICE, R.; LISEC, J.; CENTENO, D. C.; CARILLO, P.; LEISSE, A.; URBANCZYK-WOCHNIAK, E.; FERNIE, A. R. Mild reductions in mitochondrial citrate synthase activity result in a compromised nitrate assimilation and reduced leaf pigmentation but have no effect on photosynthetic performance or growth. **Plant Physiol**, v. 147, n. 1, p. 115-27, 2008.

SIENKIEWICZ-PORZUCEK, A.; NUNES-NESE, A.; SULPICE, R.; LISEC, J.; CENTENO, D. C.; CARILLO, P.; LEISSE, A.; URBANCZYK-WOCHNIAK, E.; FERNIE, A. R. Mild reductions in mitochondrial citrate synthase activity result in a compromised nitrate assimilation and reduced leaf pigmentation but have no effect on photosynthetic performance or growth. **Plant Physiology**, v. 147, n. 1, p. 115-127, 2008.

SIENKIEWICZ-PORZUCEK, A.; SULPICE, R.; OSORIO, S.; KRAHNERT, I.; LEISSE, A.; URBANCZYK-WOCHNIAK, E.; HODGES, M.; FERNIE, A. R.; NUNES-NESE, A. Mild reductions in mitochondrial NAD-dependent isocitrate dehydrogenase activity result in altered nitrate assimilation and pigmentation but do not impact growth. **Mol Plant**, v. 3, n. 1, p. 156-73, 2010.

SIENKIEWICZ-PORZUCEK, A.; SULPICE, R.; OSORIO, S.; KRAHNERT, I.; LEISSE, A.; URBANCZYK-WOCHNIAK, E.; HODGES, M.; FERNIE, A. R.; NUNES-NESE, A. Mild reductions in mitochondrial NAD-Dependent Isocitrate dehydrogenase activity result in altered nitrate assimilation and pigmentation but do not impact growth. **Molecular Plant**, v. 3, n. 1, p. 156-173, 2010.

SILVA, F. C. da.; CESAR, M. A. A.; SILVA, C. A. B. Pequenas Indústrias rurais de cana-de-açúcar: melado, rapadura e açúcar mascavo. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**, p. 155, 2003.

SILVA, G. F. F.; SILVA, E. M.; CORREA, J. P. O.; VICENTE, M. H.; JIANG, N.; NOTINI, M. M.; JUNIOR, A. C.; DE JESUS, F. A.; CASTILHO, P.; CARRERA, E.; LÓPEZ-DÍAZ, I.; GROTEWOLD, E.; PERES, L. E. P.; NOGUEIRA, F. T. S. Tomato floral induction and flower development are orchestrated by the interplay between gibberellin and two unrelated microRNA-controlled modules. **New Phytol**, v. 221, n. 3, p. 1328-1344, 2019.

SIMPSON, G. G. The autonomous pathway: epigenetic and post-transcriptional gene regulation in the control of Arabidopsis flowering time. **Curr Opin Plant Biol**, v. 7, p. 570-574, 2004.

SIMPSON, G. G.; DIJKWEL, P. P.; QUESADA, V.; HENDERSON, I.; DEAN, C. F. Y. is an RNA 3 end-processing factor that interacts with FCA to control the Arabidopsis floral transition. **Cell**, v. 113, p. 777-787, 2003.

SMITH, F. A.; RAVEN, J. A. Intracellular pH and its regulation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 30, p. 289-311, 1979.

STUDART-GUIMARÃES, C., FAIT, A., NUNES-NESE, A., CARRARI, F.; USADEL, B.; FERNIE, A. R. Reduced expression. Of succinyl-coenzyme A ligase can be compensated for by up-regulation of the γ -Aminobutyrate Shunt in Illuminated Tomato Leaves. **Plant Physiology**, v. 145, n. 3, p. 6326-639, 2007.

STUDART-GUIMARÃES, C.; FAIT, A.; NUNES-NESE, A.; CARRARI, F.; USADEL, B.; FERNIE, A. R. Reduced expression of succinyl-coenzyme A ligase can be compensated for by up-regulation of the gamma-aminobutyrate shunt in illuminated tomato leaves. **Plant Physiol**, v. 145, n. 3, p. 626-39, 2007.

STUDART-GUIMARÃES, C.; GIBON, Y.; FRANKEL, N.; WOOD, C.C.; ZANOR, M.I.; FERNIE, A.R.; CARRARI, F. Identification and characterisation of the alpha and beta subunits of succinyl CoA ligase of tomato. **Plant Mol Biol**. V. 59, n. 5, p. 781-91, 2005.

SUAREZ-LOPEZ, P.; WHEATLEY, K.; ROBSON, F.; ONOUCHI, H.; VALVERDE, F.; COUPLAND, G.; *CONSTANS* mediates between the circadian clock and the control of flowering in Arabidopsis. **Nature**, v. 410, p. 1116-1120, 2001.

SWEETMAN, C.; DELUC, L. G.; CRAMER, G. R.; FORD, C. M.; SOOLE, K. L. Regulation of malate metabolism in grape berry and other developing fruits. **Phytochemistry**, v. 70, p. 1329-1344, 2009.

SZAL, B.; PODGÓRSKA, A. The role of mitochondria in leaf nitrogen metabolism. **Plant Cell Environ**, v. 35, n. 10, p. 1756-68, 2012.

TANAKA, O.; TAKIMOTO, A. Flowe-promoting effect of some amino acids and amides in *Lemma paucicostata* 6746. **Plant e Cell Physiology**, v. 18, n. 1, p. 27-34, 1977.

- TESFAYE, M.; TEMPLE, S. J.; ALLAN, D. L.; VANCE, C. P.; SAMAC, D. A. Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic alfalfa enhances organic acid synthesis and confers tolerance to aluminum. **Plant Physiol**, v. 127, n. 4, p. 1836-44, 2001.
- TOLBERT, N. E. Metabolic pathways in peroxisomes and glyoxysomes, **Annual Review of Biochemistry Biochem**, v. 50, p. 133-157, 1981.
- TSCHOEP, H.; GIBON, Y.; CARILLO, P.; ARMENGAUD, P.; SZECOWKA, M.; NUNES-NESEI, A.; FERNIE, A. R.; KOEHL, K.; STITT, M. Adjustment of growth and central metabolism to a mild but sustained nitrogen-limitation in Arabidopsis. **Plant Cell Environ**, v. 32, n. 3, p. 300-18, 2009.
- TSENG, C.P.; YU, C. C.; LIN, H. H.; CHANG, C. Y.; KUO, J.T. Oxygen- and growth rate-dependent regulation of Escherichia coli fumarase (FumA, FumB, and FumC) activity. **J Bacteriol**, v. 183, n. 2, p. 461-7, 2001.
- VAN DER MERWE, M. J.; OSORIO, S.; MORITZ, T.; NUNES-NESEI, A.; FERNIE, A. R. Decreased mitochondrial activities of malate dehydrogenase and fumarase in tomato lead to altered root growth and architecture via diverse mechanisms. **Plant Physiol**, v. 149, p. 653–669, 2009.
- VERNIQUET, F.; GAILLARD, J.; NEUBURGER, M.; DOUCE, R. Rapid inactivation of plant aconitase by hydrogen peroxide, **Biochem J**, v. 276, n. 3, p. 643-648, 1991.
- WADA, K. C.; TAKENO, K. Stress-induced flowering. **Plant Signal Behav**, v. 5, n. 8, p. 944-7, 2010.
- WHITTAKER, C.; DEAN, C. The FLC locus: a platform for discoveries in epigenetics and adaptation. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 33, p. 555– 575, 2017.
- WIEGAND, G.; REMINGTON, S. J. Citrate synthase: structure, control, and mechanism. **Annu Rev Biophys Chem**, v. 15, p. 97-117, 1986.
- WU, X.; HAN, Y.; ZHU, X.; SHAH, A.; WANG, W.; SHENG, Y.; FAN, T.; CAO, S.; Negative regulation of cadmium tolerance in Arabidopsis by MMDH2. **Plant Mol Biol**, v. 101, n. 4, p. 507-516, 2019.
- WU, Z.; XIAOFENG, FANG.; DANLING, ZHU.; CAROLINE, DEAN, Autonomous Pathway: *FLOWERING LOCUS C* Repression through an Antisense-Mediated Chromatin-Silencing Mechanism, **Plant Physiology**, v. 182, n. 1, p. 27–37, 2020.
- XU, Z.; ZHANG, R.; YANG, M.; LAW, Y.-S.; SUN, F.; HON, N.L.; NGAI, S.M.; LIM, B.L. A Balance between the Activities of Chloroplasts and Mitochondria Is Crucial for Optimal Plant Growth. **Antioxidants**, v. 10, p. 935, 2021.
- YANO, M.; KATAYOSE, Y.; ASHIKARI, M. et al. Hd1, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the arabidopsis flowering time gene CONSTANS. **The Plant Cell**, v. 12, p. 2473–2484, 2000.

YI, S.; ZHOU, X.; SUN, Z.; LI, X.; LI, E. Cloning and functional characterization of a citrate synthase gene of *Rhododendron micranthum* Turcz. *South African Journal of Botany*, v. 147, p. 915-925, 2022.

YOGEV, O.; YOGEV, O.; SINGER, E.; SHAULIAN, E.; GOLDBERG, M.; FOX, TD.; Pines, O. Fumarase: a mitochondrial metabolic enzyme and a cytosolic/nuclear component of the DNA damage response. **PLoS Biol**, v. 8, n. 3, p. e1000328, 2010.

ZHANG, S.; ZHANG, Y.; LI, K.; YAN, M.; ZHANG, J.; YU, M.; TANG, S.; WANG, L.; QU, H.; LUO, L.; XUAN, W.; XU, G. Nitrogen Mediates Flowering Time and Nitrogen Use Efficiency via Floral Regulators in Rice. **Curr Biol**, v. 31, n. 4, p. 671-683.e5, 2021.

CAPÍTULO 3: A APLICAÇÃO DE PIRACLOSTROBINA ALTERA O TEMPO DE FLORESCIMENTO EM *Arabidopsis thaliana*

RESUMO

O florescimento é um processo decorrente da transição do crescimento vegetativo para reprodutivo, que envolve uma sequência de mudanças no padrão morfológico. No entanto, em algumas culturas agrícolas esse processo promove perdas de produtividade e dificulta o manejo das lavouras. Recentemente, alguns estudos apontaram que a pulverização de piraclostrobina em plantas poderia promover sinalização para a indução do florescimento. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi investigar a influência da piraclostrobina no tempo de florescimento em *Arabidopsis thaliana*. Para isso, foi montado dois experimentos: o primeiro em fotoperíodo indutivo (DL) e o segundo em fotoperíodo não indutivo (DC). Os tratamentos utilizados nos experimentos foram T1: aplicação de água e T2: aplicação de piraclostrobina. Nos experimentos foram feitas análises de expressão relativa dos genes relacionados ao florescimento, biossíntese de giberelinas e aconitase. Também foram verificados o perfil metabólico e tempo de florescimento. Os resultados deste estudo demonstraram que a aplicação de piraclostrobina promoveu aumento na expressão dos genes da aconitase e teor de citrato nas primeiras horas após a aplicação. Também, foi possível notar alterações nas expressões de *AtFT*, *AtGA3ox2* e *AtGAI2*. Além disso, a piraclostrobina promoveu atraso do florescimento em plantas de *A.thaliana* cultivadas em fotoperíodo não indutivo.

Palavras-chave: Fungicida. Giberelina. Indução do florescimento

INTRODUÇÃO

O fungicida piraclostrobina pertence ao grupo químico das estrobilurinas, as quais foram descobertas a partir de substâncias naturais produzidas por uma variedade de basidiomicetos (Bartlett et al., 2002). Nesses fungos, as estrobilurinas são produzidas através do aminoácido fenilalanina derivado do ácido chiquímico, (Anke et al., 1977), que possui grande potencial para controlar alguns fungos filamentosos (Anke et al., 1977). Essas substâncias fúngicas são sensíveis à luz e possuem baixo poder de ação, o que dificulta o controle de fungos mais resistentes (Anke et al., 1977; Balba, 2007). No entanto, empresas agroquímicas perceberam a capacidade fúngica das estrobilurinas e investiram em pesquisas, utilizando-as como base para produzir fungicidas sintéticos que são mais estáveis e poderosos (Bartlett et al., 2002).

O fungicida piraclostrobina é uma molécula que possui alta eficiência na inibição da germinação dos esporos, crescimento e penetração de micélios fúngicos em plantas, o que promove uma maior sanidade das lavouras (Venancio et al., 2003; ADAPAR, 2018). No entanto, nesses últimos 22 anos, estudos vêm demonstrando que esse fungicida, além de controlar diversas doenças fúngicas, também tem estimulado efeitos fisiológicos benéficos em muitas culturas agrícolas (Köehle et al. 2003; Moro et al. 2017; Smozinski 2017; Marek et al. 2018; ADAPAR, 2018; Linhares Neto 2020).

Diversas modificações genéticas, metabólicas e fisiológicas foram observadas em experimentos com aplicação de piraclostrobina. Nesse contexto, foi notado através de RNAseq que a aplicação de piraclostrobina em cana-de-açúcar alterou a expressão de aproximadamente 877 genes relacionados a cloroplastos, mitocôndrias, hormônios e proteínas de sinalização de defesa (Linhares-Neto, 2020). Além disso, foi observado que a aplicação desse fungicida aumenta a concentração de sacarose, amido, fotossíntese e produtividade; promove alteração da respiração, atividade das enzimas redutase do nitrato e invertases (Köehle et al. 2003; Moro et al. 2017; Smozinski 2017; Linhares Neto 2020).

A aplicação de piraclostrobina em plantas, também, é capaz de aumentar a concentração de óxido nítrico (NO) e, consecutivamente, regular o desenvolvimento (Linhares Neto, 2020). Nas plantas, o aumento de NO celular é capaz de promover redução na atividade da enzima aconitase (Gupta et al., 2012). Essa redução pode ocorrer devido à oxidação do cluster de ferro-enxofre 4Fe-4S presente na aconitase, (Hentze e Kuhn, 1996). Além disso, a molécula de NO é capaz de promover alterações na indução do florescimento (Zhang et al., 2019), bem como, regula negativamente a sinalização de giberelinas (Chen et al., 2022), hormônios que estão

diretamente relacionado ao processo de indução do florescimento (Goldberg-Moeller et al., 2013). Nesse contexto, foi observado que a aplicação de piraclostrobina em cana-de-açúcar foi capaz de prover alterações na expressão de genes relacionados ao florescimento (*ScIDI*, *ScFT1* e *ScFT2*) (Silva, 2016). Bem como, foi capaz de promover atraso na diferenciação do meristema vegetativo para reprodutivo (Linhares Neto, 2020). No entanto, nenhum desses estudos conseguiram observar alteração no tempo de indução floral. Diante desses resultados, surgiram evidências de que a piraclostrobina pode estar envolvida na regulação do tempo de florescimento em plantas.

Atualmente, diversos estudos têm como objetivo a busca por tecnologias e/ou manejo que possam melhorar as condições de lavouras que apresentam problemas durante o processo de indução do florescimento. Nesse caso, o surgimento das flores em algumas culturas promove grande perdas econômicas para os produtores. Por exemplo, na cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), o desenvolvimento da inflorescência provoca perda de produtividade (Silva et al., 2003). No cafeeiro (*Coffea* spp.), a floração desuniforme é o principal obstáculo, uma vez que a maturação desigual dos frutos dificulta o manejo da colheita (Majerovicz e Sondahl, 2005). Na cultura do abacaxizeiro (*Ananas comosus*), a floração também não é uniforme, sendo recomendado o uso adicional de produtos para induzir o florescimento uniforme (Dass et al., 1975). Assim, é possível verificar que nem sempre o florescimento das culturas é benéfico para o produtor, quando se trata dessas culturas.

Em razão do que foi exposto, foi notado que em algumas culturas agrícolas o surgimento das flores é um obstáculo para maximizar a produtividade. Como também, a aplicação de piraclostrobina em plantas surge com possível potencial para controlar o tempo de florescimento. Dessa forma, esse estudo teve como objetivo investigar a influência da aplicação de piraclostrobina na expressão relativa de alguns genes relacionados ao florescimento, bem como, qual o efeito desse fungicida no tempo de florescimento em *Arabidopsis thaliana*.

MATÉRIAS E MÉTODOS

Local do experimento

Os experimentos foram realizados em ambiente controlado, na sala de crescimento de plantas do Setor de Fisiologia Vegetal, pertencente ao Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG, Brasil. As análises foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas (LFMP) e Laboratório Central de Análise e Prospecção Química (CAPQ).

Material Vegetal e condução do experimento

As sementes de *A. thaliana* (Columbia 0) utilizadas nos experimentos são provenientes do estoque do LFMP. Essas sementes foram embebidas em água destilada e mantidas a 4°C no escuro por dois dias para quebrar a dormência. Após esse processo, as sementes foram colocadas em placas contendo meio MS meia força, 1% de sacarose e 2,8% de Phitigel para germinarem. Em seguida, foram transplantadas para vasos contendo substrato Carolina Soil CSC® e vermiculita na proporção 2:1. Durante o período experimental algumas plantas foram mantidas no fotoperíodo indutivo (16 horas luz e 8 horas escuro - DL) e outras em fotoperíodo não indutivo (8 horas luz e 16 horas escuro - DC). As condições dos experimentos foram: irrigação na capacidade de campo do substrato; temperatura entre 18 e 25°C; umidade relativa do ar entre 30-80% e intensidade da luz de 180 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Delineamento experimental e aplicação do produto

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições biológicas, sendo cada repetição formada por um *pool* de cinco plantas. Os tratamentos utilizados foram T1: aplicação de água; T2: aplicação de piraclostrobina (Comet®- 250g/L) na dosagem de 0,5L/ha⁻¹. As coletas foram realizadas em três tempos: 8, 32 e 104 horas após a aplicação (HAA), em plantas mantidas em DL (Fig. 3 - A); e 4, 28 e 100 horas após a aplicação (HAA) em plantas em DC (Fig. 3 - B). Para a análise do florescimento foram utilizadas 10 plantas por tratamento. A aplicação de água e piraclostrobina foram realizadas utilizando-se borrifador manual (300 mL, Sanremo), em plantas de *A. thaliana* com 14 dias de idade (experimento DL) e 27 dias de idade (experimento DC), considerando o período prévio da indução do florescimento. Em cada aplicação foi usado 0,8 mL de calda por planta. As aplicações foram realizadas duas horas após o acender das luzes.

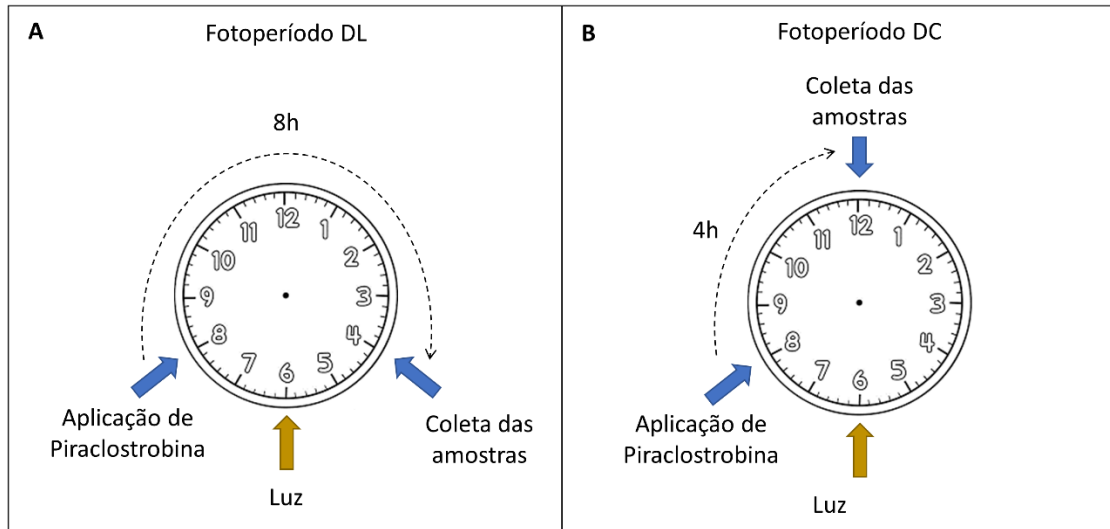


Figure 3: Momento da aplicação de piraclostrobina e coleta das amostras. **A)** plantas cultivadas em dia longo e **B)** plantas cultivadas em dia curto.

Análises bioquímicas

Determinação do perfil metabólico

A extração e derivatização dos metabólitos para cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa foi realizada de acordo com Lisec et al. (2006), com adaptações. Para esse processo, foi pesado aproximadamente 50 mg de folha macerada em nitrogênio líquido em tubos de Eppendorf de 2 mL. Foi adicionado em conjunto às amostras 700 μL de metanol (grau de cromatografia - Sigma) e 30 μL de ribitol (utilizado como um padrão quantitativo interno). Em seguida, a extração foi realizada a 70°C por 15 min. O extrato resultante foi centrifugado a 11000 rcf por 10 min, e 550 μL do sobrenadante foram transferidos para outro tubo de 2 μL , onde 375 μL de clorofórmio (grau de cromatografia- Sigma) e 750 μL de água desionizada foram adicionados. Após vortex por 15s, outra centrifugação foi realizada por 15 min a 12000 rcf. Em seguida, foi coletado um total de 150 μL do sobrenadante e transferido para um tubo de 1,5 μL . Essa solução foi seca a vácuo utilizando um speed vac. Para a derivatização foi adicionado 20 μL de cloridrato de metoxiamina (20 mg/mL em piridina) e mantido por 2 horas a 37°C no Shake (Solab, SL 222). Em seguida, foi adicionado 35 μL de N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA – Sigma®) e mantido no shake por 30 min a 37°C. Após a derivatização, as amostras foram corridas utilizando uma cromatografia a gás (GC-2010, Shimadzu) acoplada a um espectro de massa (GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu). Em seguida, a análise de abundância relativa de isotopômeros de massa foi realizada usando o software Xcalibur 2.1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham).

Análise de Giberelinas totais

A extração de giberelinas foi feita de acordo com o protocolo de Lisec et al. (2006), com adaptação. Em resumo, aproximadamente 50 mg de amostra macerada e 1 mL de metanol foram adicionados em tubo Eppendorf. Em seguida, as amostras foram submetidas a 70°C por 15 min. O extrato foi centrifugado em 10.000 rpm por 10 min e 750 µL do sobrenadante foi coletado e transferido para outro tubo de 2 mL. A análise de GA foi feita realizada de acordo com (Almeida et al., 2014) com adaptações. Para isso foi utilizado 300 µL do extrato mais 200 µL de metanol 80%. Em seguida 2,0 mL de solução de acetato de zinco (21,9g de acetato de zinco em 100 mL de água destilada e 1 mL de ácido acético glacial) foi adicionado. Foi adicionado, também, 2,0 mL de ferrocianeto de potássio (10,6 g em 100 mL de água). O extrato foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 min. Em seguida, 3,75 mL do sobrenadante foi coletada e adicionado junto com 3,75 mL de HCL a 30% em um tubo de 10 mL e incubado a 20°C por 75 min. Em seguida foi feita a leitura no comprimento de 254 nm.

Análise Molecular

Amostras de folhas foram coletadas e congeladas em nitrogênio líquido, em seguida, armazenadas a -80°C até a extração do RNA utilizando o protocolo descrito por Oliveira et al. (2015). Após a extração, foi verificada a qualidade e quantidade de RNA das amostras utilizando o espectrofotômetro Nanovue® (NanoVue GE Healthcare). Para avaliar a integridade do RNA das amostras, foi feito gel de agarose o qual foi visualizado utilizando um fotodocumentador UV-transilluminator (UVITEC FireReder XS D-77Ls-20.M).

Para a síntese de DNA complementar (cDNA) as amostras foram tratadas utilizando DNA free TM kit (Invitrogen™) para eliminar o DNA. A avaliação da integridade e pureza do RNA foram feitas utilizando eletroforese e fotodocumentador UV-Transilluminator. Posteriormente, as amostras foram armazenadas temporariamente em freezer -20°C. Após o tratamento com DNase, as amostras que apresentarem alto grau de integridade e pureza foram tratadas com Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems™) e novamente armazenadas em freezer -20°C.

Para a expressão dos genes alvos foram utilizados os seguintes pares de primers: *AtFT*, *AtASO1*, *AtGA3*, *AtRGA1*, *AtGAI*, *AtFLC*, *AtACO1*, *AtACO2*, *AtACO3* incluindo os genes de referência *PUX7* e *TIP4* (Skiljaica et al., 2022) (Tabela1 – suplementar). A amplificação dos genes foi feita utilizando um termociclador Rotor Gene Q Real-Time PCR (Qiagen). As análises foram feitas em duplicatas técnicas para todos os ensaios de análise de expressão. Os dados foram analisados utilizando-se Rotor-Gene Series Purê Detections Software (Versão 2.0.2).

Avaliação do tempo de florescimento

A análise do florescimento em *A. thaliana* foi realizada de acordo com Mouradov et al., (2002). Para isso, foi contado o número de folhas presentes na roseta e os dias que antecederam o aparecimento da primeira flor.

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de estatística descritiva e analisados quanto à distribuição, normalidade e homogeneidade de variâncias. Diferenças significativas de expressão gênica foram determinadas usando modelo linear misto (Steibel et al., 2009). Os dados cromatográficos de perfil metabólico foram analisados utilizando a plataforma MetaboAnalyst (Chong et al., 2018). Para isso, os dados foram transformadas em \log^2 e autoescalados, o qual é recomendado para reduzir a variabilidade da escala entre o conjunto de dados metabolômicos, aumentando a confiabilidade dos resultados (Xia & Wishart, 2011).

RESULTADOS

Nesse trabalho, foram realizados dois experimentos com o objetivo de investigar a ação da molécula piraclostrobina no tempo de florescimento em *A. thaliana*. Para isso, primeiramente, foi estudado a influência da piraclostrobina no experimento com plantas submetidas a DL e, posteriormente, foi executado o experimento com plantas cultivadas em DC. Nesses estudos, foram utilizados dois fotoperíodos diferentes, pois, cada um possui características específica para induzir o florescimento nas plantas (Wilson et al., 1992). Dessa forma, as coletas dos experimentos foram realizadas em horários diferentes como está descrito nos materiais e métodos. Em cada experimento, foram avaliadas variáveis como expressão de genes relacionados ao florescimento e biossíntese de giberelina. Bem como, foi verificado o comportamento dos metabolitos e tempo de florescimento.

Influência da aplicação de piraclostrobina na expressão dos genes relacionados ao florescimento, biossíntese de GA e aconitase em plantas de *A. thaliana* mantidas em fotoperíodo indutivo

Nas plantas cultivadas em fotoperíodo de DL foram avaliadas as expressões relativas de *FLOWERING LOCUS T (FT)*, *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1 (SOC1)* e *FLOWERING LOCUS C (FLC)*. Essas análises foram realizadas por que o gene *FT* é responsável por codificar uma proteína com a função de sinalizar a indução do florescimento em DL (Reeves e Coupland, 2001), *SOC1* atua como um integrador central do florescimento (Blazquez et al., 1998) e *FLC* atua na inibição do florescimento em plantas cultivadas em DL (Li et al., 2008). Em resumo, nossas análises através de PCR em tempo real revelaram que a

expressão do gene *AtFT* foi mais expresso às 8HAA em plantas que foram pulverizadas com piraclostrobina em relação ao controle (Fig. 4 – A). Entretanto, às 32 e 104 HAA não houve diferença entre os tratamentos (Fig. 4 – A). Além disso, também foi verificado que as expressões dos genes *AtSOC1* e *AtFLC* não diferenciaram significativamente entre os tratamentos (Fig. 4 – B e C).

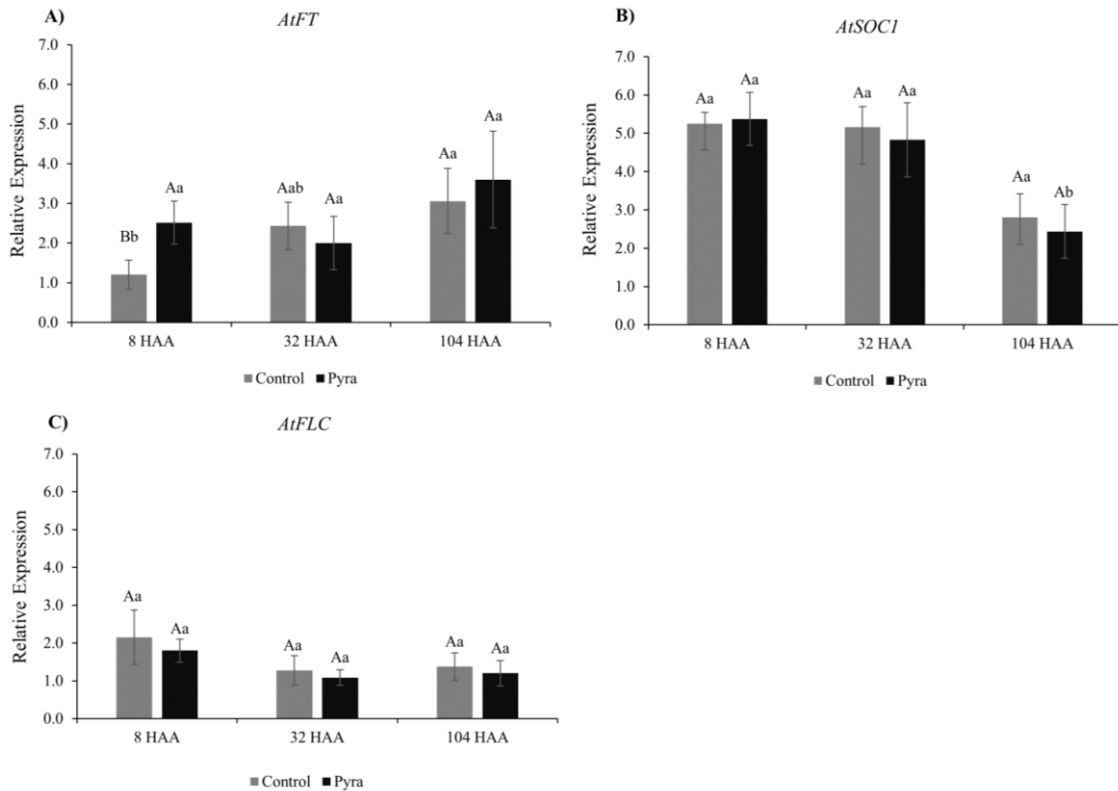


Figure 4. Expressão relativa dos genes relacionados ao florescimento em plantas de *A. thaliana* pulverizadas com água (controle) e piraclostrobina mantidas em fotoperíodo indutivo. A) expressão relativa de *FLOWERING LOCUS T* (*FT*); B) expressão relativa de *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1* (*SOC1*); C) expressão relativa de *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*). Os dados são médias de $n = 3$. Letras maiúsculas, nas colunas, indicam diferença significativa entre os tratamentos e letras minúsculas, nas colunas, indicam diferença estatística significativa entre os tempos de coleta ($p < 0.05$).

Também foram realizadas análises das expressões relativas de *GA3 OXIDASE* (*GA3OX*) que está relacionada à última etapa de biossíntese das GAs bioativas (Bai et al., 2022) e, *REPRESSOR OF gal-3* (*RGA*) e *GA-INSENSITIVE* (*GAI*) que atuam na repressão da sinalização de GAs (Sun e Gübler, 2004; Davière e Achard, 2013). Nas plantas que foram pulverizadas com piraclostrobina foi possível observar redução na expressão do gene *AtGA3ox2* às 8 HAA (Fig. 5 – A). Nessas plantas, o nível de expressão foi de aproximadamente 2,7 vezes menor. No entanto, não foi observado diferença significativa para *AtGA3ox2* nas coletas às 32 e 104 HAA (Fig. 5 – A). Além disso, é possível observar que as plantas tratadas com

piraclostrobina possuem um padrão no aumento da expressão de *AtGA3ox2* durante os intervalos das coletas, mas no controle não notamos esse comportamento (Fig. 5 – A). Por outro lado, quando analisamos as expressões dos genes *AtGAI2* e *AtRGAI* não observamos nenhuma alteração clara entre os tratamentos (Fig. 5 – B e C). também foi notado que no tratamento controle apesar de promover redução do conteúdo total de GA nas primeiras horas (8 e 32 HAA) não houve diferença significativa em relação ao tratamento com piraclostrobina (Fig. 5 – D).

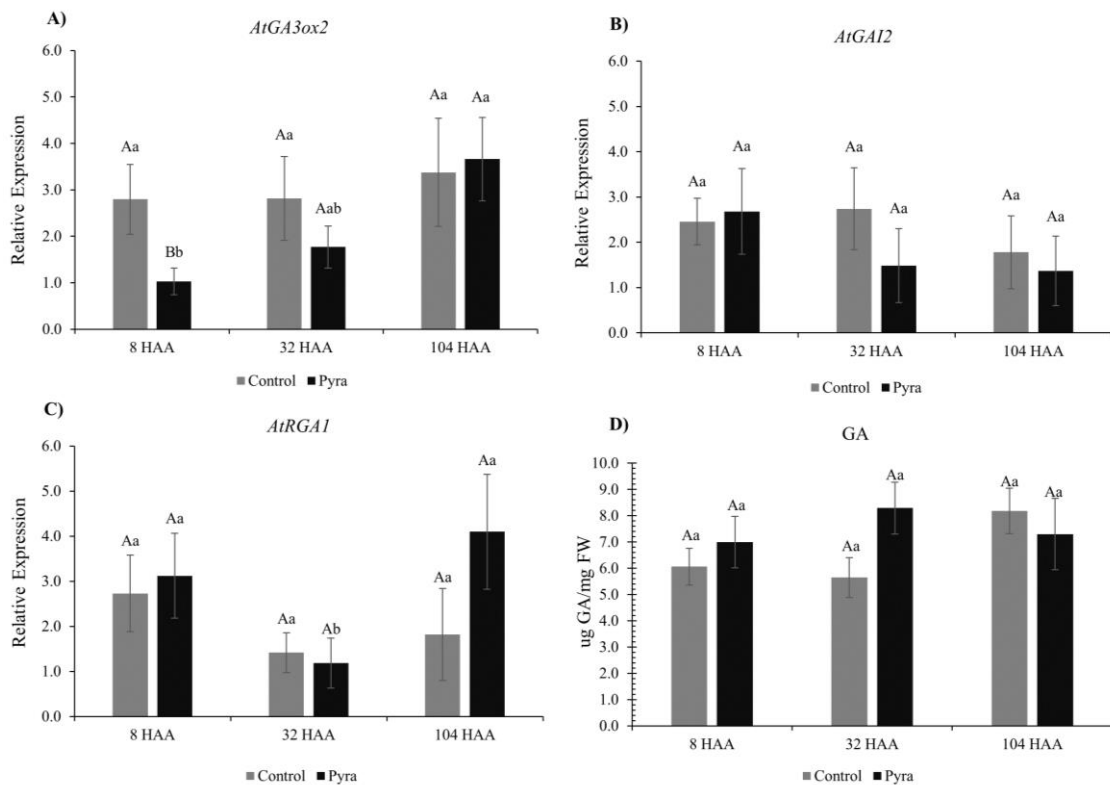


Figure 5. Expressão relativa dos genes relacionados ao florescimento em plantas de *A. thaliana* pulverizadas com água (controle) e piraclostrobina mantidas em fotoperíodo indutivo. A) expressão relativa de *GA3 OXIDASE* (*GA3*); B) expressão relativa de *GIBBERELLIN INSENSITIVE* (*GAI*); C) expressão relativa de *REPRESSOR OF GA1-3* (*RGA*). Os dados são médias de $n = 3$. As letras maiúsculas indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos e as letras minúsculas indicam diferença estatística significativa entre os tempos de coleta. Diferença entre as letras indicam diferença significativa igual $p < 0.05$.

Também foram feitas análises das expressões relativas dos genes *AtACO1* citosólica, e *AtACO2* e *AtACO3* que são mitocondriais, responsáveis por sintetizarem a enzima aconitase (Bernardo et al., 2009). Em geral, foram observadas diferenças nas expressões gênicas relativas dos genes *AtACO1*, *AtACO2* e *AtACO3*, que aumentaram na primeira coleta (8 HAA) em plantas com pulverização de piraclostrobina quando comparada ao controle (Fig. 6). Esse aumento na expressão foi de aproximadamente 2.14, 4.53 e 3.35 vezes, respectivamente. Logo

em seguida, as 32 HAA foi possível observar que a expressão dos genes da aconitase, em plantas tratadas com o fungicida, reduziram significativamente em relação às 8 HAA (Fig. 6). Por outro lado, às 32 e 104 HAA não foi possível notar diferença entre os tratamentos em estudo (Fig. 6). Uma das possíveis causas para este padrão pode estar relacionada ao tempo de respostas genica que normalmente ocorre logo em seguida ao tratamento ou ao tempo de meia vida do fungicida que é entorno de 3-8 dias.

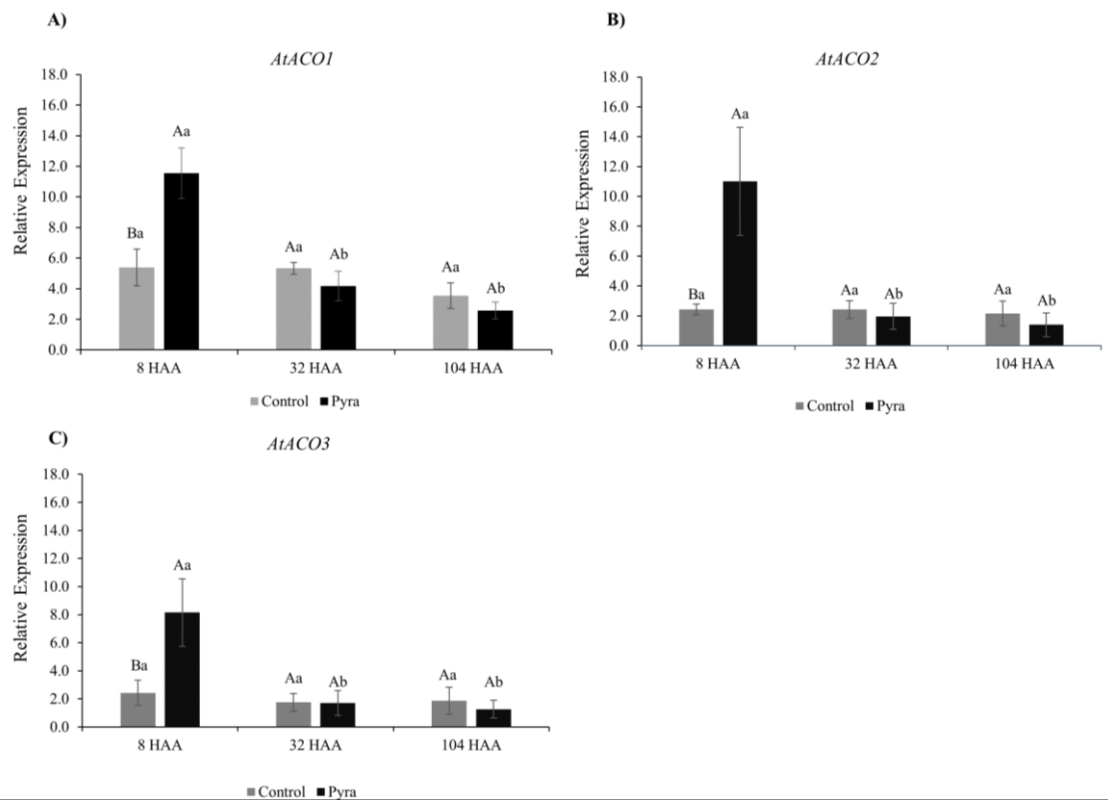


Figure 6. Expressão relativa dos genes relacionados ao florescimento em plantas de *A. thaliana* pulverizadas com água (controle) e piraclostrobina mantidas em fotoperíodo indutivo. A) expressão relativa de *ACONITASE 1* (*ACO1*); B) expressão relativa de *ACONITASE 2* (*ACO2*); C) expressão relativa de *ACONITASE 3* (*ACO3*). Os dados são médias de $n = 3$. As letras maiúsculas indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos e as letras minúsculas indicam diferença estatística significativa entre os tempos de coleta. Diferença entre as letras indicam diferença significativa igual $p < 0,05$.

Para avaliar as respostas metabólicas das folhas de *A. thaliana* foi aplicado água e piraclostrobina, em seguida realizamos análise do perfil metabólico. Logo depois, foi realizada uma análise de componentes principais (PCA) para correlacionar os diferentes padrões provocados pelos tratamentos entre as amostras. Primeiramente, foram analisadas as três coletas juntas com o objetivo de encontrar alguma diferença entre os tratamentos. Curiosamente, nesse contexto não foi possível observar nenhuma alteração nos padrões dos metabólitos entre os

tratamentos (Fig. 7 - A). Quando foram analisadas as três coletas juntas, os dois primeiros componentes da PCA explicaram 69.8% das respostas observadas (Fig. 7 - A). Esse comportamento pode ter ocorrido por causa dos intervalos das coletas, o qual promoveu alta dispersão entre os pontos plotados, tornando os cluster dos tratamentos com maior área e, assim, promovendo sobreposição.

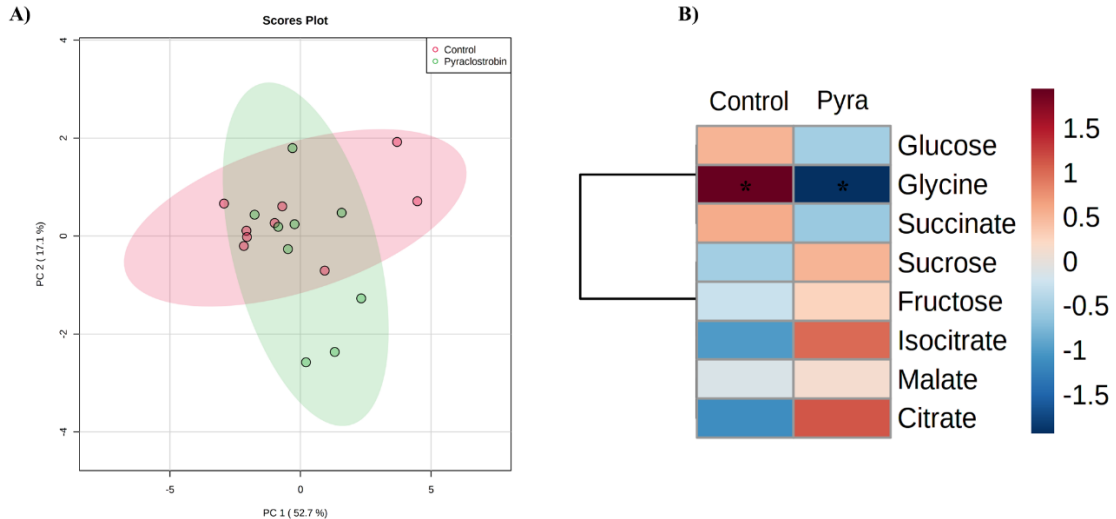


Figure 7. Resultados das alterações do perfil metabólico em folhas de *A. thaliana* sob influência da aplicação de água (controle) e piraclostrobina em fotoperíodo indutivo, coletadas em 8, 32 e 104 HAA. A) análise de componentes principais (PCA); B) análise com heatmap. Os * mostram os metabolitos que apresentaram diferença estatística significativa pelo teste t de Student com nível de significância de $p < 0,05$. As análises foram realizadas na plataforma Metaboanalyst com dados de médias $n = 9$.

Embora a análise de PCA não tenha mostrado diferença entre os padrões do perfil metabólico, a análise pelo teste t de Student, plotada na forma de heatmap, revelou que os tratamentos diferem substancialmente em níveis metabólicos (Fig. 7 - B). Por exemplo, a aplicação de piraclostrobina quando comparada com o controle causou alteração na concentração de glicina em plantas expostas ao DL (Fig. 7 - B). Devido a esta alteração proveniente da aplicação de piraclostrobina decidimos analisar separadamente cada coleta. Portanto, foi feita uma PCA e heatmap para cada coleta separadamente para comparar o efeito da piraclostrobina em relação ao controle.

Metabolitos que foram influenciados pela aplicação de piraclostrobina em plantas *A. thaliana* cultivadas em fotoperíodo indutivo

Utilizamos a análise de PCA para verificar padrões metabólicos das folhas de *A. thaliana* sob influência de piraclostrobina em cada coleta. Os gráficos de PCAs, das coletas 8, 32 e 104 HAA, revelaram que os tratamentos diferem consideravelmente um do outro (Fig. 8).

Esse comportamento metabólico pode ser explicado pelos dois primeiros componentes da PCA que foi de 89.9, 82.3 e 94.5%, respectivamente (Fig. 8). Ou seja, as plotagens das PCAs mostraram que a piraclostrobina promove uma resposta diferente do controle em todos os tempos em estudo. Diante disso, resolvemos apresentar o teor dos metabolitos das folhas na forma de heatmap para cada coleta.

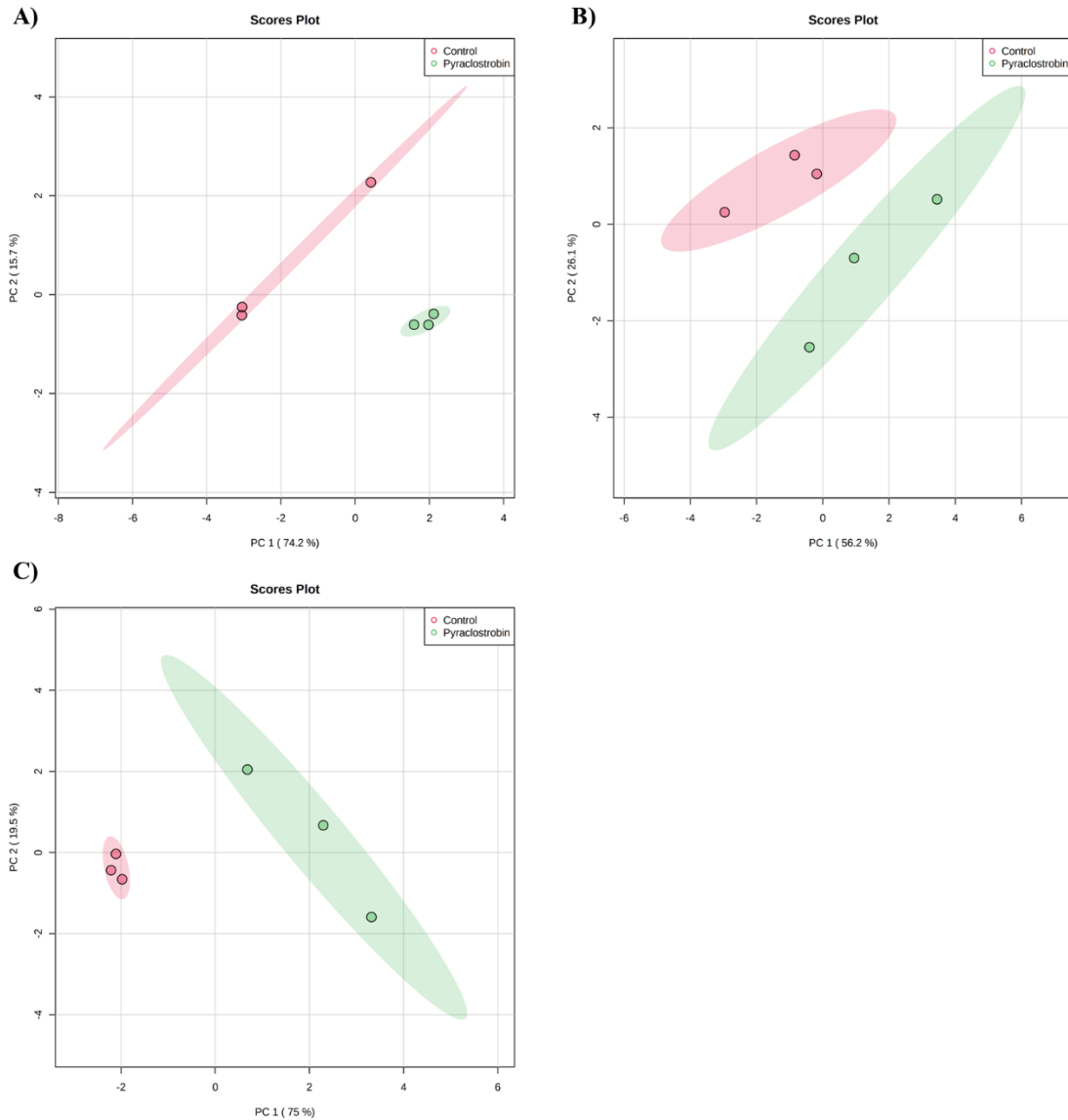


Figure 8. Análise de componentes principais (PCA) dos perfis metabólicos de folhas de *A. thaliana* sob influência de aplicação de água (controle) e piraclostrobina em fotoperíodo indutivo. A) coleta às 8 HAA; B) coleta às 32 HAA e C) coleta às 104 HAA. As análises foram realizadas na plataforma Metaboanalyst com dados de médias $n = 3$.

No presente estudo, o heatmap foi construído utilizando o coeficiente de correlação de Pearson, que mede a correlação das variáveis de escalas métricas que estão sendo analisadas. No experimento com DL é possível ver diferenças significativas nas concentrações dos metabolitos entre os tratamentos nas coletas às 8, 32 e 104 HAA (Fig. 9). Na coleta às 8 HAA

houve aumento significativo de citrato, frutose e malato no tratamento com piraclostrobina (Fig. 9 – A). Por outro lado, na coleta às 32 HAA apenas a glicose apresentou redução significativa para piraclostrobina em relação ao controle (Fig. 9 – B). Já na coleta as 104 HAA foi observado que plantas que foram pulverizadas com piraclostrobina reduziram significativamente o teor de citrato, glicina e succinato em relação ao controle (Fig. 9 – C).

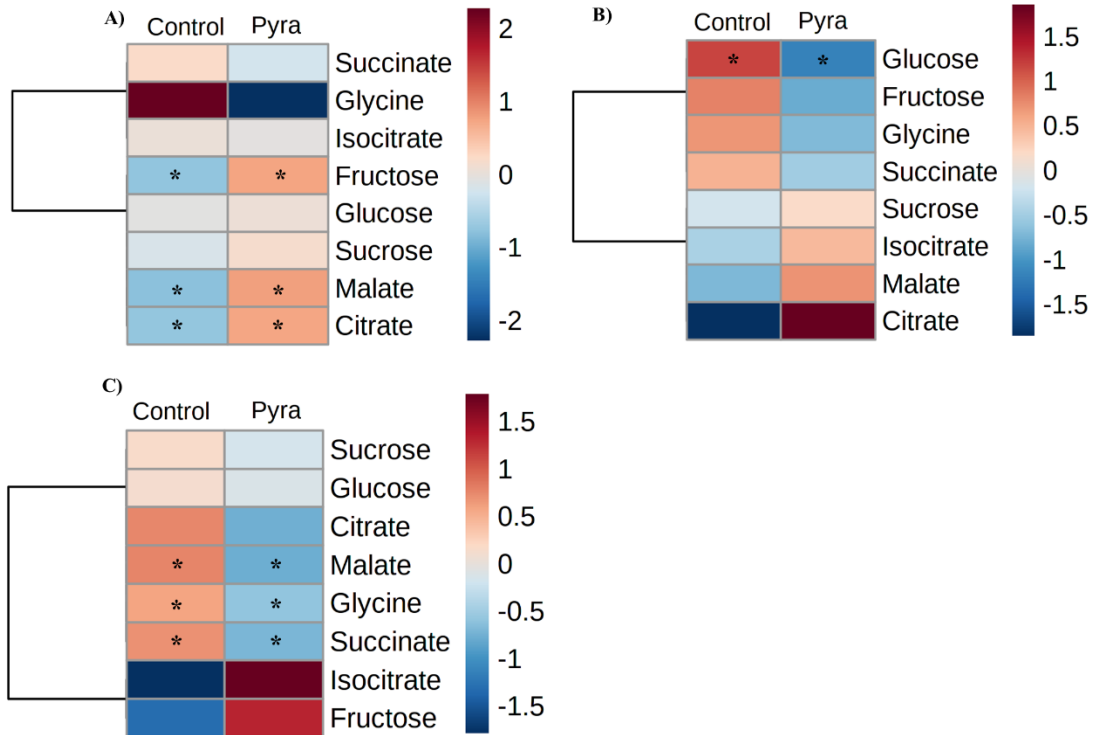


Figure 9. Representação em heatmap das diferenças do teor de metabolitos nas folhas de *A. thaliana* sob aplicação de água (controle) e piraclostrobina em fotoperíodo indutivo. A) coleta às 8 HAA; B) coleta às 32 HAA e C) coleta às 104 HAA. Os dados são médias de $n = 3$. As diferenças significativas entre os tratamentos são indicadas pelo * ($p < 0.05$ pelo teste t de Student). O agrupamento foi feito pela correlação de Pearson. As análises foram realizadas na plataforma Metaboanalyst.

Influência da aplicação de piraclostrobina durante o tempo de florescimento em *A. thaliana* cultivadas em fotoperíodo indutivo

Tomando como base os resultados encontrados para expressão gênica e perfis metabólicos, resolvemos refazer o experimento para avaliar a ação da piraclostrobina no tempo de florescimento em plantas de *A. thaliana*. Para isso, pulverizamos ao 14º dia água e piraclostrobina nas plantas que estavam em DL. Como indicadores para a análise do tempo do florescimento, utilizamos o número de folhas produzidas na roseta e os dias após a semeadura (DAS) que antecederam a abertura da primeira flor (Mouradov et al., 2002). Esses indicadores demonstram que plantas com florescimento tardio apresentam mais folhas e DAS do que plantas

com florescimento precoce. Assim, ao avaliarmos o número de folhas e DAS não foi possível observar diferença significativas para esses padrões (Fig. 10 – A e B). Esses resultados demonstraram que a pulverização com piraclostrobina não promoveu alteração no tempo de florescimento em *A. thaliana* em DL (Fig. 10 – C).

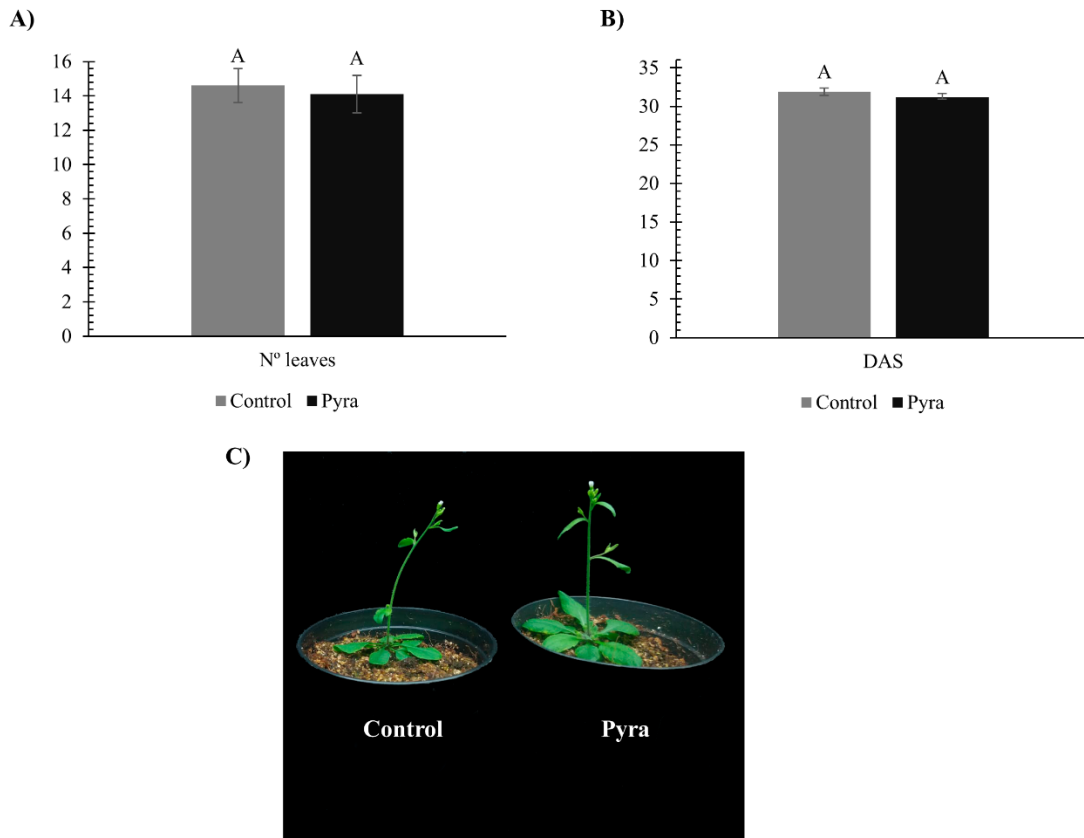


Figure 10: Análise do tempo de florescimento em *A. thaliana* sob influência da aplicação de água (controle) e piraclostrobina em fotoperíodo indutivo. A) número de folhas na roseta que antecederam a abertura da primeira flor; B) dias após a semeadura que antecederam a abertura da primeira flor C) foto demonstrativa dos tratamentos após a abertura da primeira flor. Os valores das médias são n = 10. As diferenças significativas entre os tratamentos são indicadas pelas letras maiúsculas (teste t de Student - $p < 0.05$).

Influência da aplicação de piraclostrobina na expressão dos genes relacionados ao florescimento, biossíntese de GA e aconitase em plantas de *A. thaliana* mantidas em fotoperíodo não indutivo

Apesar da aplicação de piraclostrobina não ter promovido alteração no tempo de florescimento em *A. thaliana* em DL, resolvemos refazer o experimento em DC, pois, observamos que a aplicação de piraclostrobina alterou a expressão de alguns genes da via de sinalização de GAs e alguns metabolitos do ciclo TCA. Neste contexto, verificamos que não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos, na expressão relativa dos genes

AtSOC1 e *AtFLC* (Fig. 11). Esse resultado pode ser explicado, pois, provavelmente as coletas foram realizadas quando as plantas não se encontravam no período de indução do florescimento, o qual iniciou-se aos 27 dias após a aplicação.

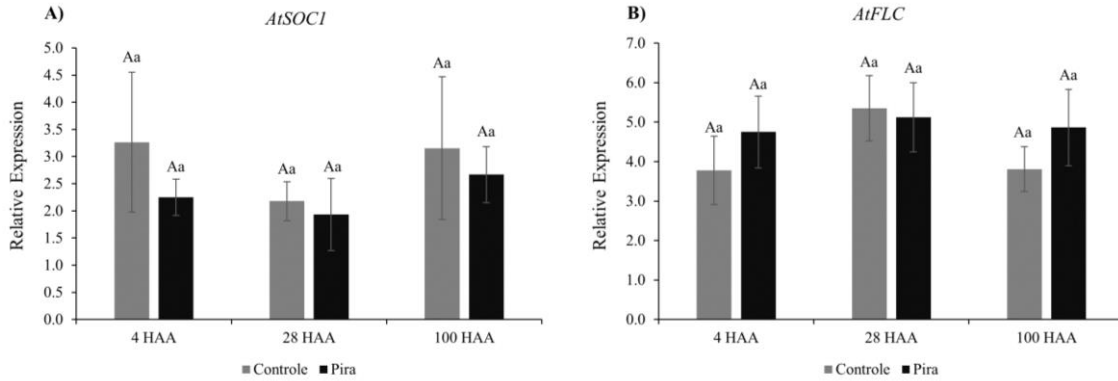


Figure 11. Expressão relativa dos genes relacionados ao florescimento em plantas de *A. thaliana* pulverizadas com água (controle) e piraclostrobina mantidas em fotoperíodo não indutivo. A) expressão relativa de *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1 (SOC1)*; B) expressão relativa de *FLOWERING LOCUS C (FLC)*. Os dados são médias de $n = 3$. As letras maiúsculas indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos e as letras minúsculas indicam diferença estatística significativa entre os tempos de coleta. Diferença entre as letras indicam diferença significativa igual $p < 0,05$.

Em condição de DC, a aplicação do fungicida em plantas de *A. thaliana* causou redução da expressão relativa de *AtGA3ox2* às 4 e 28 HAA quando comparada ao controle (Fig. 12 - A). No entanto, apenas nas primeiras horas (4 HAA) a pulverização desse fungicida promoveu diferença significativa (Fig. 12 - A). Essa redução na expressão foi de aproximadamente 2.9 vezes. Surpreendentemente, esse padrão também se repetiu no experimento em DL. Houve também diferença para expressão relativa de *AtGAI2* que reduziu em plantas tratadas com piraclostrobina às 28 HAA quando comparadas ao controle (Fig. 12 - B). Por outro lado, não foi possível verificar diferença na expressão do gene *AtRGAI* e teor total de GA. Mas, curiosamente, quando comparamos o teor total de GA nos dois fotoperíodos é possível observar comportamento semelhante para os dois tratamentos.

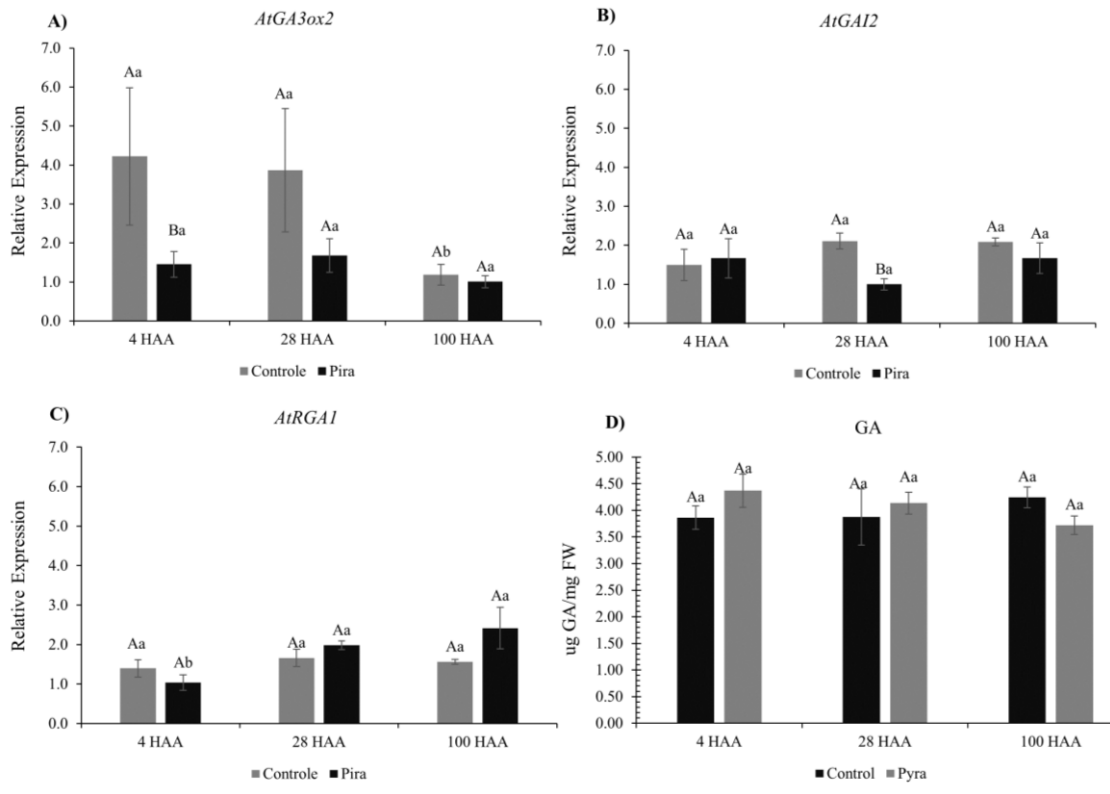


Figure 12. Expressão relativa dos genes relacionados ao florescimento em plantas de *A. thaliana* pulverizadas com água (controle) e piraclostrobin mantidas em fotoperíodo não indutivo. A) expressão relativa de *GA3 OXIDASE (GA3OX)*; B) expressão relativa de *GIBBERELLIN INSENSITIVE (GAI)*; C) expressão relativa de *REPRESSOR OF GA1-3 (RGA)*. Os dados são médias de $n = 3$. As letras maiúsculas indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos e as letras minúsculas indicam diferença estatística significativa entre os tempos de coleta. Diferença entre as letras indicam diferença significativa igual $p < 0,05$.

Também foi avaliado a expressão relativa dos genes *AtACO1*, *AtACO2* e *AtACO3*. Dessa forma, foi notado que a aplicação de piraclostrobin não alterou a expressão de *AtACO1* quando comparada ao controle (Fig. 13 – A). Por outro, foi possível observar que a aplicação do fungicida promoveu aumento significativo nas expressões de *AtACO2* e *AtACO3* em relação ao controle, às 4 HAA (Fig. 13 – B e C). Esse aumento na expressão foi de aproximadamente 4.53 e 3.35 vezes, respectivamente. Foi possível observar que tal como no DL os padrões se repetiram para as expressões dos genes *AtACO2* e *AtACO3* neste experimento. Nesse contexto, foi verificado que a partir das 28 HAA o tratamento com piraclostrobin promoveu redução da expressão desses genes em relação às 4 HAA Fig. 13).

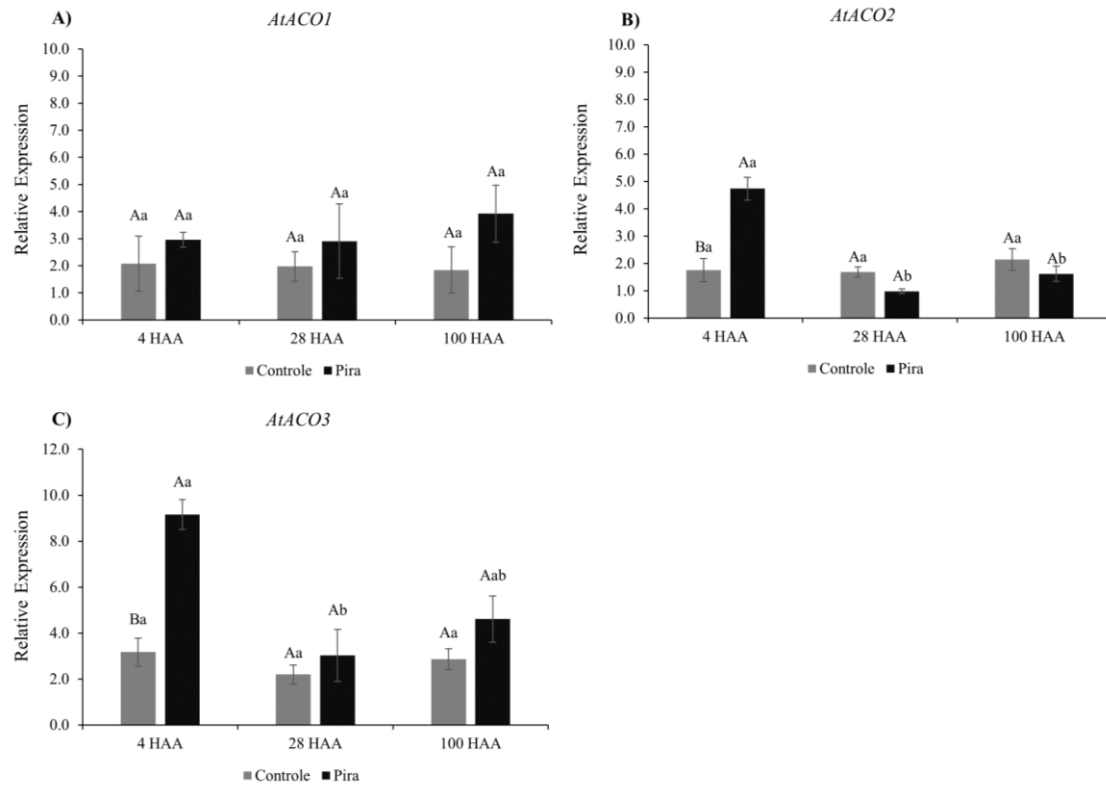


Figure 13: Expressão relativa dos genes relacionados ao florescimento em plantas de *A. thaliana* pulverizadas com água (controle) e piraclostrobina mantidas em fotoperíodo não indutivo. A) expressão relativa de *ACONITASE 1 (ACO1)*; B) expressão relativa de *ACONITASE 2 (ACO2)*; C) expressão relativa de *ACONITASE 3 (ACO3)*. Os dados são médias de $n = 3$. As letras maiúsculas indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos e as letras minúsculas indicam diferença estatística significativa entre os tempos de coleta. Diferença entre as letras indicam diferença significativa igual $p < 0,05$.

Respostas metabólicas de folhas de *A. thaliana* mantidas em fotoperíodo não indutivo sob influência de piraclostrobina

No experimento com DC também foram realizadas análises de PCAs com o objetivo de tentar identificar alterações nos padrões dos perfis metabólicos entre os tratamentos. De início foi analisada as três coletas juntas, o que mostrou uma pequena sobreposição dos cluster. Isso indica que a aplicação de piraclostrobina promoveu modesta alteração no comportamento dos metabólicos quando comparado com o controle (Fig. 14 - A). Esse comportamento é explicado pelos dois principais componentes da PCA que foi de 68.8% (Fig. 14 - A).

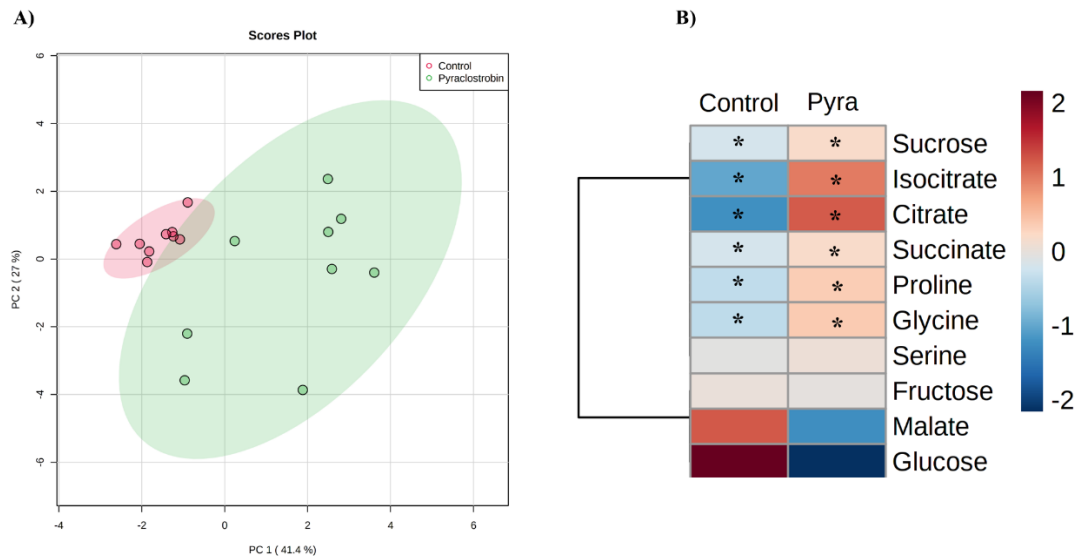


Figure 14: Resultados das alterações do perfil metabólico em folhas de *A. thaliana* nas três coletas 4, 28 e 100 HAA sob influência de aplicação de água (controle) e piraclostrobina em fotoperíodo não indutivo. A) análise de componentes principais (PCA); B) análise com heatmap. Os * mostram os metabolitos que apresentaram diferença significativa pelo teste t de Student com nível de significância de $p < 0,05$. As análises foram realizadas na plataforma Metaboanalyst com dados de médias $n = 9$.

Nesse estudo, também foram apresentadas as concentrações dos metabolitos através do heatmap. Quando foi comparada as três coletas juntas, foi verificado que a aplicação de piraclostrobina promoveu aumento significativo no teor da maioria dos metabolitos em relação ao controle. Como exemplo: sacarose, isocitrato, citrato, succinato, prolina e glicina (Fig. 14 – B). Além disso, quando confrontamos os dois fotoperíodos estudos foi possível notar que a aplicação de piraclostrobina alterou significativamente a concentração apenas de glicina em plantas cultivadas em DL. No entanto, em DL a glicina foi reduzida (Fig. 7 - B) e em DC a glicina aumentou (Fig. 14 – B). Esses resultados sugerem que a aplicação de piraclostrobina pode mudar o padrão de resposta nas plantas dependendo do fotoperíodo. Ou seja, o ambiente pode influenciar na ação do produto.

Metabolitos que foram influenciados pela aplicação de piraclostrobina em plantas *A. thaliana* cultivadas em fotoperíodo indutivo

Decidimos avaliar no experimento com DC as respostas metabólicas para cada coleta separadamente. Para isso, também, foram utilizados os gráficos de PCAs, os quais mostraram uma clara discriminação entre os tratamentos nas coletas 4, 28 e 100 HAA (Fig. 15). Essa resposta é confirmada pelos dois componentes principais que são de 73.4, 88.4 e 87.2% respectivamente (Fig. 15). Essas análises sugerem que a aplicação de piraclostrobina promove

respostas diferentes a nível metabólico quando comparada ao controle. Além disso, quando foi comparadas as PCAs dos dois fotoperíodos é possível verificar que os tratamentos diferem substancialmente um do outro independente do fotoperíodo (Fig.s 9 e 15).

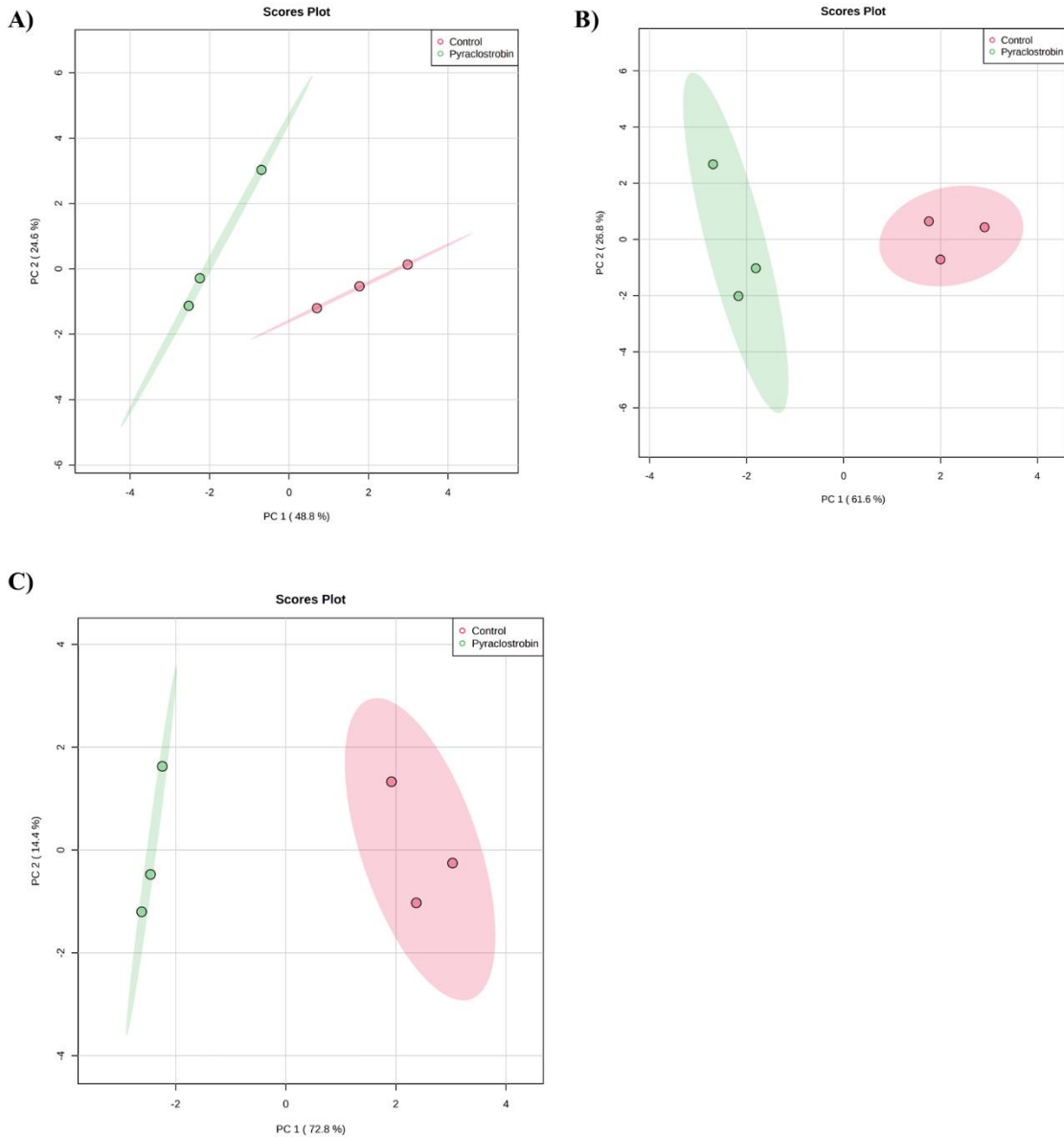


Figure 15. Análise de componentes principais (PCA) dos perfis metabólicos de folhas de *A. thaliana* sob influência de aplicação de água (controle) e piraclostrobina em fotoperíodo não indutivo. A) coleta às 4 HAA; B) coleta às 28 HAA e C) coleta às 100 HAA. As análises foram realizadas na plataforma Metaboanalyst com dados de médias $n = 3$.

Ao analisar o teor dos metabolitos em folhas de *A. thaliana* sob influência da pulverização de piraclostrobina é possível observar que apenas as coletas aos 28 e 100 HAA apresentaram algumas alterações significativas (Fig.16). Na coleta às 4 HAA dos dez metabolitos analisados nenhum apresentou diferença considerável entre os tratamentos (Fig. 16

- A). Por outro lado, na coleta às 28 HAA o tratamento com piraclostrobina aumentou significativamente o teor de citrato e sacarose (Fig. 16 – B). Já na coleta às 100 HAA a maioria das moléculas em estudo aumentaram a concentração quando foi aplicado piraclostrobina (Fig. 16, C). No entanto, foi possível observar que a aplicação com piraclostrobina aumentou consideravelmente o teor de glicose e serina e reduziu glicina e succinato em relação ao controle (Fig. 16, C).

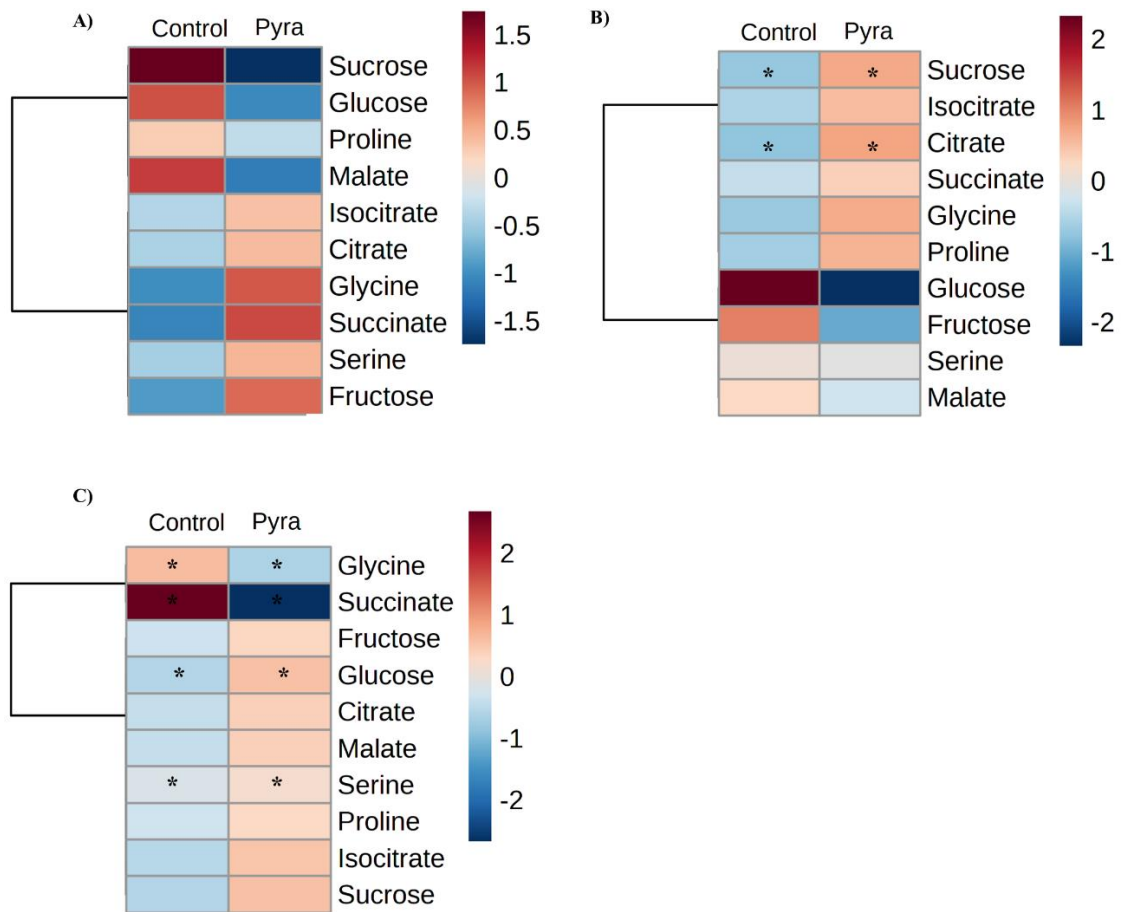


Figure 16. Representação em heatmap das diferenças do teor de metabolitos nas folhas de *A. thaliana* sob aplicação de água (controle) e piraclostrobina em fotoperíodo não indutivo. A) coleta às 4 HAA; B) coleta às 28 HAA e C) coleta as 100 HAA. Os dados são médias de $n = 3$. As diferenças significativas entre os tratamentos são indicadas pelo * ($p < 0.05$ pelo teste t de Student). O agrupamento foi feito pela correlação de Pearson. As análises foram realizadas na plataforma Metaboanalyst.

Influência da aplicação de piraclostrobina durante o tempo de florescimento em *A. thaliana* cultivadas em fotoperíodo não indutivo

Em seguida, decidimos refazer o experimento com o objetivo de avaliar a atuação da piraclostrobina no tempo do florescimento. Para isso, plantas de *A. thaliana* que estavam em DC foram pulverizadas três vezes, sete em sete dias, iniciando aos 27º dias após a semeadura.

Nesse contexto, a dosagem cheia de piraclostrobina foi diluída nas três aplicações. Após esse processo, para avaliar o tempo de florescimento, foi realizada a contagem do número de folhas presente na roseta e DAS que antecederam a abertura da primeira flor (Mouradov et al., 2002). Foi possível observar claramente que aproximadamente 50% das plantas tratadas com piraclostrobina apresentaram atraso no florescimento. Assim, foi observado aumento do número de folhas e DAS no tratamento com piraclostrobina em relação ao controle (Fig. 17 – A e B). Dessa forma, esses resultados apontam que a piraclostrobina pode ser capaz de promover atraso no tempo de florescimento em *A. thaliana* cultivadas em DC (Fig. 17 – C).

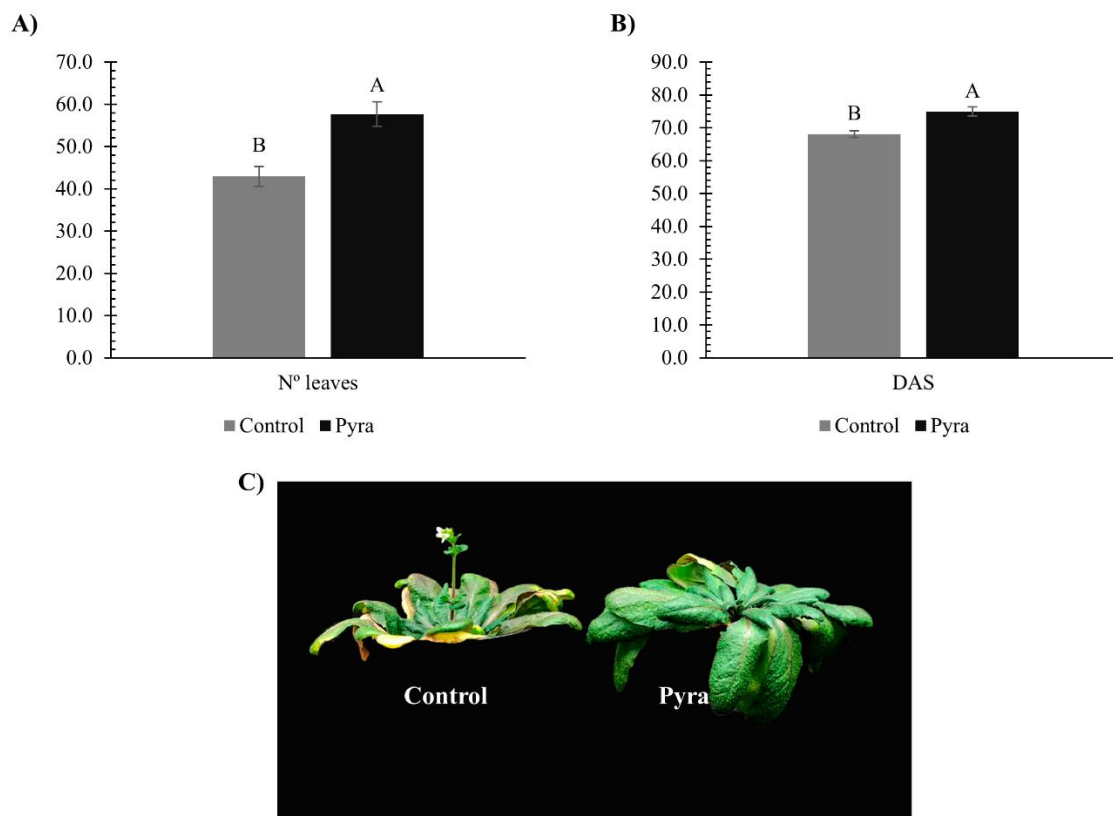


Figure 17: Análise do tempo de florescimento em *A. thaliana* sob influência da aplicação de água (controle) e piraclostrobina em fotoperíodo não indutivo. A) número de folhas na roseta que antecederam a abertura da primeira flor; B) dias após a semeadura que antecederam a abertura da primeira flor C) foto demonstrativa dos tratamentos após a abertura da primeira flor. As medias são n = 10. As diferenças significativas entre os tratamentos são indicadas pelas letras maiúsculas (teste t de Student - $p < 0.05$).

DISCUSSÃO

A influência da piraclostrobina na expressão da aconitase e citrato

A piraclostrobina é um inibidor do transporte de elétrons das mitocôndrias em células de fungos. Essa molécula é capaz de se ligar ao citocromo bc1 no sítio Qo, e bloquear o transporte de elétrons do complexo III para o citocromo c, promovendo redução na produção

de ATP, que é essencial para os processos metabólicos dos fungos (Brandt et al., 1993; Ammermann al., 2000). Apesar de ser um produto direcionado para o controle sanitário de alguns fungos em lavouras, existem diversos relatos, como já foi descrito, que essa molécula promove alteração em processos fisiológicos em plantas (Köehle et al. 2003; Moro et al. 2017; Smozinski 2017; Marek et al. 2018; ADAPAR, 2018; Linhares Neto 2020).

No presente estudo, foi demonstrado que a aplicação de piraclostrobina em *A.thaliana* promoveu aumento da expressão dos genes da *ACO* nos dois fotoperíodos (fig. 6 e 13), bem como aumento do teor de citrato em folhas (Fig. 9 e 16). Desta forma, acreditamos que a pulverização de piraclostrobina possa ter promovido a redução da atividade da enzima *ACO*, e por conseguinte, aumentado os níveis de citrato. Uma vez que a *ACO* é responsável pela catalisação reversível de citrato em isocitrato (Courtois-Verniquet e Dource, 1993). O aumento da expressão de *ACO* nas primeiras horas pode estar relacionado a regulação interna, visto que existe um alto teor de citrato nas células das plantas pulverizadas com o fungicida.

Um dos fatores que podem ter promovido a alteração no teor de citrato e, consecutivamente, aumentado a expressão de *ACO* em plantas é a sinalização pelo NO. Nesse contexto, alguns estudos têm reportado que plantas que foram submetidas à aplicação de piraclostrobina apresentaram aumento nos níveis de NO (Conrath et al., 2004; Linhares-Neto, 2020). Esse aumento do NO é capaz de interferir em vários processos fisiológicos, bem como, reduzir a atividade da enzima *ACO* em planta (Gupta et al., 2012). A redução da atividade enzimática acontece, pois, o NO é responsável por oxidar o agrupamento ferro-enxofre (4Fe-4S) presente na *ACO* (Hentze e Kuhn, 1996).

Alem do mais, em *A. thaliana* foram identificadas três isoenzimas *ACO1*, *ACO2* e *ACO3* com propriedades bioquímicas diferentes que são codificadas por genes nucleares distintos (Courtois-Verniquet e Dource, 1993; Arnaud et al., 2007). Entretanto, neste estudo foi observado que a aplicação de piraclostrobina promoveu maior alteração na expressão de *ACO2* seguida de *ACO3* e *ACO1*, respectivamente (Fig. 9 e 16). Essa resposta provavelmente pode estar atrelada a fatores intrínsecos das plantas, como por exemplo localização subcelular de cada isoenzima e fase de desenvolvimento da planta (Jaenisch e Bird, 2003). Atualmente, existem diversas divergências na literatura sobre o local de ação de cada proteína. Entretanto, Bernardo et al., (2009) sugeriram que *ACO1* é exclusiva do citosol enquanto *ACO2* e *ACO3* são mitocondriais.

A influência da piraclostrobina na via fotoperiódica e giberelina

Aqui, fornecemos evidências experimentais de que a aplicação de piraclostrobina pode ter potencial para alterar o teor de GAs bioativas em plantas. Visto que neste estudo, foi verificado que a pulverização do fungicida em plantas promoveu redução da expressão do gene *GA3ox2* nos dois fotoperíodos (Fig. 5 e 12). Esse gene é responsável por codificar uma proteína que tem como função catalisar a hidroxilação de GA9 e GA20 em GA4 e GA1, respectivamente (He et al., 2019; Bai et al., 2022). Durante o ciclo de vida das plantas, existem indicativos de que as GAs, além de estarem envolvidas no crescimento, participam de eventos do desenvolvimento que levam à competência reprodutiva (Evans e Poething, 1995). Em muitas espécies, como por exemplo a *Arabidopsis*, a transição floral é acelerada pela ação da GA (Eriksson et al., 2006). Entretanto, no presente estudo não conseguimos observar diferença do tempo de florescimento em plantas mantidas em DL, mesmo com alteração da expressão de *GA3ox2* (Fig. 5 e 12). Esse resultado pode ser explicado pelo fato que o fotoperíodo pode ter mascarado o tempo de floração. Uma vez que, em plantas de *A. thaliana* cultivadas em DL a via do fotoperíodo é predominante (Reeves e Coupland, 2001; Wilson et al., 1992). Por outro lado, as plantas que foram cultivadas em DC apresentaram atraso do florescimento e redução na expressão de *GA3ox2*, o que indica que o teor de GA foi alterado. Esse resultado pode ser explicado, pois, plantas de *A. thaliana* cultivadas em dia curto são amplamente dependentes de GAs para que ocorra a indução do florescimento (Wilson et al., 1992).

Os resultados do presente estudo, também, sugerem que a pulverização de piraclostrobina pode estar relacionada direta e/ou indiretamente à expressão de *FT*. Aqui notamos que a expressão de *AtFT* sofreu alteração com a aplicação desse produto nas primeiras horas (Fig. 4). Esse gene responsável por codificar uma proteína conhecida como florígeno que se move das folhas para o meristema apical caulinar, onde tem como função promover a transição da fase vegetativa para reprodutiva (Corbesier et al., 2007). Atualmente, sabe-se que existem alguns fatores que interferem diretamente na expressão do *FT*, dentre deles a concentração de açúcares. Nas plantas, as moléculas de açúcares possuem papel muito importante em diversos processos fisiológicos. Como também, alguns estudos têm relacionado diretamente o teor de açúcares com o conteúdo de *FT* nas folhas das plantas (Ortiz-Marchena et al., 2015; Cho et al., 2018). Além disso, estudos com aplicação de piraclostrobina tem corroborado com os nossos resultados, como por exemplo foi observado que a aplicação de produto à base de piraclostrobina causou alteração na expressão de *ScFT1* e *ScFT2* em cana-de-açúcar (Silva, 2016). Por outro lado, Linhares Neto (2020) constatou que esse fungicida foi capaz de atrasar a diferenciação do meristema apical em cana-de-açúcar.

Outro fator que pode ter influenciado nas respostas do florescimento pode estar relacionado ao manejo. Nesse caso, no experimento de DL, apesar da aplicação com piraclostrobina ter promovido aumento da expressão do gene *AtFT* nas primeiras horas após a pulverização, não houve alteração no tempo do florescimento nessas plantas (Fig. 10 C). Contudo, no DC o fungicida foi capaz de promover o atraso do florescimento em aproximadamente sete dias (Fig. 17 C). O atraso no tempo do florescimento dessas plantas pode estar associado ao manejo de aplicação. Visto que, as plantas de *A. thaliana* cultivadas nas condições de DC foram tratadas com três aplicações, enquanto as plantas de DL receberam apenas uma aplicação. Segundo Van den Bosch et al., (2011) um dos fatores que promove maior eficiência na aplicação de produtos fitossanitários é a combinação ideal do número de aplicações e dosagem correta. Ou seja, a dosagem e o posicionamento de produtos ditam as respostas nos indivíduos alvos.

A influência da piraclostrobina no metabolismo mitocondrial

Neste trabalho conseguimos verificar que alguns metabolitos chaves do ciclo tricarboxílico sofreram alteração na concentração quando comparamos a aplicação de piraclostrobina e água. No entanto, os padrões de perfis metabólicos foram diferentes entre as plantas cultivadas em DL e as plantas cultivadas em DC (Fig. 9 e 16). Essa modificação do teor dos ácidos pode ser a causa de diversas alterações fisiológicas observadas, bem como pode estar relacionado ao atraso do florescimento em plantas cultivadas em dia curto. Acreditamos que as alterações nos níveis de ácidos orgânicos do ciclo TCA pode podem ter interferido nesse resultado do florescimento através do balanço energético. Visto que, que algumas moléculas do ácido tricarboxílico estão diretamente relacionadas na produção de poderes redutores (NADPH e FADH) que posteriormente serão utilizadas para formar ATP (Araújo et al., 2011). Além disso, a alteração dos níveis desses ácidos pode promover a redução de aproximadamente 33% da relação ATP/ADP, o qual é influenciado principalmente, pela redução de ATP (Carrari et al., 2003). Em conformidade com o que foi descrito, para uma melhor eficiência da indução floral é necessário maior quantidade de ATP antes e durante esse processo Kandeler et al., (1975).

CONCLUSÕES

No geral, este estudo mostrou que a aplicação de piraclostrobina pode promover atraso do florescimento em plantas de *Arabidopsis thaliana* cultivadas em DC. Esse atraso no tempo de florescimento pode estar relacionado a alteração na atividade da enzima aconitase, bem

como, redução na expressão de genes relacionado à sinalização de GA. Por outro lado, a piraclostrobina é capaz de aumentar a expressão de *AtFT* nas folhas de *Arabidopsis thaliana* cultivadas em DL, mas não promove alteração no tempo do florescimento. Ademais, o produto de piraclostrobina é capaz de aumentar os níveis de citrato provavelmente através da redução da atividade da enzima aconitase. Bem como, afeta em maior grau a *ACO2*, seguida por *ACO3* e *ACO1*.

REFERÊNCIAS

- ADAPAR – Agência de defesa Agropecuária do Paraná, Comet fungicida, 2018. Disponível em: <http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Fungicidas/comet160218.pdf>. Acessado em: 14 de outubro de 2018.
- ALMEIDA, T. M.; DE SOUZA, G. D.; RODRIGUES-FILHO, E.; BOLAND, W.; MITHÖFER, A. Validated method for phytohormone quantification in plants. **Frontiers in plant science**, v. 5, p. 417, 2014.
- AMMERMANN, E.; LORENS, G.; SCHELBERGER, K.; MUELLER, B.; KIRSTGEN, R.; SAUTER, H. in: BCPC conference, **Pest e Diseases**, p. 541-548, 2000.
- ANKE, T.; OBERWINKLER, F.; STEGLICH, W.; SCHRAMM, G. The strobilurins: new antifungal antibiotics from the basidiomycete *Strobilurus tenacellus* (Pers. ex Fr.) Sing. **Journal of Antibiotics**, v. 30, p. 806–810, 1977.
- ARAÚJO, W. L.; NUNES-NESE, A.; NIKOLOSKI, Z.; SWEETLOVE, L. J.; FERNIE, A. R. Metabolic control and regulation of the tricarboxylic acid cycle in photosynthetic and heterotrophic plant tissues. **Plant Cell Environ**, v. 35, n. 1, p. 1-21, 2012.
- BAI, Y.; ZHANG, X.; XUAN, X.; SADEGHNEZHAD, E.; LIU, F.; DONG, T.; PEI, D.; FANG, J.; WANG, C. miR3633a-*GA3ox2* Module Conducts Grape Seed-Embryo Abortion in Response to Gibberellin. **Int. J. Mol. Sci**, v. 23, p. 8767, 2022.
- BALBA H. Review of strobilurin fungicide chemicals. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 42, p. 441–451, 2007.
- BARTLETT, D. W.; CLOUGH, J. M.; GODWIN, J. R.; HALL, A. A.; HAMER, M.; PARR-DOBROZANSKI, B. Review the strobilurin fungicides. **Pest Management Science**, v. 58, p. 649-662, 2002.
- BLAZQUEZ, M. A.; GREEN, R.; NILSSON, O.; SUSSMAN, M. R.; WEIGEL, D. Gibberellins promote flowering of arabidopsis by activating the LEAFY promoter. *Plant Cell*, v. 10, n. 5, p. 791-800, 1998.
- BRANDT, U.; HAASE, U.; SCHAEGER, H.; VON JAGOW, G. Species specificity and mechanism faction of strobilurins. **Dechema Monographien**, v. 129, p. 27–38, 1993.

CARRARI, F. Reduced Expression of Aconitase Results in an Enhanced Rate of Photosynthesis and Marked Shifts in Carbon Partitioning in Illuminated Leaves of Wild Species Tomato. **Plant Physiology**, v.133, p. 1322–1335, 2003.

CHEN, L.; SUN, S.; SONG, C. P.; ZHOU, J. M.; LI, J.; ZUO, J. Nitric oxide negatively regulates gibberellin signaling to coordinate growth and salt tolerance in Arabidopsis. **J Genet Genomics**, v. 49, n. 8, p. 756-765, 2022.

CHO, L. H.; PASRIGA, R.; YOON, J. et al. Roles of sugar in controlling flowering time. *J. Plant Biol*, v.61, p. 121-130, 2018.

CONRATH, U.; AMOROSO, G.; KÖHLE, H.; SULTEMEYER, D. F. Non-invasive online detection of nitric oxide from plants and other organisms by mass spectroscopy. **Plant Journal**, v.38, p. 1015-1022, 2004.

CORBESIER, L.; VINCENT, C.; JANG, S.; FORNARA, F.; FAN, Q.; SEARLE, I.; GIAKOUNTIS, A.; FARRONA, S.; GISSOT, L.; TURNBULL, C.; COUPLAND, G.; FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of Arabidopsis. **Science**, v. 316, n. 5827, p. 1030-3, 2007.

COURTOIS-VERNIQUET, F.; DOUCE, R. Lank aconitase in glyxisomes and peroxisome. **Biochem J**, v. 294, p. 103-107, 1993.

DASS, H. C.; RANDHAWA, G. S.; NEGI, S. P. Flowering in pineapple as influenced by ethephon and its combinations with urea and calcium carbonate. **Scientia Horticulturae**, v. 3, p. 231–238, 1975.

DAVIÈRE, J. M.; ACHARD, P. Gibberellin signaling in plants. **Development**, v. 140, n. 6, p. 1147-51, 2013.

ERIKSSON, S. GA4 Is the Active Gibberellin in the Regulation of LEAFY Transcription and Arabidopsis Floral Initiation. **The Plant Cell Online**, v. 18, p. 2172–2181, 2006.

EVANS, M.; POETHIG, R. S. Gibberellins Promote Vegetative Phase Change and Reproductive Maturity in Maize. **Plant Physiology**, v. 108, p. 475–487, 1995.

GOLDBERG-MOELLER, R.; SHALOM, L.; SHLIZERMAN, L.; SAMUELS, S.; ZUR, N.; OPHIR, R.; BLUMWALD, E.; SADKA, A. Effects of gibberellin treatment during flowering induction period on global gene expression and the transcription of flowering-control genes in Citrus buds. **Plant Sci**, v. 198, p. 46-57, 2013.

GUPTA, K. J.; SHAH, J. K.; BROTMAN, Y.; JAHNKE, K.; WILLMITZER, L.; KAISER, W. M.; BAUWE, H.; IGAMBERDIEV, A. U. Inhibition of aconitase by nitric oxide leads to induction of the alternative oxidase and to a shift of metabolism towards biosynthesis of amino acids. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 1773–1784, 2012.

HE, H.; LIANG, G.; LU, S.; WANG, P.; LIU, T.; MA, Z.; ZUO, C.; SUN, X.; CHEN, B.; MAO, J. Genome-Wide Identification and Expression Analysis of GA2ox, GA3ox, and GA20ox Are Related to Gibberellin Oxidase Genes in Grape (*Vitis Vinifera* L.). **Genes (Basel)**, v.10, n. 9, p. 680, 2019.

- HENTZE, M. W.; KUHN, L. C. Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide and oxidative stress. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 93, p. 8175-8182, 1996.
- JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nature Genetics**, v. 33, p. 245-254, 2003.
- KANDELER, R.; HUGEL, B.; ROTTENBURG, T. Relations between photosynthesis and flowering in *Lemnaceae*. **Environ. and Biol. Vont. of Photo**, 183, 161-169, 1975.
- KÖHLE, H.; GROSSMANN, K.; JABS, T.; GERHARD, M.; KAISER, W.; GLAAB, J.; HERMS, S. Physiological effects of the strobilurin fungicide F 500 on plants. **Modern Fungicides and Antifungal Compounds III**, p. 61-74, 2003
- LI, D.; LIU, C.; SHEN, L.; WU, Y.; CHEN, H.; ROBERTSON, M.; HELLIWELL, C. A.; ITO, T.; MEYEROWITZ, E.; YU, H. A repressor complex governs the integration of flowering signals in *Arabidopsis*. **Dev Cell**, v. 15, n. 1, p. 110-20, 2008.
- LINHARES NETO, M. V. Fisiologia metabólica e sinalização no desenvolvimento reprodutivo da cana-de-açúcar sob influência de piraclostrobina. **Tese – Universidade Federal de Lavras**, p. 108, 2020
- LISEC, J.; SCHAUER, N.; KOPKA, J.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A. R. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. **Nature Protocols**, v. 1, p. 387–396, 2006.
- MAJEROVICZ, N.; SONDAHL, M. R. Induction and differentiation of reproductive buds in *coffea arabia* L. **Braz J Plant Physiol**, v.17, p. 247-254, 2005.
- MAREK, J.; DE AZEVEDO, D.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D.; FARIA, C. M. D. R. Photoynthetic and productive increase in tomato plants treated with strobilurins and carboxamides for the control of *Alternaria solani*. **Scientia Horticulturae**, v. 242, p. 76–89, 2018.
- MITCHUM, M. G.; YAMAGUCHI, S.; HANADA, A.; KUWAHARA, A.; YOSHIOKA, Y.; KATO, T.; TABATA, S.; KAMIYA, Y.; SUN, T. P. Distinct and overlapping roles of two gibberellin 3-oxidases in *Arabidopsis* development. **Plant J**. v. 45, n. 5, p. 804-18, 2006.
- MORO, E.; CRUSCIOL, C. A. C.; NASCENTE, A. S.; CANTARELLA, H.; BROETTO, F.; MORO, A. L. Nitrate Reductase, Micronutrientes and upland rice development as influenced by soil pH and nitrogen sources. **Journal Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 48, p. 2642-2651, 2017.
- MOURADOV, A.; CREMER, F.; COUPLAND, G. Control of Flowering Time. **Plant Cell**, v.14, p. s111-s130, 2002.
- OLIVEIRA, R. R.; VIANA, A. J. C.; REÁTEGUI, A. C. E.; VINCENTZ, M. G. A. An efficient method for simultaneous extraction of high-quality RNA and DNA from various plant tissues. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, p. 18828-18838, 2015.

- ORTIZ-MARCHENA, M.; ROMERO, J. M.; VALVERDE, F. Photoperiodic control of sugar release during the floral transition: What is the role of sugars in the florigenic signal?, **Plant Signaling & Behavior**, v. 10, n. 5, 2015.
- REEVES, P. H.; COUPLAND, G. Analysis of flowering time control in Arabidopsis by comparison of double and triple mutants. **Plant Physiology**, v. 126, p. 1085– 1091, 2001.
- SILVA, F. C. DA.; CESAR, M. A. A.; SILVA, C. A. B. Pequenas Indústrias rurais de cana-de-açúcar: melado, rapadura e açúcar mascavo. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**, p. 155, 2003.
- SILVA, V. N. B. Expressão de genes da rota do florescimento de cana de açúcar sob influência da aplicação de piraclostrobina na cultivar RB867515. **Dissertação**, Lavras: UFLA, p. 69, 2016.
- SKILJAICA, A.; JAGIĆ, M.; VUK, T.; LELJAK LEVANIĆ, D.; BAUER, N.; MARKULIN, L. Evaluation of reference genes for RT-qPCR gene expression analysis in Arabidopsis thaliana exposed to elevated temperatures. **Plant Biol (Stuttg)**, v. 24, n. 2, p. 367-379, 2022
- SMOZINSKI, C. V. Metabolismo de carboidratos em plantas de cana-de-açúcar de diferentes idades em resposta à aplicação de piraclostrobina. **Dissertação/UFLA**, p. 43. 2017
- STEIBEL, J. P.; POLETTO, R.; COUSSENS, P. M.; ROSA, G. J. A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. **Genomics**, v.94, n. 2, p. 146-52, 2009.
- SUN, T. P.; GUBLER, F. Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. **Annu Rev Plant Biol**, v. 55, p. 197-223, 2004.
- VAN DEN BOSCH, F.; PAVELEY, N. D.; SHAW, M. W.; HOBBELEN, P. H. F.; OLIVER, R. The dose rate debate: does the risk of fungicide resistance increase or decrease with dose? **Plant Pathology**, v. 60, p. 597–606, 2011.
- VENANCIO, W. S.; RODRIGUES, M. A. T.; BEGLIOMINI, E.; SOUZA, N. L. Physiological Effectes of Strobilurin Fungicides on Plantas, **Ci. Exatas Terra, Ci. Agr. Eng.**, v.9, p. 59-68, 2003.
- WILSON, R. N.; HECKMAN, J. W.; SOMERVILLE, C. R. Gibberellin Is Required for Flowering in Arabidopsis thaliana under Short Days. **Plant Physiology**, v. 100, p. 403–408, 1992.
- XIA J, WISHART DS. 2011. Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst. **Nature Protocols**, v. 6, p. 743– 760.
- XU, Z.; ZHANG, R.; YANG, M.; LAW, Y.-S.; SUN, F.; HON, N.L.; NGAI, S.M.; LIM, B.L. A Balance between the Activities of Chloroplasts and Mitochondria Is Crucial for Optimal **Plant Growth. Antioxidants**, 10, 935, 2021.

ZHANG, Z. W.; FU, Y. F.; ZHOU, Y. H.; WANG, C. Q.; LAN, T.; CHEN, G. D.; ZENG, J.; CHEN, Y. E.; YUAN, M.; YUAN, S.; HU, J. Y. Nitrogen and nitric oxide regulate Arabidopsis flowering differently. **Plant Sci**, v. 284, p. 177-184, 2019.

SUPLEMENTOS

Tabela 1: Pares de primers dos genes alvos e referências que foram usados no presente estudo

Genes	Primers	Pb	Comprimento
<i>AtFT</i>	F: ACCACCTGTTTGTTC AAGAT	18	150
	R: CCAAGCCATTAGTCACC	18	
<i>AtASOC1</i>	F: AGGAGAAAGCTCTAGCTGC	19	119
	R: GCTACTCTCTTCATCACCTCT	21	
<i>AtGA3ox2</i>	F: CTGGTTGATCCTCTCCAATC	20	142
	R: TCAAGAAATTCAGTCGGAAGAC	22	
<i>AtRGA1</i>	F: ATTCCAAGGTCGATTGTCCA	20	121
	R: GAGAAGCTCGTCGTCCAT	18	
<i>AtGAI2</i>	F: TGAAATGCTCAAACGGCG	18	87
	R: CGTTCTCCTGCGAGTCAA	18	
<i>AtACO1</i>	F: ATCACGGAGGGATTTTGC	18	135
	R: AAGTCATTCTCGTCCTCCT	19	
<i>AtACO2</i>	F: GCAAGGCTTTCTTCTTCCC	19	120
	R: GAGAGCCGAGGAGAAACT	18	
<i>AtACO3</i>	F: AACCGCTTCATCTTCCGC	18	125
	R: CGAGAAGAGACGACGGAGA	19	
<i>AtPUX7</i>	F: GTTTCTCAGACTATCAAAGCCA	22	120
	R: ATCAATTACAAGGACCACGG	20	
<i>AtTIP41</i>	F: GCAGCACAATGGAAATTCAGG	21	122
	R: GCCTCAACCGTTTCTTTGTC	20	

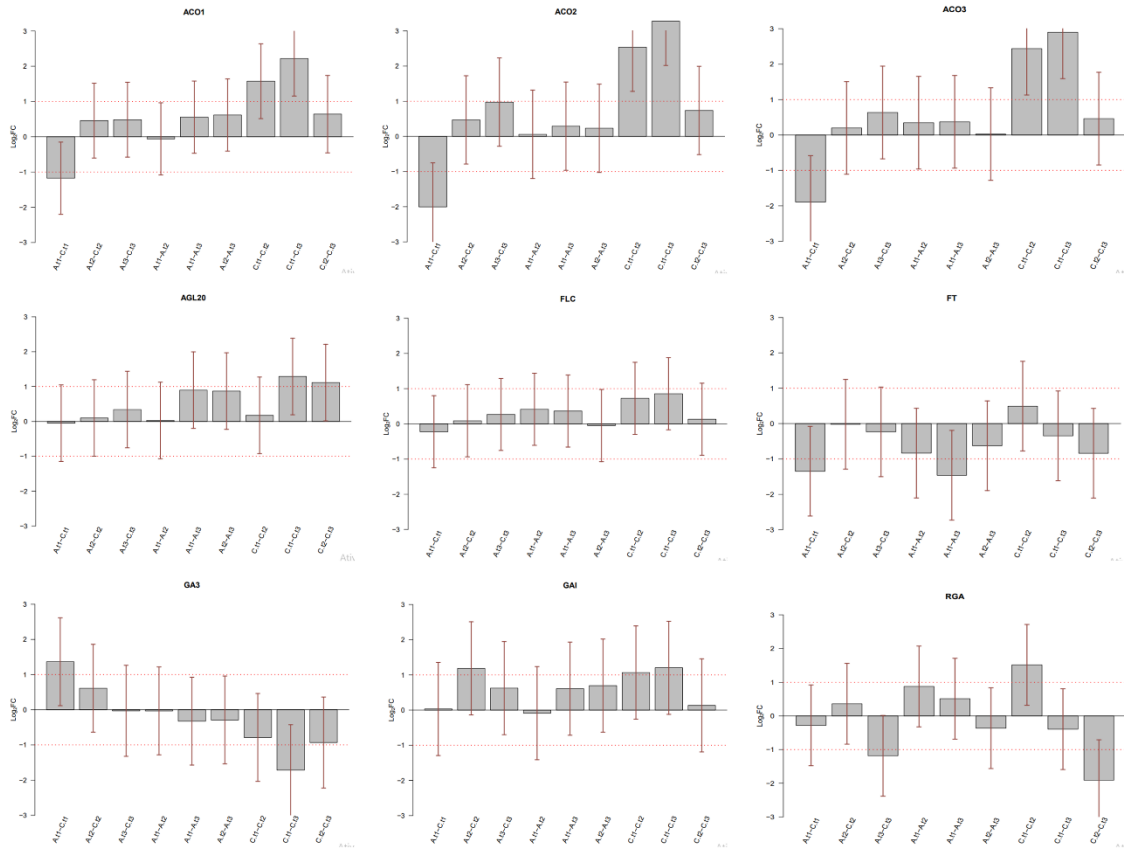


Figure 18: Resultados das expressões dos genes alvos pelo modelo linear misto em plantas de *A. thaliana* sob influência da aplicação de piraclostrobina em fotoperíodo indutivo. A letra “A” representa o tratamento com aplicação de água; letra “C” representa o tratamento com aplicação de piraclostrobina; “t1” representa a coleta às 8 HAA; “t2” representa a coleta às 32 HAA; “t3” representa a coleta às 104 HAA. Médias que ultrapassam o limite de 1 e -1 do log₂FC apresentam diferenças significativas a nível de 0,05%.

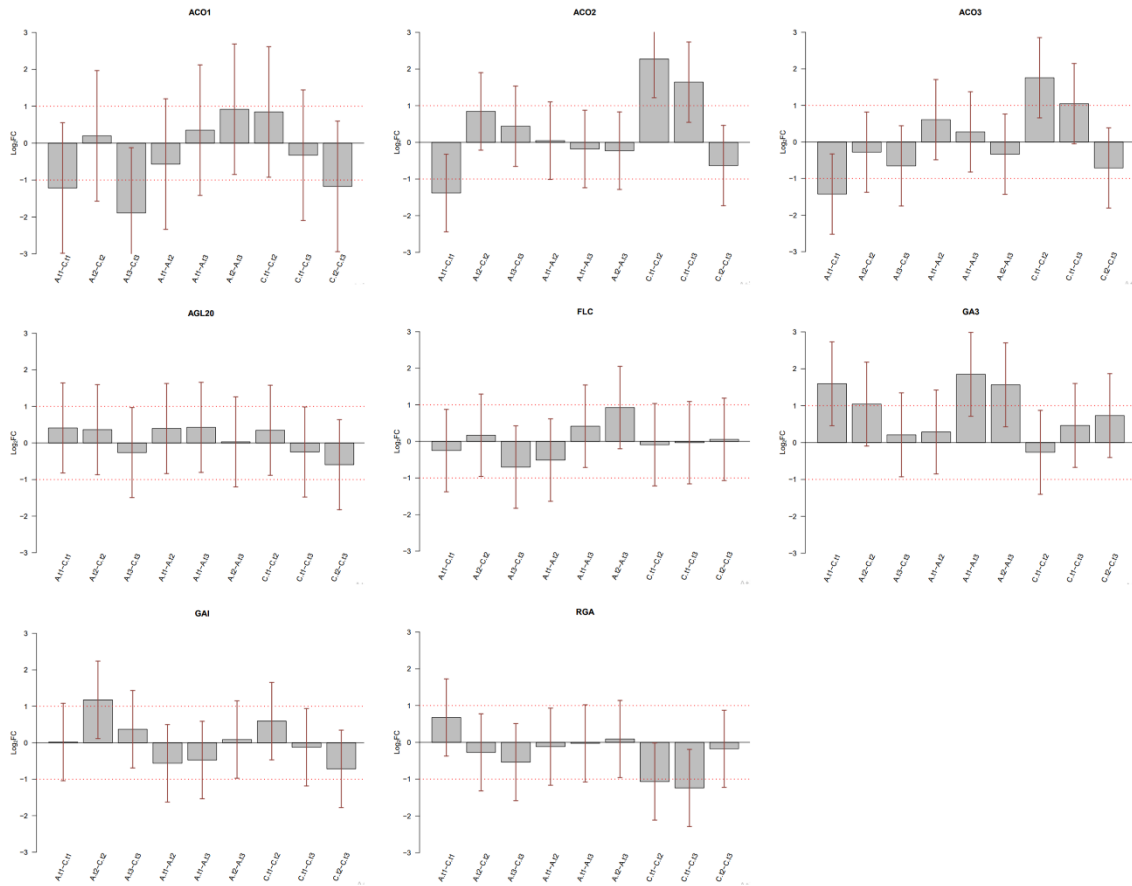


Figure 19: Resultados das expressões dos genes alvo pelo modelo linear misto em plantas de *A. thaliana* sob influência da aplicação de piraclostrobina em fotoperíodo não indutivo. A letra “A” representa o tratamento com aplicação de água; letra “C” representa o tratamento com aplicação de piraclostrobina; “t1” representa a coleta às 4 HAA; “t2” representa a coleta às 24 HAA; “t3” representa a coleta às 100 HAA. Médias que ultrapassam o limite 1 e -1 do log₂FC apresentam diferenças significativas a nível de 0,05%.

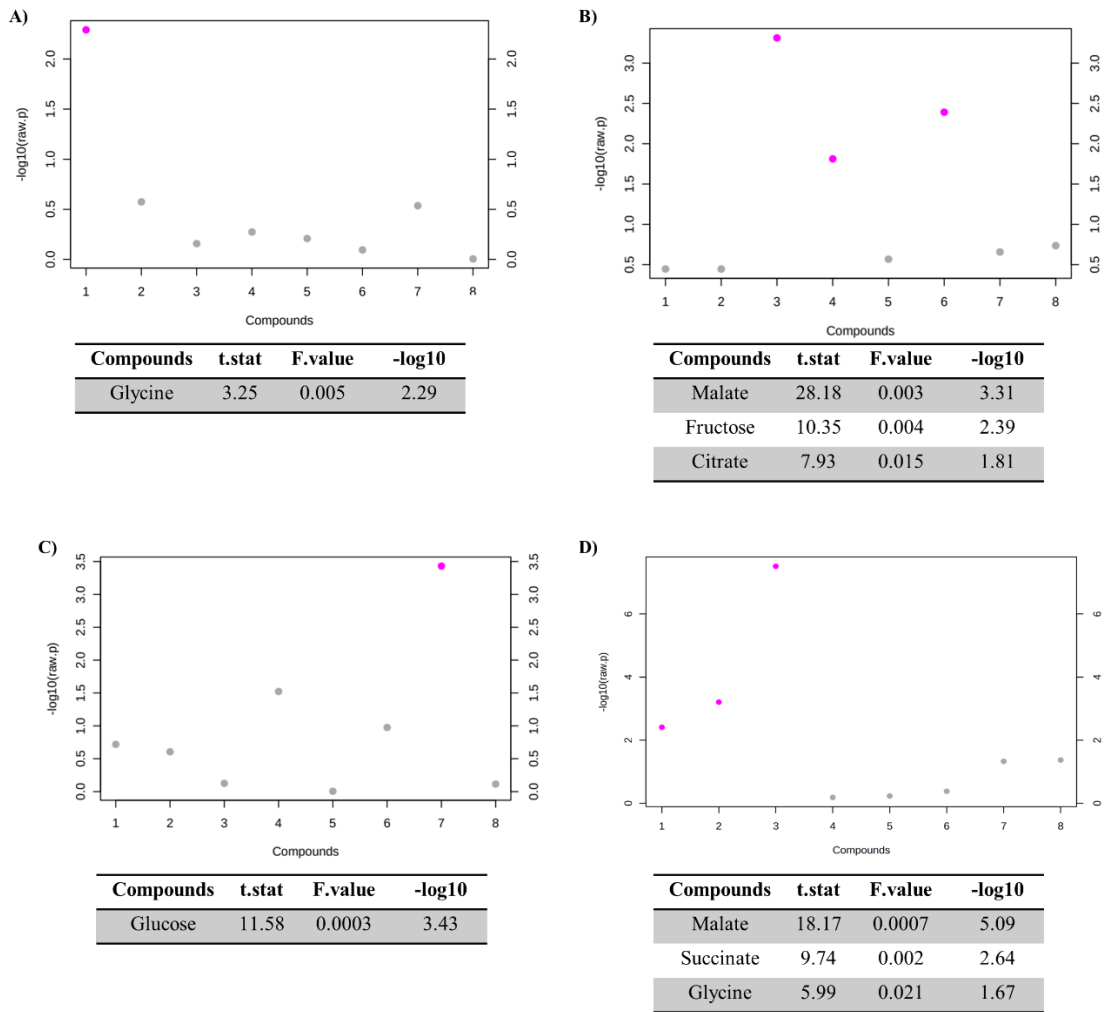


Figure 20: Análise pelo teste t do perfil metabólico de folhas de *A. thaliana* sob influência de aplicação de piraclostrobina em fotoperíodo indutivo (16h claro/8h escuro). A) resultado das três coletas juntas; B) resultado da coleta 8 HAA; C) resultado da coleta 32 HAA; D) resultado da coleta 104 HAA. Os resultados foram selecionados com limite de 0,05% utilizando-se a plataforma MetaboAnalyst. Os círculos rosas representam metabolitos que apresentaram diferenças significativas.

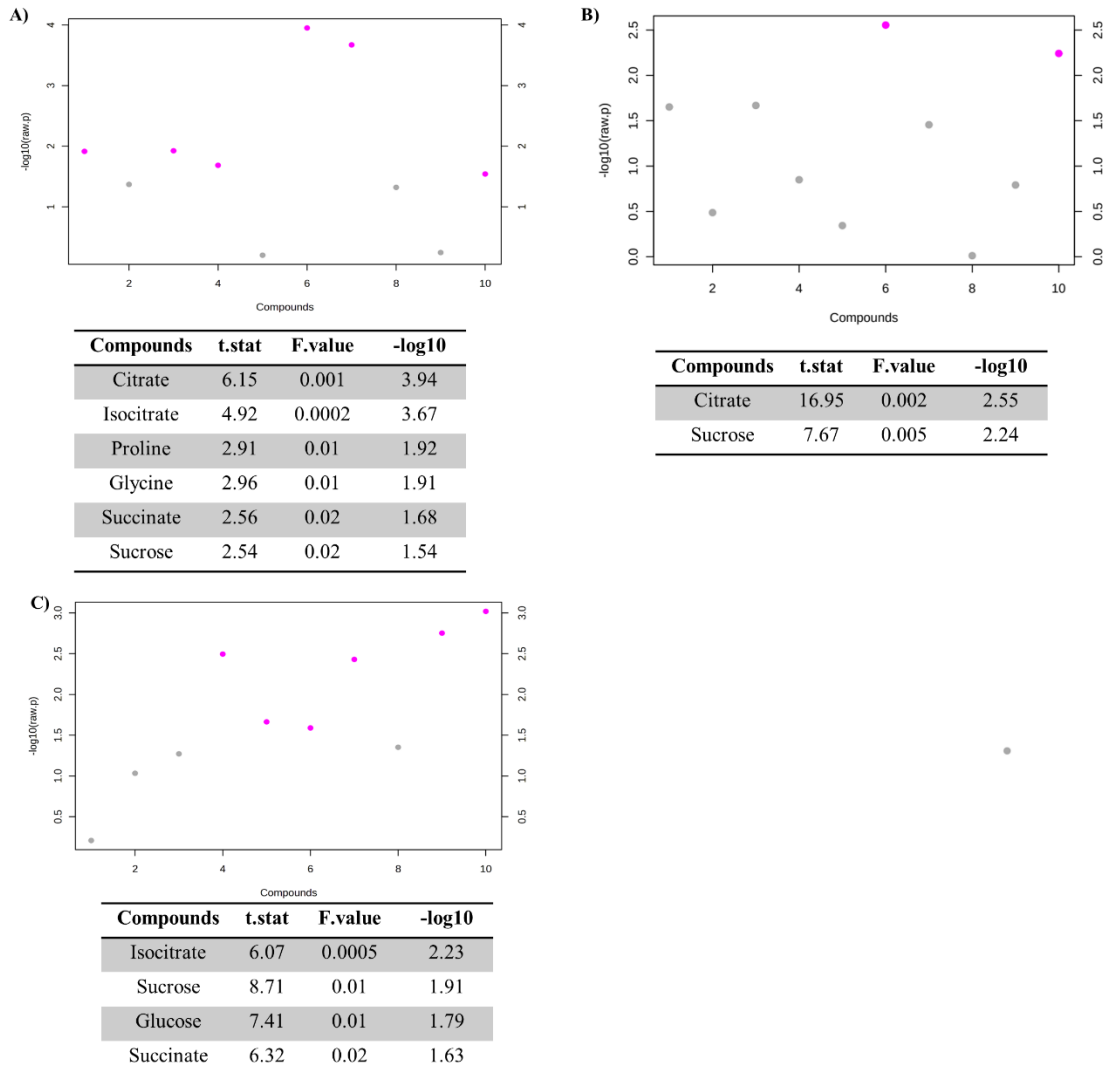


Figure 21: Análise pelo teste t do perfil metabólico de folhas de *A. thaliana* sob influência de aplicação de piraclostrobina em fotoperíodo não indutivo (8h claro/16h escuro). A) resultado das três coletas juntas; B) resultado da coleta 28 HAA; C) resultado da coleta 100 HAA. Os resultados foram selecionados com limite de 0,05% utilizando-se a plataforma MetaboAnalyst. Os círculos rosas representam metabolitos que apresentaram diferenças significativas.

CAPÍTULO 4: A ACONITASE É CAPAZ DE MODULAR A EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À SINALIZAÇÃO DE GIBERELINAS E ALTERAR O TEMPO DE FLORESCIMENTO EM *Arabidopsis thaliana*.

RESUMO

A aconitase (ACO) é responsável por catalisar o segundo passo do ciclo de Krebs, através da isomerização reversível do citrato em isocitrato. Nas plantas essa enzima é relacionada diretamente a vários processos metabólicos e fisiológicos no crescimento e desenvolvimento como fotossíntese, metabolismo de carboidratos e lipídios, sistema antioxidante, mecanismo de defesa e senescência. No entanto, alguns estudos têm apontado algumas evidências de que a aconitase pode estar relacionada ao tempo de indução do florescimento em plantas. Porém, não existe nenhum estudo voltado para entendimento desse mecanismo. Por isso, esse trabalho tem como objetivo investigar qual a influência da enzima aconitase no tempo de florescimento em *Arabidopsis thaliana*. Para isso, foram selecionadas linhagens que apresentavam fragmento de RNAi dos genes da ACO. Os experimentos foram executados utilizando-se plantas WT, *aco1-L2*, *aco1-L4* e *aco2-L1*. Em seguida, foram realizadas análises de expressão genica, metabolitos e tempo de florescimento. Os resultados deste estudo, demonstram evidências de que a redução na expressão da enzima aconitase em *Arabidopsis thaliana* é capaz de acelerar o florescimento em plantas cultivadas em DC, através da alteração na expressão de genes relacionado à biossíntese de giberelinas e redução na concentração de amido e sacarose nas folhas.

Palavras-chave: Metabolismo energético. Florescimento. Giberelinas

INTRODUÇÃO

A aconitase (ACO) é responsável por catalisar o segundo passo do ciclo de Krebs, através da isomerização reversível do citrato em isocitrato (Courtois-Verniquet e Dource, 1993). Essa enzima, também conhecida como aconitase hidratase, é uma proteína ferro-enxofre contendo um agrupamento 4Fe-4S (Beinert et al., 1996). Nas células das plantas, a ACO está presente em dois locais subcelulares. Nos dois locais tem a mesma função, mas com atuação em processos fisiológicos diferentes. Essa enzima está presente no metabolismo mitocondrial onde participa do ciclo tricarbóxico e no citosol onde auxilia no ciclo do glioxilato (Courtois-Verniquet e Dource, 1993).

Atualmente, existem diversos estudos com foco em demonstrar propriedades inerentes da ACO. As principais descobertas tangíveis são sobre localização, cinética e componentes estruturais da ACO nas células de planta (Brouquisse et al., 1987; Courtois-Verniquet e Dource, 1993; Beinert et al., 1996; Arnaud et al., 2007). Também tem sido reportado que a ACO pode alterar processos essenciais em plantas como por exemplo: fotossíntese, metabolismo de carboidratos e lipídios, sistema antioxidante, mecanismo de defesa e senescência (Hu e Plaxton, 1996; Carrari, 2003; Moeder et al., 2006; Hooks et al., 2014).

Além disso, outros estudos têm verificado que a restrição na expressão de genes da ACO pode reduzir fortemente o potencial germinativo (Hooks et al., 2014). Bem como, promover desenvolvimento atrofiado na fase inicial (Carrari, 2003; Moeder et al., 2006). Esses resultados observados em plantas com restrição na expressão de ACO são muito semelhantes aos encontrados em plantas que apresentam deficiência na expressão de genes da rota de biossíntese de giberelina (GA) (Groot e Karssen, 1987; Wilson et al., 1992; Debeaujon e Koorneef, 2000). Ou seja, uma possível interferência dos mutantes de ACO pode estar relacionada aos níveis de GA nas plantas. Uma vez que as GAs durante a germinação e desenvolvimento inicial possuem um papel essencial (Tuan et al., 2018; Debeaujon e Koorneef, 2000).

A GA representa uma classe de hormônios clássica que em plantas pode atuar em diversos processos fisiológicos. Um desses processos está relacionado à transição da fase vegetativa para reprodutiva (Eriksson et al., 2006). Resumidamente, nesse processo, as GAs são responsáveis por reduzir a atividade das proteínas DELLA (Murase et al., 2008), as quais se ligam fisicamente às proteínas SPL 9/10 e as impedem de executar funções sob os genes-alvos (Yu et al., 2012). Por si, os SPL 9/10 são reguladores positivos do *miR172* e SPL 3/4/5 os quais podem induzir diretamente a expressão do gene florígeno e assim promover a indução floral em dias longos em *A.thaliana* (Yu et al., 2012). Além disso, existem evidências de que

as GAs também desempenham um papel importante na transição floral em plantas de *A. thaliana* cultivadas em dia curto. Isso ocorre, pois, as GAs são responsáveis por regular a transcrição do gene *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1 (SOC1)* o qual dá início à indução do florescimento nessas condições (Blázquez et al., 1998; Moon et al., 2003).

Diante do que foi escrito, são evidentes os esforços para se tentar elucidar e compreender a função da ACO nos processos essenciais de crescimento e desenvolvimento de plantas. Contudo, são limitados os estudos sobre a restrição da atividade da ACO e seus efeitos em processos ligados ao florescimento. Devido a isso, esse estudo tem como objetivo avaliar a influência da enzima ACO na expressão de genes relacionados à sinalização de GA e indução do florescimento em plantas de *A. thaliana* cultivadas em diferentes fotoperíodos.

MATÉRIAS E MÉTODOS

Local do experimento

Os experimentos foram realizados em ambiente controlado, na sala de crescimento do Setor de Fisiologia Vegetal, pertencente ao Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG, Brasil. As análises foram feitas no Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas (LFMP) e Laboratório de Bioquímica e Nutrição de Plantas (LBNP) da UFLA.

Material Vegetal e condução do experimento

As construções dos mutantes de *ACO* de *A. thaliana* foram desenvolvidas no LFMP. Para esses experimentos, utilizamos sementes de geração T3 que foram selecionadas no antibiótico Canamicina 50 mg. Essas sementes foram embebidas em água destilada e mantidas a 4°C no escuro por dois dias para quebrar a dormência. Após esse processo, as sementes foram colocadas em placas contendo meio MS meia força, 1% de sacarose e 2,8% de Phitagel para germinarem. Em seguida, foram transplantadas para vasos contendo substrato Carolina Soil CSC® e vermiculita na proporção 2:1. Durante o período experimental algumas plantas foram mantidas no fotoperíodo indutivo (16 horas luz e 8 horas escuro - DL) e outras em fotoperíodo não indutivo (8 horas luz e 16 horas escuro - DC). As condições dos experimentos foram: irrigação na capacidade de campo do substrato; temperatura entre 18 e 25°C; umidade relativa do ar entre 30-80% e intensidade da luz de 180 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Delineamento experimental e coleta do material

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro linhagens e cinco repetições biológicas. Cada repetição representa uma unidade experimental formada por um

pool de cinco plantas. As linhagens utilizadas foram T1: plantas selvagens (WT); T2: *aco1.L2*, T3: *aco1.L4* e T4: *aco2-L1*. As coletas foram realizadas aos 18 dias de idade para as plantas que estavam em DL e 34 dias de idade para as plantas que estavam em DC (Fig. 22).

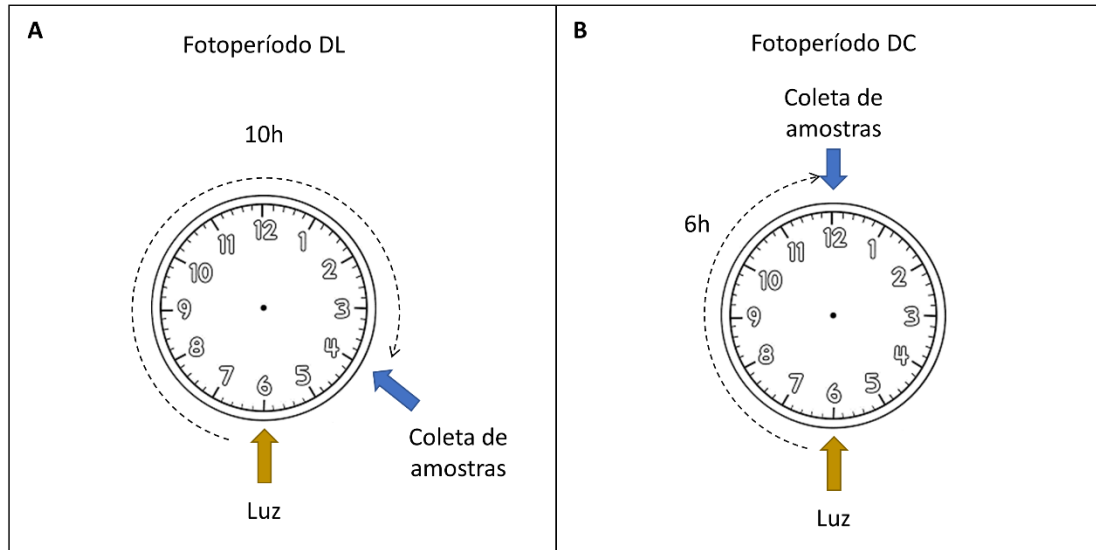


Figure 22: Momento da coleta das amostras. **A)** plantas cultivadas em dia longo e **B)** plantas cultivadas em dia curto.

Obtenção dos mutantes via RNAi

Identificação dos transcritos em estudo

Com o objetivo de reduzir a atividade da enzima aconitase em plantas de *Arabidopsis thaliana* e caracterizar a função dos genes *ACO1* e *ACO2* na indução do florescimento, foi realizado o silenciamento gênico por RNAi destes genes. As identificações das sequências dos transcritos em estudo foram obtidas no banco de dados do NCBI (Tabela 2).

Tabela 2: Identificação dos transcritos da aconitase em *Arabidopsis thaliana*

Nome do gene	ID NCBI	Tamanho em pb
Aconitate hydratase 1 (ACO1)	829737	3347 pb
Aconitate hydratase 2 (ACO2)	828805	3349 pb

Construções dos mutantes de *Arabidopsis thaliana* via RNAi

As construções para o silenciamento dos genes da aconitase, foram realizadas utilizando-se o sistema Gateway de recombinação (Invitrogen™). Esse sistema é baseado na reação de recombinação sítio-específico conforme descrito por KARIMI; INZÉ e DEPICKER (2002). Em resumo, para se obter a construção do silenciamento dos genes da enzima aconitase em *A. thaliana* foram desenhadas sequências de DNAs alvos, as quais foram clonadas no vetor

de entrada pENTR™ (Figura 23). Em seguida, essas sequências foram transferidas para o vetor de destino PK7GWIWG2(II) (Figura 24).

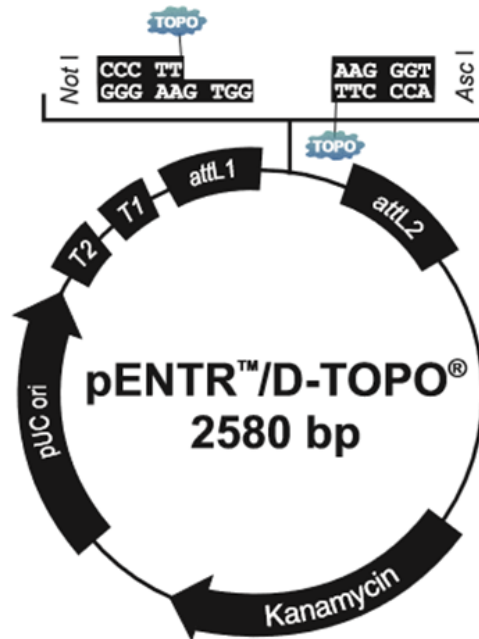


Figure 23: Mapa do vetor de entrada do sistema Gateway pENTR (Invitrogen™)

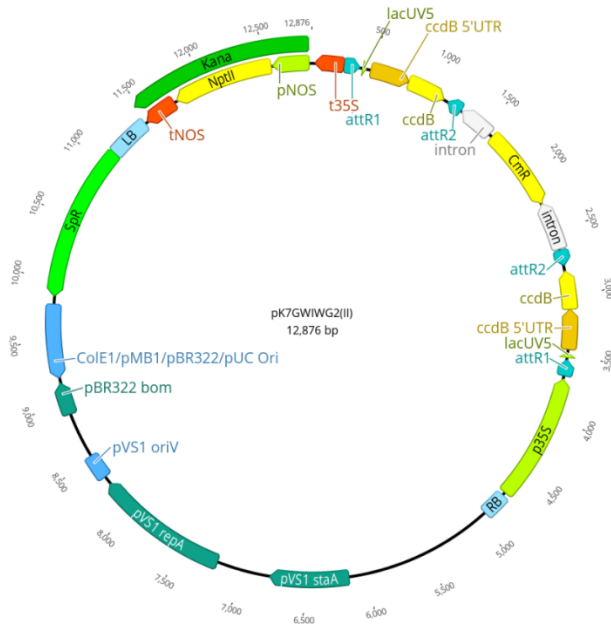


Figure 24: Mapa do vetor PK7GWIWG2(II). utilizado em experimentos de silenciamento gênico por RNAi

Extração de RNA e síntese de cDNA

Para isolar os genes da aconitase, utilizamos folhas, que foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido até o momento da extração do RNA. A extração foi realizada de acordo com Oliveira et al., (2015). A integridade das amostras foi verificada em gel de agarose 1,2% (m/v) que posteriormente foram visualizadas utilizando fotodocumentador UV-transilluminator (UVITEC FireReder XS D-77Ls-20.M). A quantificação do RNA foi feita em espectrofotômetro NanoVue™ GE Healthcare A260.

Todas as amostras de RNA foram tratadas com enzima TURBO DNA-free™ Kit (Invitrogen™) para a degradação do DNA genômico. Após o tratamento com DNase, as amostras de RNA foram submetidas à eletroforese, a fim de verificar se ainda tinham ou continham DNA genômico. As amostras que apresentaram alto grau de integridade, livres de DNA e contaminantes, foram utilizadas para a síntese de cDNA, pelo kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™). Após a síntese do cDNA as amostras foram armazenadas em freezer -20°C.

Amplificação dos transcritos e purificação das bandas

A amplificação dos transcritos foi feita por PCR a partir de amostras de cDNA de folha. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2% (m/v) que posteriormente foram visualizadas utilizando fotodocumentador UV-transilluminator (UVITEC FireReder XS D-77Ls-20.M). Os fragmentos obtidos foram purificados do gel de agarose pelo kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen).

Clonagem, transformação bacteriana e extração DNA plasmidial

Para a clonagem dos transcritos, foi utilizado o vetor pENTR™/D-TOPO™ Cloning Kit (Invitrogen™). As reações foram seguidas de acordo com as recomendações do fabricante. Para a transformação, foram utilizadas as células de bactérias quimicamente competente de *Escherichia coli* One Shot™ TOP10 (Invitrogen™).

Para introdução do vetor na bactéria foi utilizado o processo de choque térmico. Após a transformação, as colônias foram submetidas à PCR, para comprovar a presença do fragmento de interesse. As colônias positivas foram selecionadas para o processo de extração do DNA plasmidial. A extração plasmidial foi feita utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) seguindo as recomendações do fabricante.

Sequenciamento e reações LR

Os plasmídeos contendo os insertos dos fragmentos correspondentes aos genes de interesse, foram sequenciados pelo método de Sanger. As sequências obtidas no

sequenciamento foram comparadas e alinhadas com as sequências nos bancos de dados NCBI. As sequências confirmadas foram utilizadas para a recombinação com o vetor de destino com o kit Gateway™ LR Clonase™ II Enzyme mix (Invitrogen™).

A transferência dos fragmentos de interesse para os vetores de expressão se dá pela recombinação dos sítios attL, presentes no vetor pENTR, com os sítios attR, presentes no vetor de destino. As reações LR foram feitas de acordo com as recomendações do fabricante. Após a reação LR, o produto foi utilizado para transformação de bactérias quimicamente competentes de *Escherichia coli* One Shot™ TOP10 (Invitrogen™). Para verificar a presença do inserto e o sucesso da recombinação, o DNA plasmidial foi analisado. As colônias positivas foram sequenciadas e selecionadas para a transformação de *Agrobacterium tumefaciens*.

Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

O preparo das células competentes da *Agrobacterium tumefaciens*, GV3101, foi feita seguindo o protocolo cloreto de cálcio. As células competentes foram estocadas e armazenadas em freezer -80°C. Para a transformação, as células foram descongeladas e foi adicionado o fragmento de interesse. A mistura foi mantida em gelo e depois transferida para nitrogênio líquido, e subsequentemente foram incubadas em banho maria a 37°C. Em seguida, foi adicionado o meio LB e mantido em agitação a 28°C. Após o crescimento, o meio foi espalhado em placas de Petri contendo meio LB e Canamicina 50 mg. As colônias foram checadas por PCR e as positivas foram utilizadas para a transformação de *A. thaliana* conforme o protocolo de floral-dip (Zhang et al. 2006).

Seleção das plantas transformadas

Após a transformação das plantas de *A. thaliana* via floral dip, sementes foram coletadas e semeadas em placas de Petri contendo meio MS meia força com antibiótico Canamicina 50 mg. Em seguida, as plantas que germinaram nesse meio foram identificadas por PCR, e as que apresentaram o fragmento alvo foram mantidas até a coleta das sementes. Esse processo se repetiu até quando as plantas apresentaram genes alelos homozigotos (geração T3).

Análise Molecular

Extração de RNA

Amostras de folhas foram coletadas e congeladas em nitrogênio líquido, em seguida, armazenadas a -80°C até a extração do RNA utilizando o protocolo conforme descrito por Oliveira et al., (2015). Após a extração, verificamos a qualidade e quantidade das amostras

utilizando o espectrofotômetro Nanovue® (NanoVue GE Healthcare). Para avaliar a integridade do RNA, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose que posteriormente foram visualizadas utilizando fotodocumentador UV-transilluminator (UVITEC FireReder XS D-77Ls-20.M).

Síntese de cDNA

Para a síntese de DNA complementar (cDNA), as amostras foram tratadas utilizando DNA free TM kit para eliminar o DNA. EM seguida, um volume de 1 µL foi utilizado para quantificação no Nanovue®. A avaliação da integridade e pureza do RNA foram feitas utilizando eletroforese e fotodocumentador UV-Transilluminator. Posteriormente, as amostras foram armazenadas no freezer -20°C. Após o tratamento com DNase, as amostras que apresentarem alto grau de integridade e pureza foram tratadas com Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription e novamente armazenadas no freezer -20°C

Análise de expressão gênica

Para a expressão dos genes alvos foram utilizados os seguintes pares de primers: *AtFT*, *AtASOC1*, *AtGA3*, *AtRGA1*, *AtGAI*, *AtFLC*, *AtACO1*, *AtACO2* e *AtACO3*, com os genes *dereferência PUX7* e *TIP4* (Skiljaica et al., 2022) (Tabela 3 – suplementar). A amplificação dos genes foi feita utilizando um termociclador Rotor Gene Q Real-Time PCR (Qiagen). As análises foram feitas em duplicatas técnicas para todos os ensaios de análise de expressão. Os dados foram analisados utilizando-se rotor-gene series pure detections software (Versão 2.0.2).

Análises bioquímicas

As coletas para as análises bioquímicas foram realizadas às 12:00 no experimento com DL e às 16:00 no experimento com fotoperíodo indutivo DC. Todo o material vegetal foi macerado em nitrogênio líquido e, em seguida, armazenado em ultrafreezer -80 °C, até o momento das análises. Para a extração, pesamos aproximadamente 50 mg do material macerado em microtubos de 2mL. Em seguida, adicionamos 350 µL de etanol 100% e colocamos os tubos em banho Maria a 75°C por 20 min. Logo após esse processo, transferimos o sobrenadante para um novo tubo de 2 mL. Esse processo se repetiu por mais duas vezes. O sobrenadante coletado foi utilizado para as análises de açúcares redutores e não redutores, e aminoácidos solúveis totais, o pellet resultante foi utilizado para análise dos teores de proteínas e amido.

Resumidamente, a quantificação dos açúcares redutores foi feita por meio do método DNS, proposto por Miller (1959) e os açúcares solúveis totais pelo método de antrona, descrito por Dische (1962). A quantificação de aminoácidos foi realizada pelo método de ninhidrina

conforme o descrito por Yemm e Coccking (1955). Para a determinação da proteína, o pellet da extração etanólica foi solubilizado com NaOH (0,1M) e encubado à 80°C por 1h, o sobrenadante resultante foi utilizado para quantificação pelo protocolo Bradford (1976). Para a extração do amido foi utilizado o mix da amostra derivada da extração de proteínas, na qual foi adicionado tampão acetato de potássio, para a acidificação do meio, seguido da adição da solução de degradação (tampão acetato de potássio mais a enzima amiloglucosidade) (adaptado de Hendriks *et al.*, 2003 e Zanandrea *et al* 2010). Para a extração da sacarose foi adicionado hidróxido de potássio (KOH) ao extrato etanólico (1:1). A quantificação do amido e sacarose se deu pelo método de antrona (Dische 1962).

Análise de Giberelinas Totais

A extração de giberelinas foi feita de acordo com o protocolo de Lisec *et al.*, (2006) com adaptação. Em resumo, aproximadamente 50 mg de amostra macerada e 1 mL de metanol foram adicionados em tubo Eppendorf. Em seguida, as amostras foram submetidas a 70°C por 15 min. O extrato foi centrifugado em 10.000 rpm por 10 min e 750 µL do sobrenadante foi coletado e transferido para outro tubo de 2 mL. A análise de GA foi realizada de acordo com Almeida *et al.*, 2014, com adaptações. Para isso foi utilizado 300 µL do extrato mais 200 µL de metanol 80%. Em seguida 2,0 mL de solução de acetato de zinco (21,9g de acetato de zinco em 100 mL de água destilada e 1 mL de ácido acético glacial) foi adicionado. Em seguida, foram adicionados 2,0 mL de ferrocianeto de potássio (10,6 g em 100 mL de água). O extrato foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 min. Em seguida, 3,75 mL do sobrenadante foi coletado e adicionado junto com 3,75 mL de HCL a 30% em um tubo de 10 mL e incubado a 20°C por 75 min. Em seguida foi feita a leitura no comprimento de 254 nm.

Avaliação do tempo de florescimento

A análise do florescimento em *A. thaliana* foi realizada de acordo com Mouradov *et al.*, (2002). Para isso, contamos o número das folhas presentes na roseta e os dias que antecederam o aparecimento da primeira flor.

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de estatística descritiva e analisados quanto à distribuição, normalidade e homogeneidade de variâncias. Diferenças significativas entre as expressões dos genes foram determinadas usando o modelo linear misto (Steibel *et al.*, 2009). Para os metabólitos e variáveis de florescimento os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Identificação das linhagens de RNAi do gene *ACO* em *A. thaliana*

As linhagens de *A. thaliana* mutantes que contêm as construções foram rastreadas a nível de PCR em folhas. As PCRs confirmaram que duas linhagens expressaram o fragmento da construção para o gene *aco1* (Fig. 25- A) e uma linhagem para o gene *aco2* (Fig. 25 - B). As linhagens de ACO confirmadas foram propagadas em placas de Petri contendo meio MS e em seguida transferidas para a vasos contendo substrato na sala de crescimento para análises posteriores.

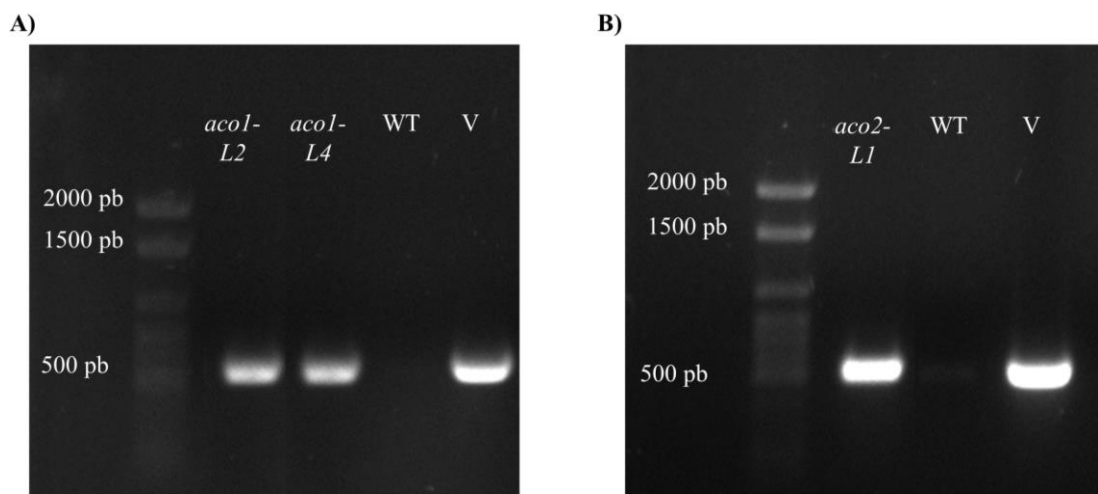


Figure 25: Gel de agarose (1,2%) da PCR do DNA para confirmação das linhagens mutantes de *A. thaliana*. **A)** PCR mostrando as linhagens com mutação no gene da *ACO1*. **B)** PCR mostrando as linhagens com mutação no gene da *ACO2*. Número de pares de base (pb); plantas com mutação na expressão do gene aconitase (*aco1-L2*, *aco1-L4* e *aco2-L1*); plantas selvagens (WT) e vetor PK7GWIWG2 (II) (V).

Efeito na expressão gênica em linhagens de *A. thaliana* com mutação em *ACO* que foram mantidas em fotoperíodo indutivo

As análises de expressões gênicas mostraram que todas as linhagens que continham RNAi do gene ACO apresentaram aumento na expressão relativa de *AtFT* quando comparada à selvagem. No entanto, não foi observada diferença estatística significativa entre as linhagens e WT (Fig. 25 – A). Também, foi verificado que para os genes *AtSOC1* e *AtFLC* não houve diferença significativa entre WT e as linhagens ACO a nível de expressão gênica (Fig. 25 – B e C).

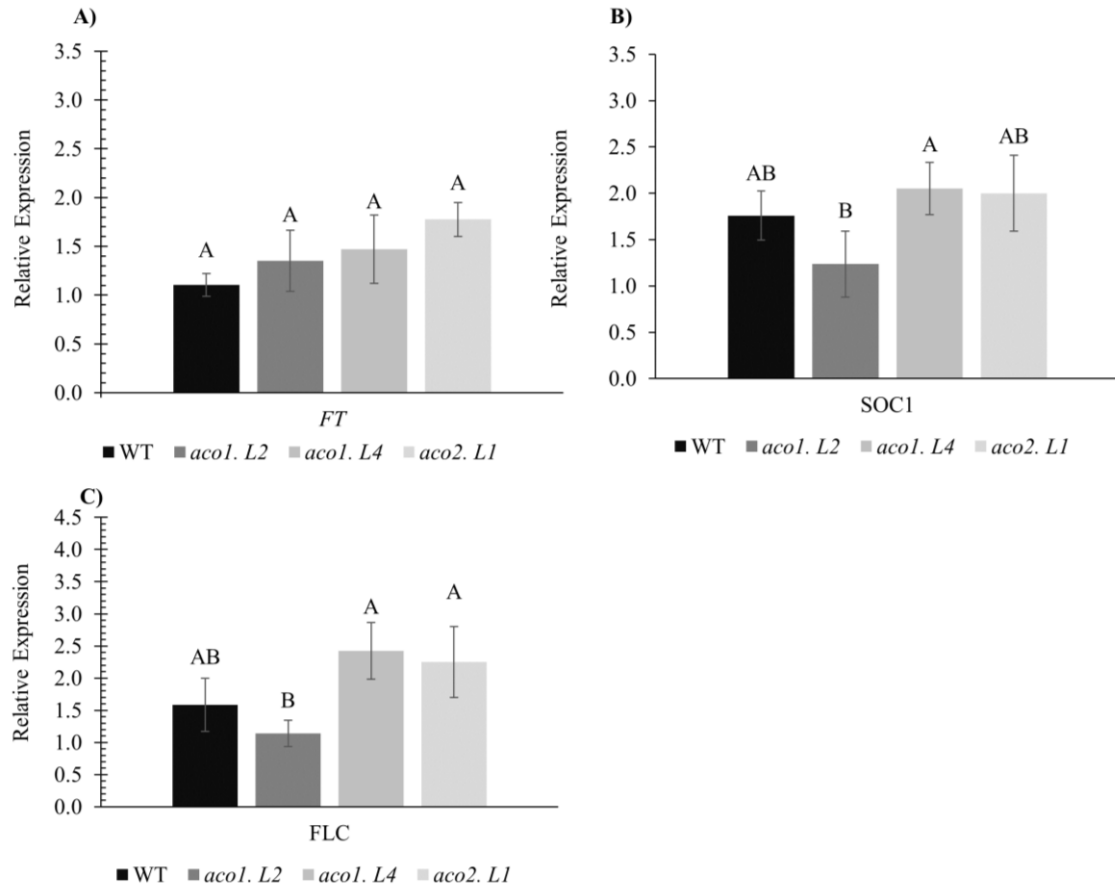


Figure 26: Análises da expressão de genes envolvidos em respostas regulatórias do florescimento em plantas com mutação na expressão de *ACO* mantidas em fotoperíodo indutivo. **A)** Expressão relativa de *FLOWERING LOCUS T* (*FT*), **B)** Expressão relativa de *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1* (*SOC1*) e **C)** Expressão relativa de *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*). Os valores são apresentados como média \pm SD de cinco repetições. As letras diferentes entre as linhagens indicam diferença estatística significativa pelo modelo linear misto.

A expressão de genes associados à biossíntese e repressão da sinalização de GA, bem como, o conteúdo total de GA também foi avaliado. Nesse contexto, foi possível observar que nas linhagens *ACO* a expressão dos genes *AtGA3ox2*, *AtGAI2* e *AtRGA1* não apresentou diferença estatística significativa em relação às plantas WT (Fig. 27). Para GAs totais, também, não foi verificado diferença entre os tratamentos (Fig. 27).

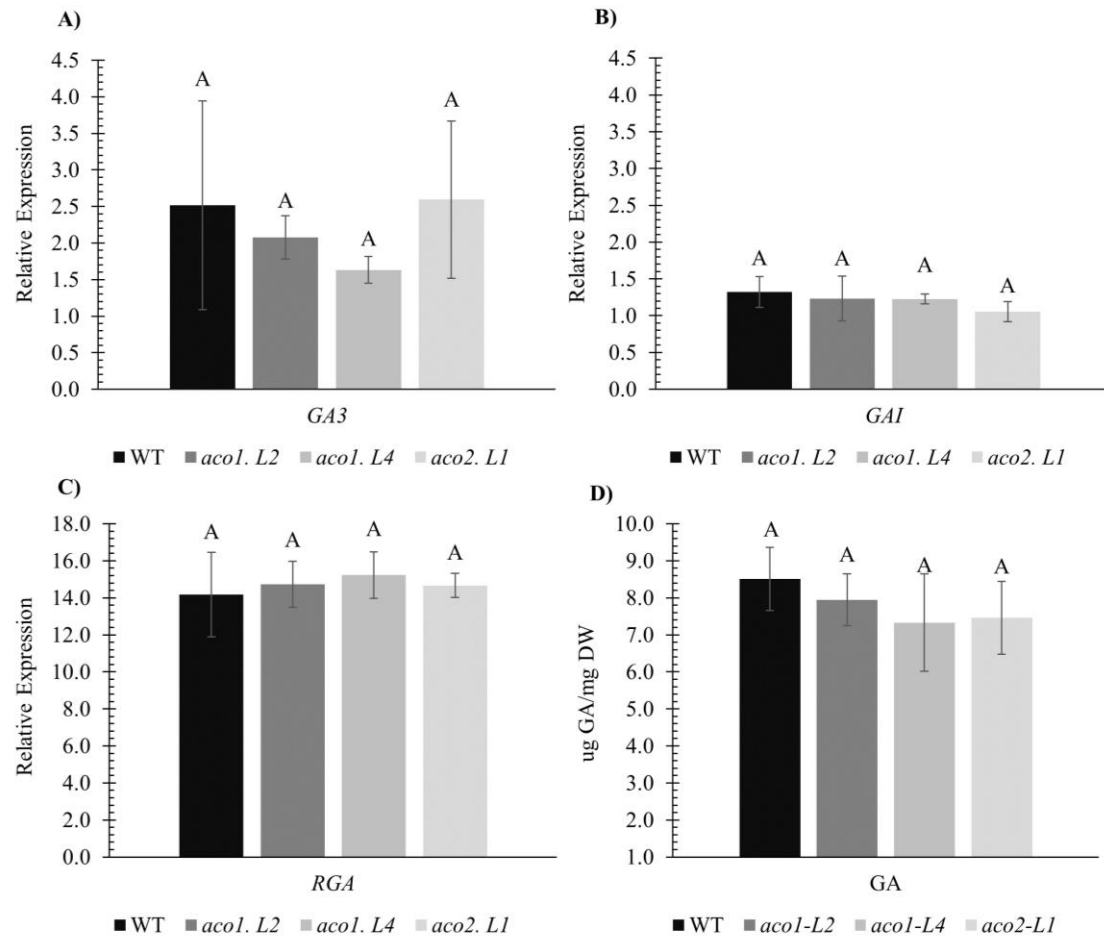


Figure 27: Expressão relativa de genes envolvidos na rota da giberelina e conteúdo total de giberelinas em linhagens mutantes de *ACO* mantidas em fotoperíodo indutivo. **A)** expressão relativa de *GA3 OXIDASE (GA3)*, **B)** expressão relativa de *GIBBERELLIN INSENSITIVE (GAI)* e **C)** expressão relativa de *REPRESSOR OF GAI-3 (RGA)*. Os valores são apresentados como média \pm SD de cinco repetições. As letras diferentes entre as linhagens indicam diferença estatística significativa pelo modelo linear misto.

Também foi avaliada a expressão relativa dos genes *ACO* nas folhas de *A. thaliana*, confirmando nosso resultado de triagem anterior (Fig. 28). Nesse contexto, a análise de RT-qPCR mostrou que a expressão do gene *AtACO1*, comparada com a planta selvagem, reduziu em aproximadamente 2,88 e 2,00 vezes nas linhagens *aco1-L2* e *aco1-L4*, respectivamente (Fig. 28 – A). Também foi verificado que na linhagem *aco2-L1*, a expressão relativa de *AtACO2*, foi reduzida em 3,08 vezes quando comparada ao WT (Fig. 28 – B). No entanto, não foi observada nenhuma alteração na expressão relativa de *AtACO3* entre os tratamentos (Fig. 28 – C).

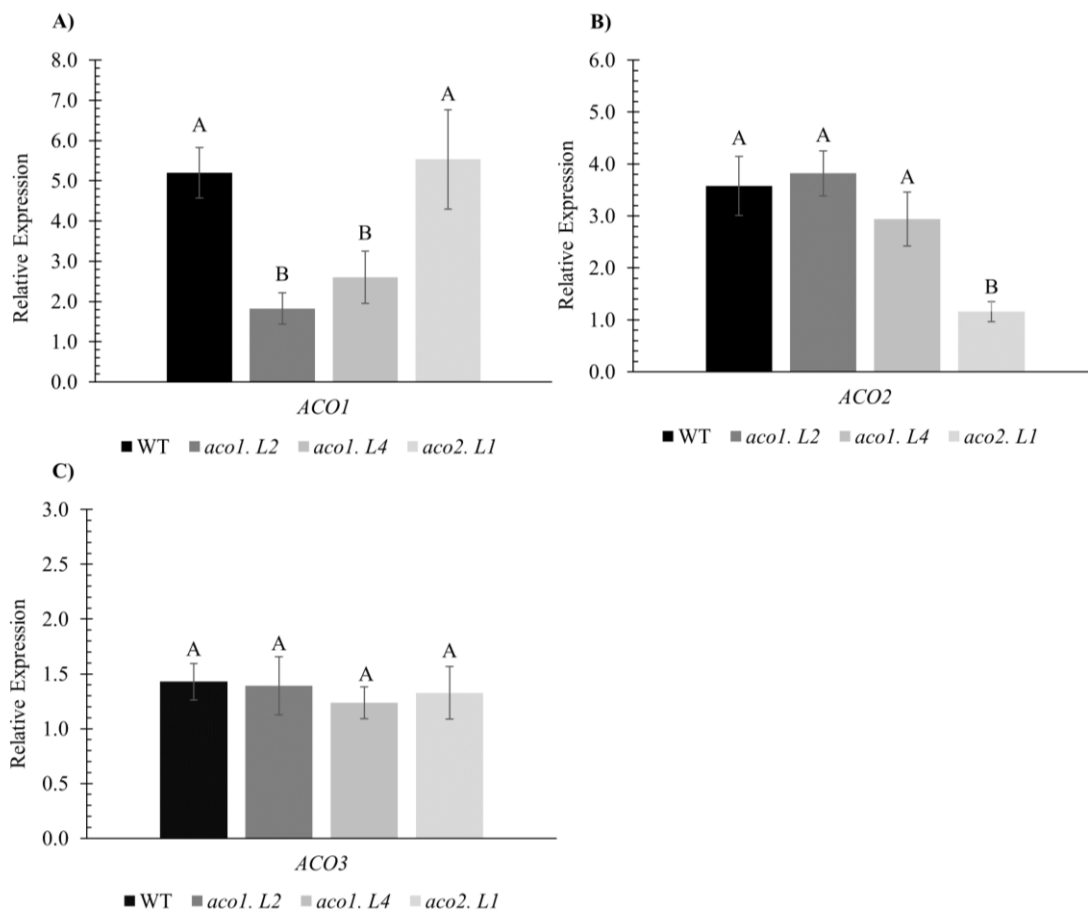


Figure 28: Análise da abundância de mRNAs da aconitase por RT-PCR quantitativo nas linhagens de *A. thaliana* mantidas em fotoperíodo indutivo. **A)** Expressão relativa de *ACONITASE 1 (ACO1)*, **B)** Expressão relativa de *ACONITASE 2 (ACO2)* e **C)** Expressão relativa de *ACONITASE 3 (ACO3)*. Os valores são apresentados como média \pm SD de cinco repetições. As letras diferentes entre as linhagens indicam diferença estatística significativa.

Respostas metabólicas das linhagens mutantes de *A. thaliana* mantidas em fotoperíodo indutivo

Após as análises de RT-qPCR, decidimos avaliar o teor de carboidratos e aminoácidos totais nas folhas das plantas cultivadas em DL. Os resultados dessas avaliações revelaram que não houve diferença significativa para teor de açúcares solúveis totais e açúcares redutores entre as linhagens ACO e WT (Fig. 29 – A, B). Também, foi verificado uma tendência no aumento de sacarose nas linhagens ACO em relação as plantas WT, no entanto, os níveis de sacarose foram significativamente elevados apenas na linhagem *aco1-L2* (Fig. 29 – C). Esse aumento correspondeu aproximadamente a 35% em relação às plantas WT. Além disso, as linhagens *aco1-L2* e *aco2-L1* também foram caracterizadas por níveis maiores de amido em relação às plantas WT (Fig. 29- D). Esse aumento no conteúdo de amido foi de aproximadamente 41 e 38%, respectivamente. Também, foi observado uma tendência no aumento de aminoácidos

totais nas linhagens ACO. Embora nos conjuntos de plantas os níveis de aminoácidos totais tenham sido elevados, apenas as linhagens *aco1-L2* e *aco2-L1* diferenciaram significativamente das plantas WT (Fig. 29 - E).

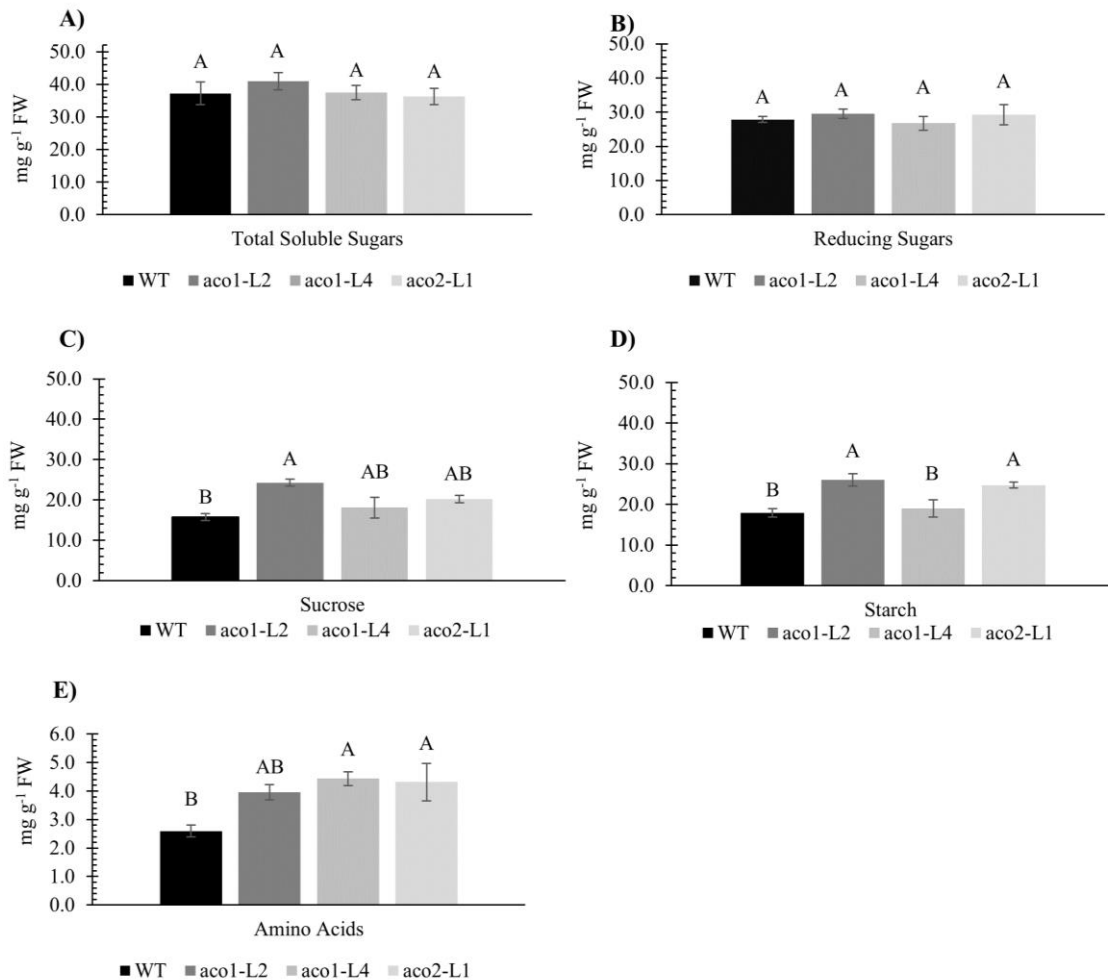


Figure 29: Resultados das alterações metabólicas em folhas de plantas selvagens e linhagens ACO cultivadas em fotoperíodo indutivo. A) açúcares solúveis totais (AST), B) açúcares redutores (AR), C) sacarose, D) amido e E) aminoácidos totais. As letras maiúsculas indicam diferença estatística significativa entre as linhagens pelo teste Tukey com nível de significância de $p < 0,05$. Os dados são médias de $n = 5$.

Análise visual do fenótipo das plantas mutantes de *A. thaliana* mantidas em fotoperíodo indutivo

Após analisar os resultados obtidos de expressão relativa e metabólitos foi avaliado o tempo de florescimento nas linhagens transformadas de *A. thaliana* mantidas em DL. Inicialmente, acreditávamos que essas plantas poderiam sofrer alguma alteração no tempo de florescimento, pois, a expressão relativa *AtFT* apesar de não ter diferenciado significativamente foi visivelmente maior em todos os mutantes do que nas plantas selvagens (Fig. 30). Entretanto, foi observado que não houve alteração significativa para os parâmetros número de folhas e dias

após semeadura (Fig. 30 – A e B). Essas duas variáveis são muito utilizadas para avaliar o tempo de florescimento em *A. thaliana* (Mouradov et al., 2002). Na figura 30 - C é possível verificar que não houve alteração no tempo de florescimento entre plantas WT e transformadas.

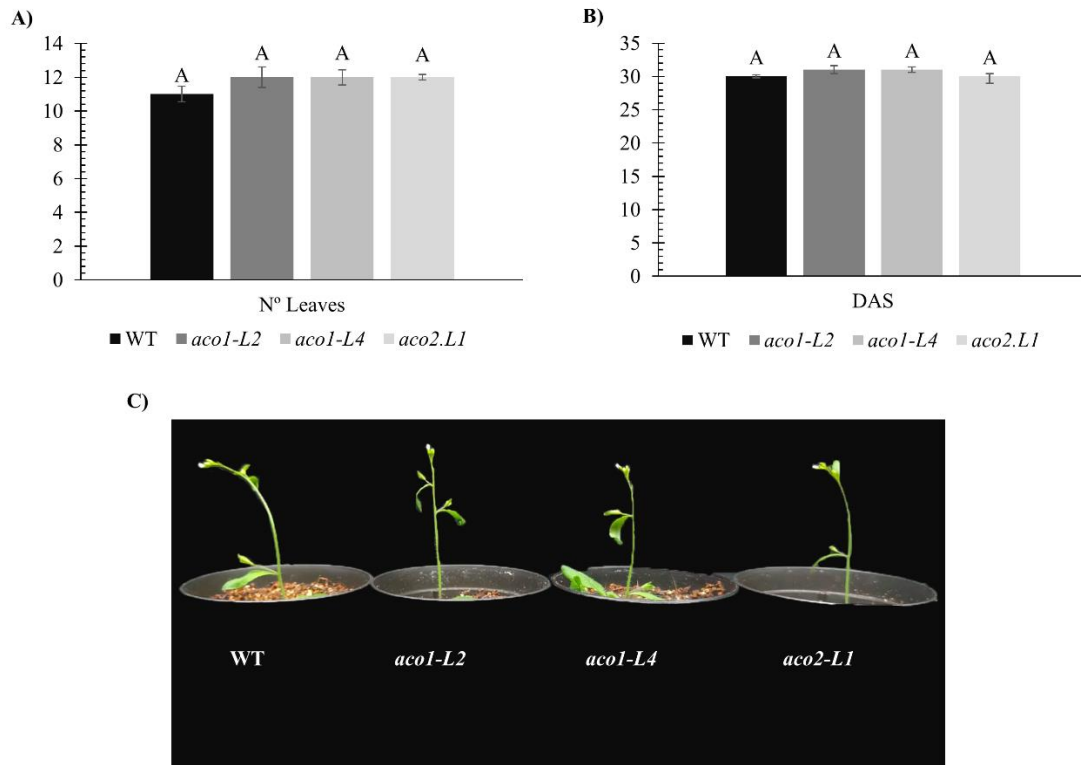


Figure 30: Análise do fenótipo em plantas de *A. thaliana* mutantes em *ACO* mantidas em fotoperíodo indutivo. **A)** número de folhas na roseta que antecederam a abertura da primeira flor, **B)** dias após a semeadura que antecederam a abertura da primeira flor e **C)** foto demonstrativa dos tratamentos após a abertura da primeira flor. Os valores são apresentados como média \pm SD de dez repetições. As diferenças significativas entre os tratamentos são indicadas pelas letras maiúsculas (teste de Tukey - $P < 0.05$).

Efeito na expressão gênica em linhagens de *A. thaliana* com mutação em *ACO* que foram mantidas em fotoperíodo não indutivo

Para verificar a influência da *ACO* em plantas de *A. thaliana* cultivadas em DC, realizamos uma triagem a nível de mRNA. Essa triagem revelou que a expressão de *AtSOC1* foi aumentada em todas as linhagens *ACO*, no entanto, apenas a linhagem *aco1-L2* diferenciou significativamente das plantas selvagens (Fig. 31 – A). Esse aumento na expressão relativa correspondeu a aproximadamente 2,34 vezes. Em contrapartida, foi notado que não houve alteração na expressão de *AtFLC* entre as linhagens e WT (Fig. 31 - B). Mas é possível observar um padrão de redução na expressão relativa de *AtFLC* em todas as linhagens quando comparada ao WT.

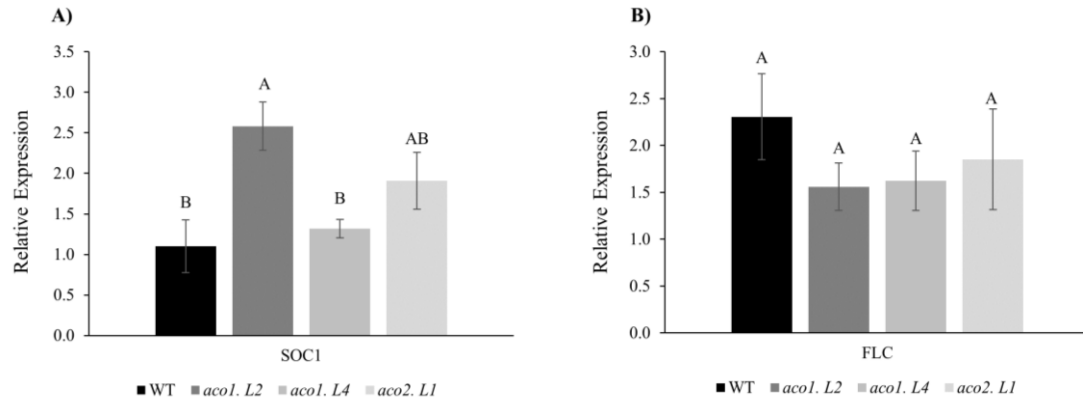


Figure 31: Análises da transcrição de genes envolvidos em respostas regulatórias do florescimento em plantas com mutação na expressão de *ACO* mantidas em fotoperíodo não indutivo. **A)** Expressão relativa de *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1 (SOC1)* e **B)** Expressão relativa de *FLOWERING LOCUS C (FLC)*. Os valores são apresentados como média \pm SD de cinco repetições. As letras diferentes entre as linhagens indicam diferença estatística significativa pelo modelo linear misto.

Também foi quantificado por RT-qPCR a expressão dos genes *AtGA3ox2*, *AtGAI2* e *AtRGAI1* e o teor de GAs totais por espectrofotometria. Diante disso, foi possível notar que as linhagens *aco1-L2* e *aco2-L1* em estudos apresentaram maior expressão relativa de *AtGA3ox2* quando comparada a planta WT (Fig. 32 - A). Além disso, foi observado que a expressão de *AtGAI2* reduziu significativamente na linhagem *aco1-L4* quando comparada ao controle (Fig. 32 - B). Bem como, foi possível notar redução significativa da expressão de *AtRGAI1* apenas na linhagem *aco1-L2* quando contraposta com planta WT (Fig. 32 - C). Apesar de verificar alterações em genes da via de biossíntese e repressão de GA, não observamos nenhuma alteração significativa no teor de GAs totais entre os tratamentos (Fig. 32 - D).

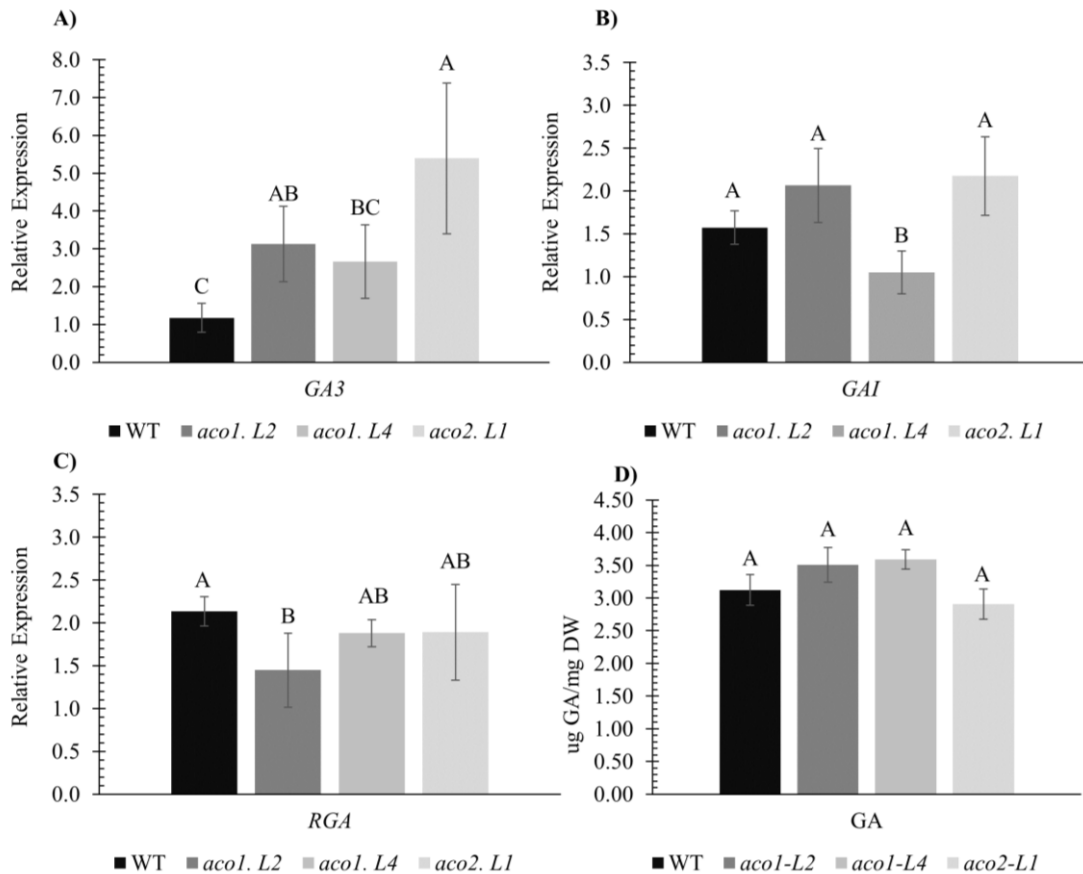


Figure 32: Expressão relativa de genes envolvidos na rota da giberelina e conteúdo total de giberelinas em linhagens mutantes de *ACO* mantidas em fotoperíodo não indutivo. **A)** expressão relativa de *GA3 OXIDASE* (*GA3*), **B)** expressão relativa de *GIBBERELLIN INSENSITIVE* (*GAI*) e **C)** expressão relativa de *REPRESSOR OF GAI-3* (*RGA*). Os valores são apresentados como média \pm SD de cinco repetições. As letras diferentes entre as linhagens indicam diferença estatística significativa pelo modelo linear misto.

Foi estudado a nível de mRNA os genes da *ACO* em plantas que foram cultivadas em DC. Fizemos novamente essa análise, pois, a duração do fotoperíodo induz grandes mudanças metabólicas em plantas (Djerrab et al., 2021), o que também pode modular alteração na expressão de *ACO*. Nessas condições, foi possível notar que a expressão do gene *AtACO1* reduziu em aproximadamente 2,00 e 1,53 vezes nas linhagens *aco1-L2* e *aco1-L4*, respectivamente (Fig. 33 - A). Além disso, é possível verificar que em comparação às plantas WT a expressão relativa de *AtACO2* reduziu drasticamente na linhagem *aco2.L1* (Fig. 33 - B). Nessa linhagem, a redução foi de aproximadamente 2,84 vezes. No entanto, não notamos nenhuma alteração significativa na expressão do gene *AtACO3* entre as linhagens e WT (Fig. 33 - C). Quando comparamos os dois fotoperíodos é possível verificar nas linhagens mutantes que a expressão do gene *ACO1* foi menor nas linhagens *ACO* em DL do que em DC (Fig. 28 e Fig. 33). Essa diferença foi de aproximadamente 1,44 e 1,30 vezes nas linhagens *aco1-L2* e

aco1-L4 respectivamente. Essa redução também foi notada para a expressão *ACO2* na linhagem *aco2-L1* (Fig. 28 e Fig. 33), na qual essa diferença foi de aproximadamente 1,08 vezes.

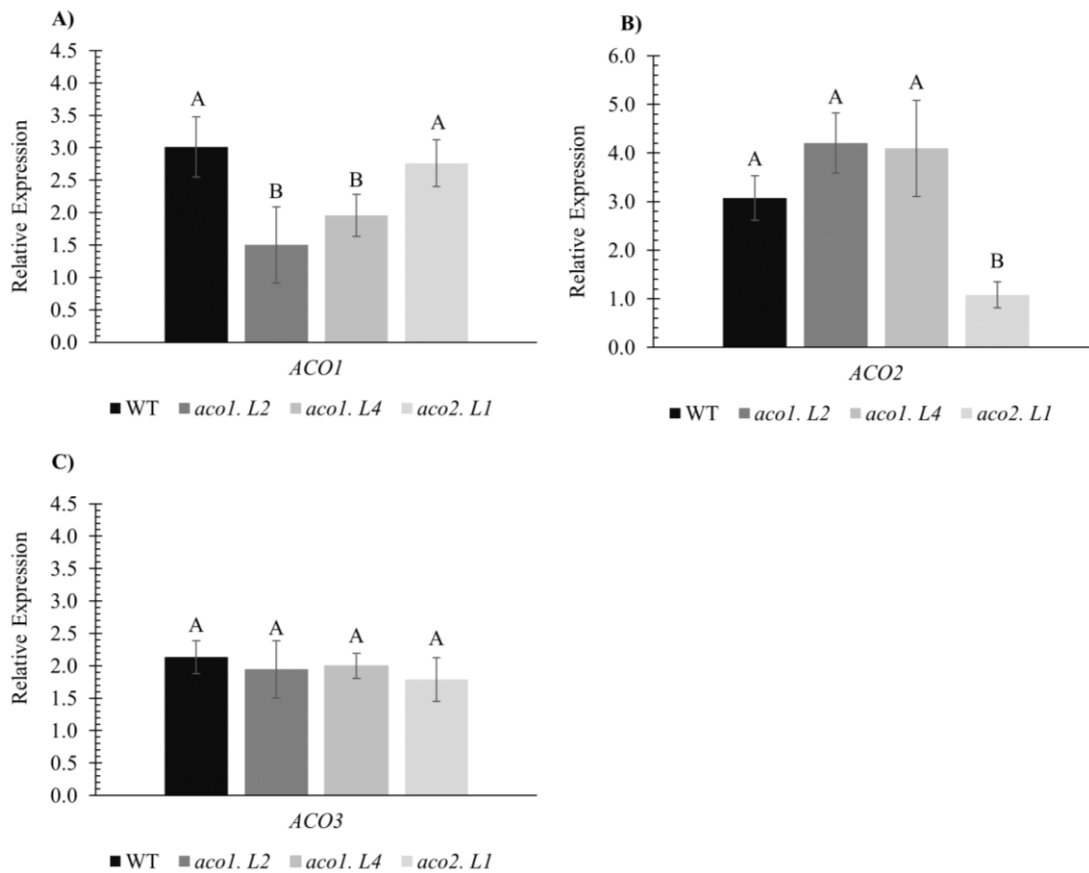


Figure 33: Análise da expressão relativa da aconitase por RT-PCR quantitativo nas linhagens de *A. thaliana* mantidas em fotoperíodo não indutivo. **A)** Expressão relativa de *ACONITASE 1* (*ACO1*), **B)** Expressão relativa de *ACONITASE 2* (*ACO2*) e **C)** Expressão relativa de *ACONITASE 3* (*ACO3*). Os valores são apresentados como média \pm SD de cinco repetições. As letras diferentes entre as linhagens indicam diferença estatística significativa.

Respostas metabólicas das linhagens mutantes de *A. thaliana* mantidas em fotoperíodo não indutivo

Para estudar as alterações metabólicas nas folhas das plantas cultivadas em DC, foram quantificados os níveis de açúcares solúveis totais, açúcares redutores, sacarose, amido, aminoácidos e proteínas. Estas análises revelaram que os níveis de açúcares solúveis totais, açúcares redutores e aminoácidos totais permaneceram inalterados entre as linhagens ACO e plantas WT (Fig. 34 – A, B e E). Entretanto, foi verificado que a concentração de sacarose apresentou um padrão de redução em todas as linhagens ACO em relação as WT, mas apenas a linhagem *aco1-L4* apresentou diferença significativa quando comparada com WT (Fig. 34 – C). Essa redução representou aproximadamente 28%. Além disso, também foi observado que

na linhagem *aco2-L1* houve redução na concentração de amido nas folhas em aproximadamente 31% em relação às plantas WT (Fig. 34 - D).

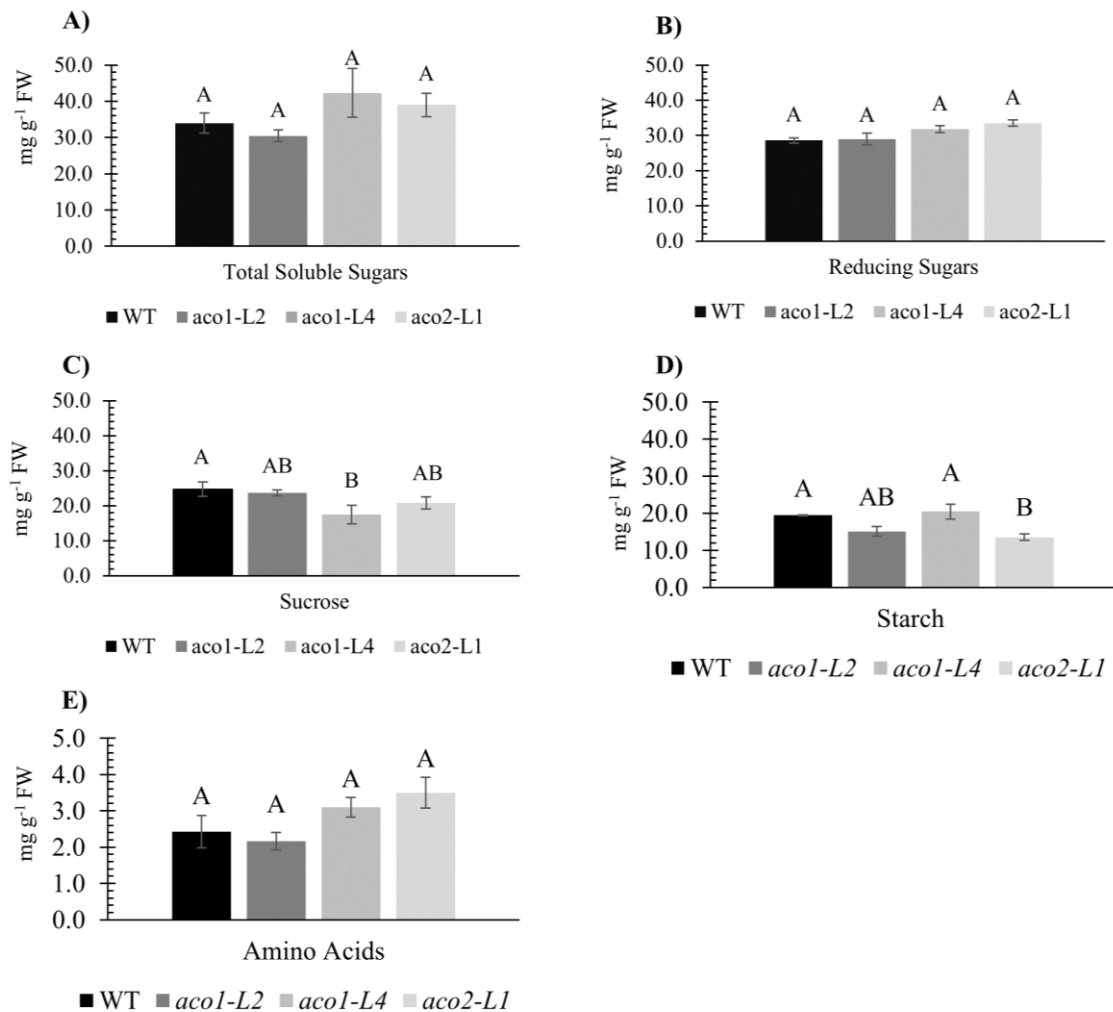


Figure 34: Resultados das alterações metabólicas em folhas de plantas selvagens e linhagens ACO cultivadas em fotoperíodo não indutivo. A) açúcares solúveis totais (AST), B) açúcares redutores (AR), C) sacarose, D) amido e E) aminoácidos totais. As letras maiúsculas indicam diferença significativa entre as linhagens pelo teste Tukey com nível de significância de $p < 0,05$. Os dados são médias de $n = 5$.

Análise visual do fenótipo das plantas mutantes de *A. thaliana* submetidas a fotoperíodo não indutivo

Também foi avaliado o tempo de florescimento nas plantas transformadas que foram cultivadas em DC. Para isso, contamos o número de folhas e DAS que antecederam a abertura da primeira flor (Mouradov et al., 2002). Nesse experimento foi verificada alteração no tempo do florescimento, resultado este contrário ao das plantas que estavam em DL. Na Fig. 35 – A, foi possível notar que todas as linhagens de ACO reduziram significativamente o DAS em relação às plantas selvagens. Essa redução foi de aproximadamente 9, 8 e 5 dias, para as

linhagens *acol-L2*, *acol-L4* e *aco2-L1*, respectivamente. Além disso, o número de folhas também reduziu significativamente nas plantas mutantes (Fig. 35 – B). Essa redução correspondeu a aproximadamente 23, 29 e 12% para *acol-L2*, *acol-L4* e *aco2-L1*, respectivamente. Assim, esses resultados demonstram que a redução na expressão de *ACO1* e *ACO2* pode ter um papel fundamental durante a indução do florescimento em plantas de *A. thaliana* mantidas em DC (Fig. 35 - C)

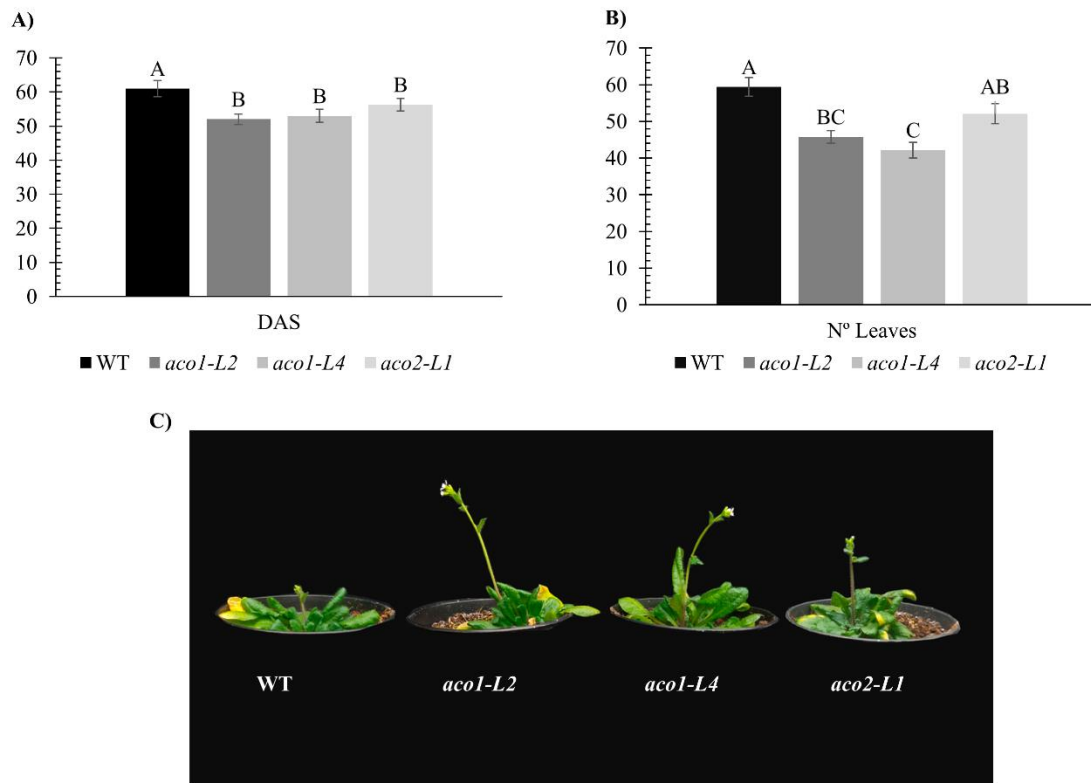


Figure 35: Análise do fenótipo em plantas de *A. thaliana* mutantes em *ACO* mantidas em fotoperíodo indutivo. **A)** número de folhas na roseta que antecederam a abertura da primeira flor, **B)** dias após a sementeira que antecederam a abertura da primeira flor e **C)** foto demonstrativa dos tratamentos após a abertura da primeira flor. Os valores são apresentados como média \pm SD de dez repetições. As diferenças significativas entre os tratamentos são indicadas pelas letras maiúsculas (teste de Tukey - $P < 0.05$).

DISCUSSÃO

A *A. thaliana* é considerada uma planta facultativa que induz o florescimento mais rápido em DL, mas em condições de DC o florescimento é retardado (Gazzani et al., 2003). Esse processo é coordenado por mecanismos diferentes, mas que possuem a mesma finalidade, como por exemplo nas plantas cultivadas em DL a via do fotoperíodo é quem controla o florescimento, por outro lado, em plantas cultivadas em DC quem regula esse processo são os mecanismos endógenos como GAs (Wilson et al., 1992; Reeves e Coupland, 2001; Hisamatsu

e King 2008). Nesse contexto, as plantas de *A. thaliana* possuem mecanismos específicos que são responsáveis por receber os sinais externos, promover a transdução, transmitir e gerar a resposta para cada condição ambiental (Kaiser et al., 1999; Takala et al., 2014). Assim, a percepção nas variações fotoperiódica podem induzir diferentes padrões genéticos, metabólicos e fenológicos (Reeves e Coupland, 2001; Gazzani et al., 2003). Devido a essas possíveis alterações induzidas nas plantas, avaliamos o tempo de florescimento nas linhagens de ACO cultivadas em fotoperíodo de DL e DC.

Influência da ACO na indução do florescimento em *A. thaliana* cultivadas em fotoperíodo de dia longo

A redução na expressão da *ACO* levou a à falta do fenótipo característico durante o estágio reprodutivo nas plantas cultivadas em DL quando comparada a plantas selvagens. Esse resultado pode ser esclarecido com o auxílio das análises de expressão relativa dos genes relacionados ao florescimento e sinalização de GAs. No entanto, apenas esses resultados não são capazes de responder qual o mecanismo exato que assegurou os fenótipos observados. O florescimento das plantas de *A. thaliana* mantidas em DL é controlado primordialmente pelo *FT* que codifica uma proteína com a função de sinalizar a indução do florescimento (Reeves e Coupland, 2001). No presente estudo, foi observado que a redução na expressão da *ACO* promoveu um leve aumento na expressão de *AtFT*, que não foi diferencialmente significativo nas linhagens ACOs, mas por apresentar esse padrão em todas as linhagens cultivadas em DL resolvemos discutir sobre esse efeito (Fig. - 26) Curiosamente, o acréscimo na expressão do gene *AtFT* não foi suficiente para acelerar o florescimento nas linhagens ACOs (Fig. 30 - C). A falta de um fenótipo visível pode estar atrelada a uma alta expressão relativa dos genes *ACO* nessas condições, ou seja, a expressão relativa não caiu abaixo de um limiar que pudesse promover alterações. Para isso, sugerimos para os próximos trabalhos, a seleção de linhagens que possuam maior redução na expressão dos genes *ACO* ou construção de linhagens que apresentem silenciamento de mais de um gene (mutante duplo). Somado a este fator, o cultivo de *A. thaliana* em DL pode ter mascarado o tempo de florescimento. Visto que, em plantas de *A. thaliana* cultivadas em dias longos a via do fotoperíodo é predominante (Wilson et al., 1992; Reeves e Coupland, 2001). Ou seja, a via fotoperiódica indutiva pode ter apresentado maior relevância em relação as outras alterações nessas plantas e assim anulado qualquer interferência no tempo de florescimento.

O padrão no aumento da expressão do *AtFT* em todas as linhagens ACOs também pode estar associado ao aumento de açúcares nas folhas. Isso ocorre, pois, plantas que apresentam

maior conteúdo de sacarose nas folhas possuem alta expressão de *FT* (King et al., 2008). Nesse caso, o aumento da sacarose é associado à alta taxa de fotossíntese nas folhas e o excesso desse processo é armazenado na forma de amido nos cloroplastos (Tognetti et al., 2013; Goldschmidt e Huber, 1992). Diante disso, no presente estudo, não avaliamos a eficiência da fotossíntese, mas foi possível observar elevados níveis de sacarose e amido nas folhas das linhagens de ACO (Fig. 29). Esses resultados indicam um provável aumento da fotossíntese líquida nas linhagens ACO. Em conformidade com o que foi descrito, resultados semelhantes também foram encontrados nas linhagens de tomateiros com restrição na expressão de ACO. Essas linhagens de tomateiro foram caracterizadas com elevada atividade fotossintética e acúmulo de amido e sacarose em folhas (Carri et al., 2003).

Influência da ACO na indução do florescimento em *A. thaliana* cultivadas em fotoperíodo de dia curto

As linhagens de ACO cultivadas em DC apresentaram florescimento acelerado. Essa alteração do florescimento pode estar relacionada a alterações na função dos componentes da biossíntese e transdução de sinal das GAs, os quais causam modificação no tempo de floração em *A. thaliana* (Wilson, et al., 1992). Nesse contexto, plantas de *A. thaliana* cultivadas sob DCs com níveis de GA endógenos baixos apresentam maior abundância de proteínas DELLA o que promove atraso do florescimento (XU et al., 1997). Nas plantas superiores existem cinco proteínas DELLA que fazem parte da família GRAS as quais regulam a sinalização das GAs, dentre essas, estão as proteínas REPRESSOR OF *ga1-3* (RGA) e GA-INSENSITIVE (GAI) que possuem funções diretas no processo de florescimento (Sun e Gübler, 2004; Davière e Achard, 2013). Durante o cultivo de *A. thaliana* em DCs, as DELLA assumem papel importante no controle da indução do florescimento, pois, são responsáveis por inibir a expressão do gene *SOC1*, que codifica uma proteína integradora floral e dá início ao processo de florescimento (Moon et al., 2003). Além disso, tem sido sugerido que *SOC1* é um dos principais genes reguladores do tempo de floração responsivo às GAs sob condições de DC (Moon et al., 2003; Achard et al., 2004). Isso ocorre, pois, as GAs modulam a expressão de *SOC1* por meio de modificações epigenéticas mediadas pelo complexo NF-Y (Hou et al., 2014). Esse complexo é um fator de transcrição conservado nos eucariotos que tem como função ligar-se ao único elemento cis dentro do promotor do gene *SOC1* para modular as modificações epigenéticas (Dolfini et al., 2012; Hou et al., 2014). Quando tomamos em conjunto o que foi exposto, nossos resultados sugerem que a redução da expressão de *ACO* nas linhagens transformadas antecipou o florescimento sob DC porque houve aumento nos níveis de GAs bioativas. Isso ocorreu,

porque além do estudo mostrar que as plantas anteciparam o florescimento ainda houve maior nível de expressão de *AtSOC1* e *AtGA3ox2*, bem como, redução de *AtGAI2* e *AtRGAI*, genes relacionados à biossíntese de GA (Fig. 32 e Fig. 35).

O nível reduzido de sacarose (Sac) nas folhas das linhagens ACOs também pode ter induzido a antecipação do florescimento. Nas plantas, a Sac é essencial em diversos processos biológicos de crescimento e desenvolvimento como embriogênese, germinação de sementes, desenvolvimento de plântulas, senescência, dentre outros (Yang et al., 2004; Hoeberichts et al., 2007; Eveland e Jackson, 2015; Ousa et al., 2015). Existem fortes evidências de que a indução floral em várias espécies é coordenada por um rápido aumento da concentração de Sac no floema e meristema apical (Bernier et al., 1993; Roldan et al., 1999; Heyer et al., 2004). O aumento desse açúcar nessas regiões é ditado pela exportação da Sac das folhas para o floema (Lu et al., 2020). Esse processo de exportação normalmente promove redução na concentração de Sac nas folhas das plantas (Dasgupta et al., 2014; Lu et al., 2020). A redução da Sac nas folhas durante a indução do florescimento ocorre, pois, as plantas necessitam de grande quantidade de açúcares no meristema apical para promover o crescimento e diferenciação celular (Koch, 1996; Roldan et al., 1999; Heyer et al., 2004; Silvitz et al., 2007). Curiosamente, em *Arabidopsis*, a indução do florescimento em plantas de DC é induzida pela exportação de Sac das folhas para o meristema apical (Corbesier et al., 1998; Silvitz et al., 2007; Andrés et al., 2020). Portanto, plantas cultivadas em DC necessitam de grande taxa de exportação de Sac das folhas para induzir o florescimento. Nesse contexto, no presente estudo foi verificado que as linhagens ACOs cultivadas em DC apresentaram baixa concentração de Sac nas folhas (Fig. 34 - C), o que indica que esse açúcar foi exportado para auxiliar o processo de florescimento. Além disso, também foi observado que o teor de amido reduziu nas folhas das linhagens ACO (Fig. 34 - D). Nesse contexto, é importante salientar que a Sac é formada a partir das trioses-fosfatos geradas pelo processo de fotossíntese e o excesso desse açúcar é estocado na forma de amido transitório nos cloroplastos das folhas (Tognetti et al., 2013; Goldschmidt e Huber, 1992). Nas plantas, esse amido transitório, em algumas condições específicas, é degradado para fornecer suprimento contínuo de carbono e promover a manutenção dos processos fisiológicos (Caspar et al., 1985; Ludewig et al., 1998). Assim, os resultados dessa pesquisa sugerem que toda sacarose produzida foi destinada para auxiliar na indução do florescimento, ao invés de ser alocada na forma de amido transitório. Outra suposição é que o amido transitório estocado possa estar sendo degradado para suprir a falta de sacarose nas folhas com o objetivo de manter o perfeito funcionamento metabólico. Essa suposição é corroborada por Corbesier et al., (1998)

os quais verificaram que a mobilização do amido transitório é necessária para obter maior taxa de exportação de sacarose no momento de indução do florescimento em plantas cultivadas em DC.

CONCLUSÕES

Neste artigo, mostramos evidências de que a redução na expressão da enzima aconitase mitocondrial e citosólica em *Arabidopsis thaliana* é capaz de alterar o florescimento em plantas cultivadas em DC. Bem como, sugerimos que o principal mecanismo envolvido nesse processo pode estar associado ao alto nível de GAs bioativas, visto que, a redução na expressão de ACO promoveu aumento na expressão relativa de *AtSOC1* e *AtGA3ox2* e redução de *AtGAI2* e *AtRGAI1*. Além disso, a inibição na expressão de ACO pode ter promovido o aumento de sacarose, amido e aminoácidos em plantas cultivadas em DL, mas em plantas cultivadas em DC a sacarose e amido foram reduzidos.

REFERÊNCIAS

- ACHARD, P.; HERR, A.; BAULCOMBE, D. C.; HARBERD, N. P. Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. **Development**, v. 131, n. 14, p. 3357-65, 2004.
- ANDRÉS, F.; KINOSHITA, A.; KALLURI, N.; FERNÁNDEZ, V.; FALAVIGNA, V. S.; CRUZ, T. M. D.; JANG, S.; CHIBA, Y.; SEO, M.; METTLER-ALTMANN, T.; HUETTEL, B.; COUPLAND, G. The sugar transporter SWEET10 acts downstream of FLOWERING LOCUS T during floral transition of *Arabidopsis thaliana*. **BMC Plant Biol**, v. 20, n. 1, p. 53, 2020.
- ARNAUD, N.; RAVET, K.; BORLOTTI, A.; TOURAINE, B.; BOUCHEREZ, J.; FIZAMES, C.; BRIAT, J. F.; CELLIER, F.; GAYMARD, F. The iron-responsive element (IRE)/ iron-regulatory protein 1 (IRP1) cytosolic aconitase iron regulatory witch does not operate in plants. **Biochem J**, v. 405, p. 523-531, 2007.
- BEINERT, H.; KENNEDY, M. C.; STOUT, C. D. Aconitase as iron-sulfur protein, enzyme, and iron-regulatory protein. **Chem. Rev**, v. 96, p. 2335-2374, 1996.
- BERNIER, G.; HAVELANGE, A.; HOUSSA, C.; PETITJEAN, A.; LEJEUNE, P. Physiological Signals That Induce Flowering. **Plant Cell**, v. 5, n. 10, p. 1147-1155, 1993.
- BLÁZQUEZ, M. A.; GREEN, R.; NILSSON, O.; SUSSMAN, M. R.; WEIGEL, D. Gibberellins promote flowering of *Arabidopsis* by activating the LEAFY promoter. **Plant Cell**, v. 10, p. 791-800, 1998.
- BROUQISSE, R.; NISSHIMURA, M.; GAILLARD, J.; DOUCE, R. Characterization of a cytosolic aconitase in higher plant cells. **Plant Physiol**, v. 84, p. 1402-1407, 1987.

CARRARI, F.; NUNES-NESE, A.; GIBON, Y.; LYTOVCHENKO, A.; LOUREIRO, M. E.; FERNIE, A. R. Reduced expression of aconitase results in an enhanced rate of photosynthesis and marked shifts in carbon partitioning in illuminated leaves of wild species tomato. **Plant Physiol**, v. 133, n. 3, p. 1322-35, 2003.

CASPAR, T.; HUBER, S. C.; SOMERVILLE, C. Alterations in Growth, Photosynthesis, and Respiration in a Starchless Mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Deficient in Chloroplast Phosphoglucomutase Activity. **Plant Physiol**, v. 79, n. 1, p.11-7, 1985.

CORBESIER, L.; LEJEUNE, P.; BERNIER, G. The role of carbohydrates in the induction of flowering in *Arabidopsis thaliana*: comparison between the wild type and a starchless mutant. **Planta**, v. 206, p. 131-137, 1998.

COURTOIS-VERNIQUET, F.; DOUCE, R. Lack of aconitase in glyoxisomes and peroxisomes. **Biochem J**, v. 294, p. 103-107, 1993.

DASGUPTA, K.; KHADILKAR, A. S.; SULPICE, R.; PANT, B.; SCHEIBLE, W.; FISAHN, J.; STITT, M.; BRIAN, G. Ayre, Expression of Sucrose Transporter cDNAs Specifically in Companion Cells Enhances Phloem Loading and Long-Distance Transport of Sucrose but Leads to an Inhibition of Growth and the Perception of a Phosphate Limitation, **Plant Physiology**, v.165, n. 2, p. 715–731, 2014.

DAVIÈRE, J. M.; ACHARD, P. Gibberellin signaling in plants. **Development**, v. 140, n. 6, p. 1147-51, 2013.

DEBEAUJON, I.; KOORNNEEF, M. Gibberellin Requirement for *Arabidopsis* Seed Germination Is Determined Both by Testa Characteristics and Embryonic Abscisic Acid. **Plant Physiology**, v. 122, p. 415–424, 2000.

DISCHE, Z. Methods in carbohydrates chemistry. In: Whistler R, Kearsley MW (eds) *Methods in carbohydrates chemistry*, 2nd ed. **Academic Press**, New York, 478–512, 1962.

DOLFINI, D.; GATTA, R.; MANTOVANI, R.; NF-Y and the transcriptional activation of CCAAT promoters. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol**, v. 47, p. 29–49 2012.

ERIKSSON S. GA4 Is the Active Gibberellin in the Regulation of LEAFY Transcription and *Arabidopsis* Floral Initiation. **The Plant Cell Online**, v. 18, p. 2172–2181, 2006.

EVELAND, A. L.; JACKSON, D. P., Sugars, signalling, and plant development, **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n.9, p. 3367–3377, 2012.

GAZZANI, S.; GENDALL, A. R.; LISTER, C.; DEAN, C. Analysis of the molecular basis of flowering time variation in *Arabidopsis* accessions. **Plant Physiol**, v. 132, n. 2, p. 1107-14, 2003.

GOLDSCHMIDT, E. E.; HUBER, S. C. Regulation of photosynthesis by end-product accumulation in leaves of plants storing starch, sucrose, and hexose sugars. **Plant Physiol**. 1992

GROOT, S. P. C.; KARSSSEN, C. M. Gibberellins regulate seed germination in tomato by endosperm weakening: a study with gibberellin-deficient mutants. **Planta**, v. 171, p. 525–531, 1987.

HENDRIKS, J. H.; KOLBE, A.; GIBON, Y.; STITT, M.; GEIGENBERGER, P. ADP-glucose pyrophosphorylase is activated by posttranslational redox-modification in response to light and to sugars in leaves of *Arabidopsis* and other plant species. **Plant Physiology**, v. 133, n. 2, p. 838-849, 2003.

HEYER, A. G.; RAAP, M.; SCHROEER, B.; MARTY, B.; WILLMITZER, L. Cell wall invertase expression. at the apical meristem alters floral, architectural, and reproductive traits in *Arabidopsis thaliana*. **Plant J.** v. 39, n. 2, p. 161-9, 2004.

HISAMATSU, T.; KING, R.W. The nature of floral signals in *Arabidopsis*. II. Roles for FLOWERING LOCUS T (FT) and gibberellin. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, p. 3821–3829, 2008.

HOEBERICHTS, F. A.; VAN DOORN, W. G.; VORST, O.; HALL, R. D.; VAN WORDRAGEN, M. F. Sucrose prevents up-regulation of senescence-associated genes in carnation petals. **J Exp Bot**, v. 58, n. 11, p. 2873-85, 2007.

HOOKS, M. A.; ALLWOOD, J. W.; HARRISON, J. K. D.; KOPKA, J.; ERBAN, A.; GOODACRE, R.; BALK, J. Selective induction and subcellular distribution of ACONITASE 3 reveal the importance of cytosolic citrate metabolism during lipid mobilization in *Arabidopsis*. **Biochemical Journal**, v. 463, p. 309–317, 2014.

HOU, X.; ZHOU, J.; LIU, C. *et al.* Nuclear factor Y-mediated H3K27me3 demethylation of the *SOCL1* locus orchestrates flowering responses of *Arabidopsis*. **Nat Commun**, v. 5, p. 4601 2014.

HU, Z.; PLAXTON, W. C. Purification and Characterization of Cytosolic Pyruvate Kinase from Leaves of the Castor Oil Plant. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 333, p. 298–307, 1996.

KAISER, W. M.; WEINER, H.; HUBER, S. C. Nitrate reductase in higher plants: A case study for transduction of environmental stimuli into control of catalytic activity. **Physiol. Plant**, v. 105, p. 385–390, 1999.

KARIMI, M.; INZÉ, D.; DEPICKER, A. Gateway vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. **Trends Plant Sci.** v. 7, n. 5, p. 193-5, 2002.

KING, R. W.; HISAMATSU, T.; GOLDSCHMIDT, E. E.; BLUNDELL, C. The nature of floral signals in *Arabidopsis*. I. Photosynthesis and a far-red photoresponse independently regulate flowering by increasing expression of FLOWERING LOCUS T (FT). **J Exp Bot**, v.59, p. 3811–3820, 2008

KOCH, K. E. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**, v. 47, p. 509-540, 1996.

- LISEC, J.; SCHAUER, N.; KOPKA, J.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A. R. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. **Nature Protocols**, v. 1, p. 387–396, 2006.
- LU, M. Z.; SNYDER, R.; GRANT, J.; TEGEDER, M. Manipulation of sucrose phloem and embryo loading affects pea leaf metabolism, carbon and nitrogen partitioning to sinks as well as seed storage pools. **Plant J**, v. 101, n. 1, p. 217-236, 2020.
- Ludewig F, Sonnewald U, Kauder F, Heineke D, Geiger M, Stitt M, Müller-Röber BT, Gillissen B, Kühn C, Frommer WB. The role of transient starch in acclimation to elevated atmospheric CO₂. *FEBS Lett.* 1998 Jun 12;429(2):147-51.
- MILLER, G. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.
- MOEDER, W.; DEL POZO, O.; NAVARRE, D. A.; MARTIN, G. B.; KLESSIG, D. F. Aconitase plays a role in regulating resistance to oxidative stress and cell death in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*. **Plant Molecular Biology**, v. 63, p. 273–287, 2006.
- MOON, J.; SUH, S. S.; LEE, H.; CHOI, K. R.; HONG, C. B.; PAEK, N. C, et al. The SOC1 MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 35, p. 613–623, 2003.
- MURASE, K.; HIRANO, Y.; SUN, T. et al. Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor *GID1*. **Nature**, v. 456, p. 459–463, 2008.
- OLIVEIRA, R. R.; VIANA, A. J. C.; REÁTEGUI, A. C. E.; VINCENTZ, M. G. A. An efficient method for simultaneous extraction of high-quality RNA and DNA from various plant tissues. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, p. 18828-18838, 2015.
- OSUNA, D.; PRIETO, P.; AGUILAR, M. Control of Seed Germination and Plant Development by Carbon and Nitrogen Availability. **Front Plant Sci.** v. 18, n. 6, p. 1023, 2015.
- REEVES, P. H.; COUPLAND, G. Analysis of flowering time control in *Arabidopsis* by comparison of double and triple mutants. **Plant Physiology**, v. 126, p. 1085– 1091, 2001.
- ROLDÁN, M.; GÓMEZ-MENA, C.; RUIZ-GARCÍA, L.; SALINAS, J.; MARTÍNEZ-ZAPATER, J. M. Sucrose availability on the aerial part of the plant promotes morphogenesis and flowering of *Arabidopsis* in the dark. **Plant J**, v. 20, n. 5, p. 581-90, 1999.
- SIVITZ, A. B.; REINDERS, A.; JOHNSON, M. E.; KRENTZ, A. D.; GROF, C. P.; PERROUX, J. M.; WARD, J. M. *Arabidopsis* sucrose transporter *AtSUC9*. High-affinity transport activity, intragenic control of expression, and early flowering mutant phenotype. **Plant Physiol**, v. 143, n. 1, p. 188-98, 2007.
- SUN, T. P.; GUBLER, F. Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. **Annu Rev Plant Biol**, v. 55, p. 197-223, 2004.

TAKALA, H.; BJORLING, A.; BERNTSSON, O.; LEHTIVUORII, H.; NIEBLING, S.; HOERNKE, M.; KOSHELEVA, I.; HENNING, R.; MENZEL, A.; JANNE, A.; et al. Signal amplification and transduction in phytochrome photosensors. **Nature**, v. 509, p. 245–249, 2014.

TOGNETTI, J. A.; PONTIS, H. G.; MARTINEZ-NOEL, G. M. A. Sucrose signaling in plants. **Plant Signal Behav**, v. 8, n. 3, p. e23316, 2013.

TUAN, P. A.; KUMAR, R.; REHAL, P. K.; TOORA, P. K.; AYELE, B. T. Molecular Mechanisms Underlying Abscisic Acid/Gibberellin Balance in the Control of Seed Dormancy and Germination in Cereals. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, 2018.

WILSON, R. N.; HECKMAN, J. W.; SOMERVILLE, C. R. Gibberellin Is Required for Flowering in *Arabidopsis thaliana* under Short Days. **Plant Physiology**, v. 100, p. 403–408, 1992.

YANG, Z.; ZHANG, L.; DIAO, F.; HUANG, M.; WU, N. Sucrose regulates elongation of carrot somatic embryo radicles as a signal molecule. **Plant Mol Biol**, v. 54, n. 3, p. 441–59, 2004.

YEMM, E. W.; COCKING, E. C.; RICKETTS, R. E. The Determination of Amino Acids with Ninhydrin. **Analyst**, v. 80, p. 209–214, 1955.

YU, S.; GALVAO, V. C.; ZHANG, Y. C.; HERRER, D.; ZHANG, T. Q.; HAO, Y. H. et al. Gibberellin Regulates the *Arabidopsis* Floral Transition through miR156-Targeted SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE Transcription Factors. **The Plant Cell**, v. 24, p. 3320–3332, 2012

ZANANDREA, I.; ALVES, J. D.; DEUNER, S.; GOULART, P. F. P.; HENRIQUE, P. DE C.; SILVEIRA, N. M. Tolerance of *Sesbania virgata* plants to flooding. **Australian Journal of Botany**, 57, 661–669, 2010.

SUPLEMENTOS

Tabela 3: Pares de primers dos genes alvos e referências que foram usados no presente estudo

Genes	Primers	Pb	Comprimento
<i>AtFT</i>	F: ACCACCTGTTTGTTC AAGAT	18	150
	R: CCAAGCCATTAGTCACC	18	
<i>AtASOC1</i>	F: AGGAGAAAGCTCTAGCTGC	19	119
	R: GCTACTCTCTTCATCACCTCT	21	
<i>AtGA3ox2</i>	F: CTGGTTGATCCTCTCCAATC	20	142
	R: TCAAGAAATTCAGTCGGAAGAC	22	
<i>AtRGA1</i>	F: ATTCCAAGGTCGATTGTCCA	20	121

	R: GAGAAGCTCGTCGTC CAT	18	
<i>AtGAI2</i>	F: TGAAATGCTCAAACGGCG	18	87
	R: CGTTCTCCTGCGAGTCAA	18	
<i>AtAC01</i>	F: ATCACGGAGGGATTTTGC	18	135
	R: AAGTCATTCTCGTCCTCCT	19	
<i>AtAC02</i>	F: GCAAGGCTTTCTTCTTCCC	19	120
	R: GAGAGCCGAGGAGAAACT	18	
<i>AtAC03</i>	F: AACCGCTTCATCTTCCGC	18	125
	R: CGAGAAGAGACGACGGAGA	19	
<i>AtPUX7</i>	F: GTTTCTCAGACTATCAAAGCCA	22	120
	R: ATCAATTACAAGGACCACGG	20	
<i>AtTIP41</i>	F: GCAGCACAATGGAAATTCAGG	21	122
	R: GCCTCAACCGTTTCTTTGTC	20	

CAPÍTULO 5: PERSPECTIVAS FUTURAS

Atualmente, existem diversas culturas, como abacaxizeiro, cafeeiro e cana-de-açúcar, para as quais o florescimento pode significar um processo oneroso e/ou laborioso durante o manejo das lavouras. Desta forma, trabalhos que propõem soluções para os problemas que o florescimento promove em algumas culturas e possa promover aumento de produtividade são essenciais para comunidade acadêmica, científica, comercial e produtora. Os trabalhos com fundamentos básicos, como por exemplo os que foram desenvolvidos com a genética reversa utilizando as enzimas do ciclo TCA, podem se tornar o ponto de partida para que possa se utilizar a tecnologia já existente, com o objetivo de aumentar a produtividade das culturas com problemas durante a fase reprodutiva. Nesse contexto, sabendo qual enzima do ciclo do TCA pode acelerar ou retardar o florescimento, algumas decisões poderão ser tomadas, como por exemplo, qual o melhor momento para aplicar o produto comercial já existente e assim melhorar o manejo. Para isso, é necessária mais informação sobre o papel de cada enzima do ciclo TCA durante a fase reprodutiva em várias espécies. Após o real entendimento da função de cada enzima na indução do florescimento o próximo passo seria o estudo de quais produtos comerciais (Agroquímicos e/ou farmacêuticos) são capazes de promover alteração da atividade das enzimas do ciclo TCA *in vivo*. Em relação a esse assunto, atualmente, existem estudos apontando que alguns produtos comerciais possuem essa função, como por exemplo, peróxido de hidrogênio, fosfanato de succinil, óxido nítrico, dentre outros (Verniquet et al., 1991; Araújo et al., 2008; Gupta et al., 2012). Além disso, levando em consideração que fungos e plantas apresentam similaridade entre a maioria dos complexos proteicos presentes na CTE (Joseph-Horne et al., 2001; Millar et al., 2011; Grahl et al., 2012), seriam interessantes, estudos que investiguem se produtos agroquímicos como fungicidas e inseticidas que possuam como mecanismo de ação as mitocondriais, também interferem nessa organela em plantas. Sabendo-se da existência de produtos que possuam o potencial de promover alteração nas enzimas do ciclo TCA, o próximo passo seria o estudo de posicionamento e dosagem para melhorar a eficiência do produto. Desta forma, os problemas durante o florescimento de algumas culturas poderiam ser minimizados com tecnologias já existentes e, consecutivamente, reduzir os gastos com desenvolvimento de novas tecnologias para essa finalidade.