



MARK MELO MARTINS

**ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE DOIS GENES DA
FAMÍLIA MATE COM A TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM
TRÊS ESPÉCIES DE *Eucalyptus sp.***

**LAVRAS – MG
2025**

MARK MELO MARTINS

**ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE DOIS GENES DA FAMÍLIA MATE COM A
TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM TRÊS ESPÉCIES DE *Eucalyptus sp.***

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

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva
Orientador

**LAVRAS – MG
2025**

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

Martins, Mark Melo.

Associação da expressão de dois genes da família MATE com a tolerância ao
alumínio em três espécies de Eucalyptus sp. / Mark Melo Martins. - 2024.
67 p. : il.

Orientador: Luciano Vilela Paiva

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2024.
Bibliografia.

1. Biotecnologia vegetal. 2. Estresse abiótico. 3. qPCR. I. Vilela Paiva, Luciano.
II. Universidade Federal de Lavras. III. Título.

MARK MELO MARTINS

**ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE DOIS GENES DA FAMÍLIA MATE COM A
TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM TRÊS ESPÉCIES DE *Eucalyptus sp.***

**ASSOCIATION OF THE EXPRESSION OF TWO GENES FROM THE MATE
FAMILY WITH ALUMINUM TOLERANCE IN THREE SPECIES OF *Eucalyptus sp.***

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

APROVADO em 30 de agosto de 2024.

Dra. Giovana Esteves	UFLA
Prof. Dr. Breno Régis Santos	UNIFAL
Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva	UFLA

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva
Orientador

**LAVRAS - MG
2025**

*Dedico este trabalho a todos os seres
que estão trilhando um caminho
de encontrar a nota a ser
emitida na grande
orquestra do
Universo.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela oportunidade de experienciar as nuances da vida de um pesquisador aprendiz, que contribuiu em muito para o meu crescimento tanto pessoal como profissional.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal (PPGBV). Agradeço por disponibilizarem os recursos financeiros essenciais às necessidades da execução da pesquisa, onde foram comprados reagentes, kits e tudo que era necessário para a execução do estudo.

Agradeço à minha mãe, Jakilene Melo Martins por ter me proporcionado a oportunidade de crescimento e cuidados, resultando até este momento da minha vida. Agradeço também ao meu Pai, José Ribamar Cunha Martins, que mesmo já tendo partido da Terra contribuiu com ensinamentos e valores partilhados essenciais à constituição de quem tenho me tornado. Agradeço ao meu irmão Bruno e a Letícia por estarem próximos, me dando auxílio e possibilidades de conhecer outros mundos. Agradeço ao Caique, meu sobrinho, por sempre me ensinar a ver a vida com os olhos simples e amorosos da criança.

Agradeço ao professor Luciano Paiva, que foi o meu orientador nestes 2 anos e que acompanhou o meu desenvolvimento, buscando sempre me mostrar a vida de um pesquisador e também corrigindo erros que eu viria a ter. O seu entusiasmo por conhecer a Natureza e suas nuances é contagiante.

Agradeço ao Laboratório Central de Biologia Molecular da UFLA, que proporcionou a estrutura necessária para desenvolver a pesquisa e consequentemente a experiência. E quando me refiro a estrutura, não falo apenas de reagentes, equipamentos sofisticados e caros, também me refiro às pessoas. Estas, garantiram uma estrutura emocional proporcionando crescimento nos últimos 2 anos. Agradeço aos técnicos do laboratório: Ricardo Resende, Fabrício Lelis e Heliete Carvalho. Eles foram muito pacientes, consequentemente desenvolvemos uma amizade e pude aprender muito com as suas dedicações ao trabalho. Agradeço a atual coordenadora do programa Kalynka do Livramento, por sanar dúvidas processuais e por conversas descontraídas. Agradeço aos pós-doutorandos TÁCILA Marinho, Tallita Silva, Rafaeli Souza, Caroline Timóteo, Rafael de Oliveira, Gabriel Lasmar, Wesley Máximo, Giselly Alves e Giovana Esteves. Agradeço aos doutorandos e mestrandos que de alguma forma me auxiliaram com conversas produtivas e descontraídas: Ana Beatriz, Lorrana Flores, Elídio Pinto, Lara Oliveira, Jherson

Delgado, Samanda Lopéz, Carolina Bojáca, Lisseth Puentes, Cindy Montaña, Paloma Silva e Alisson Silva. Agradeço especialmente a dois ICs que são diferenciados e me ajudaram muito em várias etapas do processo: Wagner Henrique e Giovana Marques. Não posso deixar de agradecer especialmente a duas figuras já citadas, mas que foram de grande importância no desenvolvimento da pesquisa: Fabrício Lélis e Giovana Esteves, ambos me acompanharam em todo o processo, mas especialmente na fase final ajudaram a esclarecer muitas coisas assim como executar várias análises, sempre com paciência e esclarecendo a importância de ser organizado e precavido.

Agradeço a pessoas que conheci, valendo muito a pena, e que me influenciaram indiretamente na pesquisa: Matheus Lopes, Akiiany Anderson, Igor Carvalho, Julianne Bezerra, Giovani Paludo, Raniela Dalmaso, Eduardo Augusto, Ramon Machado, Guilherme Augusto, Gabriela Ferraz, Everaldo José, Miguel Carvalho, José Carlos, Gabriel Mesquita, Christian Carvalho, Rafaella da Paz, Sara Carvalho, Raul Marques, Jaime Netto, Mariana Brando, Helena Viana, Rodrigo Vimieiro, Poliana Alves, Ana Costa, Davi Costa, Gustavo Cherubim, Milena Santos.

Agradeço especialmente à Ana Luiza (E Família), Giovana Zanúncio, Fernanda de Oliveira, Giovana Esteves, Lorrana Flores, Lucas Laboissie're e Wagner Henrique.

Gostaria de agradecer especialmente aos meus companheiros de jornada, que mesmo separados pelo espaço, os reais sentimentos continuaram a nos ligar. Valeu Lucas Teng, Andrey Coelho, Giovanna Medeiros, Raphael Rodrigues, Emilly Bastos, Larissa Batista (E família), Daniel Jun, Thainá Souza e Jeanni Velozo.

*“Não te esqueças, porém
De que amanhã será um outro dia.”*

Meimei

RESUMO

O eucalipto é uma cultura de grande importância para o mercado, pois sua madeira processada abastece diversas cadeias produtivas, como papel e celulose, carvão e energia, e movelaria. Todavia, algumas espécies são afetadas por altas concentrações de alumínio livre presente no solo, reduzindo a produtividade. Uma das principais limitações do solo é a presença de alumínio tóxico, que fica disponível para as plantas em solos com pH abaixo de 5. Nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil, onde a maioria dos plantios de eucalipto ocorrem, esse problema é comum devido à acidez dos solos. Existe uma família de genes chamada *Multidrug and Toxic Compound Extrusion* (MATE), que inclui um grupo de proteínas responsáveis pela exsudação de ácidos orgânicos nas raízes. Essas proteínas são capazes de liberar ácidos orgânicos, como malato e citrato, capazes de quelar o alumínio fitotóxico e reduzir seus efeitos negativos nas plantas. Diante disso, o objetivo deste estudo foi investigar e comprovar a relação entre dois genes da família MATE e a exsudação de citrato em três espécies de eucalipto com diferentes níveis de tolerância ao Al^{3+} . Para isso, sementes foram germinadas *in vitro* e após 60 dias as plântulas de *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus urophylla* e *Eucalyptus dunnii* foram expostas a meios líquidos contendo 2mM de Al^{3+} para estimular a produção de citrato e a ativação dos genes associados a essa resposta fisiológica. Foram coletadas alíquotas do meio líquido para análise por *High Performance Liquid Chromatography - Diodearray Detector* (HPLC-DAD) e o método enzimático de detecção de citrato utilizando o Kit MAK333 da Sigma-Aldrich®. As raízes foram coletadas, passando pela extração do RNA total, posteriormente foi realizado o tratamento com DNase para remoção do DNA genômico, em seguida executou-se a síntese de cDNA e finalmente o teste de eficiência dos *primers* para realização da qPCR. Por problemas pontuais no decorrer do experimento, como não conseguir extrair RNA com bons índices de qualidade a partir de amostras de raízes, não foi possível a realização de uma análise de qPCR confiável, a qual demonstraria a expressão dos genes na condição estressante. Enquanto a quantificação da liberação de citrato no meio, o método enzimático falhou devido a alguma interferência do meio que os explantes estavam, como o pH ou algum componente, o Al^{3+} por exemplo. Porém, o método via HPLC funcionou para detecção das concentrações de citrato do meio, mas os resultados não apresentaram variação estatística. Logo, não foi possível comprovar a associação dos genes candidatos da família MATE com a tolerância ao Al^{3+} , porém foram listados os principais entraves a serem observados ao realizar pesquisas semelhantes, a fim de evitar os mesmos problemas.

Palavras-chave: biotecnologia vegetal; estresse abiótico; qPCR.

ABSTRACT

Eucalyptus is a crop of great importance to the market, as its processed wood supplies various production chains, such as paper and cellulose, charcoal and energy, and furniture. However, some species are affected by high concentrations of free aluminum present in the soil, reducing productivity. One of the main soil limitations is the presence of toxic aluminum, which becomes available to plants in soils with a pH below 5. In the Midwest, Southeast, and South regions of Brazil, where most eucalyptus plantations are located, this problem is common due to soil acidity. There is a family of genes called Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE), which includes a group of proteins responsible for the exudation of organic acids in the roots. These proteins can release organic acids, such as malate and citrate, which can chelate phytotoxic aluminum and reduce its negative effects on plants. Given this, the aim of this study was to investigate and demonstrate the relationship between two genes from the MATE family and citrate exudation in three species of eucalyptus with different levels of tolerance to Al^{3+} . For this purpose, seeds were germinated in vitro, and after 60 days, the seedlings of *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus urophylla*, and *Eucalyptus dunnii* were exposed to liquid media containing 2mM of Al^{3+} to stimulate citrate production and the activation of genes associated with this physiological response. Samples of the liquid medium were collected for analysis by High Performance Liquid Chromatography - Diode Array Detector (HPLC-DAD) and the enzymatic method for citrate detection using the Sigma-Aldrich® MAK333 Kit. The roots were collected, and total RNA was extracted, followed by DNase treatment to remove genomic DNA, cDNA synthesis, and primer efficiency testing for qPCR. Due to specific issues during the experiment, such as not being able to extract RNA with good quality indices, qPCR analysis, which would demonstrate gene expression under stressful conditions, was not possible. The enzymatic method for quantifying citrate release in the medium failed due to some interference from the medium where the explants were, such as pH or some component, Al^{3+} for example. However, the HPLC method worked, with some obstacles, to detect citrate concentrations in the medium, but the results did not show statistical variation. Therefore, it was not possible to prove the association of the candidate genes from the MATE family with Al^{3+} tolerance. However, the main points to be observed when conducting similar research were listed to avoid the same problems.

Keywords: plant biotechnology; abiotic stress; qPCR.

INDICADORES DE IMPACTO

A pretensão inicial deste estudo seria desenvolver comprovações científicas que contribuíssem para o melhoramento do eucalipto em frente à fitotoxicidade do alumínio. Porém, com os resultados alcançados, este estudo colabora para evitar ações que comprometam pesquisas cuja metodologia seja análoga. Com isso, reduzindo custos de futuros testes e promovendo maior assertividade na execução de outras pesquisas referentes a essa temática. O estudo se enquadra no 15º Objetivo de Desenvolvimento Sustentável da Organização das Nações Unidas, relacionado à Vida Terrestre. Caso este estudo venha a motivar projetos de extensão universitária, relacionados à Política Nacional de Extensão da UFLA, o projeto se enquadraria na 5ª temática, referente ao Meio Ambiente. Como sugestão de projetos de extensão, a criação de grupos responsáveis por ações de disseminação de conhecimento a respeito dos efeitos da acidez do solo para plantios florestais, e como eles têm reflexo na vida cotidiana da sociedade, consequentemente ampliando a problemática para além do campo.

IMPACT INDICATORS

The initial aim of this study was to develop scientific evidence that would contribute to the improvement of eucalyptus in the face of aluminum phytotoxicity. However, with the results achieved, this study helps to prevent actions that compromise research with analogous methodologies. This, in turn, reduces the costs of future tests and promotes greater accuracy in the execution of other research related to this topic. The study aligns with the 15th Sustainable Development Goal of the United Nations, related to Life on Land. If this study inspires university extension projects, according to the themes of the National Extension Policy of UFLA, the project would fall under the 5th theme, related to the Environment. As a suggestion for extension projects, the creation of groups responsible for disseminating knowledge about the effects of soil acidity on forest plantations and how they impact the daily life of society, consequently expanding the issue beyond the field.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mapa de aptidão de solos de Minas Gerais.....	20
Figura 2 - Metabolismo de morte celular induzida por	21
Figura 3 - Metabolismo de resistência da célula vegetal ao	23
Figura 4 - Associação de transportadores MATE com H ⁺ -ATPase.	25
Figura 5 - Pipeline de prospecção de genes candidatos da família MATE de <i>E. grandis</i>	27
Figura 6 - Árvore filogenética de transportadores da família MATE em <i>E. grandis</i>	28
Figura 7- Estrutura tridimensional da CasMATE1 de <i>Camelina sativa</i>	30
Figura 8 - Ilustra o processo básico da espectrofotometria.	32
Figura 9 - Representação do processo na primeira adaptação de enraizamento de <i>E. dunnii</i> . .	39
Figura 10 - Ilustração da parede polimérica com a fase reversa AW.....	41
Figura 11 - Ilustração do funcionamento ideal do cartucho de SPE para concentração de citrato.	42
Figura 12 - Etapas de lavagens da coluna Strata-X-AW.....	43
Figura 13 - Concentração de citrato em decorrência da exposição ao Alumínio.	45
Figura 14 - Condutividade elétrica (CE) em decorrência da exposição ao Alumínio.....	47
Figura 15 - pH em decorrência da exposição ao Alumínio.	47
Figura 16 - Eletroforese em gel das amostras do tratamento 1 (30min de exposição ao Al ⁺³).49	
Figura 17 - Tratamento do RNA extraído de <i>E. dunnii</i> com DNase.	51
Figura 18 – Curva de <i>melting</i> de todos os genes.	53
Figura 19 – Plotagem da amplificação de todos os genes.	54
Figura 20 – Concentração de citrato em µM por cada espécie e tratamento.....	56
Figura 21 – Curva padrão para determinação de ácido cítrico.	57
Figura 22 - Imagem do teste enzimático analisado no espectrofotômetro.	57
Figura 23 - Suposição de como o Al(OH) ₃ adsorve o Ácido Cítrico.	58
Quadro 1 - Informações sobre os primers.....	38
Quadro 2 - Média da concentração de RNA não tratado, razões 260/280 e 260/30 de cada amostra.....	50
Quadro 3 - Métricas de qualidade do teste de eficiência dos primers.	55

LISTA DE ABREVIATURAS

Al	Alumínio
AlCl ₃	Cloreto de Alumínio
Ca	Cálcio
Ca(NO ₃) ₂	Nitrato de cálcio
H	Hidrogênio
Mg	Magnésio
O	Oxigênio

LISTA DE SIGLAS

ALMT	Aluminum-Activated Malate Transport Protein
ART1	Al Resistance Transcription Factor
cDNA	DNA complementar
Ct	Ciclo de <i>threshold</i>
ELISA	Enzyme-Linked ImmunonoSorbent Assay
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IBÁ	Indústria Brasileira de Árvores
MATE	Multidrug and Toxic Compound Extrusion
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OA	Ácidos Orgânicos
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
ONU	Organização das Nações Unidas
PCR	Polymerase Chain Reaction
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
SiBCS	Sistema Brasileiro de Classificação de Solos
STAR	Sensitive To Al Rhizotoxicity
TCA	Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (Ciclo de Krebs)
TUB	Tubulina
UBQ	Ubiquitina
$\Delta\Psi_m$	Potencial Eletroquímico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1	Eucalipto: origem, aspectos econômicos e biológicos	18
2.2	Estresse fisiológico devido à alta concentração de alumínio no solo.....	19
2.3	Aspectos biológicos da fitotoxicidade do Al^{+3}	20
2.4	Prospecção de genes sensíveis ao estresse de alumínio.....	25
2.5	Genes da família MATE.....	29
2.6	PCR em tempo real (qPCR) e High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	30
2.7	Espectrometria	31
3	MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1	Cultivo <i>in vitro</i>	34
3.2	Meio com Al^{3+}	34
3.3	Ensaio de quantificação de citrato	34
3.4	Ensaio de expressão gênica	35
3.4.1	Extração de RNA	35
3.4.2	qPCR.....	36
3.5	Enraizamento de <i>E. dunnii</i>	38
3.5	Purificação do meio para análise em HPLC	40
3.5.1	Estudo para purificação do citrato	40
3.5.2	Tratamento com o cartucho SPE Strata-X-AW	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.2	Análise físico-química do meio	45
4.3	Análise de expressão dos genes de interesse	48
4.3.1	Extração de RNA	48
4.3.2	Tratamento com DNase.....	51
4.3.3	Síntese de cDNA e qPCR.....	52
4.4	Quantificação de Citrato	55
4.4.1	Método enzimático.....	55
4.4.2	Coloides que adsorvem citrato	58
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
	REFERÊNCIAS.....	60
	APÊNDICE	64

1 INTRODUÇÃO

O eucalipto é da família Myrtaceae e nativo de regiões da Oceania. Começou a ser introduzido no Brasil na primeira metade do século XIX no jardim botânico do Rio de Janeiro (Castro *et al.*, 2016), e se adaptou muito bem devido às condições edafoclimáticas parecidas de sua origem. Na metade do século XX, a demanda por produtividade da madeira de eucalipto começou a aumentar, sendo necessário o desenvolvimento de tecnologias capazes de melhorar a sua produtividade (Gonçalves, 2019). Atualmente, a eucaliptocultura faz parte da cadeia produtiva de papel e celulose, carvão e energia, movelaria.

No Brasil, o Estado com maiores florestas plantadas de eucalipto é Minas Gerais, com 2,2 milhões de ha (IBÁ, 2022) e a maioria dos solos mineiros são acidificados devido a um grau elevado de intemperismo (Silva, 2018). Os solos ácidos tendem a possuir elevados níveis de íons de Al^{3+} e Fe^{2+} , que podem interagir com as plantas de forma fitotóxica diminuindo a sua produtividade (Yamamoto, 2018). Devido a isso, a calagem tornou-se a alternativa mais comum para lidar com essa limitação, reduzindo a acidez e consequentemente elevando a produtividade.

A biotecnologia vegetal é uma área que pode contribuir com possíveis soluções a esta problemática, pois permite a realização de alterações significativas e pontuais nas plantas, mitigando o efeito de muitos estresses. Estudos sobre genes associados à resistência e à seca são um exemplo (Munaweera *et al.*, 2022). Para utilizar técnicas biotecnológicas que contribuam com o melhoramento é necessário o reconhecimento prévio dos genes ligados à resistência. Essa etapa pode ser feita utilizando análises *in silico* inicialmente e posteriormente análises de bancada para comprovação dos resultados encontrados computacionalmente.

Sabe-se que os organismos possuem uma família de genes chamada: *Multidrug and Toxic Compound Extrusion* (MATE) (Claxton *et al.*, 2021). Esta família é constituída de proteínas transmembranares responsáveis por transportar substâncias essenciais ao funcionamento celular, e um grupo específico dessa família está relacionado com a exsudação de citrato. Este composto orgânico está presente em uma rota de tolerância ao Al^{3+} realizada pela raiz de plantas sob estresse (Kochian *et al.*, 2015).

Em um estudo realizado por nosso grupo de pesquisa (Cardoso, 2018), foi feita a busca de genes candidatos da família MATE para *E. grandis*. Neste estudo, por meio de análises bioinformáticas, foram encontrados dois genes ligados à exsudação de citrato e por conseguinte à tolerância de Al^{3+} , porém ainda não comprovados por experimentos laboratoriais desta associação.

Logo, o objetivo da pesquisa consistiu em investigar a expressão dos genes descobertos por análises bioinformáticas por Cardoso (2018) em três espécies de eucalipto: *Eucalyptus grandis*, por ser mais suscetível ao estresse por Al^{3+} ; *Eucalyptus urophylla*, pois é menos suscetível ao estresse por Al^{3+} e *Eucalyptus dunnii*, que possui grau de suscetibilidade mediana ao estresse por Al^{3+} , comparado aos anteriores (Silva *et al.*, 2004).

Para atingir esse objetivo, inicialmente, as plantas foram avaliadas em diferentes períodos de exposição ao Al^{3+} . Em seguida, foi realizada a análise da expressão dos genes candidatos para determinar como eles respondem ao estresse induzido pelo alumínio. Por fim, foi avaliada a liberação do ácido orgânico citrato para o meio, uma vez que a exsudação de citrato é um mecanismo conhecido de tolerância ao alumínio em algumas plantas. Esses passos são cruciais para compreender melhor os mecanismos genéticos e fisiológicos que conferem tolerância ao Al^{3+} , podendo contribuir para o desenvolvimento de plantios florestais mais resistentes à solos ácidos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Eucalipto: origem, aspectos econômicos e biológicos

O aumento da exploração de madeira está associado ao início da revolução industrial, pois a frente de desenvolvimento e da produção exigia fontes de energia, construção de ferrovias e navios para o escoamento dos produtos. Então, a madeira era transformada em carvão para siderurgia, dormentes de ferrovia e combustíveis de navios. Com o passar dos anos, mudanças sociais, ambientais e na forma de produção ocorreram, influenciando na maneira de obtenção da madeira, que estava começando a ficar escassa e ocorrendo o aumento das pressões sociais e ambientais sobre as práticas exploratórias (Gonçalves, 2019).

Na década de 1940, os preços da polpa de celulose apresentaram-se elevados, pressionando o surgimento de uma alternativa para a sua extração. Na década seguinte, Japão, China e África do Sul começaram a utilizar madeira de coníferas para a comercialização de celulose. Porém, somente na década de 1960 a tecnologia se refinou e foi encontrada no eucalipto uma promissora fonte de polpa de celulose, além de possibilitar redução no tempo de colheita de 30 anos (coníferas) para 7 anos (eucaliptos). Neste momento, países que possuíam condições edafoclimáticas parecidas às da Austrália e outros países da Oceania ganharam evidência, como Brasil, Portugal, Espanha, França e Índia (Gonçalves, 2019).

No Brasil, os planos desenvolvimentistas que começaram a surgir no governo de Juscelino Kubitschek impulsionaram o crescimento da eucaliptocultura no país, todavia, o governo de Ernesto Geisel desenvolveu estratégias para tornar o país um grande produtor, promovendo empréstimos e incentivando os produtores (Gonçalves, 2019).

Segundo a Indústria Brasileira de Árvores (IBÁ), nos últimos anos, a produção de madeira serrada foi em torno de 8 milhões de m³, 7 milhões de toneladas de carvão vegetal em 2022, em que 6,9 milhões de toneladas foram obtidas de florestas plantadas. Em 2022, o Brasil produziu cerca de 25 milhões de toneladas de celulose e 11 milhões de toneladas de papel. Foi o maior exportador de celulose, faturando 8,4 bilhões de dólares. Em 2022 o Brasil possuía 7,6 milhões de hectares de áreas plantadas com eucalipto, a região sudeste liderando o ranking com 46% dessas áreas, e o Estado de Minas Gerais possuindo 2,2 milhões de hectares (IBÁ, 2023).

Alternativas sustentáveis para o manejo florestal e o avanço da ciência para proteção das florestas liga-se diretamente ao pensamento de futuro e sustentabilidade, junto aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Organização das Nações Unidas (ONU). As ODS são um plano de ação dentro da Agenda pós-2015 a fim de promover sociedades

pacíficas e inclusivas, proteger o planeta, eliminar a pobreza extrema e a fome, assim como garantir educação de qualidade ao longo da vida. São 17 objetivos considerados audaciosos, mas possíveis se cada país colaborar com a sua parte.

2.2 Estresse fisiológico devido à alta concentração de alumínio no solo

Plantios de eucalipto são afetados pelo alumínio presente em solos ácidos. Atualmente Minas Gerais é o Estado que possui a maior silvicultura dessa espécie, apesar da maioria dos solos mineiros serem ácidos.

O Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (SiBCS) possui muitas categorias e subcategorias de solos, dentre elas Minas Gerais detém 13 classes (Silva *et al.*, 2018), sendo as de maior ocorrência os latossolos vermelho-amarelos, latossolos vermelhos e cambissolos háplicos (EMBRAPA, 2004).

Segundo o SiBCS, os latossolos são caracterizados pela presença do horizonte B latossólico. Este é marcado por forte intemperização da rocha de origem e dos minerais primários e secundários menos resistentes. Nesse processo, argilominerais mais resistentes, óxidos e/ou hidróxidos de ferro e alumínio se concentram nestes solos. O processo de formação deste horizonte se chama latolização/ferralitização. Com o aumento da concentração de argila de baixa troca de cátions, característico de latossolos (Camacho *et al.*, 2021), o pH começa a ficar mais ácido. O mineral de origem influencia na cor do solo formado, a goethita com cores bruno-amareladas e hematita com cores avermelhadas (Kampf *et al.*, 2015).

O SiBCS (2018) elucida que os cambissolos possuem características diversas, contendo horizonte superficial, seguido de um horizonte B incipiente, com características insuficientes para ser enquadrado como: Vertissolos, Chernossolos, Plintossolos e Organossolos. São muito parecidos com os latossolos, porém possuem diferenças específicas. Dependendo do tipo de cambissolo, possuem alta ou baixa capacidade de troca de cátions.

A acidez no solo provoca a redução da produtividade, e para mitigar seus efeitos, utiliza-se métodos para modificar o pH destes. Em um estudo feito por Cravo; Smyth; Brasil (2012) avaliando a influência do calcário e seu efeito residual em culturas de milho e feijão-caupi, obtiveram o resultado associativo da maior produção das culturas com maior índice Ca e Mg.

Latossolos e Cambissolos naturais possuem baixa fertilidade, mas sua aptidão agrícola pode ser relacionada com a silvicultura, agricultura e pecuária, dependendo dos tratamentos realizados e tecnologias aplicadas (Menezes *et al.*, 2009). Como mostrado na figura 1, Minas Gerais possui aptidão agrícola considerável, porém baixa para silvicultura, representada pelos

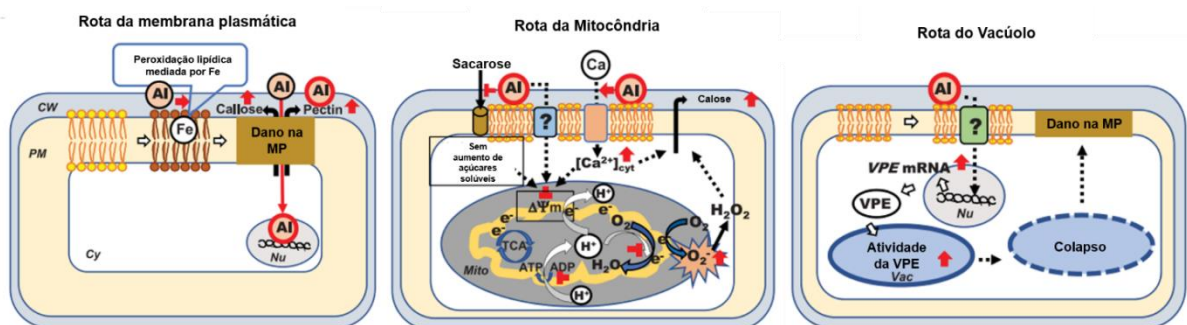
macronutrientes essenciais: o Ca^{+2} e o Mg^{+2} . Esta competição reduz a eficiência de absorção destes nutrientes (Shetty *et al*, 2021; Kochian *et al*, 2015).

Após começar a ser absorvido pelas células radiculares, os efeitos fitotóxicos se iniciam. Por ser um elemento muito reativo na forma iônica, ele afeta várias regiões da célula e a exposição prolongada pode levar à morte celular. Ao interagir com as células, o primeiro contato é realizado com a parede celular, que é constituída de polissacarídeos passíveis de interação com o Al^{3+} . Dentre os polissacarídeos, as pectinas possuem cargas negativas, tendo uma interação elétrica, enquanto as hemiceluloses adsorvem o Al^{3+} por serem neutras e não possuírem carga. Estes carboidratos são controlados por enzimas responsáveis pela manutenção, desenvolvimento e crescimento da parede celular, como as expansinas, pectinas e metilesterases, etc. Estas enzimas podem ter sua função afetada pela presença do Al^{3+} o que prejudica o processo de alongamento celular (Kochian *et al*, 2015).

A membrana plasmática (MP) também interage com o Al^{3+} , podendo gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) e sofrer a despolarização (Matsumoto, 2000; Illés *et al*, 2006). A MP possui proteínas que transportam o Al^{3+} para dentro da célula, como Nr1 e NIP (Kochian *et al.*, 2015). O Al^{3+} também pode chegar na mitocôndria, vacúolo e atingir o DNA, interagindo com os fosfatos da sua estrutura e causando mudanças em sua organização e estrutura, consequentemente prejudicando a divisão celular (Yamamoto, 2018; Matsumoto, 2000).

O principal dano causado na MP é a peroxidação lipídica, em que o Al^{3+} liga-se aos fosfolipídios, mudando a sua estrutura e também a tornando mais suscetível ao Fe^{+3} (Figura 2). Essa peroxidação gera o rompimento da MP em alguns pontos, aumentando o nível de calose nessas regiões (Yamamoto, 2018), que é um polissacarídeo comumente produzido em resposta à danificação da parede celular, funcionando como uma proteção à integridade celular e entrada de patógenos.

Figura 2 - Metabolismo de morte celular induzida por Al^{3+} .



Fonte: Adaptado de Yamamoto, 2018.

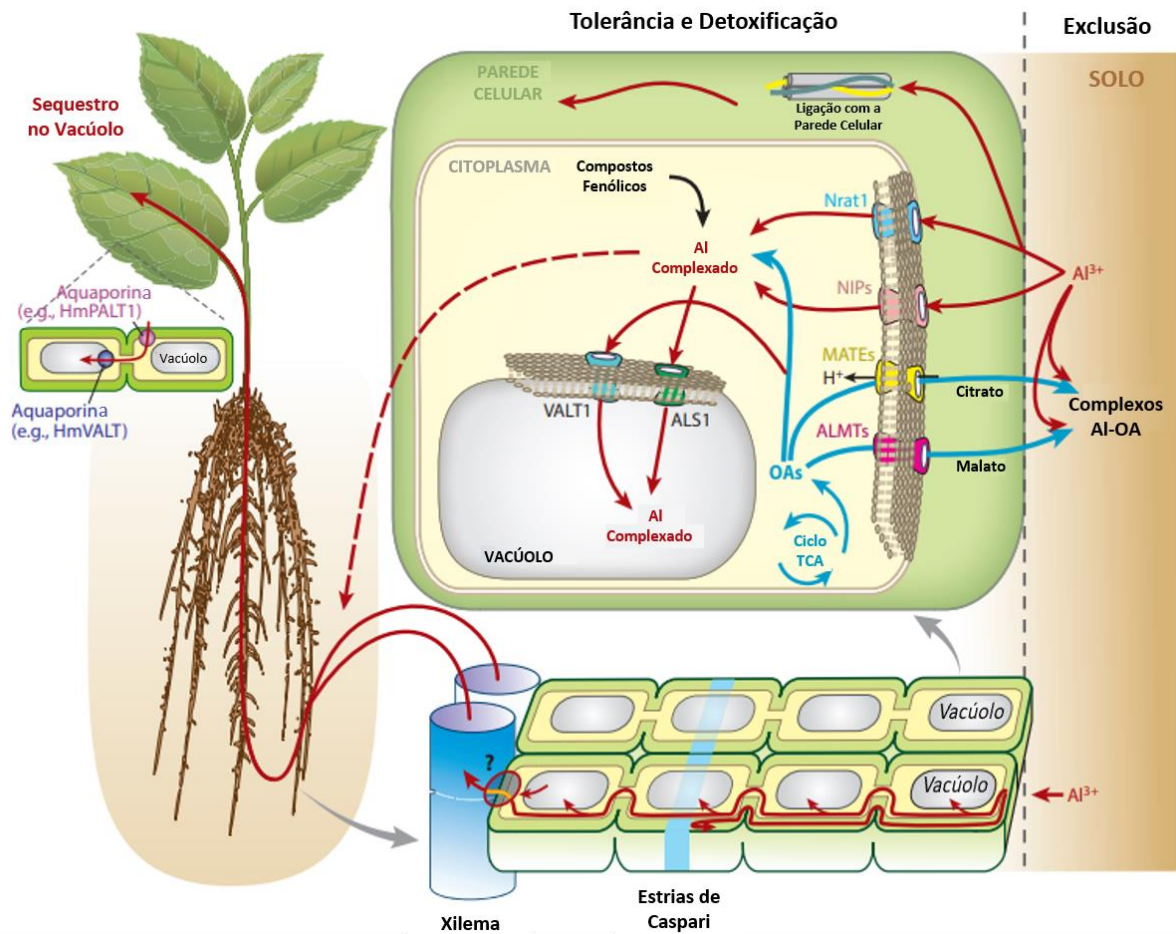
Na mitocôndria, o Al^{3+} causa disfunção mitocondrial, levando à morte celular (Figura 2). Inicialmente, o aumento de Al^{3+} ao redor da membrana plasmática (MP) bloqueia os canais de cálcio e prejudica a entrada de sacarose. Com a entrada do Al^{3+} no citosol, ocorre uma alteração do pH citoplasmático e uma mudança no potencial eletroquímico $\Delta\Psi_m$. Essa mudança resulta em alterações estruturais na mitocôndria, influenciando na cascata de sinalização que resulta no aumento de Ca^{+2} no citoplasma e na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como ânions superóxidos (O_2^-). Com o tempo, ocorre inibição da respiração, esgotamento de ATP e aumento na produção de ROS (Yamamoto, 2018).

Outro dano percebido causado pelo Al^{3+} no interior da célula é o colapso vacuolar, que ocorre devido ao aumento da atividade da enzima de processamento vacuolar (VPE), comumente ligada a estresses de diversas naturezas, além de contribuir para a atividade de caspases. Com a entrada de Al^{3+} no citoplasma existem sinalizadores que aumentam a expressão do gene das VPEs, que colapsam o vacúolo (Yamamoto, 2018).

Portanto, os principais prejuízos do Al^{3+} para as plantas são: Inibição do alongamento da raiz, redução de biomassa, deposição de calose e lignina no ápice radicular, disfunção da membrana plasmática e parede celular, formação de ROS, desequilíbrio de Ca^{+2} nas rotas de transdução e inibição de respiração nas mitocôndrias (Shetty *et al.*, 2021).

Existem mecanismos desenvolvidos por algumas plantas para tolerar e resistir ao Al^{3+} tóxico (Figura 3). Atualmente sabe-se que a parte mais afetada e responsiva a este estresse é o ápice radicular, que consiste na coifa, zonas de transição e meristema (Matsumoto, 2000). Os mecanismos consistem em reduzir a quantidade de Al^{3+} no citoplasma ou liberar Ácidos Orgânicos (OA) para a solução do solo para quelar o Al^{3+} em potencial de ser absorvido pela célula (Kochian *et al.*, 2015).

Figura 3 - Metabolismo de resistência da célula vegetal ao Al^{3+} .



Fonte: Kochian *et al.*, 2015.

A acumulação de Al^{3+} é também observada em plantas que desenvolveram mecanismos de tolerância. Como demonstrado no esquema da figura 3, a planta absorve o Al e transporta-o para outros tecidos, sendo internalizado nos vacúolos foliares por proteínas da família das aquaporinas como a HmPALT1 (Kochian *et al.*, 2015).

O mecanismo que utiliza os ácidos orgânicos para quelar o Al^{3+} do ambiente é comum à maioria das plantas. As mais resistentes são aquelas que possuem este mecanismo melhor desenvolvido, principalmente quanto a velocidade de resposta e quantidade de OAs exsudados.

O Al^{3+} chega no citoplasma via transportadores, como Nramps e NIPs. Assim, ocorrem várias alterações no citosol, que culminam com a ativação e produção de mais proteínas transportadoras de OAs, principalmente da família *Multidrug and Toxic Compound Extrusion* (MATE) e *Aluminum-Activated Malate Transport Protein* (ALMT). O aumento do nível de expressão desses genes é mediado por fatores de transcrição como STOP1 e ASR5 (Kochian *et al.*, 2015). Existem outras proteínas importantes associadas ao processo de sensibilidade das

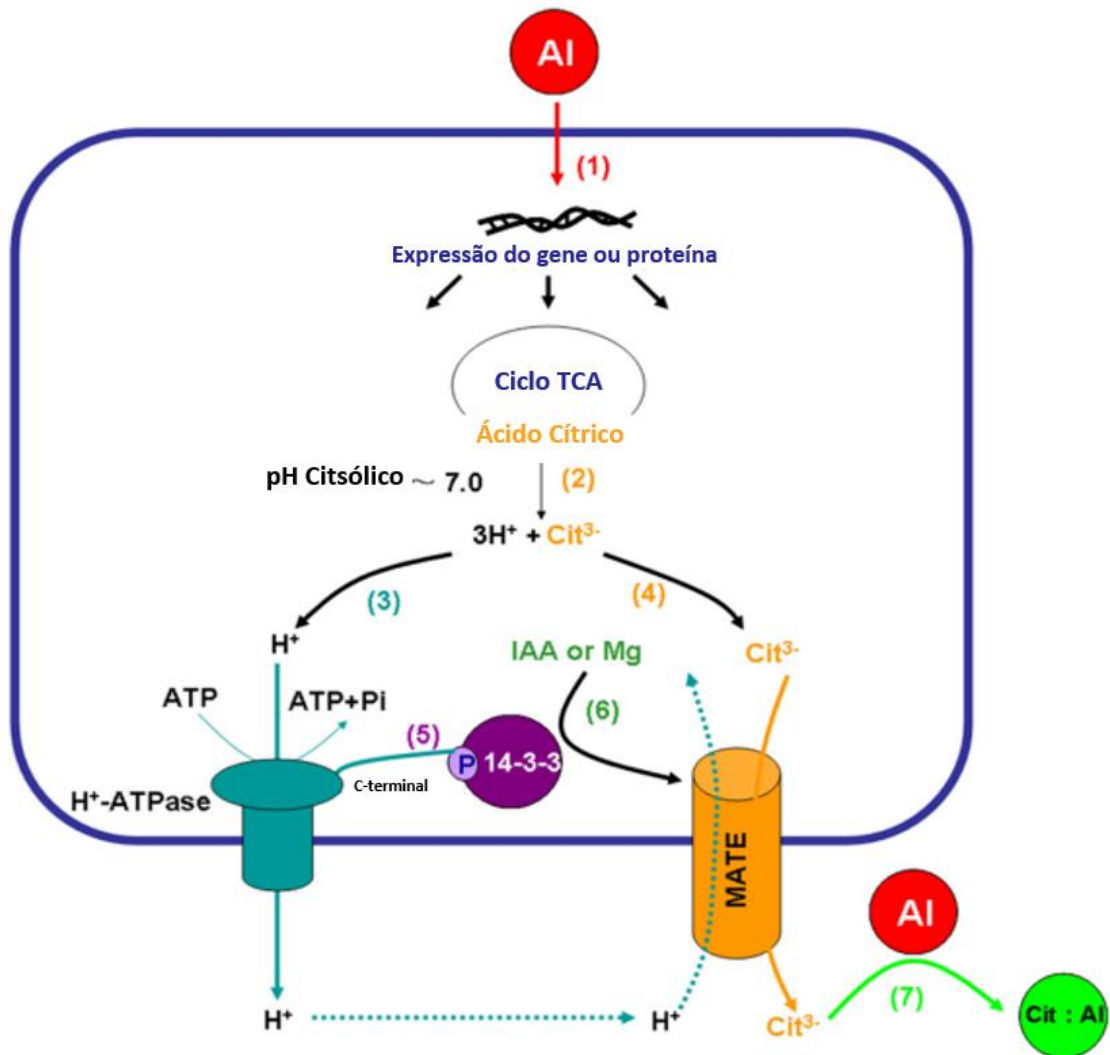
células ao Al^{3+} , como alguns fatores de transcrição *Al Resistance Transcription Factor* (ART1) e *Sensitive To Al Rhizotoxicity*, sendo STAR1 e STAR2 (Chai; Schachtman, 2022).

Os OAs mais comuns relacionados à função de quelar o Al^{3+} são: citrato, malato e oxalato. Destes, o citrato é o mais efetivo por possuir uma estrutura tricarboxílica, enquanto malato e oxalato são dicarboxílicos. As mudanças estruturais nos OAs, influenciam no custo de carbono que a célula precisa utilizar para realizar a realocação destes compostos para combater o estresse, os quais são realocados principalmente do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, conhecido também como ciclo de Krebs (TCA) (Kochian *et al.*, 2015).

O malato é liberado por proteínas da família ALMT, que são do tipo canal, enquanto o citrato é liberado por proteínas da família MATE, carreadores antiporte conferindo a entrada de íons H^+ para o interior celular. As plantas que possuem maior resistência ao Al^{3+} , tendem a absorver menores quantidades do íon. Existe também a liberação de compostos fenólicos e baixas quantidades que também influenciam no processo de quelação (Matsumo, 2000; Kochian *et al.*, 2004; Kochian *et al.*, 2015).

As proteínas da família MATE relacionadas com a exsudação de citrato possuem uma interação com as H^+ -ATPases. Como mostrado na figura 4, ao entrar na célula o Al^{3+} induz cascatas de sinalização e uma delas influencia na dissociação do ácido cítrico em citrato e íons de H^+ . Estes servirão como substrato para a H^+ -ATPase, alterando o potencial eletroquímico da membrana, pelo processo de despolarização (Plantas suscetíveis) ou hiperpolarização (Plantas resistentes), criando o ambiente químico ideal para a liberação de citrato e entrada de íons H^+ , contribuindo para o equilíbrio eletroquímico da membrana (Zhang *et al.*, 2017).

Figura 4 - Associação de transportadores MATE com H⁺-ATPase.



Fonte: Zhang *et al.*, 2017.

O processo de morte celular e resistência ou tolerância do Al³⁺ ocorre levando em consideração o tempo de exposição da planta ao estresse, que está diretamente ligado à velocidade de percepção e possibilidade de resposta a este. Os principais efeitos visíveis causados pela fitointoxicação de Al, são: retardo no crescimento; amarelamento das pontas das folhas ou folhas completas e do caule, morte de tecidos apicais e enrolamento das folhas (Shetty *et al.*, 2021).

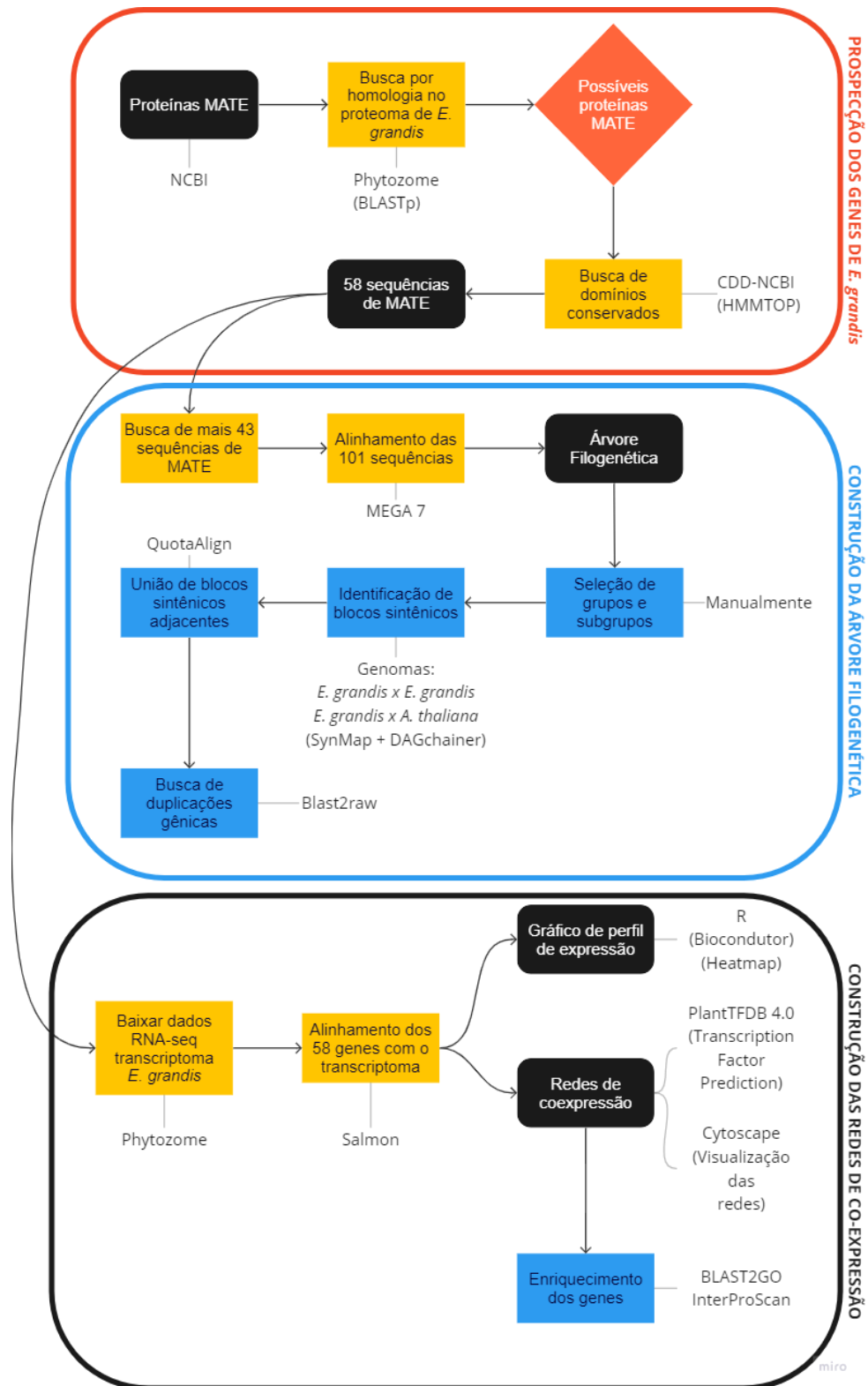
2.4 Prospecção de genes sensíveis ao estresse de alumínio

A pesquisa de genes candidatos consiste na aplicação de técnicas de bioinformática para encontrar genes relacionados a algum metabolismo de interesse, contribuindo para diferentes áreas relacionadas à espécie estudada, como na resistência a doenças (Zhang *et al.*, 2021). Os

genes candidatos de *E. grandis* foram prospectados por análises de bioinformática realizadas por Cardoso (2018), produzindo uma árvore filogenética da família MATE, análises do perfil de expressão e enriquecimento de genes. Inicialmente buscaram-se por proteínas da família MATE em diversas espécies no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Posteriormente, realizou-se uma busca por homologia no banco de dados Phytozome, específico para *E. grandis*. A partir da seleção das proteínas de *E. grandis*, procedeu-se à identificação do domínio característico e conservado da família MATE, visando confirmar sua presença. Após a aplicação desses critérios de filtragem, foram identificadas 58 sequências proteicas pertencentes à família MATE. Para a construção da árvore filogenética, essas sequências foram alinhadas com outras 43 sequências proteicas encontradas na literatura para outras espécies vegetais. Com o intuito de identificar blocos sintênicos, realizaram-se comparações entre o genoma do eucalipto (*E. grandis* x *E. grandis*) e o genoma de arábidoopsis (*A. thaliana* x *E. grandis*), além de buscar duplicações gênicas.

Para determinar a expressão absoluta dos 58 genes originários da família MATE foi realizada uma análise de expressão, alinhando os dados de RNA-seq disponíveis publicamente com o transcriptoma de *E. grandis* disponível no Phytozome. Foram montadas redes de co-expressão usando como critério apenas os transcritos caracterizados como fatores de transcrição e genes MATE. Também foram feitas análises de enriquecimento gênico. O pipeline utilizado por Cardoso (2018) pode ser visto na figura 5.

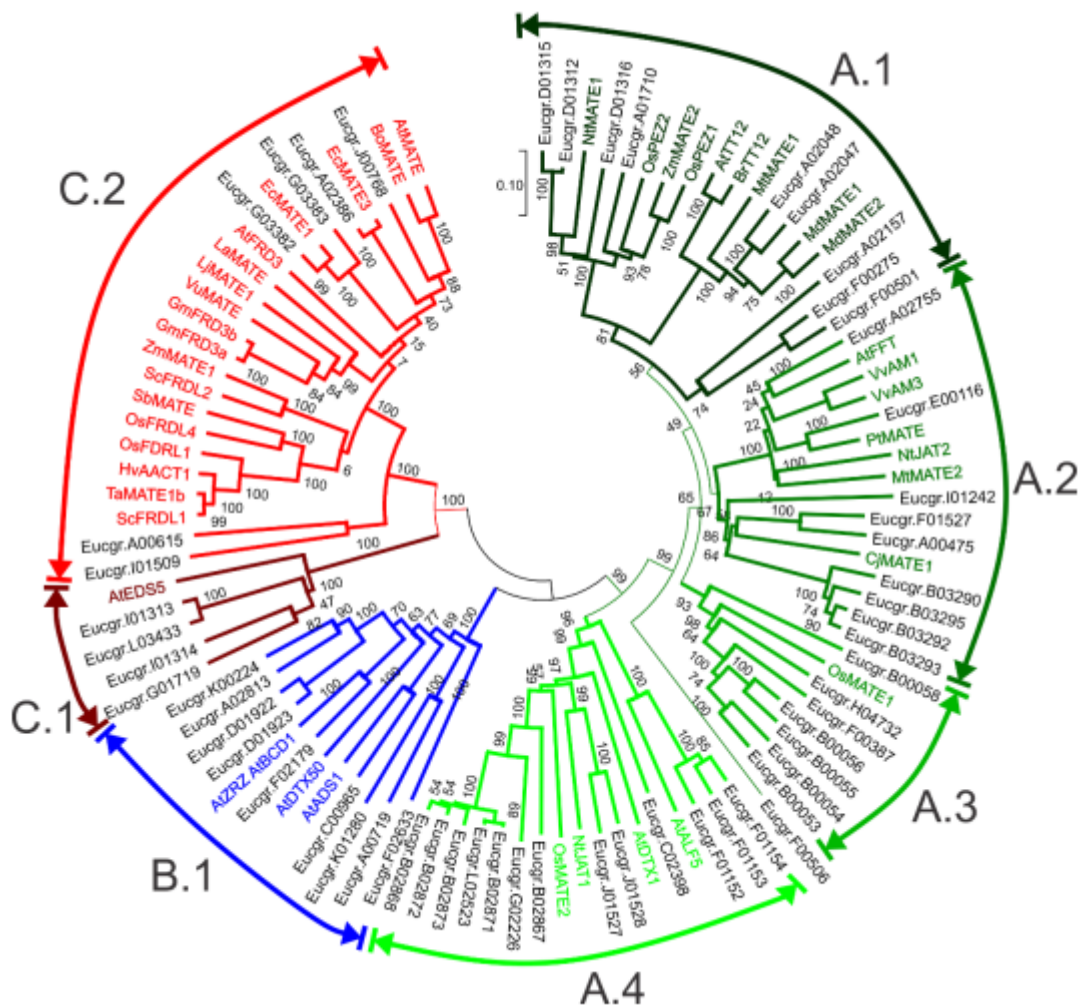
Figura 5 - Pipeline de prospecção de genes candidatos da família MATE de *E. grandis*.



Fonte: Adaptado de Cardoso (2018).

Observa-se na figura 6 que foram identificados 58 membros da família MATE, que pelas análises filogenéticas foram separadas em três clados: A, B e C. Estes clados apresentaram subgrupos: A.1, A.2, A.3, A.4, B.1, C.1 e C.2. Destes subclados, o C.2 está relacionado com a liberação de citrato para aumentar a absorção de Fe e também ao mecanismo de tolerância ao Al. Na análise de sintenia do genoma de *E. grandis* foram caracterizados os genes *Eucgr.G03383* e *Eucgr.G03382* como duplicados por *tandem*. O gene *Eucgr.G03383* apresentou expressão constitutiva, enquanto *Eucgr.G03382* apresentou maior expressão na raiz e 100% de identidade com o EcMATE1 (Gene expresso por *E. camaldulensis* na raiz em resposta ao Al). Com a análise de coexpressão percebeu-se que o gene *Eucgr.G03383* realizou 8 conexões positivas e 1 negativa, sendo o terceiro membro da família MATE com maior número de fatores de transcrição correlacionados (Cardoso, 2018).

Figura 6 - Árvore filogenética de transportadores da família MATE em *E. grandis*.



Fonte: Cardoso, 2018.

Os genes duplicados *Eucgr.G03383* e *Eucgr.G03382* potencialmente relacionados ao Al^{3+} passaram por uma análise de expressão gênica, para averiguar sua relação com a liberação de citrato para o meio e os tecidos os quais eram mais expressos. Após utilizar uma biblioteca de RNA-seq e gerar um *heatmap* Cardoso (2018) identificou que *Eucgr.G03383* demonstrou uma expressão constitutiva e *Eucgr.G03382* maior expressão na raiz, assim como 100% de identidade com EcMATE1.

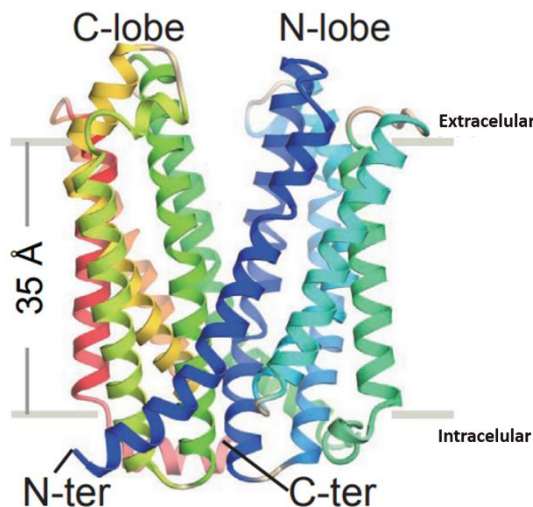
2.5 Genes da família MATE

As proteínas da família MATE são transmembranares, sendo antiportes eletro-neutras dependentes dos íons H^+ e Na^+ para liberação de cátions orgânicos, lipofílicos e xenobióticos (Tanaka *et al.*, 2017; Tanaka *et al.*, 2013). Essa família está presente nos três grandes grupos: Bacteria, Archaea e Eukarya. As proteínas dessa família possuem 12 α -hélices transmembranares, com 6 duplas de domínios N-lobo e C-lobo. As proteínas podem alternar a sua conformação em duas possibilidades, abrindo um bolso para fora da célula e captando íons H^+ ou Na^+ , ou para o interior da célula, captando a molécula a ser transportada (Claxton *et al.*, 2021). Em bactérias é comum para o transporte de drogas catiônicas anfifílicas. Em plantas ajudam na resistência a herbicidas, tolerância ao Al^{3+} , senescência foliar, etc., de modo geral, transportando metabólitos primários e secundários tanto da célula como do vacúolo (Saad *et al.*, 2023). Em mamíferos, transporta cátions iônicos relacionados a processos de detoxificação (Raturi *et al.*, 2021).

Em plantas são encontrados muitos parálogos de genes da família MATE. Em um estudo com *Daucus carota* encontraram cinco pares de duplicações segmentares e seis pares de duplicações em tandem (Saad *et al.*, 2023). Na pesquisa feita por Cardoso (2018) com *E. grandis*, os genes *Eucgr.G03383* e *Eucgr.G03382* que possivelmente estão associados ao efluxo de citrato, também estão duplicados em tandem.

A primeira estrutura tridimensional MATE de planta, resolvida por cristalografia, foi publicada por Tanaka *et al.* (2017), a partir da espécie *Camelina sativa*. Ao fazerem análise filogenética da família, os autores separaram as sequências em três subfamílias: NorM, Dinf e Eucariotos. A proteína possui 475 aminoácidos. Na figura 7 consta a imagem da estrutura resolvida, evidenciando os domínios e as partes que ficam para fora e dentro da célula.

Figura 7- Estrutura tridimensional da CasMATE1 de *Camelina sativa*.



Fonte: Adaptado de Tanaka *et al.*, 2017.

No trabalho realizado por Sawaki *et al.* (2018), houve a caracterização de 4 genes MATE em *Eucalyptus camaldulensis*, em que *EcMATE1* mostrou-se responsivo ao estresse por Al^{3+} na raiz. Para a soja, foi encontrado como gene candidato de resistência o *GmMATE75* (Liu *et al.*, 2016).

2.6 PCR em tempo real (qPCR) e High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

A técnica da *Polymerase Chain Reaction* (PCR) tem como objetivo a amplificação de um fragmento de DNA por meio da produção de múltiplas cópias. Para realizar essa amplificação, uma solução contendo desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dNTPs), primers, *Thermus aquaticus* (Taq) DNA-polimerase, DNA e solução tampão é preparada. Em seguida, essa solução é submetida ao termociclador, onde ocorrem as seguintes etapas: desnaturação da molécula de DNA a uma temperatura de 95°C, anelamento da TAQ DNA-polimerase em uma faixa de temperatura entre 55°C e 65°C, e extensão da molécula de DNA a uma temperatura de 72°C. Após a conclusão da reação, a qualidade do produto é avaliada utilizando um espectrofotômetro, enquanto a integridade dos fragmentos amplificados é verificada por meio da técnica de eletroforese em gel, permitindo a visualização das bandas correspondentes aos fragmentos de tamanho amplificados.

A *quantitative Polymerase Chain Reaction* (qPCR) baseia-se na mesma premissa da PCR convencional, porém o desenho do primer é mais específico para regiões exônicas, adicionam-se marcadores que emitem fluorescência capazes de sinalizar a quantidade de amplificação a cada ciclo da PCR. Estes marcadores podem ser corantes fluorescentes, como

Eva Green, SYBR Green I, entre outros, ou sondas repórteres que possuem sequência complementar à região que será amplificada (Ganeshamoorthy & Kandeeparoopan, 2021).

Para a aplicação da técnica de qPCR, comumente utilizada para avaliar a expressão de genes, é necessário realizar algumas etapas. Primeiramente, é preciso extrair o RNA do tecido de interesse. Em seguida, os mRNAs alvo são convertidos em cDNA por meio da ação da enzima Transcriptase Reversa, que é uma DNA polimerase dependente de RNA. Após a obtenção do cDNA, é possível realizar a amplificação em regiões específicas por meio da PCR com adição dos marcadores capazes de liberar fluorescência. Essas etapas são essenciais para permitir a quantificação e análise da expressão dos genes de interesse utilizando a técnica de qPCR (Gallup; Ackermann, 2008).

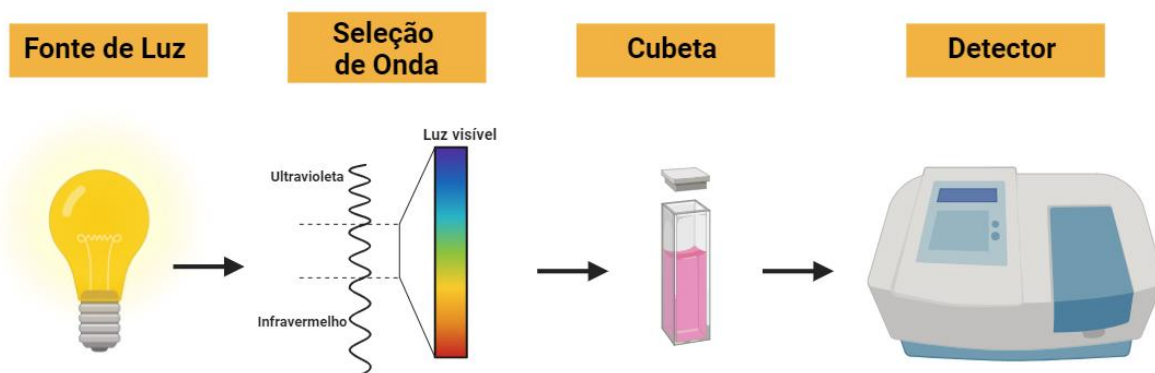
A principal diferença entre a PCR convencional e a qPCR consiste no período de monitoramento. Enquanto na primeira sabe-se o resultado final da amplificação, na segunda é possível monitorar cada ciclo de amplificação, sabendo qual foi a amostra que atingiu mais rapidamente o *threshold*, o ciclo em que ocorre isso é chamado de Ciclo de *threshold* (Ct). Como o corante usado na qPCR interage com DNA, a quantidade de fluorescência detectada está diretamente ligada a quantidade de cDNA presente na amostra, que reflete a quantidade de mRNA que havia inicialmente. É realizada uma comparação com a fluorescência de fundo, emitida por um corante colocado nas amostras, para calcular a diferença entre eles e monitorar o quanto a emissão de fluorescência tem aumentado a cada ciclo (Postollec *et al.*, 2011).

A técnica de *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) consiste em um método de separação que pode ser usado em misturas com elevado número de analitos similares. O princípio considerado é que cada composto presente na mistura possui seu próprio tempo de eluição, que será referente ao ponto que o sinal aparecerá dada as condições especiais. Este sinal consiste na representação gráfica dos compostos, esta chamada de cromatograma, em que é possível observar picos de absorbância de cada molécula a ser analisada. Ao observar o sinal, deve ser levado em consideração a área e a altura do pico, que são proporcionais a cada substância analisada. Dependendo da substância em foco e das condições de mistura, podem ser usados métodos diferentes de separação, como: Adsorção, fase reversa, trocas iônicas, pares iônicos, iônica, etc. (Meyer, 2010). Portanto, a técnica de HPLC pode ser combinada com outras para fazer análises mais específicas ou precisas (Arya *et al.*, 2023). Logo, esta técnica se faz muito útil para identificar os ácidos orgânicos ligados à tolerância ao Al^{3+} .

2.7 Espectrometria

A espectrometria consiste em uma técnica utilizada para medir a absorbância de radiação, quando emitida sobre uma amostra para determinar a concentração ou identificar uma molécula de interesse. As faixas de radiação mais comumente utilizadas são do espectro do Ultravioleta, Luz visível e Infravermelho Próximo (Bachmann e Miller, 2020).

Figura 8 - Ilustra o processo básico da espectrofotometria.



Fonte: Adaptado de Bachman e Miller (2020).

O sistema de funcionamento da espectrometria está ilustrado na figura 8. Inicialmente é utilizado na cubeta uma amostra em branco, que deve conter todos os componentes da solução exceto a molécula de interesse para contabilizar eventuais alterações que não sejam da molécula pesquisada. Quando a amostra com a molécula de interesse é exposta a radiação, ocorre uma diminuição da absorbância devido ao novo composto, e a quantidade de absorbância reduzida é proporcional em relação a quantidade da molécula de interesse presente na amostra. Ao comparar a absorbância pode-se calcular a transmitância, consistindo na razão entre a absorbância do branco dividida pela absorbância da amostra, em que ao multiplicar por 100, transforma-se em porcentagem, como pode ser observado na fórmula 1:

$$T = \frac{I}{I_0} 100 \quad (1)$$

Para transformar a Transmitância em Absorbância é utilizada a fórmula 2:

$$A = \log_{10} \frac{1}{T} \text{ ou } A = \log_{10} T \quad (2)$$

logaritimizando o inverso da transmitância. E finalmente a lei de Beer-Lambert, demonstrada na fórmula 3:

$$A = \varepsilon bC \quad (3)$$

Desse modo, associa-se de forma direta a absorvência com a concentração, absorção molar e o comprimento de onda passado pela cubeta (Bachmann e Miller, 2020). Após a obtenção do valor de absorvência utiliza-se uma regressão linear a fim de determinar a quantidade/concentração da substância alvo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultivo *in vitro*

O material vegetal a ser utilizado na condução deste estudo foram sementes de três espécies provenientes do Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF), (*Eucalyptus dunnii*, *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*). Elas inicialmente passaram por um processo de assepsia, com 1ml de álcool 70% por um minuto, detergente comercial e hipoclorito de sódio 2% por 20 minutos. O enxágue foi realizado em câmara de fluxo laminar com água destilada autoclavada e repetido 5 vezes. Posteriormente, foram semeadas duas por cada tubo de ensaio contendo 15 mL de meio MS metade da concentração iônica, suplementado com 2,4g/L de Phytigel. Após os 5 primeiros dias foram realizados eventuais individualizações das sementes que haviam germinado, deixando apenas uma planta por tubo, a fim de evitar o entrelaçamento das raízes. Os tubos com as plantas foram mantidos em sala de crescimento a 27°C, com fotoperíodo 12h/12h por um período de 60 dias, até que produzissem raízes e no mínimo dois internódios com 4 folhas.

3.2 Meio com Al^{3+}

Cada planta foi removida cuidadosamente do meio de cultura, para evitar a quebra da raiz, e colocado em uma solução contendo: água destilada, 2mM de cloreto de alumínio (AlCl_3), como fornecedora de Al^{3+} e 1mM de nitrato de cálcio $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, como fornecedora de Ca^{2+} , para evitar o rompimento da parede celular devido ao baixo pH (Figueiredo, 2013). O pH inicial dessa solução foi de 3,85. Foram selecionadas 4 plantas ao acaso e foram mantidas em cada tubo de ensaio contendo 15ml de solução de Al^{3+} . O experimento foi conduzido por Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com um grupo controle, com aplicação de 1mM de Ca^{+2} mas sem a aplicação de Al^{3+} no meio líquido, e outro grupo tratamento, com a aplicação de 2mM de Al^{3+} e 1mM de Ca^{2+} no meio líquido.

3.3 Ensaio de quantificação de citrato

Foi coletado 15 mL de cada tubo em períodos de: 30 minutos, 6 horas, 12 horas, 24 horas e 48 horas. As alíquotas dos meios foram analisadas usando a técnica HPLC e via método enzimático. A técnica de HPLC foi realizada em um sistema Shimadzu, constituído por duas bombas LC-20AD, degaseificador DGU-20A³, sistema de controle CBM-20A, forno de coluna CTO-20A, detector SPD-M20A e amostrador automático SIL-20AHT, cujos dados foram

processados no software LC-Solution. Para adaptar ao uso do HPLC, foi feito um estudo de detecção de baixas quantidade de citrato usando um cartucho de SPE como concentrador de ácido cítrico nas amostras. A análise foi conduzida utilizando uma coluna Supelcogel C610H (30 cm x 7,8 mm x 9,0 μ m) equipada com uma pré-coluna. A fase móvel foi 100mM HClO₄ em H₂O, com uma taxa de fluxo de 0,45 mL/min. O tempo de execução foi de 30 minutos a uma temperatura de 50°C, e o comprimento de onda de análise foi de 210 nm. A injeção foi direta e com volume de 10 μ L, com ausência de purificação do meio.

Durante o processo de adaptação da metodologia da SPE, foi cogitada uma alternativa para a quantificação do ácido cítrico nos meios através de ensaios enzimáticos tomando por base os estudos de Lana *et al.* (2014) que visou o desenvolvimento de uma metodologia alternativa para a quantificação de citrato em exsudados radiculares de milho como forma de tolerância ao alumínio, os autores propuseram uma metodologia enzimática, em que uma enzima específica seria capaz de transformar o citrato em piruvato e este seria quantificado por espectrofotometria, usando uma placa de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Foram utilizadas alíquotas do meio em cada tratamento e controle para a realização do teste. O Kit escolhido foi o MAK333 da *Sigma-Aldrich*, em que após a conversão do citrato em piruvato por enzima disponibilizada no kit o corante presente na reação é oxidado, tornando-se colorido, apresentando sua forma fluorescente. A detecção do kit varia entre 4 μ M a 400 μ M. O ensaio foi realizado usando uma placa de 96 poços em que foram inseridos nos poços as amostras de branco, amostras de citrato diluídas em concentrações de 0 μ M, 120 μ M, 240 μ M e 400 μ M, e amostras dos meios para quantificação do citrato. Após os ajustes realizados descontando os valores do branco, foi realizada inicialmente uma curva de diluição das concentrações conhecidas de citrato a partir da amostra que veio originalmente no kit para que a regressão pudesse ser feita posteriormente e a concentração de citrato fosse determinada.

3.4 Ensaio de expressão gênica

3.4.1 Extração de RNA

Para observar a expressão gênica, foi feito o teste de análise da qPCR para os dois genes *MATE1* duplicados, encontrado por Cardoso (2018). Foram utilizadas três repetições biológicas para cada espécie.

A extração de RNA total foi realizada a partir das raízes de *Eucalyptus* utilizando o protocolo baseado em CTAB/EDTA, adaptado de Chang *et al.* (1993). Inicialmente, foram preparadas as soluções necessárias, incluindo CTAB a 10% (aquecido a 65°C em banho-maria),

Tris-HCl 1 M (pH 8,0), NaCl 5 M e EDTA 0,5 M (ajustado para pH 8,0 com NaOH). O buffer de extração foi preparado misturando-se EDTA 0,5 M, NaCl 5 M, PVP 40000, Tris-HCl 1 M (pH 8,0), CTAB 10% e água Mili-Q até completar o volume desejado, seguido de autoclavagem e adição de spermidina para uma concentração final de 0,5 g/L. O β -mercaptoetanol foi adicionado apenas à alíquota do buffer imediatamente antes da extração.

Para garantir a integridade do RNA, todo o material utilizado foi previamente autoclavado, e as superfícies de trabalho foram higienizadas com álcool 70% e solução de hipoclorito de sódio a 0,1%.

A extração seguiu os seguintes passos: o material vegetal (100–150 mg) foi macerado em nitrogênio líquido e transferido para tubos de 2 mL previamente rotulados. O tampão de extração contendo CTAB e β -mercaptoetanol foi pré-aquecido a 65°C e adicionado às amostras, seguido de agitação em vórtex por 3 minutos e incubação a 65°C por 15 minutos (ou 55°C por 3 horas no caso de caule). Em seguida, a mistura foi centrifugada a 4°C por 10 minutos, e a fase aquosa foi coletada e submetida a três lavagens sucessivas com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), cada uma seguida de centrifugação a 4°C por 15 minutos.

O RNA foi precipitado pela adição de LiCl 8M (0,1x do volume total) e etanol absoluto (2x o volume total), seguido de incubação a -20°C por pelo menos 60 minutos. Após centrifugação a 4°C por 30 minutos, o sobrenadante foi descartado, e o pellet de RNA foi lavado sequencialmente com etanol 70% e etanol 100% (ambos resfriados a -20°C), com centrifugações intermediárias de 5 minutos a 4°C. O pellet seco foi ressuspensão em 20 μ L de água Mili-Q autoclavada ou livre de RNase e armazenado a -20°C para uso em curto prazo ou a -80°C para armazenamento prolongado.

A integridade do RNA foi determinada via eletroforese em gel de agarose 1% e a quantificação, realizada em NanoDrop ND-1000, seguindo padrões de qualidade de absorbância $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ (RNA/Proteína) e $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ (RNA/Compostos orgânicos) com valores entre 1,8 a 2,2. A fim de garantir a uniformidade das amostras, foi realizado um *pool* das amostras de RNA entre as repetições. O DNA residual da extração foi removido usando o kit Turbo DNA-free™ Kit (Thermo Fisher Scientific). Para converter o RNA em cDNA foi usado o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit.

3.4.2 qPCR

O teste de eficiência dos primers para qPCR foi realizado utilizando o kit Power SYBR™ Green PCR Master Mix (*Catalog number*: 4367659), com adesivos MicroAmp™

Optical Adhesive Film (*Catalog number: 4360954*) e placas de 96 poços MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0.1 mL (*Catalog number: 4346907*).

Os materiais empregados incluíram pipetas de 10 µL e 200 µL, ponteiros correspondentes, além de microtubos de 0,2 mL e 1,5 mL. Os equipamentos utilizados foram um termociclador, centrífuga e spin.

A reação de qPCR foi preparada utilizando um volume total de 15 µL por poço, contendo 2,5 µL de cDNA ou H₂O (1 µM), 7,5 µL de SYBR (1x), 1,2 µL de primer forward (10 µMol), 1,2 µL de primer reverse (10 µMol) e 2,6 µL de água livre de nucleases. As reações foram realizadas em cinco diluições seriadas (1:5, 1:25, 1:125, 1:625 e 1:3125), com três controles negativos (NTC) por primer.

Para determinar a quantidade de poços necessários, foi considerada a seguinte configuração: 4 primers × 3 replicatas técnicas × 5 diluições + 12 NTCs = 72 poços, correspondendo a uma placa de 96 poços. A reação foi preparada em uma proporção de 19x para cada primer, levando em conta uma reação adicional como margem para erros de pipetagem.

Após a distribuição das amostras na placa, esta foi selada com MicroAmp™ Optical Adhesive Film, centrifugada à temperatura ambiente em velocidade máxima por 1 minuto (com balanceamento adequado) e inserida no termociclador de qPCR para a amplificação. Para maiores esclarecimentos observar o Apêndice A.

As métricas de avaliação do teste de eficiência dos primers como curva de melting, R² e Percentual de Eficiência dos Primers foram extraídas do software do equipamento após a finalização da análise.

Para a realização do teste de expressão comparativa dos genes, seria realizado o cálculo de expressão relativa utilizando a fórmula desenvolvida por Pfaffl (2001), que utiliza os resultados de ΔC_t . O teste estatístico de comparação de médias seria o Teste T de Student.

Para ambas as análises houve normalização da expressão dos genes baseado nos genes de referência Tubulina (TUB) e Ubiquitina (UBQ). As reações foram executadas em triplicata biológica, e os ciclos utilizados foram determinados de acordo com o fabricante. Informações adicionais sobre os primers podem ser encontradas no quadro 1.

Quadro 1 - Informações sobre os primers.

Nome do Primer	Sequencia (5'-3')
qPCR_MATE_Fw_G03383	GTTACCCTTGCTGCCTCAAT
qPCR_MATE_Rv_G03383	GCCTTGTGATAATCTTTCTCTGC
qPCR_MATE_Fw_G03382	TGTTACCCTTGCTGCCTCAAC
qPCR_MATE_Rv_G03382	GCCCTGTGATAATCTTTTCCGC
TUB - Fw	TTCCATTTCATTTCGAAG
TUB - Rv	CCTGCCCAATGTGTATGCTT
UBQ - Fw	TGTCCTCCATCTTGTGCTTG
UBQ - Rv	GTCGATTCACTGCAAACG

Fonte: Do autor.

3.5 Enraizamento de *E. dunnii*

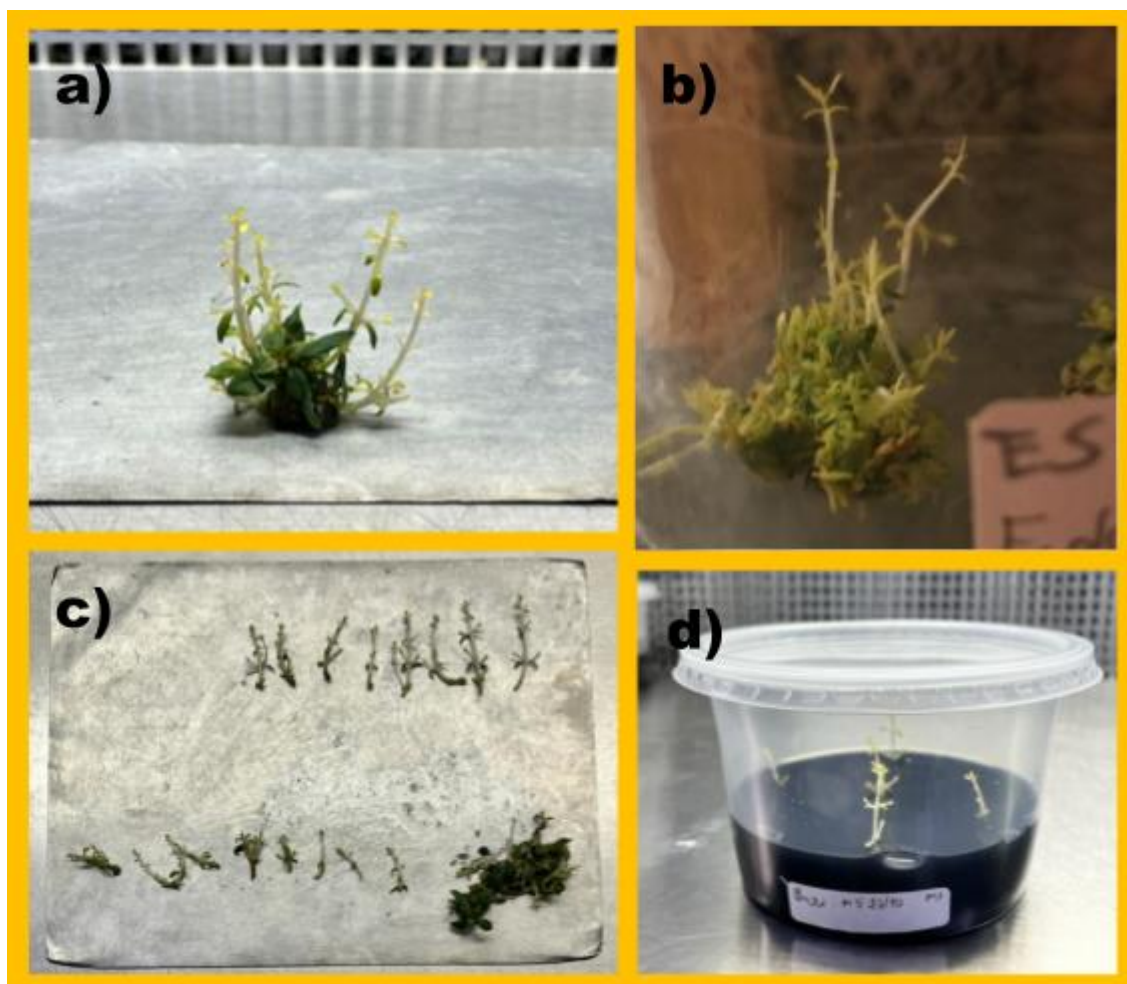
Para obter as três espécies de eucalipto contrastante quanto a sensibilidade ao alumínio tóxico utilizou-se o processo de germinação de semente em condições *in vitro*, o que não permitiu a uniformidade do sistema radicular dos explantes germinados. Porém, inicialmente a proposta é que fosse realizada multiplicação *in vitro* a fim de obter clones e consequentemente uma maior uniformidade entre as plantas. Todavia, após as várias multiplicações, o processo de enraizamento *in vitro* funcionou bem para as espécies de *E. grandis* e *E. urophylla* mas não para a espécie *E. dunnii*, embora diferentes estratégias foram executadas neste sentido.

O processo de enraizamento para as espécies de *E. grandis* e *E. urophylla* funcionou em duas etapas, sendo a primeira com a submissão dos explantes a um meio de pré-enraizamento, constituído pelo meio JADS acrescido de Ácido Indolburtírico (AIB) 0,1 mg/L e ácido ascórbico 25 mg/L, e após 7 dias ao meio de enraizamento, que consistiu do meio JADS suplementado com pantotenato de cálcio a 25 mg/L.

Como essa metodologia não funcionou para o *E. dunnii*, foram testadas algumas alternativas como a exposição dos explantes ao meio MS contendo 0,05 mg/L de BAP (Citocinina sintética) e 1,2ml/L de *Plant Preservative Mixture* (PPM), com o ágar na concentração de 6 g/L, por um período de 15 dias com ausência de luz a fim de estiolar brotos. Posteriormente os brotos foram destacados e cultivados em um meio MS com 10g/L de carvão ativado (CA) e 0,05 mg/L de BAP, passando para o fotoperíodo de 12h. Não ocorreu produção

de raízes na base dos explantes como pode ser observado na figura 9. Logo, essa metodologia não foi usada.

Figura 9 - Representação do processo na primeira adaptação de enraizamento de *E. dunnii*.



Legenda: a) Representa vários brotos estiolados. b) Brotos de *E. dunnii* estiolados no meio inicial. c) Brotos cortados sob a bandeja, prontos para serem transferidos. d) Inoculação dos brotos no segundo meio com carvão ativado.

Fonte: Do autor.

O próximo teste foi enraizar o *E. dunnii* utilizando dois meios adaptados de JADS. O primeiro meio foi o JADS, com concentração reduzida de sacarose (20g/L) e concentração pela metade da solução de macronutrientes. Ocorreu a adição, ainda no primeiro meio, de ácido ascórbico (25 mg/L) e AIB (0,75 mg/L). Este meio ficou na ausência de luz por aproximadamente 7 a 10 dias, onde foram feitas avaliações a fim de averiguar o enraizamento. Caso nesse período ocorresse a formação de calos na base do explante, estes seriam transferidos para outro meio, semelhante ao anterior nos níveis de sacarose e os macronutrientes pela metade, mas com adição de pantotenato de Ca (3 mg/L) e carvão ativado (2,5 g/L), mudando

para exposição a luz em um fotoperíodo de 12h. Em alguns explantes ocorreram formação de calos e estes foram transferidos de meio, enquanto outros não houve formação de calos permanecendo no mesmo meio inicial. Para ambos os casos não houve formação de raiz.

Devido ao insucesso no enraizamento dos explantes de *E. dunnii*, optou-se por fazer a germinação de sementes das três espécies de eucalipto, desse modo não perdendo uma espécie mas comprometendo a uniformidade do desenvolvimento dos explantes que viriam a germinar de cada semente.

3.5 Purificação do meio para análise em HPLC

3.5.1 Estudo para purificação do citrato

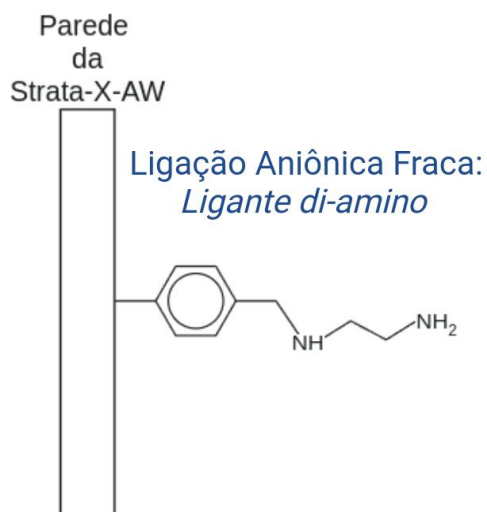
A técnica HPLC consiste em uma poderosa ferramenta para separação de moléculas diversas (Hameedat *et al.*, 2022), logo possui uma gama de etapas a serem seguidas dependendo do analito a ser identificado e quantificado no processo. Em uma das vertentes da pesquisa, consistiu na quantificação do ácido cítrico presente no meio líquido estressante para as plantas, sendo esse o analito. Embora exista a possibilidade de injeção das amostras no equipamento de forma direta, a quantidade de impurezas na amostra promove a longo prazo o entupimento da coluna cromatográfica e consequentemente o aumento da pressão, passível de danificar a coluna e as análises não serem concluídas. A fim de melhorar a detecção de baixas concentrações de citrato, foi realizado um estudo para desenvolver maneiras de tornar mais eficiente o processo. Em seguida, serão apresentadas as tentativas de solução e o levantamento de hipóteses para os problemas encontrados no estudo.

3.5.2 Tratamento com o cartucho SPE Strata-X-AW

Como observado em algumas metodologias (Garcia-Oliveira *et al.*, 2014; Ma, Chen, Zheng *et al.*, 2015), é interessante concentrar o ácido cítrico utilizando uma coluna *Solid Phase Extraction* (SPE) a fim de remover compostos que não são interessantes para a análise, podendo prejudicá-la, como o entupimento supracitado (ThermoScientific, 2011).

Ao pesquisar os tipos de colunas SPE que mais se adequariam à purificação do ácido cítrico, encontrou-se a SPE Strata-X-AW da Phenomenex. Segundo o manual da fabricante, os modelos Strata X são baseados em sorventes poliméricos que se utilizam de uma fase reversa para trocas iônicas. A classe AW refere-se à fase reversa, que neste caso é para trocas de ânions fracos, como exemplificado na figura 10.

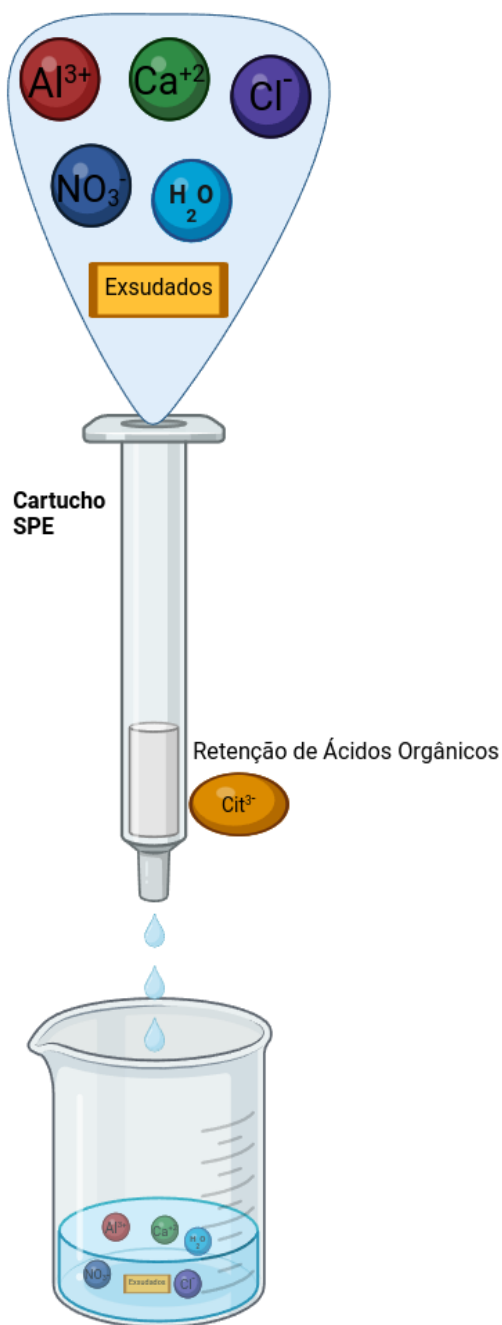
Figura 10 - Ilustração da parede polimérica com a fase reversa AW.



Fonte: Adaptado do manual da fabricante.

Para o funcionamento adequado da coluna de SPE, concentra-se o ácido cítrico da amostra, em uma faixa ótima de pH a ser trabalhada entre 6 e 7. Como pode ser observado na figura 11, a amostra contendo os íons dissociados e os exsudados orgânicos da planta, onde espera-se encontrar o ácido cítrico, são injetados na SPE em que apenas os ácidos fracos, principalmente o ácido cítrico, fica aderido a coluna, para ser posteriormente removido de forma a aumentar a sua concentração priorizando a purificação para então ser injetado na coluna cromatográfica.

Figura 11 - Ilustração do funcionamento ideal do cartucho de SPE para concentração de citrato.



Fonte: Do autor.

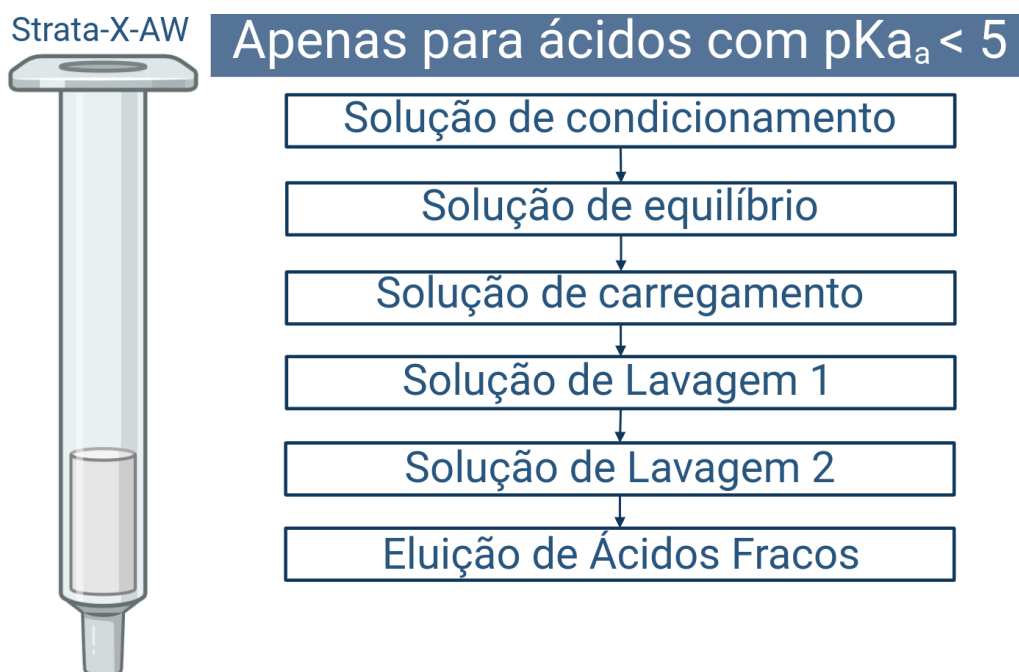
Todavia, no intervalo de pH ideal para o cartucho de SPE, ocorre a precipitação de Al^{3+} em $\text{Al}(\text{OH})_3$ devido a Constante de Produto de Solubilidade (KPS) ser $3\text{e-}34$ (Skoog *et al.* 2009), cuja reação.¹



A figura 12 apresenta passos que devem ser tomados para a utilização eficiente da coluna. Para o caso específico do ácido cítrico, foi adaptada a solução de eluição, em vez de

usar 5% de ácido fórmico em Metanol, usa-se 5% de ácido fórmico em 3mL de água, removendo totalmente o ácido cítrico retido à coluna.

Figura 12 - Etapas de lavagens da coluna Strata-X-AW.



Fonte: Adaptado do manual de uso da fabricante.

Para elucidar os processos subjacentes à precipitação do Al^{3+} , foi feito um meio com $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ (2mM), $Ca(NO_3)_2$ (1mM) e Ácido Cítrico (20ppm), a fim de simular o meio com ácido cítrico que a planta liberaria. A solução foi filtrada duas vezes, aferindo o pH e ajustando-o para dentro do limite de trabalho da coluna, e o meio agora estava completamente translúcido. Ao passar a solução pela SPE não ocorreu entupimento, porém ao injetar a solução eluída da SPE na coluna cromatográfica não foi observado nenhum pico referente ao ácido cítrico.

A fim de entender a existência de interferência da SPE na solução eluída, foi injetado diretamente na coluna cromatográfica a solução contendo $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ (2mM), $Ca(NO_3)_2$ (1mM) e Ácido Cítrico (20ppm) (Removendo qualquer efeito do cartucho de SPE) e não apareceu nenhum pico de ácido cítrico. Portanto, em alguma parte do processo anterior à passagem pela SPE, o ácido cítrico estava sendo removido.

Ao assumir que o Al^{3+} estava formando um colóide capaz de adsorver o ácido cítrico, pensou-se na utilização de um composto apto a quelar o Al^{3+} livre: o ácido etilenodiamino tetraacético ($C_{10}H_{16}N_2O_8$) ou EDTA. A fim de suprimir a precipitação de $Al(OH)_3$, foi realizado um teste comparativo com duas soluções de $AlCl_3 \cdot 6H_2O$, 2mM; $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, 1mM; Ácido

cítrico, 20ppm. Em uma das soluções foi adicionado 5mM de EDTA. O pH foi ajustado para 8,23, 10 e 12. Em todos os três pHs a solução sem adição de EDTA apresentou turbidez, enquanto a solução com adição de pH não apresentou essa condição. Para os pHs de 8,23 e 10 ocorreu centrifugação a 11000 RPM e consequentemente a formação de pellet, demonstrando a presença de precipitados na solução.

Devido a necessidade do prosseguimento de demais análises, foi realizada a injeção das amostras no HPLC sem a purificação pela coluna SPE.

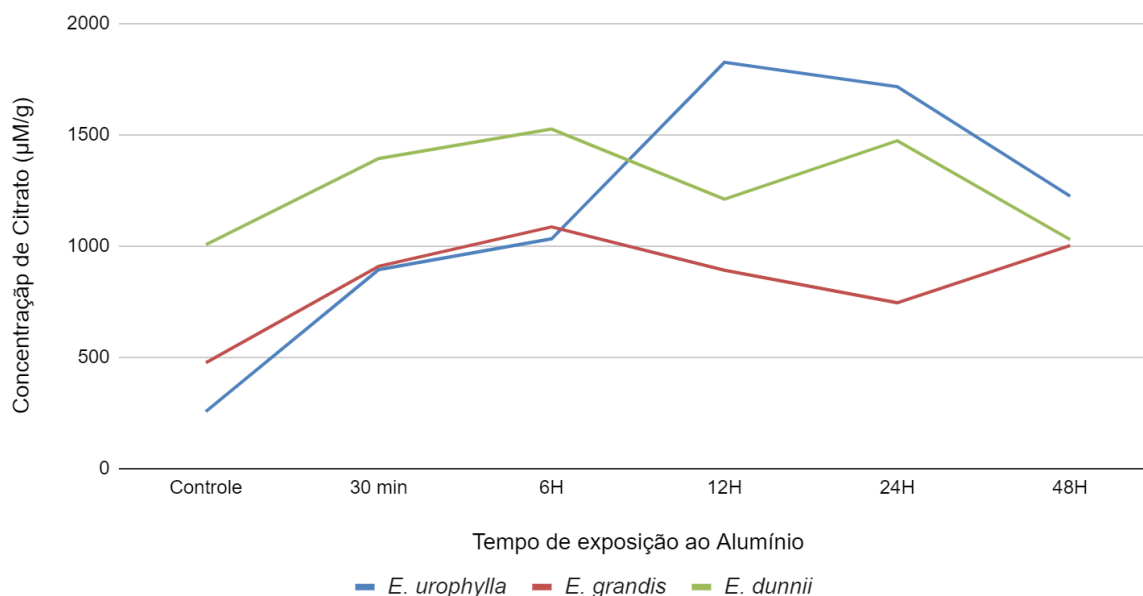
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2 Análise físico-química do meio

Há evidências que nas primeiras horas de exposição das plantas ao Al^{+3} , como por volta de 1 a 2h, inicia-se o processo de inibição da elongação celular, primeiramente na coifa da raiz que é a parte mais sensível (Kochian 1995). Portanto, percebe-se que por volta dos 30min as espécies liberaram maior quantidade de ácido cítrico, sendo possível associar esta exsudação ao estresse provocado pelo alumínio fitotóxico, pois a maior liberação de ácido cítrico confere maior tolerância à planta, como pode ser observado em diversos estudos em diferentes espécies (De La Fuente *et al.*, 1997; Miyasaka *et al.*, 1991; Tesfaye *et al.*, 2001).

Para a análise físico-química do meio de cultura dos três genótipos expostos ao Al^{+3} , avaliamos a concentração de citrato em relação ao tempo de exposição (Figura 13). Neste caso o controle foi considerado o primeiro tempo de exposição em 30 minutos sem a presença do Al^{+3} no meio.

Figura 13 - Concentração de citrato em decorrência da exposição ao Alumínio.



Fonte: Do autor.

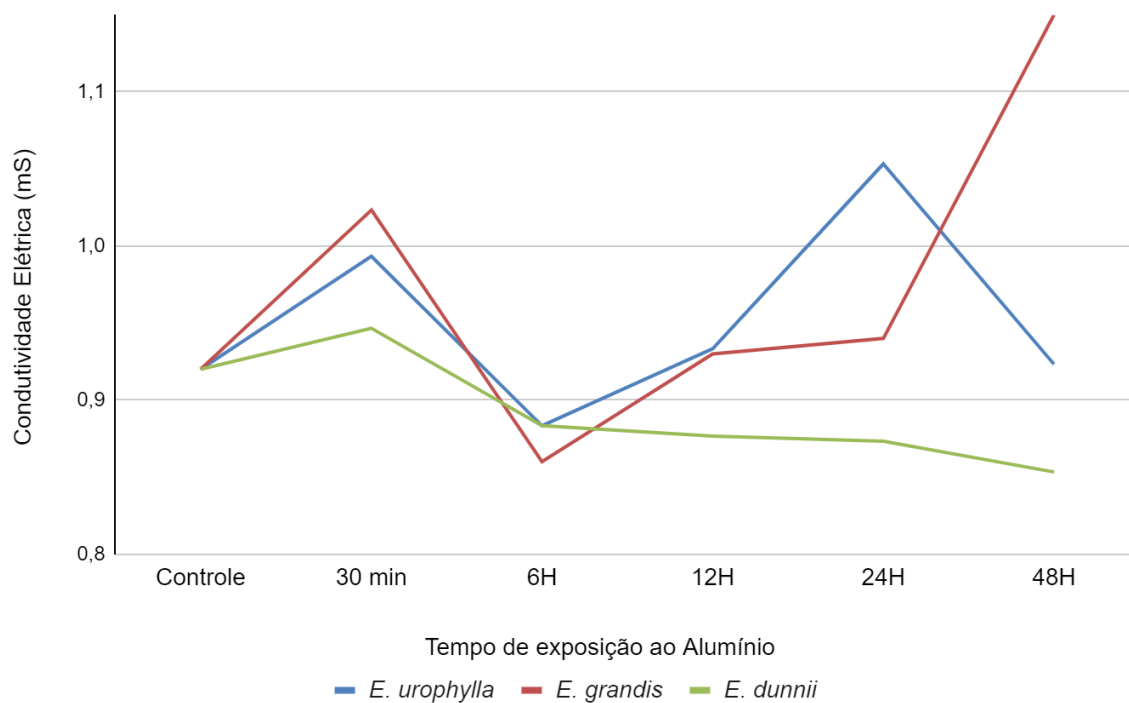
Primeiramente, é fundamental ressaltar que a estratégia adotada para análise no equipamento HPLC detectou apenas o citrato livre, não o complexado com o Al^{+3} . Como pode ser observado na figura 13, para todas as espécies foi observado um aumento da concentração de citrato até as 6h de exposição ao alumínio. Após esse período, observou-se uma tendência

de estabilização e queda da exsudação de citrato para as espécies de *E. dunnii* e *E. grandis*. Já para a espécie mais tolerante que é *E. urophylla*, esse comportamento ocorreu após 12h de exposição ao Al^{+3} , o qual foi o tempo onde se observou o pico de produção de citrato entre as três espécies. De forma geral a espécie *E. urophylla* foi a que liberou quantidades superiores de citrato, característica que pode estar associada à sua maior resistência de exposição ao alumínio tóxico, enquanto que a espécie mais sensível *E. grandis* a que liberou menos ácido orgânico. Ao final as concentrações de citrato detectadas pelo HPLC se tornam próximas, mesmo entre o genótipo considerado sensível, *E. grandis* e o tolerante *E. urophylla*. Apesar do *E. urophylla* apresentar maior tolerância ao Al^{+3} dentre as espécies estudadas, existem clones como *Eucalyptus grandis x urophylla* que apresentam maior tolerância ao alumínio tóxico em comparação ao *E. urophylla*, com diferenças na absorção de nutrientes e na parede celular (Li *et al.*, 2022).

Embora esse comportamento diferenciado entre os genótipos estudados seja observado é importante ressaltar que de acordo com as análises estatísticas não houve diferença significativa (p -valor = 0,85) entre os tratamentos, evidenciando a necessidade de um controle mais rigoroso na padronização do volume de raízes das plântulas que irão compor cada tratamento, assim como mais repetições.

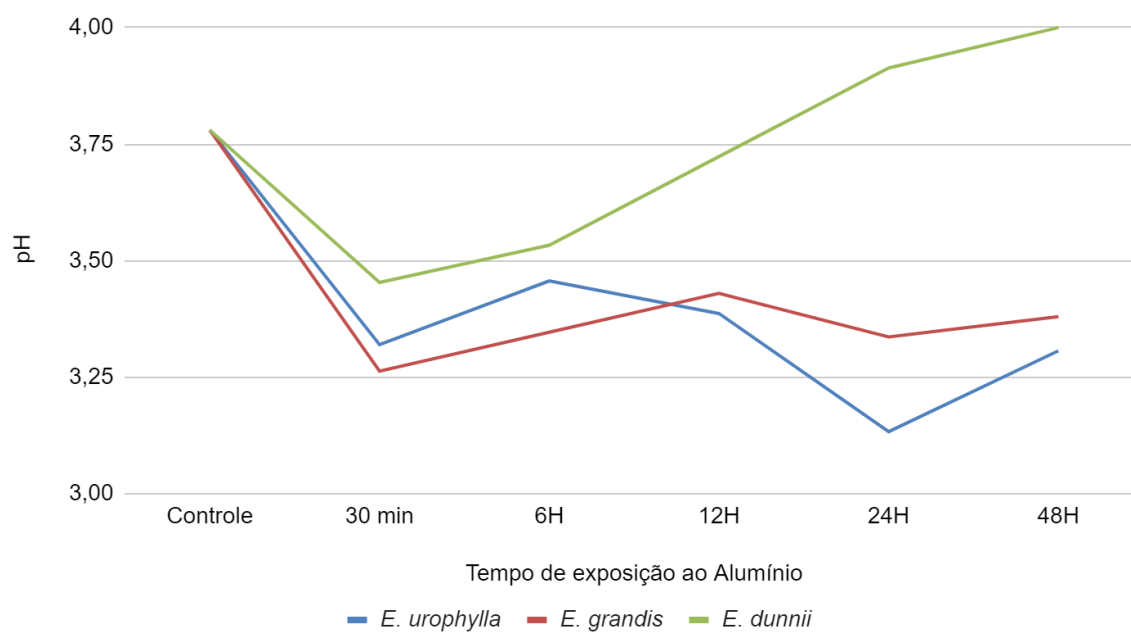
Nas figuras 14 e 15, é possível observar respectivamente a variação da condutividade elétrica (CE) e do pH durante a exposição dos diferentes genótipos ao Al^{+3} . Foram utilizados como controle dos valores de CE e pH, o meio de cultura sem presença de plantas. Observa-se que para todos os tempos de exposição, o pH e CE apresentaram comportamento opostos. Isso fica muito visível aos 30min após o tempo de exposição, quando se forma uma subida acentuada no gráfico de CE e a redução dos valores de pH. Essa discrepância foi novamente observada às 48h, onde a CE possui uma variação alta entre *E. urophylla* e *E. grandis*, enquanto o pH valores mais próximos. Apesar de existirem diferenças visíveis nos gráficos, esses contrastes não apresentaram significância estatística pelo teste de médias.

Figura 14 - Condutividade elétrica (CE) em decorrência da exposição ao Alumínio.



Fonte: Do autor.

Figura 15 - pH em decorrência da exposição ao Alumínio.



Fonte: Do autor.

Existem estudos que associam o aumento do pH na rizosfera como uma estratégia da planta de evitar os efeitos fitotóxicos do Al^{+3} (Matsumoto, 2000). Em um estudo realizado por Wang *et al.* (2006), comparou duas cultivares de trigo em que uma era sensível e outra tolerante a exposição ao alumínio. Neste experimento encontraram maiores níveis de liberação de ácido málico e ácido cítrico na cultivar tolerante, com a liberação em 30min de ácido málico e posterior aumento após 2 a 4h dos níveis do ácido.

Na figura 13 é possível visualizar em 30min a liberação do ácido cítrico, com aumento considerável em 12h para *E. urophylla*. Como o estudo de Wang *et al.* (2006) encontrou uma associação da liberação de ácidos orgânicos com o aumento de pH, a hipótese levantada foi de que os ácidos orgânicos ao quelar o Al^{+3} promovem o acúmulo de cargas positivas próximas ao ápice radicular, atraindo íons OH^- resultando no aumento do pH e consequentemente reduzindo os efeitos do alumínio fitotóxico. Na figura 15, observa-se o aumento do pH a partir dos 30min para todas as espécies, corroborando com os dados da literatura.

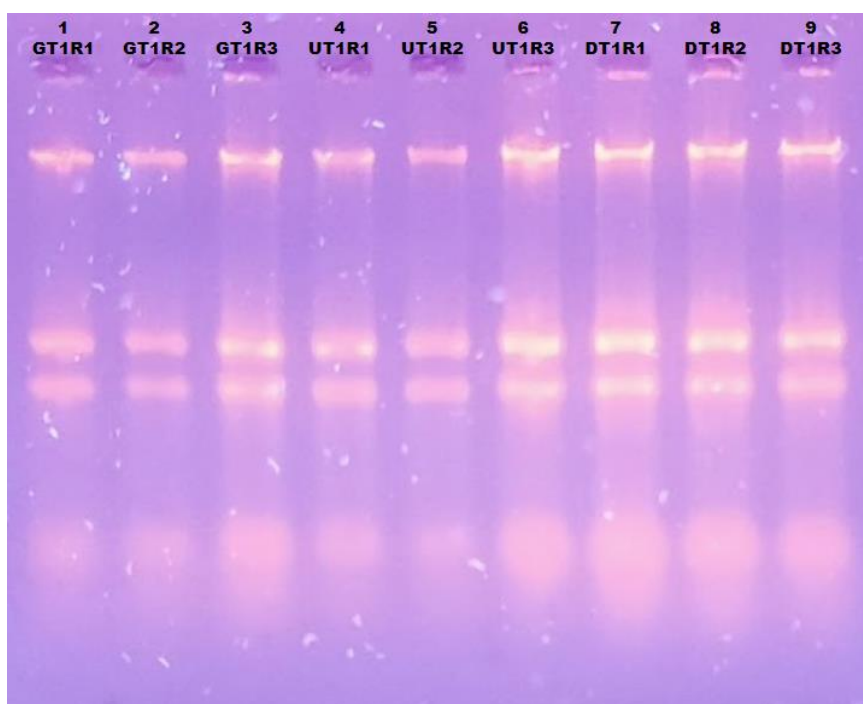
4.3 Análise de expressão dos genes de interesse

4.3.1 Extração de RNA

Foi selecionado o protocolo adaptado de Chang *et al.* (1993), que utiliza CTAB e LiCl (Apêndice A). Devido à variação na quantidade de raízes presentes nas plântulas, algumas amostras possuíam mais material radicular do que outras para a extração de RNA. Isso resultou em algumas amostras uma menor quantidade de material a ser macerado, o que, ao medir a concentração de RNA (em ng/ μ l) no espectrofotômetro, verificou-se menores quantidades e uma tendência a maior presença de impurezas nas razões 260/280, que mede a contaminação do material por proteínas.

Outro fator relevante, consiste na experiência do processo de extração, em que as últimas extrações foram melhores do que as primeiras. A figura 16 representa as amostras com 30 min de exposição ao Al^{+3} , sendo uma das últimas a serem extraídas. É possível observar em ambos os géis que a qualidade da maioria dos RNAs está dentro dos padrões considerados de boa extração, ou seja, sem degradação das bandas referentes ao RNA ribossomal 28s e 18s. Percebe-se também a presença de uma banda de tamanho superior, relacionada ao DNA.

Figura 16 - Eletroforese em gel das amostras do tratamento 1 (30min de exposição ao Al^{+3}).



Legenda: *E. urophylla* (Inicial “U”), *E. grandis* (Inicial “D”) e *E. dunnii* (Inicial “D”).

Fonte: Do autor.

Durante a execução da extração existem diversas etapas, dentre elas o processo de maceração da amostra congelada no nitrogênio líquido, que deve ser realizada com cuidado para evitar o degelo da amostra, oxidando-a, assim como atingir a textura mais pulverizada possível. Outra etapa que é considerada de suma importância é a realização das lavagens e agitação com solução de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), onde deve-se aliquotar dos microtubos apenas o sobrenadante.

Segundo alguns autores, as plantas apresentam compostos fenólicos que influenciam negativamente no processo de purificação das moléculas de RNA (Miranda *et al.* 2019). Como pode ser observado no Quadro 2, muitas amostras apresentaram concentração de RNA satisfatória – a partir de 300ng/μL – para prosseguir com as demais etapas da análise, porém, amostras como DT5, GT5, UcT4, UT3, UT4 e UT5 que apresentaram valores inferiores a 300ng/μL. De forma integral, sem contabilizar as médias, a menor concentração de RNA encontrada foi de 48,54 ng/μL e a maior de 1490,28 ng/μL. Para os valores de absorvância, foi observado na razão 260/280 amplitudes entre 1,45 e 1,82, e para a razão de 260/230 houve uma amplitude de 0,46 e 1,78. Para ambas as razões os resultados não foram interessantes, uma vez que os resultados deveriam ficar acima de 1,8 (Le Provost *et al.*, 2007), embora alguns autores considerem de 1,9 a 2,7 (Miranda *et al.* 2019) para os padrões de qualidade.

Quadro 2 - Média da concentração de RNA não tratado, razões 260/280 e 260/30 de cada amostra.

Amostra	ng/μl	260/280	260/230
DcT3	1025,19	1,60	1,33
DcT4	837,23	1,55	1,33
DcT5	769,11	1,76	1,59
DT1	1221,11	1,72	1,60
DT2	1121,29	1,65	1,50
DT3	1476,80	1,69	1,57
DT4	456,50	1,58	0,97
DT5	252,60	1,61	1,23
GcT3	588,29	1,69	1,41
GcT4	486,93	1,62	1,09
GcT5	493,19	1,70	1,62
GT1	832,89	1,69	1,58
GT2	827,25	1,72	1,69
GT3	422,85	1,69	1,35
GT4	506,24	1,60	1,25
GT5	281,13	1,70	1,42
UcT3	618,43	1,73	1,44
UcT4	190,22	1,61	1,32
UcT5	230,33	1,54	0,76
UT1	885,27	1,72	1,47
UT2	434,93	1,67	1,73
UT3	188,30	1,70	0,89
UT4	210,69	1,65	1,21
UT5	173,76	1,65	1,30

Fonte: Do autor.

Em um estudo a fim de comparar protocolos de extração para folhas, Miranda *et al.* (2019) encontrou valores de 1,02 a 1,91 para a razão 260/280, demonstrando que dependendo do uso do protocolo ocorre variação considerável na qualidade do RNA extraído. Desse modo,

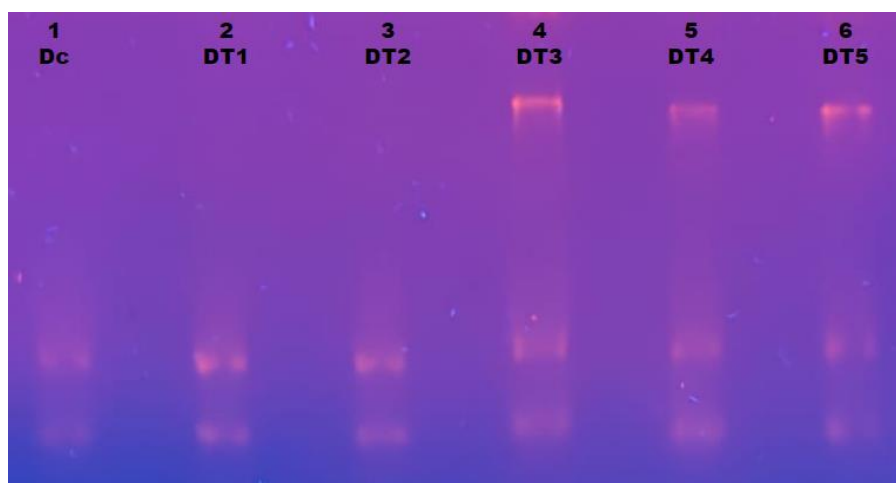
pode-se sugerir a adaptação de protocolos mais adequados à planta que se está pesquisando, assim como o tecido alvo.

Plasencia *et al.* (2015) realizaram uma pesquisa com genes responsáveis pelo desenvolvimento e formação da madeira em *Eucalyptus*, e precisaram extrair RNA de *E. grandis*. Na etapa de extração do RNA testaram vários kits e protocolos convencionais, e perceberam que os kits RNAeasy plant mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) e Power plant RNA isolation kit (MoBio, Carlsbad, USA) não apresentaram bons resultados. De modo geral, a quantidade de compostos fenólicos presentes nas raízes de *E. grandis* dificultou a adequação de um protocolo ideal. Selecionaram um protocolo baseado em CTAB e colocaram como condição observar a cor das raízes, caso apresentem tons de marrom e vermelho, provavelmente haverá problemas com a contaminação por compostos fenólicos.

4.3.2 Tratamento com DNase

Após a extração de RNA, é preciso que o DNA genômico também extraído seja degradado, a fim de evitar *off-targets* devido a possibilidade dos primers da qPCR também anelarem no DNA genômico. O tratamento com o kit TURBO DNA-free™ da ThermoFisher Scientific se mostrou eficiente para algumas amostras (Dc, DT1 e DT2) e não eficiente para outras amostras (DT3, DT4 e DT5), como observado na figura 17.

Figura 17 - Tratamento do RNA extraído de *E. dunnii* com DNase.



Fonte: Do autor.

A fim de contornar este problema, foi refeito o tratamento com o dobro da quantidade de DNase exigida no kit para aquelas amostras com o DNA ainda presente e, neste caso, obteve-se sucesso na eliminação total do DNA genômico. Percebeu-se que amostras que apresentavam uma menor concentração de RNA e pior qualidade na razão 260/230, ao serem adicionadas ao

pool de RNA, prejudicaram a atuação da enzima DNase devido a maior presença de contaminantes.

Em um estudo que buscava otimizar a remoção de contaminantes de DNA em amostras de RNA com uso da enzima DNase I, Huang, *et al.*, (1996) descobriram que a presença de contaminantes fenólicos reagem com a enzima, afetando a degradação do DNA. De modo geral, as DNases I e II precisam de cofatores catiônicos como Ca^{+2} e Mg^{+2} para serem ativas, logo compostos como zinco e cobre podem ser fortes inibidores da DNase II (Torriglia *et al.*, 1995; Evans e Aguilera, 2003), assim como outros compostos que venham a interagir com esses íons ou com o sítio ativo da enzima.

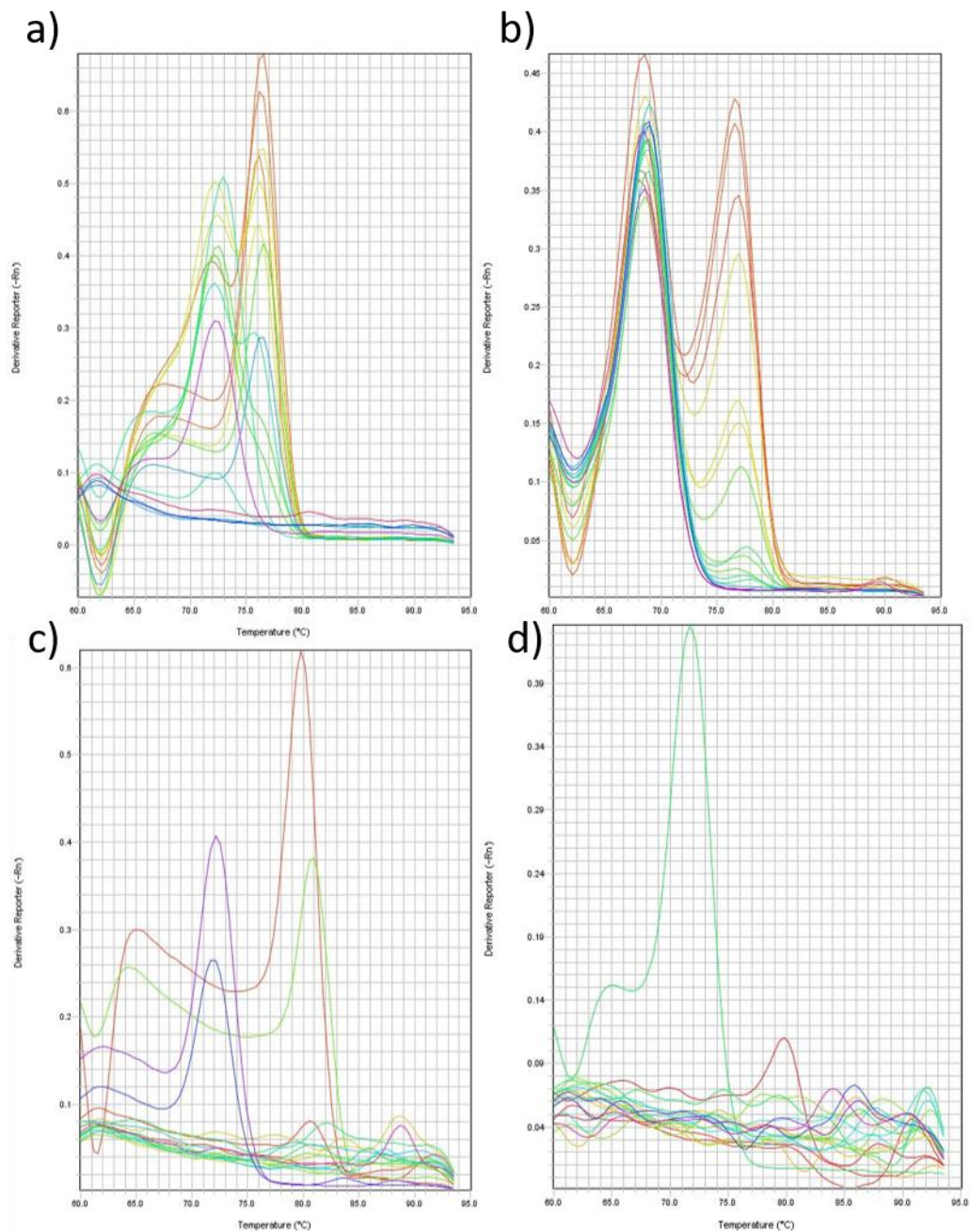
4.3.3 Síntese de cDNA e qPCR

Após o tratamento com a DNase, a próxima etapa foi a síntese de cDNA, usando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* da ThermoFisher Scientific seguindo as recomendações da fabricante.

Inicialmente foi realizado o teste de eficiência dos primers para os dois genes alvos e para vários genes constitutivos. Dentre os constitutivos apenas a tubulina e ubiquitina tiveram qualidade aceitável. Em relação aos primers referentes para os genes alvo, aqueles para o gene *G03383* não possibilitaram amplificação em nenhum dos testes realizados, o que pode estar associado a falta de expressão do gene. Outra possível explicação pode ser a baixa qualidade dos mesmos, visto que não ficaram dentro das métricas de qualidade como a Eficiência do Primer e o R^2 .

Como pode ser observado na figura 18, para todos os genes apareceram picos duplicados de *melting*, mostrando a inespecificidade dos primers. Com isso, uma das hipóteses levantadas consistiu na contaminação do material por DNA genômico. Então foi realizada uma PCR clássica com algumas amostras de RNA tratado utilizando um gene conhecido para plantas, o *Phytoene Desaturase (PDS)*, comumente usado como marcador molecular.

Figura 18 – Curva de *melting* de todos os genes.

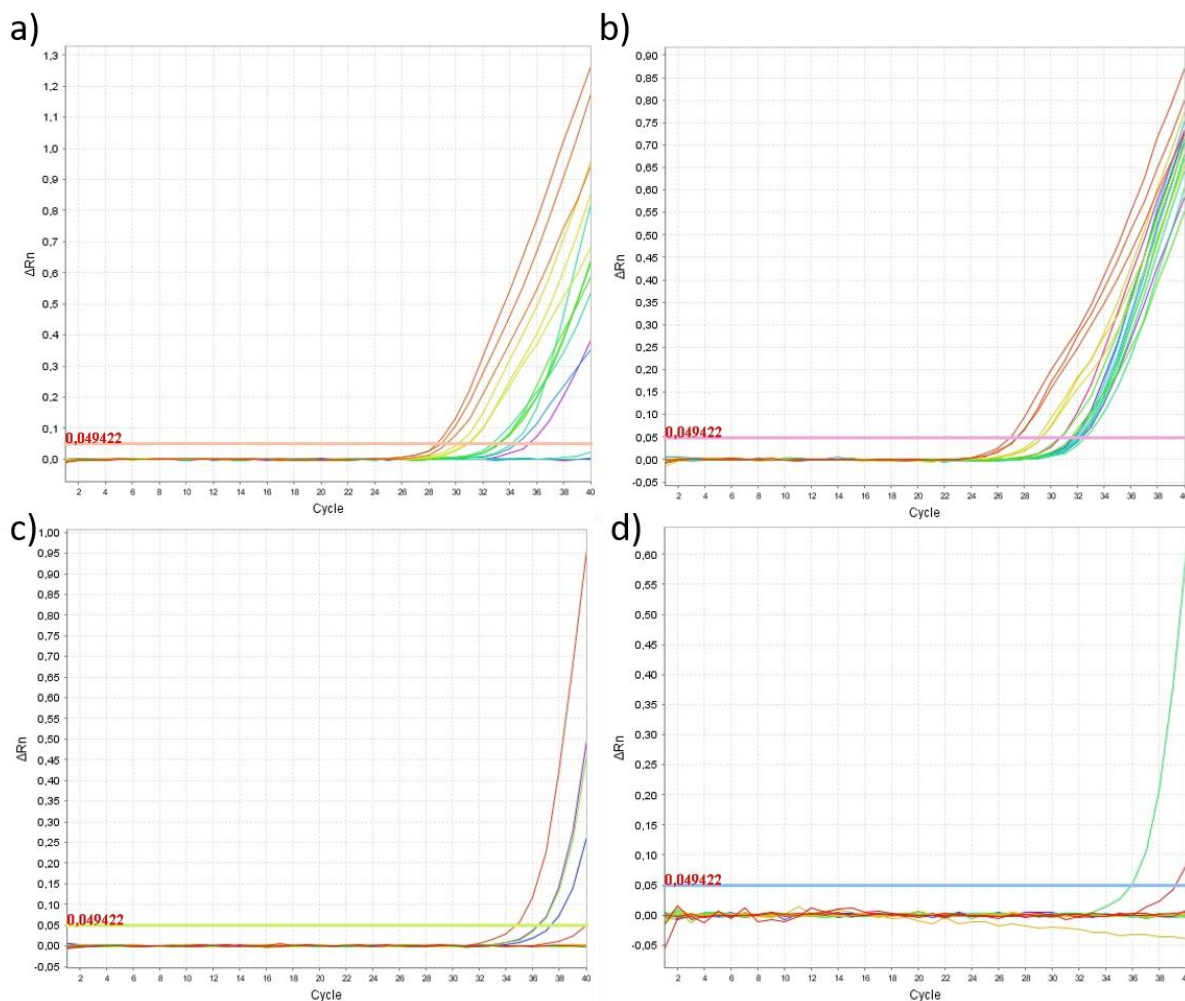


Legenda: a) Curva de *melting* da Ubiquitina. b) Curva de *melting* da Tubulina. c) Curva de *melting* do Mate G03383. d) Curva de *melting* do Mate G03382.

Fonte: Do autor.

O resultado da PCR exibido na figura 19 demonstrou a falta de amplificação para as amostras de RNA tratado, comprovando que não havia mais DNA genômico a ponto de ser amplificado na PCR, descartando a hipótese levantada anteriormente.

Figura 19 – Plotagem da amplificação de todos os genes.



Legenda: O *threshold* para todas as amplificações foi de 0,049422. a) Plot de amplificação da Ubiquitina. b) Plot de amplificação da Tubulina. c) Plot de amplificação do Mate *G03383*. d) Plot de amplificação do Mate *G03382*.

Fonte: Do autor.

Devido os RNAs não terem contemplado a purificação adequada de compostos fenólicos (260/230) acredita-se que a presença destes contaminantes influenciou o funcionamento da polimerase desencadeando o mau funcionamento da qPCR. Sabe-se que a presença de inibidores como compostos fenólicos podem prejudicar a reação de transcrição reversa assim como a amplificação do cDNA pela polimerase (Bustin *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2014).

Segundo o *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments* (MIQE) estabelecido por Bustin *et al.* (2009), a eficiência da PCR é aferida através do *Slope* ou inclinação das curvas de calibração, logo quanto mais próximo de 1 ou 100% indica que a quantidade de produto da PCR está dobrando a cada ciclo. Percebe-se no quadro 3 que os

valores de *Y-intercepts* e *Slope* foram muito baixos ou fora de um padrão de acréscimo de produto de PCR.

Quadro 3 - Métricas de qualidade do teste de eficiência dos primers.

Gene	Slope	Y-Inter	R2	Eff %
MATE <i>G03383</i>	0,513	37,27	0,026	-98,879
TUB	-1,839	26,566	0,865	249,858
UBQ	-2,19	27,949	0,885	186,182
MATE <i>G03382</i>	-1,12	25,785	0,007	681,801

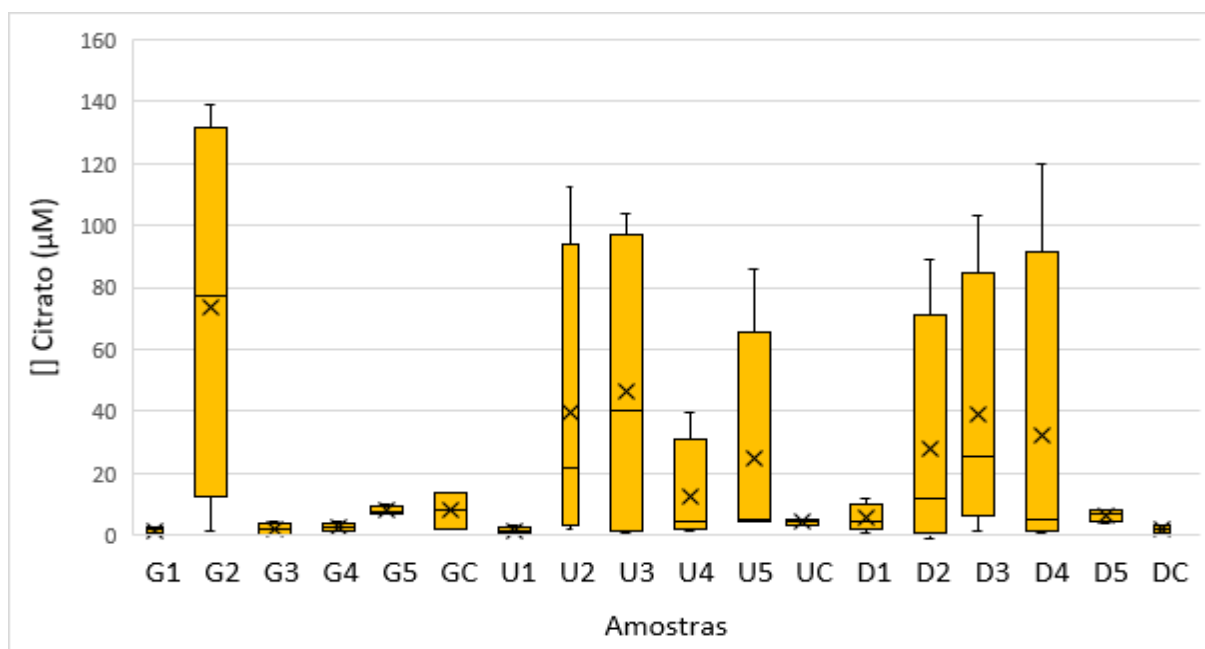
Fonte: Do autor.

4.4 Quantificação de Citrato

4.4.1 Método enzimático

Os resultados obtidos para a concentração de citrato utilizando o kit (Figura 20) se mostraram muito diferentes das obtidas pelo HPLC, mostrou-se como os valores presentes no resultado enzimático estavam menores, logo pode-se afirmar que o kit enzimático não funcionou. A principal suspeita é relacionada ao funcionamento da enzima, que foi prejudicada pelo pH baixo dos meios estressantes, em um intervalo de 3 a 4. Assim como a presença do Al^{+3} pode estar interferindo no funcionamento da enzima, que por não ser divulgada pela fabricante não tem como ser pesquisada.

Figura 20 – Concentração de citrato em μM por cada espécie e tratamento.



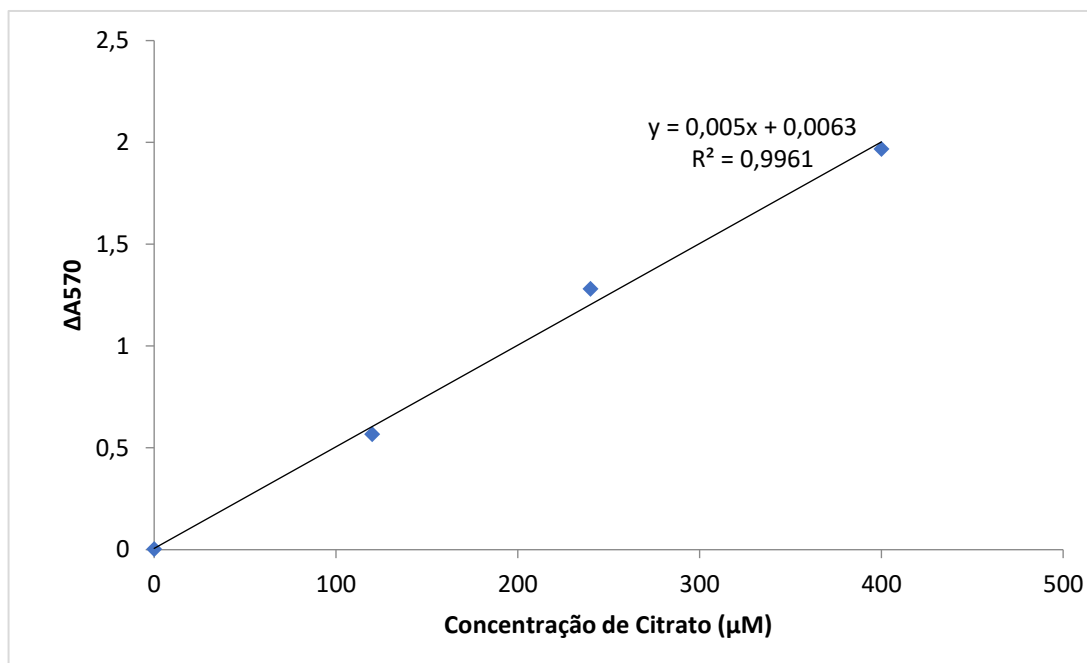
Legenda: G, *E. grandis*. U, *E. urophylla*. D, *E. dunnii*. Os números consistem nos tratamentos, 1 (30min), 2 (6h), 3 (12h), 4 (24h), 5 (48h). “C” corresponde ao controle.

Fonte: Do autor.

Alguns problemas podem ocorrer na realização de análises espectrofotométricas, devido a absorvância molar ser influenciada pelo pH, temperatura e solução matriz (Bachmann e Miller, 2020). E no caso desse método específico, como uma enzima foi utilizada, condições como temperatura e pH devem ser cautelosamente observadas.

A mesma lógica de funcionamento deve ser extrapolada para a utilização de placas de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) em vez de cubetas, que foi o caso desta análise. Foi realizada uma curva padrão do ácido cítrico, recomendado pelo Kit, a fim de calcular a concentração, apresentados na figura 21, com o R^2 de 0,9961 (Lana *et al.*, 2014).

Figura 21 – Curva padrão para determinação de ácido cítrico.



Fonte: Do autor.

Na figura 22 é possível observar dois poços com uma coloração mais acentuada para o rosa, enquanto os demais não apresentam uma cor demarcada. Mesmo com todos os componentes da reação exigidos pelo kit, percebe-se que não ocorreu a reação de forma esperada na maioria dos poços. Outro fato observável é a comparação das quantidades de citrato estimadas serem elevadas em alguns tratamentos, mas não apresentar nenhuma cor no poço de reação.

Figura 22 - Imagem do teste enzimático analisado no espectrofotômetro.

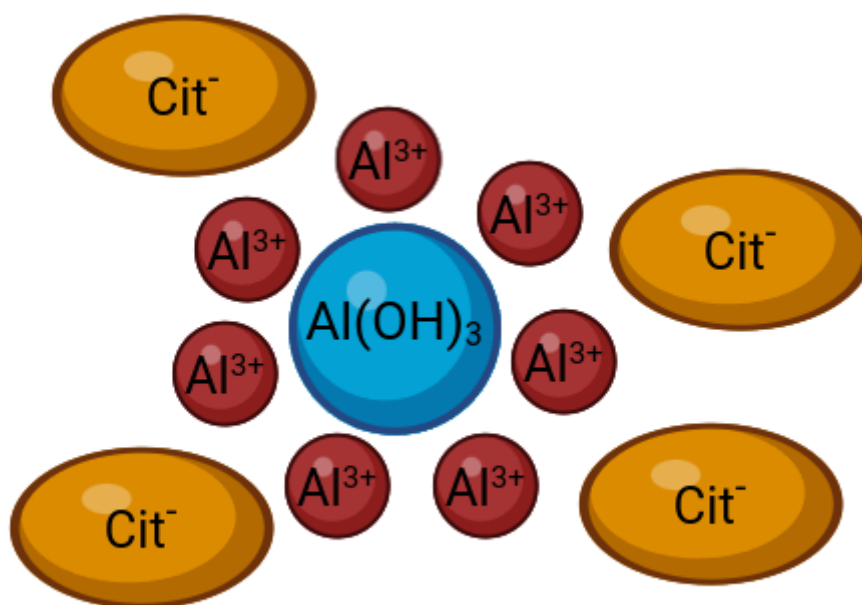


Fonte: Do Autor.

4.4.2 Coloides que adsorvem citrato

No processo de desenvolver uma metodologia para purificar a amostra, percebeu-se a quelagem do citrato. Hipotetizou-se que o processo ocorrido no método de Fajans poderia estar se repetindo neste estudo. No método de Fajans, os indicadores de adsorção, que são os ânions de um composto orgânico, atraem-se por uma camada de contra-íons que envolve um colóide originalmente carregado negativamente (Skoog *et al.* 2009, p.342). Neste caso, o colóide formado é o $\text{Al}(\text{OH})_3$, e seria envolto por uma camada de contra-íons de Al^{3+} e estes adsorveriam o citrato, como pode ser observado na Figura 23.

Figura 23 - Suposição de como o $\text{Al}(\text{OH})_3$ adsorve o Ácido Cítrico.



Fonte: Autor.

Como não ocorreu a precipitação de $\text{Al}(\text{OH})_3$ e o sequestro do citrato da amostra, foi realizado um teste com a coluna SPE e posteriormente a injeção na coluna cromatográfica do HPLC. Porém, na solução eluída não foi encontrado o pico do ácido cítrico. Logo, hipotetiza-se que por a coluna SPE ser específica para ácidos fracos, o EDTA (um ácido fraco) com o Al^{3+} quelado, estivesse aderido à coluna e apenas fosse liberado ao utilizar-se a solução de eluição.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho inicialmente buscou confirmar se os genes *G03383* e *G03382* estavam associados ao aumento da liberação de citrato no meio, como estratégia de tolerância das espécies de *Eucalyptus* pesquisadas. No entanto, o resultado alcançado contribui na determinação de possíveis erros que podem ocorrer na execução de uma metodologia parecida. Portanto, auxilia o planejamento experimental para que seja mais cuidadoso e assertivo. Logo, deve-se considerar o aumento do número de repetições para no mínimo 3, possibilitando testes estatísticos confiáveis, além da busca do protocolo ideal, com as adaptações necessárias, para a extração de RNA em eucalipto.

Durante o processo de análise do meio, o uso do Kit Enzimático MAK333 foi ineficaz para este tipo de experimento. A contaminação por compostos fenólicos na extração de RNA, observada na razão 230/260 no espectrofotômetro, gerou muitos problemas para o tratamento com DNase e qPCR, portanto deve-se considerar refazer a extração antes de prosseguir para outros passos de análises moleculares.

Além disso, sugere-se o uso de clones em vez de sementes para garantir uma maior uniformidade da biomassa radicular e a possibilidade de utilizar meio totalmente líquido, como hidroponia, para o cultivo dos explantes, a fim de reduzir o estresse causado pela mudança de meio semissólido para líquido, garantindo maior quantidade de raízes.

Este estudo servirá como alerta para outros pesquisadores, permitindo que identifiquem e evitem possíveis problemas ao planejarem experimentos de natureza similar.

REFERÊNCIAS

- ARYA, P.; MUNSHI, M.; KUMAR, P. **Diosgenin: Chemistry, extraction, quantification and health benefits**. Food Chemistry Advances, v. 2, p. 100170, 1 Out 2023. Acesso em: 29 mai. 2023.
- BUSTIN, S. A. *et al.* The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. Clinical Chemistry, v. 55, n. 4, p. 611–622, 1 abr. 2009.
- CAMACHO, M. E. *et al.* Morphology and characteristics of eight Oxisols in contrasting landscapes of Costa Rica. CATENA, v. 197, p. 104992, 1 fev. 2021.
- CARDOSO, T. B. Estabelecimento de uma rede de correlação de genes diferencialmente expressos nos estresses de al e p e caracterização das famílias MATE e ALMT em *Eucalyptus grandis* e *Populus trichocarpa*. Dissertação de mestrado apresentada para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Vegetal. Universidade Federal de Lavras. 2018.
- CASTRO, C. A. O. *et al.* Breve histórico do melhoramento genético do eucalipto no Brasil sob a ótica dos avanços biométricos. Ciência Rural, v. 46, n. 9, p. 1585–1593, 16 jun. 2016.
- CLAXTON, D. P.; JAGESSAR, K. L.; MCHAOUB, H. S. Principles of Alternating Access in Multidrug and Toxin Extrusion (MATE) Transporters. Journal of Molecular Biology, v. 433, n. 16, p. 166959, ago 2021.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Mapeamento de solos e aptidão agrícola das terras do Estado de Minas Gerais. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/965988/mapeamento-de-solos-e-aptidao-agricola-das-terras-do-estado-de-minas-gerais>. 2004. Acesso em: 5 mai 2023.
- FIGUEIREDO, L. D. Cálcio e boro aliviam a toxidez por H⁺ e Al³⁺ e suprimem a indução de guaiacol peroxidase em raízes do cultivar Micro-Tom de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.): possível envolvimento da parede celular. 2 ago.2013.
- GALLUP, J. M.; ACKERMANN, M. R. The ‘PREXCEL-Q Method’ for qPCR. International Journal of Biomedical Science : IJBS, v. 4, n. 4, p. 273, 15 dez. 2008.
- GONÇALVES, A. S. A “caixa-preta” da eucaliptocultura: controvérsias científicas, disputas políticas e projetos de sociedade. Projeto História: Revista do Programa de Estudos Pós-Graduados de História, v. 65, 2 ago 2019.
- HARIHARAN, G.; PRASANNATH, K. Recent Advances in Molecular Diagnostics of Fungal Plant Pathogens: A Mini Review. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, v. 10, p. 829, 11 Jan 2021.
- ILLÉŠ, P. *et al.* Aluminium toxicity in plants: internalization of aluminium into cells of the transition zone in Arabidopsis root apices related to changes in plasma membrane

potential, endosomal behaviour, and nitric oxide production. *Journal of Experimental Botany*, v. 57, n. 15, p. 4201–4213, 1 Dez 2006. Acesso em: 14 mai 2023.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. **Relatório Anual de 2023.** Brasília, 2023
Disponível em: <https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorio-anual-iba2023-r.pdf>.
Acesso em: 17 mai. 2023.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção de Extração Vegetal e da Silvicultura.** Disponível em:
<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pevs/quadros/brasil/2021>. Acesso em 27 abr. 2023.

JOHNSON, G. *et al.* **Minimum Information Necessary for Quantitative Real-Time PCR Experiments.** In: [s.l: s.n.]. p. 5–17.

KAMPF, N.; CURI, N.; MARQUES, J. J. **Intemperismo e Ocorrência de Minerais no Ambiente do Solo.** In: MELO, V. F.; ALLEONI, L. R. F. (Eds). *Química e Mineralogia do Solo. Parte I: Conceitos Básicos.* 1ed. Viçosa, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2009. Cap. V. p.333-379.

KOCHIAN, L. V. *et al.* **Plant adaptation to acid soils: The molecular basis for crop aluminum resistance.** *Annual Review of Plant Biology*, v. 66, p. 571–598, 29 abr. 2015.

KOCHIAN, L. V.; HOEKENGA, O. A.; PIÑEROS, M. A. **How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency.** *Annual Review of Plant Biology*, v. 55, p. 459–493, 2004.

KOCHIAN, L. V. **Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants.** *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 46, p. 237–260, 1995.

LIU, J. *et al.* **Genome-wide analysis of MATE transporters and expression patterns of a subgroup of MATE genes in response to aluminum toxicity in soybean.** *BMC Genomics*, v. 17, n. 1, p. 1–15, 11 mar. 2016.

MATSUMOTO, H. **Cell biology of aluminum toxicity tolerance in higher plants.** *International Review of Cytology*, v. 200, p. 1–46, 2000. Acesso em: 14 mai. 2023.

MENEZES, M. D. *et al.* **Levantamento pedológico e sistema de informações geográficas na avaliação do uso das terras em sub-bacia hidrográfica de Minas Gerais.** *Ciência e Agrotecnologia*, v. 33, n. 6, p. 1544–1553, 2009. Acesso em: 5 mai. 2023.

MEYER, V. R. **Practical High-Performance Liquid Chromatography.** John Wiley and Sons Ltd p. 12 - 16, v. 5. 2010.

MUNAWEERA, T. I. K. *et al.* **Modern plant biotechnology as a strategy in addressing climate change and attaining food security.** *Agriculture and Food Security*, v. 11, n. 1, p. 1–28, 1 dez. 2022.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. **A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures.** *Physiologia Plantarum*, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1 Jul 1962.

- PFAFFL, M. W. **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.** Nucleic acids research, v. 29, n. 9, p. e45, 2001.
- RATURI, S. *et al.* **Engineered MATE multidrug transporters reveal two functionally distinct ion-coupling pathways in NorM from *Vibrio cholerae*.** Communications Biology 2021 4:1, v. 4, n. 1, p. 1–17, 11 mai. 2021.
- ROOHIGO HAR, J. *et al.* **The role of the plasma membrane H⁺-ATPase in plant responses to aluminum toxicity.** Frontiers in Plant Science, v. 8, p. 1757, 17 Out 2017. Acesso em: 14 mai 2023.
- ROOHIGO HAR, S.; CLARKE, A. R.; PRENTIS, P. J. **Gene selection for studying frugivore-plant interactions: A review and an example using Queensland fruit fly in tomato.** PeerJ, 2021. Disponível em: PeerJ 9:e11762 <https://doi.org/10.7717/peerj.11762>. Acesso em: 27 mai. 2023.
- SAWAKI, Y. *et al.* **Characterization of Al-responsive citrate excretion and citrate-transporting MATEs in *Eucalyptus camaldulensis*.** Planta, v. 237, n. 4, p. 979–989, 1 abr. 2013.
- SAWAKI, Y. *et al.* **Identification of a STOP1-like protein in *Eucalyptus* that regulates transcription of Al tolerance genes.** Plant Science, v. 223, p. 8–15, 1 jun. 2014.
- SCHNERR, H.; NIESSEN, L.; VOGEL, R. F. **Real time detection of the *tri5* gene in *Fusarium* species by LightCyclerTM-PCR using SYBR®Green I for continuous fluorescence monitoring.** International Journal of Food Microbiology, v. 71, n. 1, p. 53–61, 4 dez. 2001.
- SHETTY, R. *et al.* **Aluminum toxicity in plants and its possible mitigation in acid soils by biochar: A review.** Science of The Total Environment, v. 765, p. 142744, 15 abr. 2021.
- SILVA, I. R. *et al.* **Responses of eucalypt species to aluminum: the possible involvement of low molecular weight organic acids in the Al tolerance mechanism.** Tree Physiology, 24(11), 1267–1277, 2004.
- SILVA, L. C. L. *et al.* **Pedodiversidade no estado de Minas Gerais – Brasil.** Caderno de Geografia, v. 28, n. 1, p. 18–38, 25 mar. 2018.
- SILVA, V. A. **Mapa de solos, conhecimento de campo, inventário florestal e zoneamento ecológico-econômico como base para a aptidão agrícola das terras em minas gerais elaborada em sig.** 2014. Tese de doutorado. Acesso em: 5 mai. 2023.
- LI, Y. *et al.* **Analysis of amino acid enantiomers in ambient aerosols: Effects and removal of coexistent aerosol matrix.** Journal of Environmental Sciences, v. 137, p. 732–740, 1 mar. 2024.
- SOUZA, L. S. *et al.* **Desinfestação de sementes e multiplicação in vitro de guabijuzeiro a partir de segmentos apicais juvenis (*Myrcianthes pungens* O.Berg) D. Legrand.** Revista Brasileira de Fruticultura, v. 33, n. 3, p. 691–697, 2011.

TAN, X. *et al.* **Fluoro-functionalized plant biomass adsorbent: Preparation and application in extraction of trace perfluorinated compounds from environmental water samples.** Journal of environmental sciences, v. 137, p. 703–715, 2024.

TANAKA, Y. *et al.* **Structural basis for the drug extrusion mechanism by a MATE multidrug transporter.** Nature 2013 496:7444, v. 496, n. 7444, p. 247–251, 27 mar. 2013.

TANAKA, Y.; IWAKI, S.; TSUKAZAKI, T. **Crystal Structure of a Plant Multidrug and Toxic Compound Extrusion Family Protein.** Structure, v. 25, n. 9, p. 1455- 1460.e2, 5 set. 2017.

WANG, P. *et al.* **Aluminum Tolerance of Two Wheat Cultivars (*Brevor* and *Atlas66*) in Relation to Their Rhizosphere pH and Organic Acids Exuded from Roots.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 54, n. 26, p. 10033–10039, 1 dez. 2006.

YAMAMOTO, Y. **Aluminum toxicity in plant cells: Mechanisms of cell death and inhibition of cell elongation.** Disponível em:
<https://doi.org/10.1080/00380768.2018.1553484>, v. 65, n. 1, p. 41–55, 2 Jan 2018. Acesso em: 14 mai. 2023.

ZHANG, W. *et al.* **Genome-wide identification, characterization and expression analysis of MATE family genes in apple (*Malus × domestica* Borkh).** BMC Genomics, v. 22, n. 1, p. 1–14, 1 Dez 2021.

APÊNDICE

APÊNDICE A - PROTOCOLO DE TESTE DE EFICIÊNCIA DE PRIMERS PARA QPCR

TESTE DE EFICIÊNCIA DOS PRIMERS PARA qPCR

Kit qPCR:

Power SYBR™ Green PCR Master Mix

Catalog number: 4367659

Adesivos:

MicroAmp™ Optical Adhesive Film

Catalog number: 4360954

Placas de 96 poços:

MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0.1 mL

Catalog number: 4346907

Materiais:

- Pipetas de 10 µl
- Pipetas de 200 µl
- Ponteiras de 200 µl
- Ponteiras de 10 µl
- Microtubos de 0,2 ml
- Microtubos de 1,5 ml

Equipamentos:

- Termociclador
- Spin
- Centrífuga

Cálculos:**Reação total da qPCR**

Reação de qPCR	
Componentes	1x
cDNA/H₂O (1μM)	2,5
SYBR (1x)	7,5
Primer Fw (10μMol)	1,2
Primer Rv (10μMol)	1,2
Nuclease-free H₂O	2,6
Total per reaction	15 μL

Entendendo os cálculos

- Haverão 5 diluições: 1:5, 1:25, 1:125, 1:625 e 1:3125.
- As diluições são em 5x.
- Haverão 3 NTCs (*Negative Template Control*) por primer.
- Deve ser realizado um pool de todas as amostras de cDNA.
- O volume de reação por poço é de 15 μL.

Agora vamos calcular a quantidade de poços usados a partir de um exemplo:

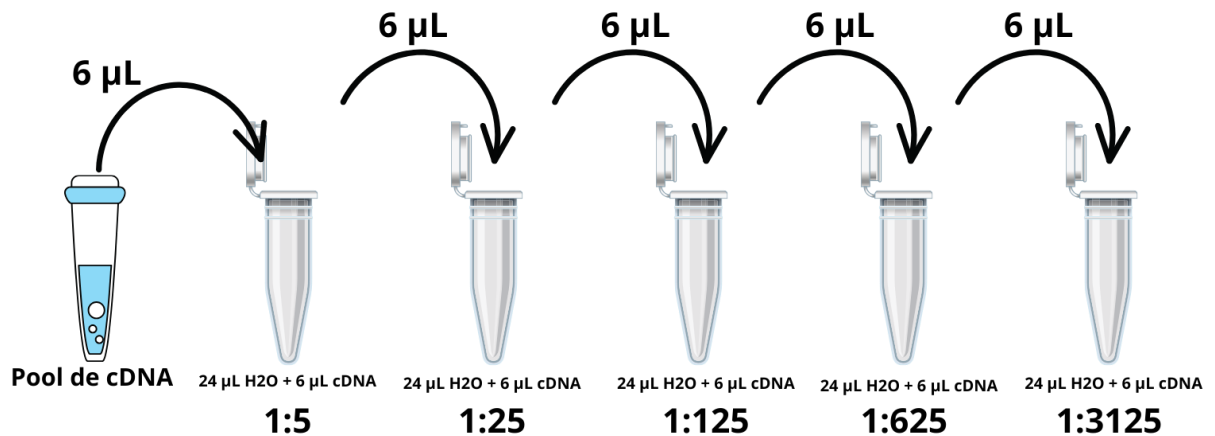
4 primers x 3 replicatas técnicas x 5 diluições + 12 NTCs = 72 Poços (1 Placa)

Reação de qPCR		Mix
Componentes	1x (μL)	19x (μL)
cDNA/H₂O (1μM)	2,5	-
SYBR (1x)	7,5	142,5
Primer Fw (10μMol)	1,2	22,8
Primer Rv (10μMol)	1,2	22,8
Nuclease-free H₂O	2,6	49,4
Total per reaction	15	237,5

Obs: Não pode vortexar Mix (SYBR + Primer + H₂O_{NF}).

Obs: Será feito 19x, considerando 1 reação a mais de erro de pipetagem. São consideradas 19 reações por primer que você tiver, neste exemplo esse processo será repetido 4 vezes, pois são 4 genes.

Esquema das diluições



Obs: Como o esquema das diluições são de 5x, a alíquota de cDNA escolhida deve ser multiplicada por 5. Como neste exemplo foi de 8µL (1 parte de 5), então ao multiplicar por 5 temos 40µL.

Exemplo de croqui a ser seguido

CROQUI DA PLACA DE 96 POÇOS												
Genes	MATE 82			MATE 83			TUB			UBQ		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3
B	1:9	1:9	1:9	1:9	1:9	1:9	1:9	1:9	1:9	1:9	1:9	1:9
C	1:27	1:27	1:27	1:27	1:27	1:27	1:27	1:27	1:27	1:27	1:27	1:27
D	1:81	1:81	1:81	1:81	1:81	1:81	1:81	1:81	1:81	1:81	1:81	1:81
E	1:243	1:243	1:243	1:243	1:243	1:243	1:243	1:243	1:243	1:243	1:243	1:243
F	NTC			NTC			NTC			NTC		
G	NTC			NTC			NTC			NTC		
H	NTC			NTC			NTC			NTC		

Pool das amostras de cDNA

1 - Em um microtubo de 0,2 mL colocar 3µL de cada amostra de cDNA a ser usado no *Mix*, totalizando 18µL.

2 - Preparar 5 microtubos de 0,2 mL para as diluições 1:5, 1:25, 1:125, 1:625 e 1:3125. Será pipetado 6µL de cDNA para realização das diluições, como no esquema.

Preparação do Mix

3 - Preparar em um microtubo de 0,6 mL um *Mix*, em que se pipeta:

142,5µL de SYBR;

11,4µL de Primer Fw;

