

**RITA DE CÁSSIA MONTEIRO BATISTA**

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DO TRANSPORTADOR MITOCONDRIAL  
DE ADENILATOS  $AtAAC1$**

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

Orientador: Adriano Nunes Nesi

**VIÇOSA - MINAS GERAIS**

**2020**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

B333c  
2020

Batista, Rita de Cássia Monteiro, 1995-  
Caracterização fisiológica do transportador mitocondrial de adenilatos AtAAC1 / Rita de Cássia Monteiro Batista. - Viçosa, MG, 2020.  
46 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Adriano Nunes Nesi.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.38-44.

1. Translocador 1 do Nucleotídeo Adenina. 2. Mitocôndrias.  
3. Células - Metabolismo. 4. Respiração celular. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22. ed. 571.2

**RITA DE CÁSSIA MONTEIRO BATISTA**

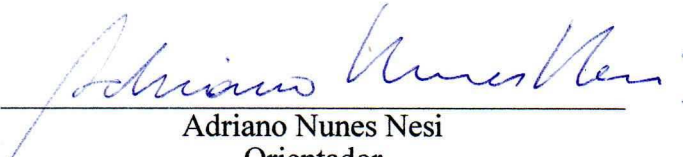
**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DO TRANSPORTADOR MITOCONDRIAL DE  
ADENILATOS *AtAAC1***

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

APROVADA: 30 de outubro de 2020.

Assentimento:

  
Rita de Cássia Monteiro Batista  
Autora

  
Adriano Nunes Nesi  
Orientador

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais Cicero Batista e Cida Monteiro  
por todo amor, carinho, ensinamento e exemplo.

Ao meu amado esposo pelo amor, dedicação, incentivo e  
companheirismo.

**Com carinho,  
Dedico.**

*“Confia ao SENHOR as tuas obras, e teus pensamentos serão  
estabelecidos.”*

*Provérbios 16.4*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua graça infinita, pelo seu plano, tempo e cuidado, por me levar por caminhos muito maiores e melhores do que os que já sonhei.

Aos meus pais Cicero Batista e Cida Monteiro, por todo amor e confiança, que apesar da distância, estão sempre comigo, me fortalecendo, dia-a-dia, a cada ligação, cada vídeo-chamada.

Ao meu amado esposo Luís Assis, por todo amor, carinho e paciência do mundo, por ser minha base, meu sustento, meu refúgio, minha família.

À minha irmã Débora Lyria e ao meu irmão Wênis por serem irmãos incríveis e serem pessoas tão importantes para mim.

Às minhas tias Luciana e Luciene Monteiro e toda minha família, por todo incentivo, oração, palavra de apoio e ensinamento.

À minha sogra, sogro e cunhadas por todo apoio a nossa vinda à Viçosa e por todo amor e carinho.

Ao meu orientador prof. Dr. Adriano Nunes Nesi, pelos direcionamentos, disposição e comprometimento em me orientar em benefício do meu crescimento profissional.

Aos demais Professores do curso pela contribuição no meu crescimento profissional. À Dr. Paula Pereira, Dr. Elias Feitosa, M.Sc Roberto Neri, M.sc Amanda Batista e Dr. Marcello Vaz por toda ajuda no planejamento dos experimentos, as ideias e esforços investidos nesse trabalho.

À professora Dr. Josabete por ter me motivado ao longo de toda graduação, por ser minha mãe científica e amiga.

Ao pastor Dário e toda Igreja Batista de Canhotinho, por toda instrução, pelas orações e por todo carinho.

Aos meus amigos e primos Jonathan David, Dayanne Michelle, Wellington Bizarria, Mônica Santos, Willian Xavier, Eduardo Lucas, Gisele Leite, Giovanna Oliveira e Maísa Laurentino por tornarem a vida mais leve.

Aos meus amigos de turma do mestrado, especialmente a Maria Carolina, Rafaela, Lúbia, Barbara e Pablo por todo companheirismo e lealdade.

Aos meus amigos da graduação, a Tamires, Michelle, Raquel, Daniela, Maianne, Maura, Marlon, Caio e Marcos.

À toda equipe da Unidade de Crescimento de Plantas, em especial a Paula, Jonas, Marcelle, Hellen, Débora, Alice, Allan e Welder pela amizade, auxílio nos experimentos, convívio e momentos de descontração.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de estudos. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de realização do curso de mestrado em Fisiologia Vegetal.

Enfim, a todos que de maneira direta ou indiretamente participaram e contribuíram para que fosse possível a conclusão de mais esta etapa, sou sinceramente grata.

## RESUMO

BATISTA, Rita de Cássia Monteiro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2020.  
**Caracterização fisiológica do transportador mitocondrial de adenilatos AtAAC1.**  
Orientador: Adriano Nunes Nesi.

As células necessitam de energia para a manutenção de vários processos metabólicos. Adenosina trifosfato (ATP) é um metabólito central no metabolismo celular, participando de inúmeras transações energéticas, e assim considerado uma fonte de energia biológica universal em todos organismos vivos. Em tecidos heterotróficos a mitocôndria é a organela responsável pela maior parte do suprimento do ATP necessário para os processos metabólicos. Para sua utilização, os adenilatos (adenosina monofosfato, AMP; adenosina difosfato, ADP; e ATP) são distribuídos entre os compartimentos celulares via proteínas carreadoras especializadas em transporte. Dentre essas proteínas se encontram os carreadores do tipo antiporte ADP/ATP (AACs), que exportam o ATP da matriz mitocondrial para o citosol e em troca importam o ADP do citosol. Em *Arabidopsis thaliana* são encontradas três isoformas de AACs (AAC1, AAC2 e AAC3). Entre essas isoformas, o AAC1 é a mais expressa em diferentes tecidos e estágios fenológicos. Contudo, a sua função fisiológica ainda não foi elucidada em plantas. Neste trabalho, avaliou-se o papel do transportador mitocondrial AAC1 em *A. thaliana*. Para tal, foram utilizadas uma linha mutante com inserção de T-DNA (KO) e quatro linhas antisense sob o controle do promotor 35S (AS2, AS4, AS5 e AS7) com reduzida expressão de AAC1. Em folhas expandidas de plantas deficientes na expressão de AAC1, observou-se redução nas taxas de respiração noturna sem alterações em parâmetros de fotossíntese em relação a plantas selvagens. Adicionalmente, foram observados diminuição no número de folhas e na área foliar específica. Verificou-se também acúmulo de açúcares (glicose, frutose, sacarose) e malato em folhas das plantas com baixa expressão de AAC1. Observou-se maiores teores de aminoácidos em paralelo com menores conteúdos de proteínas em folhas. Nas raízes, a deficiência na expressão de AAC1 resultou em menor crescimento, o qual foi associado a menores taxas respiratórias nos tecidos desse órgão. Em conjunto, os resultados apresentados sugerem que AAC1 desempenha um papel importante na respiração mitocondrial impactando o crescimento da planta como um todo, sem alterações marcantes na eficiência fotossintética.

Palavras-chave: Translocador 1 do Nucleotídeo Adenina. Mitocôndrias. Células - Metabolismo. Respiração celular.

## ABSTRACT

BATISTA, Rita de Cássia Monteiro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2020. **Physiological characterization of mitochondrial adenylates transporter AtAAC1.** Advisor: Adriano Nunes Nesi.

Cells need energy to maintain various metabolic processes. Adenosine triphosphate (ATP) is a central metabolite in cellular metabolism, participating in numerous energy transactions, and thus considered a source of universal biological energy in all living organisms. In heterotrophic tissues, mitochondria are the organelle responsible for most of the ATP supply necessary for metabolic processes. For their use, adenylates (AMP, ADP and ATP) are distributed among the cell compartments via transport-specialized carries proteins. Among these proteins are carriers of the Type Antiport ADP/ATP (AACs), which export the ATP from the mitochondrial matrix to the cytosol and in return import the ADP of the cytosol. In *Arabidopsis thaliana*, three isoforms of AACs are found: AAC1, AAC2 and AAC3. Among these isoforms, AAC1 is the most expressed in different tissues and phenological stages. However, its physiological function has not yet been fully elucidated in plants. In this work, the role of mitochondrial transporter AAC1 in *A. thaliana* was evaluated. For this, we used a mutant line with T-DNA (KO) insertion and four antisense lines under the control of promoter 35S (AS2, AS4, AS5 and AS7) with reduced expression of AAC1. In expanded leaves of plants deficient in the expression of AAC1, there was a reduction in dark respiration rates without changes in photosynthesis parameters in relation to wild plants. Additionally, was observed a decrease in the number of leaves and in the specific leaf area. There was also accumulation of sugars (glucose, fructose, sucrose), and malate in leaves of plants with low expression of AAC1. A decrease in the number of leaves and in the specific leaf area was observed. There was also accumulation of sugars (glucose, fructose, sucrose) and malate in leaves of plants with low expression of AAC1. A decrease in the number of leaves and in the specific leaf area was observed. There was also accumulation of sugars (glucose, fructose, sucrose), and malate in leaves of plants with low expression of AAC1. Higher amino acid contents were observed in parallel with lower protein contents in leaves. In the roots, the deficiency in the expression of AAC1 resulted in lower growth, which was associated with lower respiratory rates in the tissues of this organ. Together, the results presented suggest that AAC1 plays an important role in mitochondrial respiration impacting plant growth as a whole, without marked changes in photosynthetic efficiency.

Keywords: Translocator 1 of the Adenine Nucleotide. Mitochondria. Cells - Metabolism. Cellular respiration.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Isolamento e caracterização fenotípica de linhagem mutante e antisense para o transportador mitocondrial de adenilatos (AAC1) em <i>Arabidopsis thaliana</i>	11
Figura 2	Efeito da redução da expressão de AAC1 nos parâmetros de trocas gasosas em folhas de plantas de <i>A. thaliana</i> com cinco semanas de idade	15
Figura 3	Quantificação de pigmentos fotossintético e de alguns metabólitos de <i>A. thaliana</i> com expressão reduzida de AAC1 em plantas com cinco semanas de idade	16
Figura 4	Quantificação de metabólitos em folhas de <i>A. thaliana</i> com expressão reduzida de AAC1 em plantas com cinco semanas de idade	17
Figura 5	Avaliação do crescimento radicular a partir de sementes de <i>A. thaliana</i> com expressão reduzida de AAC1	18
Figura 6	Taxa de consumo de O <sub>2</sub> em plantas de <i>A. thaliana</i> com expressão reduzida para AAC1 em plantas com quatro semanas de idade	19
Figura 7	Visão geral das principais alterações fisiológicas da redução de AAC1 em folhas totalmente expandidas e iluminadas e no crescimento radicular em <i>A. thaliana</i> .	21

## LISTA DE ABREVIACOES

AAC1	Adenine nucleotide translocator 1
AAC2	Adenine nucleotide translocator 2
AAC3	Adenine nucleotide translocator 3
ADNT1	Adenine nucleotide transporter 1
ADP	Adenosine diphosphate
AFE	Área Foliar Específica
AFER	Área Foliar Específica da Roseta
AMP	Adenosine monophosphate
APC	Adenine nucleotide/Phosphate Carrier
AFT	Área foliar total
AOX	Alternative oxidase
AS	Anti sense
ATP	Adenosine triphosphate
ATPNC1	Peroxisomal adenine nucleotide carrier 1
ATPNC2	Peroxisomal adenine nucleotide carrier 2
Ca	Concentração de CO <sub>2</sub> no ar
CAN	Canamicina
Ci	Concentração interna de CO <sub>2</sub>
Col-0	Columbia 0
DNA	Desoxyribonucleic acid
ER-ANT1	Endoplasmic reticulum-adenine nucleotide transporter 1
ERO	Espcie Reativa de Oxignio
EST	Expressed Sequence Tag
ETR	Taxa de Transporte de Eltrons

IRGA	Infrared gas analyzer
gs	Condutância estomática
MCF	Mitochondrial carrier family
mCTE	Mitochondrial chain transport electron
MFR	Massa Fresca da Roseta
NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NTT1	Nucleotide Transporter 1
NTT1	Nucleotide transporter 1
NTT2	Nucleotide Transporter 2
NTT2	Nucleotide transporter 2
PCR	Polymerase chain reaction
PM-ANT1	Plasmatic membrane-adenine nucleotide transporter 1
PSII	Photosystem II
RNA	Ribonucleotide Acid
TAAC	Thylakoid ATP/ADP carrier
TCA	Tricarboxilic Cicle Acid

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
2.1 Construção do alinhamento de sequências de aminoácidos.....	18
2.2 Material Vegetal.....	18
2.3 Análises de expressão gênica.....	18
2.4 Condições de Crescimento.....	19
2.5 Análises biométricas.....	19
2.6 Análises de trocas gasosas e fluorescência .....	20
2.7 Análises de tecidos heterotróficos.....	20
2.8 Processamento das amostras e extração de metabólitos .....	21
2.9 Avaliação das taxas respiratórias em raízes e folhas.....	21
2.10 Análises estatísticas .....	21
<b>3 RESULTADOS</b> .....	<b>22</b>
3.1 Similaridade do transportador de adenilatos AtAAC1 com os demais transportadores de adenilatos .....	22
3.2 Isolamento de mutantes com inserção de T-DNA e linhas antisense para o transportador AAC122 .....	22
3.3 Avaliação dos parâmetros de trocas gasosas e fluorescência.....	24
3.4 Avaliação do metabolismo em folhas.....	25
3.5 Crescimento Radicular .....	30
3.6 Consumo de O <sub>2</sub> .....	31
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	<b>32</b>
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	<b>37</b>
<b>6 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>38</b>
<b>7 DADOS SUPLEMENTARES</b> .....	<b>45</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A compartimentalização intracelular das vias metabólicas é uma característica de todos os organismos eucariotos, sendo necessária para a separação física de diversas reações bioquímicas, bem como de seus produtos. Os compartimentos celulares são, em sua grande maioria, delimitados por membranas seletivas, permitindo a formação de microambientes específicos, essenciais para o funcionamento das células (Solymosi and Schoefs, 2019).

Para catalisar a passagem de precursores, intermediários e produtos através dos compartimentos subcelulares, as membranas biológicas hospedam várias proteínas estruturais e funcionais que possibilitam o transporte de metabólitos entre diferentes organelas (Krueger et al., 2011). Além de delimitar os espaços intracelulares, a existência de membranas biológicas em mitocôndrias e cloroplastos permite formação de uma força próton motriz nos espaços intermembranas dessas organelas, desempenhando, dessa forma, um papel fundamental no funcionamento do complexo ATP sintase formando adenosina trifosfato (ATP) para os organismos vivos (Lane and Martin, 2012).

Grande parte dos metabólitos intermediários e produtos são transportados através das membranas por proteínas pertencentes à Família de Transportadores Mitocondriais (MCF, do inglês Mitochondrial Carrier Family) (Palmieri et al., 2011). Contudo, a localização e a função fisiológica das proteínas MCF não se restringe às mitocôndrias, visto que muitas delas estão localizadas no cloroplasto, peroxissomo e retículo endoplasmático (Ferne et al., 2020; Nunes-Nesi et al., 2020). Os transportadores pertencentes à família MCF são estruturalmente relacionados, caracterizando-se por uma estrutura transmembrana padrão de seis  $\alpha$ -hélices, distribuídas em três módulos repetitivos em tandem, cada qual contendo aproximadamente 100 aminoácidos e com um peso molecular semelhante (30-35 kDa) (Picault et al., 2004). Essas proteínas medeiam o transporte específico de vários substratos, tais como, aminoácidos, nucleotídeos, dicarboxilatos, cofatores ou  $H^+$  (Haferkamp and Schmitz-Esser, 2012; Palmieri et al 2011). Apesar da semelhança estrutural entre os membros, muitas diferenças marcantes existem no que diz respeito aos papéis bioquímicos e fisiológico das proteínas carreadoras mitocondriais (Nunes-Nesi et al., 2020). Dessa forma, tornam-se necessários estudos para identificar e caracterizar as funções de todos os membros, através da determinação dos parâmetros bioquímicos, da especificidade de seus substratos, padrão de expressão e papel fisiológico.

As células necessitam de energia para a manutenção de vários processos metabólicos (Geigenberger et al., 2010). O ATP é um metabólito central no metabolismo celular, participando de inúmeras transações energéticas, logo, é considerado uma fonte de energia biológica universal em todos organismos vivos (Reiser et al., 2004; Lehninger et al., 2014). Além do fornecimento energético, o ATP é necessário durante a replicação do DNA, requerido na biossíntese, montagem e no transporte de proteínas, bem como fornecedor de adenosina para síntese de alguns metabolitos (Hara and Kondo, 2015). Adicionalmente, o ATP desempenha importante papel na resposta ao estresse e na transdução de sinais (Cao et al., 2014; Hara and Kondo, 2015; Sivaramakrishnan and Fountain, 2015).

Nas células vegetais, a biossíntese de ATP ocorre principalmente na etapa fotoquímica da fotossíntese, nos cloroplastos, e via fosforilação oxidativa, na mitocôndria, por meio da atividade da ATP sintase, a qual converte ADP e fosfato inorgânico (Pi) em ATP (Ferne et al., 2004; Voon et al., 2018). Além disso, durante o processo respiratório também ocorre a produção de ATP por fosforilação a nível de substrato na glicólise e no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (ciclo TCA) (Bonora et al., 2012).

Os adenilatos (AMP, ADP e ATP) são necessários em diferentes organelas, sendo adequadamente distribuídos entre os diversos compartimentos. Entretanto, os adenilatos não atravessam livremente membranas, devido ao tamanho relativamente grande e à natureza elétrica dessas moléculas (Reiser et al., 2004). Assim, para que a partição de energia no interior da célula ocorra de maneira eficiente, proteínas transportadoras especializadas desempenham um papel fundamental no transporte desses metabólitos através das membrana internas da mitocôndria e do cloroplasto (Geigenberger et al., 2010; Haferkamp and Schmitz-Esser, 2012; da Fonseca-Pereira et al., 2018).

Todos os transportadores de adenilatos identificados até o momento pertencem à família MCF (da Fonseca-Pereira et al., 2018). No genoma de *Arabidopsis*, foram identificados 58 membros de proteínas pertencentes à MCF (Palmieri et al., 2011). Destes, três grupos de proteínas são responsáveis pelo transporte de adenilatos através da membrana mitocondrial interna. São eles: Adenine nucleotide/Phosphate Carriers (APCs), Adenine Nucleotide Transporter 1 (ADNT1) e AACs1-3. Devido à importância dos adenilatos para as diversas vias bioquímicas, as proteínas transportadoras de ATP tem um papel fundamental no acoplamento de reações exergônicas e endergônicas (Geigenberger et al., 2010). Logo, o transporte do

ADP/ATP mediado por esses transportadores está relacionado à manutenção da homeostase celular e à partição de energia entre as organelas (da Fonseca-Pereira et al., 2018).

Os APCs são transportadores responsáveis por mediar a exportação de Pi para o citosol e a importação de adenilatos para a matriz mitocondrial (Lorenz et al., 2015). Esses transportadores são os únicos identificados até o momento capazes de alterar o pool de adenilatos na matriz mitocondrial (Monné et al., 2015). O transportador ADNT1, promove a exportação do ATP para o citosol em troca, preferencialmente, de AMP. O papel fisiológico desse transportador em *Arabidopsis* está relacionado com o processo respiratório em raízes (Palmieri et al., 2008). Além disso, a baixa expressão de ADNT1 antecipa a senescência natural das plantas em condições normais e de deficiência de carbono por escuro prolongado (Pereira, 2013). Os transportadores do grupo dos AACs medeiam a passagem eletrogênica do ADP/ATP, em que uma molécula de ADP citossólica é transportada em troca de uma molécula de ATP proveniente da matriz mitocondrial (Ogunbona and Claypool, 2019).

Entre as proteínas pertencentes à MCF, os AACs são os transportadores mais abundantes encontrados na membrana interna das mitocôndrias (Haferkamp and Schmitz- Esser, 2012). São altamente relacionados aos seus ortólogos de animais e leveduras tanto em estrutura como em função (Fontanesi et al., 2004; Haferkamp and Schmitz-Esser, 2012). Em humanos, existem quatro isoformas para o transportador de ADP/ATP, sendo o nucleotídeo de adenina translocase tipo 1 (ANT1) a isoforma mais expressa em tecidos do músculo esquelético, coração e cérebro (Dolce et al., 2005). Mutações associadas ao gene humano ANT1 implica em uma série de desordens mitocondriais provocadas por múltiplas deleções do DNA mitocondrial, o que acarreta em miopatia mitocondrial e cardiomiopatia, síndrome de Senger, entre outros distúrbios patológicos (Sharer, 2005; Echaniz-Laguna et al., 2012). Em *Saccharomyces cerevisiae*, a ausência do principal portador mitocondrial de ADP/ATP resulta em um defeito específico na atividade da enzima citocromo c oxidase (Ogunbona and Claypool, 2019). Em *Trypanosoma brucei* o silenciamento de TbAAC resultou em alterações do crescimento que coincide com uma redução significativa da síntese de ATP. Além disso, houve redução do nível de ATP citossólico, um aumento no potencial de membranas e maior quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Gnipová et al., 2015).

Em plantas de *Arabidopsis*, três genes nucleares codificam isoformas de proteínas AAC (At3g08580, AAC1; At5g13490, AAC2; e At4g28390, AAC3) (Haferkamp et al., 2002). Estes são caracterizados por uma extensão do terminal N, contendo cerca de 60 resíduos de

aminoácidos (Haferkamp and Schmitz-Esser, 2012). Análises proteômicas e *in silico* sugerem que as isoformas das proteínas AACs tem um importante papel nas funções de manutenção e envolvimento com respostas ao estresse (da Fonseca-Pereira et al., 2018). Entre as isoformas, o gene AAC1 é distintamente o mais expresso, independentemente do tipo de órgão e do estágio de desenvolvimento, enquanto que genes AAC2 e AAC3 são regulados positivamente na fase reprodutiva nos tecidos florais, síliquas e grão de pólen, porém, são expressos em níveis relativamente inferiores em todos os tecidos vegetativos (Batista, 2019). Além do mais, entre as proteínas transportadoras mitocondriais, AAC1 é a isoforma mais abundante (Fuchs et al., 2020), apresentando mais de 300 ESTs (do inglês: Expressed Sequence Tag), o que corresponde ao triplo do segundo membro mais abundantemente registrado, o Transportador de Fosfato 1 (do inglês Phosphate Carrier 1 [PiC1; At5g14040]) (Picault et al., 2004; Haferkamp, 2007; Fernie et al., 2020). Com isso, sugere-se que o transportador AAC1 desempenha um papel fundamental na partição energética em *Arabidopsis* (Haferkamp, 2007; Fernie et al., 2020; Nunes-Nesi et al., 2020).

Em teoria, a redução da expressão dos AACs resultaria em uma menor quantidade destes transportadores, o que colaboraria para uma menor capacidade de distribuição do ATP da matriz mitocondrial para o citosol. Logo, a atividade da ATP Sintase seria comprometida por ocorrer redução das exportações/importações do ATP/ADP. A via respiratória é limitada pelo turnover de adenilatos, principalmente devido às limitações no suprimento desses metabólitos (O'Leary et al., 2019). O steady-state energético torna-se vulnerável quando este suprimento de ATP/ADP ocorre de maneira lenta (Geigenberger et al., 2010). Quando o steady-state energético é afetado, há uma propensão a uma maior redução da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria (mCTE) e, em consequência, espera-se um aumento do poder redutor na organela, podendo acarretar no desbalanço da homeostase redox mitocondrial e, até mesmo, em estresse oxidativo (Vishwakarma et al., 2015).

Alterações da expressão e/ou atividade de outros transportadores de adenilatos vem sendo investigadas como uma possível estratégia para a manutenção do steady-state energético em plantas com baixa expressão dos AACs. Batista (2019) observou que a mutação em proteínas AACs alterou a expressão de outras proteínas transportadoras de adenilatos em *Arabidopsis*, de forma a colaborar com um turnover dinâmico de adenilatos. Adicionalmente, a regulação positiva de complexos proteicos dissipadores de energia, como a da Oxidase Alternativa (AOX), também pode contribuir para homeostase redox mitocondrial, uma vez que esses

processos operam na membrana interna da mitocôndria, contribuindo para uma menor produção de ATP via processo respiratório (Vishwakarma et al., 2015).

Apesar dos diversos estudos bioquímicos e moleculares realizados nas últimas décadas envolvendo a identificação e caracterização de transportadores mitocondriais em plantas, o papel fisiológico dessas proteínas carreadoras de ADP/ATP não está esclarecido. Neste sentido, pouco se sabe sobre a função destes transportadores em plantas cultivadas sob condições ambientais ótimas ao crescimento e desenvolvimento vegetal, assim como em condições ambientais adversas. Portanto, é de grande importância verificar e compreender o papel fisiológico destas proteínas em plantas. Assim, o presente estudo teve como objetivo caracterizar fisiologicamente o papel de AAC1 em *A. thaliana*, buscando uma maior compreensão de como e em que nível uma menor expressão deste transportador afeta o metabolismo celular e o crescimento das plantas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Construção do alinhamento de sequências de aminoácidos

As sequências de aminoácidos do transportador AAC1 e dos demais transportadores adenilatos pertencentes à família MCF, foram coletadas em formato FASTA (Pearson and Lipman, 1988) e comparados, em sua extensão total, dois a dois utilizando a ferramenta ClustalW, com o objetivo de determinar a identidade de seus aminoácidos.

### 2.2 Material Vegetal.

Foram utilizadas plantas de *Arabidopsis thaliana* do tipo selvagem, ecotipo Columbia (Col-0) e cinco linhagens mutantes com reduzida expressão do gene que codifica para o transportador mitocondrial de adenilatos (AAC1; At3g8580). A linha denominada de KO é oriunda da coleção Institute Genome Analysis Laboratory - SIGnAL Salk (aac1; SALK\_134240C) e possui uma inserção de T-DNA, via *Agrobacterium tumefaciens* na região promotora do gene do transportador (Figura 1Bi). Plantas mutantes homozigotas foram selecionadas por meio de PCR, utilizando primers específicos para o gene AAC1 (AtAAC1: forward 5'- CGTAACACATGGGAGAACAATAGAGAAA-3', reverse 5'- TAAACTAAAGTCAACAGATCCAAACGATTTTGA-3' e para T-DNA primer LBb1.3: 5'- ATTTTGCCGATTTTCGGAAC-3'. Para a reação de PCR foram utilizados 35 ciclos de três etapas: (a) desnaturação a 95 °C por 45 segundos, (b) anelamento a 58 °C por 45 segundos e (c) extensão a 72 °C por um minuto e 25 segundos.

Utilizou-se também quatro linhagens transgênicas do tipo antisenso denominadas de AS2, AS4, AS5 e AS7. Para a construção das linhas antisenso, utilizou-se o promotor 35S contendo um marcador de resistência à Canamicina (Figura 1Bii). Plantas transgênicas homozigotas oriundas desses genótipos, foram selecionadas com base na resistência ao antibiótico, através de meio seletivo contendo canamicina a uma concentração de 50 µg ml<sup>-1</sup> e a expressão verificada por qRT-PCR (Figura 1C).

### 2.3 Análises de expressão gênica

Para verificar a expressão do gene AAC1 foi utilizada a técnica de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR). O RNA total foi extraído de folhas totalmente expandidas de plantas com cinco semanas de idade. Para a extração foi utilizado o reagente TRIzol® (Invitrogen™),

conforme as indicações do fabricante. Após a extração, o RNA total foi tratado com DNase/RNase-free (Invitrogen™) e quantificado em espectrofotômetro a 260nm. Para a síntese da fita de DNA complementar (cDNA) foi utilizado aproximadamente 2 µg de RNA. As reações de qRT-PCR foram realizadas utilizando-se o equipamento 7300 Real Time System (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) e o kit de amplificação Power SYBR® Green PCR Master Mix (Life Technologies/Applied Biosystem). Utilizou-se primers específicos forward 5'-CCCGCAATAAACTGAGATGTTG-3' e reverse 5'-AAAGTTGGCGTCAGAACGATATAA-3'. Como controle endógeno, foi utilizado o gene da actina (Czechowski et al., 2005). No total, foram utilizadas quatro plantas por linhagem e as amostras foram amplificadas em duplicata com as seguintes etapas: 50°C por 2 minutos, 95°C por 2 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95 °C por 3s, 60°C por 30 segundos e 95°C por 15 minutos.

## 2.4 Condições de Crescimento

Sementes foram superficialmente esterilizadas em 1mL de etanol 70% por 1 minuto e em 1mL de hipoclorito de sódio a 2% por 15 minutos. Em seguida, foram lavadas cinco vezes com ultrapura autoclavada. Após a esterilização, as sementes foram distribuídas em placas de Petri (90x15mm) sobre meio MS (Murashige and Skoog, 1962) com metade da força iônica, suplementado com 1% (p/v) de sacarose. As placas com as sementes foram submetidas ao processo de estratificação por um período de cinco dias a 4 °C no escuro. Posteriormente, as placas foram mantidas em sala de crescimento a 22 ± 2 °C, umidade relativa de 60%, irradiância de 150 µmol de fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 8 h de luz e 16 h de escuro, durante dez dias.

Após um período de 10 dias, as plântulas foram transplantadas para potes plásticos de 0.1 litros de capacidade em substrato comercial Carolina Soil Padrão EC 0,7 – 8 Kg. Após o transplante, as plântulas foram mantidas em câmara de crescimento nas mesmas condições supracitadas por um período de cinco semanas. As análises fisiológicas e bioquímicas descritas abaixo foram realizadas em plantas com cinco semanas de idade.

## 2.5 Análises biométricas

Plantas crescidas nas condições descritas no item 2.4, foram coletadas com cinco semanas de idade para avaliação dos seguintes parâmetros de crescimento: massa fresca da roseta (MFR), massa seca da roseta (MSR), área foliar da roseta (AFR), área foliar específica

da roseta (AFER), número de folhas (NF) e área foliar específica (AFE). A AFR e a AFT foram determinadas pelo método da imagem digital, onde as folhas foram digitalizadas com auxílio de um scanner (HP Scanjet G2410 1200X1200) e as imagens obtidas processadas com auxílio do software ImageJ (Baker et al., 1996). A AER e AFE foram estimadas utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{AFER (ou AFE)} = \text{AFR (ou AF)} / \text{MSR}$$

## 2.6 Análises de trocas gasosas e fluorescência

Os parâmetros de trocas gasosas foram avaliados através de um analisador de gases a infravermelho em sistema aberto (IRGA – Infrared Gas Analyzer), modelo LI 6400XT (LI-COR, Lincoln, NE, EUA), com fluorômetro acoplado (LI-6400-40, LI-COR Inc.) em plantas com cinco semanas, 30 minutos após o início do período luminoso. A concentração de referência de CO<sub>2</sub> foi definida em 400 mmol CO<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> de ar. Todas as medições foram realizadas usando a câmara foliar de 2 cm<sup>2</sup>, mantendo a temperatura do bloco em 25 °C e 150 μmol fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. As taxas de respiração foram determinadas durante o período de escuro, após um período de 30 minutos para aclimação da planta a esta condição. Para essas avaliações foram avaliadas seis plantas por genótipo.

## 2.7 Análises de tecidos heterotróficos

O crescimento radicular foi realizado conforme previamente descrito (Palmieri et al. (2008) com algumas modificações. As sementes foram semeadas em placas de Petri (90x15mm) sobre meio MS ½ força suplementado com 1% de sacarose. Posteriormente, as placas contendo as sementes foram estratificadas no escuro a 4°C por três dias. Após a estratificação, as placas foram dispostas verticalmente em sala de crescimento a 22 ± 2 °C, umidade relativa de 60%, irradiância de 150 μmol de fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 8 h de luz e 16 h de escuro, durante 5 dias. Após esse período, as plântulas foram transferidas para placas quadradas (120x120mm). Foram aplicados dois tratamentos: (i) MS suplementado com 1% de sacarose (p/v) e (ii) MS sem sacarose, permanecendo nas mesmas condições descritas a cima. Foram transplantadas um total de 18 plântulas por genótipo para cada tratamento. O comprimento das raízes foi avaliado diariamente num período total de dez dias. Então, crescimento radicular foi mensurado com auxílio do software ImageJ, sendo quantificado a distância entre os sucessivos pontos marcados ao longo do crescimento axial.

## **2.8 Processamento das amostras e extração de metabólitos**

Cinco rosetas inteiras de cada linhagem foram coletadas no meio do período luminoso e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e armazenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até as análises. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas e alíquotas de aproximadamente 20 mg de matéria fresca foram submetidas à extração metanólica conforme descrito por Salem et al. (2016).

Após a extração, foram quantificados na fração insolúvel os teores de amido (Fernie et al., 2001) e proteína (Bradford MM, 1976) e na fração solúvel os teores de clorofilas, nitrato (Sulpice et al., 2009), glicose, frutose e sacarose (Fernie et al., 2001) e dos ácidos orgânicos malato e fumarato (Nunes-Nesi et al., 2007).

## **2.9 Avaliação das taxas respiratórias em raízes e folhas**

As taxas de consumo de  $\text{O}_2$  foram avaliadas em plantas com quatro semana de idade, utilizando-se um eletrodo de  $\text{O}_2$  do tipo Clark, conforme descrito por Jiang et al. (2019). Antes de medir as taxas respiratórias, foi obtido o peso fresco das raízes e folhas e em seguida incubadas em tampão contendo 50 mM de HEPES (N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico), 10 mM de MES (ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico) (pH 6,6) e 0,2 mM de  $\text{CaCl}_2$ . Para evitar a interferência da luz as medições foram feitas no escuro por 20 minutos. A taxa de consumo de  $\text{O}_2$  foi calculada assumindo-se que a concentração de  $\text{O}_2$  no tampão saturado de ar era de  $260\text{ }\mu\text{M}$  a  $23^{\circ}\text{C}$ .

## **2.10 Análises estatísticas**

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis repetições. Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância e comparados por teste t de Student utilizando-se o algoritmo contido no software Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Seattle, WA, EUA), sendo considerados significativos os valores com  $P < 0,05$ .

### 3 RESULTADOS

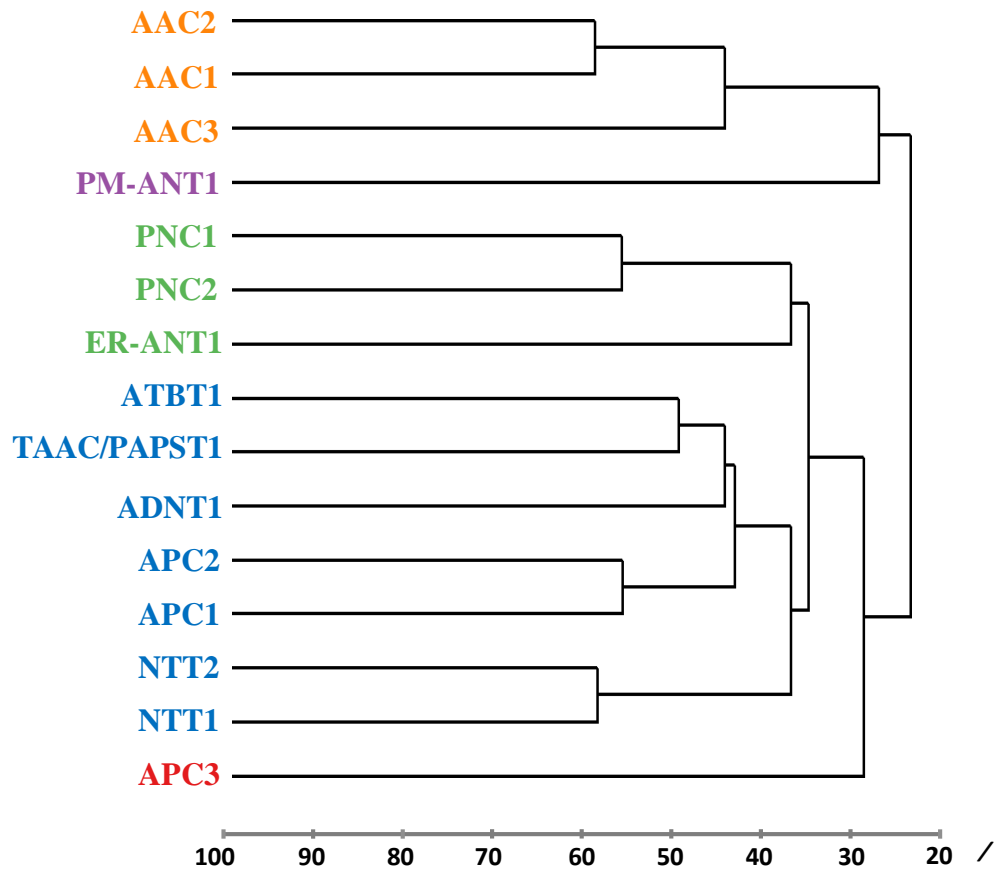
#### 3.1 Similaridade do transportador de adenilatos AtAAC1 com os demais transportadores de adenilatos

O genoma de *A. thaliana* possui 58 genes que codificam proteínas carreadoras pertencentes à MCF, entre os quais se encontram os genes AAC1-3 (Palmieri et al., 2011; Nunes-Nesi et al., 2020). A análise de comparação entre as sequências de aminoácidos dos membros AACs descritos em *A. thaliana* indica maior similaridade entre as sequências de aminoácidos da proteína AAC1 com as sequências de AAC2 e AAC3, com similaridade de 82,28% e 64,12%, respectivamente (Tabela suplementar 1). Ainda de acordo com análise de similaridade dos aminoácidos, o gene AAC1 está agrupado com a proteína codificada pelo gene PM-ANT1 (Picault et al., 2004; Zhang et al., 2016), o qual está localizado na membrana plasmática em plantas (Figura 1A).

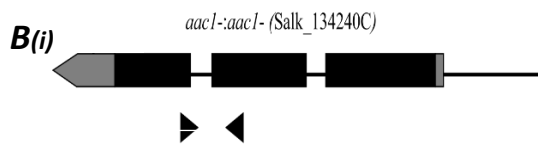
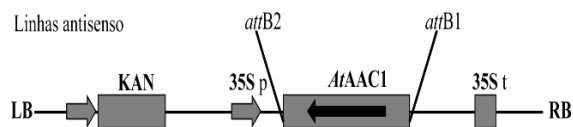
#### 3.2 Isolamento de mutantes com inserção de T-DNA e linhas antisense para o transportador AAC1

Para caracterizar o papel fisiológico dos transportador AAC1, foram selecionadas linhagens homozigotas de *A. thaliana* com inserção de T-DNA e geradas linhas antisense sob o controle do promotor 35S. A linhagem SALK\_134240C isolada para o gene AAC1, apresenta uma inserção de T-DNA na região promotora (Figura 1Bi) e com forte redução na expressão de AAC1 (Figura 1C). Paralelamente, após a transformação com a construção antisense (Figura 1Bii) foram obtidas plantas resistentes a canamicina. Destas plantas selecionadas foram isoladas quatro com redução na expressão do AAC1 (Figura 1C), as quais foram utilizadas lado a lado com a linha mutante e o tipo selvagem (WT) nos experimentos realizados. A linha KO apresentou apenas 8,75% da expressão de AAC1 observada no WT, enquanto as linhagens antisense AS5, AS7, AS4 e AS2 apresentaram 6,59%, 10,64%, 20,68% e 21,37% da expressão observada no WT respectivamente (Figura 1C).

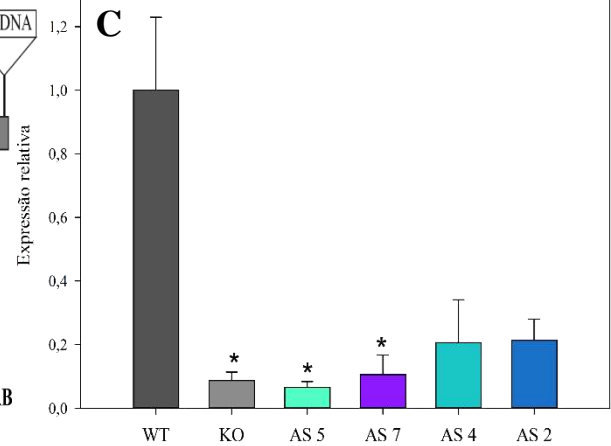
A



B

**B(ii)**

C



D



**Figura 1.** Isolamento e caracterização fenotípica de linhagem mutante e antisense para o

transportador mitocondrial de ATP (AAC1) em *Arabidopsis thaliana*. A, dendograma demonstrando similaridade entre as sequências de aminoácidos dos transportadores mitocondriais de adenilatos identificados em *A. thaliana*. B, representação esquemática do gene AtAAC1(At3g08580), Bi, inserção do T-DNA. As caixas representam os éxons e as setas próximas ao T-DNA a posição dos primers usados na seleção das plantas mutantes. Bii, as linhagens antisense apresentam o gene de resistência à canamicina (CAN), o promotor 35S e o gene AAC1 na orientação antisense e um terminador 35S. C, expressão de AAC1 em folhas de *A. thaliana* do tipo selvagem (WT) e nas respectivas linhagens transgênicas. D, fenótipo das rosetas dos genótipos de *A. thaliana* com cinco semanas de idade com reduzida expressão dos transportador de adenilato AAC1 em relação ao WT. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de quatro plantas e os asteriscos indicam diferenças significativas pelo teste t de Student ( $P < 0.05$ ) em comparação com o WT. As plantas avaliadas possuíam cinco semanas de idade no momento da coleta. Siglas: AAC1 (At3G08580): ADP/ATP carrier 1, AAC2 (At5G13490): ADP/ATP carrier 2, AAC3 (At4g28390): ADP/ATP carrier 3, APC1 (At5g61810) : Adenine nucleotide/Phosphate Carrier 1, APC2 (At5g51050): Adenine nucleotide/Phosphate Carrier 2, APC3 (At5g07320): Adenine nucleotide/Phosphate Carrier 3, ADNT1(At4g01100): Adenine Nucleotide Transporter 1, NTT1(At1g80300): nucleotide transporter 1, NTT2 (At1g15500): nucleotide transporter 2, TAAC/PAPST1 (At5g01500): PAPS/PAP carrier in plastids and an ATP/ADP carrier in the thylakoid membrane, ATBT1(At4g32400): *Arabidopsis* Brittle 1 PCN1 (At3g05290): Peroxisomal adenine nucleotide carrier 1, PCN2 (At5g27520): Peroxisomal adenine nucleotide carrier 2, ER-ANT1(At5g17400): Endoplasmic Reticulum Adenylate Transporter1, PMANT1(At5g56450): Plasma Membrane Adenylate Transporter.

### 3.3 Avaliação dos parâmetros de trocas gasosas e fluorescência

Após a genotipagem das linhas com baixa expressão de ACC1, plantas dos seis genótipos foram cultivadas lado a lado sob as mesmas condições e avaliadas na quinta semana de cultivo. Apesar das diferenças marcantes em termos de expressão de AAC1 entre os genótipos não foram observadas diferenças visuais entre plantas, não tendo sido observados fenótipos anormais visíveis nos transgênicos durante o crescimento vegetativo (Figura 1D). Entretanto, uma avaliação mais detalhada das plantas mutantes demonstrou que as linhas transgênicas apresentaram uma redução no número de folhas (NF) de 8,68%, 9,68%, 14,79%, 10,71% e 9,99% para linhas KO, AS5, AS7, AS4 e AS2, respectivamente, em comparação com o WT (Tabela 1). Verificou-se também uma redução na área foliar específica (AFE) nas linhas KO, AS5 E AS7 e área foliar específica da roseta (AFER) nas linhas KO, AS5, AS7 e AS4. Contudo, foi observado um aumento da massa seca da roseta (MSR) nas linhas KO, AS5 e AS7 (Tabela 1).

**Tabela 1.** Parâmetros de crescimento de plantas de *Arabidopsis* com baixa expressão do gene AAC1. Plantas cultivadas em sala de crescimento a  $22 \pm 2$  °C, umidade relativa de 60%, irradiância de  $150 \mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 8 h de luz e 16 h de escuro. As avaliadas possuíam cinco semanas de idade.

PARÂMETROS	WT	KO	AS5	AS7	AS4	AS2
MFR	0.8±0.03	0.97±0.07	0.962±0.01	0.850±0.05	0.84±0.034	<b>0.7487±0.04</b>
MSR	0.08±0.003	<b>0.11±0.007</b>	<b>0.104±0.005</b>	<b>0.107±0.006</b>	0.088±0.002	0.080±0.006
NF	32.66±0.49	<b>29.833±0.7</b>	<b>29.5±1.112</b>	<b>27.83±0.945</b>	<b>29.16±1.013</b>	<b>29.4±0.846</b>
AFT	36.68±1.36	37.99±2.55	31.83±3.241	35.25±2.91	36.74±1.75	35.258±1.94
AFE	42.94±2.51	<b>34.63±1.48</b>	<b>39.91±1.638</b>	<b>34.97±1.69</b>	34.60±2.11	35.85±1.409
AFER	34.44±1.67	<b>29.32±2.191</b>	<b>23.64±1.912</b>	<b>27.27±1.190</b>	<b>27.61±0.269</b>	27.169±1.441

Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de cinco amostras independentes. Abreviações: \*MFR: massa fresca da roseta; MSR: massa seca da roseta (g), NF: número de folhas, AFT: área foliar total ( $\text{cm}^2$ ), AFE: área foliar específica ( $\text{m}^2 \text{kg}^{-1}$ ), AFR: área foliar da roseta ( $\text{cm}^2$ ), AFER: área foliar específica da roseta ( $\text{m}^2 \text{kg}^{-1}$ ).

A deficiência na expressão de AAC1 não afetou os parâmetros de trocas gasosas referentes a taxas de fotossíntese líquida, concentração interna de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ), razão da concentração interna de  $\text{CO}_2$  em relação a concentração de  $\text{CO}_2$  do ar ( $C_i/C_a$ ), e a condutância estomática ( $g_s$ ) (Figura 2A, B, C). De forma similar, não foram observadas diferenças significativas das linhas transgênicas em comparação ao WT quanto à taxa de transporte de elétrons (ETR) (Figura 2D). Contudo, verificou-se uma redução significativa nas taxas de respiração noturna ( $R_d$ ) (Figura 2F). Observou-se que as linhas KO, AS5, AS2 e AS7 reduziram significativamente suas taxas de respiração noturna em 16,61%, 25,09%, 17,96% e 17,55% em relação aos valores apresentados pelo WT, respectivamente (Figura 2F).

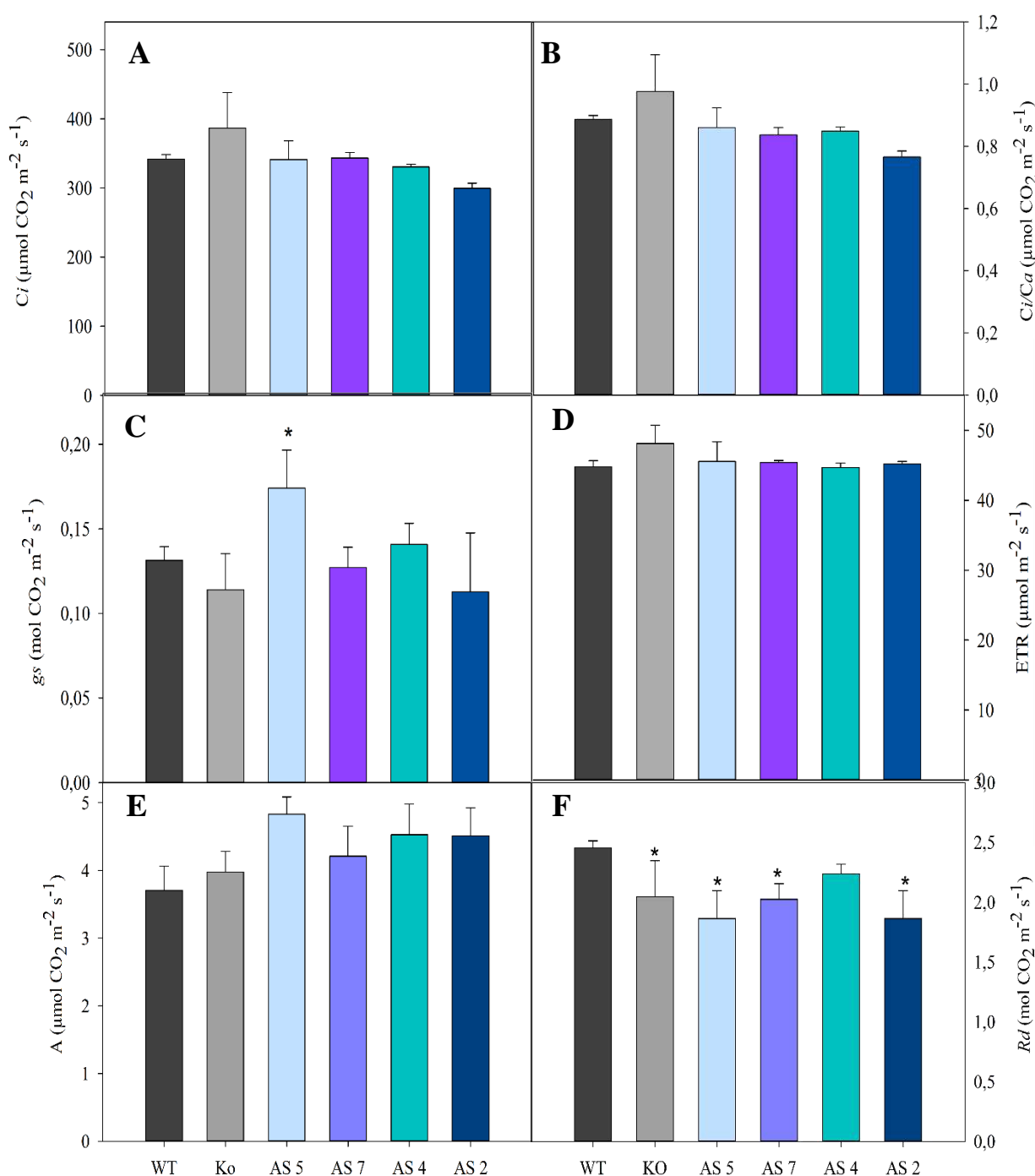
### 3.4 Avaliação do metabolismo em folhas

Para avaliar os efeitos resultantes da baixa da expressão dos transportador AAC1 no metabolismo, foram avaliados alguns compostos relacionados ao metabolismo do carbono e do nitrogênio, em folhas de plantas cultivadas sob condições ideais de crescimento, coletadas no

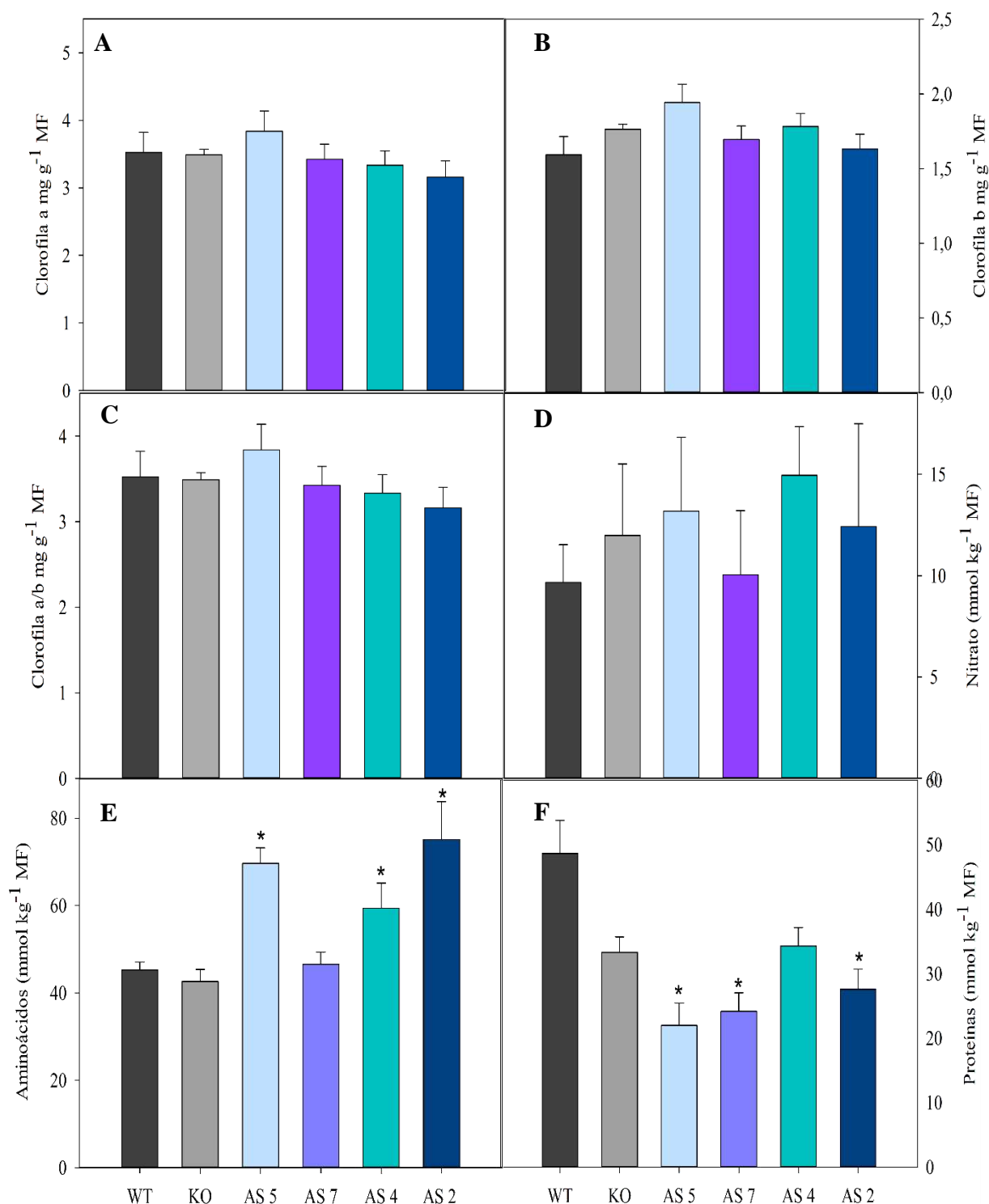
meio do período de luz. De acordo com as taxas inalteradas de fotossíntese e parâmetros de fluorescência, não foram verificadas alterações no conteúdo de clorofilas das plantas com expressão reduzida AAC1 em relação ao WT (Figura 3A-C). De forma similar, os conteúdos de nitrato não foram alterados significativamente nas linhas mutantes (Figura 3D). Entretanto, verificou-se um aumento no teor de aminoácidos totais em folhas das linhas AS4, AS5 e AS2 em relação ao WT (Figura 3E). Em relação aos teores de proteína total, houve uma tendência de redução em todas as linhas transgênicas, sendo significativo somente para as linhas AS5, AS2 e AS7 (Figura 3F).

Quanto aos compostos associados ao metabolismo do carbono, foram observadas diferenças na concentração de carboidratos não-estruturais entre as plantas transgênicas (Figura 4). Verificou-se aumento significativo nos níveis de glicose e frutose nas linhas mutantes e antisense em relação ao WT (Figura 4A e B). Já para sacarose, aumento significativo foi observado apenas em plantas das linhas AS5 e AS2 em relação ao WT (Figura 4C). Em relação aos teores de amido, a baixa expressão de AAC1 não alterou os níveis deste composto (Figura 4D).

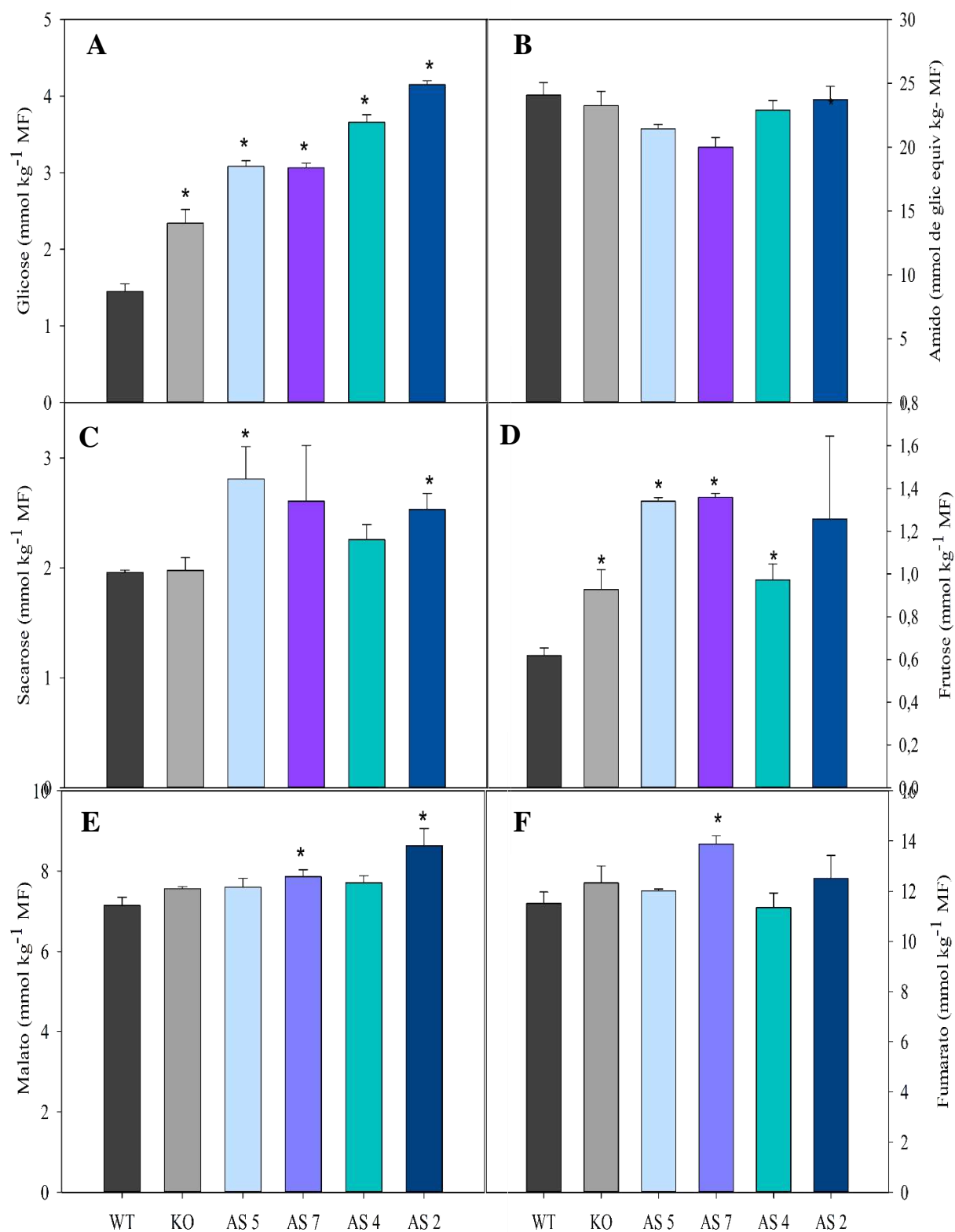
Em relação aos níveis de malato e fumarato, dois ácidos orgânicos envolvidos na respiração celular vegetal (Zell et al., 2010; Igamberdiev and Eprintsev, 2016), observou-se um aumento nas linhas AS5 e AS2, para malato e na linha AS7 para fumarato, em relação aos respectivos níveis observados em folhas de plantas WT (Figura 4E e F).



**Figura 2.** Efeito da redução da expressão de AAC1 nos parâmetros de trocas gasosas em folhas de plantas de *A. thaliana* com cinco semanas de idade. A, condutância estomática ( $g_s$ ). B, taxa de transporte de elétrons no PSII (ETR). C, concentração interna de CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ). D, razão entre as concentrações de CO<sub>2</sub> intercelular da folha e a do ar ( $C_i/C_a$ ). E, taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> ( $A$ ). F, respiração no escuro ( $R_d$ ). Valores representam a média  $\pm$  erro padrão de dez plantas individuais. Asteriscos indicam diferença significativa ( $P < 0.05$ ), segundo o teste t de Student, em comparação com o tipo selvagem (WT).



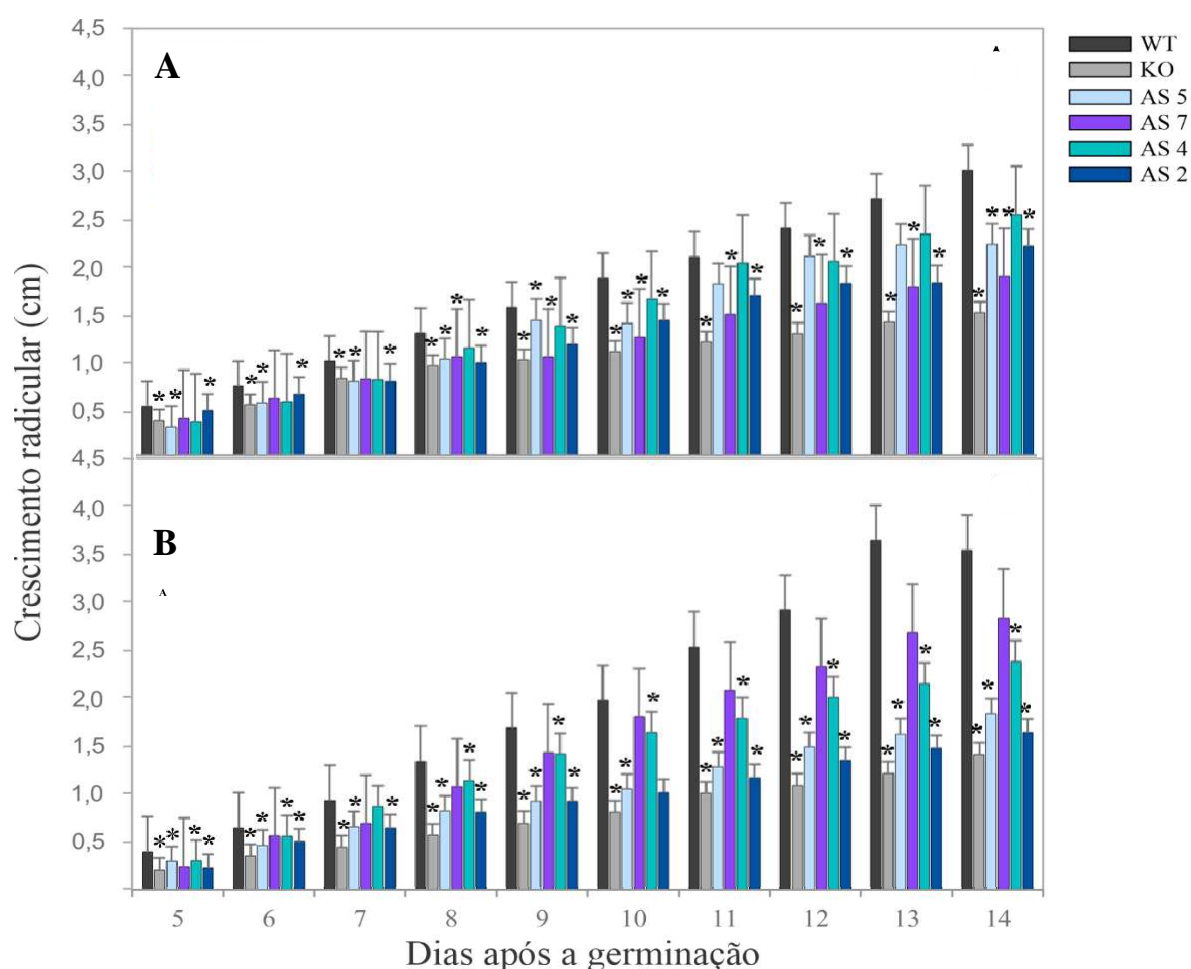
**Figura 3.** Níveis de pigmentos fotossintético e de alguns metabólitos relacionados com o metabolismo do nitrogênio em folhas de *A. thaliana* com expressão reduzida de AAC1 em plantas com cinco semanas de idade, no meio do período de luz. A, clorofila a; B, clorofila b; C, razão clorofila a/b; D, nitrato; E, aminoácidos; F, proteínas. Valores representam a média ± erro padrão de cinco plantas. Asteriscos indicam diferença significativa ( $P < 0.05$ ), segundo o teste t de Student, em comparação com o tipo selvagem (WT). MF: Massa Fresca.



**Figura 4.** Níveis de açúcares e ácidos orgânicos em folhas de *A. thaliana* com expressão reduzida de AAC1 em plantas com cinco semanas de idade. A, glicose; B, frutose; C, sacarose; D, amido; E, malato; F, fumarato. Valores representam a média  $\pm$  erro padrão de cinco plantas. Asteriscos indicam diferença significativa ( $P < 0.05$ ), segundo o teste t de Student, em comparação com o tipo selvagem (WT).

### 3.5 Crescimento Radicular

Com o objetivo de avaliar o efeito da redução da expressão do transportador AAC1 em tecidos radiculares, decidiu-se investigar o impacto dessa redução em relação ao crescimento radicular durante 14 dias após a germinação das sementes, na presença e ausência de sacarose no meio de cultivo (Figura 5). A suplementação do meio com sacarose, tem como finalidade o fornecimento externo de uma fonte de carbono, eliminando a dependência das sementes de suas próprias reservas. Logo, adição de sacarose pode promover a restauração fenotípica ou até certo ponto apontar limitações relacionadas a deficiências no metabolismo das sementes. De forma geral, observou-se uma redução significativa no crescimento radicular das linhas mutantes em relação ao WT, independente da adição ou não de sacarose ao meio de cultivo.

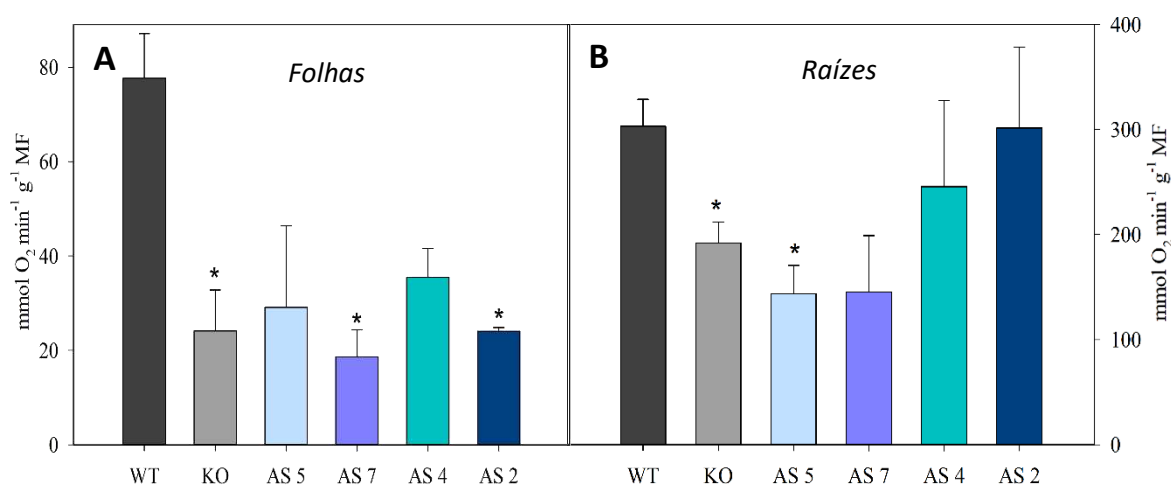


**Figura 5.** Crescimento radicular de plântulas de *A. thaliana* com reduzida expressão do transportador de adenilatos (AAC1). Comprimento radicular avaliado num período de 10 dias com sementes cultivadas em meio sem sacarose (A) e com 1% de sacarose (B). Valores representam a média  $\pm$  erro padrão de quatro placas, cada uma com seis sementes por genótipo

e os asteriscos indicam diferença significativa ( $P < 0.05$ ), segundo o teste t de Student, em comparação com o tipo selvagem (WT).

### 3.6 Consumo de O<sub>2</sub>

Visando investigar o efeito da redução da expressão do gene AAC1 sob a taxa respiratória de raízes e folhas de *A.thaliana*, foi avaliado o consumo de O<sub>2</sub>. Assim, verificou-se que a deficiência na expressão de AAC1 promoveu uma redução nas taxas de consumo de O<sub>2</sub> em folhas e raízes (Figura 6). Na parte aérea estas alterações foram significativas para as linhas KO, AS5 e AS2; já nas raízes as diferenças foram significativas nas linhas KO e AS5.



**Figura 6.** Taxa de consumo de O<sub>2</sub> em plantas de *A. thaliana* com expressão reduzida para AAC1 em plantas com 4 semanas de idade. A, consumo de O<sub>2</sub> em folhas. B, Consumo de O<sub>2</sub> nas raízes. Valores representam a média  $\pm$  erro padrão de três plantas individuais e os asteriscos indicam diferença significativa ( $P < 0.05$ ), segundo o teste t de Student, em comparação com o tipo selvagem (WT). MF: matéria fresca.

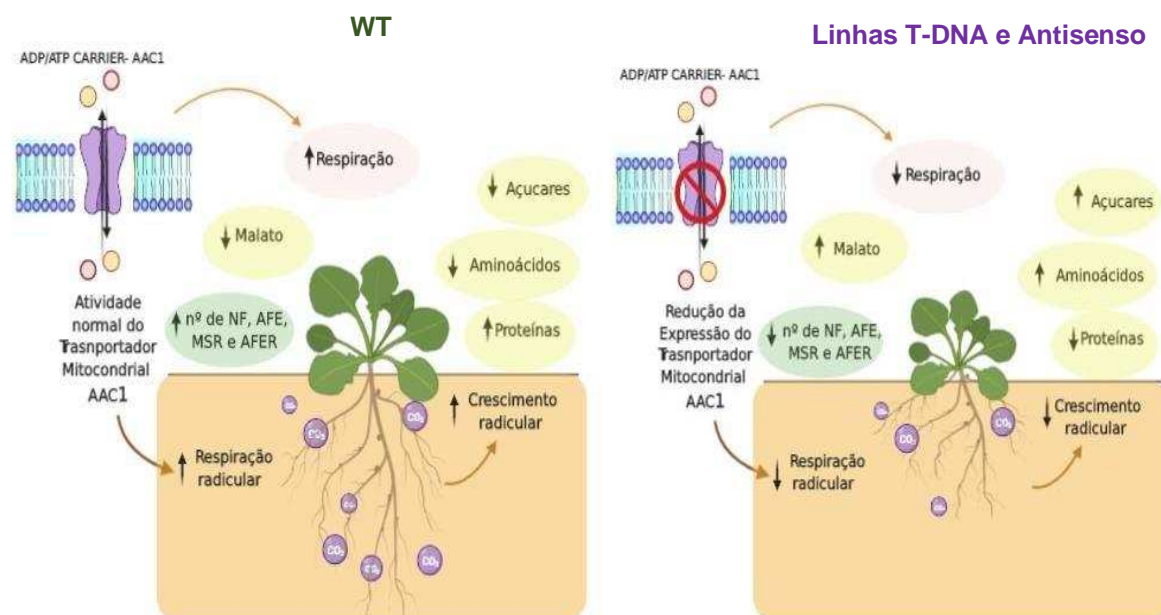
## 4 DISCUSSÃO

Neste trabalho, investigou-se a importância do transporte mediado pela proteína transportadora AAC1 no metabolismo vegetal. A redução da expressão de AAC1 afetou parâmetros biométricos relacionados ao crescimento e ao desenvolvimento da parte aérea em *A. thaliana* (Figura 7). Linhas transgênicas para o transportador de ADP/ATP (AAC1) apresentaram uma redução na massa fresca da roseta e número de folhas, concomitantes com reduções na área foliar específica.

A redução do número de folhas observada mediante a diminuição da atividade do transportador AAC1 pode estar diretamente relacionada à expressão desse transportador na região meristemática do ápice vegetativo, onde o gene AAC1 é altamente expresso (Figura suplementar 1A e B). O meristema apical do caule (SAM) é formado por diferenciação das células meristemáticas, sendo essa diferenciação relacionada ao redox celular (Bashandy et al., 2010; Tognetti, 2017; Dolzblasz et. al., 2018). O controle do crescimento por alterações no redox celular é modulado por um inúmeras interações entre antioxidantes, espécies reativas de oxigênio e hormônios como as auxinas e citocininas, sendo estes importantes reguladores do ciclo celular, na expansão, proliferação e diferenciação em outros órgãos (Considini and Foyer, 2014). Logo, a manutenção da homeostase redox celular tem um papel fundamental no crescimento e desenvolvimento das plantas (Gapper and Dolan, 2006; Dolzblasz et. al., 2018). Além disso, alterações no ciclo celular do meristema apical também pode resultar em alterações no crescimento vegetativo (Dolzblasz et al., 2016). A progressão do ciclo celular é dependente de uma quantidade substancial de energia mitocondrial. Sendo que a fosforilação de substratos mitocondriais mediada por ciclina B1/Cdk1 permite que as células percebam e respondam aumento da demanda energética e regulem positivamente a respiração mitocondrial para que a progressão do ciclo celular ocorra de forma eficaz. Contudo, quando a função mitocondrial é prejudicada, ocorre comprometimento do suplemento necessário de ATP, o que pode resultar na parada do ciclo celular (Wang et al., 2014). Evidências anteriores demonstram que a menor expressão do transportadores AACs em *A. thaliana* acarreta em aumento do poder redutor celular e conseqüentemente em alterações no status redox, uma vez que as plantas mutantes apresentaram aumento na razão NADPH/NADP<sup>+</sup> e NADH/NAD<sup>+</sup> (Batista, 2019). Além disso, alterações nos níveis de energia provocados pelo menor transporte de ATP pode afetar a progressão do ciclo celular na região meristemática apical. Assim, a redução na expressão de

AAC1 pode ter promovido alterações no meristema apical, os quais, por sua vez, promoveram variações do número de folhas e na área foliar dessas plantas.

A deficiência na expressão do transportador AAC1 não comprometeu a eficiência fotossintética nas linhas transgênicas em condições ótimas ao desenvolvimento. Contudo, essa deficiência promoveu uma redução na atividade respiratória das folhas, tanto em termos de evolução de CO<sub>2</sub> quanto no consumo de O<sub>2</sub> (Figura 2F e 6). O processo respiratório tem papel fundamental na formação dos esqueletos de carbono, visto que grande parte das demandas necessárias para manutenção e crescimento dos tecidos é suprida por esta via metabólica (Markelz et al., 2014). Dado a alta expressão de AAC1 em relação as demais isoformas de AACs e em relação aos demais transportadores de adenilatos mitocondriais (Fernie et al., 2020; Fuchs et al., 2020), espera-se um decréscimo nos níveis de exportação de ATP pela mitocôndria, em consequência a redução na atividade do complexo ATP sintase e consequentemente um menor transporte de elétrons provocando uma elevação do potencial redox da matrix mitocondrial. Consequentemente, uma menor quantidade de ATP que está provavelmente sendo gerada nas plantas com menor expressão de AAC1 e, portanto, pode-se esperar que um menor conteúdo energético esteja disponível para a manutenção e o crescimento das plantas mutantes para AAC1 durante o período noturno. Logo, a redução do número de folhas, assim como da área foliar específica e da roseta observadas nesse estudo, podem estar relacionadas ao decréscimo da taxa respiratória nas linhas com reduzida expressão de AAC1. Alguns estudos demonstram que alterações em relacionadas a atividade respiratória pode impactar negativamente o crescimento de plantas, decorrentes principalmente da redução da respiração. Brito et al. (2020) observaram que plantas mutantes de AtSFC1 apresentaram redução na germinação e crescimento da radícula prejudicado, um fenótipo relacionado a redução da taxa respiratória. Plantas de arroz mutantes de LRK1, um gene importante na regulação dos fluxos respiratórios em folhas não-iluminadas, apresentaram redução da respiração noturna seguido de retardo no crescimento (Qu et al., 2020). Linhas mutantes de ndufs4 apresentaram redução na eficiência de fosforilação, o que resultou em redução dos níveis de adenilatos, supressão da germinação e crescimento, acompanhada com mudanças nos níveis de ácidos orgânicos e aminoácidos (Meyer et al., 2009).



**Figura 7.** Visão geral das principais alterações fisiológicas da redução de AAC1 em folhas totalmente expandidas e iluminadas e no crescimento radicular em *A. thaliana*. Abreviações: NF, Número de Folhas; AFE, Área Foliar específica; MSR, Massa Seca da Roseta; e AFER; Área Foliar Específica da Roseta.

Plantas transgênicas com expressão reduzida de AAC1 também apresentaram redução da taxa de consumo de oxigênio radicular. A respiração radicular fornece a força motriz para o crescimento da raiz (Neufeld et al., 2008). A redução de AAC1 resultou em menor crescimento radicular das linhas transgênicas cultivadas em meio sem sacarose. Contudo, mesmo no tratamento suplementado com sacarose, o crescimento radicular das linhas transgênicas continuou menor em comparação ao WT, sugerindo não estar ocorrendo comprometimento da utilização das reservas, mas sim, provavelmente, alterações relacionadas ao metabolismo mitocondrial. Resultados similares foram observados em plantas deficientes na expressão do transportador ADNT1 (Palmieri et al., 2008). Nesse estudo observou-se que deficientes na expressão de ADNT1 apresentaram redução na respiração e no crescimento radicular em plantas. Estes resultados estão de acordo com a importância de enzimas do ciclo TCA em tecidos radiculares. Nesses tecidos verificou-se que alterações na respiração e redução do crescimento radicular em *Solanum lycopersicum* (Carrari et al., 2003; Nunes-Nesi et al., 2005; Nunes-Nesi et al., 2007; Van Der Merwe et al., 2009; van der Merwe et al., 2010).

Nas avaliações metabólicas, foi possível constatar padrões de flutuação dos compostos quantificados em folhas totalmente expandidas. Foi observado o acúmulo de alguns metabólitos nas folhas das linhas transgênicas com baixa expressão para o transportador AAC1. De maneira geral, foi observado que as linhas transgênicas apresentaram maiores concentrações de carboidratos não-estruturais. Uma vez que os carboidratos são os substratos preferencialmente utilizados durante as reações de oxidação do processo de respiração celular vegetal, o acúmulo desses metabólitos pode estar associado à redução da respiração observada nas linhas transgênicas. O metabolismo dos ácidos orgânicos está intimamente relacionado à respiração, podendo os ácidos orgânicos serem usados como fonte de poder redutor para a cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, ou fornecendo esqueletos de carbono para outras vias metabólicas (O'Leary et al., 2017). Uma menor exportação ATP e importação de ADP pode inibir a cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria e gerar acúmulo de redutores na matriz mitocondrial. Esse efeito pode resultar em aumento da concentração de substrato/intermediários das reações da via respiratória, fazendo com que os carboidratos não sejam oxidados na mesma velocidade como em condições normais, favorecendo seu acúmulo (O'Leary et al., 2019). Além disso, diversos produtos da respiração, quando acumulados, tem a capacidade inibir enzimas da glicólise e do ciclo TCA (O'Leary et al., 2019), o que contribui para um consumo mais lento de vários intermediários metabólicos utilizados na respiração, como malato, glicose, frutose e sacarose, que também tenderam a acumular em maior quantidade nas linhas transgênicas avaliadas. Logo, altos níveis de substratos associados ao turnover de adenilatos e ao suprimento de substratos podem limitar a respiração noturna das folhas (O'Leary et al., 2017). A redução do AAC1 também resultou em aumento significativo nos níveis de aminoácidos nas linhas transgênicas. Em contrapartida, foi observada uma redução do nível de proteína total nas linhas transgênicas, sugerindo que pode estar ocorrendo uma maior degradação proteica nestas linhas. Em situações em que a via clássica da respiração pode estar sendo comprometida, as vias alternativas de produção de ATP são estimuladas (Araújo et al., 2011). Um dos aspectos da flexibilidade respiratória é o uso de substratos alternativos além dos carboidratos, incluindo ácidos orgânicos, aminoácidos e ácidos graxos. Evidências demonstram que aminoácidos provenientes da degradação de proteínas, podem ser uma importante fonte de substratos alternativo para respiração das plantas, assegurando a síntese de ATP por uma via alternativa da via respiratória clássica (Araújo et al., 2011; Peng et al., 2015).

Numa visão geral, o transportador de adenilatos AAC1 desempenha um papel importante em relação ao metabolismo mitocondrial nas folhas expandidas e no crescimento radicular de *A. thaliana*. Visto que a redução da expressão do gene que codifica AAC1 resultou em redução da taxa respiratória nas folhas e raízes, acúmulo de açúcares e aminoácidos em folhas iluminadas, e afetou o crescimento da roseta e das raízes.

## 5 CONCLUSÃO

A redução da expressão do gene que codifica a proteína transportadora AAC1 não promoveu alterações significativas nos parâmetros fotossintéticos em condições ótimas ao desenvolvimento. Contudo, a deficiência de AAC1 promoveu alterações no crescimento, visto que linhas mutantes apresentaram menor crescimento da parte aérea, possivelmente associada à redução da taxa respiratória noturna nas plantas mutantes. Dessa forma, um possível decréscimo nos níveis de exportação do ATP da matriz mitocondrial para o citosol pode ter colaborado para alterações no meristema apical caulinar, possivelmente modulado por um desbalanço no estado redox associado ao comprometimento da progressão do ciclo celular, visto que o AAC1 é altamente expresso na região do meristema apical. O crescimento radicular e o consumo de O<sub>2</sub> em raízes também foram afetados negativamente nas linhas com expressão reduzida de AAC1, o que está de acordo com a grande importância da respiração mitocondrial para a provisão energética em tecidos radiculares. Linhas com expressão reduzida de AAC1 apresentaram maiores concentrações de carboidratos não-estruturais, sendo que o acúmulo desses metabólitos pode estar associado à redução da respiração observada nas linhas mutantes, uma vez que altos níveis de substratos associados ao turnover de adenilatos e ao suprimento de substratos podem limitar a respiração noturna das folhas. Também foi observado aumento no nível de aminoácidos acompanhado de uma redução significativa no nível de proteínas nas linhas mutantes. Dessa forma, esses dados sugerem uma maior degradação proteica nessas linhas, sugerindo flexibilidade respiratória, assegurando dessa forma a síntese de ATP por via alternativa a via respiratória clássica. Portanto, os resultados desse trabalho sugerem que transportador AAC1 tem um papel importante na manutenção da respiração celular e crescimento da parte aérea e do sistema radicular de *A. thaliana* em condições ótimas de cultivo.

## 6 REFERÊNCIAS

- Araújo, W. L., Tohge, T., Ishizaki, K., Leaver, C. J., and Fernie, A. R.** (2011). Protein degradation - an alternative respiratory substrate for stressed plants. *Trends Plant Sci.* **16**:489–498.
- Baker, B., Olszyk, D. M., and Tingey, D.** (1996). Digital image analysis to estimate leaf area. *J. Plant Physiol.* **148**:530–535.
- Bashandy T, Guillemintot J, Vernoux T, Caparros-Ruiz D, Ljung K, Meyer Y, R., and J-P** (2010). Interplay between the NADP-linked thioredoxin and glutathione systems in *Arabidopsis* auxin signaling. *Plant Cell Advance Access* published 2010.
- Batista, A. L.** (2019). Importância fisiológica dos transportadores mitocondriais de adenilatos AACs em *Arabidopsis thaliana* *Advance Access* published 2019.
- Bonora, M., Patergnani, S., Rimessi, A., de Marchi, E., Suski, J. M., Bononi, A., Giorgi, C., Marchi, S., Missiroli, S., Poletti, F., et al.** (2012). ATP synthesis and storage. *Purinergic Signal.* **8**:343–357.
- Bradford MM** (1976). rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* *Advance Access* published 1976.
- Brito, D. S., Agrimi, G., Charton, L., Brillhaus, D., Bitetto, M. G., Lana-Costa, J., Messina, E., Nascimento, C. P., Feitosa-Araújo, E., Pires, M. V., et al.** (2020). Biochemical and functional characterization of a mitochondrial citrate carrier in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. J.* **477**:1759–1777.
- Cao, Y., Tanaka, K., Nguyen, C. T., and Stacey, G.** (2014). Extracellular ATP is a central signaling molecule in plant stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **20**:82–87.
- Carrari, F., Nunes-Nesi, A., Gibon, Y., Lytovchenko, A., Loureiro, M. E., and Fernie, A. R.** (2003). Reduced Expression of Aconitase Results in an Enhanced Rate of Photosynthesis and Marked Shifts in Carbon Partitioning in Illuminated Leaves of Wild Species Tomato. *Plant Physiol.* **133**:1322–1335.
- Considini MJ, F. C.** (2014). Redox Regulation of Plant Development. *Antioxid redox signal* *Advance Access* published 2014.
- da Fonseca-Pereira, P., Neri-Silva, R., Cavalcanti, J. H. F., Brito, D. S., Weber, A. P. M., Araújo, W. L., and Nunes-Nesi, A.** (2018). Data-Mining Bioinformatics: Connecting

- Adenylate Transport and Metabolic Responses to Stress. *Trends Plant Sci.* **23**:961–974.
- Dolce, V., Scarcia, P., Iacopetta, D., and Palmieri, F.** (2005). A fourth ADP/ATP carrier isoform in man: Identification, bacterial expression, functional characterization and tissue distribution. *FEBS Lett.* **579**:633–637.
- Dolzblasz, A., Smakowska, E., Gola, E. M., Sokolowska, K., Kicia, M., and Janska, H.** (2016). The mitochondrial protease AtFTSH4 safeguards Arabidopsis shoot apical meristem function. *Sci. Rep.* **6**.
- Dolzblasz Alicja, Gola M Edyta, Sokolowska Katarzyna, Smakowska-Luzan Elwira, 2, Twardawska Adriana, and J. H.** (2018). Impairment of Meristem Proliferation in Plants Lacking the Mitochondrial Protease AtFTSH4. *Int. J. Mol. Sci.* Advance Access published 2018.
- Echaniz-Laguna, A., Chassagne, M., Ceresuela, J., Rouvet, I., Padet, S., Acquaviva, C., Nataf, S., Vinzio, S., Bozon, D., and de Camaret, B. M.** (2012). Complete loss of expression of the ANT1 gene causing cardiomyopathy and myopathy. *J. Med. Genet.* **49**:146–150.
- Fernie, A. R., Roscher, A., Ratcliffe, R. G., and Kruger, N. J.** (2001). Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: Fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling heterotrophic cells. *Planta* **212**:250–263.
- Fernie, A. R., Carrari, F., and Sweetlove, L. J.** (2004). Respiratory metabolism: Glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**:254–261.
- Fernie, A. R., Cavalcanti, J. H. F., and Nunes-Nesi, A.** (2020). Metabolic roles of plant mitochondrial carriers. *Biomolecules* **10**:1–23.
- Fontanesi, F., Palmieri, L., Scarcia, P., Lodi, T., Donnini, C., Limongelli, A., Tiranti, V., Zeviani, M., Ferrero, I., and Viola, A. M.** (2004). Mutation in AAC2, equivalent to human adPEO-associated ANT1 mutations, lead to defective oxidative phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae* and affect mitochondrial DNA stability. *Hum. Mol. Genet.* **13**:923–934.
- Fuchs, P., Rugen, N., Carrie, C., Elsässer, M., Finkemeier, I., Giese, J., Hildebrandt, T. M., Kühn, K., Maurino, V. G., Ruberti, C., et al.** (2020). Single organelle function and organization as estimated from Arabidopsis mitochondrial proteomics. *Plant J.* **101**:420–441.

- Gapper, C., and Dolan, L.** (2006). Control of plant development by reactive oxygen species. *Plant Physiol.* Advance Access published 2006.
- Geigenberger, P., Riewe, D., and Fernie, A. R.** (2010). The central regulation of plant physiology by adenylates. *Trends Plant Sci.* **15**:98–105.
- Gnipová, A., Šubrtová, K., Panicucci, B., Horváth, A., Lukeš, J., and Zíková, A.** (2015). The ADP/ATP carrier and its relationship to oxidative phosphorylation in ancestral protist *trypanosoma brucei*. *Eukaryot. Cell* **14**:297–310.
- Haferkamp, I.** (2007). The diverse members of the mitochondrial carrier family in plants. *FEBS Lett.* **581**:2375–2379.
- Haferkamp, I., and Schmitz-Esser, S.** (2012). The plant mitochondrial carrier family: Functional and evolutionary aspects. *Front. Plant Sci.* **3**.
- Haferkamp, I., Hackstein, J. H. P., Voncken, F. G. J., Schmit, G., and Tjaden, J.** (2002). Functional integration of mitochondrial and hydrogenosomal ADP/ATP carriers in the *Escherichia coli* membrane reveals different biochemical characteristics for plants, mammals and anaerobic chytrids. *Eur. J. Biochem.* **269**:3172–3181.
- Hara, K. Y., and Kondo, A.** (2015). ATP regulation in bioproduction. *Microb. Cell Fact.* **14**.
- Igamberdiev, A. U., and Eprintsev, A. T.** (2016). Organic acids: The pools of fixed carbon involved in redox regulation and energy balance in higher plants. *Front. Plant Sci.* **7**.
- Jiang, Z., Watanabe, C. K. A., Miyagi, A., Kawai-Yamada, M., Terashima, I., and Noguchi, K.** (2019). Mitochondrial aox supports redox balance of photosynthetic electron transport, primary metabolite balance, and growth in *arabidopsis thaliana* under high light. *Int. J. Mol. Sci.* **20**.
- Krueger, S., Giavalisco, P., Krall, L., Steinhauser, M. C., Büssis, D., Usadel, B., Flügge, U. I., Fernie, A. R., Willmitzer, L., and Steinhauser, D.** (2011). A topological map of the compartmentalized *Arabidopsis thaliana* leaf metabolome. *PLoS One* **6**.
- Lane, N., and Martin, W. F.** (2012). The origin of membrane bioenergetics. *Cell* **151**:1406–1416.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., and Cox, M. M.** (2014). *Lehninger principles of biochemistry*. 6th ed. New York.
- Lorenz, A., Lorenz, M., Vothknecht, U. C., Niopek-Witz, S., Neuhaus, H. E., and Haferkamp, I.** (2015). In vitro analyses of mitochondrial ATP/phosphate carriers from *Arabidopsis thaliana* revealed unexpected Ca<sup>2+</sup>-effects. *BMC Plant Biol.* **15**.

- Markelz, R. J. C., Vosseller, L. N., and Leakey, A. D. B.** (2014). Developmental stage specificity of transcriptional, biochemical and CO<sub>2</sub> efflux responses of leaf dark respiration to growth of *Arabidopsis thaliana* at elevated [CO<sub>2</sub>]. *Plant Cell Environ.* **37**:2542–2552.
- Meyer, E. H., Tomaz, T., Carroll, A. J., Estavillo, G., Delannoy, E., Tanz, S. K., Small, I. D., Pogson, B. J., and Millar, A. H.** (2009). Remodeled respiration in *ndufs4* with Low phosphorylation efficiency suppresses *Arabidopsis* germination and growth and alters control of metabolism at night. *Plant Physiol.* **151**:603–619.
- Monné, M., Miniero, D. V., Obata, T., Daddabbo, L., Palmieri, L., Voza, A., Nicolardi, M. C., Fernie, A. R., and Palmieri, F.** (2015). Functional characterization and organ distribution of three mitochondrial ATP–Mg/Pi carriers in *Arabidopsis thaliana*. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1847**:1220–1230.
- Murashige, T., and Skoog, F.** (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* **15**:473–497.
- Neufeld, H. S., Lambers, H., Chapin, F. S., and Pons, T. L.** (2008). Plant Physiological Ecology. *Ecology* **80**:101–149.
- Nunes-Nesi, A., Carrari, F., Lytovchenko, A., Smith, A. M. O., Loureiro, M. E., Ratcliffe, R. G., Sweetlove, L. J., and Fernie, A. R.** (2005). Enhanced photosynthetic performance and growth as a consequence of decreasing mitochondrial malate dehydrogenase activity in transgenic tomato plants. *Plant Physiol.* **137**:611–622.
- Nunes-Nesi, A., Carrari, F., Gibon, Y., Sulpice, R., Lytovchenko, A., Fisahn, J., Graham, J., Ratcliffe, R. G., Sweetlove, L. J., and Fernie, A. R.** (2007). Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. *Plant J.* **50**:1093–1106.
- Nunes-Nesi, A., Cavalcanti, J. H. F., and Fernie, A. R.** (2020). Characterization of in vivo function(s) of members of the plant mitochondrial carrier family. *Biomolecules* **10**:1–20.
- O’Leary, B. M., Lee, C. P., Atkin, O. K., Cheng, R., Brown, T. B., and Millar, A. H.** (2017). Variation in leaf respiration rates at night correlates with carbohydrate and amino acid supply. *Plant Physiol.* **174**:2261–2273.
- O’Leary, B. M., Asao, S., Millar, A. H., and Atkin, O. K.** (2019). Core principles which explain variation in respiration across biological scales. *New Phytol.* **222**:670–686.
- Ogunbona, O. B., and Claypool, S. M.** (2019). Emerging roles in the biogenesis of

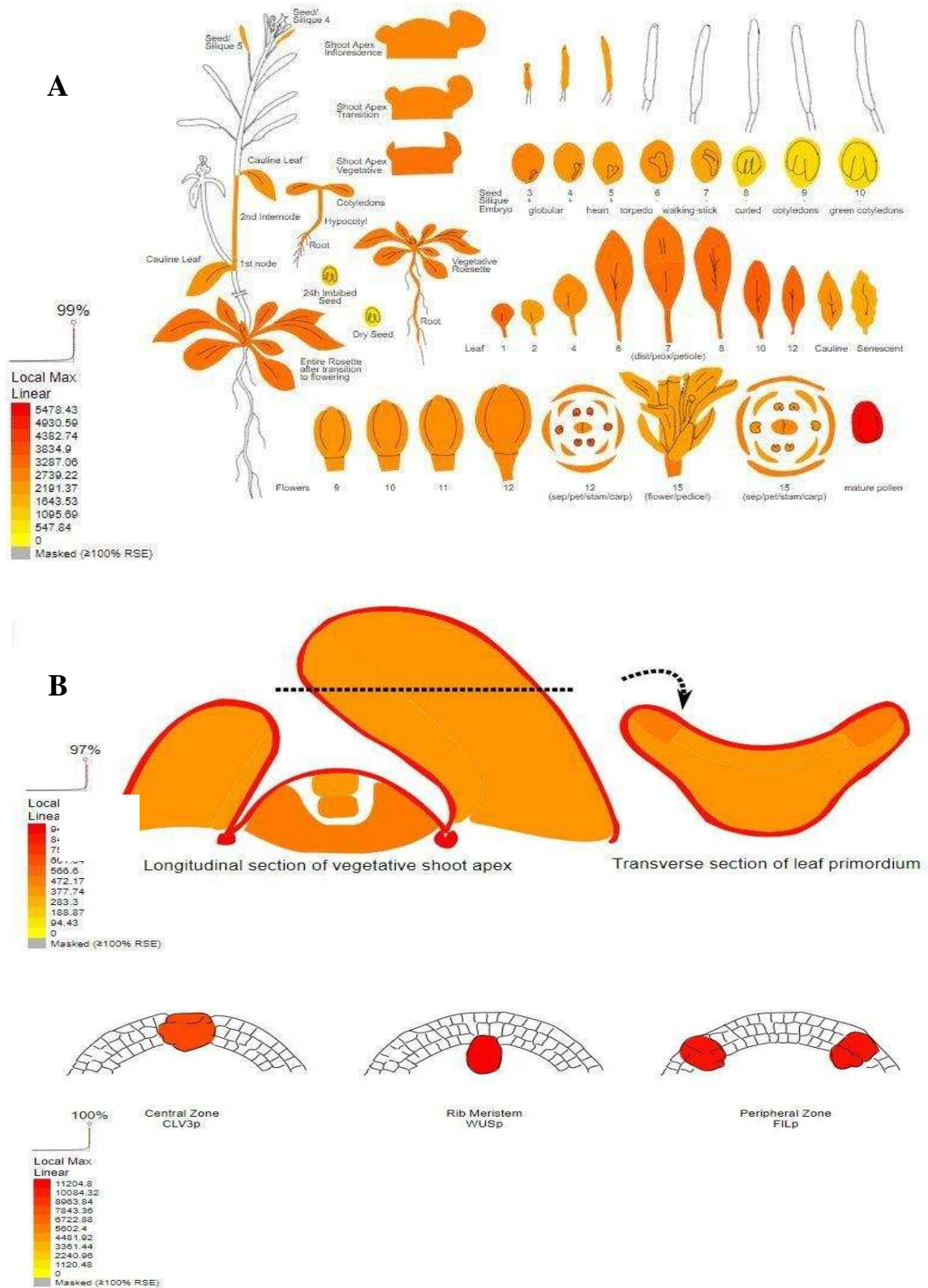
cytochrome C oxidase for members of the mitochondrial carrier family. *Front. Cell Dev. Biol.* **7**.

- Palmieri, L., Santoro, A., Carrari, F., Blanco, E., Nunes-Nesi, A., Arrigoni, R., Genchi, F., Fernie, A. R., and Palmieri, F.** (2008). Identification and characterization of ADNT1, a novel mitochondrial adenine nucleotide transporter from arabidopsis. *Plant Physiol.* **148**:1797–1808.
- Palmieri, F., Pierri, C. L., De Grassi, A., Nunes-Nesi, A., and Fernie, A. R.** (2011). Evolution, structure and function of mitochondrial carriers: A review with new insights. *Plant J.* **66**:161–181.
- Pearson, W. R., and Lipman, D. J.** (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**:2444–2448.
- Peng, C., Uygun, S., Shiu, S. H., and Last, R. L.** (2015). The impact of the branched-chain ketoacid dehydrogenase complex on amino acid homeostasis in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **169**:1807–1820.
- Pereira, P. da F.** (2013). Functional characterization of the mitochondrial adenine nucleotide transporter (ADNT1) in Arabidopsis thaliana under dark-induced senescence *Advance Access published 2013*.
- Picault, N., Hodges, M., Palmieri, L., and Palmieri, F.** (2004). The growing family of mitochondrial carriers in Arabidopsis. *Trends Plant Sci.* **9**:138–146.
- Qu, M., Essemine, J., Li, M., Chang, S., Chang, T., Chen, G. Y., and Zhu, X. G.** (2020). Genome-Wide Association Study Unravels LRK1 as a Dark Respiration Regulator in Rice (*Oryza sativa* L.). *Int. J. Mol. Sci.* **21**:1–16.
- Reiser, J., Linka, N., Lemke, L., Jeblick, W., and Neuhaus, H. E.** (2004). Molecular physiological analysis of the two plastidic ATP/ADP transporters from arabidopsis. *Plant Physiol.* **136**:3524–3536.
- Salem, M. A., Jüppner, J., Bajdzienko, K., and Giavalisco, P.** (2016). Protocol: A fast, comprehensive and reproducible one-step extraction method for the rapid preparation of polar and semi-polar metabolites, lipids, proteins, starch and cell wall polymers from a single sample. *Plant Methods* **12**.
- Sharer, J. D.** (2005). The adenine nucleotide translocase type 1 (ANT1): A new factor in mitochondrial disease. *IUBMB Life* **57**:607–614.
- Sivaramakrishnan, V., and Fountain, S. J.** (2015). Evidence for extracellular ATP as a stress

- signal in a single-celled organism. *Eukaryot. Cell* **14**:775–782.
- Solymosi, K., and Schoefs, B.** (2019). Plant cell compartments. *Bot. Lett.* **166**:269–273.
- Sulpice, R., Pyl, E. T., Ishihara, H., Trenkamp, S., Steinfath, M., Witucka-Wall, H., Gibon, Y., Usadel, B., Poree, F., Piques, M. C., et al.** (2009). Starch as a major integrator in the regulation of plant growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**:10348–10353.
- Tognetti B. Vanesa, B. A. and H. M.** (2017). Redox regulation at the site of primary growth: auxin, cytokinin and ROS crosstalk. *plant cell Environ.* Advance Access published 2017.
- van der Merwe, M. J., Osorio, S., Araújo, W. L., Balbo, I., Nunes-Nesi, A., Maximova, E., Carrari, F., Bunik, V. I., Persson, S., and Fernie, A. R.** (2010). Tricarboxylic acid cycle activity regulates tomato root growth via effects on secondary cell wall production. *Plant Physiol.* **153**:611–621.
- Van Der Merwe, M. J., Osorio, S., Moritz, T., Nunes-Nesi, A., and Fernie, A. R.** (2009). Decreased mitochondrial activities of malate dehydrogenase and fumarase in tomato lead to altered root growth and architecture via diverse mechanisms. *Plant Physiol.* **149**:653–669.
- Vishwakarma, A., Tetali, S. D., Selinski, J., Scheibe, R., and Padmasree, K.** (2015). Importance of the alternative oxidase (AOX) pathway in regulating cellular redox and ROS homeostasis to optimize photosynthesis during restriction of the cytochrome oxidase pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Ann. Bot.* **116**:555–569.
- Voon, C. P., Guan, X., Sun, Y., Sahu, A., Chan, M. N., Gardeström, P., Wagner, S., Fuchs, P., Nietzel, T., Versaw, W. K., et al.** (2018). ATP compartmentation in plastids and cytosol of *Arabidopsis thaliana* revealed by fluorescent protein sensing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**:E10778–E10787.
- Wang, Z., Fan, M., Candas, D., Zhang, T. Q., Qin, L., Eldridge, A., Wachsmann-Hogiu, S., Ahmed, K. M., Chromy, B. A., Nantajit, D., et al.** (2014). Cyclin B1/Cdk1 coordinates mitochondrial respiration for Cell-Cycle G2/M progression. *Dev. Cell* **29**:217–232.
- Zell, M. B., Fahnenstich, H., Maier, A., Saigo, M., Voznesenskaya, E. V., Edwards, G. E., Andreo, C., Schleifenbaum, F., Zell, C., Drincovich, M. F., et al.** (2010). Analysis of *Arabidopsis* with highly reduced levels of malate and fumarate sheds light on the role of these organic acids as storage carbon molecules. *Plant Physiol.* **152**:1251–1262.
- Zhang, X., Zheng, X., Ke, S., Zhu, H., Liu, F., Zhang, Z., Peng, X., Guo, L., Zeng, R., Hou,**

**P., et al.** (2016). ER-localized adenine nucleotide transporter ER-ANT1: an integrator of energy and stress signaling in rice. *Plant Mol. Biol.* **92**:701–715.

## 7 DADOS SUPLEMENTARES



**Figura suplementar 1.** Análise in silico da expressão do gene AAC1. A, em diferentes tecidos. B, no meristema apical. Fonte: Arabidopsis eFP Browser

**Tabela Suplementar 1.** Similaridade em porcentagem entre sequências de aminoácidos deduzidos de todas as proteínas transportadoras de adenilatos contidas na célula vegetal, até então descritas em *Arabidopsis thaliana*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<b>AAC1</b>	100														
<b>AAC2</b>	82,2862	100													
<b>AAC3</b>	64,1228	65,1754	100												
<b>APC1</b>	23,0366	23,7478	22,0128	100											
<b>APC2</b>	22,5131	24,0069	26,4035	60,2538	100										
<b>APC3</b>	21,6405	22,1071	24,9123	78,75	67,7083	100									
<b>ADNT1</b>	23,6149	24,7956	22,7975	24,4323	25,6131	22,4342	100								
<b>NTT1</b>	21,6405	22,2798	20,3509	20,4267	19,7729	20,625	22,4342	100							
<b>NTT2</b>	22,2513	23,057	21,9298	20,6785	21,1089	21,25	22,6158	82,7141	100						
<b>TAAC/PAPST1</b>	21,99	23,9206	22,807	27,6442	24,1987	25,8013	27,6113	19,8718	20,4327	100					
<b>ATBT1</b>	22,2513	20,8117	22,6316	28,4987	29,4317	29,6014	22,1617	21,0348	21,7133	26,6327	100				
<b>PCN1</b>	22,1878	20,6398	20,6398	23,7358	21,775	22,291	22,6066	22,4974	22,4974	21,1558	20,3302	100			
<b>PCN2</b>	20,8075	20,2899	21,2215	23,3954	23,1884	22,4638	21,7391	22,2567	22,0497	20,7039	21,0145	80,5383	100		
<b>ER-ANT1</b>	53,9631	53,4202	57,0033	22,9099	25,19	23,127	24,3414	21,6069	23,127	23,7785	23,0185	20,1954	23,127	100	
<b>PM-ANT1</b>	34,2397	34,0383	33,1319	25,3776	22,9607	24,1692	26,7875	21,7523	23,2628	20,5438	21,6516	21,259	22,3602	34,202	100

AAC1 (At3G08580): ADP/ATP carrier 1, AAC2 (At5G13490): ADP/ATP carrier 2, AAC3 (At4g28390): ADP/ATP carrier 3, APC1 (At5g61810): Adenine nucleotide/Phosphate Carrier 1, APC2 (At5g51050): Adenine nucleotide/Phosphate Carrier 2, APC3 (At5g07320): Adenine nucleotide/Phosphate Carrier 3, ADNT1(At4g01100): Adenine Nucleotide Transporter 1, NTT1(At1g80300): nucleotide transporter 1, NTT2 (At1g15500): nucleotide transporter 2, TAAC/PAPST1 (At5g01500): PAPS/PAP carrier in plastids and an ATP/ADP carrier in the thylakoid membrane, ATBT1(At4g32400): Arabidopsis Brittle 1 PCN1 (At3g05290): Peroxisomal adenine nucleotide carrier 1, PCN2 (At5g27520): Peroxisomal adenine nucleotide carrier 2, ER-ANT1(At5g17400): Endoplasmic Reticulum Adenylate Transporter1, PMANT1(At5g56450): Plasma Membrane Adenylate Transporter.