

IZABEL DE SOUZA CHAVES

**EFEITOS FISIOLÓGICOS DA EXPRESSÃO REDUZIDA DE
TRANSPORTADORES DE NAD⁺ EM *Arabidopsis thaliana***

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015**

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

T

Chaves, Izabel de Souza, 1986-
C512e Efeitos fisiológicos da expressão reduzida de
2015 transportadores de NAD⁺ em *Arabidopsis thaliana* / Izabel de
Souza Chaves. – Viçosa, MG, 2015.
x, 94f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Adriano Nunes Nesi.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Arabidopsis thaliana*. 2. Nicotinamida adenina
dinucleotídeo - Transporte. 3. Fotossíntese. 4. Amido.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Vegetal. Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal.
II. Título.

CDD 22. ed. 583.84

IZABEL DE SOUZA CHAVES

**EFEITOS FISIOLÓGICOS DA EXPRESSÃO REDUZIDA DE
TRANSPORTADORES DE NAD⁺ EM *Arabidopsis thaliana***

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

APROVADA: 16 de julho de 2015.

Cléberon Ribeiro

Elizabeth Pacheco Batista Fontes

Agustín Zsögön

Thomas Christopher Rhys Williams

Adriano Nunes Nesi
(Orientador)

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, pelo apoio;
à minha mãe, pelo exemplo de força e
ao meu namorado Diogo pelo companheirismo,

Com carinho,

DEDICO

"Nós cruzamos nossas pontes quando chegamos a elas e as queimamos atrás de nós, sem nada para mostrar o nosso progresso além da memória do cheiro de fumaça e uma suposição de que nossos olhos outrora marejaram." (Tom Stoppard)

"Infelizmente, uma super abundância de sonhos é compensada por um crescente potencial de pesadelos." (Sir Peter Ustinou)

"Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós mesmos." (Friedrich Nietzsche)

AGRADECIMENTOS

Meu maior aprendizado durante a execução desta Tese foi de que não fazemos nada sozinhos. É indispensável à participação das pessoas com conselhos, dicas, apoios, sorrisos e ajudas em si. Por isso, sou eternamente grata a todos que de alguma forma, mesmo da mais simples possível, contribuíram para a finalização deste trabalho. Agradeço a Deus, por não desistir de mim, principalmente nos momentos de dúvida; aos meus pais e irmão por serem exatamente como eles são e ao meu namorado Diogo por estarmos ‘juntos contra o mundo’ pois afinal, *“O amor não sente obrigações, não pensa em nada sobre seus problemas, tenta o que estiver acima de sua força, não defende desculpas para a impossibilidade; para isso acredita que todas as coisas são legítimas por si mesmas e que todas as coisas são possíveis.”* (Thomas Kempis) e *“Sem família, o homem, sozinho no mundo, treme com o frio.”* (Andre Maurois). Além disso, agradeço às minhas grandes amigas Giuliana e Ana Carla por toda a amizade e companheirismo durante estes tão singulares anos. Ana, minha gratidão com você será eterna! Você sabe! Meninas, *“A amizade duplica as alegrias e divide as tristezas.”* (Francis Bacon). Dividimos muitas nesse tempo mas com certeza ainda temos muito para duplicar!

Um agradecimento mais que especial é necessário à Ana Carla (novamente), David e Franklin, pela imprescindível ajuda e ensinamentos na condução dos experimentos. Sem vocês o caminho seria muito mais difícil. Além disso, agradeço também à Paula pelos auxílios constantes no laboratório; ao Renan, pela companhia e amizade durante a condução dos experimentos e análise de ácidos graxos; à Dani por todos os ensinamentos de biologia molecular; ao Jorge Condori pelas análises de cruzamentos e dicas de PCR; ao Acácio pelas fotos; à Andrea pela ajuda com os *primers*; ao Jorge Perez pelas ajudas com qRT-PCR e por me compreender tão bem; ao Marcel, pela ajuda com desenho de *primers*, correções de projeto, análise de perfil e tantas outras; à Amanda, pela ajuda na análise de qRT-PCR, à Franciele, pela ajuda com as análises anatômicas; ao Diego, pela ajuda no processo de pedida de bolsa Sanduíche e aos estagiários que me tanto ajudaram ao longo desta jornada: Jô, Jéssica, Mayara, Nayara, Tiago, Ítalo e Welder. Agradeço também a todas as pessoas que estiveram comigo durante estes quatro anos. Apesar de não serem citadas, não são menos importantes. Guardo todas no meu coração, pois a gratidão é a memória do coração e *“As melhores e mais belas coisas na vida não podem ser vistas nem tocadas, devem ser sentidas com o coração.”* (Hellen Keller).

“A coisa mais autêntica sobre nós é nossa capacidade de criar, de superar, de suportar, de transformar, de amar e de sermos maiores que nosso sofrimento.” (Ben Okri), por isso, agradeço também à Dr. Nicole Linka, prof. Andreas Weber, Björn, Pia, Tea, Tabea e todos os integrantes do *Plant Biochemistry Laboratory* da *Heinrich Heine University Düsseldorf* por me acolherem tão bem, pelos ensinamentos e especialmente à Nicole que foi simplesmente maravilhosa comigo!

Gostaria de agradecer ao professor Adriano pelas orientações, apoio durante toda a condução desta Tese e por acreditar neste trabalho. E aos membros da banca e demais professores por todas as sugestões propostas e ensinamentos durante estes quatro anos. Agradeço a todos os integrantes de modo geral do curso de pós-graduação em Fisiologia Vegetal – UFV por todo o apoio e por me ensinar o que eu quero e o que eu não quero ser. *“Uma tragédia não precisa ter sangue e morte; é suficiente que ela seja cheia daquela tristeza majestosa que é o prazer da tragédia.”* (Jean Racine). Porém, *“Existe uma santidade nas lágrimas. Não são marca de fraqueza, mas de força. São mensageiras da dor incontrolável e do amor indescritível.”* (Washington Irving).

Agradeço também à Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), ao *Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology*, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento do trabalho e bolsa concedida.

Enfim, agradeço mais uma vez a todos que de alguma forma estiveram envolvidos na condução deste trabalho e na minha formação profissional e pessoal. *“Nada é permanente neste mundo cruel, nem mesmo os nossos problemas.”* (Charles Chaplin). *“Na vida, ao contrário do xadrez, o jogo continua após o xeque-mate.”* (Isaac Asimov).

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5
CAPÍTULO 1	6
RESUMO	7
1 INTRODUÇÃO	9
2 MATERIAL E MÉTODOS	11
2.1 Material vegetal	11
2.2 Condições de cultivo.....	12
2.3 Análise de expressão gênica	13
2.4 Análises de tecidos autotróficos	13
2.4.1 Determinação dos parâmetros de fluorescência da clorofila <i>a</i> e troca gasosas	13
2.4.2 Análise de crescimento	14
2.4.3 Determinação da densidade estomática	15
2.4.4 Determinação de metabólitos	15
2.5 Análises de tecidos heterotróficos	16
2.5.1 Avaliações morfológicas	16
2.5.2 Germinação de sementes e formação de plântulas normais	17
2.5.3 Análise de perfil de ácidos graxos	17
2.6 Análise estatística	18
3 RESULTADOS	18
3.1 Parâmetros de crescimento e trocas gasosas.....	18
3.2 Avaliação do metabolismo ao longo do dia.....	22
3.3 Análises em tecidos heterotróficos	24
4 DISCUSSÃO	29
4.1 Impactos da baixa expressão de <i>NDTI</i> sobre a fotossíntese.....	29
4.2 Impactos da baixa expressão de <i>NDTI</i> no metabolismo do carbono	33
4.3 Fenótipos observados em tecidos heterotróficos	35
5 CONCLUSÃO	38
6 AGRADECIMENTOS	38

7 REFERÊNCIAS.....	38
DADOS SUPLEMENTARES.....	46
CAPÍTULO 2	53
RESUMO.....	54
1 INTRODUÇÃO.....	56
2 MATERIAL E MÉTODOS	58
2.1 Material vegetal	58
2.2 Condições de cultivo.....	59
2.3 Análise de expressão gênica	60
2.4 Análises de tecidos autotróficos	61
2.4.1 Determinação dos parâmetros de fluorescência da clorofila <i>a</i> e troca gasosas	61
2.4.2 Análise de crescimento	62
2.4.3 Determinação da densidade estomática	62
2.4.4 Determinação de metabólitos	62
2.5 Análises de tecidos heterotróficos	63
2.5.1 Germinação de sementes e formação de plântulas normais	63
2.5.2 Análise de perfil de ácidos graxos	64
2.6 Análise estatística	64
3 RESULTADOS	65
3.1 Análises em tecidos autotróficos	66
3.2 Análises em tecidos heterotróficos	72
4 DISCUSSÃO	75
4.1 Efeitos da redução na expressão de <i>NDT2</i> em tecidos autotróficos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	75
4.2 Efeitos da baixa expressão de <i>NDT2</i> sobre tecidos e órgãos heterotróficos.....	79
5 CONCLUSÃO.....	81
6 AGRADECIMENTOS	81
7 REFERÊNCIAS.....	82
FIGURAS SUPLEMENTARES.....	89
CONCLUSÕES GERAIS	92
CONSIDERAÇÕES GERAIS	94

RESUMO

CHAVES, Izabel de Souza, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Efeitos fisiológicos da expressão reduzida de transportadores de NAD⁺ em *Arabidopsis thaliana*.** Orientador: Adriano Nunes Nesi. Coorientadores: Edgard Augusto de Toledo Picoli, Marcelo Rogalski e Wagner Luiz Araújo.

Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) e seu derivado NADP⁺ são compostos essenciais em todos os organismos vivos e que estão envolvidos em transações energéticas, na sinalização celular e em diversas reações na forma de coenzimas. Alterações no catabolismo ou no anabolismo do NAD⁺ podem modificar não apenas a sua concentração, mas também o poder redutor celular, impactando aspectos importantes do crescimento e desenvolvimento. Uma vez que as etapas finais da biossíntese de NAD⁺ ocorrem no citosol, o mesmo precisa ultrapassar membranas biológicas para exercer suas funções dentro de organelas celulares. Neste trabalho, avaliou-se em *Arabidopsis thaliana* o papel dos transportadores cloroplástico e mitocondrial de NAD⁺, denominados *AtNDT1* e *AtNDT2*, respectivamente. Para tal, foram utilizadas linhagens mutantes obtidas por inserção do T-DNA e foram geradas plantas transgênicas contendo uma construção antisense para os transportadores *NDT1* e *NDT2*, sob o controle do promotor 35S, das quais, três linhagens com reduzida expressão de cada transportador foram selecionadas. Estas plantas foram caracterizadas extensivamente a nível fisiológico e bioquímico. Verificou-se que plantas com expressão reduzida de *NDT1* apresentam maior número de folhas e área foliar específica em relação às plantas não transformadas (WT). Observaram-se também maiores taxas de fotossíntese por unidade de massa e, conseqüentemente, maior acúmulo de sacarose e amido em comparação com o WT. Entretanto, estas plantas apresentaram menor viabilidade do grão de pólen, redução no comprimento das síliquas e sementes abortadas. Já em plantas com reduzida expressão do transportador *NDT2* descobriu-se que apesar de possuírem menor número de folhas, a área foliar aumentou. A fotossíntese nestas plantas diminuiu consideravelmente em decorrência de uma menor densidade estomática e condutância estomática. Concomitantemente, plantas com reduzida expressão de *NDT2* apresentaram menor acúmulo de amido. A germinação das sementes e formação de plântulas foram menores e mais lentas em comparação com o WT. Além disso, houve aumento na concentração relativa de alguns ácidos graxos durante o estabelecimento das plântulas. Diante dos resultados obtidos, sugere-se que os transportadores de NAD⁺ estão envolvidos na determinação do número de folhas e área foliar, na fotossíntese, na condutância estomática e nas concentrações de amido. Além disso, tecidos heterotróficos

também são fortemente influenciados, especialmente aqueles envolvidos em processos reprodutivos. Para compreender a função deste transportador é necessário analisar não apenas a concentração celular dos nucleotídeos de pirimidina, mas também como alterações no *status* redox celular afetam o metabolismo vegetal. Assim, os dados obtidos neste trabalho sugerem que alterações no estado redox em cloroplastos e mitocôndrias causadas pela diminuição da expressão de *NDT1* ou *NDT2* afetam processos em outras organelas que não aquela em que ocorre a redução da expressão. Estes resultados abrem possibilidades para aplicações biotecnológicas, uma vez que a regulação da biossíntese e transporte de cofatores pode ser usada como uma ferramenta para estratégias de aumento da assimilação de carbono em plantas. Para tal, é necessário, no entanto compreender mais o papel destes transportadores em outros tecidos vegetais e condições adversas bem como o papel de enzimas chave que atuam no processo.

ABSTRACT

CHAVES, Izabel de Souza, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2015. **Physiological effects of NAD⁺ transporters reduced expression in *Arabidopsis thaliana*.** Adviser: Adriano Nunes Nesi. Co-advisers: Edgard Augusto de Toledo Picoli, Marcelo Rogalski and Wagner Luiz Araújo.

Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP⁺) are indispensable redox-active components of all living organisms. These nucleotides play essential roles in signaling and in many reactions as they act as co-enzymes. NAD catabolism or anabolism changes impact not only the concentration of these coenzymes but also the cellular poise, modifying plant growth and development. Since the final steps of NAD⁺ biosynthesis occurs in cytosol, this nucleotide needs to be imported by organelles to play its functions inside cellular organelles. This work analyzed the function of a plastid and a mitochondrial *Arabidopsis thaliana* NAD⁺ transporter, named as *AtNDT1* e *AtNDT2* respectively. We have isolated T-DNA insertion mutants and three antisense lines, controlled by the 35S promoter, for *NDT1* and *NDT2*. Plants with reduced expression of *NDT1* and *NDT2* were individually selected and characterized at physiological and biochemical level. It was verified that *NDT1* low expression lines displayed higher leaf number and specific leaf area compared to wild type plants (WT). Interestingly, higher photosynthesis per mass unit and sucrose and starch concentration was observed. On the other hand, *NDT1* low expression lines show less pollen viability and reduced silique length and increased the number of aborted seeds. The low expression *NDT2* lines displayed reduced number of leaves and increased leaf area. Despite these phenotypes, the net photosynthetic rate decreased considerably due to lower stomatal conductance, possible as a consequence of lower stomatal density. Concomitantly, these plants showed lower starch accumulation during the day. The germination and seedling growth rate were reduced as compared to WT. Furthermore, the oil relative concentration increased during seedling establishment. Based on these results, we conclude that NAD⁺ transporters have important function in determining leaf number, area, stomatal conductance, photosynthetic rate and starch accumulation. Moreover, heterotrophic tissues are strongly affected by the reduction in the expression of these transporters, especially those tissues involved in reproductive process. For a better understanding of the role played by these transporters, it is necessary to analyze not only nucleotide cellular concentration but also the redox poise in different cell compartments. Thus, the results presented in this thesis suggest that lower expression of NAD transporters alters redox poise in different organelles

affecting important physiological processes. These results open possibilities for biotechnology application, once the regulation of biosynthesis and transport of cofactors might be used as a tool for increasing carbon assimilation in plants. Nonetheless, it is necessary understanding the role of these transporters in other plant tissues and plant cultivated under stress conditions involved in these processes.

INTRODUÇÃO GERAL

A compartimentalização do metabolismo é uma característica de todas as células eucarióticas. Os compartimentos subcelulares são geralmente delimitados por uma bicamada lipídica que mantém a integridade do compartimento e forma microambientes específicos. Embora física e bioquimicamente distintos estes compartimentos e seus conteúdos metabólicos estão interligados pelo transporte de metabólitos entre diferentes organelas, como mitocôndrias e cloroplastos, e o citosol (Krueger et al., 2011). Dessa forma, para o funcionamento adequado do metabolismo celular, o intercâmbio de moléculas entre os diferentes compartimentos celulares deve ocorrer de forma rápida e precisa para atender a grande oferta e demanda de precursores metabólicos (Weber e Fischer, 2007). Assim, torna-se necessário a existência de proteínas específicas que realizem a importação e exportação de metabólitos através destas membranas para que o metabolismo celular ocorra adequadamente (Linka e Weber, 2010; Palmieri et al., 2011; Sze et al., 2013; Hedrich et al., 2015).

Boa parte das proteínas que realizam este tipo de transporte são proteínas carreadoras homólogas pertencentes a uma família de transportadores mitocondriais presente em diferentes organismos eucarióticos, a *Mitochondrial Carrier Family* (MCF) (Picault et al., 2004). Os membros desta família apresentam algumas características estruturais em comum, como seis segmentos transmembrana do tipo α -hélice e cinco porções hidrofílicas que, em conjunto, podem ser divididos em três domínios. Cada domínio possui aproximadamente 100 aminoácidos de comprimento e consiste de duas α -hélice transmembranas separadas por um *loop* hidrofílico (Picault et al., 2004). Estas proteínas são relativamente pequenas, com massa molecular entre 30-34 kDa e transportam uma grande variedade de moléculas, dentre as quais o nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) (Millar e Heazlewood, 2003; Picault et al., 2004; Palmieri e Pierri, 2010; Palmieri et al., 2011). Embora análises das sequências de aminoácidos indiquem que os transportadores da família MCF possuem homologia com proteínas localizadas na membrana mitocondrial interna, verifica-se que muitas destas proteínas estão localizadas em outras organelas celulares como cloroplasto, peroxissomo e retículo endoplasmático (Palmieri et al., 2011). Variações nas porções N e C-terminal dos aminoácidos que compõem estas proteínas servem de indicadores da correta organela para a qual elas devem fazer parte (Palmieri et al., 2009).

O NAD⁺ é um metabólito central no metabolismo celular e está envolvido em transações energéticas, na sinalização celular e em diversas reações na forma de coenzimas (Rasmusson e Wallström, 2010). Alterações no catabolismo ou no anabolismo do NAD⁺ podem alterar não apenas a sua concentração, mas também o poder redutor celular, impactando aspectos importantes do crescimento e desenvolvimento das plantas (Noctor et al. 2006; Hashida et al., 2009). Devido a sua capacidade de transportar elétrons, o NAD⁺ é essencial em praticamente todas as organelas e funções celulares. Nas mitocôndrias, por exemplo, o NAD(P)⁺ participa da síntese de proteínas Fe/S, da cadeia transportadora de elétrons, do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) e da descarboxilação da glicina enquanto que nos cloroplastos, está envolvido no ciclo de Calvin e Benson e via oxidativa das pentoses fosfatadas (Geigenberger e Fernie, 2014). Já no peroxissomo atua em etapas da β-oxidação (Bernhardt et al., 2012).

A biossíntese do NAD⁺ pode ocorrer por uma via *de novo* e uma via de salvamento (Hashida et al., 2009). A via *de novo* inicia-se nos plastídeos tendo como precursores os aminoácidos aspartato ou triptofano, enquanto a via de salvamento começa com a nicotinamida (NAM) ou com o ácido nicotínico (NA). Ambas as vias convergem para a formação do ácido nicotínico mononucleotídico (NaMN) que por sua vez originará o NAD⁺. Como essa última etapa é realizada no citosol, após ser sintetizado, o NAD⁺ precisa, necessariamente, ser importado para o interior das organelas celulares para que possa exercer suas funções (Noctor et al., 2006).

Em uma bactéria simbiótica *Chlamydiae* foi identificado a primeira proteína candidata ao transporte de NAD⁺. A descoberta deste candidato a transportador antiporte NAD⁺/ADP demonstrou pela primeira vez que moléculas de NAD⁺ podem ser transportadas através de membranas citoplasmáticas (Haferkamp et al., 2004). Posteriormente, uma proteína denominada ScNDT (NDT: *Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD⁺) Transporter*) foi identificada em leveduras pela sua capacidade de realizar o transporte de NAD⁺ (Todisco et al., 2006). A caracterização desta proteína revelou que esta possui uma alta afinidade por NAD⁺ e sua localização na membrana mitocondrial interna indicou o provável envolvimento no fornecimento de NAD⁺ à matriz por transporte do tipo antiporte em troca de, principalmente, ADP e AMP (Todisco et al., 2006). Após esta descoberta, foram identificadas proteínas carreadoras em *Arabidopsis* que realizam o transporte do NAD⁺ para organelas celulares, tais como o transportador AtNDT1 (At2g47490) que está localizado na membrana

interna do cloroplasto, o *AtNDT2* (At1g25380) que está localizado na membrana interna mitocondrial (Palmieri et al., 2009) e o *PXN* (At2g39970), um transportador que reside na membrana do peroxissomo (Bernhardt et al., 2012). *AtNDT1* e *AtNDT2* possuem 61% de similaridade entre seus aminoácidos. As maiores diferenças, entretanto, consistem no fato de que *AtNDT2* exibe na sua porção N-terminal um suposto peptídeo de trânsito e que a extensão C-terminal de *AtNDT1* é 45 aminoácidos mais curta que a de *AtNDT2*. Estas diferenças podem estar relacionadas ao direcionamento dos transportadores à sua organela correspondente (Palmieri et al., 2009). Além disso, *AtNDT1* e *AtNDT2* possuem propriedades de transporte similares e embora transportem preferencialmente NAD^+ , ambos aceitam AMP e ADP como substrato de troca e não nicotinamida ou ácido nicotínico ou NADP^+ e NADPH (Palmieri et al., 2009). Já o *PXN* troca preferencialmente AMP, também em transporte antiporte $\text{NAD}^+_{in}/\text{AMP}_{out}$ (Bernhardt et al., 2012).

Tanto *NDT1* quanto *NDT2* de *Arabidopsis* foram recentemente caracterizados em nível molecular e bioquímico (Palmieri et al., 2009). Os genes que codificam para os transportadores *NDT1* e *NDT2* são fortemente expressos em tecidos em desenvolvimento e em células com alta atividade metabólica, embora seus padrões de expressão difiram de acordo com o tecido considerado (Palmieri et al., 2009). Além disso, análises *in silico*, indicam alta expressão de *NDT1* em grãos de pólen maduros e em células-guarda, enquanto o *NDT2* é mais expresso em sementes e em diferentes estádios de germinação. Já o *PXN* foi caracterizado através de linhagens mutantes por inserção de T-DNA em *Arabidopsis* (Bernhardt et al., 2012). Este estudo demonstrou que a ausência do transportador em *Arabidopsis* altera o perfil de ácidos graxos durante o estabelecimento de plântulas e possivelmente causa alterações na β -oxidação durante o estabelecimento de plântulas uma vez que o *PXN* transporta NAD^+ necessário para a oxidação de ácidos graxos durante a mobilização de lipídeos durante a germinação da semente e desenvolvimento da plântula (Bernhardt et al., 2012).

Apesar dos estudos bioquímicos e moleculares terem contribuído para a compreensão do papel desses transportadores *in vitro*, o papel fisiológico destas proteínas carreadoras de NAD^+ ainda permanece obscuro. Ainda é desconhecida a função destes transportadores em plantas cultivadas sob condições ambientais ótimas ao crescimento e desenvolvimento vegetal, bem como em condições ambientais adversas. Em adição, pouco se sabe sobre a função destes transportadores nos diferentes tecidos vegetais onde o metabolismo de NAD^+

parece ser de extrema importância como em folhas iluminadas e em processos como a formação e desenvolvimento de tecidos síliquas e sementes, germinação e eventos pós-germinativos.

Desta forma, é de fundamental importância verificar e compreender o papel fisiológico destas proteínas em plantas. Assim, este trabalho caracterizou morfológica e fisiologicamente plantas de *Arabidopsis*, cuja expressão dos genes *NDT1* e *NDT2* foram especificamente reduzidas. Estas plantas forneceram informações básicas para o entendimento de como e em que nível o transporte de NAD^+ possui um papel relevante no metabolismo celular. Para tal, os dois transportadores foram analisados isoladamente, sendo as principais alterações fenotípicas das plantas com baixa expressão do transportador *NDT1* descritas no capítulo 1, e os principais fenótipos encontrados em plantas com baixa expressão do transportador *NDT2* apresentadas no capítulo 2.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bernhardt K, Wilkinson S, Weber APM, Linka N** (2012) A peroxisomal carrier delivers NAD⁺ and contributes to optimal fatty acid degradation during storage oil mobilization. *Plant J* **69**: 1–13
- Geigenberger P, Fernie AR** (2014) Metabolic control of redox and redox control of metabolism in plants. *Antioxid Redox Signal* **21**: 1389-421
- Haferkamp I, Schmitz-Esser S, Linka N, Urbany C, Collingro A, Wagner M, Horn M, Neuhaus HE** (2004) A candidate NAD⁺ transporter in an intracellular bacterial symbiont related to Chlamydiae. *Nature* **432**: 622-625
- Hashida S, Takahashi H, Uchimiya H** (2009) The role of NAD biosynthesis in plant development and stress responses. *Ann Botany* **103**: 819–824
- Hedrich R, Sauer N, Neuhaus HE** (2015) Sugar transport across the plant vacuolar membrane: nature and regulation of carrier proteins. *Curr Opin Plant Biol* **25**: 63-70
- Krueger S, Giavalisco P, Krall L, Steinhauser M, Büssis D, Usadel B, Flügge, Fernie AR, Willmitzer L, Steinhauser D** (2011) A topological map of the compartmentalized *Arabidopsis thaliana* leaf metabolome. *PLoS ONE* **6**: e17806
- Linka N, Weber APM** (2010) Intracellular metabolite transporters in plants. *Mol Plant* **3**: 21-53
- Millar AH, Heazlewood JL** (2003) Genomic and proteomic analysis of mitochondrial carrier proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **131**: 443-453
- Noctor G, Queval G, Gakière B** (2006) NAD(P) synthesis and pyridine nucleotide cycling in plants and their potential importance in stress conditions. *J Exp Bot* **57**: 1603-1620
- Palmieri F, Pierri CL** (2010) Structure and function of mitochondrial carriers – Role of the transmembrane helix P and G residues in the gating and transport mechanism. *FEBS Lett* **584**: 1931-1939
- Palmieri F, Pierri CL, Grassi A, Nunes-Nesi A, Fernie AR.** (2011) Evolution, structure and function of mitochondrial carriers: a review with new insights. *Plant J* **66**: 161–181
- Palmieri F, Rieder B, Ventrella A, Blanco E, Thi Do P, Nunes-Nesi A, Trauth AU, Fiermonte G, Tjanden J, Agrimi G, Kirchberger S, Paradies E, Fernie AR, Neuhaus HE** (2009) Molecular identification and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* mitochondrial and chloroplastic NAD⁺ carrier proteins. *J Biol Chem* **284**: 31249-31259
- Picault N, Hodges, M, Palmieri L, Palmieri, F** (2004) The growing family of mitochondrial carriers in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* **9**: 138-146
- Rasmusson AG, Wallström SV** (2010) Involvement of mitochondria in the control of plant cell NAD(P)H reduction levels. *Biochem Soc Trans* **38**: 661–666

Sze H, Geisler M, Murphy AS (2014) Linking the evolution of plant transporters to their functions [Editorial]. *FPLS* **4**: 1-2

Todisco S, Agrimi G, Castegna A, Palmieri F (2006) Identification of the mitochondrial NAD1 transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **281**: 1524–1531

Weber AP, Fischer K (2007) Making the connections—the crucial role of metabolite transporters at the interface between chloroplast and cytosol. *FEBS Lett* **581**: 2215–2222

CAPÍTULO 1

Determinação do papel fisiológico do transportador cloroplastídico de NAD⁺ (NDT1) em plantas de *Arabidopsis thaliana*

Izabel de Souza Chaves¹, Alexandra Florian², Jorge Alberto Condori Apfata¹, Marcel Viana Pires³, Fábio Murilo Da Matta³, Toshihiro Obata², Wagner L. Araújo¹, Nicole Linka⁴, Ferdinando Palmieri⁵, Alisdair R. Fernie², Adriano Nunes-Nesi⁶

¹ Max Planck Partner Group, Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900 Viçosa, Minas Gerais, Brasil

² Max-Planck-Institute of Molecular Plant Physiology Am Mühlenberg 1, 14476 Potsdam-Golm, Germany

³ Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900 Viçosa, Minas Gerais, Brasil

⁴ Department of Plant Biochemistry, Heinrich Heine University Düsseldorf, 40225, Düsseldorf, Germany

⁵ Department of Pharmaco-Biology, Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, University of Bari, 70125 Bari, Italy

RESUMO

Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) e seu derivado NADP^+ são compostos essenciais em todos os organismos vivos e atuam em processos metabólicos fundamentais como fotossíntese e respiração, entre outros. Uma vez que as etapas finais da biossíntese de NAD^+ ocorrem no citosol, o mesmo precisa ultrapassar membranas biológicas para exercer suas funções dentro de organelas celulares. Neste trabalho, avaliou-se em *Arabidopsis* o papel do transportador cloroplastídico de NAD^+ , denominado *AtNDT1*. Foram geradas plantas transgênicas contendo uma construção antisense para o transportador *AtNDT1* sob o controle do promotor 35S. Destas, três linhagens foram isoladas por apresentarem redução significativa na expressão do transportador *AtNDT1*. Em adição, uma linhagem mutante obtida pela inserção do T-DNA foi também utilizada. Após uma caracterização detalhada das plantas com reduzida expressão de *NDT1* verificou-se um aumento no número de folhas e na área foliar específica em relação as plantas não transformadas (WT). Observaram-se também maiores taxas de fotossíntese por unidade de massa e conseqüentemente um maior acúmulo de sacarose e amido em comparação com o WT. Entretanto, plantas com baixa expressão de *NDT1* apresentaram menor viabilidade do grão de pólen, redução no comprimento das siliquis e um grande número de sementes abortadas. Assim, estes resultados indicam que o transportador *NDT1* possui papel relevante tanto em tecido autotróficos quanto heterotróficos. Embora, aparentemente, as plantas com reduzida expressão de *NDT1* sejam favorecidas em seu crescimento e concentrações de açúcares e amido, estas plantas são profundamente afetadas em relação ao seu desenvolvimento reprodutivo. Acredita-se que o transportador *NDT1*, assim como o NAD^+ , sejam importantes na manutenção do potencial redox entre tecidos autotróficos e heterotróficos.

PALAVRAS-CHAVE:

Transportadores, nicotinamida adenina dinucleotídeo, fotossíntese e metabolismo

1 INTRODUÇÃO

Nucleotídeos de piridina são metabólitos essenciais em numerosas reações de oxidação e redução em todos os organismos vivos. A nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) e seu derivado fosforilado (NADP^+) são coenzimas centrais na regulação da homeostase celular. Alterações no catabolismo ou no anabolismo destes nucleotídeos podem alterar não apenas a sua concentração, mas também o poder redutor da célula, influenciando o crescimento e desenvolvimento das plantas (Noctor et al., 2006, Hashida et al., 2009). Devido a sua capacidade de transportar elétrons, NAD^+ e NADP^+ são essenciais em praticamente todas as organelas e funções celulares (Hashida et al., 2010).

No cloroplasto a redução do NADP^+ a NADPH , durante a etapa fotoquímica da fotossíntese, é fundamental para fotossíntese e outros processos que utilizam essas coenzimas. O fluxo linear de elétrons opera em série nos fotossistemas e leva a transferência de elétrons da água para o NADP^+ . Concomitantemente ao transporte de elétrons, prótons são concentrados no estroma do cloroplasto gerando um gradiente eletroquímico de prótons que possibilita a síntese de ATP pelo complexo ATPase (Nelson e Yocum, 2006). O ciclo de Calvin e Benson utiliza os produtos das reações luminosas da fotossíntese, ATP e NADPH para reduzir CO_2 inorgânico a açúcares orgânicos (Michelet et al., 2013).

Tanto NAD(H) quanto NADP(H) desempenham um papel essencial nas vias de sinalização por meio da geração e eliminação de espécies reativas de oxigênio (Hashida et al., 2010). Estas coenzimas também estão envolvidas na adaptação a estresses ambientais, tais como radiação UV, salinidade, temperatura e seca (De Block et al., 2005). Ademais, estudos recentes utilizando mutantes knockout das enzimas constituintes das vias *de novo* e de salvamento da biossíntese de piridinas destacaram a importância dos nucleotídeos de piridina em outros processos como viabilidade do grão de pólen e crescimento do tubo polínico (Hashida et al., 2007), germinação (Hunt et al., 2007), movimento estomático (Hashida et al., 2010), florescimento (Liu et al., 2009), desenvolvimento (Hashida et al., 2009), senescência (Schippers et al., 2008) e assimilação do nitrogênio (Takahashi et al., 2009). Assim, em conjunto, estes estudos demonstram que o metabolismo do NAD é fundamental para uma série de processos metabólicos em uma célula vegetal.

Tem-se observado em plantas que a biossíntese do NAD^+ pode ocorrer por uma via *de novo* ou por uma via de salvamento (Hashida et al., 2009). A via *de novo* inicia-se nos

plastídios tendo como precursores aspartato ou triptofano. Já a via de salvamento começa com a nicotinamida (NAM) ou com o ácido nicotínico (NA). Ambas as vias convergem para a formação do ácido nicotínico mononucleotídeo (NaMN) que por sua vez originará o NAD⁺. Como essa última etapa é realizada no citosol, após ser sintetizado, o NAD⁺ precisa, necessariamente, ser importado para o interior das organelas celulares para que possa exercer suas funções (Noctor et al., 2006).

Em leveduras foi identificada uma proteína denominada ScNDT (NDT: *Nicotinamide Adenine Dinucleotide* (NAD⁺) *transporter*) capaz de realizar o transporte de NAD⁺ (Todisco et al., 2006). A caracterização dessa proteína revelou sua localização na membrana mitocondrial interna. Além disso, verificou-se que esta proteína possui uma alta afinidade por NAD⁺ sugerindo como provável função o fornecimento de NAD⁺ à matriz mitocondrial por transporte do tipo antiporte em troca de, principalmente, ADP e AMP (Todisco et al., 2006). Posteriormente foram identificadas três proteínas em *Arabidopsis* capazes de realizar o transporte do NAD⁺ para organelas celulares, o AtNDT1 (At2g47490) que está localizado na membrana interna do cloroplasto, o AtNDT2 (At1g25380) localizado na membrana interna mitocondrial (Palmieri et al., 2009) e PXN (At2g39970), que reside na membrana do peroxissomo (Bernhardt et al., 2012). AtNDT1 e AtNDT2 possuem propriedades de transporte similares e embora transportem preferencialmente NAD⁺, ambos aceitam AMP e ADP como substrato de troca e não nicotinamida ou ácido nicotínico ou NADP⁺ e NADPH (Palmieri et al., 2009). Já o PXN troca preferencialmente AMP em transporte do tipo antiporte NAD⁺/AMP (Bernhardt et al., 2012).

O transportador NDT1 foi caracterizado detalhadamente em nível molecular e funcional em condições *in vitro* (Palmieri et al., 2009). Constatou-se que o gene que codifica para esta proteína é fortemente expresso em tecidos em desenvolvimento e em células com alta atividade metabólica e taxas de divisão (Palmieri et al., 2009). A expressão de AtNDT1 predomina em células do mesófilo e na extremidade da raiz principal e de raízes adventícias. Verifica-se baixa expressão em tecidos florais, síliquas em desenvolvimento e sementes (Palmieri et al., 2009). Apesar disso, os estudos desenvolvidos até o momento apenas caracterizam bioquímica e molecularmente este transportador em condições *in vitro*. Contudo, a função fisiológica deste transportador ainda permanece por ser verificada.

Dada à importância do NAD⁺ e NADP⁺ no metabolismo vegetal acredita-se que a ausência do transporte de NAD impactaria o balanço redox das células em diferentes tecidos vegetais. Este impacto no balanço redox poderia influenciar o crescimento e o desenvolvimento da planta tanto em condições ambientais ótimas ao crescimento e desenvolvimento quanto em condições de estresse. Além disso, pesquisar a função de proteínas transportadoras é um ponto crítico para o melhor conhecimento dos processos fotossintéticos e sua regulação (Pfeil et al., 2014). Desta forma, este trabalho objetivou identificar e compreender o papel fisiológico do transportador cloroplastídico de NAD⁺ em *Arabidopsis thaliana* e compreender como e em que nível o transporte de NAD⁺ possui papel relevante para o metabolismo celular. Neste trabalho, discute-se a importância deste transportador em folhas iluminadas e os impactos da baixa expressão de *NDT1* em tecidos heterotróficos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Para a realização deste estudo foram utilizadas linhagens de *Arabidopsis* com diferentes níveis de redução na expressão do gene que codifica o transportador cloroplastídico de NAD⁺ (*AtNDT1*, *At2g47490*). Uma das linhagens (*ndt1::ndt1*), proveniente da coleção GABI-KAT (GK-241G12), foi obtida por meio de inserção de T-DNA, via *Agrobacterium tumefaciens*. Esta linhagem mutante apresenta a inserção de T-DNA no nono éxon do gene do transportador (Figura 1). As plantas mutantes foram selecionadas em meio com sulfadiazina e a inserção do T-DNA e a homozigose das plantas confirmada por PCR, utilizando *primers* específicos para o gene que confere resistência a sulfadiazina (*forward* 5'-GCACGAGGTACAAACCTCTACTCT-3', *reverse* 5'-GTCTCTCAAGTTTCAACCCATTCT-3' e T-DNA 5'-ATATTGACCATCATACTCATTGC-3').

Adicionalmente foram geradas plantas transgênicas pela inserção de uma construção do tipo antisense sob o controle do promotor 35S, obtidas pelo sistema Gateway (Landy, 1989; Ptashne, 1992; Hartley et al., 2000). Para tal, foram desenhados *primers* (*forward* 5'-

CCACCATGTCCGCTAATTCTCATCCTC-3' e *reverse* 5'-CTTAAAGTATAGAGCTTTG CTCAGAAGG-3') a partir de uma biblioteca de cDNA, para amplificação do fragmento do gene *At2g47490*. O produto purificado da reação de PCR foi recombinado com o vetor de doação (pDONR207) gerando um clone de entrada que foi transformado em *Escherichia coli* (linhagem DH5 α) para obtenção do plasmídeo contendo o gene de interesse. Uma segunda recombinação foi realizada utilizando-se o plasmídeo isolado com um vetor de destino (pK2WG7) para gerar um vetor de expressão que foi novamente transformado em *E. coli*. Posteriormente, as colônias positivas selecionadas foram utilizadas para transformar *A. tumefaciens* (linhagem GV3101) que foi, então, utilizada para infiltração em plantas WT, ecótipo Columbia-0 (Bechtold et al., 1993; Clough e Bent, 1998). O *cassete* continha também foi um gene marcador de resistência à higromicina com promotor *nos* e terminador *nos*, um promotor 35S e um terminador 35S. Como resultado, a transformação antisense do gene *NDT1* gera um *amplicon* de 939 pb.

2.2 Condições de cultivo

As sementes foram superficialmente esterilizadas e germinadas em meio MS (Murashige e Skoog, 1962) com metade da força iônica, suplementado com 1% de sacarose (p/v) e agente seletivo (sulfadiazina 5,25 mg/L ou higromicina 10 mg/L), de acordo com genótipo utilizado. Para as análises nos tecidos autotróficos, as placas com as sementes foram estratificadas por quatro dias a 4 °C e, posteriormente, mantidas em câmara de crescimento à 22 \pm 2 °C, umidade relativa de 60%, irradiância de 150 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 8 h de luz e 16 h de escuro, durante dez dias. Após este período, as plântulas foram transferidas para vasos de 0,08 dm^3 contendo substrato comercial Tropstrato HT[®] e mantidas nas mesmas condições. Durante a quarta semana após o transplante, avaliações fisiológicas e coletas de amostras em nitrogênio líquido para análises bioquímicas foram realizadas.

Já para as análises envolvendo tecidos heterotróficos, após serem estratificadas as placas foram mantidas em sala de crescimento climatizada à 22 \pm 2 °C, umidade relativa de 60%, irradiância de 150 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro, durante dez dias. Após este período as plântulas também foram transferidas para substrato comercial e avaliadas até a produção de sementes.

2.3 Análise de expressão gênica

Para a análise da expressão gênica foi utilizada a técnica de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR). Foi realizada a extração do RNA total em folhas utilizando-se o reagente TRIzol® (Invitrogen™) conforme indicações do fabricante. Em seguida o RNA total foi submetido a tratamento com DNase/RNase-free (Invitrogen™) e quantificado em espectrofotômetro a 260 nm. Aproximadamente 2 µg de RNA isolado foram utilizados para sintetizar a fita de DNA complementar (cDNA) com o *kit* ImProm-II™ *Reverse Transcription System* (Promega, Brasil) e Oligo (dT)₁₅, seguindo as recomendações descritas no mesmo. As reações de qRT-PCRs foram feitas 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) nas recomendações do produto. Utilizou-se os *primers* específicos *forward* 5'-GGGAATTCGCGGATTGTACAGT GG-3' e *reverse* 5'-TGGGAAACTGAATGGCAACATGAC-3' e como controle endógeno, para normalização dos valores da expressão gênica, os *primers forward* 5'-TTTCGGCTGA GAGGTTTCGAGT-3' e *reverse* 5'-GATTCCAAGACGTAAAGCAGATCAA-3', desenhado para o gene *At5g15710* que codifica a proteína F-box. Foram utilizadas seis plantas por linhagem e as amostras foram amplificadas em duplicata com as seguintes etapas: 94 °C por 10 min, seguidos de 40 ciclos de 94 °C por 15 s, 58 °C por 15 s e 72 °C por 15 s.

2.4 Análises de tecidos autotróficos

2.4.1 Determinação dos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* e trocas gasosas

Os parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* foram avaliados após 1 h do início do período luminoso por meio 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.). Curvas de resposta de taxa de assimilação líquida de CO₂ (*A*) à radiação fotossinteticamente ativa (*A/RFA*) foram obtidas utilizando-se uma câmara foliar de 2 cm², temperatura de 25 °C, concentração ambiente de CO₂ (*C_a*) dentro da câmara de 400 µmol CO₂ mol⁻¹ e variações da *RFA* na sequência: 1000, 1200, 1000, 800, 400, 200, 100, 50, 25, 10 e 0 µmol fótons m⁻² s⁻¹. As variáveis derivadas das curvas *A/RFA*, tais como irradiância de compensação (*I_c*), de saturação (*I_s*), eficiência no uso

da luz ($1/\Phi$) e taxa de assimilação líquida de carbono saturada pela luz (A_{RFA}) foram estimadas a partir de ajustes da curva de resposta à luz pelo modelo hiperbólico não-retangular (von Caemmerer, 2000).

Uma vez que a radiação de saturação foi próxima a $400 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 1, dados suplementares), avaliou-se a A nesta radiação e nas mesmas condições descritas anteriormente e observando-se que houve aumento na \u00e1rea foliar espec\u00edfica (AFE) e no n\u00famero de folhas das plantas mutantes, estimou-se a fotoss\u00edntese por unidade de massa, isto \u00e9 $A_{\text{masa}} = A \cdot \text{AFE}$. A taxa de fotorrespira\u00e7\u00e3o (R_p) foi estimada pela f\u00f3rmula: $R_p = ((1/12) \cdot (J_{\text{flu}} - (4 \cdot (A + R_d))))$, onde J_{flu} equivale a taxa de transporte de el\u00e9trons estimada por par\u00e2metros de fluoresc\u00eancia (Valentini et al., 1995). Tamb\u00e9m foi calculada a efici\u00eancia instant\u00e2nea (A/E) e intr\u00ednseca (A/g_s) do uso da \u00e1gua (EUA), onde E = transpira\u00e7\u00e3o e g_s = condut\u00e2ncia estom\u00e1tica.

Os valores de respira\u00e7\u00e3o (R_d) foram determinados durante a noite, ap\u00f3s 1 h de aclima\u00e7\u00e3o ao escuro. A efici\u00eancia fotoqu\u00edmica m\u00e1xima do FSII (F_v/F_m), tamb\u00e9m foi avaliada ap\u00f3s 1 h de aclima\u00e7\u00e3o ao escuro, por\u00e9m uma irradi\u00e2ncia de $0,03 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi aplicada para determinar a fluoresc\u00eancia inicial (F_0). Para obten\u00e7\u00e3o da fluoresc\u00eancia m\u00e1xima (F_m) um pulso saturante de $6000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi aplicado por 0,8 s. A F_v/F_m foi ent\u00e3o calculada como $(F_m - F_0)/F_m$. Procedeu-se ainda, \u00e0 estima\u00e7\u00e3o do *quenching* n\u00e3o fotoqu\u00edmico (NPQ) e da taxa de transporte de el\u00e9trons (ETR), conforme descrito por DaMatta et al. (2002) e Lima et al. (2002). Em todas estas an\u00e1lises foram avaliadas seis plantas por gen\u00f3tipo.

2.4.2 An\u00e1lise de crescimento

Ap\u00f3s as medi\u00e7\u00f5es de trocas gasosas e fluoresc\u00eancia, as plantas foram coletadas e os seguintes par\u00e2metros de crescimento foram avaliados: massa seca da roseta (MSR), massa seca do sistema radicular (MSSR), raz\u00e3o raiz/parte a\u00e9rea (RPA), \u00e1rea foliar da roseta (AR), \u00e1rea foliar espec\u00edfica da roseta (AER), n\u00famero de folhas (NF), \u00e1rea foliar total (AFT) e \u00e1rea foliar espec\u00edfica (AFE). A AR e a AFT foram determinadas pelo m\u00e9todo da imagem digital, onde as folhas foram digitalizadas com aux\u00edlio de um scanner (Hewlett Packard Scanjet G2410, Palo Alto, Calif\u00f3rnia, EUA) e as imagens obtidas processadas com aux\u00edlio do

software Rosette Tracker (De Vyllder et al., 2012). A AER e AFE foram estimadas utilizando a fórmula: AER (ou AFE) = AR (ou AF)/MSR.

2.4.3 Determinação da densidade estomática

Determinou-se a densidade estomática (número de estômatos mm^{-2}) das folhas das plantas mutantes em comparação com o WT. Para tal foram realizadas impressões epidérmicas utilizando-se um molde odontológico (Berger e Altmann, 2000). A impressão foi retirada na superfície abaxial de uma folha completamente expandida por planta e foram utilizadas seis plantas por genótipo. Sobre este molde foi passado uma base incolor para formar uma fina película (Von Groll et al., 2002) que posteriormente foi retirada e colocada sobre uma lâmina e levada ao microscópio (Zeiss modelo AX10) para a visualização da impressão das células. Em cada molde, dez regiões distintas foram avaliadas a fim de caracterizar, de forma mais homogênea possível, a região foliar amostrada. A visualização e registro das imagens foram feitas utilizando-se uma câmera digital (AxioCamMRc) acoplada a microscópio e o número de células estomáticas determinado utilizando-se o programa Axiovision 4.8.

2.4.4 Determinação de metabólitos

Seis rosetas inteiras de cada linhagem foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido às 8 h, 12 h e 16 h, correspondendo ao início, meio e fim do período luminoso, e às 24 h e 8 h que representam o meio e final do período de escuro. As amostras foram então armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até as análises. Foram utilizadas seis plantas por genótipo para cada extração. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas e alíquotas de aproximadamente 20 mg de matéria fresca foram submetidas à extração etanólica conforme descrito por Gibon et al. (2004). Após a extração formam-se duas fases: uma fração solúvel em etanol e uma insolúvel. Utilizando-se um leitor de microplacas (OptiMax Tunable Microplate Reader) quantificaram-se na fração solúvel em etanol os teores de clorofilas, nitrato (Sulpice et al. 2009), glicose, frutose e sacarose (Ferne et al., 2001), aminoácidos solúveis totais (Gibon et al., 2004) e ácidos orgânicos como malato e fumarato (Nunes-Nesi et

al., 2007). Já na fração insolúvel determinaram-se os teores de amido e proteína (Gibon et al., 2004). Posteriormente, foram calculadas as taxas de síntese do amido ((concentração de amido no final do período luminoso – concentração de amido no início do período de luminoso) / número de horas de luz) e a taxa de degradação do amido ((concentração de amido no final do período luminoso – concentração amido no final do período de escuro) / número de horas de escuro). Além disso, alíquotas de aproximadamente 25 mg de amostras foliares foram coletadas no meio do período de luz para quantificação dos nucleotídeos NAD⁺, NADH, NADP⁺ e NADPH de acordo com o protocolo descrito por Schippers et al. (2008).

O perfil metabólico foi avaliado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS), utilizando alíquotas de aproximadamente 25 mg de amostras foliares coletadas no meio do período de luz. A extração foi realizada conforme protocolo descrito por Lisec et al. (2006). Após a extração e separação de fases, alíquotas de 200 µL de cada amostra foram coletadas, secas a vácuo e armazenadas a -80 °C até o processo de derivatização. Para as análises via GC-MS o procedimento utilizado foi exatamente como descrito por Lisec et al. (2006) e a identificação dos metabolitos seguiu as recomendações de Fernie et al. (2011).

2.5 Análises de tecidos heterotróficos

2.5.1 Avaliações morfológicas

A viabilidade do grão de pólen foi avaliada pelo contraste com carmim acético conforme descrito por Lorenzon e Almeida (1996). Para isso, anteras dos diferentes genótipos foram maceradas e os grãos de pólen liberados foram transferidos para o corante e avaliados em microscópio de luz (modelo Olympus AX-70, Olympus Optical, Tóquio, Japão). Foram analisadas seis flores de seis plantas de cada linhagem e considerados como inviáveis os grãos de pólen não corados e, ou deformados.

Adicionalmente, foram determinados o comprimento e diâmetro das síliquas produzidas pelos genótipos com o auxílio de um microscópio estereoscópico (modelo Olympus SZX7) com câmera acoplada e-330 (Olympus Optical, Tóquio, Japão). Seis síliquas de seis plantas de cada linhagem foram fotografadas e medidas com ajuda do software Motic

Images Plus 2.0 para Windows (Motic instruments, INC, Richmond, Canadá). Todas as sementes formadas em cada síliqua foram contadas e avaliadas quanto ao comprimento e diâmetro utilizando os aparelhos citados. Além disso, foi avaliado o peso de mil sementes e o peso de todas as sementes produzidas por uma mesma planta.

2.5.2 Germinação de sementes e formação de plântulas normais

Sementes de plantas *ndt1:ndt1* e WT foram esterilizadas e colocadas para germinar conforme descrito no item 2.2. Posteriormente, foram avaliadas a percentagem de germinação, o índice de velocidade de germinação (IVG), a percentagem de plântulas normais e anormais (incluindo plântulas albinas) e o índice de emergência (IVE). O IVG e o IVE foram calculados pelo somatório do número de sementes germinadas (ou plântulas normais) a cada dia, dividido pelo número de dias decorridos entre a semeadura e a germinação, de acordo com a fórmula de Maguire (1962). Foram realizadas seis repetições com 50 sementes cada.

2.5.3 Análise de perfil de ácidos graxos

Ácidos graxos de sementes maduras e de plântulas com dois, quarto e seis dias de idade foram extraídos e derivatizados conforme descrito por Browse et al. (1986) e analisados como metil-ésteres (FAMES). O perfil de ácidos graxos foi analisado por espectrometria de massa acoplada a um cromatógrafo gasoso (*electron impact - time of flight - mass spectrometry*, GC-EI-TOF-MS), sendo o ácido graxo 17:0 utilizado como padrão interno para possibilitar a quantificação. A identificação dos compostos foi baseada no tempo de retenção e comparação do espectro de massas com espectros de referência disponíveis nas bibliotecas NIST 08 e NIST 08s (*National Institute of Standards and Technology*, Babushok et al., 2007). A quantificação relativa foi feita automaticamente pela integração dos picos cromatográficos obtidos (Bernhardt et al., 2012). Posteriormente foi calculada a percentagem total de ácidos graxos e a percentagem de cada ácido graxo em comparação ao total para cada linhagem. Foram utilizadas três repetições por idade de coleta para cada linhagem.

2.6 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância segundo delineamento inteiramente casualizado. Os resultados foram avaliados pelo teste *t* de Student ($P < 0,05$).

3 RESULTADOS

Para investigar o papel fisiológico do transportador *NDT1* foram selecionadas linhagens de *Arabidopsis* com inserção de T-DNA ou antisense (Figura 1A). A linhagem com inserção de T-DNA para o gene *NDT1*, denominada de *ndt1:ndt1* apresentou apenas 13% da expressão de *NDT1* observada no controle (WT). Já as três linhagens antisense, denominadas *as-1-ndt1*, *as-2-ndt1* e *as-3-ndt1*, apresentaram 28%, 34% e 49% da expressão observada no WT, respectivamente (Figura 1B).

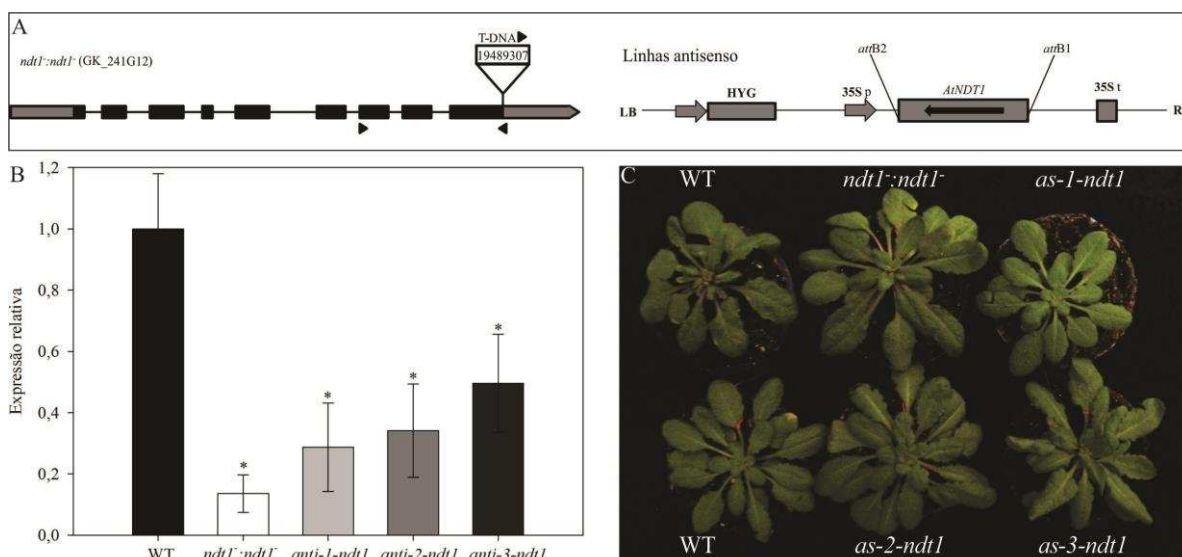


Figura 1. Obtenção e caracterização de linhagens mutantes e antisense para o transportador cloroplastídico de NAD^+ (*NDT1*) em *Arabidopsis thaliana*. A, representação esquemática do gene *AtNDT1* (*At2g47490*), indicando a inserção do T-DNA. As caixas representam os éxons e as setas próximas ao T-DNA a posição dos primers usados na seleção das plantas mutantes. As linhagens antisense apresentam o gene de resistência à higromicina (HYG), o promotor 35S e o gene *NDT1* na orientação antisense e um terminador 35S. B, expressão de *NDT1* em folhas de *Arabidopsis* tipo selvagem (WT), linhagem mutante e linhagens antisense. Os valores representam a média \pm erro padrão de seis amostras independentes e os asteriscos indicam diferenças significativas pelo teste *t* de Student ($P < 0,05$) em comparação com o tipo o WT. C, caracterização fenotípica de genótipos de *Arabidopsis* com reduzida expressão de *NDT1*. As plantas avaliadas possuíam quatro semanas de idade.

3.1 Parâmetros de crescimento e trocas gasosas

Uma vez selecionadas as linhagens, plantas dos quatro genótipos foram cultivadas e avaliadas na quarta semana de cultivo. Apesar dos genótipos com baixa expressão de *NDT1* não apresentarem alterações visuais nesta idade (Figura 1C), uma análise detalhada dos parâmetros de crescimento demonstrou diferenças marcantes em comparação ao controle. Observou-se que todas as linhagens com baixa expressão de *NDT1* apresentaram maior número de folhas (NF) em relação ao controle. Este aumento no NF foi acompanhado por aumento na AFT, AFE, AR e MSR, significativo para as linhagens *ndt1⁻:ndt1⁻* e *as-1-ndt1*, com tendências de aumento nos demais genótipos avaliados (Tabela 1).

Tabela 1: Parâmetros de crescimento de plantas de *Arabidopsis* com baixa expressão do gene *NDT1*. As plantas avaliadas possuíam quatro semanas de idade

Parâmetro*	WT	<i>ndt1⁻:ndt1⁻</i>	<i>as-1-ndt1</i>	<i>as-2-ndt1</i>	<i>as-3-ndt1</i>
MSR	50,0 ± 3,0	90,0 ± 3,0	80,0 ± 3,0	60,0 ± 8,0	60,0 ± 4,0
MSSR	10,0 ± 3,0	20,0 ± 3,0	20,0 ± 4,0	10,0 ± 4,0	10,0 ± 3,0
RPA	0,17 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,19 ± 0,01
NF	13,7 ± 1,4	19,2 ± 1,5	23,0 ± 0,3	21,0 ± 1,5	19,8 ± 1,3
AFT	14,64 ± 1,4	27,27 ± 1,5	20,42 ± 0,8	19,95 ± 2,2	18,65 ± 1,3
AFE	24,1 ± 2,4	32,0 ± 1,4	30,6 ± 0,9	33,1 ± 1,7	26,9 ± 1,5
AR	12,8 ± 1,6	25,7 ± 1,2	19,5 ± 0,6	16,7 ± 1,9	16,8 ± 0,6
AER	22,5 ± 5,1	30,3 ± 1,1	26,6 ± 0,5	27,9 ± 2,5	25,2 ± 1,2

Os valores representam a média ± erro padrão de seis amostras independentes; valores em negrito apresentam diferenças significativas pelo teste *t* de Student ($P < 0,05$) em comparação com o tipo selvagem (WT). Abreviações: *MSR: massa seca da roseta (mg), MSSR: massa seca do sistema radicular (mg), RPA: razão raiz/parte aérea, NF: número de folhas, AFT: área foliar total (cm²), AFE: área foliar específica (m² kg⁻¹), AR: área foliar da roseta (cm²), AER: área foliar específica da roseta (m² kg⁻¹).

As plantas com reduzida expressão de *NDT1* não apresentaram diferenças em comparação ao WT no que se refere à assimilação de CO₂ tanto a 400 μmol de fótons m⁻²s⁻¹ (Figura 2A) quanto a 100 e 200 μmol de fótons m⁻²s⁻¹ (Figura suplementar 1). Em adição, não foram observadas diferenças significativas entre os genótipos em relação aos parâmetros obtidos a partir da curva de resposta da fotossíntese a luz quando analisadas em unidade de área, isto é, todas as linhagens analisadas em uma equivalente área de folha (Figura

suplementar 1 e Tabela suplementar 1). Entretanto, com base nos resultados obtidos para a AFE, a fotossíntese foi também analisada em unidade de massa, isto é, levando-se em consideração a massa da folha e, portanto também a espessura foliar. Neste caso, observou-se um aumento significativo da fotossíntese nas plantas *ndt1:ndt1* e *as-1-ndt1* (Figura 2B). Quanto aos demais parâmetros de trocas gasosas verificaram-se que a g_s , a concentração interna de CO₂ (C_i), a E , a R_p e a densidade estomática diminuíram nas plantas deficientes no transportador NDT1 (Figura 2C, D, E, F; Figura suplementar 1). Já o NPQ e a R_d aumentaram nas plantas *ndt1:ndt1* em comparação com o WT (Figura 2G, H). Em relação à ETR, ao F_v/F_m e a eficiência instantânea (A/E) e intrínseca (A/g_s) do uso da água não houve diferenças estatísticas em comparação com o WT (Figura suplementar 1).

3.2 Avaliação do metabolismo ao longo do dia

Para avaliar as alterações metabólicas ocasionadas pela baixa expressão no transportador NDT1 foram avaliados vários compostos relacionados ao metabolismo do carbono e do nitrogênio ao longo do dia. As maiores diferenças encontradas entre as plantas *ndt1:ndt1* e WT ocorreram em relação aos compostos associados ao metabolismo do carbono. Plantas com baixa expressão do transportador NDT1 apresentaram maior acúmulo de amido ao final do período de luz, com um aumento na taxa de síntese e degradação do amido (Figura 3A, B, D). Verificou-se também um aumento nos níveis de glicose e sacarose no meio e no final do período de luz (Figura 3C, F) e nenhuma alteração na concentração de frutose (Figura 3E).

Em relação ao conteúdo de malato e fumarato, dois ácidos orgânicos envolvidos em vários processos (Zell et al., 2010; Araújo et al., 2011), observou-se um aumento nos níveis ao longo do dia em plantas *ndt1:ndt1*, *as-1-ndt1*, *as-2-ndt1* (Figura 3G, H). Já em relação ao conteúdo de clorofilas, nenhuma alteração foi verificada nos mutantes (Figura suplementar 2). Em relação aos compostos envolvidos no metabolismo do nitrogênio nenhuma alteração foi observada em plantas com baixa expressão de *NDT1*, exceto por um aumento no teor de proteína verificado no mutante *ndt1:ndt1* ao final do período de luz (Figura suplementar 3).

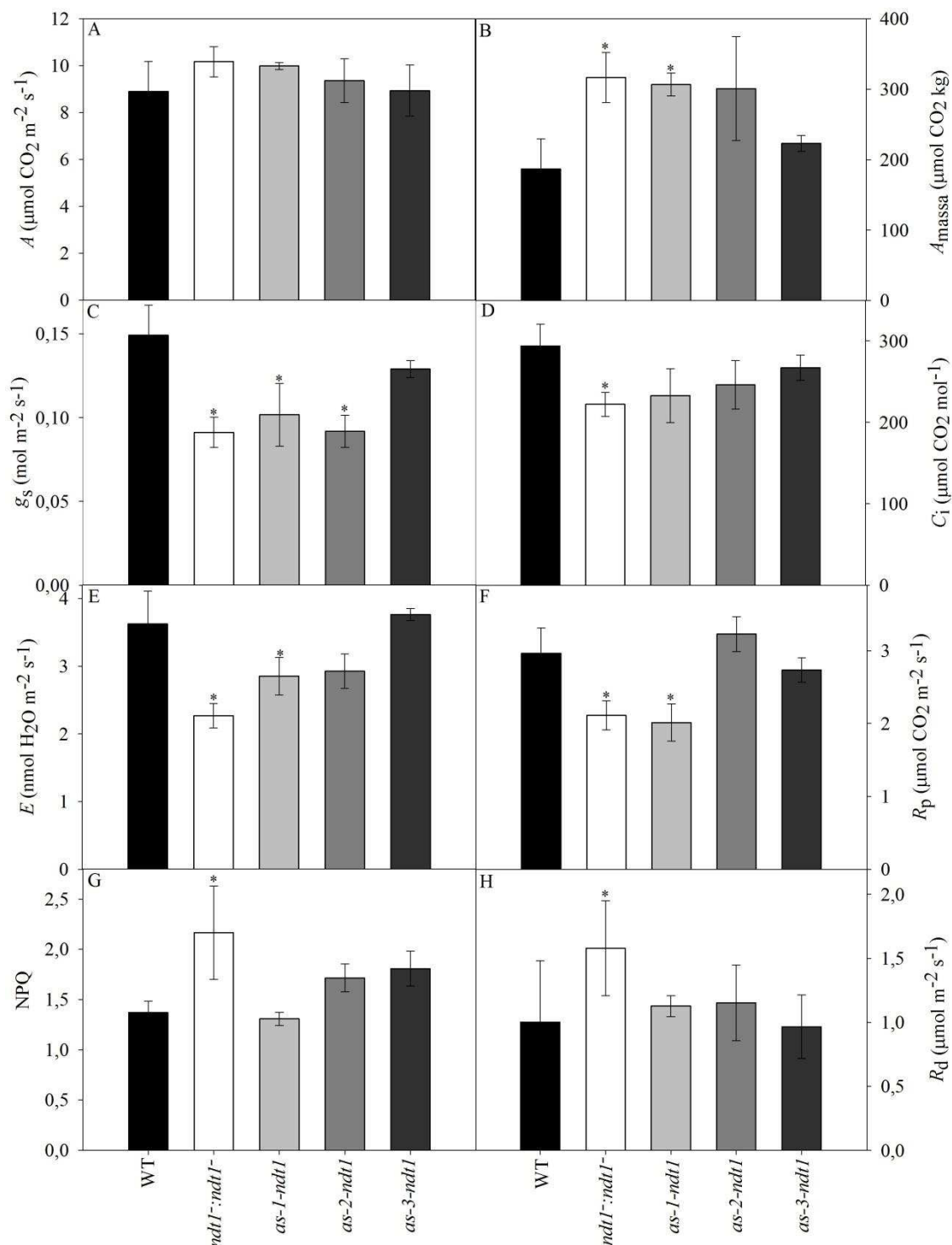


Figura 2. Efeito do decréscimo na expressão de *NDT1* nos parâmetros de trocas gasosas e fluorescência em folhas de plantas de *Arabidopsis* com quatro semanas de idade. A, taxa de assimilação líquida de CO_2 (A) em unidade de área, com radiação fotossinteticamente ativa (RFA) de $400 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. B, taxa de assimilação líquida de CO_2 (A_{massa}) em unidade de massa fresca. C, condutância estomática (g_s). D, concentração interna de CO_2 (C_i). E, transpiração (E). F, fotorrespiração (R_p). G, *quenching* não fotoquímico (NPQ). H, respiração no escuro (R_d). Valores representam a média \pm erro padrão de seis plantas individuais e os asteriscos indicam diferença significativa ($P < 0,05$), segundo o teste t de Student, em comparação com o tipo selvagem.

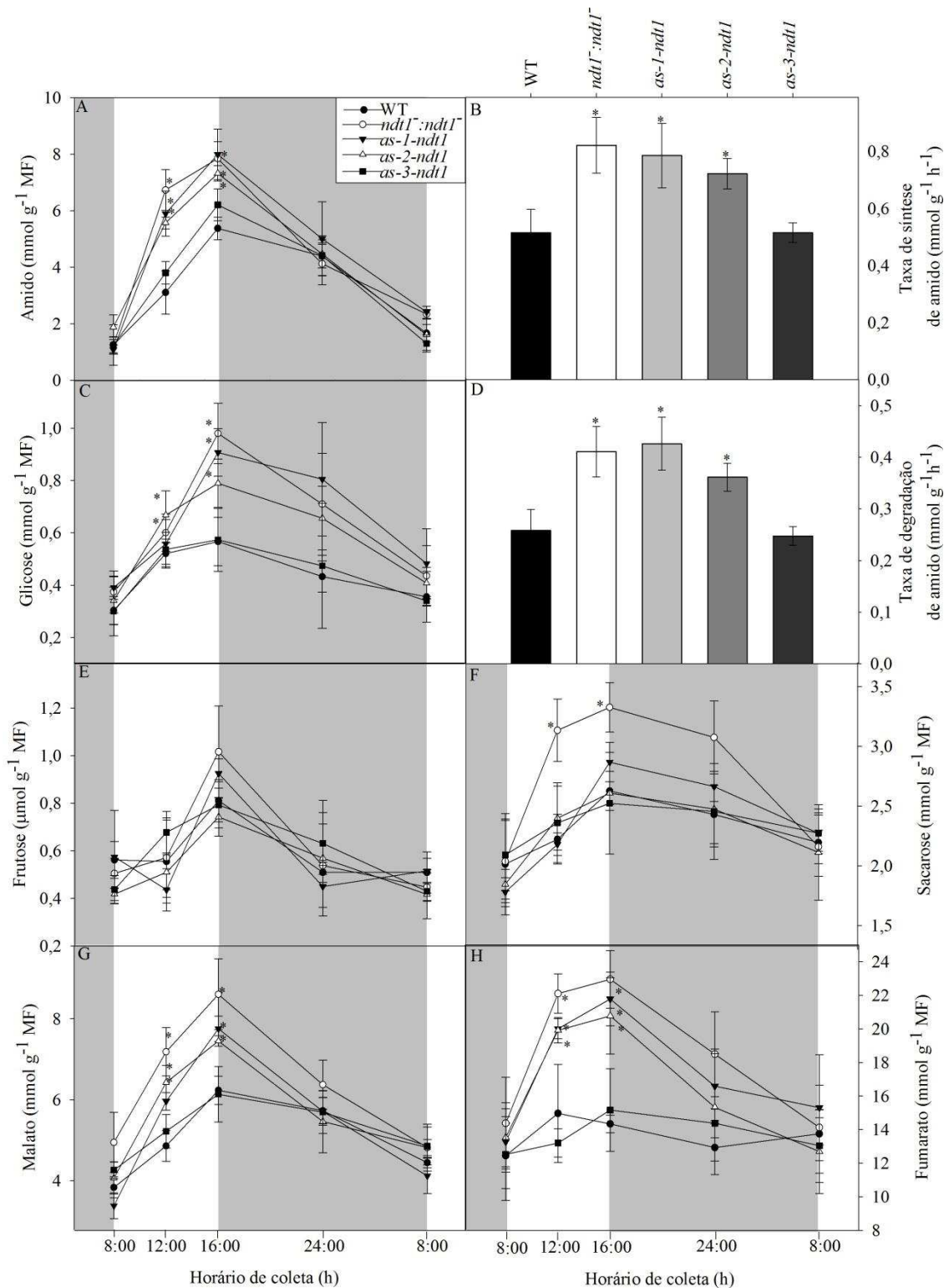


Figura 3. Variação em alguns metabólitos em folhas de *Arabidopsis* com reduzida expressão de *NDT1*. A, amido. B, taxa de síntese do amido. C, glicose D, taxa de degradação do amido. E, frutose. F, sacarose. G, malato. H, fumarato. Valores representam a média \pm erro padrão de seis plantas individuais e os asteriscos indicam diferença significativa ($P < 0,05$), segundo o teste *t* de Student, em comparação com o tipo selvagem. Áreas cinza nos gráficos representam o período de escuro. MF: massa fresca.

Para uma melhor caracterização das alterações metabólicas ocorridas durante o dia, uma análise de perfil metabólico foi realizada em amostras coletadas no meio do período de luz (Figura 4). Entre as classes de metabólitos avaliados a que mais diferiu entre linhagens com baixa expressão de *NDT1* e WT foi a de açúcares e compostos associados. Observou-se um aumento em plantas *ndt1:-ndt1-* para eritritol, frutose, galactinol, glicopiranose, glicose e sorbose. Além disso, para a mesma linhagem, outros metabólitos de outras classes também aumentaram, como glutamato, leucina, ascorbato e mio-inositol. Já a linhagem *as-1-ndt1* apresentou aumento nos níveis de ascorbato, glicose e glutamato enquanto decréscimo no nível de mio-inositol. A linhagem *as-2-ndt1*, por sua vez, exibiu aumento nos níveis de frutose, galactinol, glicose, psicose, rafinose, α - α -trealose, ácido indol-3-acetonitrila e mio-inositol e redução nos níveis de alanina e glutamina. Os demais metabólitos não variaram em relação ao WT.

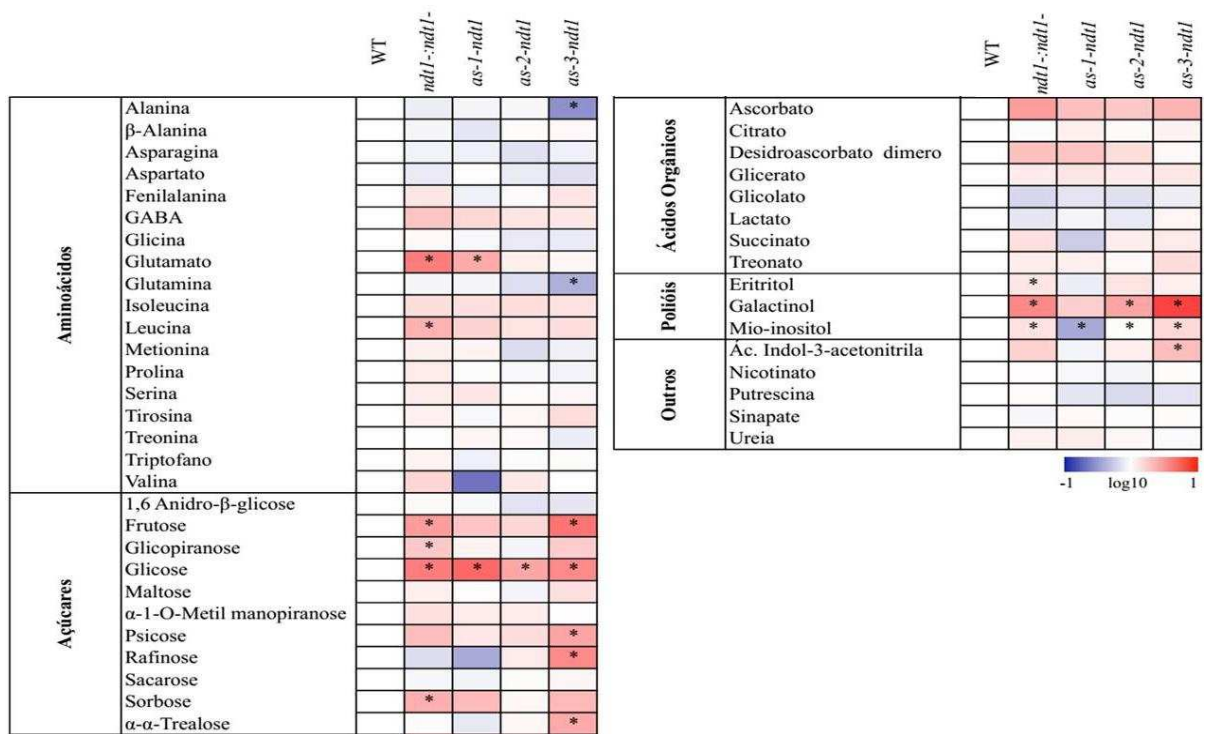


Figura 4. Heat map representando as alterações na quantidade relativa de metabólitos de folhas em plantas de *Arabidopsis* com baixa expressão do gene *NDT1* ao meio do dia. Os metabólitos foram determinados como descrito em “Material e Métodos” e os dados normalizados com base nas médias do tipo selvagem. Os valores representam a média de seis replicatas biológicas e os asteriscos indicam diferença significativa ($P < 0,05$), segundo o teste *t* de Student, em comparação com o tipo selvagem. Abreviação: Ácido amino butírico: GABA.

Em relação à concentração de nucleotídeos de piridina, houve uma diminuição na concentração de NAD^+ em plantas *ndt1:ndt1*, *as-1-ndt1*, *as-2-ndt1*. Já a concentração de NADH , NADP^+ e NADPH e a relação NADH/NAD^+ aumentou em comparação ao WT. Por outro lado, a relação $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ não apresentou diferença estatística (Figura 5).

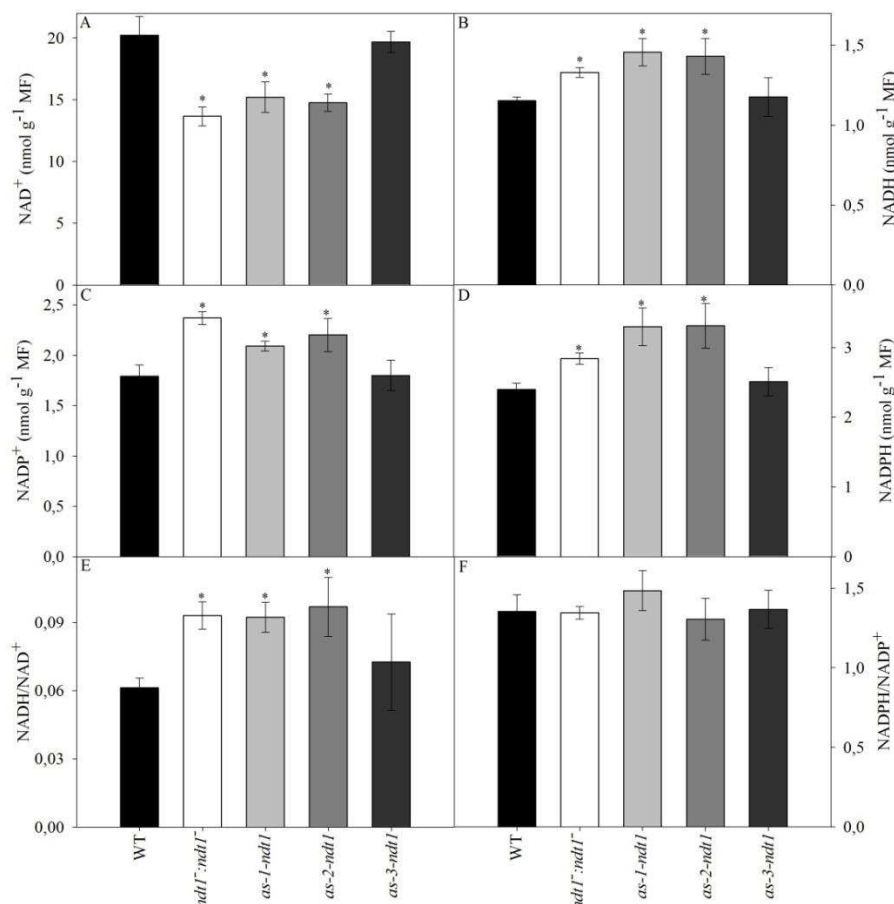


Figura 5. Nucleotídeos de piridina e suas razões em folhas de *Arabidopsis* com reduzida expressão de *NDT1*, coletadas no meio do período de luz. A, NAD^+ . B, NADH . C, NADP^+ . D, NADPH . E, NADH/NAD^+ . F, $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$. Valores representam a média \pm erro padrão de seis plantas individuais e os asteriscos indicam diferença significativa ($P < 0,05$), segundo o teste *t* de Student, em comparação com o tipo selvagem. MF: massa fresca.

3.3 Análises em tecidos heterotróficos

Dada a importância do metabolismo do NAD para o desenvolvimento dos grãos de pólen (Hashida et al., 2007) avaliou-se o efeito da redução na expressão de *NDT1* sobre a germinação dos grãos de pólen. Plantas com menor expressão de *NDT1* apresentaram menor viabilidade do grão de pólen, chegando a apenas 50% nas plantas *ndt1:ndt1*, 64% em plantas

as-1-ndt1 e 89% em plantas *as-2-ndt1* (Figura 6A, Figura suplementar 4). Além disso, verificou-se que as siliques produzidas por estas plantas foram menores que as produzidas pelas plantas WT (Figura 6B, Figura 7 e Figura suplementar 5). Observou-se também que o número de sementes produzidas por síliqua foi menor para as plantas transgênicas (Figura 6C, Figura 7 e Figura suplementar 5). Apesar disso, as sementes produzidas foram maiores nas plantas *ndt1:ndt1*, *as-1-ndt1* e *as-2-ndt1*, em comparação com o WT (Figura 6D, Figura 7 e Figura suplementar 4). O peso de mil sementes nestas plantas também foi superior (Figura 6E), embora o peso total de todas as sementes produzidas pela planta não tenha diferido entre as linhagens (Figura suplementar 5). Já os teores dos nucleotídeos diminuíram em plantas *ndt1:ndt1* em comparação com o WT (Figura 6F).

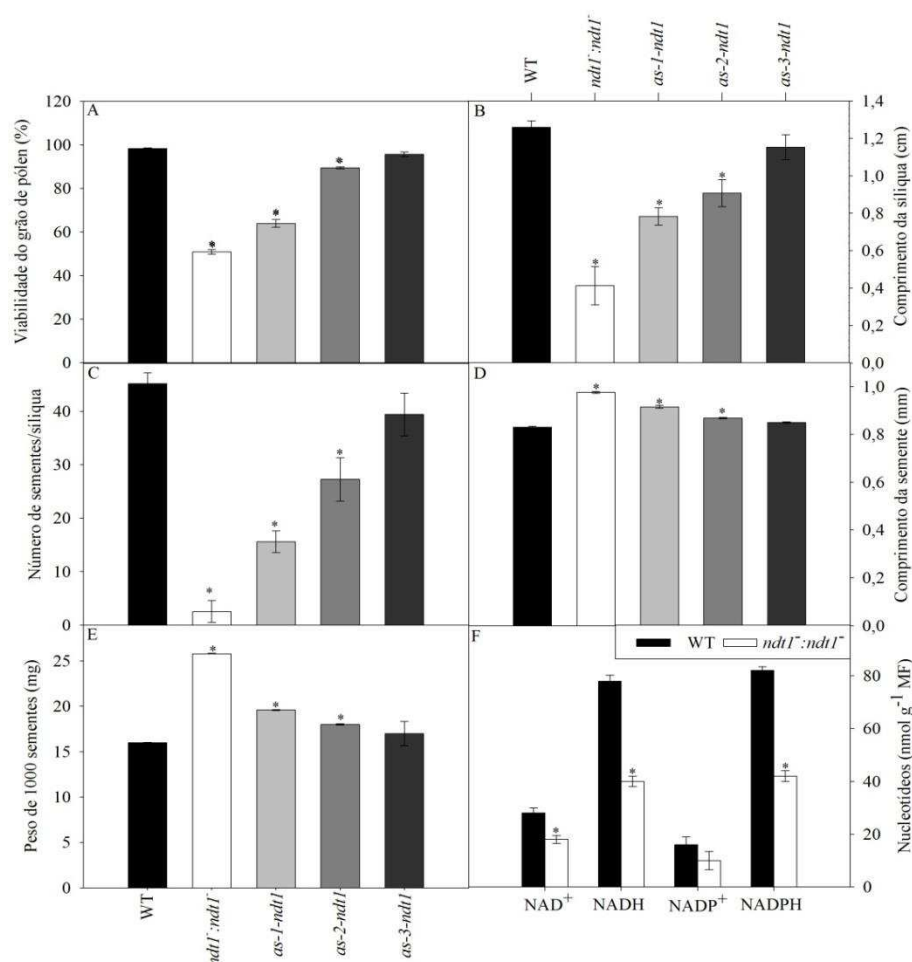


Figura 6. Análise fenotípica de plantas com reduzida expressão de *NDT1*. A, viabilidade do grão de pólen. B, comprimento da síliqua. C, número de sementes por síliqua. D, comprimento da semente. E, peso de 1000 sementes. F, nucleotídeos em síliques maduras. Valores representam a média \pm erro padrão de seis plantas individuais e os asteriscos indicam diferença significativa ($P < 0,05$), segundo o teste *t* de Student, em comparação com o tipo selvagem.

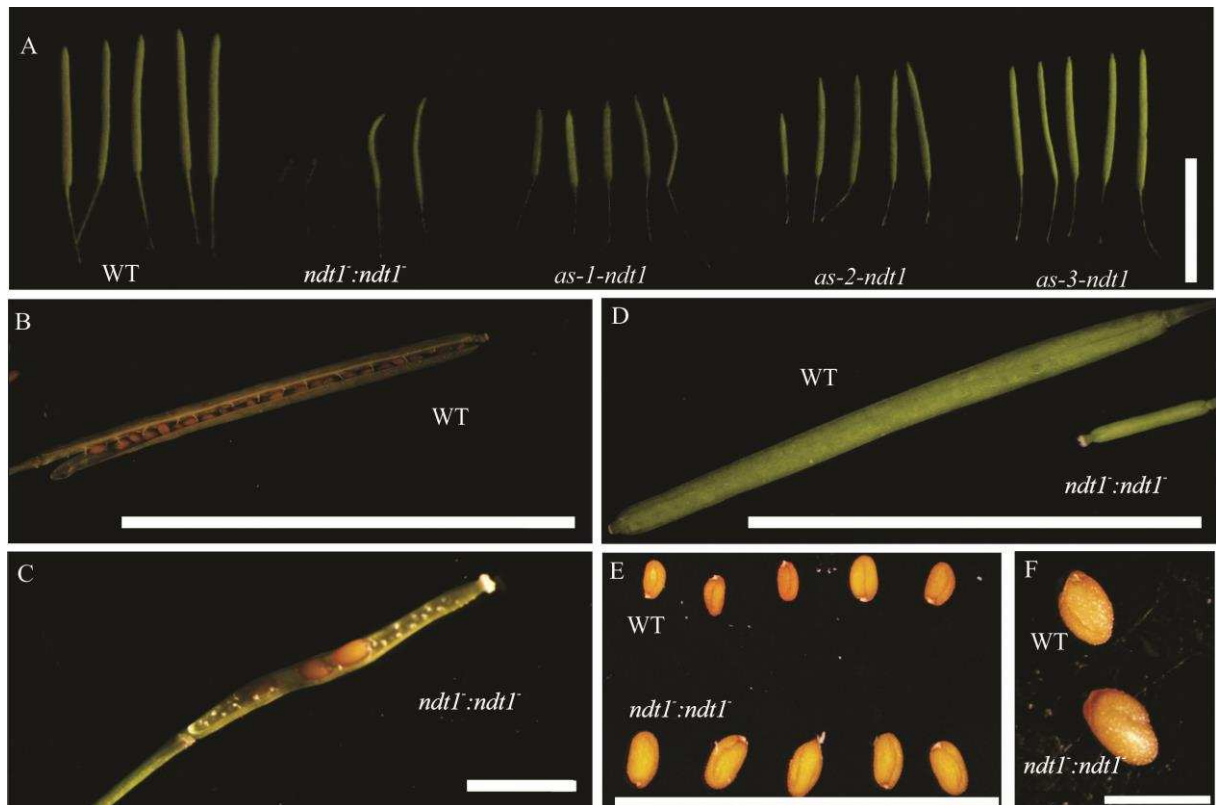


Figura 7. Análise fenotípica de plantas com reduzida expressão de *NDT1*. A, síliquis de todas as linhagens. B, síliquis de WT mostrando que são formadas muitas sementes. C, síliquis de *ndt1:ndt1* evidenciando que várias são abortadas. D, detalhe de síliquis WT e *ndt1:ndt1* enfocando a diferença entre os tamanhos. E, diferença entre o tamanho de sementes de WT e *ndt1:ndt1*. F, detalhe evidenciando as sementes de WT e *ndt1:ndt1*. Barras = 1 cm.

Para verificar se a redução no número de sementes foi ocasionada exclusivamente pela menor viabilidade de grãos de pólen foram realizados cruzamentos entre os genótipos para verificar o restabelecimento do fenótipo do WT. Quando os grãos de pólen oriundos de plantas *ndt1:ndt1* foram utilizados para fecundar as plantas WT o comprimento das síliquis geradas foi menor. Por outro lado, quando plantas WT foram utilizadas como doador masculino e *ndt1:ndt1* como feminino, o tamanho das síliquis geradas foi normal (Figura 8).

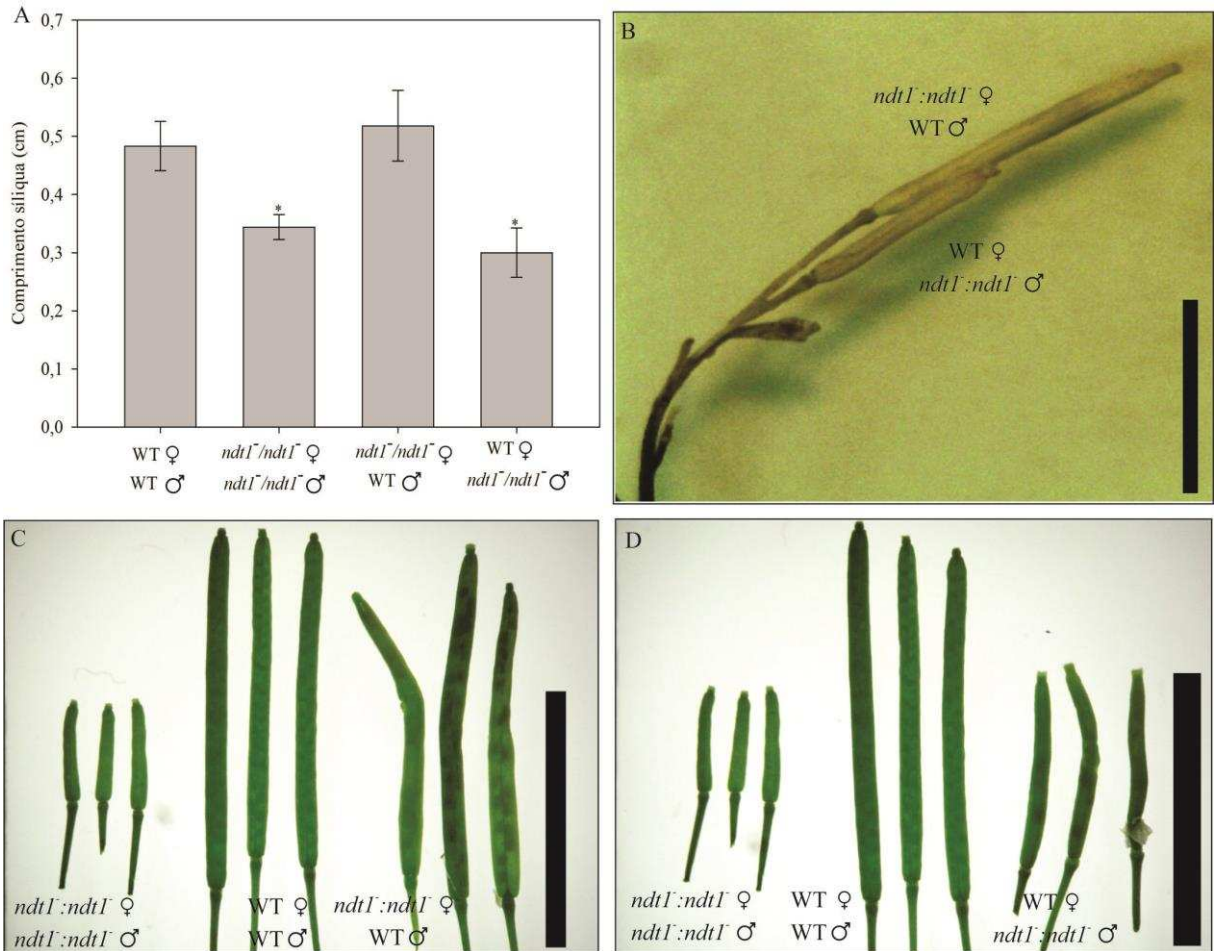


Figura 8. Análise de restauração de fenótipo por meio de cruzamentos. A, comprimento das síliques em diferentes cruzamentos. B, cruzamento com doador feminino de planta *ndt1:ndt1* e grão de pólen de planta WT e com doador feminino de planta *ndt1:ndt1* e grão de pólen de planta *ndt1:ndt1*. C, cruzamento com doador feminino de planta WT e grão de pólen de planta *ndt1:ndt1*. D, cruzamento com doador feminino de planta WT e grão de pólen de planta também WT. Foram realizados oito cruzamentos de cada combinação e os asteriscos indicam diferença significativa ($P < 0,05$), segundo o teste *t* de Student do comprimento da síliques em comparação com o cruzamento com doador feminino de planta WT e grão de pólen de planta também WT. Barras = 1 cm.

A germinação de sementes e a formação de plântulas *ndt1:ndt1* foi um pouco inferior que as WT (Figura 9A, B). De forma semelhante, o IVG e o IVE também apresentaram uma pequena redução (Tabela 3).

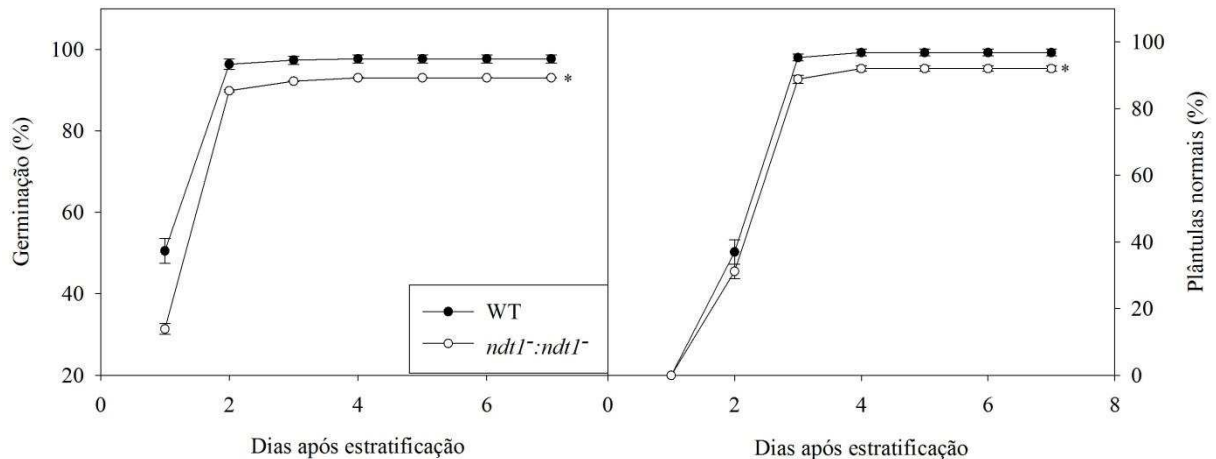


Figura 9: Germinação e formação de plântulas com baixa expressão de *NDT1*. A, percentual de germinação em meio com sacarose. B, percentual de plântulas normais desenvolvidas. Valores representam a média \pm erro padrão de seis placas com 50 sementes cada por genótipo e os asteriscos indicam diferença significativa ($P < 0,05$), segundo o teste *t* de Student, em comparação com o tipo selvagem.

Tabela 2: Índice de velocidade de germinação (IVG) e índice de velocidade de emergência (IVE) de plantas com reduzida expressão de *NDT1*

Genótipo	IVG	IVE
WT	50,1 \pm 1,5	17,2 \pm 0,4
<i>ndt1⁻:ndt1⁻</i>	39,0 \pm 1,5	15,5 \pm 0,3

Os valores representam a média cada \pm erro padrão de seis placas com 50 sementes cada por genótipo. Valores em negrito são significativos pelo teste *t* de Student's ($P < 0,05$) em comparação com o tipo selvagem.

Dada a importância do NADPH como fonte de poder redutor para a biossíntese de ácidos graxos nos cloroplastos foi analisado o conteúdo relativo de ácidos graxos em sementes maduras. Os resultados obtidos sugerem que em sementes o conteúdo relativo dos ácidos graxos avaliados e o conteúdo total de ácidos graxos não diferiram em comparação com o WT (Figura 10A). Adicionalmente, uma vez que o NADP possui papel importante durante a β -oxidação e o estabelecimento de plântulas, foi avaliado também o conteúdo de ácidos graxos também em plântulas com dois, quatro e seis dias após a estratificação. De forma geral, o conteúdo de ácidos graxos foi pouco alterado em plântulas com dois e quatro dias após a estratificação. Houve apenas um aumento no teor dos ácidos de 20:2; 24:0 e 24:1 carbonos aos dois dias após a estratificação e nos de 14:0 e 20:1a carbonos nas plântulas com quatro dias após a estratificação (Figura 10B, C). Por outro lado, em plântulas *ndt1⁻:ndt1⁻* com seis dias após a estratificação observou-se um aumento em um maior número de ácidos

graxos (14:0; 16:3; 18:2; 18:3; 20:2 e 20:1a carbonos, isto é, quase todos insaturados). Entretanto, o conteúdo total de ácidos graxos não foi alterado (Figura 10D).

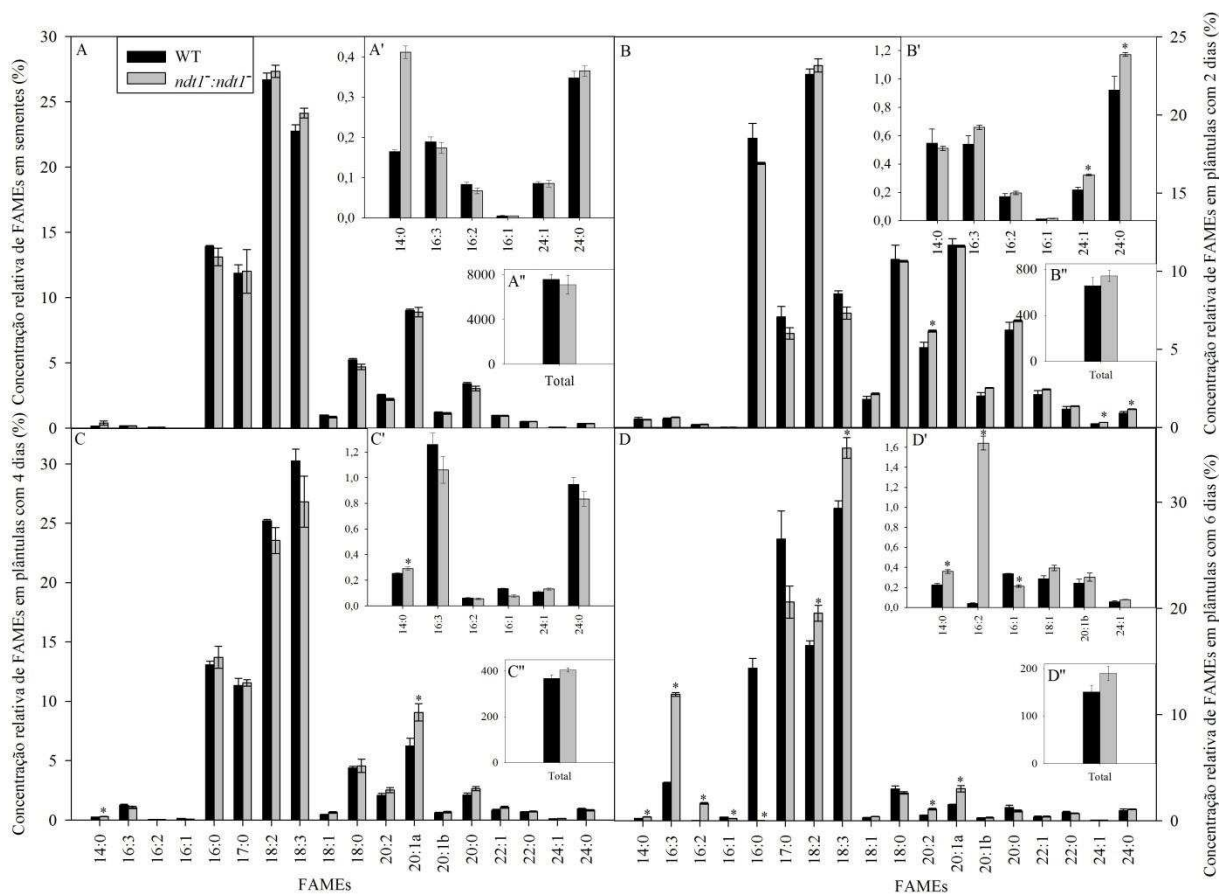


Figura 10. Concentração relativa de ácidos graxos analisados como metil-ésteres (FAMES) em sementes e plântulas com baixa expressão de *NDT1*. A, em sementes. B, em plântulas com dois dias de idade. C, em plântulas com quatro dias de idade. D, em plântulas com dois seis de idade. Em detalhe é possível ver alguns dos FAMES para melhor visualização. Valores representam a média \pm erro padrão de três amostras individuais e os asteriscos indicam diferença significativa ($P < 0,05$), segundo o teste *t* de Student, em comparação com o tipo selvagem.

4 DISCUSSÃO

4.1 Impactos da baixa expressão de *NDT1* sobre a fotossíntese

Neste trabalho, investigou-se a importância do transporte NAD^+ no metabolismo vegetal e como a redução na expressão do transportador cloroplastídico *NDT1* afeta a fisiologia da planta inteira. Verificou-se que a redução na expressão de *NDT1* em folhas, promoveu alterações na fotossíntese bem como no metabolismo do carbono e crescimento

vegetativo. A redução na expressão de *NDTI* não afetou a fotossíntese líquida quando expressa por unidade de área. Entretanto, quando determinada por unidade de massa, a fotossíntese aumentou nas plantas *ndt1: ndt1* e *as-1-ndt1*. Esse aumento se deve ao fato de que houve aumento significativo no número de folhas e nas áreas total e específica da roseta e das folhas destacadas (Tabela 1). De fato, a área foliar específica exerce grande influência na capacidade fotossintética (Gonzalez et al., 2010; Nouvellon et al., 2010). Além disso, a área foliar específica está relacionada com a adaptação das plantas a diferentes condições ambientais, visto que a plasticidade foliar é, muitas vezes, a forma pela qual as plantas aumentam a eficiência na captura de energia luminosa e utilização de recursos, como luz, água e nitrogênio (Nouvellon et al., 2010). Assim, embora se tenha avaliado o conteúdo dos nucleotídeos na folha inteira, acredita-se que a deficiência do transportador NDT1 possivelmente leve a uma diminuição na concentração de NAD^+ especificamente no estroma do cloroplasto, e que esta redução estimule o aumento no número de folhas e área foliar, aumentando assim a fotossíntese. De fato, evidências indicam que a proliferação celular e a atividade do meristema apical radicular e da parte aérea são influenciadas pelo *status* redox celular (Sagi et al., 2004; Bashandy et al., 2010). Além disso, plantas mutantes deficientes em NADPH oxidases possuem alterações na resposta a auxinas e estrigolactonas, hormônios conhecidamente relacionados à atividade meristemática (Sagi et al., 2004).

A capacidade fotossintética pode ser limitada por processos de ordem difusiva ou bioquímica. A primeira refere-se à fixação de CO_2 , pela Rubisco e a segunda, às resistências estomáticas e mesofílicas que o CO_2 encontra à sua difusão, desde a atmosfera até os sítios de carboxilação, nos cloroplastos (Flexas et al., 2008). O inverso da resistência estomática é a g_s e alterações na g_s ocorrem em paralelo com alterações na densidade estomática (Tanaka et al., 2013). Análises *in silico* demonstram que o gene *NDTI* apresenta alta expressão em células-guarda, fato corroborado pela baixa densidade estomática de plantas *ndt1: ndt1* (Figuras suplementares 1 e 6). A importância do NAD durante o movimento estomático já foi demonstrada (Murata et al., 2001; Yang et al., 2008; Hashida et al., 2010) uma vez que diminuições nas concentrações de NAD favorecem o aumento de NADP e a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) induzida pelo ácido abscísico (ABA; Hashida et al., 2010). Além disso, o ABA somente ativa células guarda quando NADPH está presente no citosol (Murata et al., 2001). Embora o mecanismo que correlacione a associação do NAD ao movimento estomático ainda não tenha sido elucidado, os dados encontrados aqui sugerem que o NAD seja importante não apenas no movimento estomático, mas também,

diferentemente do que encontrado por Hashida et al. (2010), o transporte de NAD aturaria também na biogênese de células guarda.

Embora o decréscimo na densidade estomática tenha sido acompanhado de uma diminuição da g_s , o aumento na fotossíntese demonstra que as plantas com baixa expressão de *NDT1* conseguiram compensar a deficiência na importação NAD^+ para o estroma e manter a síntese de $NADP^+$ necessário na etapa fotoquímica da fotossíntese e, da forma reduzida ($NADPH$), para as reações envolvidas na reação do carbono fixado. Embora pouco se conheça a respeito dos mecanismos que controlam o tamanho foliar, especialmente porque este é regulado por múltiplos fatores (Gonzalez et al., 2009), acredita-se diante dos resultados encontrados, que o transporte de NAD possa participar na coordenação de sinais metabólicos responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento vegetal. Mutantes *nadk2*, deficientes na NAD cinases *NADK2*, que sintetiza $NADP$ a partir de NAD , apresentam crescimento retardado, associando a importância do $NADP$ ao crescimento vegetal (Chai et al, 2005; Takahashi et al., 2006). Neste trabalho, as concentrações de $NADP$ aumentaram nas plantas com reduzida expressão de *NDT1*, sugerindo a hipótese de que um dos fatores responsáveis pelo maior crescimento das plantas seja o $NADP$.

Além da diminuição da concentração celular de NAD^+ , a baixa expressão de *NDT1* promoveu aumento nos níveis de $NADH$, $NADPH$ e da relação $NADH/NAD^+$ (Figura 5). A manutenção do estado redox celular é imprescindível ao bom funcionamento celular (Jambunathan et al., 2010) e algumas formas de restaurar alterações nesta relação são aumentar as taxas de dissipação de elétrons ou de fosforilação. Estas vias alternativas ajudam a regular a relação $NADPH/ATP$, reduzir a eficiência quântica da fotossíntese e contribuem para a perda de energia (Wilhelm e Selmar, 2011). Outra possibilidade para o ajuste da relação $NADPH/ATP$ é a preponderância do transporte cíclico de elétrons em detrimento do transporte linear de elétrons (Munekage et al., 2002; Munekage et al., 2004; Nakamura et al., 2013). O transporte cíclico de elétrons pode competir com o transporte linear (Shikanai, 2014) e pode gerar gradiente de prótons através da membrana dos tilacóides e síntese de ATP pela ATP sintase sem acumular $NADPH$ uma vez que os elétrons são reciclados da ferredoxina para a plastoquinona (Allen, 2003), mantendo assim os níveis de $NADP^+$. Dessa forma, alternando as vias de transporte linear e cíclico de elétrons, há uma flexibilidade na relação $NADPH/ATP$ para satisfazer as necessidades do metabolismo (Foyer, 2012). Assim, o

aumento na concentração de NADPH ocorrido em plantas com reduzida expressão de *NDT1* poderia alterar a relação NADPH/ATP, favorecendo o transporte cíclico de elétrons.

A atividade da ATP sintase pode variar devido a trocas na disponibilidade de substratos, como por exemplo, ADP e fosfato inorgânico (Pi) (Yamori et al. 2011). Uma vez que NDT1 realiza o transporte de NAD^+ para o estroma em troca principalmente de ADP e AMP, plantas com baixa expressão deste transportador poderiam acumular estes nucleotídeos no estroma. Cabe ressaltar que o transportador NDT1 transporta NAD^+ em troca preferencialmente de AMP e ADP em taxas relativamente iguais em condições *in vitro* e não nicotinamida ou ácido nicotínico ou NADP^+ e NADPH (Palmieri et al., 2009). Dado que o NADH possui baixa eficiência de troca e ao fato de que o conteúdo celular de NAD^+ excede algumas vezes o de NADH, o transporte de NADH por estes transportadores só ocorreria muito raramente, excluindo a importância do transporte de NADH sob condições fisiológicas normais (Palmieri et al., 2009). Além disso, AMP e ADP estão disponíveis no estroma como substrato de troca porque a síntese *de novo* destes adenilatos ocorre neste compartimento (Zrenner et al., 2006), fazendo com que o efluxo de AMP e, ou ADP via NDT1 permita a entrada de NAD^+ no estroma (Palmieri et al., 2009). Assim, diminuindo-se a expressão de *NDT1*, a entrada de NAD^+ no cloroplasto ficaria prejudicada da mesma forma que a saída de ADP e AMP. O aumento de ADP e AMP por sua vez, favoreceria a síntese de ATP pela ATP sintase.

Esta hipótese é reforçada pelo aumento na concentração de açúcares em geral, especialmente sacarose e amido, e devido ao aumento no número de folhas e nas áreas foliar total e específica de plantas com reduzida expressão de *NDT1*. Estes seriam indicativos de aumento na taxa de fosforilação. Esta conjectura é corroborada pelo fato de que: (i) a fotorrespiração, considerada como uma via alternativa de dissipação de poder redutor diminuiu nas plantas *ndt1-1: ndt1-1* e *as-1-ndt1*; (ii) pela diminuição na g_s e C_i , que contribuem para aumento no transporte cíclico de elétrons (Golding et al. 2004); e (iii) pelo aumento no NPQ nas plantas *ndt1* (Figura 2). O NPQ é essencial para prevenir os danos foto-oxidativos na membrana do tilacóide (Wilhelm e Selmar, 2011). NPQ é aumentado pelo transporte cíclico de elétrons, uma vez que a dissipação térmica é induzida por acidificação do lúmen do tilacóide, gerando ΔpH (Munekage et al., 2002).

4.2 Impactos da baixa expressão de *NDT1* no metabolismo do carbono

O amido tem sido identificado como um metabolito integrador do crescimento com a fotossíntese (Sulpice et al. 2009). Ao ser degradado em maiores taxas no período de escuro como observado neste estudo, o amido suporta maiores taxas respiratórias no escuro (Figura 2) e a maior área foliar observada nas plantas mutantes. A síntese e degradação de amido ocorrem no cloroplasto e o fluxo em cada direção depende do fornecimento de trioses fosfatadas e a regulação de enzimas chave envolvidas na biossíntese (Foyer et al., 2012). Em folhas, a regulação da AGPase tem sido estudada em detalhes (Michalska, et al., 2009; Gibson et al. 2011, Glaring et al., 2012). Esta enzima está sujeita a regulação transcricional, com sua expressão aumentada por açúcares (Kolbe et al. 2005) e diminuída por nitrato e fosfato (Nielsen et al., 1998). De forma geral, houve um aumento na concentração de açúcares em plantas deficientes no transportador *NDT1* (Figura 4), especialmente sacarose e glicose (Figura 3F, C), que provavelmente contribuiu para o aumento das taxas de amido nas plantas mutantes. Além disso, AGPase é sensível a regulação alostérica, sendo ativada por 3-fosfoglicerato (3-PGA) e inibida por Pi, e também pode ser regulada por modificações proteicas pós-traducionais (Stitt et al., 1987; Fu et al., 1998; Tiessen et al., 2002). Alterações pós-traducionais no estroma do cloroplasto alteram o estado redox da enzima, ativando ou inativando-a (Tiessen et al., 2002). Como exemplo, estudos recentes demonstram que tioredoxina redutase C dependente de NADP (NTRC), enzima plastidial que contem tanto uma redutase de tioredoxina dependente de NADP quanto um domínio de tioredoxina, medeia a ativação da AGPase por ação de NADPH (Michalska et al., 2009). Esta afirmação corrobora o possível aumento da atividade da AGPase em plantas com baixa expressão do transportador *NDT1* que provavelmente possuem aumento nos teores de NADPH no interior do cloroplasto (Figura 5).

Em condições onde o suprimento de carbono excede o utilizado para o crescimento, o amido não é completamente degradado durante a noite resultando em um progressivo aumento no conteúdo de amido dia após dia (Hädrich et al., 2012; Scialdone et al., 2013; Pilkington et al., 2015). Isso se deveria, pelo menos parcialmente, a inibição por retroalimentação da degradação do amido pela trealose-6-fosfato (Tre-6-P; Martins et al., 2013). Nestas condições, a Tre-6-P atua rapidamente como sinalizador para permitir o ajuste do *turnover* do amido às flutuações ambientais (Pilkington et al., 2015). Uma vez que plantas com reduzida expressão de *NDT1* apresentaram maiores taxas de síntese e degradação de

amido (Figura 3), acredita-se que o aumento na concentração de amido nestas plantas se deva a uma maior atividade da AGPase. As alterações no estado redox celular causadas pela baixa expressão de *NDT1* são evidenciadas pelo aumento em NADH/NAD, e o provável aumento na síntese de ATP suporta esta ideia.

Em *Arabidopsis*, os níveis de malato e fumarato apresentam variações diurnas similares às alterações nos níveis de amido e sacarose (Figura 3). Este acréscimo durante o dia e decréscimo durante a noite sugere a função desses metabólitos como moléculas de armazenamento transiente de carbono (Chia et al., 2000; Fahnenstich et al., 2007; Gibon et al., 2009). De fato, estudos recentes demonstram o papel do fumarato como uma fonte alternativa de carbono semelhante ao amido, além de ter papel importante na manutenção do pH celular (Fahnenstich et al., 2008). Assim, os teores aumentados destes metabólitos em plantas com baixa expressão de *NDT1* parecem ter contribuído para o aumento na área foliar e número de folhas e consequentemente a maior fotossíntese por unidade de massa, mesmo com o menor aporte de NAD^+ . Dessa forma, o aumento da fotossíntese contribuiu para uma maior síntese de sacarose e amido das plantas deficientes no transportador *NDT1*.

Além disso, a inibição antisense da subunidade ferro-enxofre da succinato desidrogenase (SDH) e fumarase em tomate, resultou em aumento e redução da fotossíntese e biomassa, respectivamente, por um efeito mediado por ácidos orgânicos na abertura e fechamento estomática (Nunes-Nesi et al., 2007; Araújo et al., 2011). A medição dos níveis apoplásticos de ácidos orgânicos nestes transformantes e também em mutantes para a fumarase, revelou uma correlação negativa entre os níveis de fumarato e g_s . Semelhantemente, embora menor, a mesma correlação negativa foi encontrada para as concentrações de malato (Araújo et al., 2011). Resultados semelhantes foram observados em *Arabidopsis thaliana* (Fuentes et al., 2011). Estes resultados estão de acordo com os encontrados neste trabalho, uma vez que se observaram maiores aumentos nas concentrações de fumarato do que de malato nas plantas com reduzida expressão de *NDT1* e uma forte diminuição na g_s .

4.3 Fenótipos observados em tecidos heterotróficos

Estudos recentes utilizando mutantes deficientes em enzimas da biossíntese do NAD demonstram uma importância funcional do NAD durante o desenvolvimento de tecidos reprodutivos, como grãos de pólen, meristema floral, siliquas e sementes (Hashida et al., 2007; Hunt et al., 2007; Liu et al., 2009; Hashida et al., 2013). Semelhantemente, no presente trabalho verificou-se que a baixa expressão de *NDTI* promove um aumento no número de pólenes inférteis (Figura 6 e Figura suplementar 4). De fato, o metabolismo NAD possui papel essencial na formação de grãos de pólen (Chai et al., 2005; Berrin et al., 2005; Chai et al., 2006; Hashida et al., 2009). Durante o desenvolvimento do grão de pólen ocorre um expressivo aumento na biossíntese de NAD. Observa-se também que na célula-mãe do grão de pólen o NAD é transportado para os quatro micrósporos gerados, especialmente porque várias vias metabólicas que operam durante a maturação do grão de pólen e crescimento do tubo polínico, como por exemplo, síntese de lipídeos, componentes das paredes celulares e aminoácidos, são altamente dependentes do NAD (Hashida et al., 2009). Além disso, a ocorrência de altas concentrações de NAD^+ pode atuar mantendo o grão de pólen dormente por inibir competitivamente reações redox dependentes de NADH, essenciais para formação do tubo polínico (Hashida et al., 2013). Estudos de proteômica mostram que o metabolismo energético de enzimas NADH dependentes foi identificado em grão de pólen de *Arabidopsis* (Holmes-Davis et al., 2005). A oxidação do NAD(P)H é diretamente acoplada à síntese de ATP o qual é essencial para a regulação de várias enzimas como a nucleotídeo difosfato cinase (NDP), enzima importante na dinâmica de crescimento do tubo polínico (Palmieri et al., 1973; Gu et al., 2005). Dessa forma, dada a grande importância do NAD^+ no desenvolvimento do grão de pólen e crescimento do tubo polínico, é de se esperar que uma diminuição no transporte de NAD^+ ocasione a formação de pólenes inviáveis como as encontradas neste trabalho.

Em decorrência da menor viabilidade dos grãos de pólen observada em plantas com baixa expressão do *NDTI*, ocorreu uma diminuição considerável no número de sementes e consequentemente um menor preenchimento das siliquas reduzindo o comprimento e o diâmetro das mesmas (Figura 6, Figura 7 e Figura suplementar 5). Atribui-se a produção de siliquas encurtadas a problemas funcionais do gametófito masculino (Hashida et al., 2013). Recentemente, verificou-se que plantas mutantes deficientes da expressão de NMNAT, uma importante enzima da biossíntese de NAD, apresentaram além de grãos de pólen inviáveis,

síliquas encurtadas e menor número de sementes por síliqua (Hashida et al., 2013). Nesse estudo, os autores não discutem as razões que levam ao encurtamento das síliquas, embora mostrem como uma consequência da má formação do grão de pólen e da germinação precoce do tubo polínico, em decorrência da menor concentração de NAD^+ encontrada nos mutantes. Estes dados corroboram os encontrados aqui, já que de fato síliquas de plantas *ndt1⁻: ndt1⁻* possuem menor concentração de NAD^+ (Figura 6F).

Uma vez que o tamanho das síliquas nas plantas com baixa expressão de *NDT1* foi menor em comparação com o WT é razoável supor que a quantidade de sementes produzidas nestas síliquas também seja inferior. Entretanto, chama a atenção a grande quantidade de sementes abortadas encontradas em plantas *ndt1⁻: ndt1⁻*, indicando que o NAD^+ também é importante durante o desenvolvimento embrionário (Figura 7). Uma vez que a concentração dos nucleotídeos diminuiu nas síliquas maduras, provavelmente a alocação dos recursos repassada via células espermáticas para o zigoto e endosperma ficou prejudicada. Isso fez com que menos sementes fossem geradas, mas que as sementes produzidas recebessem uma quantidade maior de carboidratos, justificando o maior tamanho encontrado nas sementes *ndt1⁻: ndt1⁻*, *as-1-ndt1* e *as-2-ndt1* (Figura 6 e Figura suplementar 4).

As sementes são formadas a partir tanto de tecidos maternos quanto paternos, de forma bastante coordenada e o tamanho das sementes tem influencia parental, onde uma preponderância de genoma proveniente do pai provoca redução no crescimento da semente enquanto um predomínio de genoma maternal causa um supercrescimento (Scott et al., 1998). De acordo com os resultados encontrados na análise de restauração de fenótipo, quando grãos de pólen provenientes do tipo selvagem foram utilizados em flores de plantas *ndt1⁻: ndt1⁻*, o fenótipo de síliquas encurtadas foi restaurado e, de forma semelhante, quando o progenitor masculino são plantas *ndt1⁻: ndt1⁻* as síliquas continuam encurtadas (Figura 8). Assim, o doador masculino parece ser de extrema importância na formação de síliquas, isto é, a influencia neste processo é paterna.

Apesar de as sementes de plantas *ndt1⁻: ndt1⁻* serem maiores e mais pesadas do que as das plantas WT (Figura 6D, E), o conteúdo relativo e total de ácidos graxos não diferiu estatisticamente em comparação com o WT (Figura 10A). Entretanto, esta quantificação baseou-se na quantidade de ácidos graxos por mg de massa fresca e não na concentração de ácidos graxos por semente. Sementes de *Arabidopsis* possuem ácidos graxos como maior

fonte de reserva de carbono em (~35% por peso; Baud et al., 2002). Assim, embora não se tenha verificado alterações na concentração total de ácidos graxos por mg de matéria fresca, a hipótese de que haja alteração na concentração de ácidos graxos por semente não pode ser descartada. Por outro lado, outros compostos, como por exemplo, carboidratos e proteínas também fazem parte da composição das sementes (Baud et al., 2002) e portanto também podem ocorrer alterações na concentração destes compostos, o que justificaria o aumento no tamanho e peso das sementes com reduzida expressão de *NDT1*.

O conteúdo de ácidos graxos em plântulas *ndt1⁻: ndt1⁻* foi muito pouco alterado, especialmente aos dois e quatro dias após a estratificação (Figura 10B, C). Aos seis dias após a estratificação verifica-se o aumento relativo de alguns ácidos graxos, porém, a concentração total dos ácidos graxos quantificados não foi alterada (Figura 10D). Após a germinação, triacilgliceróis são hidrolisados e os ácidos graxos liberados são quebrados via β -oxidação para prover energia para o desenvolvimento de plântulas (Graham, 2008; Quettier e Eastmond, 2009). Durante a oxidação de ácidos graxos, o NAD^+ é reduzido a NADH pela proteína multifuncional peroxissomal (MFP). Para manter o fluxo através de diferentes rotas metabólicas, o NADH produzido necessita ser regenerado nos peroxissomos (Graham, 2008). A malato desidrogenase dependente de NAD peroxissomal (PMDH) reoxida o NADH a NAD^+ via redução reversível de oxaloacetato a malato (Pracharoenwattana et al., 2010), assim tanto a redução do NAD^+ à NADH quanto sua oxidação, são essenciais para a correta oxidação de ácidos graxos. Alterações na β -oxidação fazem com que as plantas sejam incapazes de mobilizar seus ácidos graxos armazenados, comprometendo processos como o estabelecimento de plântulas (Zolman et al., 2001). O aumento na concentração relativa de ácidos graxos é um indicativo que embora o mutante *ndt1⁻: ndt1⁻* seja capaz de mobilizar os ácidos graxos e formar plântulas viáveis, a quebra dos ácidos graxos pode ser considerada levemente tardia. De acordo com os resultados de percentagem de plântulas normais e IVE, de fato, há um pequeno atraso na formação das plântulas *ndt1⁻: ndt1⁻* (Figura 9B, Tabela 3). De forma semelhante, o conteúdo de ácidos graxos não variou em sementes de plantas deficientes no transportador peroxissomal de NAD^+ (PXN), embora as plântulas também apresentem este atraso na mobilização de ácidos graxos, com efeitos ainda mais pronunciados (Bernhardt et al., 2012). Além disso, mutantes deficientes para a malato desidrogenase peroxissomal dependente de NADH, que é responsável por re-oxidar o NADH e manter ativa a β -oxidação, também possuem atraso no estabelecimento de plântulas (Pracharoenwattana et al., 2007). Isto indica que o NAD^+ é importante no estabelecimento de plântulas uma vez que

o NAD^+ é necessário para a β -oxidação, acredita-se que a redução na expressão de *NDTI*, influencie de alguma forma a β -oxidação nos peroxissomos, talvez através de transferência de poder redutor.

5 CONCLUSÃO

Alterações redox causadas pela redução na expressão de *NDTI* causam alterações no desenvolvimento de tecidos autotróficos e heterotróficos. O número de folhas, a área foliar e o número de estômatos de plantas com reduzida expressão do gene que codifica para este transportador foi alterado, influenciando a atividade fotossintética e a biossíntese de açúcares e amido. Além disso, este transportador tem papel imprescindível no desenvolvimento de tecidos reprodutivos, e a redução na expressão de *NDTI* ocasiona grãos de pólen inviáveis e, em consequência, siliquis encurtadas e sementes maiores. Assim, acredita-se que este transportador tenha papel relevante na manutenção da homeostase redox e o equilíbrio no desenvolvimento de tecidos autotróficos e heterotróficos.

6 AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), ao Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento do trabalho e bolsa concedida ao primeiro autor. À David Barbosa Medeiros e Ana Carla Resende Fraiz pelo suporte nas avaliações de trocas gasosas realizadas neste trabalho.

7 REFERÊNCIAS

Allen JF (2003) Cyclic, pseudocyclic and noncyclic photophosphorylation: new links in the chain. *Trends Plant Sci* **8**: 15–19

Araujo WL, Nunes-Nesi A, Osorio S, Usadel B, Fuentes D, Nagy R, Balbo I, Lehmann M, Studart-Witkowski C, Tohge T, Martinoia E, Jordana X, DaMatta FM, Fernie AR (2011) Antisense inhibition of the iron–sulphur subunit of succinate dehydrogenase enhances photosynthesis and growth in tomato via an organic acid-mediated effect on stomatal aperture. *Plant Cell* **23**: 600-627

Babushok VI, Linstrom PJ, Reed JJ, Zenkevich IG, Brown RL, Mallard WG, Stein SE (2007) Development of a database of gas chromatographic retention properties of organic compounds. *Journal of Chromatogr A* **1157**: 414-421

Baud S, Boutin JP, Miquel M, Lepiniec L, Rochat C (2002) An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiol Biochem* **40**: 151-160

Bashandy T, Guillemint J, Vernoux T, Caparros-Ruiz D, Ljung K, Meyer Y, Reichheld J-P (2010) Interplay between the NADP-linked thioredoxin and glutathione systems in *Arabidopsis* auxin signaling. *Plant Cell* **22**: 376-391

Bechtold N, Ellis J, Pelletier G (1993) In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *Compt Rendus Acad Sci, Life Sci* **316**: 1194-1199

Berger D, Altmann T (2000) A subtilisin-like serine protease involved in the regulation of stomatal density and distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* **14**: 1119-1131

Bernhardt K, Wilkinson S, Weber APM, Linka N (2012) A peroxisomal carrier delivers NAD⁺ and contributes to optimal fatty acid degradation during storage oil mobilization. *Plant J* **69**: 1-13

Berrin J-G, Pierrugues O, Brutesco C, Alonso B, Montillet J-L, Roby D, Kazmaier M (2005) Stress induces the expression of *AtNADK-1*, a gene encoding a NAD(H) kinase in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Genet Genomics* **273**: 10-19

Browse J, McCourt PJ, Somerville CR (1986) Fatty acid composition of leaf lipids determined after combined digestion and fatty acid methyl ester formation from fresh tissue. *Anal Biochem* **152**: 141-145

Chai MF, Chen QJ, An R, Chen YM, Chen J, Wang XC (2005) NADK2, an *Arabidopsis* chloroplastic NAD kinase, plays a vital role in both chlorophyll synthesis and chloroplast protection. *Plant Mol Biol* **59**: 553-564

Chai MF, Wei PC, Chen QJ, An R, Chen J, Yang S, Wang XC (2006) NADK3, a novel cytoplasmic source of NADPH, is required under conditions of oxidative stress and modulates abscisic acid responses in *Arabidopsis*. *Plant J* **47**: 665-674

Chia DW, Yoder TJ, Reiter WD, Gibson SI (2000) Fumaric acid: an overlooked form of fixed carbon in *Arabidopsis* and other plant species. *Planta* **211**: 743-751

Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**: 735-743

DaMatta FM, Loos RA, Silva EA, Loureiro ME (2002) Limitations to photosynthesis in *Coffea canephora* as a result of nitrogen and water availability. *J Plant Physiol* **159**: 975-981

De Block M, Verduyn C, De Brouwer D, Cornelissen M (2005) Poly(ADP-ribose) polymerase in plants affects energy homeostasis, cell death and stress tolerance. *Plant J* **41**: 95-106

De Vyllder J, Vandenbussche F, Hu Y, Philips W, Van Der Straeten D (2012) Rosette Tracker: an open source image analysis tool for automatic quantification of genotype effects. *Plant Physiol* **160**: 1149-1159

Fahnenstich H, Saigo M, Niessen M, Drincovich MF, Flüggge UI, Maurino VG (2008) Malate and fumarate emerge as key players in primary metabolism: *Arabidopsis thaliana* overexpressing C4-NADP-ME offer a way to manipulate the levels of malate and to analyse the physiological consequences. In: Allen JF, Gantt E, Golbeck JH, Osmond B (Eds.), *Photosynthesis Energy From the Sun*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, pp. 971-975

Fahnenstich H, Saigo M, Niessen M, Zanon MI, Andreo CS, Fernie AR, Drincovich MF, Flüggge UI, Maurino VG (2007) Alteration of organic acid metabolism in *A. thaliana* overexpressing the maize C4-NADP-malic enzyme causes accelerated senescence during extended darkness. *Plant Physiol* **145**: 640-652

Fernie AR, Aharoni A, Willmitzer L, Stitt M, Tohge T, Kopka J, Carroll AJ, Saito K, Fraser PD, de Luca V (2011) Recommendations for reporting metabolite data. *Plant Cell* **23**: 2477-2482

Fernie AR, Roscher A, Ratcliffe RG, Kruger NJ (2001) Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose 6 phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta* **212**: 250-263

Flexas J, Ribas-Carbó M, Diaz-Espejo A, Galmés J, Medrano H (2008) Mesophyll conductance to CO₂: current knowledge and future prospects. *Plant, Cell Environ* **31**: 602-621

Foyer CH, Neukermans J, Queval G, Noctor G, Harbinson J (2012) Photosynthetic control of electron transport and the regulation of gene expression. *J Exp Bot* **63**: 1637-1661

Fu Y, Ballicora MA, Leykam JF, Preiss J (1998) Mechanism of reductive activation of potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase. *J Biol Chem* **273**: 25045-25052

Gibon Y, Blaessing OE, Hannemann J, Carillo P, Hohne M, Hendriks JHM, Palacios N, Cross J, Selbig J, Stitt M (2004) A robot-based platform to measure multiple enzyme activities in *Arabidopsis* using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and prolonged darkness. *Plant Cell* **16**: 3304-3325

Gibson K, Park J-S, Nagaia Y, Hwanga S-K, Cho Y-C, Roh K-E, Lee S-M, Kim D-H, Choi S-B, Ito H, Edwards GE, Okita TW (2011) Exploiting leaf starch synthesis as a transient sink to elevate photosynthesis, plant productivity and yields. *Plant Sci* **181**: 275-281

Glaringa MA, Skryhan K, Kötting O, Zeeman SC, Blennow A (2012) Comprehensive survey of redox sensitive starch metabolising enzymes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* **58**: 89-97

Golding AJ, Finazzi G, Johnson GN (2004) Reduction of the thylakoid electron transport chain by stromal reductants—evidence for activation of cyclic electron transport upon dark adaptation or under drought. *Planta* **220**: 356-365

Gonzalez N, Beebster GTS, Inzé D (2009) David and Goliath: what can the tiny weed *Arabidopsis* teach us to improve biomass production in crops? *Curr Opin Plant Biol* **12**: 157-164

Gonzalez N, Bodt S De, Sulpice R, Jikumaru Y, Chae E, Dhondt S, Daele TV, Milde L De, Weigel D, Kamiya Y, Stitt M, Beebster GTS, Inzé D (2010) Increased leaf size: different means to an end. *Plant Physiol* **153**: 1261-1279

Graham IA (2008) Seed storage oil mobilization. *Annu. Rev Plant Biol* **59**: 115-142

Gu Y, Fu Y, Dowd P, Li S, Vernoud V, Gilroy S, Yang Z (2005) A Rho family GTPase controls actin dynamics and tip growth via two counteracting downstream pathways in pollen tubes. *J Cell Biol* **169**: 127-138

Hädrich N, Hendriks JH, Kötting O, Arrivault S, Feil R, Zeeman SC, Gibon Y, Schulze WX, Stitt M, Lunn JE (2012) Mutagenesis of cysteine 81 prevents dimerization of the APS1 subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase and alters diurnal starch turnover in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant J* **70**: 231–242

Hashida S-n, Itami T, Takahashi H, Takahara K, Nagano M, Kawai-Yamada M, Shoji K, Goto F, Yoshihara T, Uchimiya H (2010) Nicotinate/nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase-mediated regulation of NAD biosynthesis protects guard cells from reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal movement in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **61**: 3813-3825

Hashida S-n, Takahashi H, Kawai-Yamada M, Uchimiya H (2007) *Arabidopsis thaliana* nicotinate/nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase (AtNMNAT) is required for pollen tube growth. *Plant J* **49**: 694-703

Hashida S-n, Takahashi H, Takahara K, Kawai-Yamada M, Kitazaki K, Shoji K, Goto F, Yoshihara T, Uchimiya H (2013) NAD⁺ accumulation during pollen maturation in *Arabidopsis* regulating onset of germination. *Mol Plant* **6**: 216–225

Hashida S, Takahashi H, Uchimiya H (2009) The role of NAD biosynthesis in plant development and stress responses. *Ann Botany* **103**: 819-824

- Hartley JL, Temple GF, Brasch MA** (2000) DNA Cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res* **10**: 1788-1795
- Holmes-Davis R, Tanaka CK, Vensel WH, Hurkman WJ, McCormick S** (2005) Proteome mapping of mature pollen of *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics*. **5**: 4864-4884.
- Hunt L, Holdsworth MJ, Gray JE** (2007) Nicotinamidase activity is important for germination. *Plant J* **51**: 341-351
- Jambunathan N, Penaganti A, Tang Y, Mahalingam R** (2010) Modulation of redox homeostasis under suboptimal conditions by *Arabidopsis* nudix hydrolase. *BMC Plant Biology* **10**: 173
- Kolbe A, Tiessen A, Schluepmann H, Paul M, Ulrich S, Geigenberger P** (2005) Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 11118-11123
- Landy A** (1989) Dynamic, structural, and regulatory aspects of Lambda site specific recombination. *Ann Rev Biochem* **58**: 913-949
- Lima ALS, DaMatta FM, Pinheiro HA, Totola MR, Loureiro ME** (2002) Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environ Exp Bot* **47**: 239-247
- Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR** (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nat Protoc* **1**: 387-396
- Liu Y-J, Nunes-Nesi A, Wallström SV, Lager I, Michalecka AM, Norberg FEB, Widell S, Fredlund KM, Fernie AR, Rasmusson AG** (2009) A redox-mediated modulation of stem bolting in transgenic *nicotiana sylvestris* differentially expressing the external mitochondrial NADPH dehydrogenase. *Plant Physiol* **150**: 1248-1259
- Lorenzon MCA, Almeida EC** (1996) Viabilidade e germinação do pólen de linhagens parentais de cebola híbrida. *Pesqui Agropec Bras* **32**: 345-349
- Maguire JD** (1962) Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Sci* **2**: 176-177
- Martins MCM, Hejazi M, Fettke J, Steup M, Feil R, Krause U, Lunn JE** (2013) Feedback inhibition of starch degradation in *Arabidopsis* leaves mediated by trehalose 6-phosphate. *Plant Physiol* **163**:1142-1163
- Michalska J, Zauber H, Buchanan BB, Cejudo FJ, Geigenberger P** (2009). NTRC links built-in thioredoxin to light and sucrose in regulating starch synthesis in chloroplasts and amyloplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**: 9908-9913
- Michelet L, Zaffagnini M, Morisse S, Sparla F, Perez-Perez ME, Francia F, Danon A, Marchand CH, Fermani S, Trost P, Lemaire SD** (2013) Redox regulation of the Calvin-Benson cycle: something old, something new. *Front Plant Sci* **4**: 470

Munekage Y, Hojo M, Meurer J, Endo T, Tasaka M, Shikanai T (2002) PGR5 is involved in cyclic electron flow around photosystem I and is essential for photoprotection in *Arabidopsis*. *Cell* **110**: 361-371

Munekage Y, Hashimoto M, Miyake C, Tomizawa K-I, Endo T, Tasaka M, Shikanai T (2004) Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. **429**: 579-582

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**: 473-497

Murata Y, Pei Z-M, Mori IC, Schroeder J (2001) Abscisic acid activation of plasma membrane Ca^{2+} channels in guard cells requires cytosolic NAD(P)H and is differentially disrupted upstream and downstream of reactive oxygen species production in *abi1-1* and *abi2-1* protein phosphatase 2C mutants. *Plant Cell* **13**: 2513-2523

Nakamura N, Iwano M, Havaux M, Yokota A, Munekage YN (2013) Promotion of cyclic electron transport around photosystem I during the evolution of NADP-malic enzyme-type C4 photosynthesis in the genus *Flaveria*. *New Phytologist* **199**: 832-842

Nelson N, Yocum CF (2006) Structure and function of photosystems I and II. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 521-65

Nielsen TH, Krapp A, Roper-Schwarz U, Stitt, M (1998) The sugar-mediated regulation of genes encoding the small subunit of Rubisco and the regulatory subunit of ADP glucose pyrophosphorylase is modified by phosphate and nitrogen. *Plant Cell Environ* **21**: 443-454

Noctor G, Queval G, Gakiere B (2006) NAD(P) synthesis and pyridine nucleotide cycling in plants and their potential importance in stress conditions. *J Exp Bot* **57**: 1603-1620

Nouvellon Y, Laclau J-P, Epron D, Kinana A, Mabiala A, Roupsard O, Bonnefond J-M, Maire G le, Marsden C, Bontemps J-D, Saint-André L (2010) Within-stand and seasonal variations of specific leaf area in a clonal *Eucalyptus* plantation in the Republic of Congo. *Forest Ecol Manag* **259**: 1796-1807

Nunes-Nesi A, Carrari F, Gibon Y, Sulpice R, Lytovchenko A, Fisahn J, Graham J, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ, Fernie AR (2007) Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. *Plant J* **50**:1093-1106

Palmieri F, Rieder B, Ventrella A, Blanco E, Thi DP, Nunes-Nesi A, Trauth AU, Fiermonte G, Tjanden J, Agrimi G, Kirchberger S, Paradies E, Fernie AR, Neuhaus E (2009) Molecular identification and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* mitochondrial and chloroplastic NAD⁺ carrier proteins. *J Biol Chem* **284**: 31249-31259

Palmieri R, Yue RH, Jacobs HK, Maland L, Wu L, Kuby SA (1973) Nucleoside triphosphate-nucleoside diphosphate transphosphorylase (nucleoside diphosphokinase). 3. Subunit structure of the crystalline enzyme from brewers' yeast. *J Biol Chem* **248**: 4486-4499

- Pfeil BE, Schoefs B, Spetea C** (2014) Function and evolution of channels and transporters in photosynthetic membranes. *Cell Mol Life Sci* **71**: 979-998
- Pilkington SM, Encke B, Krohn N, Höhne M, Stitt M, Pyl E-T** (2015) Relationship between starch degradation and carbon demand for maintenance and growth in *Arabidopsis thaliana* in different irradiance and temperature regimes. *Plant Cell Environ* **38**: 157-171
- Pracharoenwattana I, Cornah JE, Smith SM** (2005) Arabidopsis peroxisomal citrate synthase is required for fatty acid respiration and seed germination. *Plant Cell* **17**: 2037-2048
- Pracharoenwattana I, Zhou W, Smith SM** (2010) Fatty acid beta-oxidation in germinating Arabidopsis seeds is supported by peroxisomal hydroxypyruvate reductase when malate dehydrogenase is absent. *Plant Mol Biol* **72**: 101-109
- Ptashne M** (1992). A genetic switch: Phage (Lambda) and higher organisms. Cell Press, Cambridge, 92 p
- Quettier A, Eastmond PJ** (2009) Storage oil hydrolysis during early seedling growth. *Plant Physiol Biochem* **47**: 485-490
- Sagi M, Davydov O, Orazova S, Yesbergenova Z, Ophir R, Stratmann JW, Fluhr R** (2004) Plant Respiratory Burst Oxidase Homologs impinge on wound responsiveness and development in *Lycopersicon esculentum*. *Plant Cell* **16**: 616-628
- Schippers JHM, Nunes-Nesi A, Apetrei R, Hille J, Fernie AR, Dijkwel PP** (2008) The *Arabidopsis* onset of leaf death5 mutation of quinolinate synthase nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis and causes early ageing. *Plant Cell* **20**: 2909-2925
- Scialdone A, Mugford ST, Feike D, Skeffington A, Borrill P, Graf A, Smith AM, Howard M** (2013) Arabidopsis plants perform arithmetic division to prevent starvation at night. *eLife* **2**: 1-24
- Scott RJ, Spielman M, Bailey J, Dickinson HG** (1998) Parent-of-origin effects on seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **125**: 3329-3341.
- Shikanai T** (2014) Central role of cyclic electron transport around photosystem I in the regulation of photosynthesis. *Curr Opin in Biotech* **26**: 25-30
- Stitt M, Lilley RM, Gerhardt R, Heldt HW** (1989) Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. *Methods Enzymol* **174**: 518-552
- Sulpice R, Pyl ET, Ishihara H, Trenkamp S, Steinfath M, Witucka-Wall H, Gibon Y, Usadel B, Poree F, Piques MC, von Korff M, Steinhauser MC, Keurenties JJ, Guenther M, Hoehne M, Selbig J, Fernie AR, Altmann T, Stitt M** (2009) Starch as a major integrator in the regulation of plant growth. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 10348-10353
- Takahashi H, Takahara K, Hashida S, Hirabayashi T, Fujimori T, Kawai-Yamada M, Yamaya T, Yanagisawa S, Uchimiya H** (2009) Pleiotropic modulation of carbon and nitrogen metabolism in Arabidopsis plants overexpressing the *NAD kinase2* Gene. *Plant Physiol* **151**: 100-113

- Tiessen A, Prescha K, Branscheid A, Palacios N, McKibbin R, Halford NG, Geigenberger P** (2003) Evidence that SNF1-related kinase and hexokinase are involved in separate sugar-signalling pathways modulating post-translational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in potato tubers. *Plant J* **35**: 490-500
- Todisco S, Agrimi G, Castegna A, Palmieri F** (2006) Identification of the mitochondrial NAD1 transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **281**: 1524–1531
- Tanaka Y, Sugano SS, Shimada T, Hara-Nishimura I** (2013) Enhancement of leaf photosynthetic capacity through increased stomatal density in Arabidopsis. *New Phytol* **198**: 757-764
- Valentini R, Epron D, De Angelis P, Matteucci G, Dreyer E** (1995) *In situ* estimation of net CO₂ assimilation, photosynthetic electron flow and photorespiration in Turkey oak (*Q. cerris* L.) leaves: diurnal cycles under different levels of water supply. *Plant Cell Environ* **18**: 631-640
- von Caemmerer S** (2000). Biochemical models of leaf photosynthesis. 165 pp. Victoria, Australia: CSIRO Publishing
- von Groll U, Berger D, Altmann T** (2002) The subtilisin-like serine protease SDD1 mediates cell-to-cell signaling during Arabidopsis stomatal development. *Plant Cell* **14**: 1527-1539
- Wilhelm C, Selmar D** (2011) Energy dissipation is an essential mechanism to sustain the viability of plants: The physiological limits of improved photosynthesis. *J Plant Physiol* **168**: 79-87
- Yamori W, Takahashi S, Makino A, Price GD, Badger MR, von Caemmerer S** (2011) The roles of ATP synthase and the cytochrome *b₆/f* complexes in limiting chloroplast electron transport and determining photosynthetic capacity. *Plant Physiol* **155**: 956-962
- Yang Y, Costa A, Leonhardt N, Siegel RS, Schroeder JI** (2008) Isolation of a strong Arabidopsis guard cell promoter and its potential as a research tool. *Plant Methods* **4**: 6
- Zolman BK, Silva ID, Bonnie Bartel B** (2001) The Arabidopsis *pxa1* mutant is defective in an ATP binding cassette transporter-like protein required for peroxisomal fatty acid β -oxidation. *Plant Physiol* **127**: 1266-1278
- Zrenner R, Stitt M, Sonnewald U, Boldt R** (2006) Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 805-836

DADOS SUPLEMENTARES

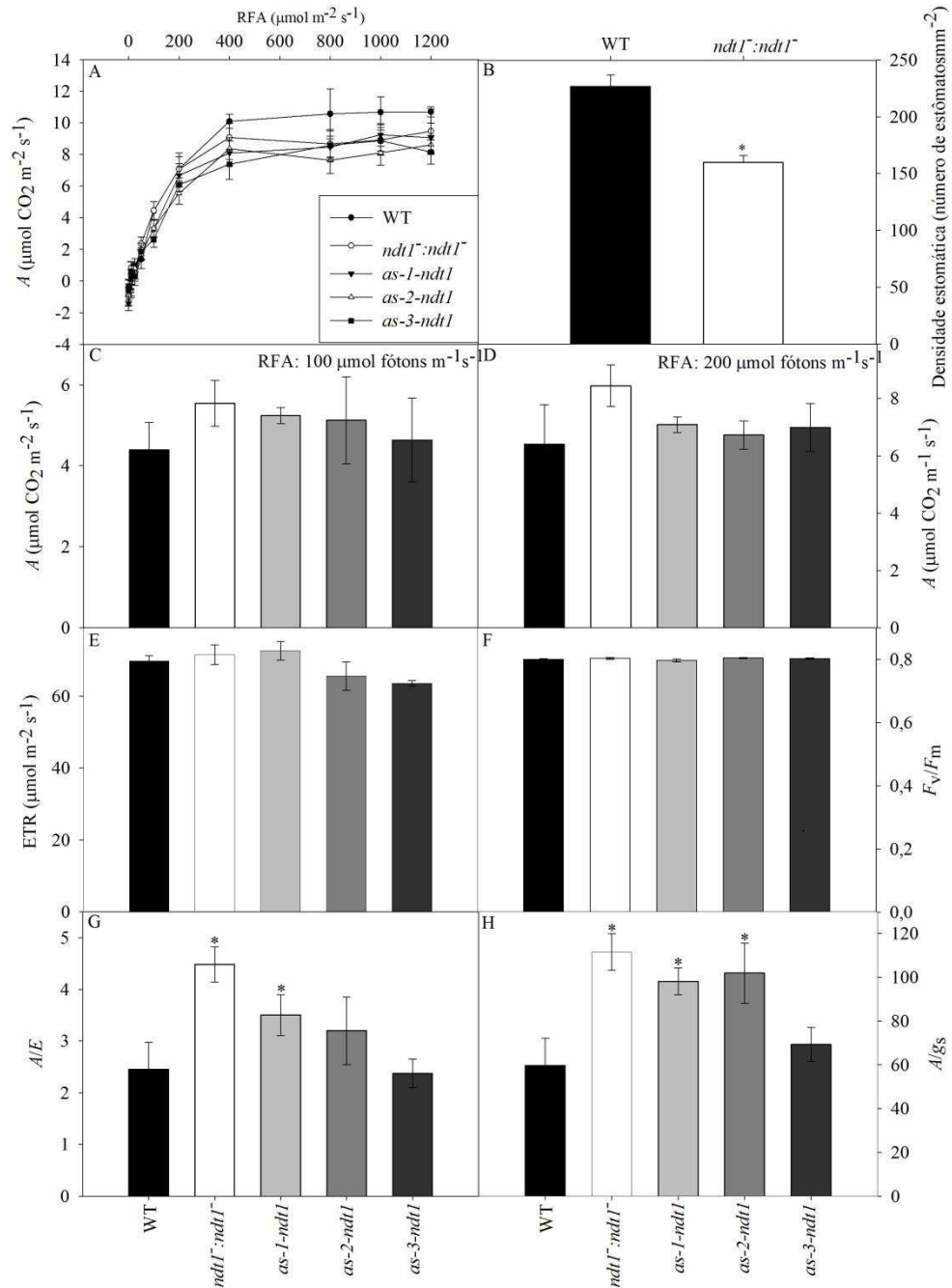


Figura suplementar 1. Efeito da redução na expressão de *NDT1* nos parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* de plantas de *Arabidopsis* com quatro semanas de idade. A, curva de resposta da fotossíntese a alterações na radiação fotossinteticamente ativa (RFA). B, densidade estomática. C, taxa de assimilação líquida de CO_2 (A) com radiação fotossinteticamente ativa (RFA) de $100 \mu\text{mol}$ de fôtons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. D, taxa de assimilação líquida de CO_2 (A) com radiação fotossinteticamente ativa (RFA) de $200 \mu\text{mol}$ de fôtons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. E, taxa de transporte de elétrons (ETR), F, eficiência fotoquímica máxima do FSII (F_v/F_m). G, eficiência instantânea do uso da água. H, eficiência intrínseca do uso da água. Valores representam a média \pm erro padrão de seis plantas individuais e os asteriscos indicam diferença significativa ($P < 0,05$), segundo o teste *t* de Student, em comparação com o tipo selvagem.

Tabela suplementar 1: Parâmetros fotossintéticos derivados da curva de luz de plantas *ndt1* (Figura 2)

Parâmetro*	WT	<i>ndt1:ndt1</i>	<i>anti-1-ndt1</i>	<i>anti-2-ndt1</i>	<i>anti-3-ndt1</i>
A_{RFA}	10,1 ± 0,5	9,1 ± 0,9	8,1 ± 0,7	8,4 ± 0,7	8,3 ± 0,9
I_c	21,3 ± 4,3	21,3 ± 4,0	22,0 ± 0,5	23,0 ± 1,9	16,9 ± 1,4
I_s	328 ± 42	336 ± 99	338 ± 54	321 ± 45	342 ± 40
$1/\phi$	18,5 ± 3,5	21,6 ± 4,0	24,5 ± 5,9	25,3 ± 9,4	23,4 ± 5,0

Os valores representam a média de seis plantas ± erro padrão. Valores em negrito são significativos pelo teste *t* de Student's ($P < 0.05$) em comparação com o tipo selvagem. * A_{RFA} : taxa de assimilação líquida de carbono saturada pela luz, I_c : irradiância de compensação, I_s : irradiância de saturação, $1/\phi$: eficiência no uso da luz.

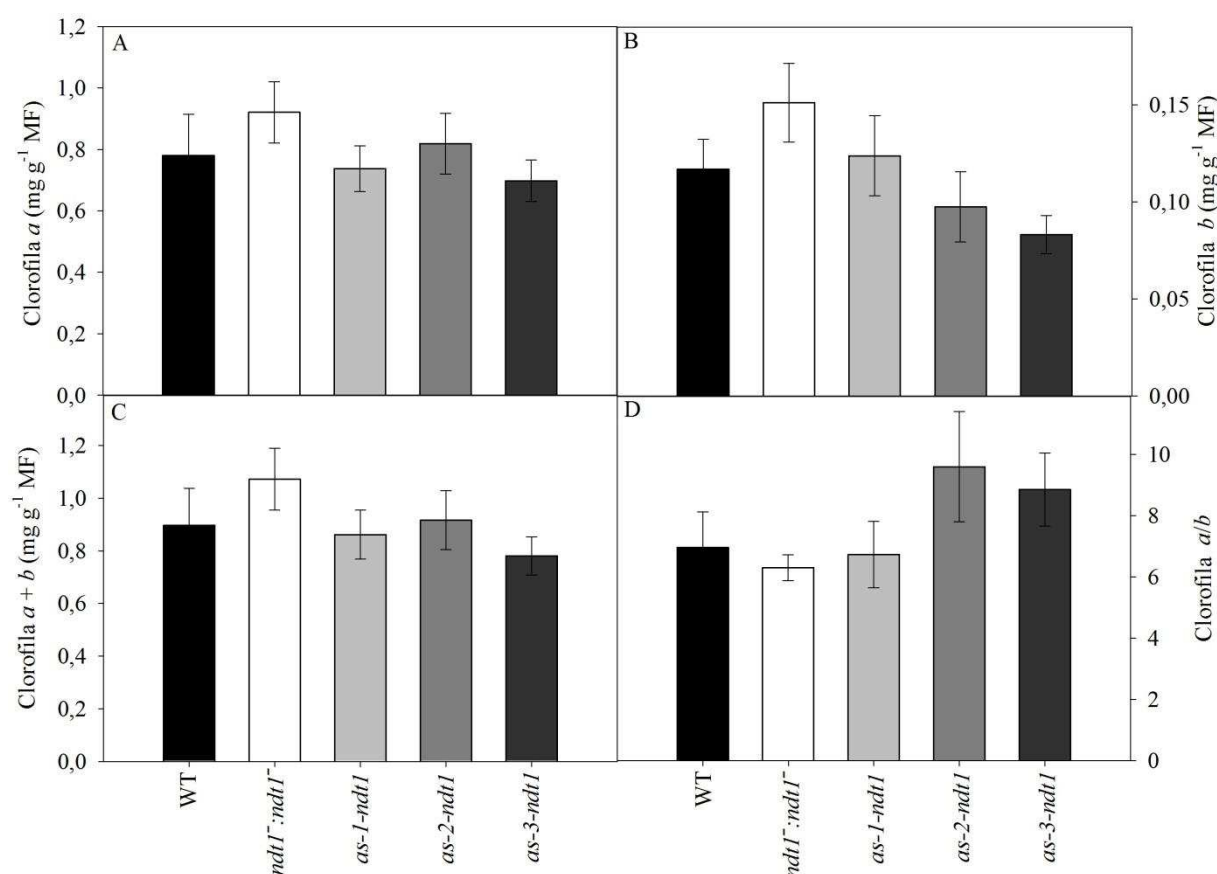


Figura suplementar 2. Efeito da redução na expressão de *NDT1* na quantificação e clorofilas de folhas de *Arabidopsis* coletadas ao meio do dia. A, clorofila *a*. B, clorofila *b*. C, conteúdo de clorofila *a* + *b*. D, razão clorofila *a/b*. Valores representam a média ± erro padrão de seis plantas individuais e os asteriscos indicam diferença significativa ($P < 0,05$), segundo o teste *t* de Student, em comparação com o tipo selvagem. MF: matéria fresca

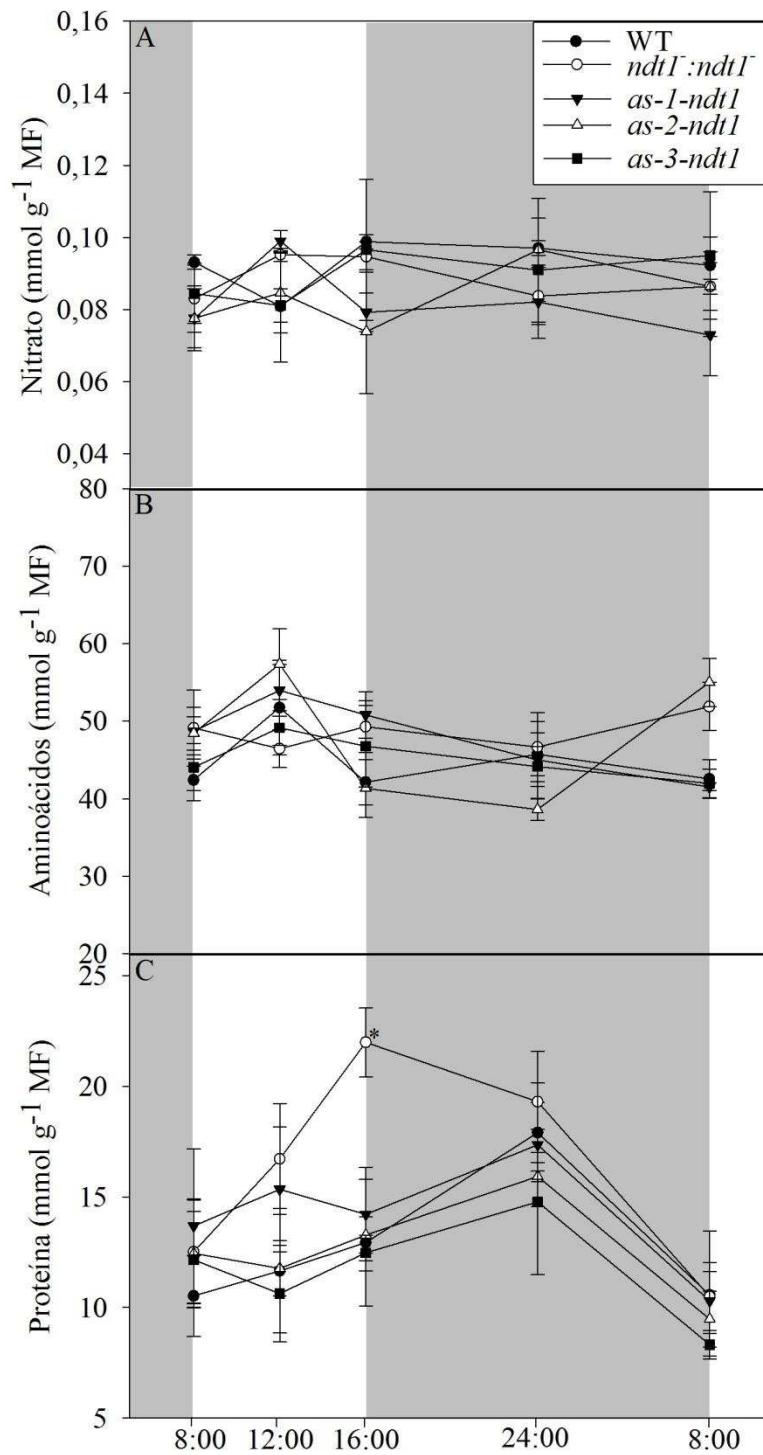


Figura suplementar 3. Fenótipo de plantas de *Arabidopsis* com quatro semanas de idade e redução na expressão de *NDT1*. A, nitrato B, aminoácidos. C, proteína. Valores representam a média \pm erro padrão de seis plantas individuais e os asteriscos indicam diferença significativa ($P < 0,05$), segundo o teste *t* de Student, em comparação com o tipo selvagem. Áreas cinza nos gráficos representam o período de escuro.

Tabela suplementar 2: Nível relativo de metabólitos em folhas de linhagens de Arabidopsis com quatro semanas de idade e reduzida expressão de *NDT1*

Metabólitos	WT	<i>ndt1:ndt1</i>	<i>as-1-ndt1</i>	<i>as-2-ndt1</i>	<i>as-3-ndt1</i>
Aminoácidos					
Alanina	1,00 ± 0,15	0,86 ± 0,29	0,92 ± 0,12	0,93 ± 0,06	0,37 ± 0,07
β-Alanina	1,00 ± 0,06	0,92 ± 0,06	0,80 ± 0,05	1,03 ± 0,05	1,07 ± 0,07
Asparagina	1,00 ± 0,11	0,89 ± 0,37	0,87 ± 0,16	0,77 ± 0,12	0,88 ± 0,02
Aspartato	1,00 ± 0,07	0,84 ± 0,15	1,02 ± 0,17	0,84 ± 0,05	0,76 ± 0,07
Fenilalanina	1,00 ± 0,15	1,26 ± 0,47	0,88 ± 0,08	1,05 ± 0,15	1,27 ± 0,12
GABA	1,00 ± 0,19	1,70 ± 0,65	1,44 ± 0,29	1,28 ± 0,34	1,24 ± 0,06
Glicina	1,00 ± 0,13	1,06 ± 0,46	0,94 ± 0,19	0,83 ± 0,04	0,84 ± 0,02
Glutamato	1,00 ± 0,46	3,24 ± 0,16	2,14 ± 0,14	1,17 ± 0,06	1,09 ± 0,17
Glutamina	1,00 ± 0,10	0,92 ± 0,16	0,92 ± 0,01	0,75 ± 0,08	0,49 ± 0,04
Isoleucina	1,00 ± 0,13	1,35 ± 0,78	1,33 ± 0,23	1,37 ± 0,21	1,32 ± 0,09
Leucina	1,00 ± 0,17	2,01 ± 0,70	1,51 ± 0,29	1,31 ± 0,20	1,37 ± 0,34
Metionina	1,00 ± 0,12	1,16 ± 0,56	1,12 ± 0,13	0,74 ± 0,15	0,88 ± 0,22
Prolina	1,00 ± 0,22	1,23 ± 0,67	0,99 ± 0,17	0,94 ± 0,16	0,90 ± 0,16
Serina	1,00 ± 0,12	1,20 ± 0,36	1,26 ± 0,13	1,04 ± 0,12	1,08 ± 0,20
Tirosina	1,00 ± 0,35	1,14 ± 0,29	0,95 ± 0,12	1,09 ± 0,11	1,36 ± 0,20
Treonina	1,00 ± 0,12	1,01 ± 0,29	1,10 ± 0,26	1,07 ± 0,10	0,85 ± 0,10
Triptofano	1,00 ± 0,21	1,12 ± 0,12	0,88 ± 0,12	0,99 ± 0,33	1,03 ± 0,10
Valina	1,00 ± 0,08	1,46 ± 0,23	0,28 ± 0,14	1,24 ± 0,13	1,00 ± 0,01
Ácidos orgânicos					
Ascorbato	1,00 ± 0,29	2,45 ± 0,85	1,78 ± 0,16	1,67 ± 0,41	1,99 ± 0,29
Citrato	1,00 ± 0,04	0,98 ± 0,15	1,15 ± 0,04	1,05 ± 0,06	1,13 ± 0,04
Desidroascorbato dimero	1,00 ± 0,15	1,78 ± 0,20	1,69 ± 0,41	1,35 ± 0,17	1,07 ± 0,34
Glicerato	1,00 ± 0,06	1,20 ± 0,15	1,26 ± 0,16	1,20 ± 0,12	1,25 ± 0,09
Glicolato	1,00 ± 0,05	0,70 ± 0,17	0,79 ± 0,11	0,76 ± 0,07	0,86 ± 0,07
Lactato	1,00 ± 0,08	0,81 ± 0,10	0,92 ± 0,22	0,82 ± 0,06	1,10 ± 0,20
Succinato	1,00 ± 0,15	1,34 ± 0,25	0,64 ± 0,09	1,18 ± 0,06	1,22 ± 0,12
Treonato	1,00 ± 0,24	1,18 ± 0,24	1,15 ± 0,11	1,07 ± 0,23	1,36 ± 0,13
Açúcares					
1,6 Anidro-β-glicose	1,00 ± 0,16	1,05 ± 0,32	0,95 ± 0,10	0,78 ± 0,05	0,81 ± 0,03
Eritritol	1,00 ± 0,20	1,27 ± 0,10	0,86 ± 0,04	1,29 ± 0,12	1,15 ± 0,10
Frutose	1,00 ± 0,30	2,43 ± 0,48	1,70 ± 0,52	1,44 ± 0,21	3,50 ± 0,73
Galatinol	1,00 ± 0,40	2,94 ± 0,23	1,57 ± 0,13	2,26 ± 0,12	5,56 ± 0,78
Glicopirranose	1,00 ± 0,43	1,63 ± 0,45	1,12 ± 0,12	0,91 ± 0,09	1,58 ± 0,03
Glicose	1,00 ± 0,08	3,26 ± 0,02	3,92 ± 0,06	2,23 ± 0,01	2,87 ± 0,13
Maltose	1,00 ± 0,18	1,15 ± 0,10	1,02 ± 0,11	0,91 ± 0,11	1,33 ± 0,17
α-1-O-Metil manopirranose	1,00 ± 0,18	1,33 ± 0,36	1,21 ± 0,12	1,20 ± 0,07	1,02 ± 0,03
Psicose	1,00 ± 0,86	1,80 ± 0,24	1,25 ± 0,30	1,36 ± 0,17	2,26 ± 0,35
Rafinose	1,00 ± 0,51	0,74 ± 0,45	0,47 ± 0,02	1,23 ± 0,36	2,89 ± 0,55
Sacarose	1,00 ± 0,05	0,93 ± 0,05	0,89 ± 0,05	1,03 ± 0,02	1,08 ± 0,06
Sorbose	1,00 ± 0,78	2,06 ± 0,48	1,86 ± 0,43	1,08 ± 0,19	1,90 ± 0,42
α-α-Trealose	1,00 ± 0,25	1,04 ± 0,20	0,82 ± 0,07	1,08 ± 0,10	2,17 ± 0,08

Continua

Metabólitos	Conclusão				
	WT	<i>ndt1:ndt1</i>	<i>as-1-ndt1</i>	<i>as-2-ndt1</i>	<i>as-3-ndt1</i>
Outros					
Ác. Indol-3-acetonitrila	1,00 ± 0,25	1,52 ± 0,40	0,91 ± 0,07	1,17 ± 0,14	1,82 ± 0,12
Mio-inositol	1,00 ± 0,22	1,32 ± 0,16	0,46 ± 0,02	1,03 ± 0,21	1,43 ± 0,06
Nicotinato	1,00 ± 0,03	1,02 ± 0,34	0,94 ± 0,06	0,92 ± 0,12	1,03 ± 0,11
Putrescina	1,00 ± 0,08	1,04 ± 0,50	0,81 ± 0,15	0,72 ± 0,09	0,78 ± 0,11
Sinapate	1,00 ± 0,08	0,93 ± 0,43	1,07 ± 0,27	0,99 ± 0,13	1,03 ± 0,13
Ureia	1,00 ± 0,08	1,14 ± 0,39	1,18 ± 0,24	1,08 ± 0,10	0,96 ± 0,01

Os valores representam níveis relativos ± erro padrão de seis amostras independentes; valores em negrito são significativos pelo teste *t* de Student's ($P < 0,05$) em comparação com o tipo selvagem. GABA: Ácido amino butírico.

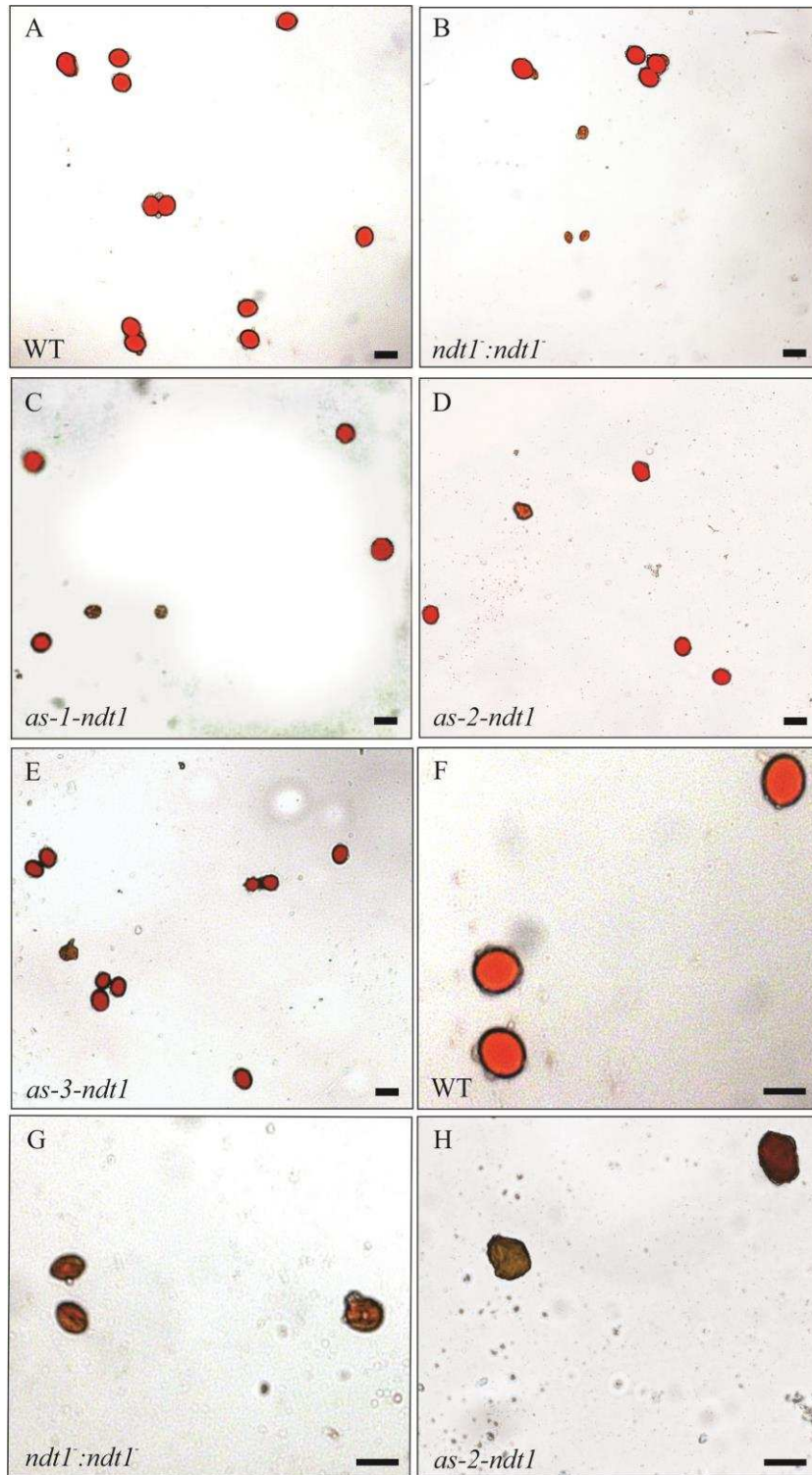


Figura suplementar 4. Análise fenotípica de grãos de pólen corados com carmim acético de plantas com reduzida expressão de *NDT1*. O corante marca de vermelho células vivas e de amarelo células mortas. Também é possível ver grãos de pólen deformados. A, tipo selvagem (WT). B, *ndt1:ndt1*. C, *as-1-ndt1*. D, *as-2-ndt1*. E, *as-3-ndt1*. F, Detalhe de grãos de pólen WT. G, Detalhe de grãos de pólen inviáveis (menores em comparação com o WT) de plantas *ndt1:ndt1*. H, Detalhe de grão de pólen deformado de plantas *as-2-ndt1*. Barra = 20 μ m.

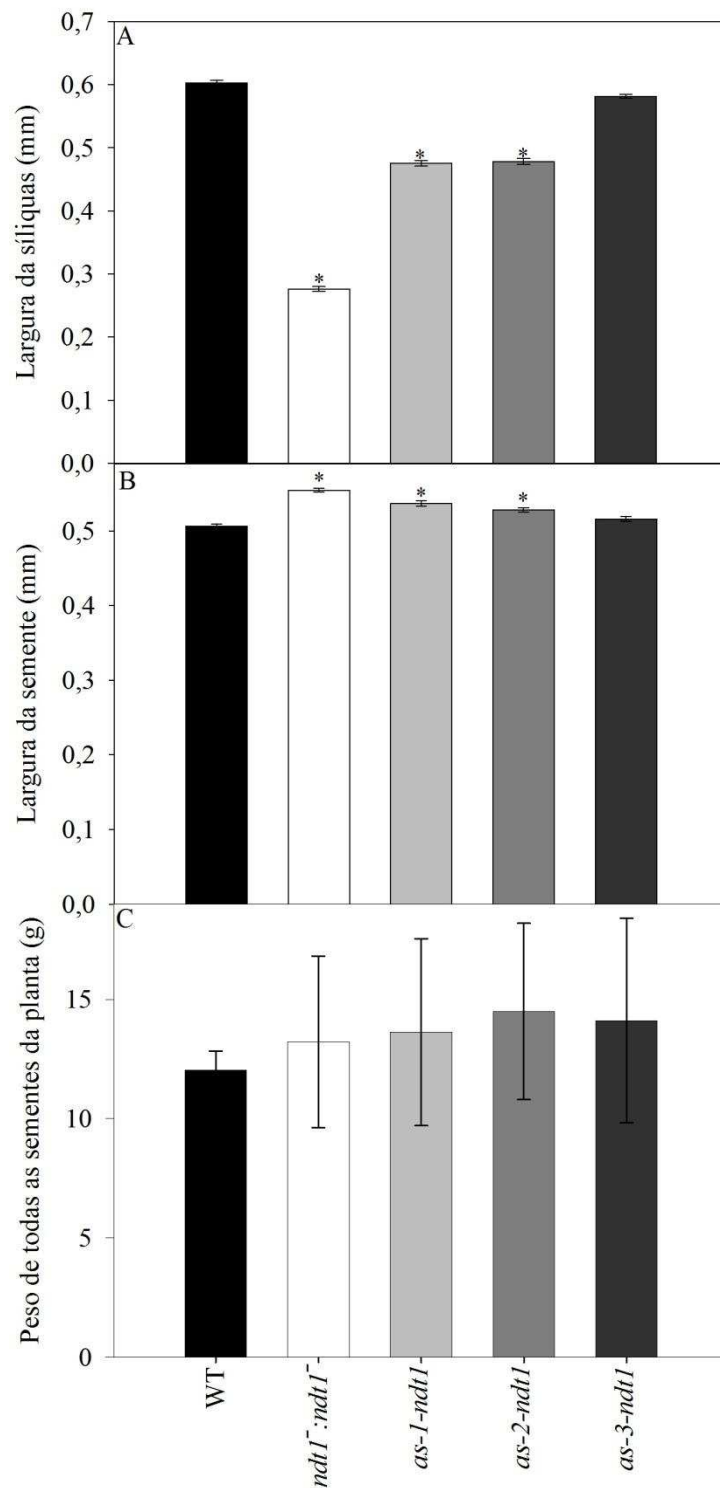


Figura suplementar 5. Avaliações fenotípicas em plantas com baixa expressão de *NDT1*. A, largura das siliquas. B, largura da semente. C, peso de todas as sementes de uma planta. Valores representam a média \pm erro padrão de seis plantas individuais e os asteriscos indicam diferença significativa ($P < 0,05$), segundo o teste *t* de Student, em comparação com o tipo selvagem.

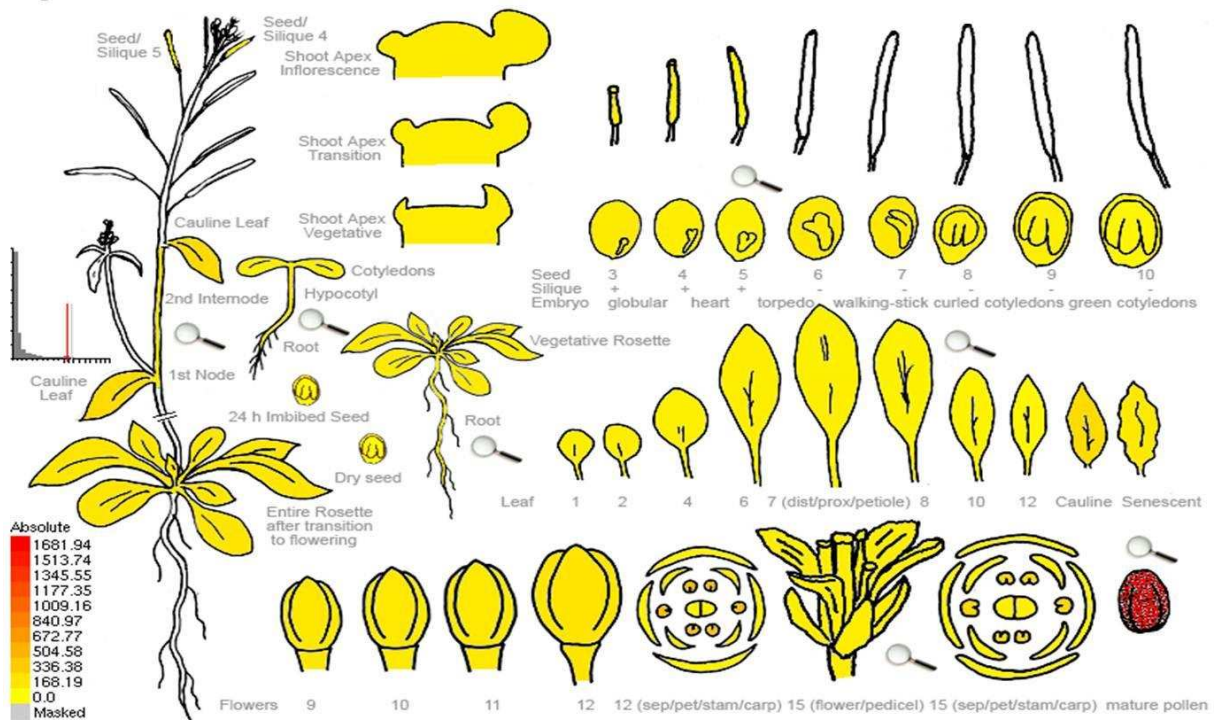


Figura suplementar 6. Análise *in silico* do gene *NDT1* em diferentes tecidos. Fonte: Arabidopsis eFP Browser <<http://esc4037-shemp.csb.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>>

Capítulo 2

Determinação do papel fisiológico do transportador mitocondrial de NAD⁺ (NDT2) em plantas de *Arabidopsis thaliana*

Izabel de Souza Chaves¹, Alexandra Florian², Marcel Viana Pires³, Paula Fonseca Pereira¹
Fábio Murilo Da Matta³, Toshihiro Obata², Wagner L. Araújo¹, Nicole Linka⁴, Ferdinando Palmieri⁵, Alisdair R. Fernie², Adriano Nunes-Nesi⁶

¹ Max Planck Partner Group, Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900 Viçosa, Minas Gerais, Brasil

² Max-Planck-Institute of Molecular Plant Physiology Am Mühlenberg 1, 14476 Potsdam-Golm, Germany

³ Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900 Viçosa, Minas Gerais, Brasil

⁴ Department of Plant Biochemistry, Heinrich Heine University Düsseldorf, 40225, Düsseldorf, Germany

⁵ Department of Pharmaco-Biology, Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, University of Bari, 70125 Bari, Italy

RESUMO

O nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) é um metabólito central no metabolismo celular que está envolvido em transferência de energia, na sinalização celular e como coenzima em diversas reações. Alterações no catabolismo ou no anabolismo do NAD^+ podem alterar não apenas a sua concentração, mas também o poder redutor celular, impactando aspectos importantes do crescimento e desenvolvimento das plantas. No presente trabalho, avaliou-se o papel do transportador mitocondrial de NAD^+ (*NDT2*) em plantas de *Arabidopsis thaliana* com reduzida expressão deste transportador. Para tal, foi utilizada uma linhagem mutante obtida por inserção do T-DNA e adicionalmente foram geradas plantas transgênicas contendo uma construção antisense para o transportador *NDT2*, sob o controle do promotor 35S, da qual, três linhagens com reduzida expressão foram selecionadas. Estas plantas foram caracterizadas extensivamente a nível fisiológico e bioquímico e observou-se que apesar de possuírem um menor número de folhas, a área foliar total aumentou. Apesar disso, a fotossíntese nestas plantas diminuiu consideravelmente em decorrência de uma menor condutância estomática em consequência de uma reduzida densidade estomática. Concomitantemente, plantas com reduzida expressão de *NDT2* apresentaram menor acúmulo de amido ao longo do dia e aumento nos níveis de malato e fumarato ao meio do dia. Em tecidos não fotossintetizantes vários fenótipos foram observados em decorrência da redução do *NDT2*. A germinação das sementes destas plantas e formação de plântulas normais foram menores e mais lentas em comparação com o tipo selvagem. Além disso, houve aumento na concentração de ácidos graxos durante a mobilização das reservas da semente e estabelecimento das plântulas. Em conjunto, estes dados sugerem que alterações no potencial redox em mitocôndrias causadas pela diminuição da expressão de *NDT2* afetam processos que ocorrem nos cloroplastos, especialmente a fotossíntese e a síntese de amido. Além disso, afetam substancialmente a germinação e estabelecimento das plântulas.

PALAVRAS-CHAVE

Transportadores, mitocôndria, nicotinamida adenina dinucleotídeo, fotossíntese, amido, germinação

1 INTRODUÇÃO

Mitocôndrias são organelas presentes em todas as células eucarióticas e atuam em várias funções fisiológicas. Em plantas, além de serem responsáveis pela respiração e suprimento de energia para a célula, elas também estão envolvidas na assimilação de nitrogênio, na fotorrespiração, no metabolismo do carbono, na biossíntese de aminoácidos, respostas a estresses, dentre outros processos biológicos (Oswald et al., 2001; Araújo et al., 2012; Nunes-Nesi et al., 2013). Ao contrário da membrana externa, a membrana interna das mitocôndrias é impermeável à maioria dos metabólitos. Assim, torna-se necessário a existência de proteínas específicas que realizem a importação e exportação de metabólitos através das membranas internas (Palmieri et al., 2011). A passagem de compostos hidrofóbicos através da membrana mitocondrial interna é realizada principalmente por diferentes proteínas, dentre as quais muitas são pertencentes à família de transportadores mitocondriais (*Mitochondrial Carrier Family*, MCF; Picault et al., 2004). As proteínas pertencentes a esta família são relativamente pequenas, com massa molecular entre 30-34 kDa, e características semelhantes, como seis segmentos transmembrana do tipo α -hélice e cinco porções hidrofílicas que, em conjunto, podem ser divididos em três domínios (Picault et al., 2004).

Transportadores mitocondriais têm sido identificados via estudos bioquímicos em mitocôndrias isoladas. Estes transportadores têm sido diferenciados com base na especificidade do seu substrato e sensibilidade a inibidores (Palmieri et al., 2011; Sze, 2013). Alguns transportadores estão envolvidos na fosforilação oxidativa, outros no transporte de intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (Ciclo TCA), aminoácidos ou cofatores (Laloi, 1999; Palmieri et al., 2011; Sze, 2013; Monné e Palmieri, 2014). Foi identificada uma proteína existente na membrana mitocondrial interna da mitocôndria e pertencente à MCF que realiza o transporte de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) para dentro desta organela, já que os passos finais da biossíntese de NAD^+ ocorrem apenas no citosol (Palmieri et al., 2009). Este transportador foi denominado NDT2 (NDT: *Nicotinamide Adenine Dinucleotide* (NAD^+) *transporter*) e revelou uma alta afinidade por NAD^+ sugerindo como sua provável função o fornecimento de NAD^+ à matriz mitocondrial por transporte do tipo antiporte em troca de, principalmente, ADP e AMP (Palmieri et al., 2009). Além disso, outros transportadores de NAD^+ também já foram descritos, como o transportador cloroplastídico de NAD^+ , denominado NDT1 e o transportador peroxisomal de NAD^+ , chamado PXN. A NDT1

e *At*NDT2 possuem 61% de similaridade entre seus aminoácidos. *At*NDT2, entretanto, possui na sua porção N-terminal um suposto peptídeo de trânsito que serviria para direcionar esta proteína para a membrana interna da mitocôndria. Além disso, *At*NDT2 possui extensão C-terminal 45 aminoácidos mais longa que *At*NDT1 (Palmieri et al., 2009).

O NAD^+ é um metabólito central no metabolismo celular que está envolvido em transações energéticas, na sinalização celular e em diversas reações na forma de coenzimas (Rasmusson e Wallström, 2010). Alterações no catabolismo ou no anabolismo do NAD^+ podem alterar não apenas a sua concentração, mas também o poder redutor celular, impactando aspectos importantes do crescimento e desenvolvimento das plantas (Noctor et al. 2006, Hashida et al., 2009). Devido a sua capacidade de transportar elétrons, o NAD^+ é um composto essencial em numerosas reações de redox em todos os organismos vivos (Hashida et al., 2010).

Variações no estado redox celular são intrínsecas ao metabolismo vegetal e são determinadas pela oxidação e redução de várias substâncias redox-ativas, especialmente NAD(H) e NADP(H) (Geigenberger e Fernie, 2014). Estes nucleotídeos atuam como cofatores de um grande número de enzimas e juntamente com a água são os compostos que mais interconectam redes metabólicas (Nelson e Cox, 2012). O NAD^+ e a sua forma reduzida NADH estão envolvidos em reações importantes do metabolismo, como a glicólise, a síntese de proteínas Fe/S, a cadeia transportadora de elétrons, o ciclo TCA e a descarboxilação da glicina nas mitocôndrias; o ciclo de Calvin-Belson e a via oxidativa das pentoses fosfatadas nos cloroplastos e a β -oxidação nos peroxissomos, entre outros processos do metabolismo (Bernhardt et al., 2012; Geigenberger e Fernie, 2014). Por serem utilizados em reações redox possuem importante papel no controle da atividade de desidrogenases. Por causa disso, são essenciais em todas as organelas celulares e o trânsito destes solutos entre diferentes organelas como mitocôndria, plastídeo, retículo endoplasmático, complexo de Golgi e peroxissomo tem sido observado (Palmieri et al., 2009).

Recentemente tem-se verificado a existência de uma regulação coordenada entre cloroplasto e mitocôndria, organelas que cooperam metabolicamente entre si durante a fotossíntese, a síntese de sacarose e a assimilação de nitrogênio (Foyer et al., 2011; Nunes-Nesi et al., 2011; Araújo et al., 2012). Estudos recentes revelam ainda que, de fato, a taxa de assimilação de carbono pode variar quando a atividade mitocondrial é alterada (Carrari et al.,

2003; Bartoli et al.2005; Nunes-Nesi et al., 2005, Nunes-Nesi et al., 2007a; Araújo et al., 2010; Fuentes et al., 2011;). Assim, alterações nas concentrações ou transporte de NAD^+ na mitocôndria podem afetar diferentes aspectos do metabolismo vegetal. Nesse sentido, este trabalho objetivou caracterizar o transportador mitocondrial de NAD^+ a nível fisiológico e bioquímico em plantas de *Arabidopsis thaliana*. O gene *NDT2* é fortemente expresso em tecidos em desenvolvimento e em células com alta atividade metabólica, embora seus padrões de expressão variem de acordo com o tecido considerado (Palmieri et al., 2009). Utilizando uma construção para avaliar o padrão de expressão dos genes *NDT2*, estes autores observaram que o promotor deste gene promove elevada expressão de *GUS* em plantas *Atndt2-promotor-GUS* no meristema apical da parte aérea, nas nervuras de folhas jovens e senescentes, em siliques em desenvolvimento, incluindo estruturas funiculares, nas nervuras de flores, em grãos de pólen em desenvolvimento e no cilindro central de raízes.

Apesar da caracterização bioquímica da proteína *NDT2 in vitro* as funções fisiológicas da mesma *in vivo*, em plantas cultivadas sob condições ótimas ao desenvolvimento ou em condições adversas ainda permanecem por serem estudadas. Nesse sentido, foram geradas e utilizadas plantas com reduzida expressão do gene *NDT2* para melhor compreender o papel fisiológico deste transportador em plantas. Dado que o NAD^+ é essencial no metabolismo vegetal, acredita-se que alterações no transporte do NAD^+ possam impactar seriamente o crescimento e desenvolvimento das plantas. Uma vez que existe uma coordenada relação entre diferentes organelas celulares, os efeitos não ficariam restritos a alterações em processos que ocorrem na mitocôndria, mas sim no metabolismo como um todo. Assim, este trabalho investigou alterações fisiológicas e bioquímicas em plantas com reduzida expressão de *NDT2* crescidas em condições ótimas ao desenvolvimento vegetal e aspectos importantes da germinação e desenvolvimento de plântulas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Foram utilizadas diferentes linhagens mutantes com reduzida expressão do gene que codifica o transportador mitocondrial de NAD^+ (*AtNDT2*, *At1g25380*) para a realização deste trabalho. Uma delas, denominada aqui de *ndt2::ndt2*⁻ é oriunda da coleção GABI-KAT (GK-

143G09) e possui uma inserção de T-DNA, via *Agrobacterium tumefaciens* no quinto éxon do gene do transportador, assim como um gene de seleção para sulfadiazina (Figura 1A). Plantas mutantes oriundas desse genótipo foram selecionadas com base na resistência ao antibiótico e à homozigose por meio de reações de PCR, utilizando *primers* específicos para o gene *NDT2* e para o T-DNA (*forward* 5'-ATATTGACCATCATACTATTGC-3', *reverse* 5'-TGGATCGCGACATGGCTTACTC-3' e T-DNA 5'-ATATTGACCATCATACTCATTGC-3').

Também foram utilizadas plantas transgênicas pela inserção de uma construção do tipo antisenso sob o controle do promotor 35S, obtidas pelo sistema Gateway e denominadas *as-1-ndt2*, *as-2-ndt2* e *as-3-ndt2* (Landy, 1989; Ptashne, 1992; Hartley et al., 2000). Para realizar este tipo de construção, *primers* específicos foram desenhados a partir de uma biblioteca de cDNA, para amplificação do fragmento do gene *At1g25380* (*forward* 5'-GGCTCCACCATGATTGAACATGG-3' e *reverse* 5'-AGCTGGGTCTTATTTGCTTCCAAGA3'). O produto purificado a partir da reação de PCR foi recombinado com o vetor de doação (pDONR207) gerando um clone de entrada que foi transformado em *Escherichia coli* (linhagem DH5 α) para obtenção do plasmídeo contendo o gene de interesse. Uma segunda recombinação foi realizada utilizando-se o plasmídeo isolado com um vetor de destino (pH2WG7) para gerar um clone de expressão que foi novamente transformado em *E. coli*. As colônias positivas foram então selecionadas e utilizadas para transformar *A. tumefaciens* (linhagem GV3101) e posteriormente infiltradas em plantas WT, ecótipo Columbia-0 (Bechtold et al., 1993; Clough e Bent, 1998). O *cassete* continha também foi um gene marcador de resistência à higromicina com promotor *nos* e terminador *nos*, um promotor 35S e um terminador 35S. Como resultado, a transformação antisenso do gene *NDT2* gera um *amplicon* de 1092 pb.

2.2 Condições de cultivo

As sementes de todos os genótipos foram superficialmente esterilizadas e germinadas em meio MS (Murashige e Skoog, 1962) com metade da força iônica, suplementado com 1% de sacarose (p/v) e agente seletivo (sulfadiazina 5,25 mg/L ou higromicina 10 mg/L) de acordo com genótipo utilizado. Após quatro dias de estratificação a 4 °C, as placas com as sementes que foram utilizadas nas análises de tecidos autotróficos foram levadas para uma

câmara de crescimento à 22 ± 2 °C, umidade relativa de 60%, irradiância de 150 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 8 h de luz e 16 h de escuro, durante dez dias. Após este período, as plântulas obtidas foram transferidas para vasos de 0,08 dm^3 contendo substrato comercial Tropstrato HT[®] e mantidas nas mesmas condições por quatro semanas, onde foram então realizadas as análises fisiológicas e coletas de amostras em nitrogênio líquido para análises bioquímicas.

Para as análises de germinação e de perfil de ácidos graxos, as sementes foram esterilizadas e colocadas para germinar conforme descrito anteriormente. Porém, após o período de estratificação, as placas foram mantidas em sala de crescimento climatizada à 22 ± 2 °C, umidade relativa de 60%, irradiância de 150 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro.

2.3 Análise de expressão gênica

Foi analisada a expressão gênica das plantas mutantes e WT pela a técnica de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR). Para tal, inicialmente, extraiu-se o RNA total de flores utilizando-se o reagente TRIzol[®] (Invitrogen[™]) conforme indicações do fabricante. Em seguida, o RNA total foi submetido a tratamento com DNase/RNase-free (Invitrogen[™]), quantificado em espectrofotômetro a 260 nm e cerca de 2 μg do RNA isolado foi utilizado para sintetizar a fita de DNA complementar (cDNA) com o *kit* ImProm-II^(™) *Reverse Transcription System* (Promega, Brasil) e Oligo (dT)₁₅, seguindo as recomendações descritas no mesmo. Com o cDNA gerado, realizou-se as reações de qRT-PCRs utilizando-se o *kit* de amplificação Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Life Technologies/Applied Biosystem) nas recomendações do produto e o equipamento 7300 Real Time System (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). Para obter as amplificações, foram utilizados *primers* específicos para o gene *NDT2* (*forward* 5'-CGATGCCATGTTCCAACACTAC-3' e *reverse* 5'-CATCAAAAGGGCCAAAAGT-3') e como controle endógeno, para normalização dos valores da expressão gênica, os *primers* específicos para o gene que codifica a proteína GAPDH (*forward* 5'-TTGGTGACAACAGGTCAAGCA-3' e *reverse* 5'-AAACTTGTCGC TCAATGCAATC-3'). Foram coletadas todas as flores de seis plantas com um mês e meio de idade por genótipo e as amostras foram amplificadas em duplicata com as seguintes etapas: 94 °C por 10 min, seguidos de 40 ciclos de 94 °C por 15 s, 58 °C por 15 s e 72 °C por 15 s.

2.4 Análises de tecidos autotróficos

2.4.1 Determinação dos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* e trocas gasosas

Foram avaliados parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* de plantas com quatro semanas de idade, utilizando-se 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.) com câmara foliar de 2 cm² e mantendo-se a temperatura do equipamento a 25 °C e concentração ambiente de CO₂ (*C_a*) dentro da câmara de 400 μmol CO₂ mol⁻¹. Inicialmente, após 1 h do início do período luminoso, curvas de resposta de taxa de assimilação líquida de CO₂ (*A*) à radiação fotossinteticamente ativa (*A/RFA*) foram obtidas variando-se a *RFA* na sequência: 1000, 1200, 1000, 800, 400, 200, 100, 50, 25, 10 e 0 μmol fótons m⁻² s⁻¹. A partir de ajustes da curva de resposta à luz pelo modelo hiperbólico não-retangular foram estimadas variáveis derivadas das curvas *A/RFA*, tais como irradiância de compensação (*I_c*), de saturação (*I_s*), eficiência no uso da luz ($1/\phi$) e taxa de assimilação líquida de carbono saturada pela luz (*A_{RFA}*) (von Caemmerer, 2000).

Uma vez que a radiação de saturação foi próxima a 400 μmol fótons m⁻² s⁻¹ (Figura 2A), avaliou-se a *A* nesta radiação e nas mesmas condições descritas anteriormente. Também foi avaliada a respiração durante a noite (*R_d*) e a eficiência fotoquímica máxima do FSII (F_v/F_m), após 1 h de aclimação ao escuro. Para determinar a F_v/F_m foi aplicada uma irradiância de 0,03 μmol fótons m⁻² s⁻¹ para determinar a fluorescência inicial (*F₀*) e para obtenção da fluorescência máxima (*F_m*) um pulso saturante de 6000 μmol fótons m⁻² s⁻¹ foi aplicado por 0,8 s. A F_v/F_m foi então calculada como $(F_m - F_0)/F_m$. Procedeu-se ainda, à estimativa do *quenching* não fotoquímico (NPQ) e da taxa de transporte de elétrons (ETR), conforme descrito por DaMatta et al. (2002) e Lima et al. (2002).

Também foi estimada a taxa de fotorrespiração (*R_p*) pela fórmula: $R_p = ((1/12) \cdot (J_{flu} - (4 \cdot (A + R_d))))$, onde J_{flu} equivale a taxa de transporte de elétrons estimada por parâmetros de fluorescência (Valentini et al., 1995), e a eficiência instantânea (*A/E*) e intrínseca (*A/g_s*) do uso da água (EUA), onde *E* = transpiração e *g_s* = condutância estomática. Em todas estas análises foram avaliadas seis plantas por genótipo.

2.4.2 Análise de crescimento

Após as medições de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*, as plantas foram coletadas e os seguintes parâmetros de crescimento foram avaliados: massa seca da roseta (MSR), massa seca do sistema radicular (MSSR), razão raiz/parte aérea (RPA), área foliar da roseta (AR), área foliar específica da roseta (AER), número de folhas (NF), área foliar total (AFT) e área foliar específica (AFE). A AR e a AFT foram determinadas pelo método da imagem digital, onde as folhas foram digitalizadas com auxílio de um scanner (Hewlett Packard Scanjet G2410, Palo Alto, Califórnia, EUA) e as imagens obtidas processadas com auxílio do *software* Rosette Tracker (De Vylder et al., 2012). A AER e AFE foram estimadas utilizando a fórmula: AER (ou AFE) = AR (ou AF)/MSR.

2.4.3 Determinação da densidade estomática

A fim de determinar a densidade estomática (número de estômatos mm⁻²) das plantas com reduzida expressão de *NDT2* em comparação com o WT, foram retiradas impressões epidérmicas da superfície abaxial de uma folha completamente expandida de seis plantas por genótipo, utilizando-se um molde odontológico (Berger e Altmann, 2000). Sobre este molde foi colocada uma fina camada de uma base incolor (Von Groll et al., 2002) para formar uma fina película. Dez campos desta película foram analisados em microscópio (Zeiss modelo AX10) para a visualização da impressão das células. Posteriormente, estes campos foram fotografados utilizando-se uma câmera digital (AxioCamMRc) acoplada a microscópio e o número de células estomáticas determinado com auxílio do programa Axiovision 4.8.

2.4.4 Determinação de metabólitos

Plantas inteiras com quatro semanas de idade foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido às 8 h, 12 h e 16 h, correspondendo ao início, meio e fim do período luminoso, e às 24 h e 8 h que representam o meio e final do período de escuro. Posteriormente, as amostras foram maceradas e homogeneizadas em nitrogênio líquido e alíquotas de aproximadamente 20 mg de matéria fresca foram submetidas à extração etanólica conforme descrito por Gibon et al. (2004). Seguindo este protocolo, duas frações foram

obtidas: uma fração solúvel em etanol e outra insolúvel. Na fração solúvel quantificou-se os teores de clorofilas, nitrato (Sulpice et al. 2009) glicose, frutose e sacarose (Ferne et al., 2001), aminoácidos solúveis totais (Gibon et al., 2004) e ácidos orgânicos como malato e fumarato (Nunes-Nesi et al., 2007a) e na fração insolúvel determinaram-se os teores de amido e proteína (Gibon et al., 2004), utilizando-se um leitor de microplacas (OptiMax Tunable Microplate Reader). Posteriormente, foram calculadas as taxas de síntese do amido ((concentração de amido no final do período luminoso – concentração de amido no início do período de luminoso) / número de horas de luz) e de degradação do amido ((concentração de amido no final do período luminoso – concentração amido no final do período de escuro) / número de horas de escuro).

Também foi analisado o perfil metabólico das plantas coletadas as 12 h por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). Para tal, alíquotas de aproximadamente 25 mg de amostras foliares foram submetidas a extração a frio conforme protocolo descrito por Lisec et al. (2006) e alíquotas de 200 µL de cada amostra foram coletadas, secas a vácuo e armazenadas a -80 °C até o processo de derivatização. Posteriormente, amostras foram analisadas via GC-MS conforme protocolo descrito por Lisec et al. (2006) e a identificação dos metabolitos seguiu as recomendações de Ferne et al. (2011).

Além disso, alíquotas de aproximadamente 25 mg de amostras foliares também foram coletadas as 12 h e utilizadas para quantificar os nucleotídeos NAD⁺, NADH, NADP⁺ e NADPH, de acordo com o protocolo descrito por Schippers et al. (2008). Em todos os casos, foram utilizadas seis plantas inteiras por genótipo para a obtenção das alíquotas utilizadas nas extrações.

2.5 Análises de tecidos heterotróficos

2.5.1 Germinação de sementes e formação de plântulas normais

Sementes de plantas *ndt2:ndt2* e WT foram esterilizadas e colocadas para germinar conforme descrito no item 2.2. Posteriormente, foram avaliadas a percentagem de germinação, o índice de velocidade de germinação (IVG), a percentagem de plântulas normais

e anormais (incluindo plântulas albinas) e o índice de emergência (IVE). O IVG e o IVE foram calculados pelo somatório do número de sementes germinadas (ou plântulas normais) a cada dia, dividido pelo número de dias decorridos entre a semeadura e a germinação, de acordo com a fórmula de Maguire (1962). Foram realizadas seis repetições com 50 sementes cada.

2.5.2 Análise de perfil de ácidos graxos

O perfil de ácidos graxos foi determinado em sementes de plantas *ndt2:ndt2* e WT e plântulas com dois, quatro e seis dias após a estratificação. Para tal, os ácidos graxos foram extraídos e derivatizados conforme descrito por Browse et al. (1986) e analisados como metil-ésteres (FAMES). Posteriormente, o perfil de ácidos graxos foi analisado por espectrometria de massa acoplada a um cromatógrafo gasoso (*electron impact - time of flight - mass spectrometry*, GC-EI-TOF-MS), sendo o ácido graxo de 17:0 carbonos utilizado como padrão interno para possibilitar a quantificação. Os compostos foram identificados com base no tempo de retenção de cada composto e comparação do espectro de massas com espectros de referência disponíveis nas bibliotecas NIST 08 e NIST 08s. A quantificação relativa foi feita automaticamente pela integração dos picos cromatográficos obtidos (Bernhardt et al., 2012). Posteriormente, foi calculada a percentagem total de ácidos graxos e a percentagem de cada ácido graxo em comparação ao total para cada genótipo. Foram utilizadas três repetições por idade de coleta para cada genótipo.

2.6 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância segundo delineamento inteiramente casualizado. Os resultados foram avaliados pelo teste *t* de Student ($P < 0,05$).

3 RESULTADOS

Além da linhagem com inserção de T-DNA no gene *NDT2*, denominada *ndt2⁻:ndt2⁻* foram utilizadas linhagens antisense para *NDT2* sob o controle do promotor 35S (Figura 1A). Após a transformação, um total de 20 linhagens foram selecionadas em placas com higromicina e transferidas para vasos contendo substrato. Plantas destas linhagens transgênicas foram transferidas para sala de crescimento onde permaneceram até o final do ciclo. Devido a baixa expressão de *NDT2* em tecidos autotróficos (Palmieri et al., 2009), foram coletadas amostras de flores para a extração de RNA e análise da expressão de *NDT2*. Apenas linhagens com redução significativa na expressão de *NDT2* foram selecionadas para a realização deste trabalho (Figura 1B). A linhagem *ndt2⁻:ndt2⁻* apresentou apenas 45% da expressão de *NDT2* encontrada no WT, enquanto as linhagens antisense apresentaram 46%, 70% e 91% da expressão observada no WT, respectivamente (Figura 1B). Estas linhagens foram denominadas *as1-ndt2*, *as2-ndt2* e *as3-ndt2* (Figura 1A).

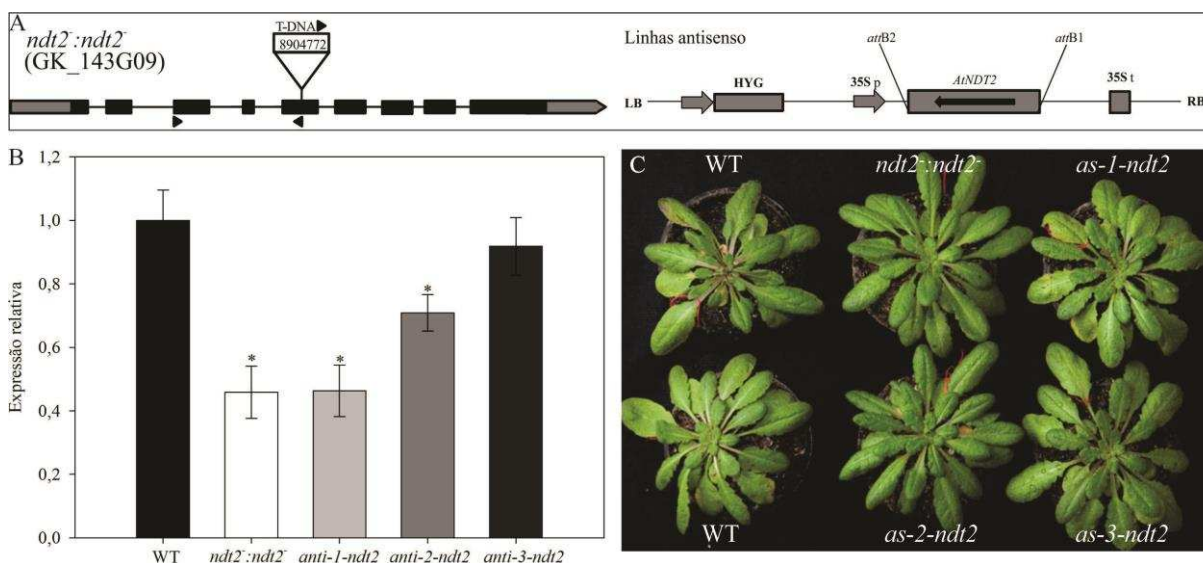


Figura 1. Isolamento e caracterização fenotípica de linhagens mutantes e antisense para o transportador mitocondrial de NAD (*NDT2*) em *Arabidopsis thaliana*. A, representação esquemática do gene *AtNDT2* (*At1g25380*), indicando a inserção do T-DNA. As caixas representam os éxons e as setas próximas ao T-DNA a posição dos primers usados na seleção das plantas mutantes. As linhagens antisense apresentam o gene de resistência à higromicina (HYG), o promotor 35S e o gene *NDT2* na orientação antisense e um terminador 35S. B, expressão de *NDT2* em flores completamente abertas de plantas de *Arabidopsis*, com um mês e meio de idade, tipo selvagem (WT), linhagem mutante e linhagens antisense. Os valores representam a média ± erro padrão de seis amostras independentes e os asteriscos indicam diferenças significativas pelo teste *t* de Student ($P < 0,05$) em comparação com o WT. C, caracterização fenotípica de genótipos de *Arabidopsis* com reduzida expressão de *NDT2*. As plantas avaliadas possuíam quatro semanas de idade.

3.1 Análises em tecidos autotróficos

Parâmetros de crescimento e trocas gasosas foram avaliados em plantas com quatro semanas de idade. A análise visual das plantas com baixa expressão de *NDT2* não revelou nenhum fenótipo aparente (Figura 1C). Entretanto, uma avaliação mais detalhada demonstrou que as plantas *ndt2⁻:ndt2⁻*, *as1-ndt2* e *as2-ndt2* apresentaram menor NF e maiores AFT e AR. Os demais parâmetros relacionados ao crescimento e partição da matéria seca, MSR, MSSR, RPA, AFE e ERA, não diferiram em relação o WT (Tabela 1).

Tabela 1: Parâmetros de crescimento de plantas de *Arabidopsis* com baixa expressão do transportador *NDT2*. As plantas avaliadas possuíam quatro semanas de idade

Parâmetro*	WT	<i>ndt2⁻:ndt2⁻</i>	<i>anti-1-ndt2</i>	<i>anti-2-ndt2</i>	<i>anti-3-ndt2</i>
MSR	90,0 ± 6,0	90,0 ± 3,0	90,0 ± 3,0	70,0 ± 1,5	90,0 ± 1,7
MSSR	20,0 ± 1,0	20,0 ± 1,0	20,0 ± 2,0	30,0 ± 6,0	30,0 ± 9,0
RPA	0,26 ± 0,02	0,26 ± 0,01	0,23 ± 0,02	0,25 ± 0,03	0,31 ± 0,34
NF	31,0 ± 1,2	26,3 ± 1,8	25,0 ± 1,1	25,3 ± 0,9	24,2 ± 0,6
AFT	34,5 ± 1,4	39,0 ± 1,4	38,5 ± 0,9	31,9 ± 1,4	42,5 ± 1,2
AFE	37,7 ± 3,3	43,6 ± 0,9	41,4 ± 1,4	41,4 ± 3,6	40,8 ± 2,8
AR	28,7 ± 1,3	34,2 ± 1,9	35,1 ± 0,7	30,1 ± 1,1	37,8 ± 2,3
AER	31,5 ± 3,1	38,3 ± 1,1	38,1 ± 1,6	38,1 ± 2,3	35,7 ± 2,7

Os valores representam a média ± erro padrão de seis amostras independentes; valores em negrito apresentam diferenças significativas pelo teste *t* de Student ($P < 0,05$) em comparação com o tipo selvagem (WT). Abreviações: *MSR: massa seca da roseta (mg), MSSR: massa seca do sistema radicular (mg), RPA: razão raiz/parte aérea, NF: número de folhas, AFT: área foliar total (cm²), AFE: área foliar específica (m² kg⁻¹), AR: área foliar da roseta (cm²), AER: área foliar específica da roseta (m² kg⁻¹).

Em relação aos parâmetros de trocas gasosas, verificou-se que plantas com baixa expressão de *NDT2* apresentaram menor *A*, incluindo os valores de fotossíntese em função da intensidade luminosa (*A/RFA*; Figura 2A, B). Quando as curvas foram ajustadas pelo modelo hiperbólico não-retangular, somente a irradiância de saturação foi menor estatisticamente em comparação com o WT. Os demais parâmetros derivados da curva, isto é, a taxa de assimilação líquida saturada pela luz (*A_{RFA}*), irradiância de compensação (*I_c*) e eficiência do uso da luz, determinada a partir do inverso do rendimento quântico aparente ($1/\Phi$) apresentaram uma leve redução em comparação com o WT (Tabela 2).

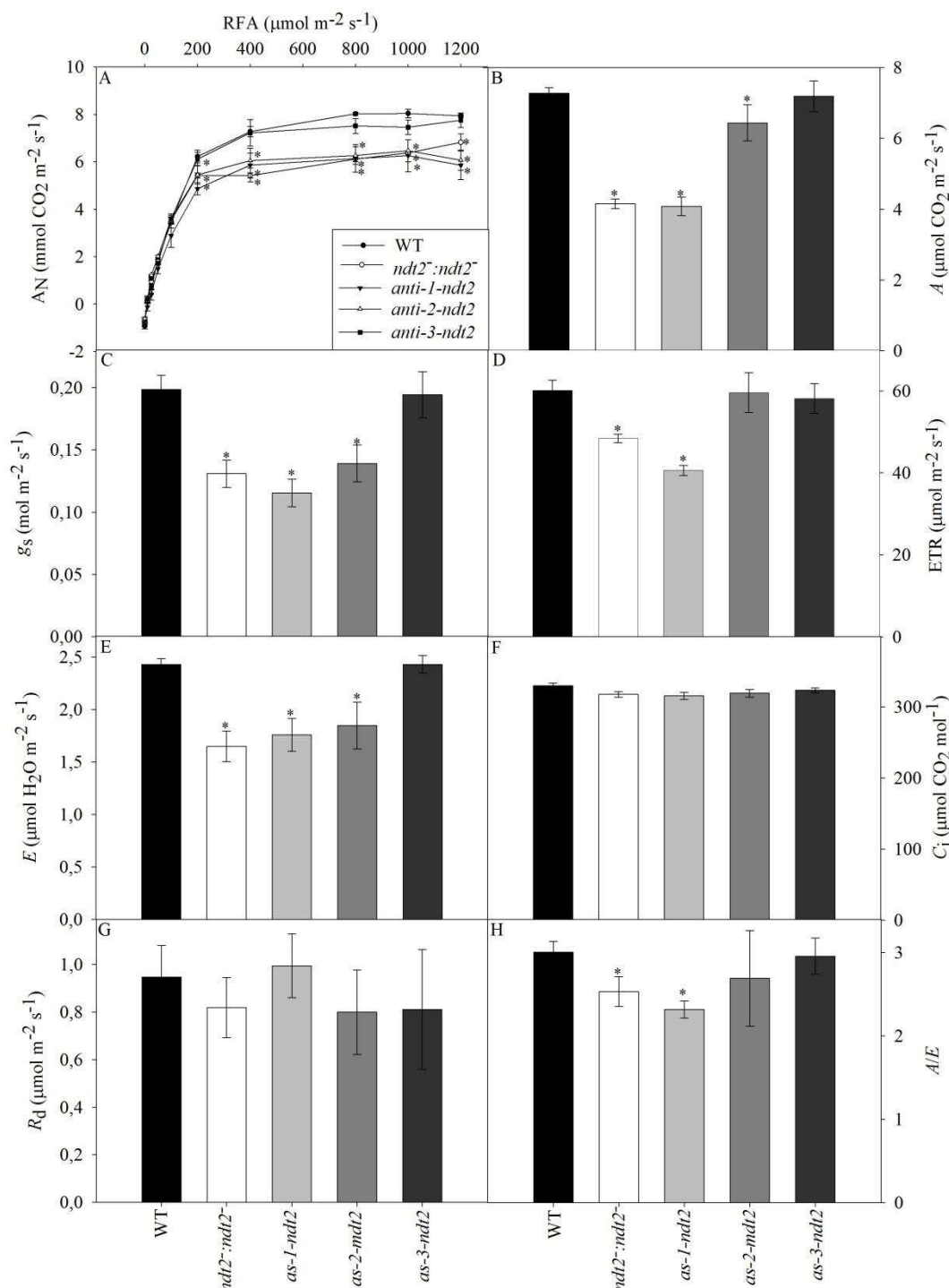


Figura 2. Efeito do decréscimo na expressão de *NDT2* nos parâmetros de trocas gasosas em folhas de plantas de *Arabidopsis* com quatro semanas de idade. A, curva de resposta da fotossíntese a alterações na radiação fotossinteticamente ativa (RFA). B, taxa de assimilação líquida de CO₂ (A) a uma radiação fotossinteticamente ativa (RFA) de 400 μmol de fótons m⁻²s⁻¹. C, condutância estomática (*g*_s). D, taxa de transporte de elétrons (ETR). E, transpiração (E). F, concentração interna de CO₂ (C_i). G, respiração no escuro (R_d). H, eficiência instantânea do uso da água (A/E). Valores representam a média ± erro padrão de seis plantas individuais e os asteriscos indicam diferença significativa (P < 0,05), segundo o teste *t* de Student, em comparação com o tipo selvagem.

Tabela 2: Parâmetros fotossintéticos derivados da curva de luz (Figura 2A) de plantas com baixa expressão de *NDT2*. As plantas avaliadas possuíam quatro semanas de idade

Parâmetros*	WT	<i>ndt2:ndt2</i>	<i>anti-1-ndt2</i>	<i>anti-2-ndt2</i>	<i>anti-3-ndt2</i>
A_{RFA}	7,26 ± 0,4	6,11 ± 0,1	6,13 ± 0,6	6,26 ± 0,4	7,21 ± 0,6
I_c	24,6 ± 3,4	21,7 ± 2,3	22,2 ± 1,5	21,6 ± 4,2	24,5 ± 2,6
I_s	265,5 ± 14,6	204,8 ± 1,3	169,3 ± 16,4	200,6 ± 10,3	233,0 ± 20,5
$1/\phi$	8,2 ± 0,9	5,1 ± 1,5	6,9 ± 0,6	8,5 ± 3,3	5,6 ± 0,5

Os valores representam a média de seis plantas ± erro padrão. Valores em negrito são significativos pelo test *t* de Student's ($P < 0.05$) em comparação com o tipo selvagem. Abreviações: * A_{RFA} : taxa de assimilação líquida de carbono saturada pela luz ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), I_c : irradiância de compensação ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), I_s : irradiância de saturação ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), $1/\phi$: eficiência no uso da luz ($\mu\text{mol fótons mol}^{-1} \text{ CO}_2$).

Em relação aos demais parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*, a g_s diminuiu consideravelmente em plantas *ndt2:ndt2*, *as1-ndt2* e *as2-ndt2*, assim como a taxa de transporte de elétrons (ETR) e a *E* (Figura 2C, D, E). Já a concentração interna de CO_2 (C_i , Figura 2F), a R_d (Figura 2G) e a R_p não sofreram alterações (Figura suplementar 1A). Por outro lado, plantas *ndt2:ndt2* e *as1-ndt2* apresentaram também menor eficiência instantânea do uso da água (Figura 2H), embora a eficiência intrínseca do uso da água (Figura suplementar 1B), o *quenching* não fotoquímico (NPQ; Figura suplementar 1C) e o F_v/F_m não tenham sofrido alterações (Figura suplementar 1D). Adicionalmente, foi avaliada a densidade estomática, a qual apresentou uma redução de cerca de 50% nas plantas *ndt2:ndt2* (Figura suplementar 2).

A fim de melhor compreender os efeitos da redução da expressão de *NDT2* em plantas de *Arabidopsis*, diferentes metabólitos relacionados ao metabolismo do nitrogênio e do carbono foram quantificados. A concentração de clorofila *a* diminuiu em plantas *ndt2:ndt2* e *as1-ndt2* (Figura 3A) enquanto que a concentração de clorofila *b* aumentou (Figura 3B), consequentemente verificou-se uma redução na relação clorofila *a/b*, significativa nas plantas *ndt2:ndt2* e *as1-ndt2* (Figura 3D). Por outro lado, a concentração total de clorofila (*a + b*) não variou em relação ao WT (Figura 3C).

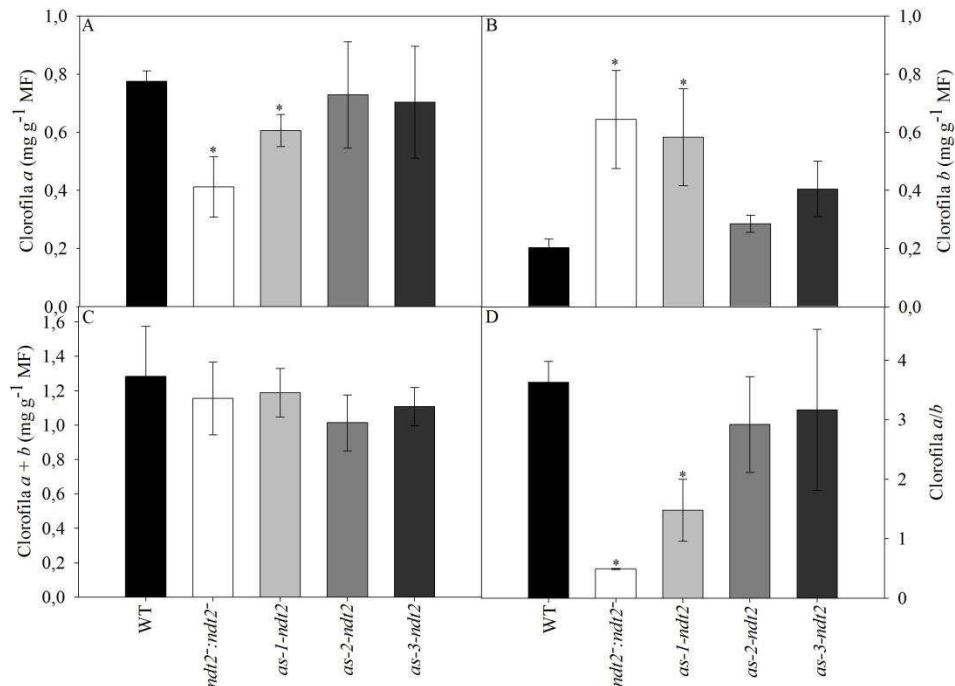


Figura 3: Efeito da redução da expressão de *NDT2* na concentração de clorofilas de plantas de *Arabidopsis* coletadas ao meio do dia. A, clorofila *a*. B, clorofila *b*. C, clorofila *a* + *b*. D, Relação clorofila *a/b*. Valores representam a média \pm erro padrão de seis plantas individuais e os asteriscos indicam diferença significativa ($P < 0,05$), segundo o teste *t* de Student, em comparação com o tipo selvagem.

Em relação aos compostos pertencentes ao metabolismo do carbono, houve um grande declínio na concentração de amido ao longo de todo o dia de plantas *ndt2⁻:ndt2⁻*, *as1-ndt2* e *as2-ndt2* (Figura 4A). De forma semelhante, a taxa de síntese e a taxa de degradação também diminuíram nestas mesmas linhagens (Figura 4B, D). Porém, não houve alteração nos níveis de glicose (Figura 4C), frutose (Figura 4E) e sacarose (Figura 4F) em todas as linhagens com reduzida expressão de *NDT2*. Já as concentrações dos ácidos orgânicos malato e fumarato aumentaram nas linhagens transgênicas em relação ao WT, apresentaram um aumento às 16:00 h (final do dia; Figura 4G, H). Não foram observadas alterações significativas na quantificação dos compostos pertencentes ao metabolismo do nitrogênio como nitrato e aminoácido (Figura suplementar 3A e B), embora tenha-se observado uma redução no teor de proteína das plantas *ndt2⁻:ndt2⁻*, *as1-ndt2* e *as2-ndt2* no meio do período noturno (Figura suplementar 3C).

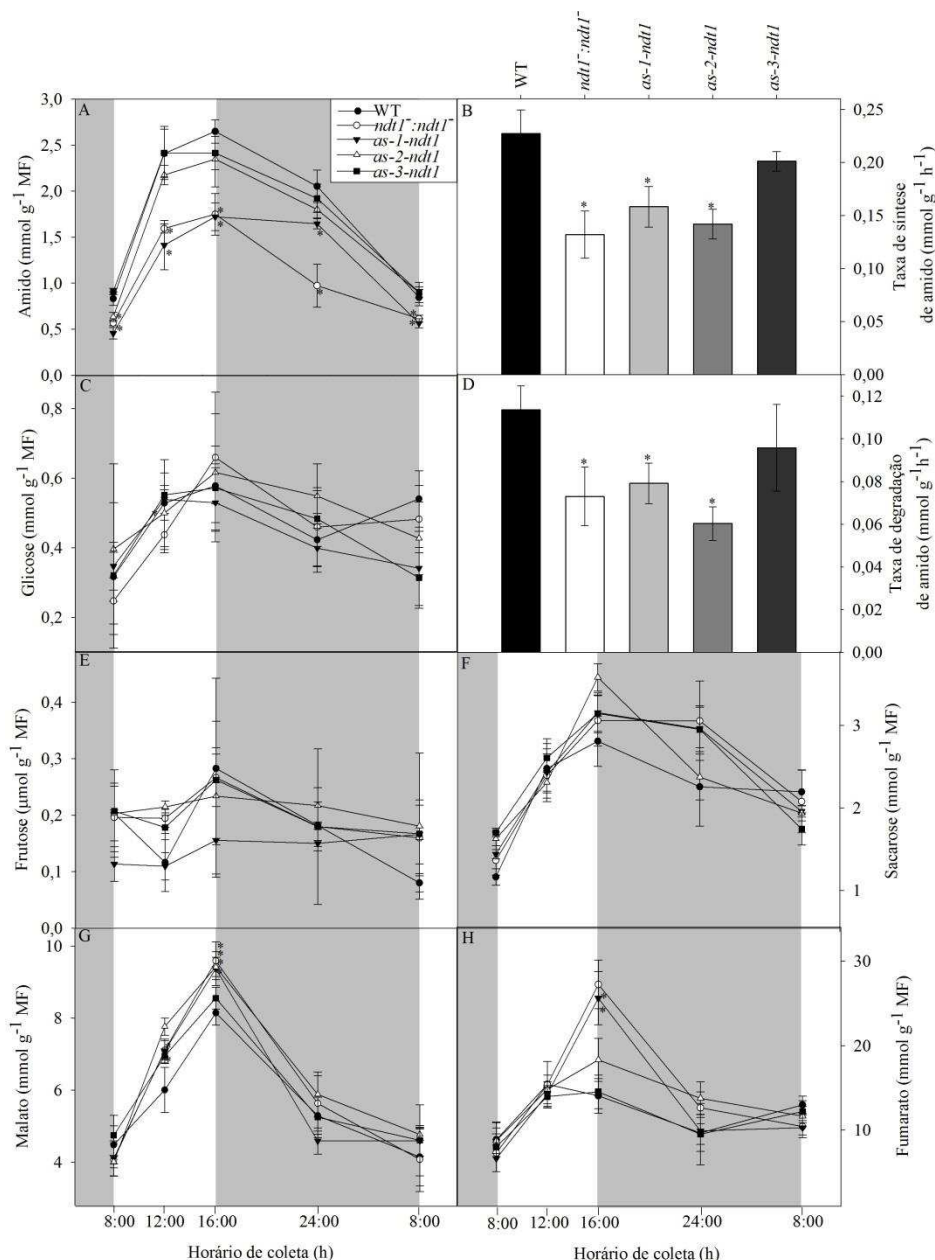


Figura 4: Variação nos níveis de metabólitos em folhas de *Arabidopsis* com reduzida expressão de *NDT2*, em plantas com quatro semanas de idade. A, teores de amido. B, taxa de síntese do amido. C, glicose. D, taxa de degradação do amido. E, frutose. F, sacarose. G, malato. H, fumarato ao longo do dia. Valores representam a média \pm erro padrão de seis plantas individuais e os asteriscos indicam diferença significativa ($P < 0,05$), segundo o teste *t* de Student, em comparação com o tipo selvagem. Áreas cinza nos gráficos representam o período de escuro. MF: massa fresca.

Para uma caracterização mais completa das alterações metabólicas ocorridas em planta com baixa expressão de *NDT2*, realizou-se uma análise de perfil metabólico por GCMS. Esta análise permitiu a quantificação de 46 metabólitos. De forma geral, houve alteração na concentração de aminoácidos e ácidos orgânicos nas plantas *ndt2:ndt2* e *as-1-ndt2* (Figura

5). Verificou-se que estas plantas apresentaram aumento nos níveis de alanina, glutamina, treonina e ascorbato enquanto que as concentrações de leucina, tirosina, triptofano, rafinose, ácido indol-3-acetonitrila e succinato diminuíram. Plantas *ndt2:ndt2* exibiram também aumento nos níveis de prolina, citrato, desidroascorbato dímero e sacarose. Já plantas *as-2-ndt2* tiveram as concentrações de glutamato, glutamina, frutose, psicose, sorbose e mio-inositol aumentadas. Plantas *as-3-ndt2* por sua vez apresentaram aumento nos níveis de frutose e psicose.

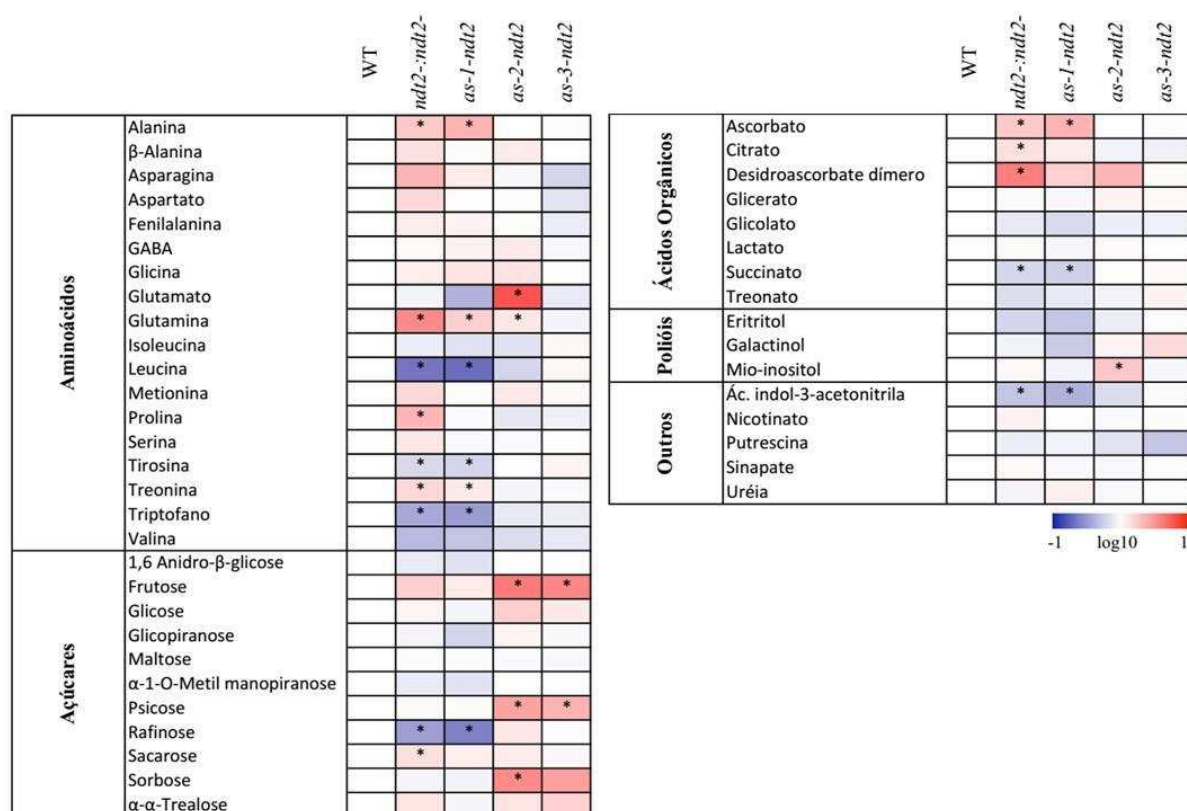


Figura 5: Heat map representando as alterações na quantidade relativa de metabólitos de folhas coletadas em plantas de *Arabidopsis* com baixa expressão do transportador NDT2 no meio do período luminoso, na quarta semana de crescimento. Os metabólitos foram determinados como descrito em “Material e Métodos” e os dados normalizados com base nas médias do tipo selvagem. Os valores representam a média de seis replicatas biológicas e os asteriscos indicam diferença significativa ($P < 0,05$), segundo o teste *t* de Student, em comparação com o tipo selvagem. Abreviação: ácido amino butírico (GABA).

Também foram determinados os nucleotídeos NAD^+ , $NADH$, $NADP^+$ e $NADPH$ na roseta inteira coletada ao meio do dia. De forma geral, não houve alterações na quantificação dos nucleotídeos nem nas razões $NADH/NAD^+$ e $NADPH/NADP^+$, apenas é possível

observar um aumento significativo na concentração de NADP⁺ em plantas *ndt2⁻:ndt2⁻* (Figura 6).

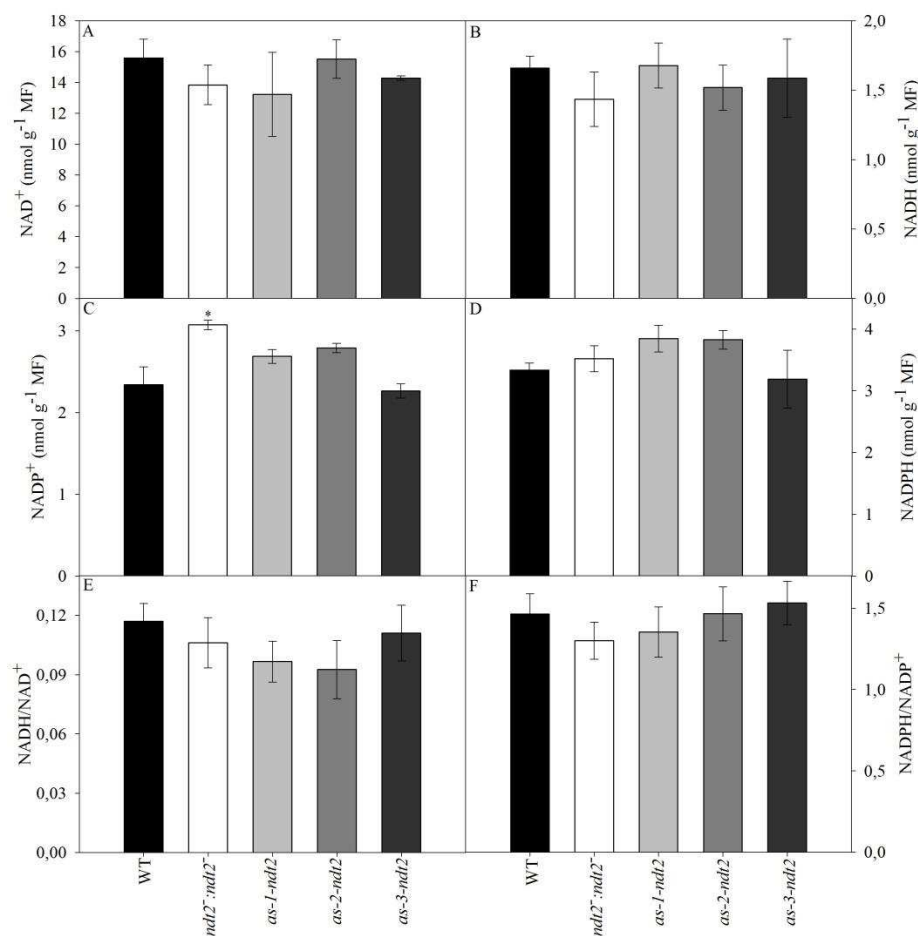


Figura 6. Nucleotídeos de piridina e suas razões em folhas de *Arabidopsis* com reduzida expressão de *NDT2*, coletadas no meio do período de luz, em plantas com quatro semanas de idade. A, NAD⁺. B, NADH. C, NADP⁺. D, NADPH. E, NADH/NAD⁺. F, NADPH/NADP⁺. Valores representam a média ± erro padrão de seis plantas individuais e os asteriscos indicam diferença significativa ($P < 0,05$), segundo o teste *t* de Student, em comparação com o tipo selvagem. MF: massa fresca.

3.2 Análises em tecidos heterotróficos

Uma vez que Palmieri e colaboradores (2009) observaram que o promotor de *NDT2* apresentou elevada expressão de *GUS* em plantas *Atndt2-promotor-GUS* em tecidos em desenvolvimento e em células com alta atividade metabólica, analisou-se a germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas *ndt2⁻:ndt2⁻*. Observou-se que plantas *ndt2⁻:ndt2⁻* possuem menor percentagem de germinação e menor percentagem de plântulas normais

(Figura 7A, B). Além disso, 15% das sementes germinadas originaram plântulas albinas (Figura 7C) que ao longo do seu crescimento adquiriram coloração esverdeada. A germinação e formação das plântulas *ndt2⁻:ndt2⁻* também ocorreu de forma mais lenta do que as WT, uma vez que os valores de IVG e IVE diminuíram (Tabela 3).

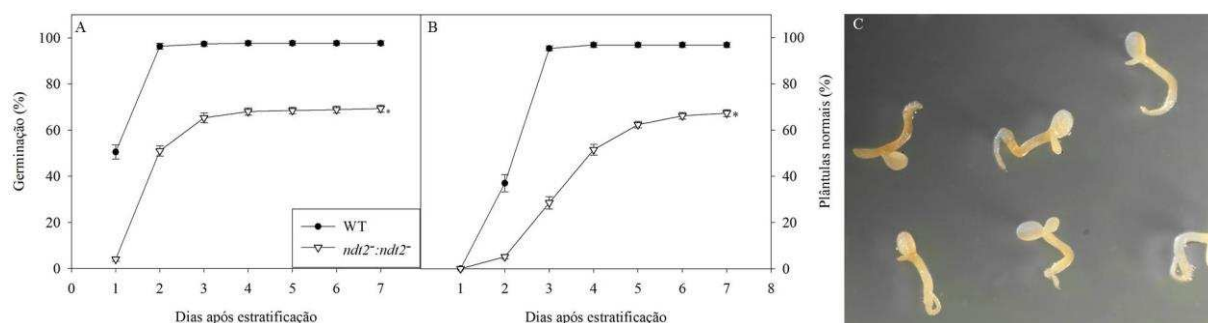


Figura 7: Germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas obtidas a partir plantas de *Arabidopsis* com baixa expressão de *NDT2*. A, percentual de germinação em meio com sacarose. B, percentual de plântulas normais desenvolvidas. C, plântulas albinas. Valores representam a média \pm erro padrão de seis placas com 50 sementes cada por genótipo e os asteriscos indicam diferença significativa ($P < 0,05$), segundo o teste *t* de Student, em comparação com o tipo selvagem.

Tabela 3: Índice de velocidade de germinação (IVG) e de velocidade de emergência (IVE) de plântulas com reduzida expressão de *NDT2*

Genótipo	IVG	IVE
WT	50,1 \pm 1,5	17,2 \pm 0,4
<i>ndt2⁻:ndt2⁻</i>	17,2 \pm 0,6	6,7 \pm 0,3

Os valores representam a media cada \pm erro padrão de seis placas com 50 sementes cada por genótipo. Valores em negrito são significativos pelo teste *t* de Student's ($P < 0,05$) em comparação com o tipo selvagem.

Uma vez que a baixa expressão de *NDT2* promoveu alterações na germinação e no desenvolvimento de plântulas, foi realizado o perfil de ácidos graxos em sementes e plântulas com dois, quatro e seis dias após a estratificação. Quando analisamos as sementes, observou-se que os ácidos graxos 16:0, 18:0, 20:1a, 20:0, 22:1 e 24:1 aumentaram enquanto 17:0, 18:2 diminuíram. Apesar destas alterações, a concentração total de ácidos graxos analisados não variou (Figura 8A, A', A'').

Em plântulas com dois dias após a estratificação não foram observadas alterações em nenhum dos FAMES analisados e na concentração total de ácidos graxos (Figura 8B, B', B'').

Entretanto em plântulas com quatro dias após a estratificação, verificou-se uma diminuição na concentração de FAMES de menor número de carbonos, como 16:3, 16:1, 17:0, 18:3 e 18:2 e aumento nos teores dos FAMES com maior número de carbonos, como 14:0, 18:1, 18:0, 20:1a, 20:0, 22:1 e 24:1 (Figura 8C, C'). A concentração total dos ácidos graxos analisados também aumentou nestas plântulas (Figura 8C''). Em plântulas com seis dias após a estratificação pequenas alterações no conteúdo de FAMES foram observadas. Verificou-se apenas um aumento no 14:0 e 18:1 e uma diminuição nos FAMES 16:3 e 16:1 carbonos (Figura 8D, D'). Como observado anteriormente, a concentração total dos ácidos graxos quantificados também não apresentou diferença estatística em comparação com o WT (Figura 8D'').

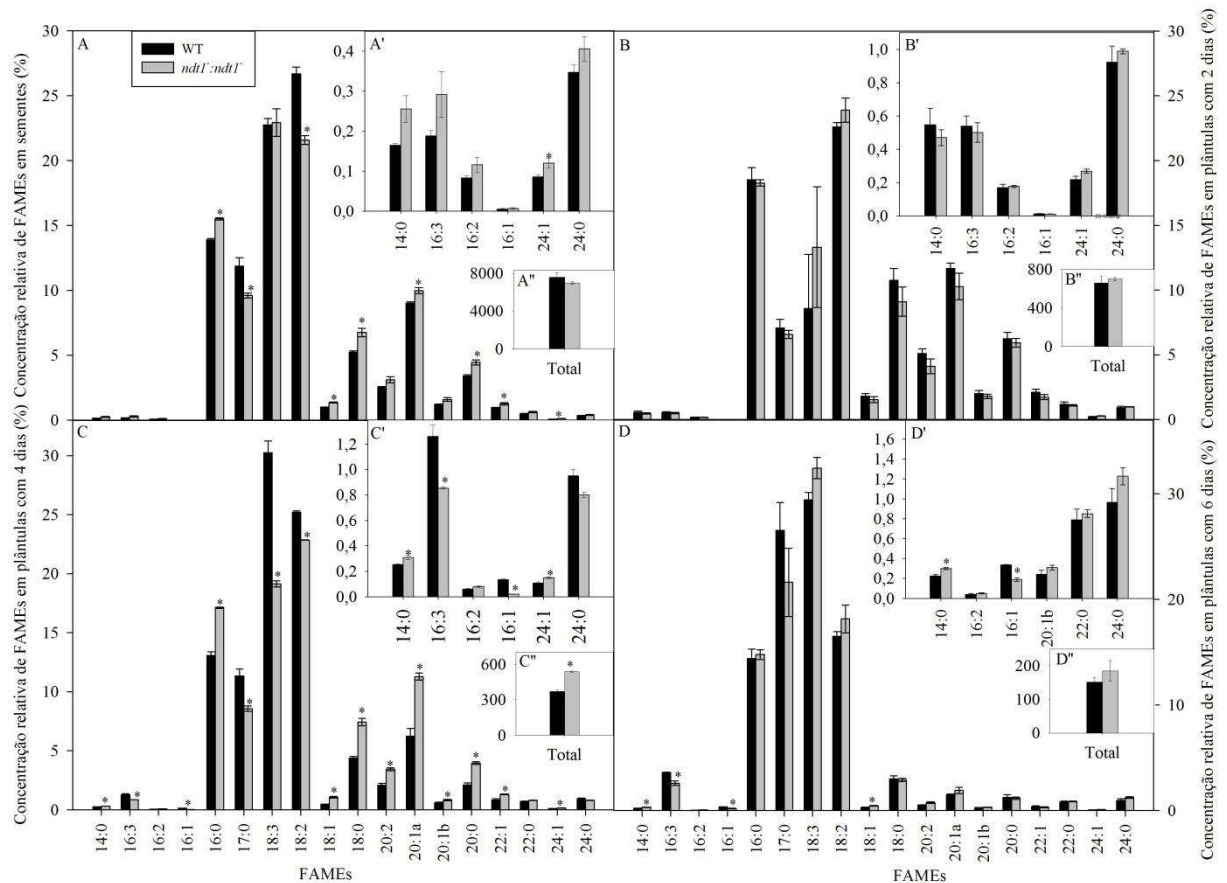


Figura 8: Concentração relativa de ácidos graxos analisados como metil-ésteres (FAMES) em sementes e plântulas com baixa expressão de *NDT2*. A, sementes secas. B, plântulas com dois dias após a estratificação. C, plântulas com quatro dias após a estratificação. D, plântulas com seis dias após a estratificação. Valores representam a média \pm erro padrão de três amostras individuais. Asteriscos indica diferença significativa ($P < 0,05$), segundo o teste *t* de Student, em comparação com o tipo selvagem.

4 DISCUSSÃO

4.1 Efeitos da redução na expressão de *NDT2* em tecidos autotróficos de *Arabidopsis thaliana*

As mitocôndrias são organelas fundamentais na manutenção da homeostase redox e da sinalização celular. Recentemente, tem se verificado a integração entre o metabolismo mitocondrial e o cloroplastídico (Noctor et al., 2007; Nunes-Nesi et al., 2007a, Nunes-Nesi et al., 2011; Araújo et al., 2012). No presente trabalho, embora não se tenha verificado alterações marcantes nas concentrações de NAD(H) e NADP(H) (Figura 6), várias alterações metabólicas foram observadas tanto em tecidos autotróficos quanto em heterotróficos. Verificou-se também que a baixa expressão de *NDT2* promoveu alterações fisiológicas significativas com efeitos sobre a fotossíntese.

Diferentes mecanismos que relacionam o metabolismo mitocondrial e cloroplastídico têm sido descritos, sendo o mais comum deles, as variações na homeostase redox. Estas alterações podem ocorrer por diferentes caminhos como, por exemplo, via malato desidrogenases (MDH), lançadeira de malato, oxidase alternativa (AOX), entre outros (Scheibe et al., 2005; Nunes-Nesi et al., 2007a). Alterações no estado redox iniciam cascatas de transdução de sinais, levando a alterações na expressão de certos genes do cloroplasto ou do núcleo e com isso alterações na fotossíntese e no desenvolvimento vegetal (Scheibe et al., 2005). Plantas *ndt2⁻:ndt2⁻* apresentaram alterações em seu estado redox, com elevação nos níveis de NADP⁺ (Figura 6C). Isso é um indicativo de que o NADP⁺ não está sendo reduzido durante a fase fotoquímica da fotossíntese, o que é condizente com a menor taxa fotossintética encontrada nestas plantas. Além disso, o estado redox do NADP(H) pode regular mecanismos que diminuem a eficácia da captura de luz e restringir as taxas de transporte de elétrons quando a intensidade luminosa excede a capacidade metabólica (Foyer e Noctor, 2009). Isso corrobora a menor irradiância de saturação (I_s) encontrada para plantas com baixa expressão de *NDT2* (Tabela 2).

A I_s reflete os valores máximos de radiação solar aos quais as folhas de uma planta foram expostas durante o seu desenvolvimento. Assim, é possível que, devido às modificações no estado redox causadas pela diminuição da expressão de *NDT2*, estas plantas regulem sua eficiência na captura de luz e, portanto tenham uma I_s menor. De forma semelhante, alterações redox contribuíram para a diminuição da ETR (Figura 2D) e do

conteúdo de clorofila *a* (Figura 3A), de modo a evitar que o excesso de excitação causasse danos ao fotossistema (PSII) e a geração de espécies reativas de oxigênio (Lemos-Filho, 2000). Em contrapartida, estas alterações regulatórias levaram a uma redução da fotossíntese. Mecanismos pelos quais alterações mitocondriais influenciam taxas fotossintéticas têm sido alvo de muitos estudos (Nunes-Nesi et al., 2007a; van Dongen et al., 2011; Araújo et al., 2012). A superexpressão da AOX em condições de seca, por exemplo, atua como uma fonte alternativa de perda de poder redutor, prevenindo seu acúmulo e a possibilidade de diminuição da fotossíntese (Bartoli et al., 2005). Semelhantemente, mitocôndrias são capazes de oxidar o excesso de poder redutor fotossintético em condições de frio e excesso de luminosidade (Hurry et al., 1995; Atkin et al., 2000). Além disso, inibidores do citocromo e de vias alternativas acarretam um forte declínio da taxa fotossintética (Krömer et al., 1993), indicando o papel destes caminhos na proteção da fotossíntese contra fotoinibição (Saradadevi e Raghavendra, 1992). Assim, não é surpresa que a redução na expressão de *NDT2* tenha causado impactos na fotossíntese.

Por outro lado, a redução da taxa fotossintética encontrada em plantas *ndt2:ndt2*, *as1-ndt2* e *as2-ndt2* também foi causada por alterações de origem estomática uma vez que apresentam diminuição da g_s (Figura 2C), de cerca de 50% da densidade estomática (Figura suplementar 2) e da eficiência instantânea do uso da água (Figura 2H). De acordo com Hashida et al (2010), existe um fino equilíbrio da atividade de células guarda funcionais e respostas às variações redox e eventos de sinalização de movimentos estomáticos. Estes autores também descrevem que muitos genes da biossíntese do NAD, especialmente o que codifica a enzima nicotinato/nicotinamina mononucleotídeo adeniltransferase (NMNAT) estão presentes em células guarda, e que a formação de ácido abscísico (ABA) induzido por espécies reativas de oxigênio (ERO), que atua como um sinal para o fechamento estomático, é acompanhada por um forte decréscimo nos níveis de NAD e aumento nos níveis de NADP. Assim, é razoável supor que a baixa expressão de *NDT2* cause alterações na densidade estomática e na g_s . A redução da condutância estomática diminui a perda de água pelas folhas e restringe a entrada de CO₂ nestes órgãos, o que diminui a assimilação fotossintética de carbono. Além disso, a densidade estomática e a g_s são positivamente correlacionadas à eficiência do uso da água (Xu e Zhou, 2008). A g_s também pode ser associada aos níveis de fumarato e malato. Plantas transgênicas de tomate com inibição antisense da subunidade ferro-enzofre da succinato desidrogenase (SDH) ou da fumarase possuem elevação nas

concentrações de ácidos orgânicos e correlação negativa entre os níveis de fumarato e malato e a g_s (Nunes-Nesi et al., 2007b; Araújo et al., 2011).

Estes resultados são semelhantes aos encontrados em trabalhos com o mutante CMS, que é macho-estéril devido à mutação no gene *NAD7* que codifica uma subunidade do Complexo I mitocondrial (NADH:ubiquinona oxidoreductase; Sabar et al., 2000; Dutilleul et al., 2003). Segundo os autores, mutantes *nad7* não apresentam variação na R_d , mas mostraram diminuição na A e na g_s . Neste caso, a menor A foi correlacionada com uma redução da g_s devido ao fato de a energia requerida para o movimento estomático pode ser provida pela mitocôndria, já que células guarda possuem alta atividade respiratória (Parvathi e Raghavendra, 1995). Além disso, o controle mitocondrial indireto da entrada de CO_2 não excluem interações diretas entre fotossíntese e respiração por redução de poder redutor e metabólitos (Sabar et al., 2000). Assim, estes trabalhos corroboram os resultados encontrados neste estudo de que alterações no estado redox mitocondrial podem causar alterações na g_s e consequentemente na A .

Interessantemente, apesar destes resultados encontrados e do fato de plantas com reduzida expressão de *NDT2* apresentarem menor número de folhas, ocorreu um aumento na área foliar e a área foliar da roseta (Tabela 1). O incremento da área foliar pode ser atribuído tanto a aumento no número de células quanto ao maior volume celular (Fanh et al., 1990). Embora estes sejam controlados geneticamente, o ambiente pode exercer forte pressão e alterar este padrão (Xu e Zhou, 2008), assim como a proliferação celular e a atividade do meristema apical radicular e da parte aérea são sensíveis a variações no estado redox (Sagi et al., 2004). A literatura sugere que o controle do crescimento por alterações redox envolva uma rede de interações entre EROs, antioxidantes e hormônios, como auxinas e citocininas, que são os maiores reguladores do ciclo de vida vegetal, especialmente da expansão celular e da transição entre a proliferação celular e a diferenciação em outros órgãos (Considine e Foyer, 2014). Além disso, alterações nas concentrações de metabólitos relacionados ao metabolismo primário, como por exemplo a sacarose, pode levar a alterações nos níveis de NADP(H) em hastes de *Arabidopsis*, e afetar a expressão de diferentes genes meristemas (Bernier e Perilleux, 2005; Liu et al., 2009). Assim, tanto a redução na expressão de *NDT2* quanto as alterações redox verificadas em plantas com baixa expressão do transportador cloroplastídico de NAD (*NDT1*), podem ter promovido alterações no meristema apical, que promoveram variações do número de folhas e no incremento da área foliar destas plantas. Embora os

mecanismos e componentes envolvidos no controle redox do crescimento ainda permaneçam por serem elucidados, os dados encontrados aqui evidenciam que o transporte de NAD exerce papel fundamental neste processo.

Apesar do aumento na área foliar, a fotossíntese das plantas com reduzida expressão de *NDT2* diminuiu e isto levou a alterações nas concentrações de metabólitos. A concentração de amido foi menor ao longo de todo o dia nas plantas *ndt2⁻:ndt2⁻* e *as1-ndt2* (Figura 4A). A síntese de amido é limitada pela luz e pelo CO₂ e se correlacionam com a taxa fotossintética (Weise et al., 2011), isto é, a redução na fotossíntese promoveu os baixos teores de amido e as menores taxas de síntese e de degradação do amido encontrados nestas plantas. Entretanto, cabe ressaltar que além das menores taxas fotossintéticas, a ativação da ADP-glicose fosforilase (AGPase) pode ter sido alterada pelo estado redox no cloroplasto. A síntese do amido é regulada pelo transporte e metabolismo de adenilatos, pela reação catalisada pela AGPase e pela enzima málica mitocondrial dependente de NAD (NAD-ME; Jenner et al., 2001; Geigenberger, 2011). Tem-se observado que alterações na atividade de enzimas do ciclo TCA podem promover alterações na biossíntese de amido em função de alterações nas concentrações de malato e fumarato (Centeno et al., 2011). No presente trabalho verificou-se que a redução na expressão de *NDT2* promove aumento nos níveis de malato e fumarato, que são consideradas moléculas de armazenamento transiente de carbono (Fahnenstich et al., 2007). De acordo com Centeno e colaboradores (2011), alterações no estado redox mitocondrial são transmitidas pelas células e tecidos adjacentes aos plastídeos via válvula de malato, conforme descrito por Scheibe (2004). O estado redox plastidial alterado resulta em diminuição da malato desidrogenase (MDH), aumento dos níveis de malato e menor estado ativado da AGPase. Isto diminui o conteúdo de amido e de açúcares solúveis. Assim, a baixa expressão de *NDT2* e o aumento nos níveis de NADP⁺, isto é, alterações no estado redox celular, podem ter ocasionado alterações na atividade da AGPase e consequentemente na concentração de amido.

Por outro lado, malato e fumarato podem servir como fontes de carbono para o ciclo TCA, a fim de manter a produção de energia (Fahnenstich et al., 2008). É o que ocorre, por exemplo, em mutantes *pgm1*, que não podem acumular amido. O carbono nestes mutantes é concentrado na forma de fumarato, servindo como um armazenamento temporário de carbono e com regulador do pH durante a assimilação de nitrato (Chia et al., 2000). Além disso, a síntese de amido é estimulada quando menos carbono é armazenado na forma de ácidos

orgânicos (Fahnenstich et al., 2008). Assim, além da diminuição na fotossíntese, a menor concentração de amido também pode ser devido ao acúmulo de malato e fumarato nas plantas com reduzida expressão de *NDT2* (Figura 4G, H) e aos aumentos dos outros ácidos orgânicos verificados na análise de perfil metabólico (Figura 5). Dessa forma, em resumo, a diminuição na concentração de amido em plantas com reduzida expressão de *NDT2* pode ser devido a três fatores: (i) a menor *A* e menor produção de trioses fosfatadas; (ii) à alterações no estado redox que levam a diminuição na atividade da AGPase ou (iii) ao acúmulo de malato e fumarato. De qualquer forma, fica claro que a importância do transportador *NDT2* nas concentrações de amido e ácidos orgânicos.

Mitocôndrias e cloroplastos trocam uma considerável variedade de metabólitos e energia entre si, de forma interconectada e interdependente (Foyer et al., 2012). Essas organelas cooperam na coordenação e regulação da fotossíntese, síntese de sacarose do amido e na assimilação do nitrogênio (Foyer et al., 2011) e participam ativamente em outros processos fundamentais como a fotorrespiração (Bauwe et al., 2010). Mitocôndrias também dissipam o excesso de equivalentes redutores produzidos pelos cloroplastos e vice versa e mutações em proteínas mitocondriais podem afetar processo cloroplastídicos (Carrari et al 2003; Dutilleul et al., 2003; Nunes-Nesi et al., 2005; Sweetlove et al., 2006; Noguchi e Yoshida, 2008). Assim, uma vez que não foram verificadas alterações na R_d (Figura 2G) a redução da expressão de *NDT2* exerce maior influência em processos cloroplastídicos do que em mitocondriais.

4.2 Efeitos da baixa expressão de *NDT2* sobre tecidos e órgãos heterotróficos

A germinação de sementes e o estabelecimento de plântulas estão associados à degradação e mobilização de reservas acumuladas na semente durante a maturação (Fait et al., 2006; Graham et al., 2008). Entretanto, estudo sugere que a germinação de sementes em mutantes deficientes no conteúdo lipídico de reservas é muito fracamente afetada (Penfield et al., 2005). Isso indica que os processos que regem a germinação são muito complexos, não sendo apenas influenciados pelo acúmulo de reservas durante o desenvolvimento da semente, mas também por outros fatores (Penfield et al., 2005). No presente trabalho verificou-se que a redução na expressão de *NDT2* causa diminuição e atraso na germinação das sementes e na formação de plântulas normais (Figura 7, Tabela 3) embora o conteúdo lipídico nas sementes

tenha sido muito pouco afetado (Figura 8A). Análises *in silico* estão de acordo com estes resultados uma vez que revelam que o gene para este transportador possui alta expressão em sementes maduras (Figura suplementar 4).

A relação do metabolismo do NAD com a germinação das sementes e desenvolvimento das plântulas tem sido investigada (Hunt et al., 2007; Hunt e Gray, 2008). Sementes maduras possuem relativamente altos níveis do gene *NIC2* que codifica a enzima nicotinamidase, uma importante enzima da via da síntese de *salvamento* de NAD⁺. Mutantes para esta enzima possuem germinação menor e mais lenta indicando que alterações na concentração de NAD em sementes provavelmente afetam reações dependentes do NAD que são necessárias para a germinação (Hunt et al., 2007). Assim, é esperado que a redução na importação de NAD⁺ pela mitocôndria e alterações no potencial redox na célula acarrete consequências marcantes sobre a germinação de sementes e desenvolvimento das plântulas. Embora sem considerar compartimentalização subcelular do NAD, tem-se verificado correlação entre os níveis de NAD e a dormência profunda de sementes (Hunt e Gray, 2008). Aparentemente, a germinação está relacionada com a presença de mecanismo que regule a concentração de NAD ou a relação NAD/NADP de modo a ajustar o equilíbrio entre a biossíntese e o catabolismo de NADP (Hunt e Gray, 2008).

Genes que codificam enzimas que catabolizam NADP são desconhecidos, embora NAD cinases (NADK1, NADK2 e NADK3), que são enzimas de síntese de NADP, sejam bem conhecidos (Takahashi et al., 2009). NADK1 e NADK3 localizam-se no citosol enquanto NADK2 nos cloroplastos. Interessantemente, mutantes *nadk2* apresentam coloração muito pouco esverdeada e crescimento retardado (Chai et al., 2005; Takahashi et al., 2006). Curiosamente, a coloração de cerca de 15% das sementes *ndt2⁻: ndt2⁻* germinadas são completamente albinas. Embora a coloração seja adquirida poucos dias depois, uma das possibilidades para esse albinismo seria a influência do NAD ou da enzima NADK2.

Durante a germinação das sementes e estabelecimento de plântulas várias alterações ocorrem no metabolismo. Sementes maduras contêm baixos níveis de ATP, mas logo após o início da embebição, uma rápida produção de ATP é iniciada em associação com o aumento das trocas gasosas na semente (Benamar et al., 2008) bem como a transcrição de diferentes genes (Weitbrecht et al., 2011). Inicialmente, transcritos expressando genes das vias glicolítica, fermentativas e do ciclo TCA aumentam, enquanto genes relacionados à

gliconeogênese, síntese de sacarose, β -oxidação e ciclo do glioxilato são transcritos mais tardiamente, apenas na fase de estabelecimento de plântulas (Weitbrecht et al., 2011). Assim, é esperado que as principais alterações na concentração dos ácidos graxos ocorram ao longo da formação das plântulas com reduzida expressão de *NDT2*, especialmente aos quatro dias após a estratificação (Figura 8C). Os aumentos no conteúdo relativo de alguns ácidos graxos, especialmente a de ácido eicosanóico (20:1), que é considerado um marcador de armazenamento de triacilgliceróis em sementes de *Arabidopsis* (Lemieux et al., 1990), corroboram o atraso na formação das plântulas, uma vez que este retardo pode estar associado à β -oxidação. Durante este processo, ácidos graxos são metabolizados juntamente com a conversão de NADP^+ a NADPH e geração de ATP . Assim, quando há um acúmulo de ácidos graxos, significa que o processo ocorre mais tardiamente. Tanto o transportador cloroplastídico de NAD^+ (*NDT1*, em menor extensão) quanto o transportador peroxisomal de NAD^+ (*PXN*, em maior extensão) apresentam alterações similares no perfil de ácidos graxos aqui encontradas (Bernhardt et al., 2012 e Capítulo 1), evidenciando que provavelmente o transporte NAD^+ para o interior das organelas é imprescindível no processo. Além disso, de forma geral, a β -oxidação tardia tem sido correlacionada a outros fatores como uma dependência da germinação por sacarose e Coenzima A (Rubio et al., 2006). Entretanto, mais estudos ainda precisam ser realizados para comprovar as interações entre a β -oxidação e transporte de NAD^+ .

5 CONCLUSÃO

O transportador mitocondrial de NAD^+ (*NDT2*) está envolvido na regulação redox celular e no ajuste da fotossíntese e da biossíntese de amido. Alterações redox modulam também a concentração nível de ácidos orgânicos, especialmente malato e fumarato. Além disso, o transportador *NDT2* é essencial para β -oxidação de ácidos graxos e a deficiência do gene *NDT2* causa atraso na germinação de sementes e no estabelecimento de plântulas. Assim, o transportador *NDT2* é importante para o adequado crescimento e desenvolvimento vegetal.

6 AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), ao Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento do trabalho e bolsa concedida ao primeiro autor. À Franklin Magnum de Oliveira Silva pelo suporte nas avaliações bioquímicas realizadas neste trabalho.

7 REFERÊNCIAS

Araújo WL, Nunes-nesi A, Nikoloski Z, Sweetlove LJ, Fernie AR (2012) Metabolic control and regulation of the tricarboxylic acid cycle in photosynthetic and heterotrophic plant tissues. *Plant Cell Environ* **35**: 1-21

Araújo WL, Nunes-Nesi A, Osorio S, Usadel B, Fuentes D, Nagy R, Balbo I, Lehmann M, Studart-Witkowski C, Tohge T, Martinoia E, Jordana X, DaMatta FM, Fernie AR (2011) Antisense inhibition of the iron-sulphur subunit of succinate dehydrogenase enhances photosynthesis and growth in tomato via an organic acid-mediated effect on stomatal aperture. *Plant Cell* **23**: 600-627

Araújo WL, Ishizaki K, Nunes-Nesi A, Larson TR, Tohge T, Krahnert I, Witt S, Obata T, Schauer N, Graham IA, Leaver CJ, Fernie AR (2010) Identification of the 2-hydroxyglutarate and isovaleryl-CoA dehydrogenases as alternative electron donors linking lysine catabolism to the electron transport chain of Arabidopsis mitochondria. *Plant Cell* **22**: 1549-1563

Atkin OK, Millar AH, Gardeström P, Day DA (2000) Photosynthesis, carbohydrate metabolism and respiration in leaves of higher plants. In: Leegood RC, Sharkey TD, von Caemmerer S (eds) *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*, Vol. 9. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 153–185

Bartoli CG, Gomez F, Gergoff G, Guamet JJ, Puntarulo S (2005) Up-regulation of the mitochondrial alternative oxidase pathway enhances photosynthetic electron transport under drought conditions. *J Exp Bot* **56**:1269-1276

Bauwe H, Hagemann M, Fernie AR (2010) Photorespiration: players, partners and origin. *Trends Plant Sci* **15**: 330–336

Bechtold N, Ellis J, Pelletier G (1993) In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *Compt Rendus Acad Sci, Life Sci* **316**: 1194-1199

Benamar A, Rolletschek H, Borisjuk L, Avelange-Macherel MH, Curien G, Mostefai HA, Andriantsitohaina R, Macherel D (2008) Nitrite–nitric oxide control of mitochondrial respiration at the frontier of anoxia. *Biochim Biophys Acta* **1777**: 1268-1275

Berger D, Altmann T (2000) A subtilisin-like serine protease involved in the regulation of stomatal density and distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* **14**: 1119-1131

Bernhardt K, Wilkinson S, Weber APM, Linka N (2012) A peroxisomal carrier delivers NAD⁺ and contributes to optimal fatty acid degradation during storage oil mobilization. *Plant J* **69**: 1-13

Bernier G, Perilleux C (2005) A physiological overview of the genetics of flowering time control. *Plant Biotechnol J* **3**: 3-16

Browse J, McCourt PJ, Somerville CR (1986) Fatty acid composition of leaf lipids determined after combined digestion and fatty acid methyl ester formation from fresh tissue. *Anal Biochem* **152**: 141-145

Carrari F, Nunes-Nesi A, Gibon Y, Litovchenko A, Loureiro ME, Fernie AR (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

Centeno DC, Osorio S, Nunes-Nesi A, Bertolo ALF, Carneiro RT, Araújo WL, Steinhauser MC, Michalska J, Rohrmann J, Geigenberger P, Oliver SN, Stitt M, Carrari F, Rose JKC, Fernie AR (2011) Malate plays a crucial role in starch metabolism, ripening, and soluble solid content of tomato fruit and affects postharvest softening. *Plant Cell* **23**: 162-184

Chai MF, Chen QJ, An R, Chen YM, Chen J, Wang XC (2005) NADK2, an Arabidopsis chloroplastic NAD kinase, plays a vital role in both chlorophyll synthesis and chloroplast protection. *Plant Mol Biol* **59**: 553-564

Chia DW, Yoder TJ, Reiter WD, Gibson SI (2000) Fumaric acid: an overlooked form of fixed carbon in Arabidopsis and other plant species. *Planta* **211**: 743-751

Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: A simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**: 735-743

Considine MJ, Foyer CH (2014) Redox Regulation of Plant Development. Antioxid redox signal **21**: 1305-1326

DaMatta FM, Loos RA, Silva EA, Loureiro ME (2002) Limitations to photosynthesis in *Coffea canephora* as a result of nitrogen and water availability. *J Plant Physiol* **159**: 975-981

De Vylder J, Vandenbussche F, Hu Y, Philips W, Van Der Straeten D (2012) Rosette Tracker: an open source image analysis tool for automatic quantification of genotype effects. *Plant Physiol* **160**: 1149-1159

Duttilleul C, Driscoll S, Cornic G, De Paepe R, Foyer CH, Noctor G (2003) Functional mitochondrial complex I is required by tobacco leaves for optimal photosynthetic performance in photorespiratory conditions and during transients. *Plant Physiol* **313**: 264-275

Fahn A (1990) *Plant Anatomy*. 2nd edition. Butterworth Heinemann, Oxford, USA, 588p.

Fahnenstich H, Saigo M, Niessen M, Zanon MI, Andreo CS, Fernie AR, Drincovich MF, Flüggge UI, Maurino VG (2007) Alteration of organic acid metabolism in *Arabidopsis thaliana* overexpressing the maize C4-NADP-malic enzyme causes accelerated senescence during extended darkness. *Plant Physiol* **145**: 640-652

Fahnenstich H, Saigo M, Niessen M, Drincovich MF, Flüggge UI, Maurino VG (2008) Malate and fumarate emerge as key players in primary metabolism: *Arabidopsis thaliana* overexpressing C4-NADP-ME offer a way to manipulate the levels of malate and to analyse the physiological consequences. In: Allen JF, Gantt E, Golbeck JH, Osmond B (Eds.), *Photosynthesis Energy From the Sun*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, pp. 971-975

Fait A, Angelovici R, Less H, Ohad I, Urbanczyk-Wochniak E, Fernie AR, Galili G (2006) *Arabidopsis* seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. *Plant Physiol* **142**: 839-854

Fernie AR, Aharoni A, Willmitzer L, Stitt M, Tohge T, Kopka J, Carroll AJ, Saito K, Fraser PD, de Luca V (2011) Recommendations for reporting metabolite data. *Plant Cell* **23**: 2477-2482

Fernie AR, Roscher A, Ratcliffe RG, Kruger NJ (2001) Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose 6 phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta* **212**: 250-26

Foyer CH, Neukermans J, Queval G, Noctor G, Harbinson J (2012) Photosynthetic control of electron transport and the regulation of gene expression. *J Exp Bot* **63**: 1637-1661

Foyer CH, Noctor G (2009) Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid redox signal* **11**: 1305-1326

Foyer CH, Noctor G, Hodges M (2011) Respiration and nitrogen assimilation: targeting mitochondria-associated metabolism as a means to enhance nitrogen use efficiency. *J Exp Bot* **62**: 1467-1482

Fuentes D, Meneses M, Nunes-Nesi A, Araújo WL, Tapia R, Gomez I, Holuigue L, Gutierrez RA, Fernie AR, Jordana X (2011) A deficiency in the flavoprotein of *Arabidopsis* mitochondrial complex II results in elevated photosynthesis and better growth in nitrogen-limiting conditions. *Plant Physiol* **157**: 1114-1127

Geigenberger P (2011) Regulation of starch biosynthesis in response to a fluctuating environment. *Plant Physiol* **155**: 1566-1577

Geigenberger P, Fernie AR (2014) Metabolic control of redox and redox control of metabolism in plants. *Antioxid Redox Signal* **21**: 1389-421

Gibon Y, Blaesing OE, Hannemann J, Carillo P, Hohne M, Hendriks JHM, Palacios N, Cross J, Selbig J, Stitt M (2004) A robot-based platform to measure multiple enzyme activities in Arabidopsis using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and prolonged darkness. *Plant Cell* **16**: 3304-3325

Graham IA (2008) Seed storage oil mobilization. *Annu. Rev Plant Biol* **59**: 115-142

Hartley JL, Temple GF, Brasch MA (2000) DNA Cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res* **10**: 1788-1795

Hashida S, Itami T, Takahashi H, Takahara K, Nagano M, Kawai-Yamada M, Shoji K, Goto F, Yoshihara T, Uchimiya H (2010) Nicotinate/nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase-mediated regulation of NAD biosynthesis protects guard cells from reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal movement in Arabidopsis. *J Exp Bot* **61**: 3813-3825

Hashida S, Takahashi H, Uchimiya H (2009) The role of NAD biosynthesis in plant development and stress responses. *Ann Botany* **103**: 819-824

Hunt L, Gray JE (2008) The relationship between pyridine nucleotides and seed dormancy. *New Phytol* **181**: 62-70

Hunt L, Holdsworth MJ, Gray JE (2007) Nicotinamidase activity is important for germination. *Plant J* **51**: 341-351

Hurry VM, Tobiæson M, Krömer S, Gardeström P, Öquist G (1995) Mitochondria contribute to increased photosynthetic capacity of leaves of winter rye (*Secale cereal* L.) following cold-hardening. *Plant Cell Environ* **18**: 69-76

Jenner HL, Winning BM, Millar AH, Tomlinson KL, Leaver CJ, Hill SA (2001) NAD malic enzyme and the control of carbohydrate metabolism in potato tubers. *Plant Physiol* **126**: 1139-1149

Krömer S (1995) Respiration during photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **46**: 45-70

Laloi M (1999) Plant mitochondrial carriers: an overview. *CMLS, Cell Mol Life Sci* **56**: 918-944

Landy A (1989) Dynamic, structural, and regulatory aspects of Lambda site specific recombination. *Ann Rev Biochem* **58**: 913-949

Lemieux B, Miquel M, Somerville C, Browse J (1990) Mutants of Arabidopsis with alterations in seed lipid fatty-acid composition. *Theor Appl Genet* **80**: 234-240

Lemos-Filho JP (2000) Fotoinibição em três espécies do cerrado (*Annona crassifolia*, *Eugenia dysentericae* e *Campomanesia adamantium*) na estação seca e na chuvosa. *Rev Bras Bot* **23**: 45-50

Lima ALS, DaMatta FM, Pinheiro HA, Totola MR, Loureiro ME (2002) Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environ Exp Bot* **47**: 239-247

Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nat Protoc* **1**: 387-396

MAGUIRE JD (1962) Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Sci* **2**: 176-177

Liu Y-J, Nunes-Nesi A, Wallström SV, Lager I, Michalecka AM, Norberg FEB, Widell S, Fredlund KM, Fernie AR, Rasmusson AG (2009) A redox-mediated modulation of stem bolting in transgenic *nicotiana sylvestris* differentially expressing the external mitochondrial NADPH dehydrogenase. *Plant Physiol* **150**: 1248-1259

Maguire JD (1962) Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Sci* **2**: 176-177

Monné M, Palmieri F (2014) Antiporters of the mitochondrial carrier family. In Bevensee M. Exchangers. Vol. 73. Academic Press

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**: 473-497

Nelson DL, Cox MM (2012) *Lehninger Principles of Biochemistry*. WH Freeman, 1340 p

Noctor G, De Paepe R, Foyer CH (2007) Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. *TRENDS Plant Sci* **12**: 125-134

Noctor G, Queval G, Gakiere B (2006) NAD(P) synthesis and pyridine nucleotide cycling in plants and their potential importance in stress conditions. *J Exp Bot* **57**: 1603-162

Noguchi K, Yoshida K (2008) Interaction between photosynthesis and respiration in illuminated leaves. *Mitochondrion* **8**: 87-99

Nunes-Nesi A, Araújo WL, Fernie AR (2011) Targeting mitochondrial metabolism and machinery as a means to enhance photosynthesis. *Plant Physiol* **155**: 101-107

Nunes-Nesi A, Araújo WL, Obata T, Fernie AR (2013) Regulation of the mitochondrial tricarboxylic acid cycle. *Curr Opin Plant Biol* **16**: 1-9

Nunes-Nesi A, Carrari F, Gibon Y, Sulpice R, Lytovchenko A, Fisahn J, Graham J, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ, Fernie AR (2007b) Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. *Plant J* **50**:1093-1106

Nunes-Nesi A, Carrari F, Litovchenko A, Loureiro ME, Smith A, Ratcliffe G, Sweetlove L, Fernie AR (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, Sweetlove LJ, Fernie AR** (2007a) Operation and function of the tricarboxylic acid cycle in the illuminated leaf. *Physiol Plantarum* **129**: 45–56
- Oswald O, Martin, Dominy PJ, Graham IA** (2001) Plastid redox state and sugars: Interactive regulators of nuclear-encoded photosynthetic gene expression. *PNAS* **98**: 2047–2052
- Palmieri F, Pierri CL, De Grassi A, Nunes-Nesi A, Fernie AR** (2011) Evolution, structure and function of mitochondrial carriers: a review with new insights. *Plant J* **66**: 161-181
- Palmieri F, Rieder B, Ventrella A, Blanco E, Thi DP, Nunes-Nesi A, Trauth AU, Fiermonte G, Tjanden J, Agrimi G, Kirchberger S, Paradies E, Fernie AR, Neuhaus E** (2009) Molecular identification and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* mitochondrial and chloroplastic NAD⁺ carrier proteins. *J Biol Chem* **284**: 31249-31259
- Parvathi K, Raghavendra AS** (1995) Bioenergetic processes in guard cells related to stomatal function. *Physiol Plant* **93**: 146-154
- Penfield S, Graham S, Graham I** (2005) Storage reserve mobilization in germinating oilseeds: *Arabidopsis* as a model system. *Biochem Soc Trans* **33**: 380-383
- Picault N, Hodges, M, Palmieri L, Palmieri, F** (2004) The growing family of mitochondrial carriers in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* **9**: 138-146
- Ptashne M** (1992). A genetic switch: Phage (Lambda) and higher organisms. Cell Press, Cambridge, 92 p
- Rasmusson AG, Wallström SV** (2010) Involvement of mitochondria in the control of plant cell NAD(P)H reduction levels. *Biochem Soc Trans* **38**: 661-666
- Rubio S, Larson TR, Gonzalez-Guzman M, Alejandro S, Graham IA, Serrano R, Rodriguez PL** (2006) An *Arabidopsis* mutant impaired in Coenzyme A biosynthesis is sugar dependent for seedling establishment. *Plant Physiol* **140**: 830-843
- Sabar M, De Paepe R, De Kouchkovsky Y** (2000) Complex I impairment, respiratory compensations, and photosynthetic decrease in nuclear and mitochondrial male sterile mutants of *Nicotiana sylvestris*. *Plant Physiol* **124**: 1239-1249
- Sagi M, Davydov O, Orazova S, Yesbergenova Z, Ophir R, Stratmann JW, Fluhr R** (2004) Plant Respiratory Burst Oxidase Homologs impinge on wound responsiveness and development in *Lycopersicon esculentum*. *Plant Cell* **16**: 616-628
- Saradadevi K, Raghavendra AS** (1992) Dark respiration protects photosynthesis against photoinhibition in mesophyll protoplasts of pea (*Pisum sativum*). *Plant Physiol* **99**: 1232-1237
- Scheibe R** (2004) Malate valves to balance cellular energy supply. *Physiol Plant* **120**: 21-26
- Scheibe R, Backhausen JE, Emmerlich V, Holtgreffe S** (2005) Strategies to maintain redox homeostasis during photosynthesis under changing conditions. *J Exp Bot* **56**: 1481-1489

Schippers JHM, Nunes-Nesi A, Apetrei R, Hille J, Fernie AR, Dijkwel PP (2008) The *Arabidopsis* onset of leaf death5 mutation of quinolinate synthase nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis and causes early ageing. *Plant Cell* **20**: 2909-2925

Sulpice R, Pyl ET, Ishihara H, Trenkamp S, Steinfath M, Witucka-Wall H, Gibon Y, Usadel B, Poree F, Piques MC, von Korff M, Steinhauser MC, Keurenties JJ, Guenther M, Hoehne M, Selbig J, Fernie AR, Altmann T, Stitt M (2009) Starch as a major integrator in the regulation of plant growth. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 10348-10353

Sweetlove LJ, Lytovchenko A, Morgan M, Nunes-Nesi A, Taylor NL, Baxter CJ, Eickmeier I, Fernie AR (2006) Mitochondrial uncoupling protein is required for efficient photosynthesis. *PNAS* **103**: 19587-19592

Takahashi H, Watanabe A, Tanaka A, Hashida S-N, Kawai-Yamada M, Sonoike K, Uchimiya H (2006) Chloroplast NAD kinase is essential for energy transduction through the xanthophyll cycle in photosynthesis. *Plant Cell Physiol* **47**: 1678-1682

Takahashi H, Takahara K, Hashida S-N, Hirabayashi T, Fujimori T, Kawai-Yamada M, Yamaya T, Yanagisawa S, Uchimiya H (2009) Pleiotropic modulation of carbon and nitrogen metabolism in *Arabidopsis* plants overexpressing the NAD kinase2 gene. *Plant Physiol* **151**: 100-113

van Dongena JT, Gupta KJ, Ramírez-Aguilar SJ, Araújo WL, Nunes-Nesi A, Fernie AR (2011) Regulation of respiration in plants: A role for alternative metabolic pathways. *J Plant Physiol* **168**: 1434-1443

von Caemmerer S (2000). *Biochemical models of leaf photosynthesis*. 165 pp. Victoria, Australia: CSIRO Publishing

von Groll U, Berger D, Altmann T (2002) The subtilisin-like serine protease SDD1 mediates cell-to-cell signaling during *Arabidopsis* stomatal development. *Plant Cell* **14**: 1527-1539

Weise SE, van Wijk KL, Sharkey TD (2011) The role of transitory starch in C₃, CAM, and C₄ metabolism and opportunities for engineering leaf starch accumulation. *J Exp Bot* **62**: 3109-3118

Weitbrecht K, Kerstin Müller K, Leubner-Metzger G (2011) First off the mark: early seed germination. *J Exp Bot* **62**: 3289-3309

Xu Z, Zhou G (2008) Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a grass. *J Exp Bot* **59**: 3317-3325

FIGURAS SUPLEMENTARES

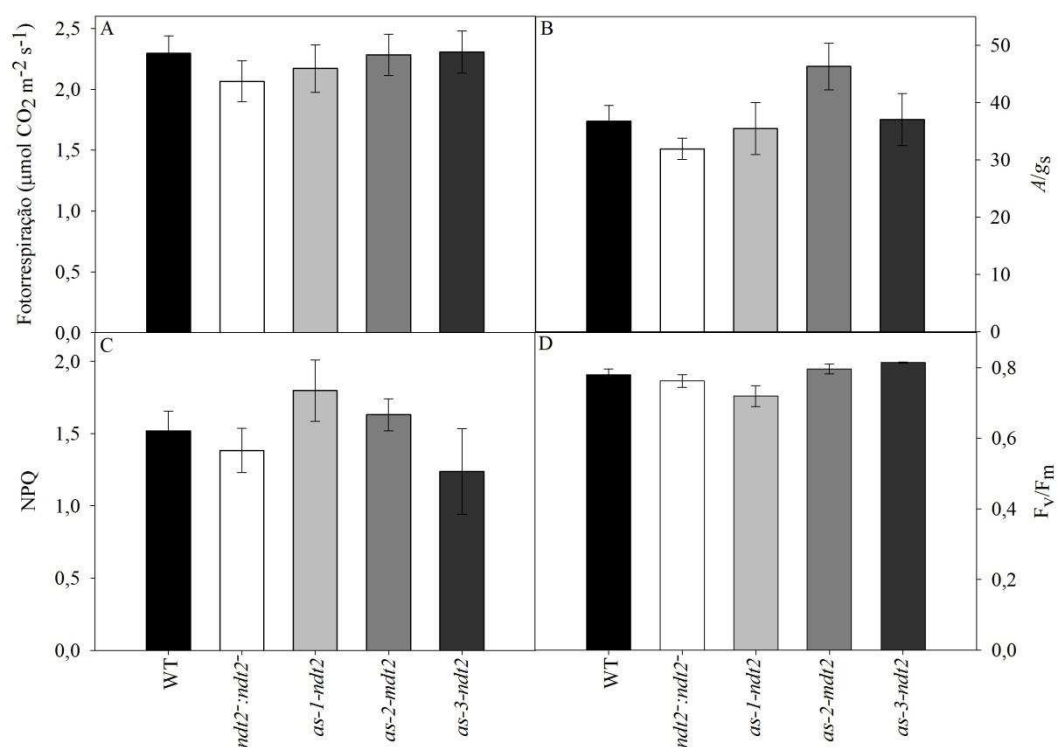


Figura Suplementar 1: Parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* em folhas de plantas com quatro semanas e redução na expressão do gene *NDT2*. A, fotorrespiração (R_p). B, eficiência intrínseca do uso da água (A/g_s). C, *quenching* não fotoquímico (NPQ). D, eficiência fotoquímica máxima do FSII (F_v/F_m). Valores representam a média \pm erro padrão de seis plantas individuais e os asteriscos indicam diferença significativa ($P < 0,05$), segundo o teste *t* de Student, em comparação com o tipo selvagem.

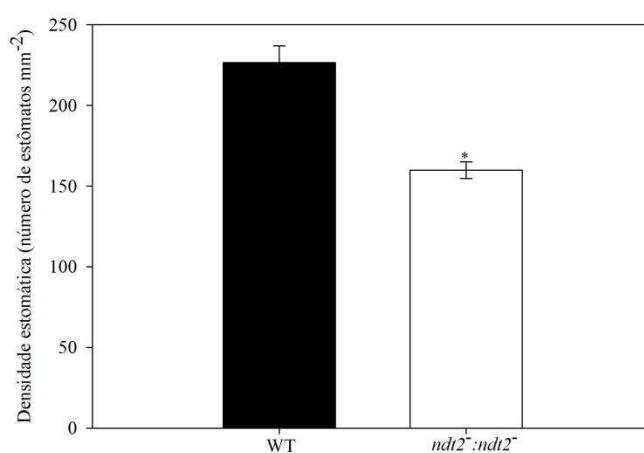


Figura Suplementar 2: Densidade estomática em folhas de plantas com baixa expressão de *NDT2*, com quatro semanas de idade. Valores representam a média \pm erro padrão de seis plantas individuais e os asteriscos indicam diferença significativa ($P < 0,05$), segundo o teste *t* de Student, em comparação com o tipo selvagem.

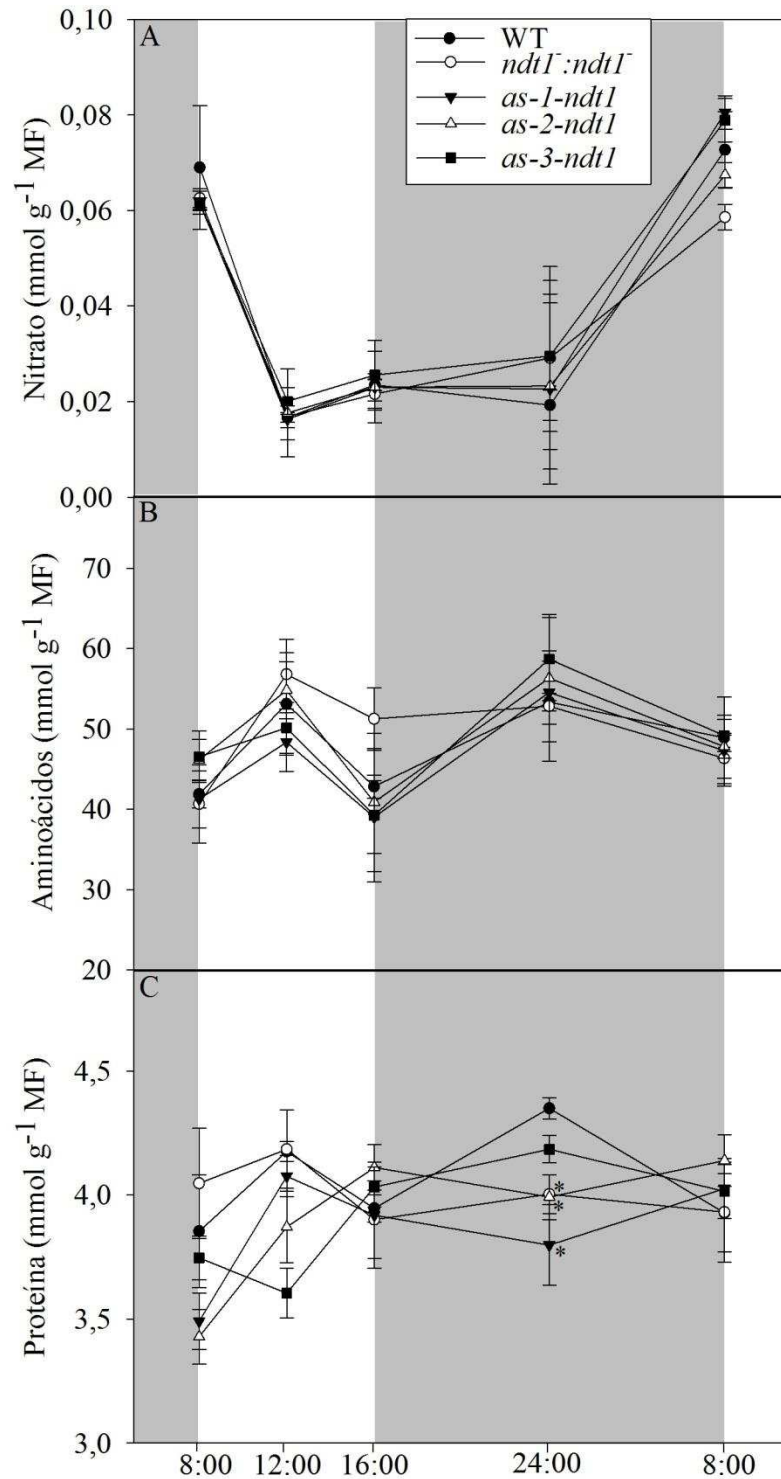


Figura suplementar 3: Variação em alguns metabólitos em folhas de *Arabidopsis* com reduzida expressão de *NDT2*, em plantas com quatro semanas de idade. A, nitrato. B, aminoácidos. C, proteína. Valores representam a média \pm erro padrão de seis plantas individuais e os asteriscos indicam diferença significativa ($P < 0,05$), segundo o teste *t* de Student, em comparação com o tipo selvagem. Áreas cinza nos gráficos representam o período de escuro. MF: massa fresca.

Tabela suplementar 1: Nível relativo de metabólitos em folhas de Arabidopsis com reduzida expressão de *NDT2*, coletadas com quatro semanas de idade, no meio do período lumínico

Metabólitos	WT	<i>ndt2:ndt2</i>	<i>as-1-ndt2</i>	<i>as-2-ndt2</i>	<i>as-3-ndt2</i>
Aminoácidos					
Alanina	1,00 ± 0,08	1,63 ± 0,11	2,00 ± 0,21	1,00 ± 0,08	1,03 ± 0,31
β-Alanina	1,00 ± 0,08	1,33 ± 0,22	0,99 ± 0,07	1,20 ± 0,18	1,00 ± 0,23
Asparagina	1,00 ± 0,18	1,97 ± 0,29	1,21 ± 0,22	0,95 ± 0,26	0,68 ± 0,04
Aspartato	1,00 ± 0,09	1,42 ± 0,20	1,02 ± 0,05	0,99 ± 0,09	0,78 ± 0,02
Fenilalanina	1,00 ± 0,12	1,19 ± 0,33	1,13 ± 0,19	1,03 ± 0,18	0,85 ± 0,15
GABA	1,00 ± 0,20	1,04 ± 0,07	1,14 ± 0,07	1,21 ± 0,33	0,94 ± 0,45
Glicina	1,00 ± 0,06	1,17 ± 0,09	1,29 ± 0,22	1,31 ± 0,15	1,01 ± 0,24
Glutamato	1,00 ± 0,25	0,90 ± 0,67	0,50 ± 0,15	4,79 ± 0,34	0,83 ± 0,28
Glutamina	1,00 ± 0,18	2,88 ± 0,50	1,56 ± 0,12	1,25 ± 0,22	0,90 ± 0,16
Isoleucina	1,00 ± 0,18	0,85 ± 0,20	0,77 ± 0,21	0,77 ± 0,12	1,09 ± 0,16
Leucina	1,00 ± 0,14	0,29 ± 0,01	0,27 ± 0,03	0,68 ± 0,14	1,09 ± 0,27
Metionina	1,00 ± 0,13	1,42 ± 0,24	1,03 ± 0,09	1,23 ± 0,23	1,08 ± 0,12
Prolina	1,00 ± 0,09	1,95 ± 0,28	0,97 ± 0,12	0,81 ± 0,16	0,87 ± 0,04
Serina	1,00 ± 0,09	1,25 ± 0,19	0,96 ± 0,08	0,96 ± 0,14	1,01 ± 0,11
Tirosina	1,00 ± 0,14	0,71 ± 0,14	0,69 ± 0,10	1,01 ± 0,08	1,11 ± 0,32
Treonina	1,00 ± 0,05	1,42 ± 0,12	1,23 ± 0,07	0,91 ± 0,09	0,96 ± 0,13
Triptofano	1,00 ± 0,15	0,46 ± 0,05	0,41 ± 0,07	0,82 ± 0,07	0,85 ± 0,12
Valina	1,00 ± 0,10	0,54 ± 0,03	0,59 ± 0,04	0,73 ± 0,35	0,82 ± 0,16
Ácidos orgânicos					
Ascorbato	1,00 ± 0,08	1,63 ± 0,11	2,00 ± 0,21	1,00 ± 0,08	1,03 ± 0,31
Citrato	1,00 ± 0,06	1,34 ± 0,11	1,19 ± 0,13	0,90 ± 0,03	0,87 ± 0,17
Desidroascorbato dimero	1,00 ± 0,27	3,23 ± 0,78	1,53 ± 0,28	1,95 ± 0,10	1,05 ± 0,38
Glicerato	1,00 ± 0,11	0,97 ± 0,08	0,94 ± 0,07	1,12 ± 0,09	1,07 ± 0,11
Glicolato	1,00 ± 0,06	0,82 ± 0,08	0,72 ± 0,10	0,86 ± 0,10	0,87 ± 0,18
Lactato	1,00 ± 0,11	1,05 ± 0,19	0,93 ± 0,16	1,06 ± 0,14	1,00 ± 0,16
Succinato	1,00 ± 0,08	0,70 ± 0,04	0,65 ± 0,04	1,00 ± 0,16	1,06 ± 0,24
Treonato	1,00 ± 0,09	0,74 ± 0,20	0,82 ± 0,04	0,90 ± 0,09	1,13 ± 0,24
Açúcares					
1,6 Anidro-β-glicose	1,00 ± 0,16	0,83 ± 0,03	0,77 ± 0,03	1,00 ± 0,06	1,01 ± 0,13
Eritritol	1,00 ± 0,23	0,69 ± 0,07	0,59 ± 0,04	0,85 ± 0,06	0,99 ± 0,09
Frutose	1,00 ± 0,25	1,55 ± 0,38	1,23 ± 0,10	3,33 ± 0,26	3,00 ± 1,45
Galatinol	1,00 ± 0,10	0,89 ± 0,04	0,62 ± 0,08	1,10 ± 0,22	1,40 ± 0,08
Glicopirranose	1,00 ± 0,13	0,91 ± 0,11	0,68 ± 0,04	1,11 ± 0,04	0,95 ± 0,20
Glicose	1,00 ± 0,16	1,10 ± 0,16	0,91 ± 0,09	1,58 ± 0,11	1,24 ± 0,01
Maltose	1,00 ± 0,08	0,98 ± 0,05	0,98 ± 0,03	0,96 ± 0,10	0,94 ± 0,23
α-1-O-Metil manopirranose	1,00 ± 0,16	0,83 ± 0,03	0,77 ± 0,03	1,00 ± 0,06	1,01 ± 0,13
Psicose	1,00 ± 0,20	0,97 ± 0,11	0,99 ± 0,06	2,29 ± 0,59	2,00 ± 0,95
Rafinose	1,00 ± 0,13	0,42 ± 0,11	0,32 ± 0,03	1,25 ± 0,50	0,98 ± 0,88
Sacarose	1,00 ± 0,09	1,34 ± 0,06	1,17 ± 0,01	1,18 ± 0,05	1,08 ± 0,09
Sorbose	1,00 ± 0,27	0,91 ± 0,16	0,89 ± 0,08	2,86 ± 0,84	2,38 ± 0,22
α-α-Trealose	1,00 ± 0,08	1,29 ± 0,09	0,92 ± 0,12	1,30 ± 0,01	1,52 ± 0,40

Continua

Conclusão

Outros

Ác. Indol-3-acetonitrila	1,00 ± 0,10	0,59 ± 0,05	0,50 ± 0,04	0,74 ± 0,11	0,97 ± 0,19
Mio-inositol	1,00 ± 0,14	1,07 ± 0,13	0,90 ± 0,04	1,67 ± 0,24	0,93 ± 0,16
Nicotinato	1,00 ± 0,11	1,13 ± 0,14	1,02 ± 0,09	0,96 ± 0,09	0,99 ± 0,12
Putrescina	1,00 ± 0,09	0,85 ± 0,09	0,89 ± 0,03	0,77 ± 0,03	0,59 ± 0,01
Sinapate	1,00 ± 0,07	1,06 ± 0,15	0,95 ± 0,07	0,95 ± 0,10	1,03 ± 0,15
Ureia	1,00 ± 0,12	0,92 ± 0,07	1,15 ± 0,16	0,94 ± 0,15	1,03 ± 0,22

Os valores representam níveis relativos ± erro padrão de seis amostras independentes; valores em negrito são significativos pelo teste *t* de Student's ($P < 0,05$) em comparação com o tipo selvagem.

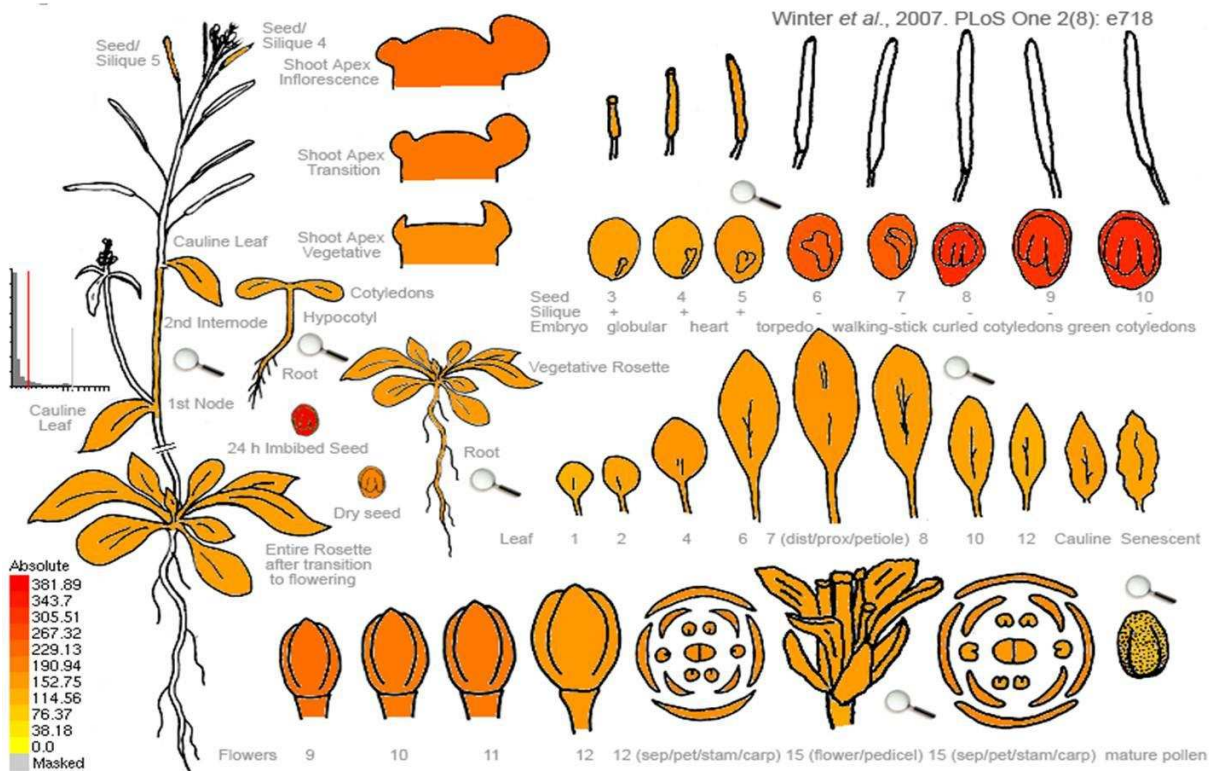


Figura suplementar 4. Análise *in silico* do gene *NDT2* em diferentes tecidos. Fonte: Arabidopsis eFP Browser <<http://esc4037-shemp.csb.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>>

CONCLUSÕES GERAIS

Diante dos resultados obtidos, observa-se que as alterações redox causadas pela redução na expressão dos genes que codificam para os transportadores NDT1 e NDT2 causam alterações no desenvolvimento de tecidos autotróficos e heterotróficos. O número de folhas, a área foliar e a densidade estomática são afetados, ocasionando alterações fotossintéticas e na síntese de açúcares, amido e ácidos orgânicos. Além disso, estes transportadores também possuem papel imprescindível no desenvolvimento de tecidos heterotróficos, especialmente aqueles envolvidos em processos reprodutivos como formação do pólen e germinação das sementes e eventos pós-germinativos como a β -oxidação. Assim, acredita-se que estes transportadores atuem na manutenção da homeostase redox e no o adequado crescimento e desenvolvimento de tecidos autotróficos e heterotróficos.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Análises filogenéticas acerca de proteínas transportadoras têm revelado novas perspectivas no conhecimento da importância de transportadores na nutrição vegetal, tolerância a estresse, produção de biomassa bem como processos de sinalização e desenvolvimento (Sze et al., 2014). Entretanto, muitas proteínas carreadoras ainda não foram caracterizadas e o papel fisiológico em condições normais e adversas destes transportadores ainda permanece em discussão (Sweetlove e Fernie, 2013). Além disso, a inespecificidade de alguns transportadores é marcante e alguns substratos podem ser transportados por vários transportadores (Palmieri et al., 2011). Assim, embora o presente trabalho tenha deixado claro que os transportadores mitocondrial e cloroplastídico de NAD são importantes em condições ótimas, para órgãos autotróficos e heterotróficos, uma vez que sua deficiência causou alterações no metabolismo vegetal em diferentes tecidos, muito provavelmente outros transportadores possam atuar no transporte de NAD⁺ nas condições fisiológicas testadas. Além disso, alguns transportadores já foram caracterizados por realizar o transporte de ATP citosólico por ADP ou AMP do estroma, como por exemplo, os transportadores de nucleotídeos NTT, o transportador ADP/ATP nomeado de ACC e o transportador de nucleotídeos de adenina, ADNT1 (Haferkamp et al., 2011; Sweetlove e Fernie, 2013). Embora não tenha sido descrito que estes transportadores carregam NAD⁺, não se descarta essa possibilidade. Outra consideração a ser feita acerca dos transportadores identificados em plantas é que uma boa parte deles ainda não foi caracterizado em condições fisiológicas ótimas ou adversas (Palmieri et al., 2011). Assim, acredita-se que avaliar os papéis dos transportadores em outros órgãos como, por exemplo, flores e raízes ou condições ambientais adversas, forneceriam ainda mais informações a respeito do papel fisiológico destas proteínas.

Haferkamp I, Fernie AR, Neuhaus HE (2011) Adenine nucleotide transport in plants: much more than a mitochondrial issue. *Trends Plant Sci* **16**: 507-515

Palmieri F, Pierri CL, de Grassi A, Nunes-Nesi A, Fernie AR (2011) Evolution, structure and function of mitochondrial carriers: a review with new insights. *Plant J* **66**: 161-181

Sweetlove LJ, Fernie AR (2013) The spatial organization of metabolism within the plant cell. *Annu Rev Plant Biol* **64**: 3.1-3.24

Sze H, Geisler M, Murphy AS (2013) Linking the evolution of plant transporters to their functions. *Front Plant Sci* **4**: 547