

DAVID BARBOSA MEDEIROS

**IMPLICAÇÕES FISIOLÓGICAS E METABÓLICAS DA PERDA
FUNCIONAL DO CANAL DE ÁCIDOS ORGÂNICOS *AtALMT12* EM
*Arabidopsis thaliana***

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M488i
2013
Medeiros, David Barbosa, 1989-
Implicações fisiológicas e metabólicas da perda funcional
do canal de ácidos orgânicos AtALMT12 em *Arabidopsis
thaliana* / David Barbosa Medeiros. – Viçosa, MG, 2013.
xii, 65f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Wagner Luiz Araújo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.54-65.

1. Ácidos orgânicos. 2. Fotossíntese. 3. Estômatos.
4. Análise foliar. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-Graduação
em Fisiologia Vegetal. II. Título.

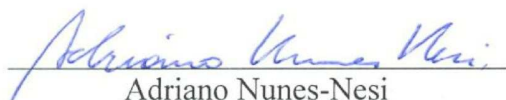
CDD 22.ed. 581.48

DAVID BARBOSA MEDEIROS

IMPLICAÇÕES FISIOLÓGICAS E METABÓLICAS DA PERDA
FUNCIONAL DO CANAL DE ÁCIDOS ORGÂNICOS *AtALMT12* EM
Arabidopsis thaliana

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

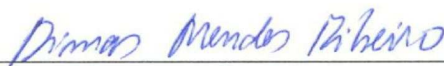
APROVADA: 26 de julho de 2013



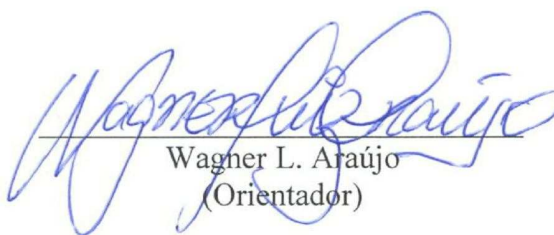
Adriano Nunes-Nesi
(Coorientador)



Fábio Murilo DaMatta
(Coorientador)



Dimas Mendes Ribeiro



Wagner L. Araújo
(Orientador)

“Deixe o futuro dizer a verdade e avaliar cada um de acordo com seus trabalhos e suas conquistas.”

Nikola Tesla

*Aos meus irmãos, Cláudia, Paula, Tiago
e ao meu cunhado Márcio pela
confiança e incentivo;*

*Aos meus padrinhos Caetano (in
memoriam) e Dulcimar Guedes por todo
o apoio,*

Ofereço

*Aos meus pais, Fátima e João de Medeiros
por todo amor, carinho e pelo que
representam para mim,*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser o comandante da minha vida, tendo me guiado até aqui.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa.

À Universidade Federal de Viçosa, pelo apoio e infraestrutura.

Ao meu orientador Prof. Wagner Araújo, pelos ensinamentos, orientação e confiança.

Aos meus coorientadores Profs. Adriano Nunes-Nesi e Fábio DaMatta pelo apoio na elaboração do projeto e execução dessa tese.

Ao Prof. Enrico Martinoia por ceder o material vegetal utilizado.

Aos membros da banca Dr. Dimas Ribeiro e Profs. Adriano Nunes-Nesi e Fábio DaMatta pelas valiosas sugestões.

Aos demais professores do curso, José Cambraia, Juraci Alves e Marcelo Rogalski, pela contribuição profissional. Em especial, aos professores Marcelo Loureiro e Raimundo Barros, por permitirem também o uso de equipamentos em seus laboratórios.

Aos técnicos Antônio Cordeiro, Carlos Raimundo, Mercês e Rogério Gomide, pelo apoio.

Aos amigos do grupo de pesquisa Alberto, Dalton, Danielle, Franciele, Franklin, Ítalo, Jorge, Laíse, Luna, Mariana, Paula, Renan, Renato, Rinamara e Samira, pela amizade, convívio e momentos de descontração. Em especial a Izabel, pela amizade e essencial ajuda nas análises de RT-PCR, Dora, pela amizade e companheirismo durante nossas análises e por fim ao “*macho véi*” João Henrique, pela amizade e ajuda sempre.

Aos amigos do Laboratório de Nutrição e Metabolismo, Leandro, Paulo, Alice, Kelly e Gustavo pela ajuda e companheirismo. Em especial a Lílian, pelo auxílio nas análises enzimáticas, a Alyne Lavysnki, pela amizade e apoio sempre providenciais e por fim ao grande Samuel pelas contribuições a esse trabalho, obrigado companheiro!

Aos amigos da pós-graduação Amanda, Adinan, Fernanda Vidal e Rebeca pelos momentos divididos durante o curso. Sem a companhia de vocês, tudo seria mais complicado, obrigado!

Aos amigos do LFV/UFRPE, Profa. Rejane Mansur, pelos conselhos passados, Cibele, Cinthya, Clarissa, Hugo Bentzen, Marcelo Ribeiro e Natália Vaz, que apesar da distância sempre estão “presentes” com palavras de apoio.

Aos meus pais e irmãos pelo amor, incentivo e confiança depositados em mim.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desse trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
2.1 <i>Material vegetal e condições de crescimento</i>	9
2.2 <i>Análise de expressão por RT-PCR semiquantitativo</i>	11
2.3 <i>Análise de crescimento</i>	12
2.4 <i>Densidade estomática</i>	13
2.5 <i>Parâmetros de fluorescência e trocas gasosas</i>	13
2.6 <i>Determinação da perda de água na roseta destacada</i>	16
2.7 <i>Análises bioquímicas</i>	17
2.7.1 <i>Extração etanólica</i>	17
2.7.2 <i>Determinação da concentração de clorofilas</i>	18
2.7.3 <i>Determinação do conteúdo de aminoácidos totais</i>	18
2.7.4 <i>Determinação do conteúdo de açúcares</i>	19
2.7.5 <i>Determinação do conteúdo de malato e fumarato</i>	19
2.7.6 <i>Determinação dos teores de proteínas solúveis</i>	20
2.7.7 <i>Determinação da concentração de amido</i>	20
2.8 <i>Avaliação de atividade enzimática</i>	21
2.9 <i>Delineamento experimental e análise estatística</i>	24
3. RESULTADOS.....	24
3.1 <i>Isolamento e confirmação da redução na expressão de ALMT12</i>	24
3.2 <i>A ausência de expressão de ALMT12 afeta o crescimento</i>	25
3.3 <i>Cinéticas de abertura e fechamento estomático são afetadas em plantas mutantes almt12</i>	27
3.4 <i>Perda de água em folhas destacadas</i>	28
3.5 <i>Parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila a</i>	29
3.6 <i>Caracterização fotossintética</i>	31
3.7 <i>Efeitos metabólicos da redução na expressão de ALMT12</i>	35
3.8 <i>Atividade enzimática em resposta a redução na expressão de ALMT12</i>	40
4. DISCUSSÃO.....	42
4.1 <i>AtALMT12 é um importante canal de ânions necessário para a adequada regulação do fechamento estomático</i>	42
4.2 <i>Expressão de almt12 altera não apenas aspectos estomáticos, mas também difusionais em Arabidopsis thaliana</i>	44
4.3 <i>Alteração na capacidade fotossintética em plantas com redução na expressão de almt12 promove mudanças metabólicas</i>	47
5. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS.....	52
6. REFERÊNCIAS.....	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Identificação molecular e caracterização fenotípica das linhas mutantes <i>almt12</i>	26
Figura 2: Cinéticas de abertura e fechamento estomático em resposta a luz e concentrações de CO ₂ ambiente de linhas mutantes <i>almt12</i>	28
Figura 3: Perda de água em rosetas destacadas de linhas mutantes <i>almt12</i>	29
Figura 4: Curvas de fotossíntese líquida (A_N) em resposta a alterações na radiação fotossinteticamente ativa (<i>RFA</i>) de linhas mutantes <i>almt12</i>	31
Figura 5: Curvas de resposta da fotossíntese líquida (A_N) a concentração subestomática (C_i) e cloroplastídica (C_c) de CO ₂ de linhas mutantes <i>almt12</i>	34
Figura 6: Teores de clorofila total ($a + b$), bem como a razão a/b de linhas mutantes <i>almt12</i>	36
Figura 7: Conteúdo de aminoácidos livres e proteínas solúveis de linhas mutantes <i>almt12</i>	37
Figura 8: Teores de açúcares solúveis e amido de linhas mutantes <i>almt12</i>	38
Figura 9: Concentração de ácidos orgânicos de linhas mutantes <i>almt12</i>	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Alterações nos parâmetros de crescimento e anatômicos em plantas mutantes <i>almt12</i>	27
Tabela 2: Variáveis instantâneas de trocas gasosas e derivadas da análise de fluorescência da clorofila <i>a</i> em plantas <i>almt12</i>	30
Tabela 3: Parâmetros fotossintéticos derivados das curvas de luz de plantas <i>almt12</i>	32
Tabela 4: Caracterização fotossintética de plantas <i>almt12</i>	33
Tabela 5: Análise de limitações fotossintéticas relativas em plantas WT-like.	35
Tabela 6: Atividade enzimática em plantas <i>almt12</i> no meio do período luminoso..	41

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ϕ	Rendimento quântico aparente
I^*	Ponto de compensação de CO ₂ cloroplastídico
ϕ_{FSII}	Eficiência quântica real do fotossistema II
$1/\phi$	Eficiência no uso da luz
AF	Área foliar
AFE	Área foliar específica
A_N	Taxa de assimilação líquida de CO ₂
A_{RFA}	Taxa de assimilação líquida de CO ₂ saturada pela luz
C_a	Concentração externa de CO ₂
C_c	Concentração cloroplastídica de CO ₂
C_i	Concentração subestomática de CO ₂
C_i^*	Ponto de compensação de CO ₂ subestomático na ausência de respiração mitocondrial
DE	Densidade estomática
DTT	ditiotreitól
EDTA	etilenodiaminotetracético
EGTA	ácido etileno glicol- <i>bis</i> (β -aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetracético
EUA	Eficiência instantânea do uso da água
F_0	Fluorescência inicial
F_m	Fluorescência máxima
FSII	Fotossistema II
F_v	Fluorescência variável
F_v/F_m	Eficiência fotoquímica máxima do FSII
F_v'/F_m'	Eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos do FSII
G3PDH	Glicerol-3-fosfato desidrogenase
G6PDH	Glicose 6-fosfato desidrogenase
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
g_m	Condutância mesofílica
g_s	Condutância estomática

I_c	Irradiância de compensação
I_s	Irradiância de saturação
J_{flu}	Taxa de transporte de elétrons estimada por parâmetros de fluorescência
J_{max}	Taxa de transporte de elétrons estimada por parâmetros de trocas gasosas
LBR	Limitação bioquímica relativa
LER	Limitação estomática relativa
LMR	Limitação mesofílica relativa
LT	Limitação relativa total
MF	Massa fresca
MSF	Massa seca foliar
MSR	Massa seca da roseta
MTT	brometo de metiltiazolildifeniltetrazólio
NAD-MDH	Malato desidrogenase dependente de NAD^+
NADP-MDH	Malato desidrogenase dependente de $NADP^+$
NF	Número de folhas
PEPC	Fosfoenolpiruvato carboxilase
PES	fenazinaetosulfato
PGK	3-fosfoglicerato cinase
PMS	fenazinametossulfato
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonil
R_d	Respiração noturna
RFA	Radiação fotossinteticamente ativa
RNA	Ácido ribonucleico
R_p	Fotorrespiração
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase – transcrição reversa
RuBP	Ribulose-1,5-bifosfato
TCR	Taxa de crescimento relativo
T-DNA	Ácido desoxirribonucleico de transferência
V_{cmax}	velocidade máxima de carboxilação
V_{TPU}	velocidade de uso das trioses fosfato
WT	Tipo selvagem

RESUMO

MEDEIROS, David Barbosa, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2013. **Implicações fisiológicas e metabólicas da perda funcional do canal de ácidos orgânicos AtALMT12 em *Arabidopsis thaliana*.** Orientador: Wagner L. Araújo. Coorientadores: Adriano Nunes-Nesi e Fábio Murilo DaMatta

Várias rotas metabólicas permitem o acúmulo de solutos necessários para o controle da abertura e fechamento estomático. Assim, os movimentos do poro estomático são regulados por alterações no potencial osmótico das células-guarda e essas alterações são alcançadas principalmente pelo transporte de íons (e.g. potássio, malato e cloreto) através de membranas celulares. Apesar do entendimento sobre os fluxos de potássio e cloreto através da membrana plasmática de células-guarda ser amplamente reconhecido, pouco se sabe acerca do papel do metabolismo de ácidos orgânicos (e.g. malato e fumarato) no controle dos movimentos estomáticos. Neste estudo, portanto, investigou-se a função do *AtALMT12*, um membro da família de transportadores de malato ativados por alumínio (ALMT) localizado na membrana plasmática de células-guarda. Foram utilizadas duas linhas mutantes de *Arabidopsis thaliana* (*almt12-1* e *almt12-2*) e seus correspondentes tipos selvagens. Plantas *almt12* foram caracterizadas por apresentarem prejuízos na cinética de fechamento estomático induzida tanto por escuro como por alta concentração de CO₂. Aumentos em parâmetros de crescimento (e.g. área foliar e taxa de crescimento relativo) foram observados em plantas *almt12* sem alterações na densidade estomática. Maiores taxas fotossintéticas (A_N) com incrementos correspondentes na condutância estomática e mesofílica, assim como na velocidade máxima de carboxilação e na taxa de transporte de elétrons, indicam uma maquinaria fotossintética aparentemente mais ativa em plantas *almt12*. As diferenças em A_N não foram associadas a limitações fotoquímicas nem bioquímicas da fotossíntese, sendo governadas, fundamentalmente por maiores disponibilidades internas de CO₂. Observou-se, também, uma alta correlação entre a degradação do amido, utilização de malato e fumarato como fonte de C para a respiração, sustentando maiores taxas de crescimento sem, contudo, alterar os níveis de aminoácidos, proteínas e pigmentos fotossintéticos. Sugere-se, portanto, que as alterações no metabolismo do C são, em larga extensão, associadas a aumentos em A_N , sem alterar, no entanto, a atividade catalítica máxima de enzimas-chave envolvidas no metabolismo fotossintético e respiratório. Concomitante, estes resultados demonstram que, ao menos sob condições ótimas de crescimento, a regulação ineficiente do fechamento dos estômatos em plantas *almt12* está largamente associada à maior capacidade fotossintética dessas plantas promovendo alterações no metabolismo primário, particularmente do C, refletindo em aumentos na taxa de crescimento.

ABSTRACT

MEDEIROS, David Barbosa, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2013. **Physiological and metabolic implications due the functional lack of organic acids channel *AtALMT12* in *Arabidopsis thaliana*.** Adviser: Wagner L. Araújo. Co-advisers: Adriano Nunes-Nesi and Fábio Murilo DaMatta

Several pathways allow the accumulation of solutes required for the control of stomatal closure and aperture. The movements of the stomatal pore are regulated by changes in the osmotic potentials of the guard cells and these changes are mainly achieved by ion transport (e.g. potassium, malate and chloride) across cellular membranes. While our knowledge about potassium and chloride fluxes across the plasma membrane of guard cells is advanced, little is known about the role of organic acid metabolism (e.g. malate and fumarate) in controlling stomatal movements. To enlighten this issue we investigated the function of the *AtALMT12*, a member of the aluminum activated malate transporter family located in the plasma membrane of guard cells. We used two *Arabidopsis thaliana* mutant lines (*almt12-1* and *almt12-2*), and their corresponding wild type. *almt12* mutant plants were characterized by an impaired dark- and CO₂-induced stomatal closure. Increases in growth parameters such as leaf area and relative growth rate were observed in *almt12* plants, despite the absence of changes in stomatal density. Higher photosynthetic rates (A_N) with correspondent increments in stomatal and mesophyll conductance and increases in maximum carboxylation velocity and electron transport rate indicates a photosynthetic apparatus apparently more active in *almt12* plants. Nevertheless, differences in A_N seem unlikely to have been caused either by photochemical impairments or a direct end-product-mediated feedback down-regulation of photosynthesis. It was also observed a high correlation between starch degradation and the usage of malate and fumarate as C source for respiration which is able to sustain higher growth rates, with no major changes in amino acids, protein and photosynthetic pigments. Overall, changes in C metabolism in these plants were largely associated with increases in the A_N , even though the similar maximum catalytic activity of key enzymes involved in photosynthetic and respiratory metabolism. Altogether, these results demonstrated that, at least under optimal growth conditions, inefficient regulation of stomata closure in *almt12* plants, was greatly associated to higher photosynthetic capacity which in turn lead to alterations in primary metabolism, particularly C metabolism, reflecting in increases in growth rate.

1. INTRODUÇÃO

Ao mesmo tempo em que as plantas necessitam de quantidades suficientes de CO₂ para manter o processo fotossintético, as perdas de água também precisam ser reguladas para evitar a desidratação e consequentes alterações metabólicas. Não obstante, devido à elevada impermeabilidade cuticular à água e CO₂ a maior parte da água transpirada, bem como a absorção de CO₂, ocorre pelos poros estomáticos, demonstrando, portanto, que os estômatos são essenciais para o controle do *status* hídrico, bem como para o ganho de carbono pela planta (Bergmann & Sack, 2007; Lawson et al., 2008; Kim et al., 2010; Bauer et al., 2013)

Os estômatos, poros funcionalmente especializados, regulam o fluxo de gases do interior para o exterior das plantas e vice-versa, sendo considerados, portanto, essenciais para dois processos vitais nos vegetais, a fotossíntese e transpiração. O poro estomático abre em resposta a uma redução no potencial osmótico e, consequentemente, no potencial hídrico das células-guarda, que resulta na entrada de água nessas células. O subsequente aumento no volume das células-guarda culmina com a abertura do poro. No sentido oposto, para que ocorra o fechamento estomático se faz necessário uma larga saída de osmólitos das células-guarda, com consequente aumento no potencial hídrico, o que leva ao efluxo de água e, por consequência, ao fechamento dos estômatos (Schroeder et al., 2001; Kim et al., 2010; Araújo et al., 2011a; Araújo et al., 2011c).

Tendo em vista a grande importância das células-guarda, esforços consideráveis vêm sendo realizados para melhor compreender a sua estrutura, desenvolvimento e fisiologia (Bergmann & Sack, 2007; Mott, 2009; Berry et al., 2010; Casson & Hetherington, 2010; Kim et al., 2010). Cumpre mencionar que, dada

à relativa facilidade de isolamento das células-guarda, o entendimento de seus processos metabólicos é muito maior do que outros 40 tipos celulares descritos até o momento em plantas (Martin et al., 2001; Alhag Dow et al., 2007). No entanto, embora seja um dos tipos celulares mais investigados, a compreensão da(s) rota(s) de sinalização que regula(m) o seu funcionamento ainda não é totalmente entendida (Hetherington & Brownlee, 2004; Israelsson et al., 2006; Kim et al., 2010), principalmente no que tange a resposta dessas rotas a estímulos ambientais (Brodrigg & McAdam, 2011). Assim, uma dentre as várias questões ainda não completamente elucidada seria como os sinais do ambiente, tais como intensidade luminosa, concentração de CO₂ e hormônios vegetais, são capazes de modular os movimentos estomáticos. Sabe-se que a abertura estomática é alcançada pela sinalização à luz, conversão de energia luminosa, transporte de íons através da membrana e atividade metabólica da célula-guarda (Shimazaki et al., 2007). Ademais, embora dados recentes indiquem que ambos, luz e CO₂, exerçam papel crucial no controle dos movimentos estomáticos, o exato mecanismo associado a esse controle não foi ainda totalmente esclarecido (Shimazaki et al., 2007; Kim et al., 2010).

O transporte de íons orgânicos e inorgânicos através de membranas celulares é de fundamental importância para a abertura e fechamento dos estômatos (Hetherington, 2001; Roelfsema & Hedrich, 2005; Pandey et al., 2007; Negi et al., 2008; Vahisalu et al., 2008). O influxo de potássio (K⁺), do apoplasto, e seu acúmulo, no vacúolo, são cruciais durante a abertura estomática e esse processo não é alcançado sem, no entanto, ocorrer um concomitante acúmulo de ânions, os quais permitem o balanço de cargas na célula. Embora a natureza química desses ânions seja dependente da espécie e das condições de crescimento, é geralmente aceito que

cloreto, malato e nitrato são os principais contra-íons para o K^+ (Roelfsema & Hedrich, 2005; Kim et al., 2010; Barbier-Brygoo et al., 2011).

Embora os ácidos orgânicos, em particular o malato, foram anteriormente considerados de menor importância relativa nos mecanismos associados ao funcionamento estomático, esses ácidos vêm sendo recentemente apontados como um dos principais reguladores do mecanismo pelo qual as células-guarda se ajustam em resposta às concentrações externas de CO_2 (Van Kirk & Raschke, 1978; Hedrich & Marten, 1993; Hedrich et al., 1994; Roelfsema et al., 2002; Nunes-Nesi et al., 2007; Araújo et al., 2011c). Nesse sentido, o malato é considerado um metabólito-chave e também o principal osmólito orgânico presente nessas células (Ferne & Martinoia, 2009; Meyer et al., 2010b). Assim, durante a abertura dos estômatos ocorre influxo de malato para as células-guarda, o qual exerce função osmótica e permite a entrada de água, resultando no aumento do volume celular e subsequente abertura do poro (Lee et al., 2008). Por outro lado, durante o fechamento estomático, o malato pode ser parcialmente convertido em amido, o qual não apresenta atividade osmótica, ou ainda liberado das células-guarda para o apoplasto (Van Kirk & Raschke, 1978). Em conjunto, essas observações demonstram que o processo de transporte de malato tem papel preponderante no controle dos movimentos estomáticos, o que reflete o corrente e crescente interesse nesse metabólito. Nesse contexto, o papel do malato sobre a regulação dos movimentos estomáticos tem sido evidenciado particularmente a partir de estudos relativos ao transporte desse íon através de membranas celulares. Assim, durante a última década, pelos menos duas famílias gênicas diferentes foram identificadas e funcionalmente caracterizadas, como mediadoras do transporte de ácidos orgânicos, com envolvimento direto nos movimentos estomáticos.

Recentemente, um gene que codifica um transportador da família ABC (ATP Binding Cassete), *AtABCB14*, atuando no transporte de malato e localizado na membrana plasmática, foi identificado e caracterizado em células-guarda de *Arabidopsis thaliana* (Lee et al., 2008). Nesse estudo, demonstrou-se que *AtABCB14* modula o fechamento estomático durante a transição de baixas para altas concentrações de CO₂. Assim, altos níveis de CO₂ aceleram o fechamento estomático em plantas com expressão reduzida de *AtABCB14*, ao passo que a aplicação de malato minimiza essa resposta. Verifica-se, portanto, que essa proteína representa um regulador negativo do movimento estomático induzido por CO₂ em *Arabidopsis*, atuando no influxo de malato do apoplasto para as células-guarda.

Outros genes foram também identificados como responsáveis pelo transporte de malato, como alguns membros da família de **A**luminium-activated **M**alate **T**ransporters (ALMT). Cumpre mencionar que, entre as famílias de transportadores/canais até agora identificados, ALMTs formam uma família única com sistema de transporte passivo exclusivo de plantas (Sasaki et al., 2004; Hoekenga et al., 2006; Kovermann et al., 2007; Meyer et al., 2010b; Meyer et al., 2011). Esses genes foram primeiramente caracterizados em raízes de trigo (*TaALMT1*), estando envolvidos na maior tolerância ao alumínio (Al³⁺), devido à exudação de malato na rizosfera para formar complexos não tóxicos, minimizando, assim, os efeitos danosos daquele íon (Sasaki et al., 2004). Posteriormente, foram caracterizados *HvALMT1* em cevada (Delhaize et al., 2004), *AtALMT1* em *Arabidopsis* (Hoekenga et al., 2006) e *GmALMT1* em soja (Liang et al., 2013), com a mesma função. Por outro lado, um membro da família ALMT, em milho (*ZmALMT12*), tem sido também caracterizado como canal de ânions inorgânicos como cloreto, nitrato e sulfato (Pineros et al., 2008). Adicionalmente, estudos recentes demonstraram que *AtALMT12* representa

um canal de ânions do tipo rápido (tipo-R), altamente expresso na membrana plasmática de células-guarda (Meyer et al., 2010b). Apesar de *AtALMT12* ser um membro da família ALMT, esse canal de ânions não é ativado por alumínio, semelhantemente a *ZmALMT1*, e, por esse fato, Meyer et al. (2010b) propuseram renomear *AtALMT12* como QUAC1 (quick-activating anion channel 1), seguindo a nomenclatura adotada para o já bem documentado canal de ânions do tipo lento, SLAC1 - slow anion channel 1 (Vahisalu et al., 2008; Geiger et al., 2010; Vahisalu et al., 2010; Du et al., 2011; Brandt et al., 2012; Kusumi et al., 2012). Embora resultados controversos sobre o transporte de ácidos orgânicos por esse canal sejam aparentes, ambos os estudos concordaram que perda de função de *AtALMT12* ocasiona comprometimento do fechamento dos estômatos em resposta ao CO₂ e ao escuro, bem como ao ácido abscísico (ABA) (Meyer et al., 2010b; Sasaki et al., 2010). Entretanto, reduções nos fluxos de malato nesse canal em *Arabidopsis* foram observadas apenas por Meyer et al. (2010b).

O transporte vacuolar de malato em células do mesófilo de *Arabidopsis* também inclui outros membros da família ALMT (Kovermann et al., 2007). Assim, foi demonstrado que *AtALMT6* é altamente expresso em vacúolos de células-guarda e é capaz de mediar o influxo de malato (Meyer et al., 2011). Adicionalmente, esses autores verificaram que vacúolos de células-guarda, isolados a partir de plantas mutantes *atalmt6*, exibiram reduções no fluxo de malato comparadas com o tipo selvagem. Essa redução não foi acompanhada, no entanto, por diferenças fenotípicas nos movimentos estomáticos naquelas plantas, provavelmente devido à redundância funcional de transportadores de malato nos vacúolos. Medições pela técnica de *patch-clamp* em plantas *knockouts* demonstraram que *AtALMT9* também contribui visivelmente para as correntes de malato (Kovermann et al., 2007). Saliente-se

também que plantas *knockouts atalmt9* não mostraram diferenças fenotípicas aberrantes quando cultivadas em condições ótimas de crescimento, sugerindo um alto grau de redundância funcional desses transportadores. Não obstante, o envolvimento de *AtALMT9* no movimento estomático foi recentemente confirmado (De Angeli et al., 2013), estando associado não somente a mediação do transporte de malato nas células-guarda, mas *AtALMT9* é também capaz de atuar como um canal de cloreto no vacúolo, sendo induzido pelas concentrações citosólicas de malato. Em conjunto, esses resultados sugerem que o malato possua não somente um papel direto como osmólito nas células-guarda, mas atue também como um componente de sinalização nessas células. Ademais evidências *in vivo* indicam que *AtALMT9* atuaria como um regulador da abertura estomática, uma vez que plantas *knockouts* exibiram não somente abertura estomática reduzida, mas também cinética de abertura dos estômatos mais lenta, reduzindo, assim, a transpiração, o que resulta em plantas mais tolerantes à limitação hídrica em relação aos tipos selvagens correspondentes (De Angeli et al., 2013).

Evidências adicionais para o papel dos ácidos orgânicos e do metabolismo mitocondrial na regulação do movimento estomático foram recentemente relatadas. A inibição antisense da subunidade ferro-enxofre da enzima succinato desidrogenase (SDH) em plantas de tomate resultou em maiores crescimento e fotossíntese via um efeito mediado pelos ácidos orgânicos na abertura estomática (Araújo et al., 2011c). Por outro lado, plantas de tomate com redução na expressão e atividade da fumarase, outra importante enzima do processo respiratório, apresentaram reduções de biomassa, assimilação de CO₂ e condutância estomática (Nunes-Nesi et al., 2007), em contraste aos resultados encontrados para as plantas deficientes em SDH em tomate (Araújo et al., 2011c) e *Arabidopsis* (Fuentes et al., 2011), possivelmente em

função do acúmulo diferencial de ácidos orgânicos nessas plantas. Cabe ressaltar também que as concentrações dos ácidos orgânicos no apoplasto e no protoplasto, nesses mutantes e também naqueles com eficiência estomática reduzida em função da redução na atividade da fumarase, revelaram uma correlação negativa entre a concentração de malato e fumarato e a abertura estomática, tendo o malato uma maior contribuição para as respostas observadas em plantas de tomate (Nunes-Nesi et al., 2007; Araújo et al., 2011c). Tomadas em conjunto, essas informações associadas com resultados obtidos para o transportador *AtABCB14* (Lee et al., 2008), fornecem fortes evidências de que as concentrações de malato e fumarato podem modular o funcionamento das células-guarda e, dessa forma, influenciar a abertura e fechamento estomático. Considerando que o malato está fisiologicamente presente no apoplasto em maiores concentrações em tomate (Araújo et al., 2011c) é plausível sugerir que este exerça maior influência na abertura estomática do que o fumarato. Concomitantemente com a identificação de transportadores que importam malato (ou fumarato) para as células-guarda (Lee et al., 2008) ou que tenham sido considerados exportadores desses ácidos orgânicos (Negi et al., 2008; Vahisalu et al., 2008), essas informações sugerem um mecanismo pelo qual os ácidos orgânicos, malato e fumarato, possam influenciar diretamente a função estomática. Adicionalmente, esses estudos fornecem fortes evidências que suportam a teoria de Mott (Mott, 2009), a qual descreve que as células-guarda não possuem uma regulação autônoma e, portanto, são fortemente influenciadas pelas células do mesófilo (Lee et al., 2008; Fernie & Martinoia, 2009; Mott, 2009) e evidentemente, pelas concentrações apoplásticas, seja de ácidos orgânicos ou de outros íons que contribuam para regulação dos movimentos estomáticos.

Embora muitas espécies vegetais acumulem malato preferencialmente a outros ânions e uma correlação positiva entre a abertura estomática e o acúmulo de malato nas células-guarda tenha sido verificada (Vavasseur & Raghavendra, 2005; Araújo et al., 2011c), esse acúmulo parece não ocorrer por mecanismos isolados do metabolismo do malato. De fato, sabe-se que o malato pode ser produzido pela degradação de amido nas células-guarda quando estimuladas por luz azul (Shimazaki et al., 2007). Curiosamente, a abertura estomática induzida pela luz azul foi muito prejudicada em plantas de *Arabidopsis* deficientes na expressão da enzima fosfoglicomutase, muito provavelmente pela ausência de amido nos cloroplastos das células-guarda nessas plantas (Lasceve et al., 1997). Registre-se, todavia, que a resposta à luz azul foi restaurada na presença de altas concentrações de cloreto (Cl^-), possivelmente porque Cl^- substitui o malato como um contra-íon necessário para contrabalancear o K^+ .

Diante do exposto, verifica-se que lacunas consideráveis sobre os mecanismos envolvidos nos movimentos estomáticos são evidentes, sendo necessários, portanto, mais estudos para se entender a importância relativa de cada mecanismo de regulação, que, muito provavelmente, é variável com as circunstâncias ambientais. Portanto, uma detalhada caracterização fisiológica e metabólica de plantas que perdem funcionalmente os transportadores e canais de ácidos orgânicos descritos acima se traduzirá em substancial informação acerca do papel desses ácidos no controle dos movimentos estomáticos. Em adição, a avaliação das respostas dessas plantas em nível molecular e metabólico, contribuirá para um maior entendimento da importância do metabolismo e/ou transporte de ácidos orgânicos no que diz respeito ao controle do *status* hídrico em plantas. A grande maioria dos trabalhos associando a função de transportadores de ácidos orgânicos têm

negligenciado o metabolismo desses ácidos, de modo que, pouco parece ter sido explorado acerca das oscilações temporais do metabolismo respiratório e fotossintético em plantas com reduções no transporte de ácidos orgânicos. Nesse contexto, os objetivos deste trabalho foram verificar a hipótese de que a perda funcional de *AtALMT12* resultaria em prejuízo no transporte de ácidos orgânicos, comprometendo a função estomática e ainda verificar se a manipulação genética desse transportador provoca alterações em nível metabólico, no que diz respeito ao metabolismo fotossintético e respiratório, em função da menor eficiência estomática. Os resultados obtidos demonstram que a ausência de *AtALMT12* altera os movimentos estomáticos com impactos no crescimento bem como no metabolismo respiratório e fotossintético. Com clara redução na eficiência do fechamento dos estômatos, plantas com perda funcional de *AtALMT12* apresentaram aumentos substanciais no crescimento via alterações no metabolismo do C, atreladas a mudanças no comportamento fotossintético, altamente correlacionadas com o aumento da difusão do CO₂ no mesófilo, sem, contudo, alterar de forma drástica a atividade de importantes enzimas associadas à fotossíntese e à respiração. Os potenciais mecanismos regulatórios assim como futuras perspectivas de pesquisa são apresentados e discutidos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e condições de crescimento

As linhas de mutantes (*almt12-1* e *almt12-2*), bem como dos seus respectivos tipos selvagens (WT-like-1 e WT-like-2), cujas sementes foram gentilmente cedidas

pelo Prof. Enrico Martinoia (Universidade de Zurique, Suíça) e previamente descritas por Meyer et al. (2010b). As duas linhas *AtALMT12* com inserção de T-DNA foram identificadas da coleção do John Innes Centre - JIC collection (Tissier et al., 1999) e denominadas *almt12-1* (SM_3_38592) e *almt12-2* (SM_3_1713). Essas linhas foram obtidas do European Arabidopsis Stock Center (Nottingham, Reino Unido) e as plantas mutantes homozigotas para a inserção de T-DNA foram isoladas a partir de uma genotipagem via PCR usando *primers* específicos para *AtALMT12*: *almt12-1*: L1, 5'-GTTGTGCAAAGGGCTTAATAGAG-3'; R1 5'-CAAGAAGGCTCATGAAAAGACAG-3'; *almt12-2*, L2 5'-ACAAGACCACCGTTGGTAAACTC-3'; R2 5'-CTCCGGCTAATCTTACACAAGG-3') e um *primer* específico para T-DNA (Spm32, 5'-TACGAATAAGAGCGTCCATTTAGAGT-3'). As inserções de T-DNA foram identificadas no terceiro éxon e no quarto éxon nas linhas mutantes *almt12-1* e *almt12-2*, respectivamente.

As sementes foram esterilizadas em álcool 70% (v/v) por 2 min e em hipoclorito de sódio 2,5% (v/v) por 15 min e, em seguida, lavadas em água estéril. Após a esterilização, as sementes foram distribuídas em placas de Petri estéreis contendo meio de cultivo ½ MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 1% de sacarose (p/v). Posteriormente, as placas foram acondicionadas a 4°C, por quatro dias, no escuro. Em seguida, as placas foram mantidas em câmara de crescimento à temperatura de 22 °C/20 °C (luz/escuro), umidade relativa de 60% e irradiância de 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sob um regime de luz/escuro de 8 h/16 h, durante 10 dias. Após esse período, as plântulas foram transferidas para vasos de 0,08 dm³ contendo substrato comercial Tropstrato HT[®] e mantidas nas mesmas condições descritas

acima. Entre a quarta e quinta semana após o trasplante avaliações fisiológicas, bem como coletas para análises bioquímicas e moleculares foram realizadas.

2.2 Análise de expressão por RT-PCR semiquantitativo

A abundância do transcrito de *AtALMT12* foi realizada por meio de uma análise de expressão via RT-PCR (*Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction*) semiquantitativo em plantas com quatro semanas de idade, nas duas linhas mutantes homozigotas (*almt12-1* e *almt12-2*), nas linhas WT-like (WT like-1 e 2), bem como em plantas WT, ecotipo Columbia-0 (Col-0), que foram utilizadas como ecotipo base para a mutação. O RNA total foi isolado e purificado usando TRIzol[®] Reagent (Life Technologies), de acordo com as recomendações do fabricante. Dois microgramas de RNA foram usados para a síntese de cDNA usando o ImProm-II[™] Reverse Transcriptase System e um primer oligo dT. A amplificação das sequências específicas de cDNA foi feita usando primers específicos descritos acima e reportados anteriormente (Meyer et al., 2010b). Como controle, a amplificação da sequência de cDNA que codifica a Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (*GAPDH*) – AT1G16300, utilizando os primers *forward* (5'-TGGTTGATCTCGTTGTGCAGGTCTC-3') e *reverse* (5'-GTCAGCCAAGTCAACA ACTCTCTG-3'), bem como a β -tubulina (*TUB9*) – AT4G20890, com os primers *forward* (5'-GATATCTGTTTCCGTACCTTGAAGC-3') e *reverse* (5'-CCGACTGTAGCATCTTGATATTGC-3'), foram realizadas. As condições utilizadas para as reações foram: 2 min a 94 °C, 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 54 °C por 30 s e 72 °C por 30 s para os *primers* específicos de *AtALMT12*; 2 min a 94 °C, 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 59 °C por 30 s e 72 °C por 45 s para *GAPDH*; 2

min a 94 °C, 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 56 °C por 30 s e 72 °C por 45 s para *TUB9*. A separação do produto da RT-PCR foi feita em gel de agarose 2% (p/v).

2.3 Análise de crescimento

Plantas de cinco semanas de idade foram coletadas e os seguintes parâmetros de crescimento foram avaliados: massa seca da roseta (MSR), área foliar (AF), área foliar específica (AFE), número de folhas (NF) e taxa de crescimento relativo (TCR). Para tanto, seis rosetas de cada genótipo foram destacadas, determinando-se o NF totalmente expandidas. Logo em seguida, determinou-se a AF pelo método da imagem digital, em que folhas totalmente expandidas foram digitalizadas com auxílio de um *scanner* (Hewlett Packard Scanjet G2410, Palo Alto, Califórnia, EUA). As imagens obtidas foram posteriormente processadas no software Rosette Tracker (De Vylder et al., 2012). As folhas foram posteriormente acondicionadas em estufa de circulação forçada de ar, a 65 °C, até obtenção de massa constante, determinando-se a MSR, assim como a massa seca foliar (MSF). A AFE foi estimada utilizando a seguinte fórmula: $AFE (m^2 kg^{-1}) = AF/MSF$. A taxa de crescimento relativo (TCR) foi determinada em base de massa seca, sendo a coleta da MS_1 realizada 20 dias após a germinação, idade essa em que a roseta se encontra com 20% de seu tamanho final (Boyes et al., 2001). A TCR foi obtida por meio da seguinte fórmula (Hunt et al., 2002):

$$TCR(g g dia^{-1}) = \frac{\ln MS_2 - \ln MS_1}{t_2 - t_1}$$

2.4 Densidade estomática

Para a estimativa da densidade estomática impressões com resina dental como molde (Berger & Altmann, 2000) foram tomadas da superfície abaxial da nona folha totalmente expandida ao meio do ciclo de luz/escuro. Cópias das impressões foram feitas com esmalte incolor (Von Groll et al., 2002) e as imagens registradas com uma câmera digital (Axiocam MRc) acoplada ao microscópio Zeiss (modelo AX10, Jena, Alemanha). A densidade estomática foi determinada em pelo menos 10 diferentes campos de $0,04 \text{ mm}^2$ por folha, a partir das imagens obtidas com auxílio do software Anat Quant 2.0 (Viçosa, Minas Gerais, Brasil).

2.5 Parâmetros de fluorescência e trocas gasosas

Os parâmetros de trocas gasosas, bem como os de fluorescência da clorofila *a* foram medidos 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.), usando a câmara foliar de 2 cm^2 , radiação fotossinteticamente ativa (*RFA*) de $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, temperatura a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e $400 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ar, sendo essas análises iniciadas após 1 h do início do período luminoso.

Para a eficiência fotoquímica máxima do FSII (F_v/F_m), após pelo menos 2 h de adaptação ao escuro, uma irradiância de $0,03 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ foi aplicada para determinar a fluorescência inicial (F_0). Para obtenção da fluorescência máxima (F_m) um pulso saturante de $6000 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ foi aplicado por 0,8 s. A eficiência quântica máxima do fotossistema II (F_v/F_m) foi então calculada como $(F_m - F_0)/F_m$. A

estimativa da eficiência quântica real do fotossistema II associada ao transporte de elétrons (ϕ_{FSII}) foi determinada de acordo com Genty et al. (1989), onde $\phi_{\text{FSII}} = (F_m' - F_s')/F_m'$ e a eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos do FSII (F_v'/F_m').

Como ϕ_{FSII} representa o número de elétrons transferidos por fóton absorvido pelo FSII, a taxa de transporte de elétrons (J_{flu}) foi calculada como $J_{\text{flu}} = \phi_{\text{FSII}} \times \alpha \times \beta \times RFA$, em que α é a absorptância da folha e β reflete o particionamento dos pacotes de energia entre os fotossistemas II e I. O produto $\alpha\beta$ foi adotado tal qual se encontra na literatura para a espécie em estudo, sendo, portanto, igual a 0,451 (Flexas et al., 2007b).

Os valores de respiração noturna (R_d) foram determinados por meio do IRGA mencionado, após pelo menos 1 h de adaptação ao escuro.

A taxa de fotorrespiração (R_p) foi estimada pela fórmula: $R_p = ((1/12) \cdot (J_{\text{flu}} - 4 \cdot (A_N + R_d)))$ (Valentini et al., 1995), baseando-se no requerimento de elétrons necessário para um evento de carboxilação e/ou oxigenação da ribulose-1,5-bisfosfato (RuBP) e no fato de que uma molécula de CO_2 é liberada para cada ciclo de duas oxigenações, durante a descarboxilação da glicina, no passo de síntese de serina durante o ciclo fotorrespiratório (Laing et al., 1974).

Curvas de resposta de A_N à radiação fotossinteticamente ativa (A_N/RFA) também foram obtidas, alterando a RFA na sequência: 600, 1000, 800, 600, 400, 200, 100, 50, 25, 10 e 0 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e mantendo-se a concentração ambiente de CO_2 (C_a) dentro da câmara em 400 $\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$, de forma que as trocas gasosas e a fluorescência da clorofila a foram medidas simultaneamente (Yin et al., 2009). As variáveis derivadas das curvas A_N/RFA , tais como irradiância de compensação (I_c), de saturação (I_s), rendimento quântico aparente (ϕ) 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)

As respostas de A_N à concentração interna de CO_2 (curvas A_N/C_i) foram obtidas a $700 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, um valor saturante (determinado a partir de curvas A_N/RFA), mas não fotoinibit\u00f3rio, variando-se a press\u00e3o parcial de CO_2 , na seguinte sequ\u00eancia: 40, 30, 20, 10, 5, 40, 60, 80, 100, 120, 140 e 160 Pa, como descrito previamente (Long & Bernacchi, 2003).

A estimativa da condut\u00e2ncia mes\u00f3filica (g_m) foi realizada usando o m\u00e9todo de Harley, a partir de dados de A_N , C_i , R_d e taxa de transporte de el\u00e9trons (J_{flu}), estimada a partir dos dados de fluoresc\u00eancia (Harley et al., 1992), como segue:

$$g_m = A_N / (C_i - (I^*(J_{flu} + 8(A_N + R_d)) / (J_{flu} - 4(A_N + R_d))))).$$

O fator de especificidade da Rubisco ainda n\u00e3o foi descrito para *Arabidopsis*, portanto, o ponto de compensa\u00e7\u00e3o de CO_2 cloroplast\u00eddico (I^*) foi obtido como uma aproxima\u00e7\u00e3o a partir do ponto de compensa\u00e7\u00e3o de CO_2 subestom\u00e1tico na aus\u00eancia de respira\u00e7\u00e3o mitocondrial (C_i^*), estimado como descrito anteriormente (Galm\u00e9s et al., 2006). Assim, o valor adotado foi retirado tal como se encontra na literatura ($49 \mu\text{mol } CO_2 \text{ mol}^{-1}$), haja vista que I^* depende apenas da composi\u00e7\u00e3o de amino\u00e1cidos das subunidades da Rubisco, n\u00e3o diferindo, portanto, entre linhas da mesma esp\u00e9cie (Berm\u00fadez et al., 2012).

As estimativas de g_m foram utilizadas para transformar as curvas A/C_i em curvas A/C_c (C_c = concentra\u00e7\u00e3o de CO_2 nos s\u00edlios de carboxila\u00e7\u00e3o). Para tanto, C_c foi calculada usando a f\u00f3rmula: $C_c = C_i - (A/g_m)$.

Os par\u00e2metros provenientes das curvas A_N/C_i e A_N/C_c , tais como taxa m\u00e1xima de carboxila\u00e7\u00e3o (V_{cmax}) e a taxa m\u00e1xima de transporte de el\u00e9trons (J_{max}), foram obtidas a partir do modelo desenvolvido por Sharkey et al. (2007). Para tanto,

excetuando-se I^* , os parâmetros de cinética da Rubisco utilizados foram tomados de Bernacchi et al. (2001). Esse procedimento foi realizado por meio do pacote de programa Solver no Microsoft Excel[®] (Microsoft, Seattle).

Para a análise de limitações fotossintéticas, as limitações relativas foram particionadas em suas componentes funcionais (Grassi & Magnani, 2005). Esse método utiliza A_N , g_s , g_m e V_{cmax} e permite o fracionamento das limitações em componentes relativos à limitação estomática (LER), mesofilica (LMR) e bioquímica (LBR). Assumiu-se como referência os genótipos que apresentaram maiores valores para A_N , g_s , g_m e V_{cmax} . Esses maiores valores foram observados sempre nas linhas mutantes *almt12-1* e *2*, as quais, portanto, foram tomadas como referência para calcularem-se as limitações parciais nos seus respectivos WT.

A cinética de abertura e fechamento estomático em resposta a luz foi determinada em plantas adaptadas ao escuro por, no mínimo, 2 h. A luz foi então desligada/ligada/desligada por 10/60/60 min, respectivamente, sempre com a concentração de CO₂ mantida em 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ e os valores de g_s registrados em intervalos de 1 min. A cinética de abertura e fechamento estomático em resposta a diferentes concentrações de CO₂ foi determinada em folhas expostas a 400/800/400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO₂ por 10/60/40 min, respectivamente, com a *RFA* mantida a 150 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e os valores de g_s registrados em intervalos de 1 min (Meyer et al., 2010b).

2.6 Determinação da perda de água na roseta destacada

Para determinação da perda de água, a massa da roseta inteira destacada, incubada com o lado abaxial para cima nas mesmas condições de crescimento, foi

determinada durante um período de 3 h com intervalo de pesagem de 10 min. A perda de água foi calculada como a percentagem de perda da massa fresca, relativa à massa fresca inicial (Araújo et al., 2011c)

2.7 Análises bioquímicas

As rosetas inteiras foram coletadas no início, meio e final do período de luz (IL, ML e FL, respectivamente), bem como no meio e final do período de escuro (ME e FE) e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, sendo armazenadas a -80 °C até as análises.

2.7.1 Extração etanólica

Alíquotas de aproximadamente 20 mg de massa fresca de folhas foram utilizadas para as análises bioquímicas. As amostras foram submetidas à extração etanólica, a quente, pela adição de 250 µL de etanol (98%) aos microtubos de 1,5 mL que continham as alíquotas. As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 20 min a 80 °C, sob agitação (822 g). Após esse período as amostras foram centrifugadas, por 10 min, a 17.000 g, a 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado em um novo microtubo de 1,5 mL. O precipitado resultante foi submetido a duas extrações conforme descrito acima, utilizando-se, sequencialmente, no entanto, 150 µL e 250 µL de etanol 80% e 50%. Os sobrenadantes obtidos foram misturados e, assim como o precipitado resultante, foram armazenados a -20 °C para as análises dos metabólitos, segundo métodos previamente descritos (Nunes-Nesi et al., 2007).

2.7.2 Determinação de clorofilas

O conteúdo de clorofilas foi determinado segundo Porra et al. (1989) por meio de um leitor de microplacas (OptiMax Tunable Microplate Reader). Para tanto, adicionou-se em cada poço da microplaca 25 µL do extrato etanólico, 25 µL de *mix* etanólico (etanol 98%, 80% e 50% nas proporções 2:1:2) e 120 µL de etanol 98%. As leituras foram feitas em dois comprimentos de onda (645 e 665 nm). Os teores de clorofilas foram determinados por meio das fórmulas abaixo e expressos em mg g⁻¹ de massa fresca (MF).

$$\text{Clorofila } a = 5,21 * \text{Abs}_{665} - 2,07 * \text{Abs}_{645}$$

$$\text{Clorofila } b = 9,29 * \text{Abs}_{645} - 2,74 * \text{Abs}_{665}$$

2.7.3 Determinação de aminoácidos totais

Os aminoácidos foram determinados de acordo com Gibon et al. (2004a). Em uma microplaca adicionou-se 25 µL do extrato etanólico, 25 µL de etanol 70%, 50 µL de tampão citrato pH 5,2, acrescido de ácido ascórbico 0,2% (*p/v*) e 100 µL de ninhidrina 1% (*p/v*) em etanol 70% (*v/v*), em cada poço. A microplaca foi então incubada no escuro, por 20 min, a 95 °C. Após esse período, foi centrifugada por 10 s, a 12.800 g. A absorvância foi determinada a 570 nm e a determinação da concentração de aminoácidos totais foi feita por meio de uma curva padrão de leucina nas seguintes concentrações: 0; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1 e 0,25 mM. Os valores obtidos foram então expressos em µmol g⁻¹ MF.

2.7.4 Determinação de açúcares

Os teores de glicose, frutose e sacarose foram determinados a partir do extrato etanólico, de acordo com Fernie et al. (2001). Em uma microplaca foram adicionados, em cada poço, 40 μL do extrato etanólico e 160 μL de *mix*, o qual continha tampão Hepes/KOH 0,1 M, MgCl_2 30 mM (pH 7,0); ATP (118 mM); NADP (48,4 mM); desidrogenase da glicose-6-fosfato - G6PDH (5 mg mL^{-1}). A absorbância foi lida a 340 nm com intervalos entre leituras de 1 min. Após a estabilização da densidade óptica (OD), adicionaram-se as enzimas em cada poço na seguinte sequência: hexocinase (1,5 unidades por reação); isomerase da glicose-6-fosfato (0,7 unidades por reação); invertase (5 unidades por reação). A concentração dos açúcares foi estimada por meio da seguinte fórmula e expressa em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF:

$$\mu\text{mol NADPH} = \Delta\text{OD}/(2,85*6,22)$$

2.7.5 Determinação de malato e fumarato

O conteúdo de malato e fumarato foi determinado de acordo com Nunes-Nesi et al. (2007). Em uma microplaca, adicionaram-se 80 μL do *mix* contendo tampão Tricina/KOH 0,4 M, pH 9; brometo de metiltiazolildifeniltetrazólio - MTT (10 mM); NAD^+ (60 mM); fenazinaetossulfato (20 mM); Triton X-100 10% (v/v); H_2O , adicionando-se, ainda, 10 μL do extrato etanólico. As absorbâncias foram então lidas a 570 nm, com intervalo entre leituras de 1 min. Após a estabilização da OD, foram adicionadas sucessivamente, desidrogenase málica (1.000 unidades mL^{-1}) e, após

nova estabilização da OD, a fumarase (100 unidades mL⁻¹). Ambas as enzimas foram ressuspensas em tampão Tricina/KOH 0,4 M, pH 9. Para a quantificação das concentrações de malato e fumarato, curvas foram feitas utilizando-se ácido málico e ácido fumárico como padrões nas seguintes concentrações: 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; 2,0 mM. As concentrações desses ácidos orgânicos foram expressas em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF.

2.7.6 Determinação de proteínas solúveis

As proteínas solúveis foram determinadas segundo Gibon et al. (2004). Para tanto, ressuspendeu-se o precipitado resultante da extração etanólica em 400 μL de NaOH 0,1 M. Após, os microtubos foram incubados por 1 h, a 95 °C, sob agitação constante (580 g). Após esse período, procedeu-se à centrifugação (17.000 g por 5 min). Por fim, retirou-se uma alíquota (3 μL) do sobrenadante que foi, então, adicionada a uma microplaca contendo 180 μL do reagente de Bradford (diluído 1:5) em cada poço. A leitura da microplaca foi feita a 595 nm. De posse de uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA), nas concentrações: 0; 0,08; 0,16; 0,24; 0,32; 0,40; 0,60; 0,80 mg μL^{-1} , determinou-se a concentração de proteína, que foi expressa em mg g⁻¹ MF.

2.7.7 Determinação de amido

O conteúdo de amido foi determinado como previamente descrito (Fernie et al., 2001). Adicionaram-se 70 μL de ácido acético 1 M aos microtubos contendo o precipitado ressuspendido em NaOH 0,1 M, utilizado para a determinação de

proteínas, para a neutralização do extrato. Retiraram-se 40 μL da suspensão, formada após agitação, e adicionou-se em cada poço da microplaca, o qual continha 60 μL do *mix* de hidrólise do amido, composto pelas enzimas amiloglicosidase e α -amilase ressuspendidas em acetato de sódio 0,5 M pH 4,9, na proporção 25 mL de acetato de sódio: 500 μL de amiloglicosidase e 5 μL de α -amilase. A microplaca foi então vedada com fita de alumínio (3M Modelo 425[®] HD) resistente a altas temperaturas e incubada por 1 h, a 55 °C. Após esse período, a microplaca foi centrifugada por 10 s a 12.800 g. 50 μL da suspensão foram transferidos para uma nova microplaca, adicionando-se 160 μL do *mix* para determinação da glicose contendo tampão HEPES/KOH 1 M, pH 7,0, MgCl_2 30 mM; ATP (118 mM); NADP (48,4 mM); G6PDH (0,7 unidades μL^{-1}). Por meio do mesmo leitor de microplacas descrito acima as absorbâncias foram determinadas a 340 nm, com 1 min de intervalo entre as leituras. Após a formação de uma linha de base estável (estabilização da OD), adicionaram-se 10 μL da enzima hexocinase (2 unidades por reação). O conteúdo de amido foi então calculado de acordo com a fórmula abaixo e expresso em μmol de glicose g^{-1} MF.

$$\mu\text{mol NADPH} = \Delta\text{OD} / (2,85 * 6,22)$$

2.8 Avaliação de atividade enzimática

O extrato para determinação da atividade enzimática foi preparado como descrito previamente (Gibon et al., 2004), onde alíquotas de 20 mg de massa fresca, armazenadas previamente a -80 °C, foram extraídas por meio de vigorosa agitação em tampão de extração, composto por glicerol 87% (v/v); BSA 0,25% (p/v); Triton

X-100 10% (v/v); Hepes/KOH 50 mM pH 7,5, MgCl₂ 10 mM; EDTA 1 mM; EGTA 1 mM; benzamidina 1 mM; ácido ε-aminocaprônico 1 mM; PMSF 1 mM; DTT 1 mM. O PMSF foi adicionado somente antes da extração. Utilizaram-se 500 µL do tampão de extração e subalíquotas foram diluídas 1:20 (v/v) para gerar diluições apropriadas para cada enzima. Quando necessário, utilizou-se o extrato enzimático bruto para as determinações de atividade enzimática. A atividade de todas as enzimas foi determinada espectrofotometricamente por meio da oxidação NADH ou NADPH, de acordo com cada enzima, a 340 nm.

A atividade total (24 min de incubação a 25 °C) e inicial da Rubisco foi determinada como descrito previamente (Sulpice et al., 2007), com algumas modificações. De forma resumida, utilizaram-se 20 µL de extrato enzimático bruto, que foi incubado em um tampão de reação constituído por Bicina 100 mM pH 8,0 em NaOH; EDTA 1 mM pH 8,0; MgCl₂ 15 mM (inicial) e 20 mM (total), DTT 10 mM; NaHCO₃ 5 mM (inicial) e 10 mM (final); NADH 0,5 mM; ATP 2 mM; cinase da fosfocreatina (2 unidades mL⁻¹); GAPDH (40 unidades mL⁻¹); cinase do 3-fosfoglicerato - PGK (10 unidades mL⁻¹); fosfocreatina 5 mM; BSA 0,1%. A reação foi iniciada com a adição de ribulose-1,5-bisfosfato (RuBP) para uma concentração final de 0,6 mM.

A atividade de PGK foi determinada segundo Burrell et al. (1994), com algumas modificações. O extrato enzimático (20 µL de extrato diluído) foi incubado em um tampão de reação, contendo Hepes/KOH 100 mM pH 8,0; EDTA 1 mM; MgCl₂ 5mM; NADH 0,3 mM; ATP 1 mM; GAPDH 0,83 unidades. A reação foi então iniciada após a adição de 3-fosfoglicerato (3-PGA), para uma concentração final de 6,5 mM.

Para transcetolase, avaliada de acordo com Gibon et al. (2004), o extrato enzimático (30 μ L de extrato bruto) foi incubado no meio de reação contendo, Tris HCl 50 mM pH 7,4; $MgCl_2$ 5 mM; 0,24 mM NADH; tiamina pirofosfato 0,5 mM; isomerase da triose-P (0,5 unidades); desidrogenase do glicerol-3-fosfato (G3PDH). A reação foi iniciada com a adição de ribose-5-fosfato, para uma concentração final de 1 mM.

A atividade de NADP-GAPDH foi determinada de acordo com Leedoog & Walker (1980), utilizando-se 20 μ L do extrato enzimático diluído. O extrato enzimático foi incubado no meio de reação, contendo tampão Hepes/KOH 100 mM, pH 8,0; ATP 5 mM; $MgCl_2$ 10 mM; NADPH 0,2 mM; 22,5 unidades de PGK. A reação foi iniciada com a adição de 3-PGA para uma concentração final de 5 mM.

A atividade da desidrogenase málica dependente de NAD (NAD-MDH) foi determinada segundo Jenner et al. (2001), com algumas modificações. Resumidamente, 20 μ L do extrato enzimático diluído foram dispostos em um tampão de reação contendo Tricina/KOH 500 mM pH 8,0; Triton X-100 0,25% (v/v); NADH 1 mM. A reação foi iniciada com a adição de oxalacetato (OAA), para uma concentração final de 1 mM.

A atividade da NADP-MDH foi determinada como descrito por Scheibe & Stitt (1988). Para tanto, 5 μ L do extrato enzimático diluído foram incubados por 2 h, a 25 °C, inicialmente em um tampão de ativação contendo Tricina/KOH 100 mM pH 8,0; KCl 180 mM; Triton X-100 0,5% (v/v); DTT 150 mM (atividade total) ou água (atividade inicial). Após essa incubação inicial, adicionou-se o tampão de reação exatamente como descrito para a determinação da atividade da NAD-MDH.

2.9 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação entre médias realizada pelo teste t de *Student* ($P < 0,05$) com auxílio dos algoritmos presentes no programa Microsoft Excel[®].

3. RESULTADOS

3.1 Isolamento e confirmação da redução na expressão de ALMT12

Para investigar o papel desempenhado pelo transporte de ácidos orgânicos nos movimentos das células estomáticas, foram utilizadas duas linhagens independentes (*almt12-1* e *almt12-2*) que contêm elementos de T-DNA inseridos no gene *ALMT12* em *Arabidopsis thaliana*. Essas plantas mutantes foram previamente caracterizadas em condições ótimas de crescimento, demonstrando que a perda de *ALMT12* altera o transporte de ácidos orgânicos e, por conseguinte, os movimentos estomáticos (Meyer et al., 2010b). Análises de RT-PCR usando pares de *primers* desenhados especificadamente para cobrir os sítios de inserção de T-DNA foram utilizados para investigar a transcrição do gene *ALMT12* (Figure 1A e 1B). As inserções de T-DNA foram identificadas no terceiro éxon e no quarto éxon nas linhas mutantes *almt12-1* e *almt12-2*, respectivamente (Figure 1A). Utilizando o conjunto de primers L1/R1 e L2/R2 foi possível detectar a expressão do gene *ALMT12*, tanto no tipo selvagem (WT, Col-0) como em linhas WT-like; contudo, produtos de amplificação não foram observados nas linhas *almt12-1* e *almt12-2*, respectivamente

(Figura 1B). Os genes *TUB9* e *GAPDH* foram utilizados como controle constitutivo (Figura 1B). Dessa forma, linhas em homozigose foram confirmadas para cada um dos mutantes por PCR e denominadas *almt12-1* e *almt12-2*, respectivamente. Estes resultados confirmaram que transcritos abrangendo o sítio de inserção do T-DNA são ausentes nas linhas mutantes. Para efeitos comparativos, todos os resultados descritos a partir de agora para as linhas mutantes *almt12-1* e *almt12-2* serão sempre comparados ao correspondente tipo selvagem, Wt-like-1 e Wt-like-2, respectivamente. Uma vez estabelecida e confirmada a identidade molecular dessas linhas independentes, essas plantas foram cultivadas juntamente com os respectivos controles (WT) (vide condições de crescimento em Material & Métodos). Nessas condições, nenhum fenótipo aberrante visível foi observado durante o crescimento vegetativo e reprodutivo desses mutantes quando comparados com suas respectivas linhas WT (Figura 1C).

3.2 A ausência de expressão de ALMT12 afeta o crescimento

Apesar das linhas mutantes não sofrerem alterações drásticas no seu fenótipo aparente, uma análise de crescimento mais detalhada dessas plantas demonstrou aumentos significativos em termos absolutos e relativos. Nesse contexto, de forma geral, plantas *almt12-1* e *almt12-2* cultivadas por cinco semanas apresentaram maiores número de folhas (NF), área foliar (AF) total, área foliar específica (AFE), massa seca da roseta (MSR) e taxa de crescimento relativo (TCR) (Tabela 1). Saliente-se, ainda, que, embora maiores AF e TCR tenham sido observadas em *almt12-1* e *almt12-2*, a densidade estomática não foi alterada (Tabela 1).

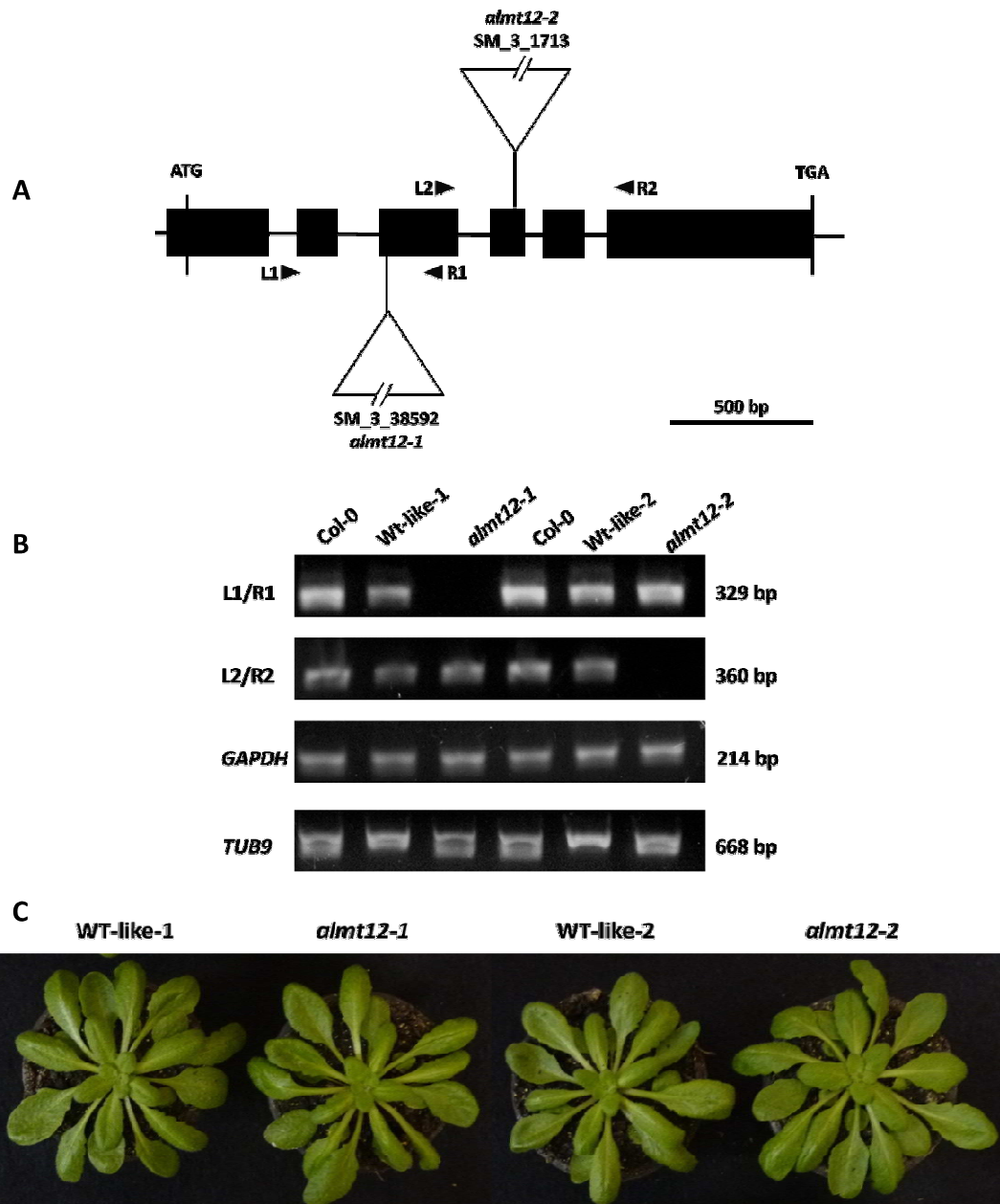


Figura 1: Identificação molecular e caracterização fenotípica das linhas mutantes *almt12*. **A.** Estrutura gênica de *AtALMT12*. Setas indicam a posição dos *primers* usados para genotipagem, bem como para análise de expressão por RT-PCR. Caixas pretas indicam éxons. Barra corresponde a 500 pares de bases. As inserções de T-DNA foram identificadas no éxon 3 e 4 em *almt12-1* e *almt12-2*, respectivamente. **B.** Análise via RT-PCR do RNA total de plantas Col-0, WT-like-1 e 2, bem como de *almt12-1* e *almt12-2* utilizando o conjunto de *primers* indicados à esquerda da figura. Análises via RT-PCR semiquantitativo demonstram a ausência de transcrito para *AtALMT12* nas linhas homocigotas *almt12-1* e *almt12-2*. **C.** Fenótipo aparente em plantas com quatro semanas de idade.

Tabela 1: Parâmetros de crescimento e morfológicos em plantas mutantes *almt12*. Valores representam as médias \pm EP (n = 8) obtidas em dois ensaios independentes. Os valores que diferem significativamente ($P < 0,05$) pelo teste *t* Student's estão em negrito.

Parâmetros*	WT-like-1	<i>almt12 - 1</i>	WT-like-2	<i>almt12 - 2</i>
NF*	28,5 \pm 0,3	32,3 \pm 1,1	24,0 \pm 0,9	30,7 \pm 0,8
AF (cm ²)	28,7 \pm 1,9	38,2 \pm 0,4	23,2 \pm 1,6	38,5 \pm 2,9
AFE (m ² kg ⁻¹)	15,2 \pm 0,8	18,7 \pm 0,5	13,3 \pm 0,9	15,5 \pm 0,7
MSR (g)	0,17 \pm 0,007	0,22 \pm 0,014	0,17 \pm 0,010	0,23 \pm 0,010
TCR (g g dia ⁻¹)	0,013 \pm 0,003	0,025 \pm 0,004	0,023 \pm 0,002	0,039 \pm 0,001
DE (estômatos mm ⁻²)	235,0 \pm 8,9	236,8 \pm 11,8	223,8 \pm 4,2	228,2 \pm 8,8

*NF: número de folhas; AF: área foliar; AFE: área foliar específica; MS: massa seca da roseta; TCR: taxa de crescimento relativo; DE: densidade estomática.

3.3 Cinéticas de abertura e fechamento estomático são afetadas em plantas mutantes almt12

Para confirmar a hipótese de que a perda funcional do canal de ânions *AtALMT12* levaria a um prejuízo no controle dos movimentos estomáticos, realizaram-se análises da cinética de indução a abertura e fechamento dos estômatos em respostas ao estímulo luminoso e a concentração de CO₂ (Figura 2). Estas análises confirmaram que as linhas mutantes apresentam uma regulação deficiente do fechamento estomático, levando, assim, a uma menor velocidade de fechamento dos estômatos, tanto em resposta ao escuro (Figura 2A e 2B) como em resposta à alta concentração de CO₂ (Figura 2C e 2D). Por outro lado, a cinética de abertura estomática foi pouco afetada e, assim, não se observaram diferenças significativas entre as linhas mutantes e seus respectivos WT não foram observadas, apesar de plantas *almt12* mostrarem uma tendência de maior e mais rápida abertura dos

estômatos. Verificou-se, ainda, que *almt12-1* e *almt12-2* apresentaram abertura estomática máxima maior que seus respectivos WT (Figura 2).

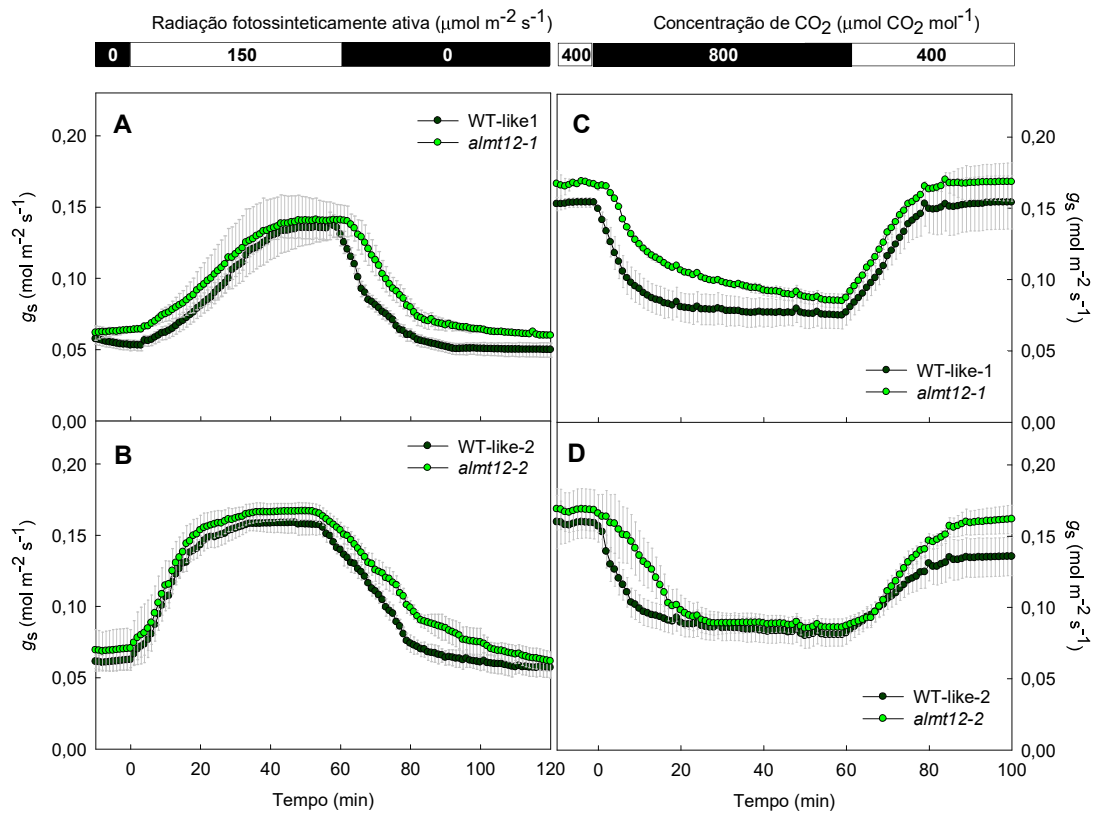


Figura 2: Cinéticas de abertura e fechamento estomático em resposta a luz e concentrações de CO_2 ambiente de linhas mutantes *almt12*. A condutância estomática (g_s) foi monitorada em *almt12-1* e *almt12-2* e seus correspondentes WT em resposta a alterações na intensidade luminosa (A e B, respectivamente), assim como em resposta a alteração nos níveis de CO_2 (C e D, respectivamente). Os dados representam a média \pm EP ($n = 10$) obtidos em dois ensaios independentes.

3.4 Perda de água em folhas destacadas

Como a velocidade de fechamento estomático é afetada tanto em plantas *almt12-1* quanto em *almt12-2* (Figura 2) e essas apresentam densidade estomática similar (Tabela 1), realizou-se um ensaio para avaliar a perda de água em rosetas destacadas. Inicialmente, tanto plantas *almt12-1* quanto *almt12-2* apresentaram taxas

de perdas semelhantes aos seus WT (Figura 3). No entanto, consistente com a cinética de fechamento mais lenta, plantas *almt12* apresentaram maiores perdas de massa fresca em relação ao seus WT correspondentes, ao longo do tempo. Dessa forma, após 240 min *almt12-1* e *almt12-2* tiveram 30% e 33% de perda de água, ao passo que, em plantas WT-like essas perdas chegaram a 26% e 29%, respectivamente. Em conjunto esses resultados confirmam a alteração na função estomática em mutantes *almt12* e que essa variação não é resultado de alterações na densidade estomática.

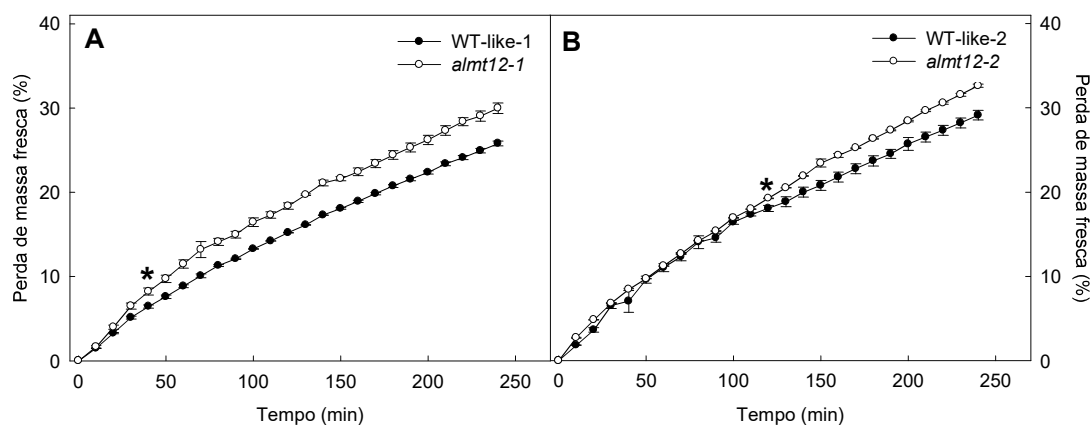


Figura 3: Perda de água em rosetas destacadas de linhas mutantes *almt12*. **(A)** para WT-like-1 e *almt12-1* e **(B)** WT-like-2 e *almt12-2*. Os dados referem-se à perda de massa fresca em relação à massa fresca inicial e representam a média \pm EP ($n = 8$) obtidos em dois ensaios independentes. Asterisco (*) indica o momento (em min) onde os valores das linhas mutantes mostram-se significativamente diferentes ($P < 0,05$) pelo teste t de *Student* em relação aos seus correspondentes WT.

3.5 Parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila a

Plantas mutantes exibiram uma tendência de maiores valores nos parâmetros instantâneos de trocas gasosas (Tabela 2). Assim, maiores valores de A_N , g_s e E foram observados em plantas mutantes *almt12-1* e *almt12-2*. De forma interessante, a

respiração no escuro (R_d) foi, em média, 40% superior nas linhas mutantes em relação aos seus WT. Estas diferenças não foram, no entanto, acompanhadas por mudanças na eficiência instantânea do uso da água (EUA).

A eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (FSII) (F_v/F_m), não diferiu entre os genótipos com valores entre 0,75 e 0,78. De forma semelhante, a eficiência de captura dos centros de reação (F_v'/F_m') não apresentou diferenças nos genótipos estudados. Por outro lado, utilizando-se dos dados de fluorescência, a fotorrespiração (R_p) e a taxa de transporte de elétrons (J_{flu}) foram estimadas sendo, em média, 30% e 14% maiores nas linhas mutantes, respectivamente.

Tabela 2: Variáveis instantâneas de trocas gasosas e variáveis derivadas da análise de fluorescência da clorofila *a* em plantas *almt12*. Valores representam as médias \pm EP (n =10) obtidas em dois ensaios independentes. Os valores que diferem significativamente dos seus respectivos tipo selvagem ($P<0,05$) pelo teste t de *Student* estão em negrito.

Parâmetros*	WT-like-1	<i>almt12 - 1</i>	WT-like-2	<i>almt12 - 2</i>
A_N ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	6,07 \pm 0,155	7,29 \pm 0,21	6,98 \pm 0,25	8,00 \pm 0,18
g_s ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0,19 \pm 0,01	0,24 \pm 0,01	0,22 \pm 0,01	0,24 \pm 0,02
E ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	4,08 \pm 0,04	4,15 \pm 0,08	3,59 \pm 0,18	4,24 \pm 0,14
EUA (A/E)	1,66 \pm 0,10	1,60 \pm 0,12	1,77 \pm 0,02	1,87 \pm 0,02
R_d ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0,85 \pm 0,10	1,29 \pm 0,17	0,66 \pm 0,14	1,28 \pm 0,13
R_p ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	2,31 \pm 0,18	3,54 \pm 0,24	2,4 \pm 0,20	3,31 \pm 0,14
F_v/F_m	0,78 \pm 0,02	0,76 \pm 0,01	0,76 \pm 0,04	0,75 \pm 0,01
F_v'/F_m'	0,31 \pm 0,019	0,29 \pm 0,012	0,29 \pm 0,013	0,31 \pm 0,009
J_{flu} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	62,9 \pm 1,2	76,9 \pm 5,2	63,8 \pm 0,8	71,1 \pm 0,12

* A_N : Fotossíntese líquida; E : transpiração, g_s : condutância estomática; EUA : eficiência instantânea do uso da água; C_i/C_a : razão da concentração interna de CO_2 em relação à concentração externa, R_p : fotorrespiração; F_v/F_m : eficiência fotoquímica máxima do FSII; F_v'/F_m' : eficiência de captura de energia dos centros de reação do FSII abertos; J_{flu} : taxa de transporte de elétrons estimada por parâmetros de fluorescência.

3.6 Caracterização fotossintética

Para caracterizar fotossinteticamente os genótipos em estudo, foram investigadas as respostas da A_N à irradiância (curva A_N/RFA) e à concentração interna de CO_2 (curvas A_N/C_i).

Curvas A_N/RFA foram obtidas (Figura 4) e ajustadas pelo modelo hiperbólico não-retangular, possibilitando a obtenção de alguns parâmetros (Tabela 3). De forma geral, tanto a irradiância de compensação (I_c) quanto a eficiência de uso da luz, determinada a partir do inverso do rendimento quântico aparente ($1/\phi$), foram semelhantes entre os genótipos. Por outro lado, a irradiância de saturação (I_s) e a taxa de assimilação líquida de carbono saturada pela luz (A_{RFA}) foram significativamente maiores apenas para *almt12-2* (aproximadamente 30%).

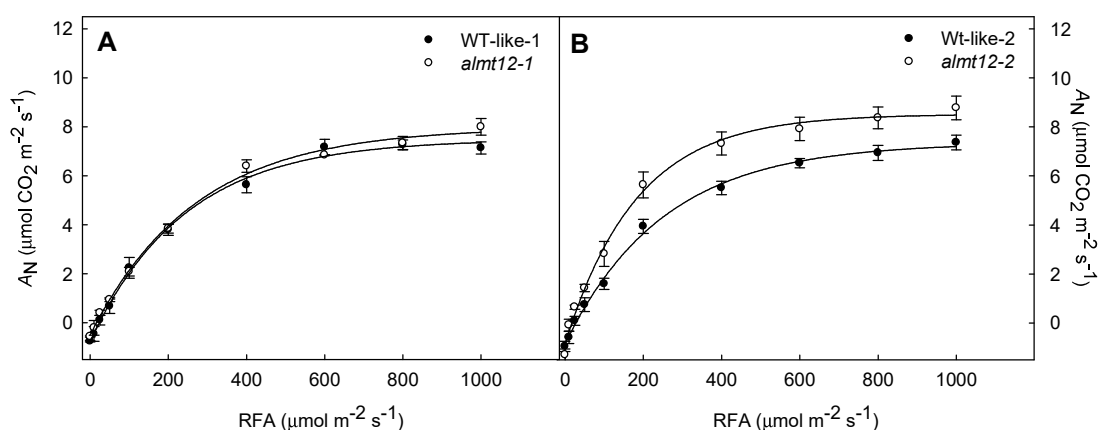


Figura 4: Curvas de fotossíntese líquida (A_N) em resposta a alterações na radiação fotossinteticamente ativa (RFA) de linhas mutantes *almt12*. **(A)** Curvas A_N/RFA para *almt12-1* e WT-like-1. **(B)** Curvas A_N/RFA para *almt12-2* e WT-like-2. Os dados estão apresentados como médias \pm EP (n=10) obtidas em dois ensaios independentes.

Tabela 3: Parâmetros fotossintéticos derivados de curvas de luz de plantas *almt12*. Valores representam as médias \pm EP (n =10) obtidas em dois ensaios independentes. Os valores que diferem significativamente dos seus respectivos tipo selvagem ($P < 0,05$) pelo teste t de *Student* estão em negrito.

Parâmetros*	WT-like-1	<i>almt12 - 1</i>	WT-like-2	<i>almt12 - 2</i>
$A_{\text{RFA}} (\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1})$	6,8 \pm 0,4	6,9 \pm 0,1	6,5 \pm 0,2	7,9 \pm 0,5
$I_c (\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1})$	20,7 \pm 0,3	22,2 \pm 1,4	26,0 \pm 1,6	24,9 \pm 0,6
$I_s (\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1})$	698,2 \pm 6,8	704,3 \pm 37,8	540,0 \pm 53,2	772,3 \pm 16,1
$1/\phi (\mu\text{mol fótons mol}^{-1} \text{ CO}_2)$	25,9 \pm 0,8	27,5 \pm 3,6	29,6 \pm 1,2	25,4 \pm 1,4

* 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

Em adição, curvas A_N/C_i foram obtidas e transformadas em curvas A_N/C_c . De forma interessante, sob concentração ambiente de CO_2 ($400 \mu\text{mol mol}^{-1}$), não foram observadas diferenças significativas entre os genótipos no que se refere a C_i e C_c (Tabela 4); no entanto, tomando pontos com maiores concentrações externas de CO_2 (C_a) em ambas as curvas, tanto C_i quanto C_c foram maiores nos mutantes, principalmente nas plantas *almt12-2*, apresentando valores médios de 1440 e 530 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$, ao passo que plantas WT-like-2 apresentaram valores médios de 1377 e 488 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ para C_i e C_c , respectivamente.

A C_c , assim como g_m , foram estimadas pela combinação de parâmetros fotossintéticos e de fluorescência da clorofila *a* (Tabela 4). Verifica-se que g_m mostrou clara tendência de aumento nas linhas mutantes (estatisticamente apenas na linha *almt12-2*), com valores, em média, 23% superiores aos encontrados para os respectivos WT.

Tabela 4: Caracterização fotossintética de plantas *almt12*. Valores representam as médias \pm EP (n = 10) obtidas em dois ensaios independentes. Os valores que diferem significativamente ($P < 0,05$) pelo teste t de *Student* estão em negrito.

Parâmetros*	WT-like-1	<i>almt12 - 1</i>	WT-like-2	<i>almt12 - 2</i>
C_i ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$)	349,4 \pm 2,7	351,5 \pm 5,4	348,8 \pm 2,4	351,4 \pm 4,7
C_c ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$)	164,1 \pm 13,7	221,4 \pm 8,9	179,0 \pm 9,5	186,8 \pm 7,1
g_m ($\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ bar}^{-1}$)	0,037 \pm 0,003	0,047 \pm 0,005	0,037 \pm 0,002	0,050 \pm 0,003
$V_{\text{cmax}_{C_i}}$ ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	26,6 \pm 0,9	32,7 \pm 1,2	29,8 \pm 0,4	35,9 \pm 0,7
$V_{\text{cmax}_{C_c}}$ ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	36,3 \pm 1,4	45,3 \pm 1,5	42,8 \pm 1,9	43,3 \pm 4,5
$J_{\text{max}_{C_i}}$ ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	55,2 \pm 1,2	66,4 \pm 1,4	57,5 \pm 0,8	75,8 \pm 1,2
$J_{\text{max}_{C_c}}$ ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	63,5 \pm 1,4	71,7 \pm 1,5	71,9 \pm 0,2	78,9 \pm 0,8
$J_{\text{max}_{C_i}} : V_{\text{cmax}_{C_i}}$	1,90 \pm 0,09	2,01 \pm 0,04	1,97 \pm 0,01	2,09 \pm 0,006
$J_{\text{max}_{C_c}} : V_{\text{cmax}_{C_c}}$	1,75 \pm 0,06	1,73 \pm 0,06	1,65 \pm 0,07	2,01 \pm 0,04

* C_i : concentração subestomática de CO_2 ; C_c : concentração cloroplastídica de CO_2 ; g_m : condutância mesofílica; $V_{\text{cmax}_{C_i}}$ ou C_c : velocidade máxima de carboxilação em base C_i ou C_c ; $J_{\text{max}_{C_i}}$ ou C_c : capacidade máxima de transporte de e^- em base C_i ou C_c .

Ao se analisar as porções finais das curvas A_N/C_i percebe-se que a taxa fotossintética máxima foi sempre superior em plantas *almt12-1* e *almt12-2* quando comparadas aos seus respectivos WT. Por outro lado, nas porções iniciais da curva, onde a fotossíntese é limitada pela taxa de carboxilação, resultados semelhantes entre os genótipos foram observados (Figura 5A e 5B). Adicionalmente, as curvas A_N/C_c mostraram-se, em termos relativos, similares às curvas A_N/C_i , embora diferenças nas porções finais das curvas, onde as mesmas são limitadas pela regeneração da RuBP e, por fim, pelo uso das trioses fosfato, tenham sido relativamente atenuadas. Em adição, os parâmetros derivados dessas curvas (V_{cmax} e J_{max}) foram sempre superiores para as linhas mutantes em relação aos WT correspondentes, independentemente da base de expressão (C_i ou C_c). Dessa forma, os valores foram em média 22 e 20%, 20 e 32% superiores em *almt12-1* e *almt12-1 2* para $V_{\text{cmax}_{C_i}}$ e $J_{\text{max}_{C_i}}$, respectivamente. Adicionalmente, em base C_c , verificaram-se valores em média 25% e 13% maiores

em *almt12-1* para $V_{\text{cmax_Cc}}$ e $J_{\text{max_Cc}}$, enquanto para *almt12-2*, apenas $J_{\text{max_Cc}}$ diferiu significativamente, em média, 10%. Ressalte-se ainda que os valores de $J_{\text{max_Ci}}$ corroboram grandemente com os valores encontrados para J_{flu} , estimado por meio dos parâmetros de fluorescência, particularmente em WT-like-2 e *almt12-2*. Ademais, a semelhança nas razões $J_{\text{max_Ci}} : V_{\text{cmax_Ci}}$ e $J_{\text{max_Cc}} : V_{\text{cmax_Cc}}$, com ligeiras tendências de maiores valores nas linhas mutantes (significativas somente *almt12-2*), sugere que, embora diferenças em A_N tenham sido verificadas, um balanço funcional adequado entre a taxa de carboxilação e o transporte de elétrons deve ter ocorrido.

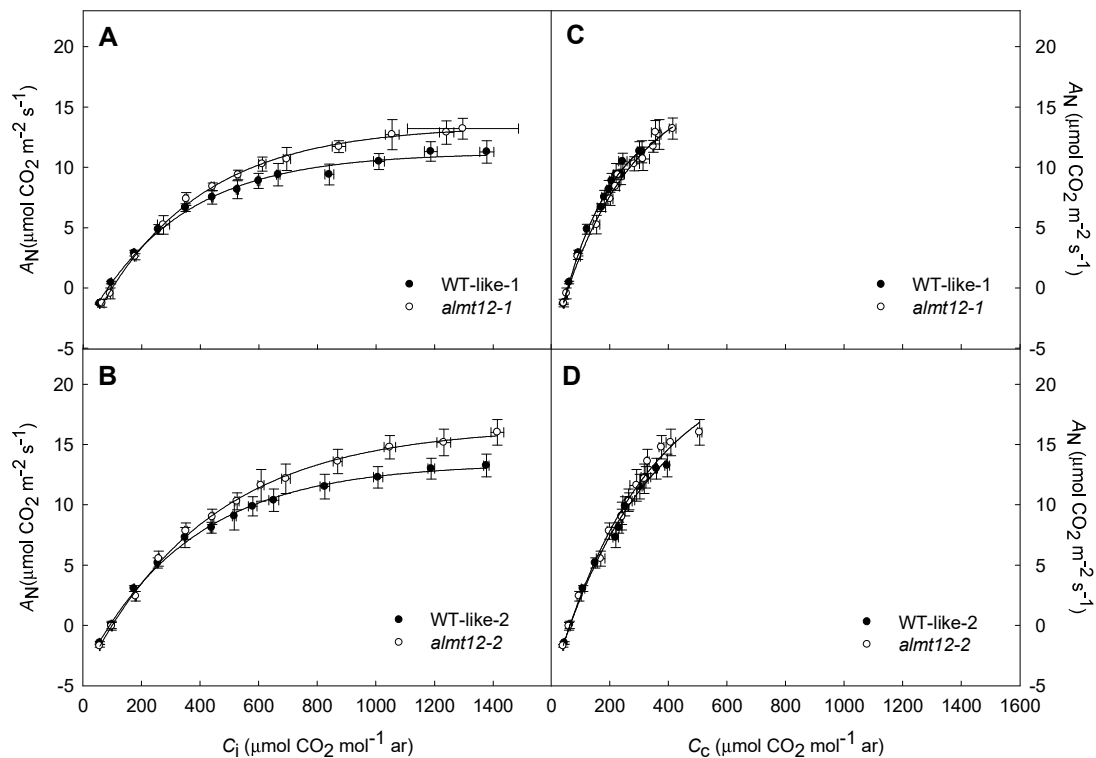


Figura 5: Curvas de resposta da fotossíntese líquida (A_N) a concentração subestomática (C_i) e cloroplastídica (C_c) de CO₂ de linhas mutantes *almt12*. (A) e (B) Curvas A_N/C_i e (C) e (D) Curvas A_N/C_c para WT-like 1/*almt12-1* e WT-like-2/*almt12-2*, respectivamente. Os dados representam as médias \pm EP (n=10) obtidas em dois ensaios independentes.

Utilizando-se os valores de A_N , g_s , g_m e das curvas A_N/C_c , uma análise quantitativa das limitações fotossintéticas foi realizada (Tabela 5). $V_{\text{cmax_Cc}}$ foi usada para estimar as limitações bioquímicas, haja vista, que os pontos até ou próximos a concentração ambiente de CO_2 ($400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), foram identificados como sendo limitados pela Rubisco. Como os maiores valores de A_N , g_s , g_m foram geralmente observados nas linhas mutantes (*almt12-1* e *almt12-2*), essas linhas foram então utilizadas como referência para calcular as limitações fotossintéticas relativas, observadas nas plantas WT. Essa análise revelou uma limitação relativa total de 24%, em ambas as linhas WT-like. Dessa redução, as limitações estomáticas (LER) e bioquímicas (LBR), pouco contribuem, apresentando valores médios de 4 e 5% em ambas as linhas WT-like. As maiores contribuições reveladas foram, portanto, mesofílicas (LMR), com valores de 15% para WT-like-1 e 2, o que implica em uma contribuição de 62% sobre as limitações relativas totais observadas (24%).

Tabela 5: Análise de limitações fotossintéticas relativas em plantas WT-like. As limitações fotossintéticas em plantas WT-like 1 e 2 são relativas às plantas *almt12-1* e *almt12-2*, respectivamente.

	Limitações relativas (%)			
	LER	LMR	LBR	LT
WT-like-1	5	15	4	24
WT-like-2	3	15	6	24

LT: limitação relativa total; LER: limitação estomática relativa; LMR: limitação mesofílica relativa; LBR: limitação bioquímica relativa.

3.7 Efeitos metabólicos da redução na expressão de *ALMT12*

Como as diferenças observadas nas trocas gasosas foram, em larga extensão, decorrentes de limitações mesofílicas com potenciais efeitos bioquímicos, as alterações metabólicas foram investigadas para melhor compreender possíveis

relações entre aquelas alterações e o transporte de ácidos orgânicos. De modo geral, compostos associados ao metabolismo N não apresentaram diferenças (Figuras 6 e 7), ao passo que os do C mostraram-se claramente alterados (Figuras 8 e 9). Em geral, não se observaram variações significativas na concentração de clorofilas, bem como na razão a/b (Figura 6). Em adição, as concentrações foliares de aminoácidos e proteínas (Figura 7) foram muito semelhantes nos genótipos em estudo.

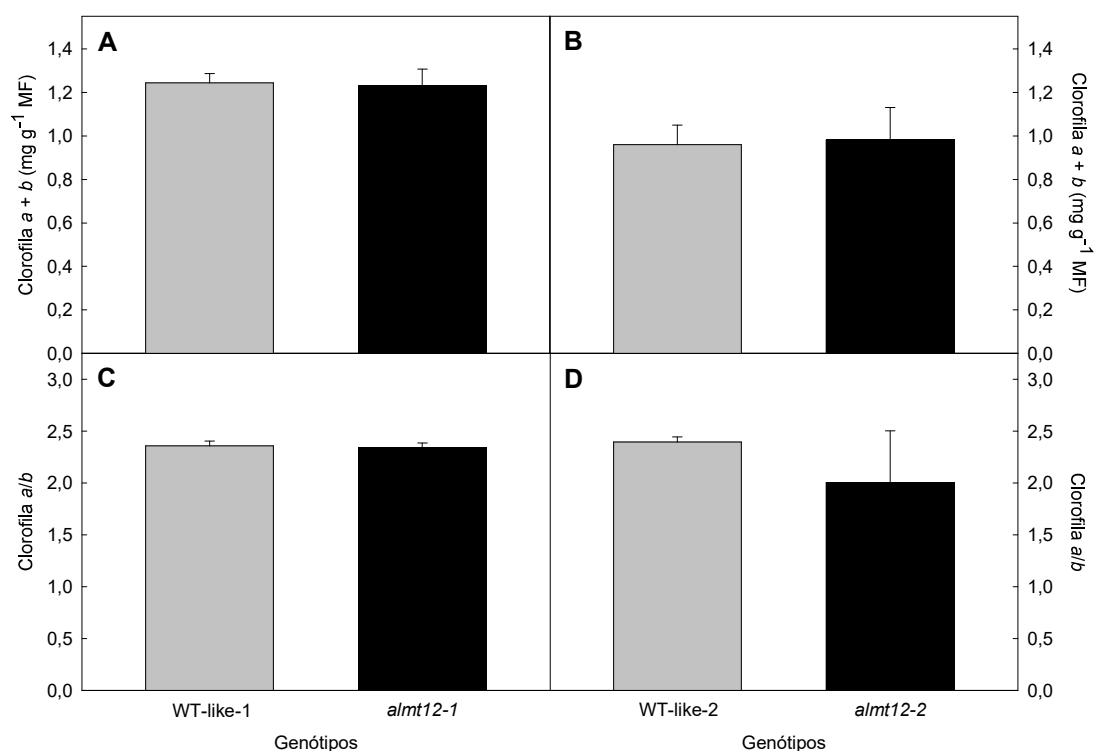


Figura 6: Teores de clorofila total ($a + b$), bem como a razão a/b de linhas mutantes *almt12*. (A) e (C) para WT-like-1 e *almt12-2*, (B) e (D) para WT-like-2 e *almt12-2*, respectivamente. Os dados representam médias \pm EP ($n = 5$).

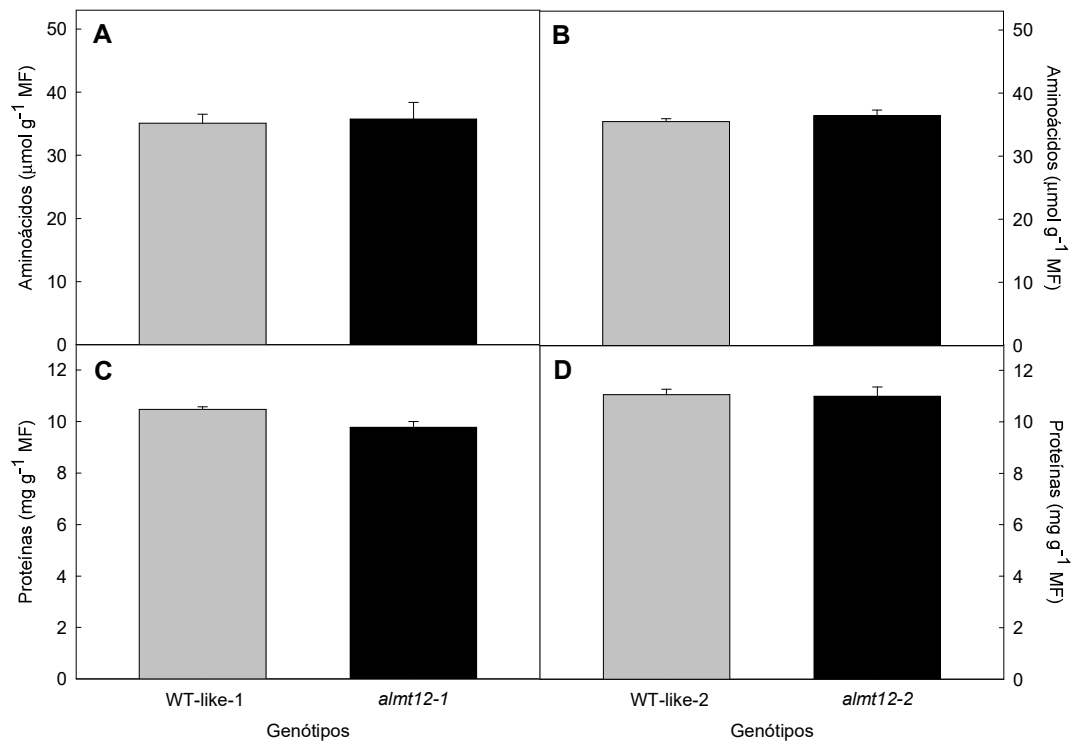


Figura 7: Concentração de aminoácidos livres e proteínas solúveis de linhas mutantes *almt12*. (A) e (B) aminoácidos para WT-like-1 e *almt12-1* e WT-like-2 e *almt12-2*. (C) e (D) proteínas para WT-like-1 e *almt12-1* e WT-like-2 e *almt12-2*, respectivamente. Os dados representam médias \pm EP (n = 5).

O padrão temporal da acumulo de amido e açúcares solúveis (Figura 8) foram similares em cada linha mutante em relação às WT correspondentes durante o ciclo diurno. Assim, linhas mutantes acumularam mais glicose, sacarose e amido, acumulando maiores concentrações ao final do período de luz e consumindo-os durante o período escuro, com níveis semelhantes aos das plantas WT ao final da noite. Registra-se ainda, como esperado, maior acúmulo de sacarose (Figura 8G e 8H) como açúcar de reserva, com valores ao final do período de luz em média 4 e 3 vezes e ainda 14 e 15 vezes superiores em relação aos de glicose (Figura 8C e 8D) e frutose (Figura 8E e 8F), em ambas linhas WT e *almt12*, respectivamente. Sugere-se que apesar das linhas mutantes apresentarem maiores teores de amido e açúcares, não houve retroinibição da fotossíntese devido ao acúmulo desses fotoassimilados.

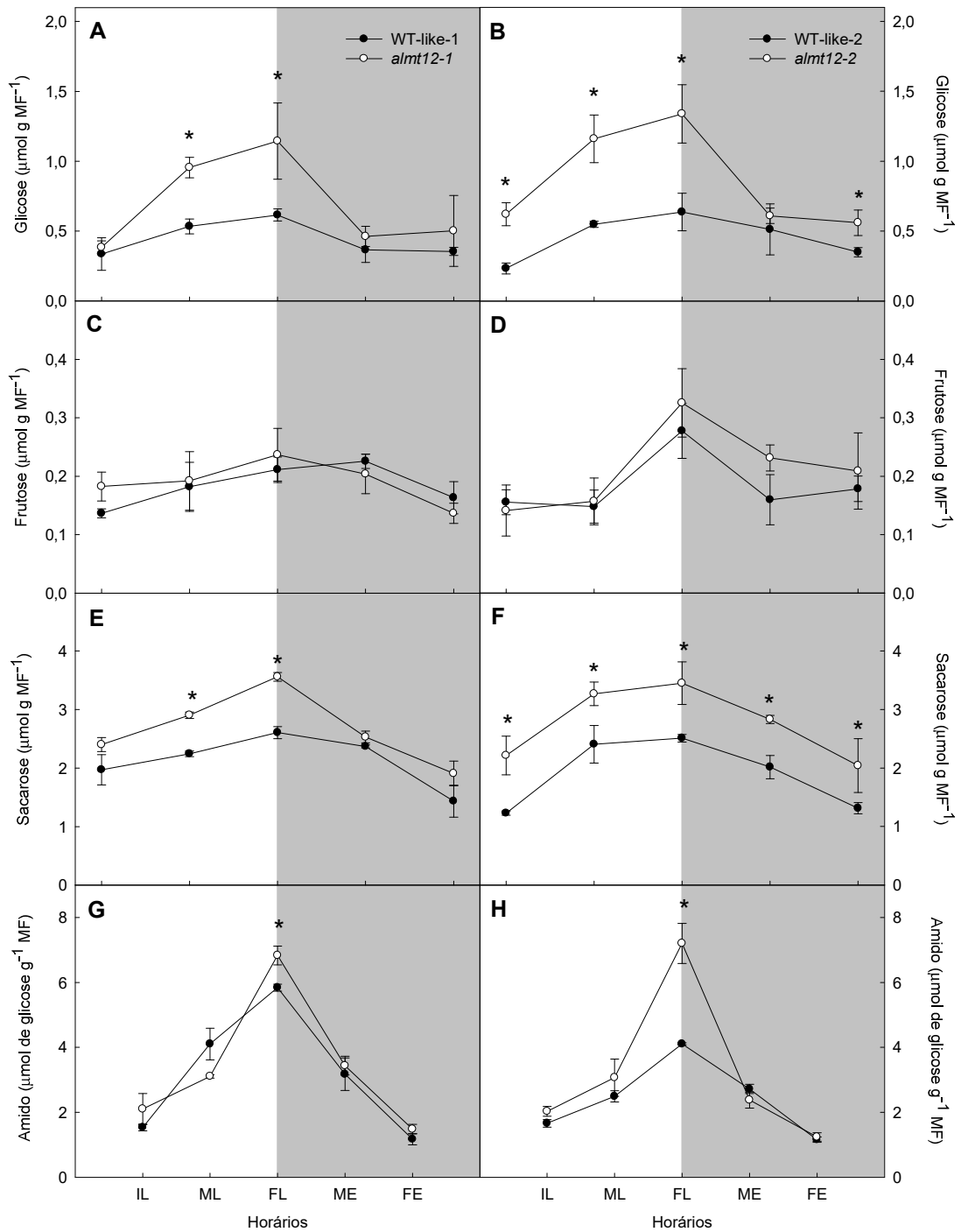


Figura 8: Teores de açúcares solúveis e amido de linhas mutantes *almt12*. (A) e (B) glicose; (C) e (D) frutose; (E) e (F) sacarose; (G) e (H) amido em WT-like-1 e *almt12-1* e em WT-like-2 e *almt12-2*, respectivamente. Os dados estão apresentados como médias \pm EP (n = 5). Asterisco (*) indica valores diferentes significativamente pelo teste t de *Student* (P<0,05) entre as linhas mutantes e seus WT correspondentes, em um mesmo ponto de coleta ao longo do ciclo luz/escuro.

O padrão de variação diurna de malato e fumarato foi bastante similar ao observado para açúcares solúveis e amido. As diferenças observadas foram, no entanto, mais atenuadas entre as plantas WT e mutantes, sendo significativas apenas ao meio e ao final do período luminoso para fumarato, e no meio do período de luz para malato (Figura 9A e 9B). Os teores de fumarato foram sempre superiores aos de malato, diferença essa, mais pronunciada ao final do período de luz, quando os teores de fumarato foram cerca de 2 vezes maiores que os teores de malato.

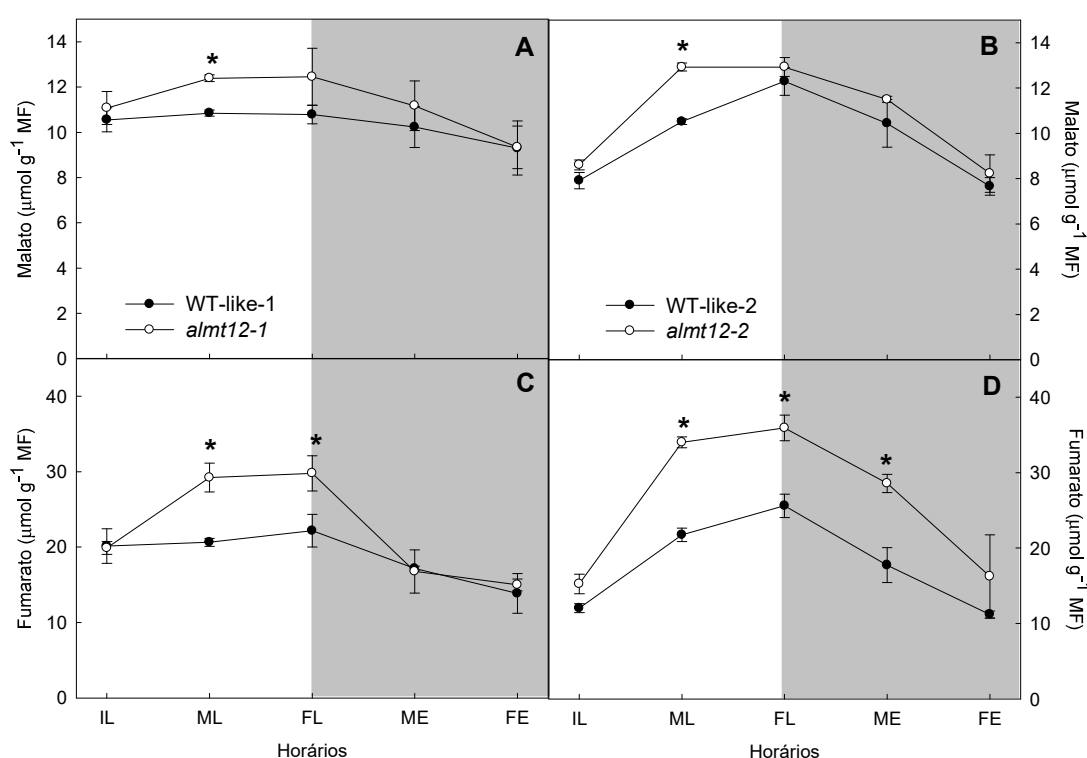


Figura 9: Concentração de ácidos orgânicos de linhas mutantes *almt12*. (A) e (B) malato; (C) e (D) fumarato para WT-like-1 e *almt12-1* e para WT-like-2 e *almt12-2*, respectivamente. Os dados representam médias \pm EP (n = 5). Asterisco (*) indica valores diferentes significativamente pelo teste t de Student ($P < 0,05$) entre as linhas mutantes e seus WT correspondentes, em um mesmo ponto de coleta ao longo do ciclo luz/escuro.

3.8 Atividade enzimática em resposta a redução na expressão de ALMT12

Embora variações na fotossíntese tenham sido observadas no presente estudo a análise das atividades catalíticas máximas de algumas enzimas importantes do metabolismo fotossintético não revelou diferenças para Rubisco e desidrogenase do gliceraldeído 3-fosfato, ao passo que a atividade máxima da transcetolase foi maior nas plantas *almt12-1* e *almt12-2* (33% e 16%, respectivamente) em relação aos seus WT (Tabela 6). Em adição, a atividade catalítica máxima da desidrogenase málica dependente de NADP (NADP-MDH), uma importante enzima indicadora do estado redox do cloroplasto, não sofreu alterações. Em relação ao metabolismo respiratório, apesar de uma clara tendência de aumento em ambas as enzimas estudadas, cinase do fosfoglicerato (PGK) e desidrogenase málica dependente de NAD (NAD-MDH), não foram observadas diferenças significativas.

Tabela 6: Atividade enzimática em plantas *almt12* no meio do período luminoso. Valores representam as médias \pm EP (n = 5). Os valores que diferem significativamente ($P < 0,05$) pelo teste t de *Student* estão em negrito.

Enzimas	nmol min ⁻¹ g ⁻¹ MF	
	WT-like-1	WT-like-2
Rubisco inicial	946,4 \pm 69,2	1078,0 \pm 105,2
Rubisco total	1450,9 \pm 71,3	1629,5 \pm 24,7
Rubisco-estado de ativação	66,7 \pm 1,9	66,5 \pm 7,4
Transcetolase	303,8 \pm 13,9	404,9 \pm 8,9
NADP-GAPDH	37,3 \pm 1,7	74,0 \pm 1,8
NADP-MDH inicial	39,0 \pm 1,7	40,6 \pm 2,4
NADP-MDH total	63,8 \pm 4,5	65,9 \pm 4,2
NADP-MDH - estado de ativação	62,1 \pm 3,9	58,8 \pm 5,8
Fosfoglicerato cinase*	12,5 \pm 0,4	13,8 \pm 0,6
NAD-MDH*	24,7 \pm 0,7	27,0 \pm 0,9

*valores expressos em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MF}$; GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; MDH: malato desidrogenase

4. DISCUSSÃO

Embora o movimento de íons das células-guardas para seu entorno, seja reconhecidamente importante durante os movimentos estomáticos, pouco ou nada se sabe acerca do papel do metabolismo dos ácidos orgânicos (e.g. malato e fumarato) durante tais movimentos. Saliente-se que a importância desses ácidos na regulação da abertura estomática foi recentemente sugerida (Ferne & Martinoia, 2009; Meyer et al., 2010a; Araújo et al., 2011b), no entanto, a hierarquia molecular e metabólica regulando este tipo celular altamente especializado não é ainda completamente esclarecida. Para investigar o papel desempenhado pelo transporte de ácidos orgânicos nos movimentos estomáticos, utilizou-se neste trabalho plantas mutantes de *Arabidopsis* com redução no transporte de ácidos orgânicos mediado por *AtALMT12*. Essa redução no transporte de ácidos orgânicos foi anteriormente demonstrada por Meyer et al. (2010b). Os resultados aqui apresentados reforçam a importância de *AtALMT12* para a regulação dos movimentos estomáticos e adicionam uma função, não reconhecida anteriormente, associada a aspectos difusivos e metabólicos.

4.1 AtALMT12 é um importante canal de ânions necessário para a adequada regulação do fechamento estomático

No presente estudo, primeiramente demonstrou-se que a perda funcional de *AtALMT12* (Figura 1) ocasionou fechamento estomático mais lento em resposta ao escuro e à alta concentração de CO₂ (Figura 2) em duas linhas independentes. Esta redução na velocidade de fechamento estomático, possivelmente afeta também a

resposta dessas plantas ao déficit hídrico, como observado pela maior perda de água das rosetas destacadas nessas (Figura 3) sem, contudo, afetar a densidade estomática (Tabela 1). Embora não se tenha observado diferenças acentuadas na cinética de abertura estomática, houve uma tendência de uma mais rápida e maior abertura dos estômatos (Figura 2 e Tabela 2). Em adição, análises de trocas gasosas revelaram um atraso e não completo fechamento estomático em plantas com redução na expressão de *AtALMT12*. Estes resultados, juntamente com os obtidos em outros trabalhos (Meyer et al., 2010b; Sasaki et al., 2010), fornecem fortes evidências de que *AtALMT12* é necessário para um eficiente fechamento estomático.

Como previamente mencionado, os ácidos orgânicos, em particular o malato, vêm sendo apontados como um dos principais reguladores do mecanismo pelo qual as células-guarda ajustam os seus movimentos (Van Kirk & Raschke, 1978; Hedrich & Marten, 1993; Hedrich et al., 1994; Roelfsema et al., 2002; Raschke, 2003; Nunes-Nesi et al., 2007; Araújo et al., 2011c). Durante a abertura estomática, malato é acumulado, sendo seu transporte mediado pelo transportador ABCB14 em *Arabidopsis thaliana* (Lee et al., 2008). Esse transportador garante o influxo de malato proveniente da solução apoplástica para dentro das células-guarda. Entretanto o malato pode também ser sintetizado por meio da degradação de amido nessas células (Vavasseur & Raghavendra, 2005). Recentemente De Angeli et al. (2013) demonstraram que o malato atua não apenas como osmorregulador, mas também como metabólito de sinalização, aumentando a sensibilidade de um canal vacuolar da família ALMT, o *AtALMT9*, responsável pelo acúmulo de cloreto, outro importante íon regulador dos movimentos estomáticos. Por outro lado, durante o fechamento estomático, a saída desses osmorreguladores, em larga escala via canais iônicos, é necessária para que ocorra um aumento no potencial hídrico das células-guarda,

concomitantemente com a saída de água e redução do poro estomático (Schroeder et al., 2001; Kim et al., 2010; Araújo et al., 2011a; Araújo et al., 2011c). Em adição, o próprio metabolismo do malato, em que a sua descarboxilação pode ocorrer pela ação da MDH, formando oxalacetato ou pela formação direta de piruvato mediada pela enzima málica, tem se mostrado fundamental para regular o fechamento dos estômatos (Penfield et al., 2012). Nesse contexto, *AtALMT12* desempenha um importante papel, permitindo o efluxo de malato das células-guarda para o apoplasto. Concomitante a essas informações e considerando que alterações nos movimentos estomáticos (Figuras 2 e 3) culminaram com incrementos na AF e na TCR (Tabela 1), independentemente de alterações na densidade estomática (Tabela 1) e na concentração de pigmentos fotossintéticos (Figura 7), é plausível sugerir que mecanismos moleculares e metabólicos tenham ocorrido, possibilitando uma reprogramação metabólica e molecular em resposta a variação na regulação estomática, nas condições de crescimento do presente trabalho. Cumpre mencionar que essas observações não se traduzem necessariamente em benefícios ao crescimento também em condições sub-ótimas, pelo menos no que diz respeito ao metabolismo de ácidos orgânicos e/ou mitocondrial como um todo (Araújo et al., 2013).

4.2 Expressão de *almt12* altera não apenas aspectos estomáticos, mas também difusionais em *Arabidopsis thaliana*

A capacidade fotossintética vegetal foi, por um longo tempo, considerada como sendo limitada somente pela velocidade de difusão do CO₂ através dos poros estomáticos e da capacidade da maquinaria fotossintética em converter a energia

luminosa em energia bioquímica (Flexas et al., 2012). No entanto, o caminho que o CO₂ absorvido pelos poros estomáticos percorre até alcançar os sítios de carboxilação da Rubisco nos cloroplastos pode se tornar um importante fator de limitação ao processo fotossintético, devido às diversas barreiras encontradas nessa rota de difusão. Assim, a g_m , anteriormente considerada como sendo grande o bastante para ter um impacto negligenciável sobre a fotossíntese (Farquhar et al., 1980), tem recentemente se tornado um ponto chave para explicar limitações ao processo fotossintético (Bernacchi et al., 2002; Flexas et al., 2007a; Bown et al., 2009; Niinemets et al., 2009; Jin et al., 2011; Scafaro et al., 2011; Detmann et al., 2012; Flexas et al., 2012; Flexas et al., 2013; Martins et al., 2013). Como um todo, os resultados aqui obtidos demonstram uma maior capacidade de fixação de CO₂ nas linhas mutantes em relação aos WT correspondentes, haja vista que maiores V_{cmax_Ci} ou C_c , e J_{max_Ci} ou C_c foram observadas (Tabelas 4). Assim, a fotossíntese, relacionada a maiores g_m nas linhas mutantes, pode explicar, ao menos parcialmente, o maior crescimento observado nessas plantas (Tabela 1). Os valores encontrados para as variáveis aqui apresentadas assemelham-se aos encontrados em plantas de *Arabidopsis* com 42 a 46 dias de idade após a germinação (Flexas et al., 2007b).

A g_m pode ser influenciada, dentre outros fatores, pela ação de anidrases carbônicas, que alteram a difusão de CO₂ (Price et al., 1994; Williams et al., 1996; Zeebe, 2011), atividade de aquaporinas, as quais podem aumentar a permeabilidade das membranas ao CO₂ (Uehlein et al., 2008; Heckwolf et al., 2011) e pela distância a ser percorrida no caminho até os sítios de carboxilação da Rubisco, ou seja, pelas características anatômicas das folhas. Nesse contexto, uma relação bastante utilizada para caracterizar essa limitação física é a razão de massa seca por unidade de área, que aumenta em função do aumento da espessura das paredes celulares, diminuindo a

velocidade de difusão do CO₂ (Flexas et al., 2008; Niinemets et al., 2009; Flexas et al., 2012). Assim, um aumento nessa razão levaria a uma redução na AFE e a consequente redução em g_m . De fato, os valores encontrados no presente trabalho corroboram com essa hipótese, tendo em vista que plantas *almt12* apresentaram maiores AFE e, em consequência, maiores g_m quando comparadas aos seus WT. No entanto, essa relação entre caracteres anatômicos e g_m nem sempre deve ser associada a espessura das paredes celulares do mesófilo, podendo ser também alterada por condições ambientais (Tosens et al., 2012).

As maiores taxas fotossintéticas dos mutantes *almt12* em relação aos seus respectivos WT aqui observadas são consistentes com observações prévias (Meyer et al., 2010b; Sasaki et al., 2010). Nessas plantas, maiores A_N com acréscimos correspondentes em g_s e g_m e pouca ou nenhuma alteração na I_s e I_c , mas com maiores taxas fotossintéticas máximas saturadas por CO₂ sugerem que, de fato, a capacidade do ciclo de Calvin-Benson é alterada em função da perda de *AtALMT12*. Assim, maiores A_N nas plantas mutantes devem ter sido, em larga extensão, consequência de menores limitações fotoquímicas, mesofílicas e bioquímicas à fotossíntese. Em se tratando de limitações à fotossíntese, em média, g_m reduz cerca de 40%, em termos absolutos, a concentração de CO₂ entre a atmosfera e os sítios de carboxilação (Warren, 2008b). Nesse sentido, de acordo com a análise de limitações fotossintéticas, a contribuição mesofílica relativa, no presente estudo foi de 15% e se mostrou de maior importância para as limitações relativas totais (24%) em ambas linhas WT (Tabela 5). Adicionalmente, estudos relativos à anatomia foliar desses mutantes, bem como de seus WT, serão de suma importância para confirmar se as alterações em g_m de plantas *almt12-1* e *almt12-2* são realmente governadas por mudanças anatômicas nessas folhas, ou se estariam associadas a um maior

investimento de N para o mesófilo, com aumento da ação de proteínas envolvidas no aumento de g_m , tais como anidrases carbônicas, aquaporinas e/ou outras proteínas que poderiam influenciar g_m (Buckley & Warren, 2013). Cabe destacar, que a relação $g_s - g_m$ pode refletir em uma forte coordenação entre A_N e g_m ou ainda em uma tendência de g_m compensar g_s em situações como deficiência hídrica, onde g_s parece ser mais afetada que g_m (Warren, 2008a; Duan et al., 2009; Vrábl et al., 2009; Galmés et al., 2011; Galmés et al., 2013), aumentando dessa forma a *EUA*, o que não foi observado no presente trabalho, haja vista, que aumentos em g_s foram acompanhados de aumentos paralelos em g_m (Tabela 2 e 4).

Medidas instantâneas dos parâmetros de trocas gasosas apresentaram valores similares aos já relatados na literatura para *Arabidopsis*, tanto para A_N (Lake, 2004; Walters et al., 2004; Flexas et al., 2007b; Bermúdez et al., 2012), quanto para g_s (Flexas et al., 2007; Bermúdez et al., 2012) e E (Boccalandro et al., 2012). Além disso, variações em g_m têm demonstrado forte impacto, com correlações positivas, sobre a fotossíntese e o crescimento (Niinemets et al., 2009; Detmann et al., 2012; Adachi et al., 2013; Flexas et al., 2013). Dessa forma, pelo menos nas condições experimentais do presente estudo, g_m contribuiu de forma substancial para aumentos na taxa fotossintética em plantas *almt12*, com reflexos diretos no crescimento, sem contudo, alterar a eficiência do uso da água nessas plantas.

4.3 Alteração na capacidade fotossintética em plantas com redução na expressão de almt12 promove mudanças metabólicas

Evidências adicionais para o papel dos ácidos orgânicos na regulação do movimento estomático, com fortes impactos no crescimento e no metabolismo

respiratório e fotossintético, foram recentemente relatadas em tomate (Nunes-Nesi et al., 2007; Araújo et al., 2011c) e em *Arabidopsis* (Fuentes et al., 2011). Assim, embora não diretamente mensurado neste trabalho, as concentrações dos ácidos orgânicos no apoplasto e no protoplasto indicam uma correlação negativa entre a concentração de malato e fumarato e a condutância estomática, tendo o malato uma maior contribuição para as respostas observadas, ao menos em plantas de tomate (Nunes-Nesi et al., 2007; Araújo et al., 2011c). Essas informações associadas com resultados obtidos para o transportador de malato *AtABCB14* (Lee et al., 2008), fornecem fortes evidências de que as concentrações de malato e fumarato no apoplasto podem modular o funcionamento das células-guarda e, dessa forma, influenciar a abertura e fechamento estomático com efeito direto no metabolismo de forma geral. No entanto, de forma, até certo ponto surpreendente, pouco se sabe como a perda de função dos genes que codificam proteínas transportadoras (canais e transportadores) de íons envolvidos nos movimentos estomáticos influenciaria o metabolismo. Os resultados aqui apresentados demonstram, de forma convincente, que alterações no transporte de ácidos orgânicos promovem mudanças substanciais no metabolismo em *Arabidopsis* sob condições ótimas de crescimento. Assim, de modo geral, o comportamento diurno de acúmulo de hexoses, sacarose e amido é consistente com observações prévias em *Arabidopsis* (Gibon et al., 2004b; Smith & Stitt, 2007; Gibon et al., 2009; Graf et al., 2010; Pal et al., 2013) e sugere que as alterações nos níveis de hexoses não foram decorrentes de aumentos relativos na degradação de sacarose ou amido, haja vista que foram observados maiores acúmulos, ao final do período luminoso, sem diferenças ao final do período de escuro nas linhas mutantes em relação aos seus respectivos WT (Figuras 8). Estes resultados corroboram com as maiores A_N observadas nessas linhas mutantes (Tabela 2), o que

possivelmente levou ao maior acúmulo de fotoassimilados que, por sua vez, foram degradados a maiores taxas no período de escuro, maiores R_d (Tabela 2), de modo a suportar o maior acúmulo de biomassa observado nas linhas mutantes.

Plantas *almt12* acumulam maiores quantidades de ácidos orgânicos, particularmente fumarato, ao final do período luminoso, com pequena ou nenhuma diferença ao final do período noturno (Figura 9). Fumarato é reconhecidamente uma fonte alternativa e flexível de fotoassimilados em *Arabidopsis* (Chia et al., 2000; Pracharoenwattana et al., 2010). A observação de que fumarato é encontrado em níveis consideravelmente altos em *A. thaliana* em comparação com outras espécies vegetais (Araújo et al., 2011b) fornece adicional evidência que fumarato constitui uma fração significativa do C fixado nessa espécie, de modo que esse ácido orgânico possa também ser um importante regulador dos movimentos estomáticos em *Arabidopsis*. Assim, o aumento na atividade e/ou conteúdo de enzimas relacionadas com a síntese e metabolismo desses ácidos orgânicos, tais como SDH, fumarase, MDH, enzima málica e fosfoenolpiruvato carboxilase – PEPC (Laporte et al., 2002; Nunes-Nesi et al., 2007; Tschoep et al., 2009; Araújo et al., 2011c), poderiam explicar o aumento nas concentrações de malato e fumarato observado em *almt12*, acoplando, dessa forma, o metabolismo respiratório ao fotossintético (Nunes-Nesi et al., 2007; Araújo et al., 2011c; Araújo et al., 2013).

É importante ressaltar que as variações das taxas fotossintéticas e no crescimento nas plantas *almt12*, não estiveram associadas a diferenças na concentração de pigmentos fotossintéticos avaliados, bem como na razão clorofila *a/b* e nas concentrações foliares de aminoácidos e proteínas totais (Figuras 6 e 7). Curiosamente, a relação entre conteúdo de aminoácidos e crescimento se dá de forma inversa, mesmo sob deficiência de N, como relatado por Tschoep et al. (2009), em

que a diminuição no crescimento em função de baixos níveis de N foi notada com o concomitante acúmulo de aminoácidos, sem contudo alterar os níveis diurnos de proteínas ou clorofilas e, ainda, sem mudanças no estado de ativação da Rubisco. Assim, associando o fato de que no presente trabalho plantas *almt12* apresentaram maior crescimento, sem, contudo alterar os níveis de aminoácidos, proteínas solúveis, bem como na ativação da Rubisco, sugere-se que a não alteração nos teores aminoácidos em plantas *almt12*, foi devido à realocação desses, para garantir a síntese proteica e de outros compostos nitrogenados, com o intuito de suportar as maiores taxas de crescimento observadas nessas plantas. Além disso, semelhanças nas razões $J_{\max} : V_{c\max}$ (Tabela 4) associadas a pequenas variações na atividade de enzimas do metabolismo fotossintético como a Rubisco, NADP-GAPDH e transcetolase são condizentes com balanço funcional fotossintético, haja vista que as plantas são capazes de ajustar o balanço entre Rubisco e os outros componentes da maquinaria fotossintética, de forma a manter um equilíbrio entre reações enzimáticas (e.g Rubisco) e de captura de luz (e.g. pigmentos) (Stitt & Schulze, 1994).

Os resultados aqui apresentados demonstram uma alta correlação entre a degradação do amido, utilização de malato e fumarato como fonte de C para a respiração e maiores taxas de crescimento, em acordo com os resultados encontrados por Gibon et al. (2009). Ainda, associado ao fato de que aumentos na fotorrespiração, tenham sido observados em plantas *almt12*, indicando grande recuperação do C perdido pela atividade oxigenase da Rubisco (Bauwe et al., 2010), podem explicar, ao menos parcialmente, aumentos significativos no crescimento, como os observados naquelas plantas. Estes resultados indicam que, apesar da alocação dessas fontes de C ser provavelmente regulada de modos distintos, sua utilização é fortemente coordenada pela planta.

Embora tenham sido observadas maiores taxas de assimilação líquida de C, bem como um aparato fotossintético aparentemente mais ativo com maiores velocidade de carboxilação (Tabela 4) e maiores taxas de transporte de elétrons em plantas *almt12* (Tabela 2 e 4), poucas diferenças foram observadas na atividade catalítica de importantes enzimas relacionadas com o processo fotossintético e respiratório (Tabela 6). Somente transcetolase, apresentou maior atividade nas duas linhas mutantes em relação aos seus WT, fato possivelmente associado ao maior uso das trioses fosfato nessas plantas, já que essa enzima está diretamente associada à fase de regeneração da RuBP, a partir dessas trioses durante o ciclo de Calvin-Benson (Stitt et al., 2010). De forma interessante, esperavam-se maiores taxas de ativação da Rubisco em linhas *almt12*, haja vista que maiores g_m , A_N e $V_{c,max}$ foram encontradas nessas plantas; no entanto, curiosamente a atividade da Rubisco não sofreu alteração nas linhas mutantes. Os resultados do presente estudo divergem dos encontrados por Araújo et al. (2011b), onde observaram, maior atividade da Rubisco em linhas de tomate com redução na expressão de SDH. Nessas plantas maiores A_N e g_s foram verificadas via mediação de ácidos orgânicos no movimento dos estômatos. No entanto, maiores g_m , apresentadas nas linhas *almt12* do presente estudo, poderiam explicar as diferenças encontradas, ou seja, provavelmente há uma alocação diferencial do N total para o N fotossintético (e.g. Rubisco). De fato, maiores investimento em Rubisco levam a aumentos na área superficial do cloroplasto culminando com aumentos em g_m (Buckley & Warren, 2013), como observado (Tabela 4), porém sem alterar o estado de ativação da Rubisco (Tabela 6). Estes resultados sugerem que a regulação ineficiente dos movimentos estomáticos em plantas *almt12*, associada às maiores taxas de assimilação de CO₂, se traduzem também em alterações no metabolismo central, devido a um maior fluxo no ciclo de

Calvin-Benson apresentando, assim, maiores taxas de crescimento relativo, associadas, não necessariamente a maior ativação das enzimas desse ciclo, mas sim pelo aumento no conteúdo das mesmas.

5. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

A importância dos ácidos orgânicos como importantes metabólitos responsáveis pela regulação dos movimentos estomáticos tem sido demonstrada. Contudo, até o momento, pouco se sabe acerca das implicações fisiológicas, metabólicas e moleculares em plantas que possuem o transporte e/ou metabolismo desses ácidos orgânicos alterado. Os resultados aqui apresentados sugerem que o transporte deficiente de ácidos orgânicos das células-guarda para seu entorno, devido a redução na expressão de *AtALMT12*, é de fundamental importância para o eficiente fechamento dos estômatos. Incrementos substanciais no crescimento em plantas perdendo funcionalmente *AtALMT12* são associadas por alterações no processo fotossintético dessas plantas, atrelados, principalmente, ao aumento em g_m . Mudanças no metabolismo do C em plantas *almt12* foram evidentes, sendo associadas, em larga extensão, aos aumentos na taxa de assimilação líquida de CO₂ sem, contudo, alterar a atividade catalítica de enzimas importantes envolvidas no processo fotossintético e respiratório. Cumpre mencionar que estudos mais detalhados acerca dessas alterações fisiológicas e metabólicas, bem como anatômicas, para confirmar se as características do mesófilo realmente estariam relacionados com o aumento da difusão do CO₂ nessas plantas, são necessários. Além disso, é de suma importância avaliar se a mutação em *AtALMT12* provocaria efeitos adicionais, particularmente em outros genes que codificam proteínas

transportadoras também envolvidas no transporte de íons durante os movimentos dos estômatos. Isso é necessário, pois se evidencia que o transporte de metabólitos, incluindo os ácidos orgânicos, está integrado em uma rede celular complexa. Registre-se que essa integração permite uma resposta pronta e rápida às variações ambientais, com vistas à economia de nutrientes e água, bem como a regulação do metabolismo no meio celular em situações de estresses, de maneira particular aqueles reconhecidamente capazes de afetar a fotossíntese e os movimentos estomáticos, que devem ser foco de estudos futuros. Em síntese, os resultados aqui apresentados fornecem um progresso no entendimento dos processos metabólicos e moleculares associados ao controle dos movimentos estomáticos; entretanto, a expansão desse estudo fornecerá ferramentas básicas e necessárias, na busca do desenvolvimento de plantas que melhor utilizem os recursos hídricos e nutricionais disponíveis.

6. REFERÊNCIAS

Adachi S, Nakae T, Uchida M, Soda K, Takai T, Oi T, Yamamoto T, Ookawa T, Miyake H, Yano M, Hirasawa T (2013) The mesophyll anatomy enhancing CO₂ diffusion is a key trait for improving rice photosynthesis. *J Exp Bot* **64**: 1061-1072

Alhagdow M, Mounet F, Gilbert L, Nunes-Nesi A, Garcia V, Just D, Petit J, Beauvoit B, Fernie AR, Rothan C, Baldet P (2007) Silencing of the mitochondrial ascorbate synthesizing enzyme L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase affects plant and fruit development in tomato. *Plant Physiol* **145**: 1408-1422

Araújo W, Nunes-Nesi A, Fernie A (2013) On the role of plant mitochondrial metabolism and its impact on photosynthesis in both optimal and sub-optimal growth conditions. *Photosynth Res*: DOI: 10.1007/s11120-013-9807-4

Araújo WL, Fernie AR, Nunes-Nesi A (2011a) Control of stomatal aperture: a renaissance of the old guard. *Plant Signal Behav* **6**: 1305-1311

Araújo WL, Nunes-Nesi A, Fernie AR (2011b) Fumarate: Multiple functions of a simple metabolite. *Phytochemistry* **72**: 838-843

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 (2011c) 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

Barbier-Brygoo H, De Angeli A, Filleur S, Frachisse JM, Gambale F, Thomine S, Wege S (2011) Anion channels/transporters in plants: from molecular bases to regulatory networks. *Annu Rev Plant Biol* **62**: 25-51

Bauer H, Ache P, Lautner S, Fromm J, Hartung W, Al-Rasheid KA, Sonnewald S, Sonnewald U, Kneitz S, Lachmann N, Mendel RR, Bittner F, Hetherington AM, Hedrich R (2013) The stomatal response to reduced relative humidity requires guard cell-autonomous ABA synthesis. *Curr Biol* **23**: 53-57

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

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

Bergmann DC, Sack FD (2007) Stomatal development. *Annu Rev Plant Biol* **58**: 163-181

Bermúdez MÁ, Galmés J, Moreno I, Mullineaux PM, Gotor C, Romero LC (2012) Photosynthetic adaptation to length of day is dependent on S-sulfocysteine synthase activity in the thylakoid lumen. *Plant Physiol* **160**: 274-288

Bernacchi CJ, Portis AR, Nakano H, von Caemmerer S, Long SP (2002) Temperature response of mesophyll conductance. Implications for the determination of Rubisco enzyme kinetics and for limitations to photosynthesis in vivo. *Plant Physiol* **130**: 1992-1998

Bernacchi CJ, Singsaas EL, Pimentel C, Portis Jr AR, Long SP (2001) Improved temperature response functions for models of Rubisco-limited photosynthesis. *Plant Cell Environ* **24**: 253-259

Berry JA, Beerling DJ, Franks PJ (2010) Stomata: key players in the earth system, past and present. *Curr Opin Plant Biol* **13**: 232-239

Boccalandro HE, Giordano CV, Ploschuk EL, Piccoli PN, Bottini R, Casal JJ (2012) Phototropins but not cryptochromes mediate the blue light-specific promotion of stomatal conductance, while both enhance photosynthesis and transpiration under full sunlight. *Plant Physiol* **158**: 1475-1484

Bown HE, Watt MS, Mason EG, Clinton PW, Whitehead D (2009) The influence of nitrogen and phosphorus supply and genotype on mesophyll conductance limitations to photosynthesis in *Pinus radiata*. *Tree Physiol* **29**: 1143-1151

Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis KR, Gortlach J (2001) Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell* **13**: 1499-1510

Brandt B, Brodsky DE, Xue S, Negi J, Iba K, Kangasjärvi J, Ghassemian M, Stephan AB, Hu H, Schroeder JI (2012) Reconstitution of abscisic acid activation of SLAC1 anion channel by CPK6 and OST1 kinases and branched ABI1 PP2C phosphatase action. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 10593-10598

Brodribb TJ, McAdam SAM (2011) Passive origins of stomatal control in vascular plants. *Science* **331**: 582-585

Buckley T, Warren C (2013) The role of mesophyll conductance in the economics of nitrogen and water use in photosynthesis. *Photosynth Res* DOI: 10.1007/s11120-013-9825-2

Burrell M, Mooney P, Blundy M, Carter D, Wilson F, Green J, Blundy K, Rees T (1994) Genetic manipulation of 6-phosphofructokinase in potato tubers. *Planta* **194**: 95-101

Casson SA, Hetherington AM (2010) Environmental regulation of stomatal development. *Curr Opin Plant Biol* **13**: 90-95

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

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

Delhaize E, Ryan PR, Hebb DM, Yamamoto Y, Sasaki T, Matsumoto H (2004) Engineering high-level aluminum tolerance in barley with the *ALMT1* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 15249-15254

Detmann KC, Araújo WL, Martins SC, Sanglard LM, Reis JV, Detmann E, Rodrigues FA, Nunes-Nesi A, Fernie AR, DaMatta FM (2012) Silicon nutrition increases grain yield, which, in turn, exerts a feed-forward stimulation of photosynthetic rates via enhanced mesophyll conductance and alters primary metabolism in rice. *New Phytol* **196**: 752-762

Du QS, Fan XW, Wang CH, Huang RB (2011) A possible CO₂ conducting and concentrating mechanism in plant stomata SLAC1 channel. *PLoS One* **6**: e24264

Duan B, Li Y, Zhang X, Korpelainen H, Li C (2009) Water deficit affects mesophyll limitation of leaves more strongly in sun than in shade in two contrasting *Picea asperata* populations. *Tree Physiol* **29**: 1551-1561

Farquhar GD, von Caemmerer S, Berry JA (1980) A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. *Planta* **149**: 78-90

Fernie AR, Martinoia E (2009) Malate. Jack of all trades or master of a few? *Phytochemistry* **70**: 828-832

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, Barbour MM, Brendel O, Cabrera HM, Carriqui M, Díaz-Espejo A, Douthe C, Dreyer E, Ferrio JP, Gago J, Gallé A, Galmés J, Kodama N, Medrano H, Niinemets Ü, Peguero-Pina JJ, Pou A, Ribas-Carbó M, Tomás M, Tosens T, Warren CR (2012) Mesophyll diffusion conductance to CO₂: An unappreciated central player in photosynthesis. *Plant Sci* **193–194**: 70-84

Flexas J, Diaz-Espejo A, Galmés J, Kaldenhoff R, Medrano H, Ribas-Carbo M (2007a) Rapid variations of mesophyll conductance in response to changes in CO₂ concentration around leaves. *Plant Cell Environ* **30**: 1284-1298

Flexas J, Niinemets Ü, Gallé A, Barbour M, Centritto M, Diaz-Espejo A, Douthe C, Galmés J, Ribas-Carbo M, Rodriguez P, Rosselló F, Soolanayakanahally R, Tomas M, Wright I, Farquhar G, Medrano H (2013) Diffusional conductances to CO₂ as a target for increasing photosynthesis and photosynthetic water use efficiency. *Photosynth Res* DOI: 10.1007/s1120-013-9844-z

Flexas J, Ortuno MF, Ribas-Carbo M, Diaz-Espejo A, Florez-Sarasa ID, Medrano H (2007b) Mesophyll conductance to CO₂ in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* **175**: 501-511

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

Fuentes D, Meneses M, Nunes-Nesi A, Araujo 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

Galmés J, Conesa MÀ, Ochogavía JM, Perdomo JA, Francis DM, Ribas-Carbó M, Savé R, Flexas J, Medrano H, Cifre J (2011) Physiological and morphological adaptations in relation to water use efficiency in Mediterranean accessions of *Solanum lycopersicum*. *Plant Cell Environ* **34**: 245-260

Galmés J, Medrano H, Flexas J (2006) Acclimation of Rubisco specificity factor to drought in tobacco: discrepancies between *in vitro* and *in vivo* estimations. *J Exp Bot* **57**: 3659-3667

Galmés J, Ochogavia JM, Gago J, Roldán EJ, Cifre J, Conesa MÀ (2013) Leaf responses to drought stress in Mediterranean accessions of *Solanum lycopersicum*: anatomical adaptations in relation to gas exchange parameters. *Plant Cell Environ* **36**: 920-935

Geiger D, Scherzer S, Mumm P, Marten I, Ache P, Matschi S, Liese A, Wellmann C, Al-Rasheid KAS, Grill E, Romeis T, Hedrich R (2010) Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca²⁺ affinities. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 8023-8028

Genty B, Briantais JM, Baker NR (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta* **990**: 87-92

Gibon Y, Blaesing OE, Hannemann J, Carillo P, Hohne M, Hendriks JH, Palacios N, Cross J, Selbig J, Stitt M (2004a) 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 in prolonged darkness. *Plant Cell* **16**: 3304-3325

Gibon Y, Blasing OE, Palacios-Rojas N, Pankovic D, Hendriks JH, Fisahn J, Hohne M, Gunther M, Stitt M (2004b) Adjustment of diurnal starch turnover to short days: depletion of sugar during the night leads to a temporary inhibition of carbohydrate utilization, accumulation of sugars and post-translational activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in the following light period. *Plant J* **39**: 847-862

Gibon Y, Pyl E-T, Sulpice R, Lunn JE, HÖHne M, GÜNther M, Stitt M (2009) Adjustment of growth, starch turnover, protein content and central metabolism to a decrease of the carbon supply when Arabidopsis is grown in very short photoperiods. *Plant Cell Environ* **32**: 859-874

Graf A, Schlereth A, Stitt M, Smith AM (2010) Circadian control of carbohydrate availability for growth in Arabidopsis plants at night. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 9458-9463

Grassi G, Magnani F (2005) Stomatal, mesophyll conductance and biochemical limitations to photosynthesis as affected by drought and leaf ontogeny in ash and oak trees. *Plant Cell Environ* **28**: 834-849

Harley PC, Loreto F, Di Marco G, Sharkey TD (1992) Theoretical considerations when estimating the mesophyll conductance to CO₂ flux by analysis of the response of photosynthesis to CO₂. *Plant Physiol* **98**: 1429-1436

Heckwolf M, Pater D, Hanson DT, Kaldenhoff R (2011) The *Arabidopsis thaliana* aquaporin AtPIP1;2 is a physiologically relevant CO₂ transport facilitator. *Plant J* **67**: 795-804

Hedrich R, Marten I (1993) Malate-induced feedback regulation of plasma membrane anion channels could provide a CO₂ sensor to guard-cells. *EMBO J* **12**: 897-901

Hedrich R, Marten I, Lohse G, Dietrich P, Winter H, Lohaus G, Heldt HW (1994) Malate-sensitive anion channels enable guard-cells to sense changes in the ambient CO₂ concentration. *Plant J* **6**: 741-748

Hetherington AM (2001) Guard cell signaling. *Cell* **107**: 711-714

Hetherington AM, Brownlee C (2004) The generation of Ca²⁺ signals in plants. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 401-427

Hoekenga OA, Maron LG, Piñeros MA, Cançado GMA, Shaff J, Kobayashi Y, Ryan PR, Dong B, Delhaize E, Sasaki T, Matsumoto H, Yamamoto Y, Koyama H, Kochian LV (2006) *AtALMT1*, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 9738-9743

Hunt R, Causton DR, Shipley B, Askew AP (2002) A modern tool for classical plant growth analysis. *Ann Bot* **90**: 485-488

Israelsson M, Siegel RS, Young J, Hashimoto M, Iba K, Schroeder JI (2006) Guard cell ABA and CO₂ signaling network updates and Ca²⁺ sensor priming hypothesis. *Curr Opin Plant Biol* **9**: 654-663

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

Jin SH, Huang JQ, Li XQ, Zheng BS, Wu JS, Wang ZJ, Liu GH, Chen M (2011) Effects of potassium supply on limitations of photosynthesis by mesophyll diffusion conductance in *Carya cathayensis*. *Tree Physiol* **31**: 1142-1151

Kim T-H, Böhmer M, Hu H, Nishimura N, Schroeder JI (2010) Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 561-591

Kovermann P, Meyer S, Hörtensteiner S, Picco C, Scholz-Starke J, Ravera S, Lee Y, Martinoia E (2007) The Arabidopsis vacuolar malate channel is a member of the ALMT family. *Plant J* **52**: 1169-1180

Kusumi K, Hirotsuka S, Kumamaru T, Iba K (2012) Increased leaf photosynthesis caused by elevated stomatal conductance in a rice mutant deficient in SLAC1, a guard cell anion channel protein. *J Exp Bot* **63**: 5635-5644

Laing WA, Ogren WL, Hageman RH (1974) Regulation of soybean net photosynthetic CO₂ fixation by the interaction of CO₂, O₂, and Ribulose 1,5-Diphosphate Carboxylase. *Plant Physiol* **54**: 678-685

Lake JA (2004) Gas exchange: new challenges with Arabidopsis. *New Phytol* **162**: 1-3

Laporte MM, Shen B, Tarczynski MC (2002) Engineering for drought avoidance: expression of maize NADP-malic enzyme in tobacco results in altered stomatal function. *J Exp Bot* **53**: 699-705

Lasceve G, Leymarie J, Vavasseur A (1997) Alterations in light-induced stomatal opening in a starch-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana* L. deficient in chloroplast phosphoglucomutase activity. *Plant Cell Environ* **20**: 350-358

Lawson T, Lefebvre S, Baker NR, Morison JI, Raines CA (2008) Reductions in mesophyll and guard cell photosynthesis impact on the control of stomatal responses to light and CO₂. *J Exp Bot* **59**: 3609-3619

Lee M, Choi Y, Burla B, Kim YY, Jeon B, Maeshima M, Yoo JY, Martinoia E, Lee Y (2008) The ABC transporter *AtABCB14* is a malate importer and modulates stomatal response to CO₂. *Nat Cell Biol* **10**: 1217-1223

Leegood RC & Walker DA (1980) Autocatalysis and light activation of enzymes in relation to photosynthetic induction in wheat chloroplasts. *Arch Biochem Biophys* **200**: 572-582

Liang C, Pineros MA, Tian J, Yao Z, Sun L, Liu J, Shaff J, Coluccio A, Kochian LV, Liao H (2013) Low pH, aluminum, and phosphorus coordinately regulate malate exudation through *GmALMT1* to improve soybean adaptation to acid soils. *Plant Physiol* **161**: 1347-1361

Long SP, Bernacchi CJ (2003) Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. *J Exp Bot* **54**: 2393-2401

Martin C, Bhatt K, Baumann K (2001) Shaping in plant cells. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 540-549

Martins SCV, Galmés J, Molins A, DaMatta FM (2013) Improving the estimation of mesophyll conductance to CO₂: on the role of electron transport rate correction and respiration. *J Exp Bot* **64**: 1-14

Meyer S, De Angeli A, Fernie AR, Martinoia E (2010a) Intra- and extra-cellular excretion of carboxylates. *Trends Plant Sci* **15**: 40-47

Meyer S, Mumm P, Imes D, Endler A, Weder B, Al-Rasheid KAS, Geiger D, Marten I, Martinoia E, Hedrich R (2010b) *AtALMT12* represents an R-type anion channel required for stomatal movement in *Arabidopsis* guard cells. *Plant J* **63**: 1054-1062

Meyer S, Scholz-Starke J, De Angeli A, Kovermann P, Burla B, Gambale F, Martinoia E (2011) Malate transport by the vacuolar *AtALMT6* channel in guard cells is subject to multiple regulation. *Plant J* **67**: 247-257

Mott KA (2009) Opinion: Stomatal responses to light and CO₂ depend on the mesophyll. *Plant Cell Environ* **32**: 1479-1486

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

Negi J, Matsuda O, Nagasawa T, Oba Y, Takahashi H, Kawai-Yamada M, Uchimiya H, Hashimoto M, Iba K (2008) CO₂ regulator *SLAC1* and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature* **452**: 483-486

Niinemets Ü, Díaz-Espejo A, Flexas J, Galmés J, Warren CR (2009) Role of mesophyll diffusion conductance in constraining potential photosynthetic productivity in the field. *J Exp Bot* **60**: 2249-2270

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

Pal SK, Liput M, Piques M, Ishihara H, Obata T, Martins MCM, Sulpice R, van Dongen JT, Fernie AR, Yadav UP, Lunn JE, Usadel B, Stitt M (2013) Diurnal changes of polysome loading track sucrose content in the rosette of wild-type *Arabidopsis* and the starchless *pgm* mutant. *Plant Physiol* **162**: 1246-1265

Pandey S, Zhang W, Assmann SM (2007) Roles of ion channels and transporters in guard cell signal transduction. *FEBS Letters* **581**: 2325-2336

Penfield S, Clements S, Bailey KJ, Gilday AD, Leegood RC, Julie EG, Graham IA (2012) Expression and manipulation of *PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE 1* identifies a role for malate metabolism in stomatal closure. *Plant J* **69**: 679-688

Pineros MA, Cancado GM, Maron LG, Lyi SM, Menossi M, Kochian LV (2008) Not all ALMT1-type transporters mediate aluminum-activated organic acid responses: the case of *ZmALMT1* - an anion-selective transporter. *Plant J* **53**: 352-367

Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: Verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* **975**: 384-394.

Pracharoenwattana I, Zhou W, Keech O, Francisco PB, Udomchalothorn T, Tschoep H, Stitt M, Gibon Y, Smith SM (2010) Arabidopsis has a cytosolic fumarase required for the massive allocation of photosynthate into fumaric acid and for rapid plant growth on high nitrogen. *Plant J* **62**: 785-795

Price GD, Caemmerer S, Evans J, Yu J-W, Lloyd J, Oja V, Kell P, Harrison K, Gallagher A, Badger M (1994) Specific reduction of chloroplast carbonic anhydrase activity by antisense RNA in transgenic tobacco plants has a minor effect on photosynthetic CO₂ assimilation. *Planta* **193**: 331-340

Raschke K (2003) Alternation of the slow with the quick anion conductance in whole guard cells effected by external malate. *Planta* **217**: 651-657

Roelfsema MRG, Hanstein S, Felle HH, Hedrich R (2002) CO₂ provides an intermediate link in the red light response of guard cells. *Plant J* **32**: 65-75

Roelfsema MRG, Hedrich R (2005) In the light of stomatal opening: new insights into 'the Watergate'. *New Phytol* **167**: 665-691

Sasaki T, Mori IC, Furuichi T, Munemasa S, Toyooka K, Matsuoka K, Murata Y, Yamamoto Y (2010) Closing plant stomata requires a homolog of an aluminum-activated malate transporter. *Plant Cell Physiol* **51**: 354-365

Sasaki T, Yamamoto Y, Ezaki B, Katsuhara M, Ahn SJ, Ryan PR, Delhaize E, Matsumoto H (2004) A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. *Plant J* **37**: 645-653

Scafaro AP, Von Caemmerer S, Evans JR, Atwell BJ (2011) Temperature response of mesophyll conductance in cultivated and wild *Oryza* species with contrasting mesophyll cell wall thickness. *Plant Cell Environ* **34**: 1999-2008

Scheibe R & Stitt M (1988) Comparison of NADP-malate de-hydrogenase activation QA reduction and O₂ evolution in spinach leaves. *Plant Physiol Biochem* **26**: 473-481

Schroeder JI, Allen GJ, Hugouvieux V, Kwak JM, Waner D (2001) Guard cell signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 627-658

Sharkey TD, Bernacchi CJ, Farquhar GD, Singsaas EL (2007) Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C3 leaves. *Plant Cell Environ* **30**: 1035-1040

Shimazaki K-i, Doi M, Assmann SM, Kinoshita T (2007) Light regulation of stomatal movement. *Annu Rev Plant Biol* **58**: 219-247

Smith AM, Stitt M (2007) Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant Cell Environ* **30**: 1126-1149

Stitt M, Lunn J, Usadel B (2010) Arabidopsis and primary photosynthetic metabolism – more than the icing on the cake. *Plant J* **61**: 1067-1091

Stitt M, Schulze D (1994) Does Rubisco control the rate of photosynthesis and plant growth? An exercise in molecular ecophysiology. *Plant Cell Environ* **17**: 465-487

Sulpice R, Tschoep H, Von Korff M, Büssis D, Usadel B, Höhne M, Witucka-Wall H, Altmann T, Stitt M, Gibon Y (2007) Description and applications of a rapid and sensitive non-radioactive microplate-based assay for maximum and initial activity of D-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Plant Cell Environ* **30**: 1163-1175

Tissier AF, Marillonnet S, Klimyuk V, Patel K, Torres MA, Murphy G, Jones JD (1999) Multiple independent defective suppressor-mutator transposon insertions in Arabidopsis: a tool for functional genomics. *Plant Cell* **11**: 1841-1852

Tosens T, Niinemets Ü, Vislap V, Eichelmann H, Castro Diéz P (2012) Developmental changes in mesophyll diffusion conductance and photosynthetic capacity under different light and water availabilities in *Populus tremula*: how structure constrains function. *Plant Cell Environ* **35**: 839-856

Tschoep H, Gibon Y, Carillo P, Armengaud P, Szecowka M, Nunes-Nesi A, Fernie AR, Koehl K, Stitt M (2009) Adjustment of growth and central metabolism to a mild but sustained nitrogen-limitation in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ* **32**: 300-318

Uehlein N, Otto B, Hanson DT, Fischer M, McDowell N, Kaldenhoff R (2008) Function of nicotiana tabacum aquaporins as chloroplast gas pores challenges the concept of membrane CO₂ permeability. *Plant Cell* **20**: 648-657

Vahisalu T, Kollist H, Wang Y-F, Nishimura N, Chan W-Y, Valerio G, Lamminmaki A, Brosche M, Moldau H, Desikan R, Schroeder JI, Kangasjarvi J (2008) SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature* **452**: 487-491

Vahisalu T, Puzõrjova I, Brosché M, Valk E, Lepiku M, Moldau H, Pechter P, Wang Y-S, Lindgren O, Salojärvi J, Loog M, Kangasjärvi J, Kollist H (2010) Ozone-triggered rapid stomatal response involves the production of reactive oxygen species, and is controlled by SLAC1 and OST1. *Plant J* **62**: 442-453

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

van Kirk CA, Raschke K (1978) Release of malate from epidermal strips during stomatal closure. *Plant Physiol* **61**: 474-475

Vavasseur A, Raghavendra AS (2005) Guard cell metabolism and CO₂ sensing. *New Phytol* **165**: 665-682

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

Vrábl D, Vašková M, Hronková M, Flexas J, Šantrůček J (2009) Mesophyll conductance to CO₂ transport estimated by two independent methods: effect of variable CO₂ concentration and abscisic acid. *J Exp Bot* **60**: 2315-2323

Walters RG, Ibrahim DG, Horton P, Kruger NJ (2004) A Mutant of Arabidopsis Lacking the Triose-Phosphate/Phosphate Translocator Reveals Metabolic Regulation of Starch Breakdown in the Light. *Plant Physiol* **135**: 891-906

Warren CR (2008a) Soil water deficits decrease the internal conductance to CO₂ transfer but atmospheric water deficits do not. *J Exp Bot* **59**: 327-334

Warren CR (2008b) Stand aside stomata, another actor deserves centre stage: the forgotten role of the internal conductance to CO₂ transfer. *J Exp Bot* **59**: 1475-1487

Williams TG, Flanagan LB, Coleman JR (1996) Photosynthetic gas exchange and discrimination against ¹³CO₂ and C₁₈O₁₆O in tobacco plants modified by an antisense construct to have low chloroplastic carbonic anhydrase. *Plant Physiol* **112**: 319-326

Yin X, Struik PC, Romero P, Harbinson J, Evers JB, Van Der Putten PEL, Vos JAN (2009) Using combined measurements of gas exchange and chlorophyll fluorescence to estimate parameters of a biochemical C₃ photosynthesis model: a critical appraisal and a new integrated approach applied to leaves in a wheat (*Triticum aestivum*) canopy. *Plant Cell Environ* **32**: 448-464

Zeebe RE (2011) On the molecular diffusion coefficients of dissolved, and their dependence on isotopic mass. *Geochim Cosmochim Acta* **75**: 2483-2498