

BARBARA SCHIRATO GONÇALVES

**IMPLICAÇÕES DO TRANSPORTADOR ATP-Mg/Pi (APC1) PARA
CRESCIMENTO E RESPOSTAS AO ALUMÍNIO EM *Arabidopsis***

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

Orientador: Adriano Nunes Nesi

Coorientadores: Paula da Fonseca Pereira e Wagner L. Araújo.

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

G635i
2024
Gonçalves, Barbara Schirato, 1998-
Implicações do transportador ATP-Mg/Pi (APC1) para
crescimento e respostas ao alumínio em *Arabidopsis* / Barbara
Schirato Gonçalves. – Viçosa, MG, 2024.
1 dissertação eletrônica (50 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Adriano Nunes Nesi.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Vegetal, 2024.

Referências bibliográficas: f. 44-50.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.191>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Mitocôndria. 2. Adenosina trifosfato. 3. Plantas -
Desenvolvimento. 4. Plantas - Efeito do alumínio. I. Nesi,
Adriano Nunes, 1975-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-Graduação
em Fisiologia Vegetal. III. Título.

CDD 22. ed. 571.657

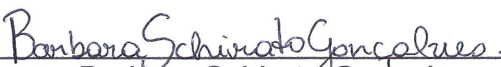
BARBARA SCHIRATO GONÇALVES

**IMPLICAÇÕES DO TRANSPORTADOR ATP-Mg/Pi (APC1) PARA
CRESCIMENTO E RESPOSTAS AO ALUMÍNIO EM *Arabidopsis***

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: 23 de Fevereiro de 2024

Assentimento:


Barbara Schirato Gonçalves
Autor


Adriano Nunes Nesi
Orientador

*Para todas as grandiosas mulheres que me
guiam nessa vida*

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, eu gostaria de agradecer ao meu psicólogo e à iniciativa da rede “saúde mental para todos”. A verdade é que sem você eu definitivamente não teria chegado tão longe, se é que teria sobrevivido ao primeiro ano. Obrigada por estar disponível para trabalhar comigo, obrigada por me mostrar a importância de descansar e cuidar da minha saúde, para que a vida seja mais leve e fácil de ser vivida. Você estava certo esse tempo todo sobre não sermos máquinas e sim seres humanos... Se eu recebi comentários sobre estar mais calma e feliz certamente teve um dedo (ou um braço todo) seu nisso. De coração mesmo, obrigada.

Também gostaria de agradecer aos meus pais e minha vó que são minha família de sangue e estavam sempre me mandando mensagens e ligando perguntando se eu precisava de alguma coisa, ou simplesmente me ouvindo chorar pelo telefone nos dias mais difíceis. Obrigada aos meus ohanos, que são a família do coração que o Tocantins me proporcionou, enquanto eu cursava ciências biológicas, em especial à amiga Lia e ao amigo Ítalo. Todos nós fizemos mestrado ao mesmo tempo em instituições diferentes e poder contar com pessoas que moram no meu coração e vivenciam a mesma realidade que a minha certamente representou um peso muito grande. Obrigada por serem minha família do coração mesmo longe.

Mariana, eu não esqueci de você, e você sabe que é facilmente uma das pessoas que eu mais amo no mundo, mesmo em países diferentes nós conversamos horas incontáveis pelo telefone, rimos e choramos... falar ou responder o seu “eu te amo” muitas vezes foi grande parte do que me segurou (mais firme e forte do que eu estaria sem você). Eu te amo muito, obrigada por mesmo com toda a distância e diferença de fuso horário sempre arrumar um tempo pra me amar de volta.

Elen e Wesley vocês foram uns dos primeiros amigos que fiz aqui em Viçosa, conhecer vocês e ter sua amizade é um grande privilégio. Elen você é brilhante e certamente era ótimo contar com a sua ajuda pra estudar para as disciplinas, mas maior que o seu brilhantismo só o coração que você carrega aí dentro.

Obrigada a Julianna, Ana Lu, Maria, Júlia Wakin e Jean, para além de toda a inestimável ajuda acadêmica (foram muitas horas e dias, de fato), por todos os momentos compartilhados (~~GUACA MOLE~~) e amizade, por todas as risadas e afeto. Por todas as comidinhas, rolês, momentos no horto e abraços apertados. Ter vocês na minha vida e no ambiente de trabalho foi o máximo.

Obrigada a Débora e Wesley por todas as conversas, ajudas (principalmente com molecular), por todos os bombons surpresa e os incensos pra realinhar as energias e falar “limpa, limpa, limpa”. Para você amiga darei menção honrosa aos abraços toda vez que a gente se via e principalmente quando alguma de nós estava precisando.

Agradeço a todo o time da UCP que de alguma forma contribuiu com meu trabalho, meu aprendizado e para tornar o ambiente de trabalho mais leve, especialmente à Rita, Jéssica, Mateus, Dora, Mariana, Bianca, Realto e Marília.

Bruno Gomes e Samuel Braga Reis o obrigada de vocês está escrito à parte porque é preciso reconhecer o quanto vocês foram ICs maravilhosos e dedicados.

Finalmente, gostaria de agradecer à Doutora Paula da Fonseca Pereira pela sua amizade e por ser uma coorientadora sempre disponível e atenciosa. Ao Prof. Wagner L. Araújo e ao meu orientador Prof. Adriano por toda a sua orientação, disponibilidade e suporte. Especialmente gostaria de agradecer ao Professor Adriano por mesmo durante um pós-doc na Alemanha sempre ter tido tempo para as nossas reuniões. Eu definitivamente aprendi muito com vocês durante esses dois anos.

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Agradeço também a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e, especialmente, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa que me permitiu estar em Viçosa para realizar meus estudos e minha pesquisa.

“eu não acredito que os talentos, sejam mentais ou de personalidade, possam ser pesados como açúcar e manteiga”.

(Virginia Woolf – Um teto todo seu)

RESUMO

GONÇALVES, Barbara Schirato, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2024. **Implicações do Transportador ATP-Mg/Pi (APC1) para crescimento e respostas ao alumínio em *Arabidopsis***. Orientador: Adriano Nunes Nesi. Coorientadores: Paula da Fonseca Pereira e Wagner L. Araújo.

O transportador de adenilatos APC1 faz parte da família de transportadores mitocondriais MCF e, diferente de outros transportadores de adenilatos, realiza a exportação de ATP em troca de fosfato inorgânico. Este transportador recebe destaque por realizar essa troca de forma eletricamente neutra ao associar o ATP a um magnésio. Sendo assim, buscou-se realizar a caracterização fisiológica deste carreador de modo a compreender suas funções no crescimento e desenvolvimento de *Arabidopsis thaliana* em condições ótimas. Para esta finalidade análises biométricas, morfométricas e metabólicas foram realizadas. Os resultados obtidos sugerem que o transportador APC1 possui papel relevante porém não essencial no crescimento da parte aérea das plantas e no desenvolvimento de plântulas. Verificou-se também, maiores níveis de malato em folhas de plantas mutantes em relação ao genótipo selvagem. Esse resultado sugere que a função do APC1 pode estar associada com o funcionamento do complexo succinato desidrogenase e outras enzimas do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (ciclo TCA). Ainda, por se tratar de um transportador de adenilatos, APC1 pode influenciar no funcionamento do complexo ATP sintetase e no fluxo de elétrons pela cadeia transportadora de elétrons e com isso influenciando indiretamente no funcionamento do ciclo TCA e na produção de ácidos orgânicos. Tendo isso em vista buscou-se, adicionalmente, investigar o papel do APC1 frente o estresse por alumínio. Experimentos em meio de cultivo foram realizados para avaliar o impacto do alumínio no crescimento radicular. Observou-se que o transportador APC1 é relevante em condições de pH ácido sem a presença de alumínio. Adicionalmente, as linhas mutantes demonstraram ser menos sensíveis a presença de alumínio do que o tipo selvagem. Este fenótipo pode estar relacionado com níveis elevados de malato observados nos mutantes e sua possível exsudação frente a esse tipo de estresse. Não obstante, estudos adicionais ainda precisam ser feitos para que se dê maior suporte a estas hipóteses.

Palavras-chave: Mitocôndria; Respostas á estresse; Transportador de adenilatos.

ABSTRACT

GONÇALVES, Barbara Schirato, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2024. **Implications of the ATP-Mg/Pi Transporter (APC1) for growth and responses to aluminum in *Arabidopsis***. Adviser: Adriano Nunes Nesi. Co-advisers: Paula da Fonseca Pereira e Wagner L. Araújo.

The adenylate transporter APC1 is part of the MCF family of mitochondrial transporters and, unlike other adenylate transporters, it exports ATP in exchange for inorganic phosphate. This transporter stands out for carrying out this exchange in an electrically neutral way by associating ATP with magnesium. Therefore, we carried out physiological characterization of CRISPR-CAS9 mutants for this carrier in order to understand its specific contributions and functions in growth and development of *Arabidopsis thaliana*. For this purpose biometric, morphometric and metabolic analyzes were carried out. The results obtained suggest that the APC1 transporter has a relevant role in the growth of the aerial part of plants and in the development of seedlings. It was also found higher levels of malate in leaves of mutant plants in relation to the wild type genotype. This result suggests that the function of APC1 may be associated with the functioning of the succinate dehydrogenase complex and other enzymes of the tricarboxylic acid cycle (TCA cycle). Furthermore, as it is an adenylate transporter, APC1 can influence the flow of electrons through the electron transport chain and thus the functioning of the TCA cycle and the production of organic acids. With this in mind, we additionally investigated the role of APC1 in the face of aluminum stress. Experiments in medium culture were carried out to evaluate the impact of aluminum on root growth. It was observed that the APC1 transporter is quite relevant in acidic pH conditions without the presence of aluminum. Additionally, the mutant lines demonstrated to be less sensitive to the presence of aluminum than the wild type. This phenotype may be related to the high levels of malate observed in the mutants and its possible exudation in the face of this type of stress. However, additional studies still need to be carried out to provide greater support for these hypotheses.

Keywords: Adenylate transporter; Mitochondria; Stress responses.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3. RESULTADOS	21
4. DISCUSSÃO	35
5. CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS	44

1. INTRODUÇÃO

A vida na terra depende diretamente da capacidade dos seres vivos de produzir e consumir energia, sendo adenosina trifosfato, o ATP, a principal molécula energética que provê suporte ao metabolismo destes seres. Em plantas, a síntese de moléculas energéticas ocorre através dos processos de fotossíntese e respiração celular, de modo que o ATP é sintetizado pelo complexo ATP sintase, localizado tanto nas lamelas do estroma dos cloroplastos quanto na membrana interna da mitocôndria (JUNGE & NELSON, 2015). Devido à constante demanda por energia que ocorre em toda a célula e pelo fato de o ATP não atravessar livremente membranas celulares, transportadores de ATP são necessários para carrear essa molécula desde os seus sítios de geração até os locais que estão demandando recurso energético (GEIGENBERGER et al., 2010). O ATP gerado pela mitocôndria é, portanto, mobilizado através de transportadores que se encontram na membrana mitocondrial interna e que pertencem à Família de Carreadores Mitocondriais (FCM) (PALMIERI, 2004). Essa família de carreadores possui 58 proteínas de membrana com diferentes funções (NUNES-NESI et al., 2020). Entre os membros dessa família, encontram-se os transportadores de adenilatos AACs (carreadores de ADP/ATP), ADNT1 (carreadores de AMP/ATP) e APCs (carreadores de ATP-Mg/Pi) (DA FONSECA-PEREIRA et al., 2018) (Figura 1). Em síntese, esses transportadores catalisam preferencialmente a exportação de ATP da matriz mitocondrial em troca da importação preferencial por ADP (adenosina difosfato), AMP (adenosina monofosfato) e Pi (fosfato inorgânico) (PALMIERI et al., 2011). Através da caracterização inicial de proteínas APCs de humanos observou-se que esses transportadores carregam, *a priori*, o ATP ligado a uma molécula de Mg^{2+} -devido a uma maior afinidade por esse substrato- e utilizam o contra-transporte de Pi, desta forma catalisando a troca de ATP-Mg²⁺ por Pi na mitocôndria (FIERMONTE et al., 2004). Entretanto, estudos mais recentes com *Arabidopsis thaliana* demonstraram que, apesar de proteínas APCs realizarem o transporte do ATP associado ao magnésio, este não é o substrato mais utilizado por esses translocadores, sendo o ADP, AMP, Pi e ATP aqueles pelos quais os transportadores APCs possuem maior especificidade (MONNÉ et al., 2015).

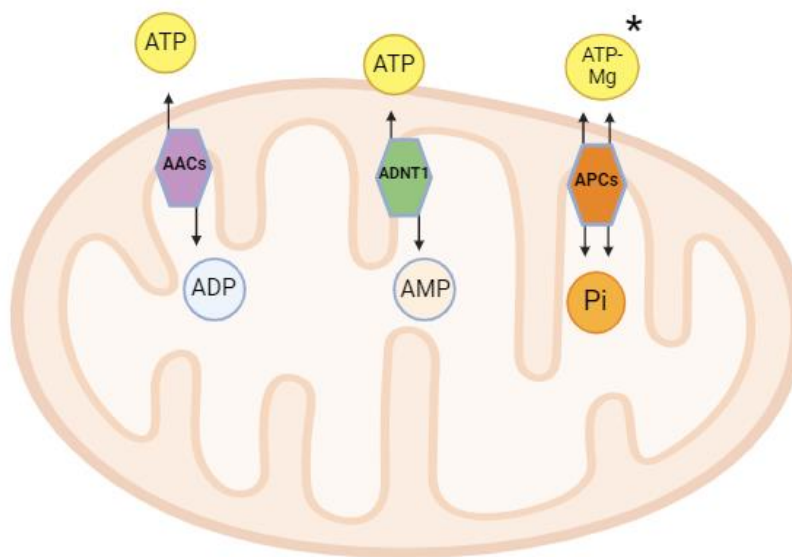


Figura 1. Representação dos transportadores de adenilatos AACs, ADNT1 e APCs presentes na membrana interna mitocondrial. Na figura os transportadores estão realizando a exportação de ATP em troca da importação de ADP (AACs), AMP (ADNT1) e Pi (APCs). * a representação dos transportadores APCs realizando o transporte de ATP-Mg e Pi foi escolhida por ser um transporte característico desse tipo de transportadores, contudo, estes não são os substratos preferenciais destes carreadores, como foi observado anteriormente por Monné et al, 2015.

Mitocôndrias são fundamentais para a geração e a exportação de energia na forma de adenilatos. Em células vegetais, o importante papel de distribuição de energia exercido por mitocôndrias é evidenciado pela diversidade de transportadores de adenilatos nessas organelas (DA FONSECA-PEREIRA et al., 2018). Tal diversidade visa atender à necessidade de adequação dos vegetais às diferentes demandas energéticas desses organismos, especialmente tendo em vista as constantes flutuações ambientais aos que os mesmos estão expostos (DA FONSECA-PEREIRA et al., 2018). Dessa forma, cada um dos transportadores de adenilatos mitocondriais possui suas especificidades. Sabe-se que os AACs são transportadores de maior afinidade pelo substrato ATP que os APCs e, por isso, suprem o transporte de energia num primeiro momento (MONNÉ & PALMIERI, 2014). Entretanto, a concentração de nucleotídeos de adenina na matriz mitocondrial pode oscilar em decorrência de uma demanda crescente por processos que consomem ATP (MONNÉ & PALMIERI, 2014). Neste tipo de condição, as mitocôndrias necessitam de um transporte líquido de adenilatos através da membrana interna, que vai além daquele

que é realizado pelos AACs (MONNÉ & PALMIERI, 2014). Este transporte líquido, por sua vez, é catalisado por outros transportadores como os APCs e o ADNT1 (MONNÉ & PALMIERI, 2014). As três isoformas do carreador ATP-Mg/Pi (APC1, APC2 E APC3) são provavelmente responsáveis por parte do transporte líquido de nucleotídeos de adenina para dentro ou para fora das mitocôndrias e, portanto, por uma parcela da variação no conteúdo de nucleotídeos de adenina da matriz (FIERMONTTE et al., 2004).

Em *A. thaliana*, *AtAPC1*, *AtAPC2* e *AtAPC3*, guardam alta similaridade estrutural com os transportadores mitocondriais ATP-Mg/Pi em humanos (MONNÉ et al., 2015). Apesar da considerável similaridade estrutural entre as três isoformas de APCs, estudos bioquímicos prévios indicam diferenças notórias entre elas (MONNÉ et al., 2015). Sob condições fisiológicas normais, o transportador *AtAPC1* é cerca de cinco vezes mais expresso em flores, folhas, caule, raiz e mudas que os outros dois (MONNÉ et al., 2015). Estes transportadores catalisam a transferência líquida de nucleotídeos de adenina através da membrana mitocondrial interna em troca de fosfato, e são regulados através de transcrição gênica e por íons de cálcio (MONNÉ et al., 2015). A regulação pelo cálcio está relacionada à estrutura dos transportadores, os quais possuem um domínio de ligação solúvel N-terminal *EF-hand* Ca^{2+} , de modo que há uma regulação da atividade transportadora do domínio C-terminal a depender da concentração citosólica de cálcio (MONNÉ; PALMIERI, 2014).

Estudos *in silico* sugerem que o transportador APC1 encontra-se em um subgrupo de oito transportadores (BAC2, DIC2, MTM1, DIC1, PNC2, APC1, PHT3;2, e AAC2) que exibem perfil de expressão altamente regulado na parte aérea sob condições de estresses por frio, osmótico e salino (NUNES-NESI et al., 2020). Além disso este transportador é indicado entre os transcritos mais responsivos ao estresse codificados pelo proteoma de *A. thaliana* (DA FONSECA-PEREIRA et al., 2018). Também foi verificado *in silico* que a expressão do *APC1* aumenta no estágio de senescência das plantas e em resposta a aplicação de ácido absísico (ABA), hormônio que possui ação direta nos canais de íons e que também se relaciona ao alongamento radicular (NUNES-NESI et al., 2020).

O metabolismo mitocondrial, por sua vez, é considerado fator relevante para determinar a resistência de plantas ao alumínio e, conseqüentemente, sua tolerância e ou resistência a solos ácidos (NUNES-NESI et al., 2014). Sabe-se que o Al^{3+} presente nesses solos altera a capacidade de troca catiônica das raízes e, com isso,

a obtenção de água e nutrientes pelas plantas é afetada (NUNES-NESI et al., 2014). A consequência dessa absorção inadequada de água e nutrientes se traduz num fator limitante para a produtividade das plantas, que, a depender da espécie, pode causar entre 25 e 80% de perdas de rendimento (SADE et al., 2016). Solos acidificados devido à presença de alumínio ocupam cerca de 30% do nosso planeta (FAO, ITPS, 2015). Adicionalmente, os solos superficiais mais ácidos do mundo estão localizados na América do Sul e os solos do Brasil são predominantemente ácidos (FAO, ITPS, 2015; OLMOS & CAMARGO, 1976). Portanto, mostram-se relevantes estudos que tenham por base elucidar genes, transportadores e mecanismos relacionados à tolerância e/ou resistência de plantas a ambientes ácidos e ricos em alumínio. Dessa forma, tais conhecimentos poderiam ser aplicados futuramente na engenharia genética para a obtenção de cultivares resistentes a esse tipo de estresse (YAN et al., 2021).

Devido à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) causadoras de danos oxidativos na planta, a respiração mitocondrial é coibida na presença de Al^{3+} (NUNES-NESI et al., 2014). Nesse contexto, a produção e a exsudação de ácidos orgânicos torna-se essencial como meio de combater esse estresse. Alguns ácidos orgânicos como, por exemplo, o citrato e o malato podem, ao serem exudados pela raiz, ter o papel de quelar o alumínio no ambiente que está em contato direto com a raiz (MA et al., 2001; YAN et al., 2021). Sabe-se que os ácidos orgânicos que serão exsudados para mitigar esse estresse podem variar entre as espécies, sendo que em *A. thaliana* o malato e o citrato têm um papel central nessa desintoxicação da planta (LIU et al., 2009). Contudo, a produção e exsudação de ácidos orgânicos pelo Ciclo do Ácido Tricarboxílico (ciclo TCA) depende da regeneração de NAD^+ a partir de $NADH$ na matriz mitocondrial e, portanto, depende do funcionamento adequado da cadeia transportadora de elétrons (SWEETLOVE et al., 2010; ZHANG & FERNIE, 2018). Os transportadores de adenilatos, por sua vez, ao exportarem o ATP e importarem outras moléculas fosfatadas (Figura 2), mantém a cadeia transportadora de elétrons funcionando, o que fornece o NAD^+ necessário ao funcionamento do ciclo TCA. Espera-se, portanto, que com uma deficiência do APC1 em plantas de *A. thaliana*, ocorra uma menor exportação de ATP e, conseqüentemente, uma menor importação de P_i , de modo que ocorra um acúmulo de $NADH$ em detrimento da regeneração do NAD^+ na cadeia transportadora de elétrons e reações na matriz mitocondrial. Diante dessa situação, espera-se uma menor eficiência do

funcionamento do ciclo TCA. Em decorrência, as plantas mutantes poderiam se tornar mais susceptíveis ao estresse pelo alumínio em virtude de uma menor produção e exsudação de ácidos orgânicos ou de menor atividade mitocondrial, reduzindo a produção de ATP necessária para os mecanismos de detoxificação celular.

Por se tratar de um transportador mitocondrial, observar a resposta de plantas deficientes em APC1 ao alumínio pode ajudar a elucidar o papel do metabolismo energético mitocondrial na resposta de plantas a esse tipo de estresse.

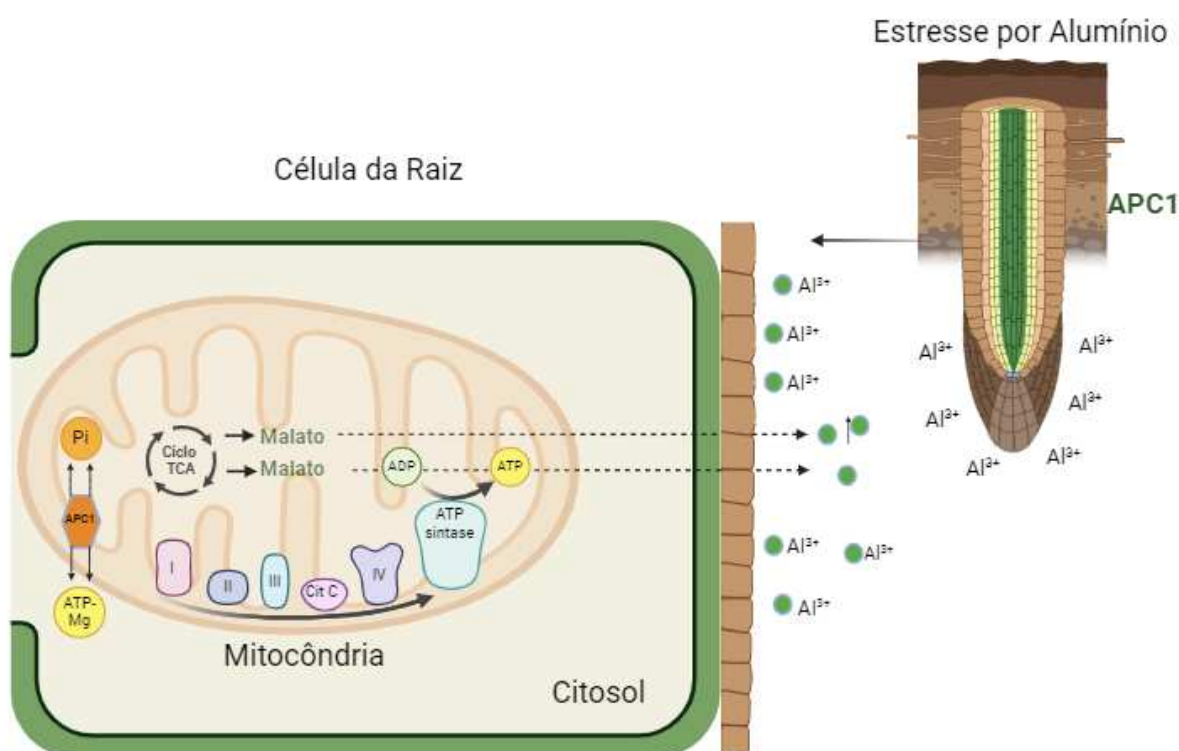


Figura 2. Representação esquemática de uma mitocôndria em uma célula de raiz de *A. thaliana*, exposta a Al^{3+} e, níveis tóxicos na solução do solo. Esse modelo sugere que a cadeia transportadora de elétrons funcionando adequadamente, permite que o ciclo TCA produza ácidos orgânicos que, ao serem exudados, quelam o alumínio presente no meio e permitem o crescimento do sistema radicular e sobrevivência da planta sob estas condições de estresse. Este modelo sugere um papel fundamental dos transportadores mitocondriais de adenilatos para a manutenção da homeostase de energia entre a mitocôndria e demais compartimentos subcelulares.

Apesar da importância notória do ATP e de outras moléculas fosfatadas no metabolismo dos seres vivos, os estudos que descrevem as proteínas responsáveis por seu transporte nas células ainda possuem lacunas de conhecimento. Sabe-se que

a mobilização de energia nas células é tão importante quanto a geração desta pelo complexo ATP sintase, sendo o pool de adenilatos na célula ajustado de acordo com o metabolismo destes. O apropriado equilíbrio entre ATP, ADP e AMP otimiza a síntese do ATP, sendo a razão entre essas moléculas, proposta como fator chave na regulação metabólica de plantas (DA FONSECA-PEREIRA et al., 2018). Nesse contexto, buscou-se realizar a caracterização fenotípica e fisiológica de plantas mutantes de *A. thaliana* deficientes em APC1 de modo a aumentar os conhecimentos sobre o papel fisiológico deste transportador.

O status energético celular também é relevante em situações de estresse, o que evidencia a importância de pesquisas que elucidem a relação entre transportadores mitocondriais e condições de estresse biótico e abiótico. Ao considerar que a maioria dos solos brasileiros são acidificados pela presença do íon Al^{3+} , e que esta condição apresenta entraves para a produtividade agrícola, visou-se compreender como a função do transportador APC1 se relaciona ao estresse por alumínio e quais seriam os reflexos desse tipo de estresse no fenótipo e fisiologia de plantas com uma deficiência deste transportador.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção das plantas mutantes

Sementes dos genótipos mutantes e do tipo selvagem (*A. thaliana*, ecótipo Columbia [col 0]; WT) foram obtidas a partir do trabalho de doutorado intitulado “Physiological and metabolic characterization of adenylates carriers in *Arabidopsis thaliana*” (NERI-SILVA, 2021). Os mutantes foram gerados pelo sistema CRISPR/Cas9 por meio do vetor pKAMA-ITACHI (pKI1.1R) (TSUTSUI & HIGASHIYAMA, 2017). RNAs guia foram projetados e direcionados preferencialmente ao primeiro exon para aumentar as chances de gerar códons de parada precoces na sequência do gene de modo que as proteínas geradas pelas plantas transformadas fossem não funcionais.

Após duas gerações de linhas mutantes, quatro linhagens Cas9-free foram selecionadas por exibirem diferentes mutações entre elas. A linhagem 8.7 por ter uma inserção de guanina (G); a linhagem 10.2 por ter uma deleção de uma adenina (A); a linhagem 10.9 por apresentar a deleção de uma timina (T) e uma adenina (A) e, por último, a linhagem 11.2 por apresentar a deleção de uma adenina (A) e de uma timina (T) nessa ordem na sequência genica. As bases modificadas afetam a leitura do gene, o que cria um códon de parada precoce, comprometendo outros domínios da proteína. A região comprometida da proteína, que é essencial para a função do transportador APC1, cria uma proteína não funcional (NERI-SILVA, 2021).

2.2 Protocolo de obtenção do material vegetal

Inicialmente, foi feita a esterilização de sementes dos cinco genótipos de *A. thaliana* em 1 mL de etanol 70% por um minuto, período após o qual o etanol foi removido e as sementes colocadas em 1 mL de solução de hipoclorito de sódio à 2,5% durante 15 minutos. Sementes mortas e material sobrenadante foram descartados e as sementes esterilizadas lavadas ao menos cinco vezes em água destilada e autoclavada. Após a esterilização, as sementes foram colocadas para germinar em placas de Petri contendo meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) meia força (com metade dos sais e vitaminas do meio MS) suplementado com 1% de sacarose [w/v], com pH ajustado para 5,7 e autoclavado. Todo o procedimento foi realizado em

câmara de fluxo laminar. As placas foram então colocadas no escuro durante um período de 72 horas a 4°C para processo de vernalização. Transcorrido esse período, as placas foram transferidas para salas de crescimento, cujas condições variaram entre condições de dias curtos, com fotoperíodo de 8 horas de luz e 16 horas de escuro, e dias neutros, com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, a depender do experimento que foi performedo. Independente do fotoperíodo, as plantas foram submetidas a 150 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ á 21°C, e 60% de umidade relativa. Dez dias após a transferência das placas para as salas de crescimento, as plântulas foram transplantadas para vasos individuais (0.1 L) contendo o substrato solo Carolina padrão EC 0.7 – 8 kg (Eucatex, São Paulo, Brasil).

2.3 Genotipagem e predição da proteína APC1

Para confirmar a mutação presente nas linhagens, plantas de todos os genótipos obtidos (WT, APC1 8.7, APC1 10.2, APC1 10.9 e APC1 11.2) foram cultivadas e tiveram folhas coletadas para genotipagem. Para extração do DNA, foi utilizado o protocolo Dellaporta (DELLAPORTA et al., 1983), posterior a isto foi realizada a eletroforese em gel para atestar a integridade das amostras e feito o DNA QC (Quality Control) com auxílio do Nanodrop 2000. Após a diluição das amostras para uma concentração de 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$, foi feita a reação de PCR e uma nova eletroforese em gel. As amostras amplificadas dentro do esperado foram então tratadas com o kit Wizard SV Gel and PCR-Clean Up System, secas em speed vac e enviadas para sequenciamento de Sanger.

Após concluída a etapa de genotipagem foi realizada a predição da proteína APC1 para observar as consequências dessas mutações para o carreador nas plantas mutantes. Após obtenção do CDS (*Coden DNA Sequence*) do gene na base de dados TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>), as sequências de interesse foram modificadas de acordo com a mutação de cada linhagem. Em seguida buscou-se a sequência de aminoácidos para esses genes no portal ExPasy (<https://web.expasy.org/translate/>), sendo realizada em seguida a predição de proteínas no AlfaFold2. Por fim, a proteína APC1 gerada pelas linhas mutantes foi comparada com a proteína APC1 em plantas do genótipo selvagem utilizando o RCSB Protein Data Bank (RCSB PDB) (<https://www.rcsb.org/alignment>).

2.4 Caracterização dos mutantes

Antes que experimentos envolvendo estresse por alumínio fossem realizados, alguns experimentos em condições ideais foram feitos para observar o fenótipo das plantas.

2.4.1 Germinação das sementes

Para análises referentes à germinação, sementes de todos os genótipos foram postas para germinar em placas de Petri contendo meio MS meia força com e sem sacarose, em condições de dias neutros. Foi analisada a taxa de germinação das sementes na presença e ausência de sacarose de modo a observar se plantas contendo a proteína APC1 não funcional iriam apresentar alteração no referido parâmetro.

2.4.2 Análises biométricas e morfométricas

Plantas mantidas sob condições de dias curtos com quatro semanas de idade foram utilizadas para análise de parâmetros biométricos e morfométricos, sendo os parâmetros aferidos: área total da roseta; massa fresca e seca da roseta, número de folhas, área total de folhas; peso fresco e peso seco da raiz e partição de matéria seca.

2.4.3 Análises do estágio reprodutivo

Para caracterização do estágio reprodutivo, plantas mantidas sob condições de dias neutros foram avaliadas através das seguintes variáveis: período de florescimento (marcado pelo início de emissão de pendão), número total de síliquas por planta, comprimento médio das síliquas, número de sementes por síliqua, peso total de sementes por planta e peso de mil sementes.

2.4.4 Análise de metabólitos

A coleta de amostras para análises de metabólitos foi feita a partir de plantas mantidas sob fotoperíodo de dias curtos, no meio do período lumínico. Para estes experimentos associados com análises de metabólitos, o substrato utilizado foi areia lavada e substrato Carolina (padrão EC 0.7 – 8 kg; Eucatex; São Paulo, Brasil) na proporção de 4:6. A coleta foi realizada com nitrogênio líquido sendo utilizadas apenas folhas completamente expandidas. Em seguida, as amostras foram postas para liofilizar.

Foram aliqüotados aproximadamente 10 mg de folhas liofilizadas. Posteriormente, os metabólitos foram extraídos com uma mistura de clorofórmio-metanol-água seguindo a metodologia de Lisec et al., (2006). A fração solúvel e o material precipitado resultante da extração foram armazenados a -20°C. A fração solúvel em etanol foi utilizada para quantificar os teores de clorofilas *a* e *b*, carboidratos solúveis (glicose, frutose e sacarose) (FERNIE et al., 2001a), aminoácidos solúveis totais (CROSS et al., 2006), e malato e fumarato (NUNES-NESI et al., 2007). A fração insolúvel em etanol foi utilizada para quantificar os teores de amido (FERNIE et al., 2001a) e proteínas (BRADFORD, 1976).

2.5 Ensaio de estresse por alumínio

Foi realizada a fenotipagem dos genótipos WT, APC1 8.7, APC1 10.2, APC1 10.9 e APC1 11.2 sob influência do estresse por alumínio. Inicialmente foi feita a esterilização de sementes dos cinco genótipos em 1 mL de etanol 70% por dois minutos, então o etanol foi removido e as sementes colocadas em 1 mL de solução de hipoclorito de sódio a 2,5% durante 15 minutos. O material sobrenadante foi descartado e as sementes remanescentes esterilizadas foram lavadas ao menos cinco vezes, durante cinco minutos em água destilada e autoclavada. Após a esterilização, as sementes foram colocadas para germinar em placas de Petri contendo meio MS meia força (com metade dos sais e vitaminas do meio MS) (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com pH ajustado para 5,0 e autoclavado. Todo o procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar. As placas foram então colocadas no escuro durante um período de 72 horas a 4°C para processo de vernalização, período após o qual foram transferidas para salas de crescimento de dias curtos com fotoperíodo de 8 horas de luz e 16 horas de escuro a 150 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a 21°C, e 60% de umidade relativa. Três dias depois as pl\u00e2ntulas foram

transplantadas para placas quadradas contendo meio MS meia força, nas combinações -Al pH 5,7; -Al pH 4,0 e +Al (cloreto de alumínio à 300 μ M) pH 4,0. A mensuração do crescimento radicular foi realizada nos dias 0, 3, 5, 7 e 9. Foram realizadas oito repetições por tratamento, com três indivíduos de cada genótipo por placa.

2.5.2 Testes histoquímicos

Para observar possíveis acúmulos de alumínio nas raízes, o teste de hematoxilina foi performado (SOUZA et al., 2016). Três plântulas de cada genótipo cultivadas nas mesmas condições descritas anteriormente foram colocadas em microtubos contendo 1 mL de solução de hematoxilina durante 30 minutos. Transcorrido esse tempo, as plântulas foram transferidas para microtubos contendo água, onde ficaram durante mais 30 minutos. Em seguida, fotos das raízes foram obtidas por intermédio de microscópio estereoscópio Leica com câmera acoplada.

Para avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio, mais especificamente de ânion superóxido (O_2^-), foi realizado o teste nitro blue tetrazolium (NBT) (KONG et al., 2011). Três plantas de cada genótipo foram colocadas em microtubos contendo 1 mL de solução corante de NBT durante um período de 40 minutos. Após isso, essas plantas foram transferidas para uma solução de descoloração onde foram deixadas em banho maria a 90°C durante 15 minutos.

2.6 Desenho experimental e análises estatísticas

Os experimentos foram conduzidos de modo inteiramente casualizado com no mínimo seis repetições. Para determinar a diferença entre os genótipos, os resultados foram submetidos a teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Os dados que apresentaram normalidade foram submetidos ao teste de Dunnet a nível de 5% de probabilidade para comparação das médias. Dados que não apresentaram normalidade, foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis e as médias comparadas pelo teste de Dunn no nível de 5% de probabilidade. Para estatísticas de fatorial duplo foi performado o teste de Tukey. As análises foram feitas utilizando o software estatístico Bioestat, versão 5.3 (AYRES et al., 2007).

3. RESULTADOS

3.1 Genotipagem e predição da proteína APC1

As linhagens WT e APC1 8.7 foram confirmadas através da genotipagem, as linhagens APC1 10.2, APC1 10.9 e APC1 11.2 também se mostraram consistentes. Entretanto, apresentaram mutações diferentes das que eram esperadas tendo em vista os resultados previamente observados (Figura 3) (NERI-SILVA, 2021). Ambas linhagens 10.2 e 10.9 apresentaram deleção de uma adenina e uma timina, porém em diferentes locais da sequência gênica, já a linha 11.2 apresentou deleção de oito pares de bases. A tradução desses genes revelaram que as proteínas APC1 são defeituosas nos mutantes (Figura 3 B – E). A proteína APC1 em plantas do genótipo selvagem apresentam 478 aminoácidos, enquanto que nas plantas mutantes são gerados códons de parada precoce reduzindo essa quantidade para 365 aminoácidos. Desse modo, a proteína APC1 nas plantas mutantes perde três domínios topológicos e três domínios transmembrana, além de parte da sua identidade estrutural. Espera-se que, em conjunto, essas alterações na estrutura do carreador impacte na estabilidade da proteína na membrana e portanto no seu funcionamento.

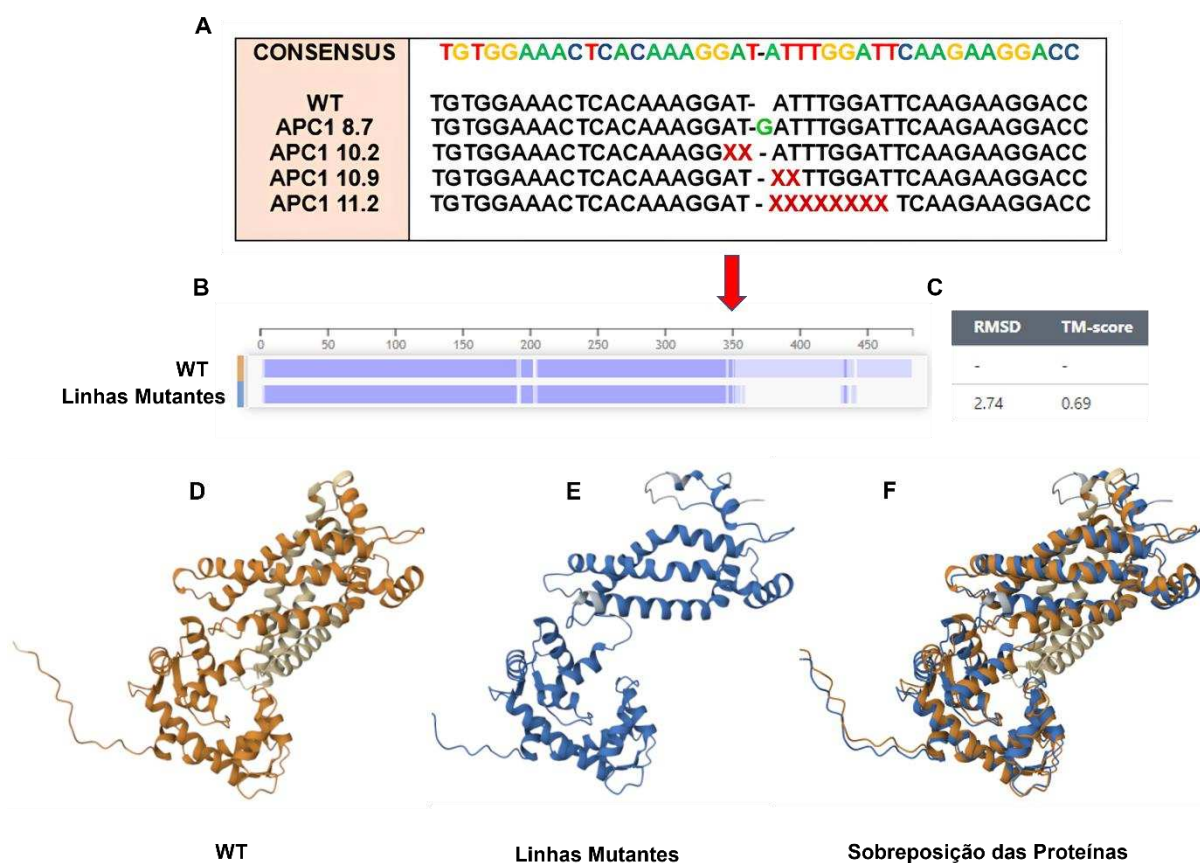


Figura 3. Representação da sequência de interesse do gene AT5G61810 na região onde foram feitas as mutações através do sistema CRISPR/Cas9 (A). As sequências aqui demonstradas foram obtidas através de eletroferogramas resultantes da análise de sequenciamento de Sanger de plantas Col-0 (WT) e mutantes Cas9-free para o transportador APC1. Também estão representados a tradução das proteínas APC1 em WT e nas Linhas Mutantes (B) bem como o RMSD e TM-Score das linhas (C), mostrando que parte da proteína é deletada nos mutantes. O modelo da proteína APC1 em plantas Col-0 e nas plantas mutantes está representado em D e E, em F é possível observar a sobreposição dessas proteínas.

3.2 Caracterização das linhagens mutantes para *APC1*

3.2.1 Germinação das sementes e desenvolvimento de plântulas

Foi possível observar que, independente da adição de sacarose ao meio, todas as linhagens apresentaram taxas de germinação próximas a 100% (Figura 4). Verificou-se também que sementes das linhagens mutantes e WT não apresentaram diferenças significativas quando germinadas em meio sem sacarose (Figura 4A). Contudo, quando houve adição de sacarose ao meio de cultivo observou-se diferença nas duas primeiras avaliações de germinação nos tempos de 12 e 24 horas (Figura 4 B). Após 12 horas em meio com sacarose, as linhagens 10.9 e 11.2 apresentaram taxas de germinação inferiores as observada no WT. Por sua vez, no intervalo de 24 horas, apenas a linhagem 11.2 apresentou taxa de germinação significativamente inferior ao tipo selvagem. Quanto à análise de emissão dos cotilédones (Figura 5), não foram observadas diferenças entre as linhas mutantes e WT, independentemente do tratamento conter ou não suplementação de carbono.

Além da análise de germinação, avaliou-se os efeitos da deficiência na atividade de APC1 sobre o desenvolvimento das plântulas em meio com e sem suplementação de carbono. Para essa análise foi observada tanto a protusão da radícula quanto a emissão de cotilédones, uma vez que, é possível que uma semente emita radícula, mas cesse seu desenvolvimento não dando origem à uma plântula viável. Desse modo, as observações foram realizadas inicialmente de 12 em 12 horas e, transcorridas 48 horas, a análise passou a ser feita de 24 em 24 horas até que as plântulas completassem 10 dias (240 horas), idade em que geralmente é realizado o transplântio para vasos individuais.

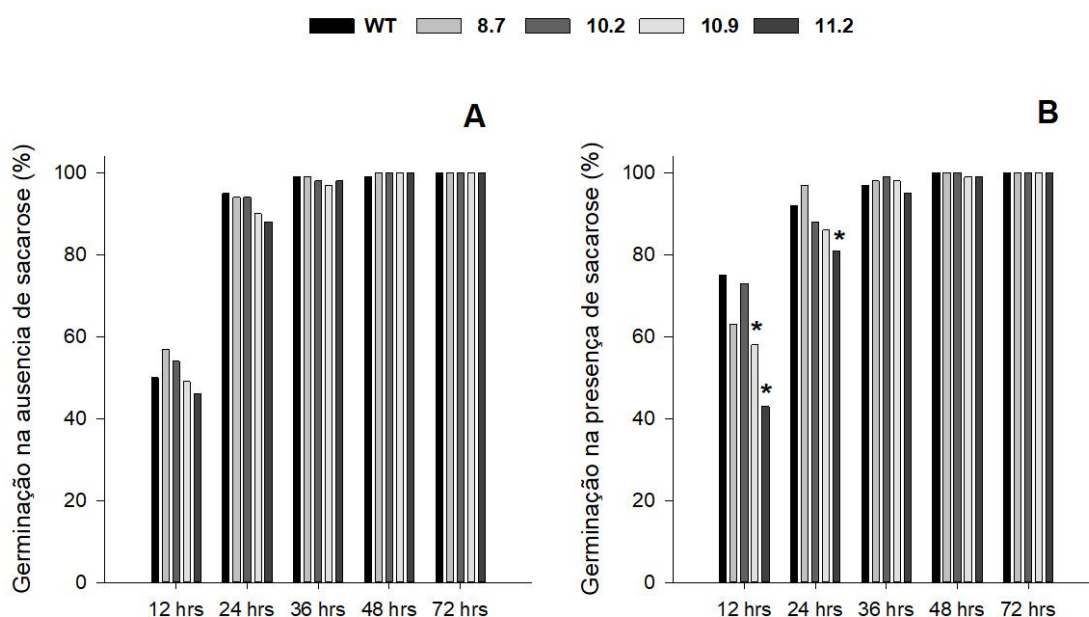


Figura 4. Taxa de germinação de sementes das linhas mutantes Cas9-free de *A. thaliana* para o transportador APC1 em placas contendo meio Murashige e Skoog (MS) meia força na ausência de sacarose (A) e com adição de sacarose a 1% (B). As placas foram mantidas sob condições de dias neutros e avaliadas a cada 12 horas. A protusão da radícula foi o caractere observado para considerar uma semente como germinada. Os valores representam a média \pm erro padrão de quatro repetições biológicas. Os asteriscos mostram diferença significativa pelo teste de Dunnet ($p < 0.05$) em comparação ao selvagem (WT).

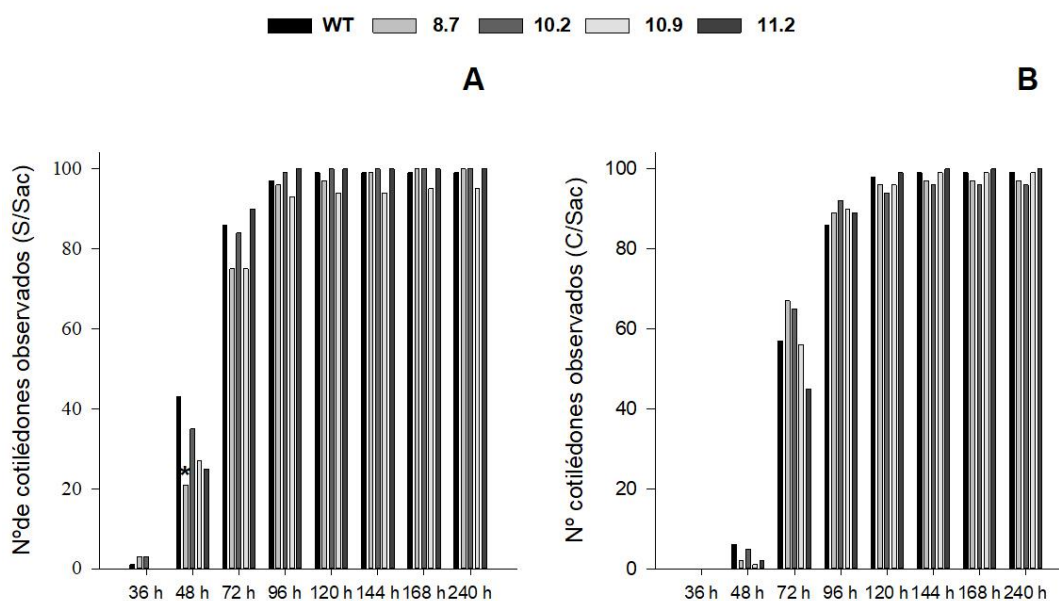


Figura 5. Número de cotilédones observados em plantas de *A. thaliana* mutantes Cas9-free para APC1 germinadas em meio sem adição de sacarose (A) e com adição de sacarose a 1% (B). Os valores representam a média \pm erro padrão de quatro repetições biológicas. Os asteriscos mostram diferença significativa pelo teste de Dunnet ($p < 0.05$) em comparação ao selvagem (WT).

3.2.2 Análises biométricas e morfométricas

De acordo com os resultados de biometria e morfometria da parte aérea, as linhagens mutantes apresentaram menor área total da roseta (não significativo para a linha 11.2; Figura 6B) quando comparados ao WT. Por sua vez, não foram significativas as diferenças para área foliar total e número de folhas por planta (Figuras 6C e D). Menores pesos seco e fresco de roseta foram observados para duas linhagens mutantes (Figura 7A e B). No que diz respeito ao peso fresco e seco de raízes, não foram verificadas diferenças entre os genótipos (Figuras 7C e D). Entretanto, verificou-se alteração na partição de matéria seca entre os diferentes órgãos para a linha 10.9 (Figura 6E).

erro padrão de oito repetições biológicas. Os asteriscos mostram diferença significativa pelo teste de Dunnet ($p < 0.05$) em comparação ao selvagem (WT).

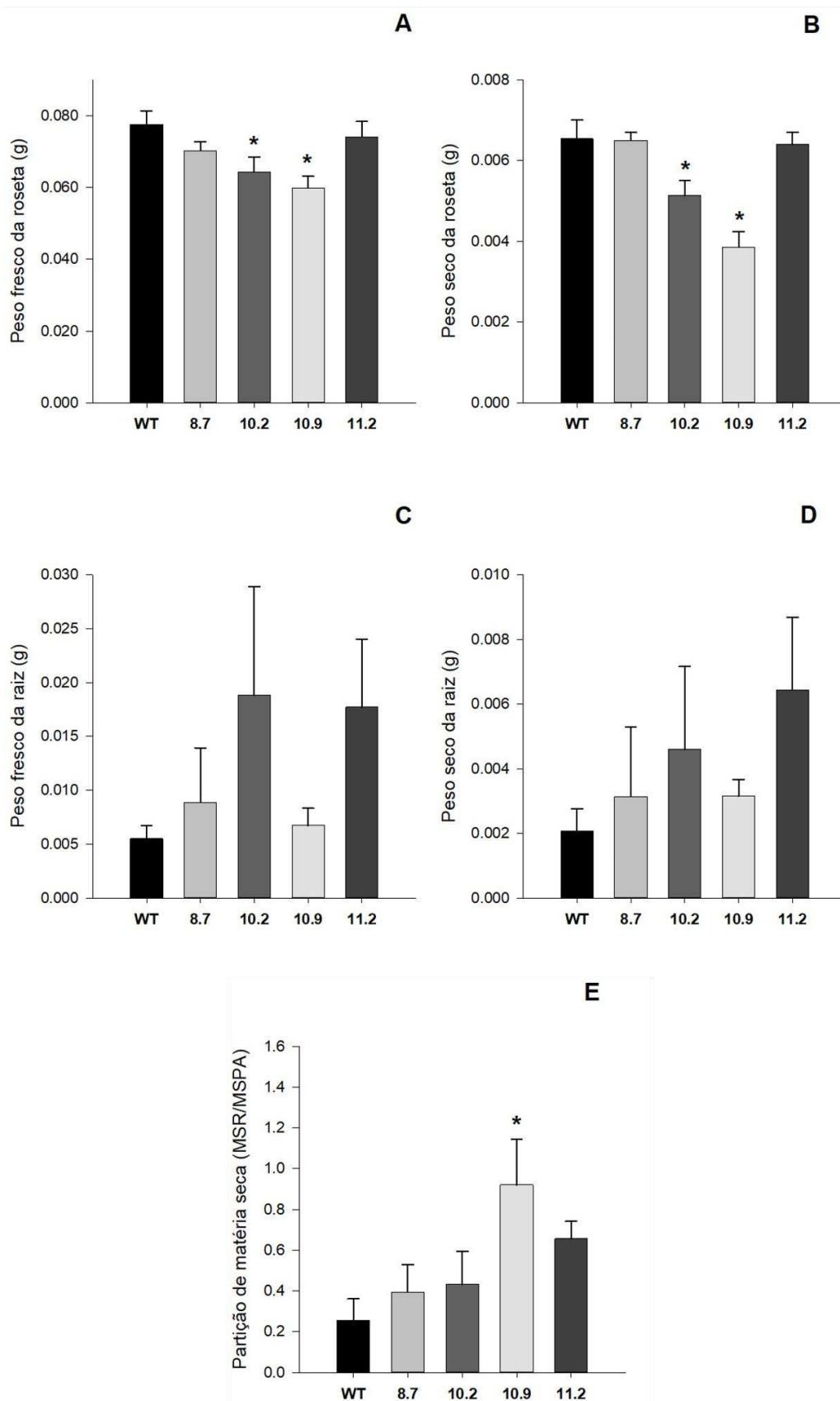


Figura 7. Parâmetros biométricos de plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes Cas9-free para o transportador APC1 mantidas sob condições de dias curtos. Peso fresco da roseta (A); peso seco da roseta (B); peso fresco da raiz (C); peso seco da raiz (D). Os valores representam a média \pm erro padrão de oito repetições biológicas. Os asteriscos mostram diferença significativa pelo teste de Dunnet ($p < 0.05$) em comparação ao selvagem (WT).

3.2.3 Avaliações biométricas de plantas em estágio reprodutivo

Quanto à caracterização de plantas em estágio reprodutivo mantidas sob condições de dias neutros, não foram observadas diferenças significativas entre os genótipos para nenhum dos parâmetros mensurados, exceto para o peso de mil sementes (Figura 8). Os resultados obtidos para este parâmetro sugerem que as sementes de três genótipos mutantes apresentam peso inferior ao mensurado em sementes WT (Figura 8D).

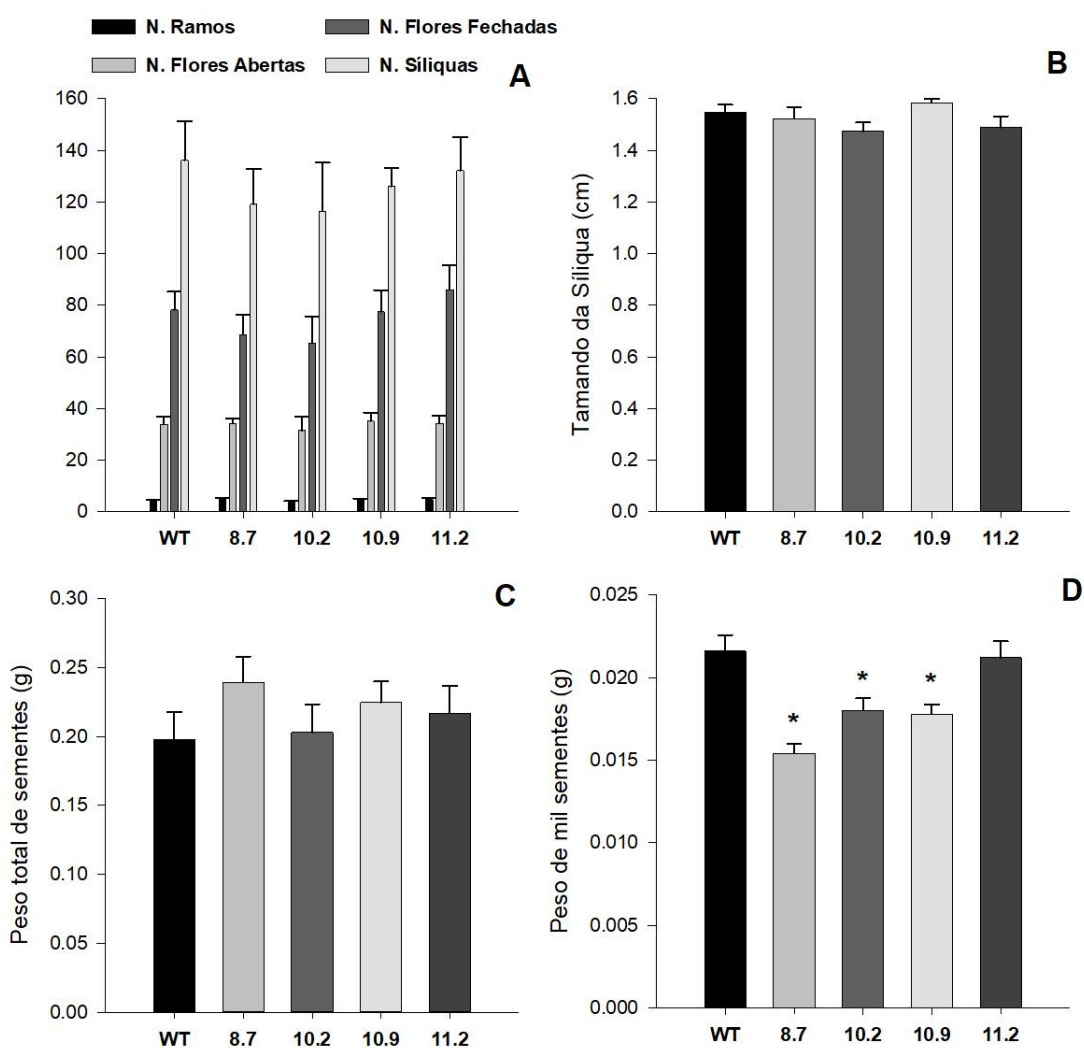


Figura 8. Parâmetros biométricos referentes a fase reprodutiva de plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes Cas9-free para o transportador APC1 mantidas sob condições de dias neutros. Número de ramos; número de flores abertas, número de flores fechadas e número de siliquas por planta (A); tamanho de síliqua (B); peso total de sementes (C) e peso de mil sementes (D). Os valores representam a média \pm erro padrão de dez repetições biológicas. Os asteriscos mostram diferença significativa pelo teste de Dunnet ($p < 0.05$) em comparação ao selvagem (WT).

3.2.4 Níveis de metabólitos do metabolismo primário

Inicialmente foram quantificados os níveis de pigmentos (clorofila *a*, clorofila *b*, clorofilas totais, clorofila *a*/ clorofila *b* e carotenoides). Em um segundo momento, foram feitas também as demais análises relacionadas aos níveis de outros metabólitos associados com o metabolismo do nitrogênio, como: aminoácidos totais, prolina e proteínas por grama de matéria seca. Observou-se que, apesar da deficiência na atividade do transportador APC1 nas linhas mutantes, nenhuma das variáveis relacionadas ao metabolismo de nitrogênio apresentaram diferenças significativas quando comparadas ao WT (Figura 9).

Em relação aos níveis dos principais compostos do metabolismo do carbono (glicose, frutose e sacarose, amido, malato e fumarato) também não foram observadas diferenças significativas entre as linhagens. Contudo, verificou-se diferenças para os níveis de malato (significativo para as linhagens mutantes (8.7, 10.2 e 10.9). Para este ácido orgânico, observou-se maiores níveis de malato em folhas das plantas mutantes para o transportador APC1 em relação as plantas do tipo selvagem (Figura 10E). Tendência de aumento nos níveis foi observada para fumarato

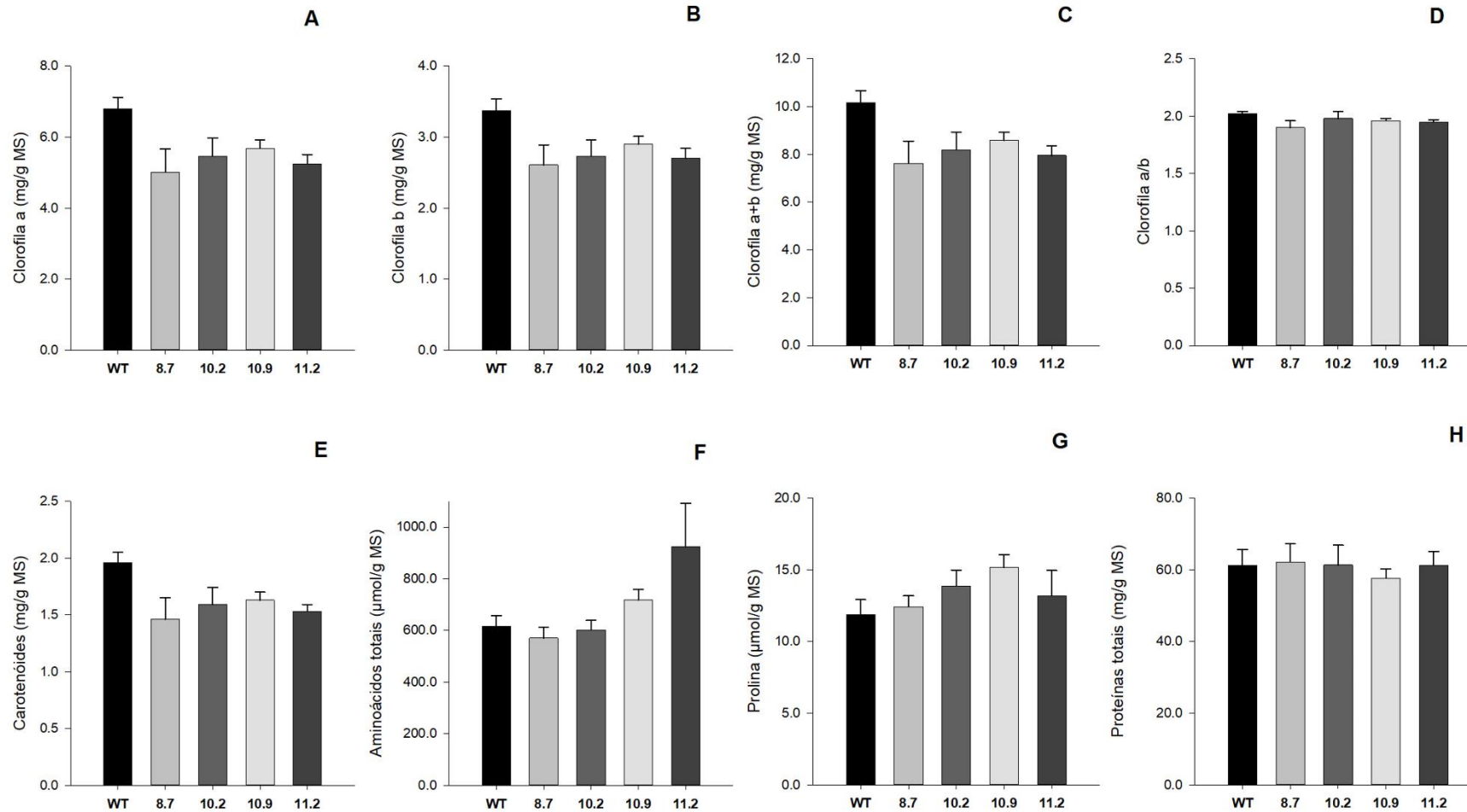


Figura 9. Variação de compostos relacionados ao metabolismo do nitrogênio em plantas mutantes Cas9-free para o transportador APC1, obtidas sob condições de dias curtos. Clorofila *a* (A); clorofila *b* (B); clorofila *a+b* (C); clorofila *a/b* (D); carotenóides (E); aminoácidos totais (F); prolina (G); proteínas totais (H). Os valores representam a média \pm erro padrão de seis repetições biológicas.

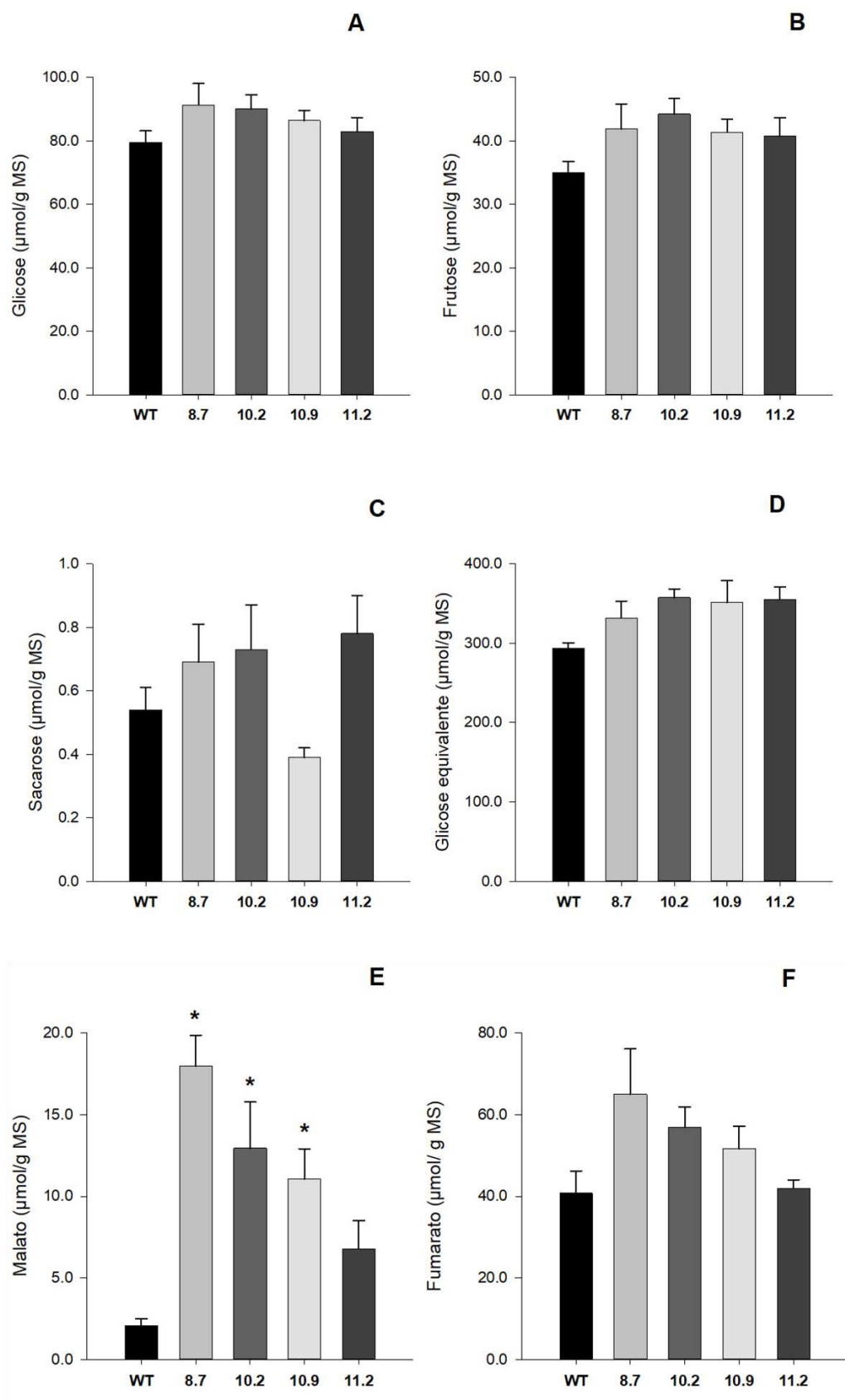


Figura 10. Variação de compostos relacionados ao metabolismo do carbono em plantas mutantes Cas9-free para o transportador APC1, obtidas sob condições de dias curtos. Glicose (A); frutose (B); sacarose (C); amido (D); malato (E); fumarato (F). Os

valores representam a média \pm erro padrão de seis repetições biológicas. Os asteriscos mostram diferença significativa pelo teste de Dunnet ($p < 0.05$) em comparação ao selvagem (WT).

3.3 Ensaios de estresse por alumínio

3.3.1 Influência do Alumínio no crescimento radicular

Ao expor as plantas a condições ótimas, no tratamento em pH 5,7 sem adição de alumínio, foi possível observar um crescimento radicular semelhante para todas as linhas no dia 3. Não obstante, no dia 5, três das quatro linhas mutantes apresentaram crescimento radicular inferior aos observados em plântulas do tipo selvagem (todas, exceto a linha 11.2, Figura 11). Nos dias 7 e 9, por sua vez, apenas uma linha apresentou menor crescimento radicular em relação ao WT, a linha 10.2 no dia 7 e a linha 8.7 no dia 9 (Figura 11A).

O tratamento em pH 4,0, sem adição de alumínio, por outro lado promoveu diferenças marcantes entre as linhagens mutantes e WT, sendo que as linhagens mutantes apresentaram menor crescimento radicular ao longo dos dias de maneira significativa (Figura 11B). Especificamente, no dia 3 apenas a linhagem 10.9 diferiu do tipo selvagem de forma significativa, ao passo que no dia 9 todas as linhas mutantes apresentaram valores de tamanho radicular estatisticamente menores em relação aos observados para o genótipo WT (Figura 11B).

No que diz respeito ao papel do transportador APC1 em condições de estresse por alumínio, não foi possível observar diferenças estatísticas entre os genótipos no tratamento em pH 4,0 com adição de Al^{3+} na concentração de 300 μM , de modo que o crescimento radicular das plantas selvagens e mutantes foi semelhante ao longo dos dias (Figura 11C).

Quando comparamos o crescimento radicular nos tratamentos em pH 4,0 com e sem adição de alumínio (Figura 12), fica claro que a presença do íon afeta de forma significativa o crescimento radicular dentro de um mesmo genótipo, exceto para os genótipos 10.9 e 8.7 nos dias 5 e 9 respectivamente. É também notável um contraste entre WT e as linhas mutantes no que diz respeito a redução do crescimento radicular no tratamento contendo alumínio. É visível que o genótipo selvagem teve um crescimento radicular mais drasticamente reduzido quando comparado com as linhagens mutantes para o transportador. No dia 9, por exemplo, WT teve seu

crescimento reduzido em 52,8% na presença de alumínio, enquanto que a linha 8.7 manteve praticamente o mesmo crescimento tanto na presença quanto na ausência do alumínio em nível tóxico; as linhas 10.9 e 11.2 por sua vez também foram menos afetadas pelo alumínio que WT sendo que a redução do crescimento radicular foi de 29,4% e 38,75%, respectivamente.

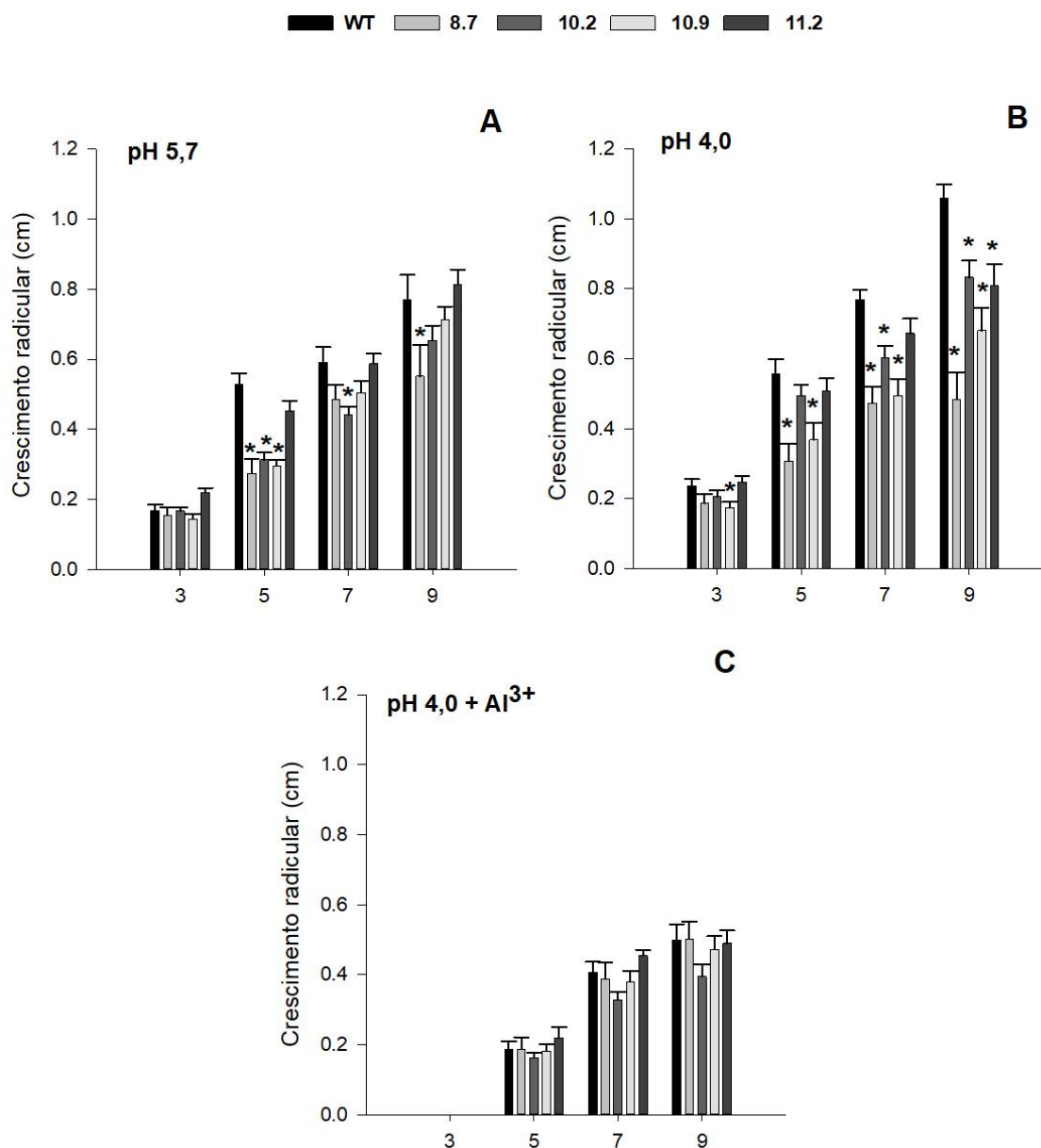


Figura 11. Crescimento radicular de *Arabidopsis thaliana* em linhas mutantes Cas9-free para o transportador APC1. As plantas foram mantidas sob condições de dias curtos, em placas, nos tratamentos: pH 5,7 (A); pH 4,0 (B) e pH 4,0 + Al³⁺ (300 μM) (C). Os valores representam a média ± erro padrão de quatro medidas de oito repetições biológicas. Os asteriscos mostram diferença significativa pelo teste de Dunnet ($p < 0.05$) em comparação ao selvagem (WT).

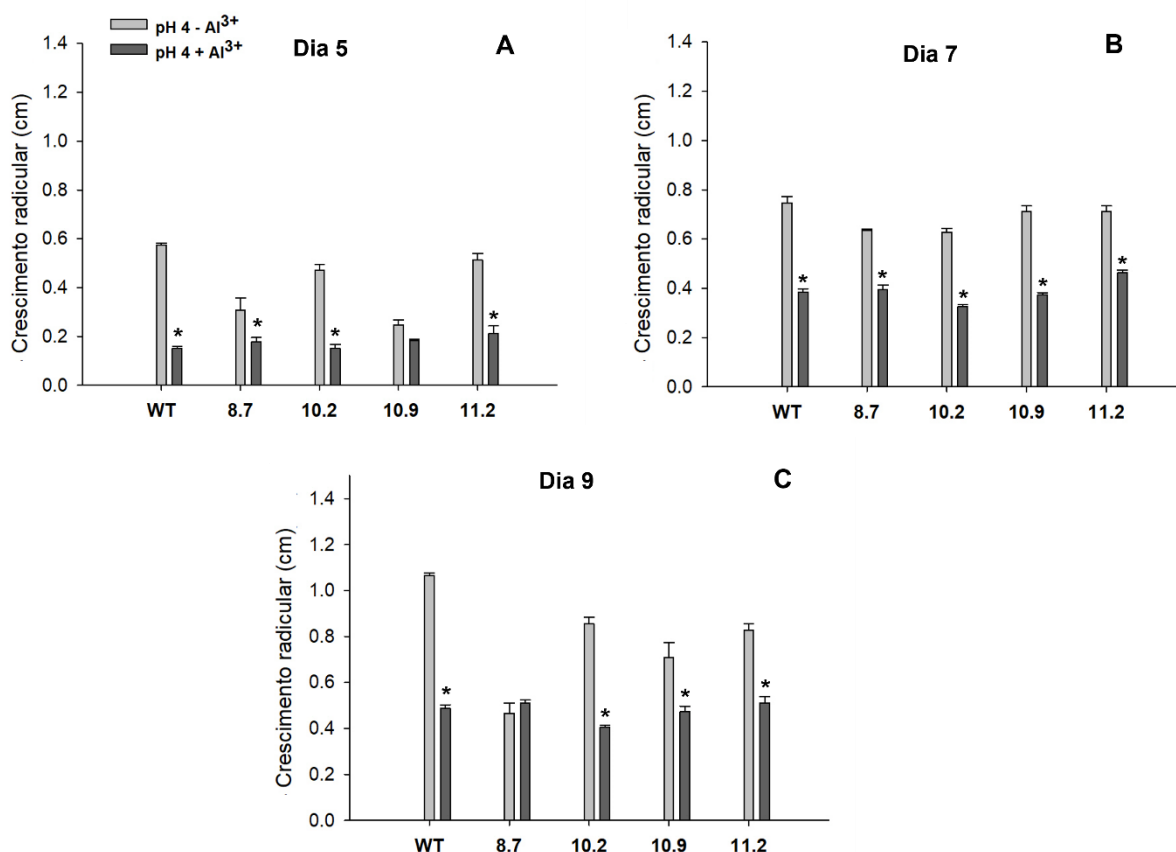


Figura 12. Crescimento radicular nas linhas mutantes Cas9-free para APC1 em pH 4,0 com e sem adição de alumínio (300 μ M) nos dias cinco (A), sete (B) e nove (C). As plantas foram mantidas em placas sob condições de dias curtos. Os valores representam a média \pm erro padrão de quatro medidas de oito repetições biológicas. Os asteriscos mostram diferença significativa pelo teste t ($p < 0.05$) e compara os efeitos da presença ou ausência de alumínio dentro de um mesmo genótipo.

3.3.2 Testes histoquímicos

O teste de hematoxilina, como esperado, acusou presença de alumínio apenas nas plântulas do tratamento em pH 4,0 com adição de alumínio (300 μ M). Entretanto, por se tratar de um método qualitativo não é possível afirmar que houve uma diferença no acúmulo de alumínio entre os genótipos (Figura 13A).

O teste NBT (Figura 13B), por sua vez, apesar de também ser qualitativo, sugere uma diferença mais clara no estresse gerado nas plantas entre os tratamentos. Verifica-se uma coloração mais intensa em radículas de plântulas cultivadas na presença de alumínio quando comparado com os tratamentos sem adição de alumínio (pH 4,0 e 5,7). Também é notável que as plantas no pH 4,0 sem adição de alumínio

apresentam coloração mais acentuada que as plantas em pH 5,7, o que demonstra que o pH baixo por si só já é um fator estressante. No que diz respeito às diferenças entre os genótipos, as plantas mutantes parecem ter coloração mais acentuada que WT nos tratamentos com e sem alumínio em pH 4,0.

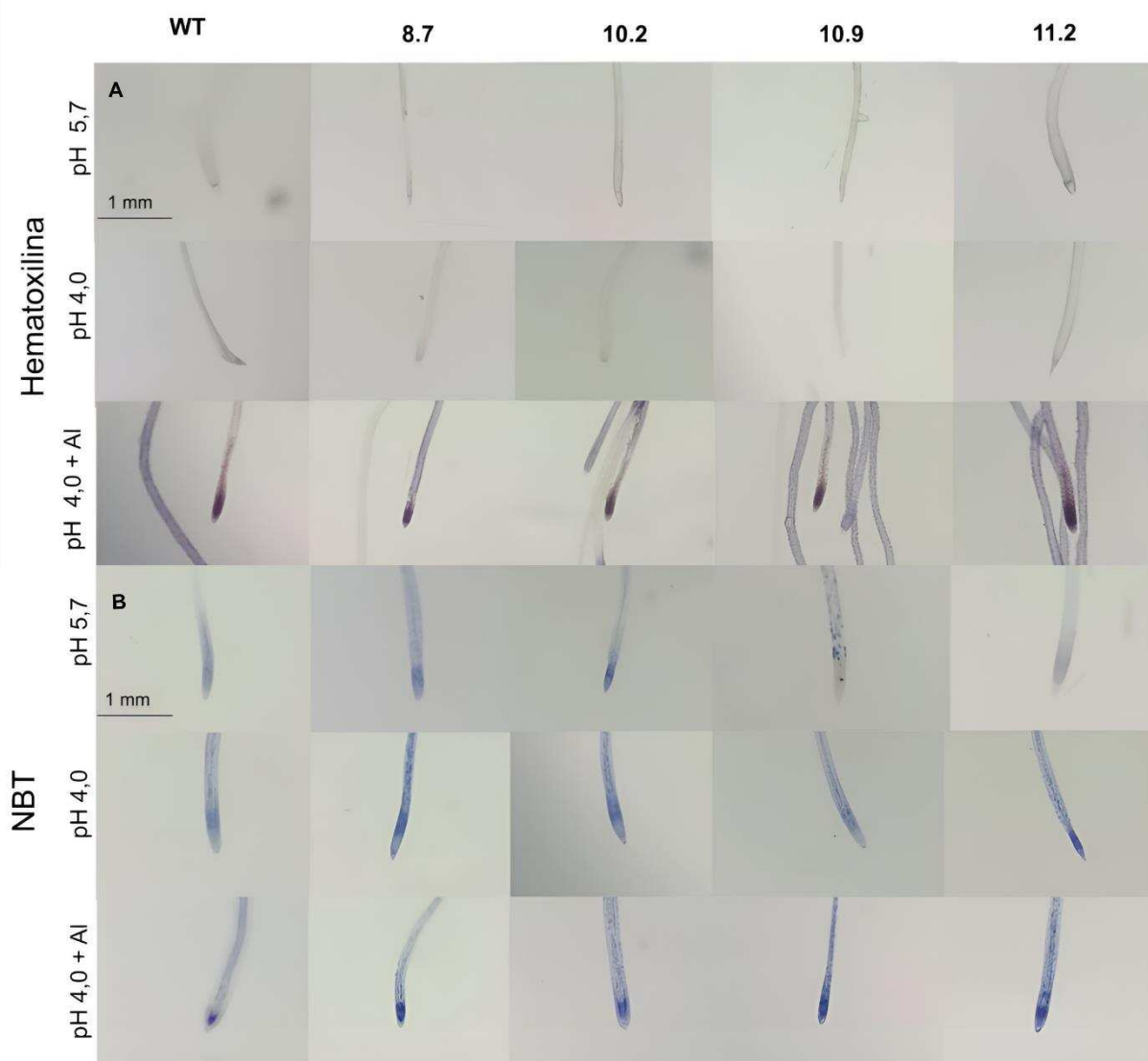


Figura 13. Ensaio histoquímico para detecção de alumínio e espécies reativas de oxigênio em plântulas de *Arabidopsis thaliana* mutantes Cas9-free para APC1. Imagens de raízes de plântulas expostas aos corantes hematoxilina (A) para detecção de alumínio nos tecidos radiculares e NBT (B) para detecção de ânion superóxido.

4. DISCUSSÃO

O transportador APC1 afeta a germinação e outros processos fisiológicos em *A. thaliana*?

Em um primeiro momento das avaliações realizadas, o transportador APC1 não aparentou ser de grande relevância para o processo germinativo das sementes (Figura 4), exceto no meio suplementado com sacarose, onde duas linhas mutantes apresentaram menores taxas de germinação na primeira leitura às 12 horas (Figura 4B). Neste contexto, é possível que outros transportadores de adenilatos como os AACs não conseguiram suprir a demanda de ATP necessária para o início da germinação na ausência do APC1. Contudo, com o passar do tempo esses demais transportadores podem ter conseguido suprir essa demanda de forma que a falta do transportador APC1 não tenha afetado as taxas de germinação ao fim de 72 horas. Este resultado conflita com o de estudos anteriores que demonstraram não haver diferenças significativas na germinação de plantas mutantes para APC1 em meio acrescido de sacarose (NERI-SILVA, 2021). O mesmo trabalho observou diferenças significativas nas taxas de germinação para duas linhas quando o meio não tinha fonte adicional de carbono (NERI-SILVA, 2021). Todavia, essa diferença pode ser atribuída à idade das sementes, ao lote, ou a algum outro fator externo que possa ter interação com a atividade da cadeia de transporte de elétrons, produção e transporte de ATP na mitocôndria. Não obstante, pesquisas *in silico* sugerem que a expressão do gene *APC1* é reduzida tanto em sementes secas quanto embebidas (Figura 14) (NAKABAYASHI et al., 2005; SCHMID et al., 2005). O transcriptoma de sementes de *A. thaliana* é caracterizado por múltiplos mecanismos reguladores (NAKABAYASHI et al., 2005), de modo que a expressão e regulação de outros genes como o *AAC1* e *AAC2* parecem ser mais significativas para o processo de germinação das sementes (DA FONSECA PEREIRA et al., 2018).

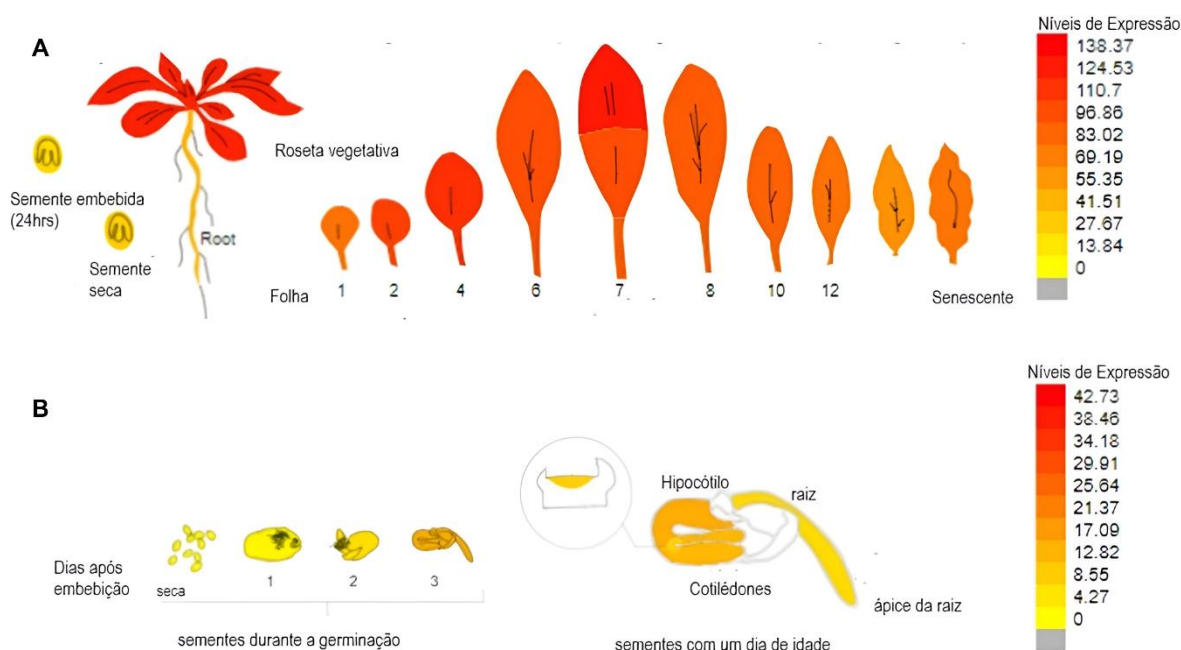


Figura 14. Perfil de expressão do gene AT5G61810 que codifica a proteína APC1 na roseta em fase vegetativa, em folhas e em sementes secas e embebidas (AtGenExpress eFP: AT5G61810/ APC1) (A) e durante o processo germinativo [Klepikova eFP (RNA-Seq data): AT5G61810 / APC1] (B).. Fonte: <https://bar.utoronto.ca/eplant/>.

Por outro lado, a mutação para o transportador APC1 afetou a área total da roseta da maioria das linhas mutantes, bem como o peso fresco e seco da roseta de duas linhagens (Figuras 6B e 7A e B). Apesar de não terem sido observadas diferenças para a área foliar total e número de folhas (Figuras 6C e D), tais resultados ainda parecem corroborar o que é observado para o perfil de transcriptoma do gene, que é altamente expresso na roseta na fase vegetativa (Figura 14) (NERI-SILVA, 2021; MONNÉ et al., 2015; SCHMID et al., 2005). Estas observações sugerem uma maior expansão foliar ao invés de um aumento no número de folhas. Resultados semelhantes para a área e peso fresco da roseta foram igualmente observados anteriormente (NERI-SILVA, 2021).

A mutação para o transportador APC1 não afetou de maneira significativa o peso fresco e seco da raiz (Figura 7C e D), o que pode ser explicado por uma menor expressão do gene *APC1* em raízes quando comparado com outros transportadores de adenilatos, como o ADNT1, os quais provavelmente supriram as demandas energéticas (PALMIERI et al., 2008). Desse modo, quando observamos a partição de

matéria seca, apesar de o resultado ter sido significativo para apenas uma das linhas, é possível observar uma tendência de aumento para as demais linhas mutantes. Em conjunto, esses resultados corroboram com um menor crescimento da parte aérea e/ou maior investimento em sistema radicular nessas linhas.

No estágio reprodutivo, o desenvolvimento dos órgãos demanda uma quantidade significativa de energia, destacando a importância de um funcionamento eficiente tanto das mitocôndrias quanto dos transportadores de adenilatos (XU et al., 2008). A necessidade por energia é tão acentuada que durante a formação de órgãos florais ocorre um aumento no número de mitocôndrias para poder suprir essa demanda energética (MILLAR et al., 2011). O transportador APC1 é altamente expresso em flores (MONNÉ et al., 2015) e apesar de não terem sido observadas diferenças entre os genótipos para os parâmetros números de flores abertas e fechadas, a falta do transportador APC1 nas linhas mutantes se traduz em uma redução do peso de mil sementes (Figura 8D). Tal resultado é um indicativo de que plantas com uma deficiência do transportador *APC1* geraram sementes com menos reservas ou com embriões menos robustos. Concomitante a isto, plantas mutantes para APC1 apresentaram síliquas com comprimento menor e com menor número de sementes por síliqua, quando mantidas sob condições de dias curtos, o que corrobora com a importância do transportador para a fase reprodutiva das plantas nessas condições (NERI-SILVA, 2021). É importante ressaltar, todavia, que ao utilizarmos a condição de dias neutros é possível que o fenótipo tenha se tornado menos marcante, pois ao aumentarmos o período de luz também aumentamos o aporte energético provindo da fotossíntese e reduzimos o período em que a planta retira a maior parte de sua demanda energética das mitocôndrias na ausência de luz. A condição de dias neutros pode, portanto, ter facilitado que outros transportadores de adenilatos compensassem a falta do APC1. Dessa forma, sugere-se realizar as análises da fase reprodutiva em plantas mutantes para APC1 mantidas sob condições de dias longos, de modo a observar se as linhas mutantes recuperariam ou não o peso de mil sementes, o tamanho das síliquas e o número de sementes por síliqua quando em comparação com o tipo selvagem.

O transportador APC1 é relevante para o metabolismo de plantas adultas sob condições ótimas?

Em conjunto, os resultados apresentados não deixam claro a importância do transportador APC1 para o metabolismo primário em plantas nas condições avaliadas. Entretanto, claro efeito foi observado sobre os níveis foliares de malato, que foi elevado nas linhas mutantes em comparação com o tipo selvagem (Figura 10E). Apesar do transportador APC1 ser altamente expresso em folhas, tecidos fotossintetizantes também contam com a produção de ATP provida pelos cloroplastos no período luminoso (GASDESTROM & IGAMBERDIEV, 2016). Isso, além da presença de outros carreadores mitocondriais e suas isoformas pode explicar o porquê de plantas sem a proteína APC1 funcional conseguirem manter o desenvolvimento foliar sem grandes perdas metabólicas (PALMIERI et al., 2008). Por outro lado, o aumento significativo dos níveis de malato pode indicar que as linhas mutantes estão tendo uma menor conversão de malato em oxaloacetato e com isso uma menor produção de NADH pelo ciclo TCA. A mutação para o transportador APC1 parece, portanto, afetar o funcionamento do complexo succinato desidrogenase, que apresenta papel crucial tanto para o funcionamento do ciclo TCA quanto para a cadeia transportadora de elétrons (ARAÚJO et al., 2011; FUENTES et al., 2011). É possível, portanto, que níveis maiores de malato ocorram em decorrência de uma menor produção de NADH o que acarretaria em menos substrato para a cadeia transportadora de elétrons. Essa falta de poder redutor na forma de NADH afetaria por fim o processo de fosforilação oxidativa e com isto reduziria a produção de ATP a partir do gradiente eletroquímico de prótons. É possível, contudo, que esse aumento nos níveis de malato seja justamente uma estratégia para contornar um desbalanço na cadeia transportadora de elétrons, resultante da falta de atividade do transportador APC1; que ao estar não funcional promoveria um acúmulo de NADH em detrimento do NAD^+ na cadeia transportadora de elétrons.

O malato e fumarato se relacionam com o estoque de carbono nas plantas e funcionam como contra íon para a manutenção do pH celular e da abertura estomática (ARAÚJO et al., 2011; FERNIE & MARTINOIA, 2009). Os altos níveis de fumarato em *A. thaliana* sugerem que este ácido orgânico constitui uma fração significativa do carbono fixado para esta espécie (ARAÚJO et al., 2011). O malato também tem sua importância destacada para a produção de ATP nas mitocôndrias e em respostas de plantas a patógenos (FERNIE & MARTINOIA, 2009). A troca de intermediários do ciclo TCA através da membrana mitocondrial conecta o ciclo TCA a diversos processos metabólicos como a gliconeogênese, o ciclo do glioxilato e a biossíntese de

aminoácidos e ácidos nucleicos (ARAÚJO et al., 2011). O malato também está relacionado com eficiência fotossintética. De modo que quando há excesso de NADPH a enzima NADP-malato desidrogenase converte OAA em malato para regenerar NADP, de forma que em cloroplastos o malato contribui para o balanço entre ATP/NADPH (FERNIE & MARTINOIA, 2009). Essa linha de raciocínio parece poder ser empregada também no presente estudo com o malato agindo como um fator balanceador entre NAD, NADH e com isso influenciando a produção de ATP. Além disso a tendência das linhas mutantes em acumular compostos relacionados ao metabolismo do carbono parece se traduzir em um menor crescimento das plantas, que na ausência do APC1 aparentam não conseguir utilizar os compostos de carbono de forma tão eficiente.

O APC1 tem um papel importante em plantas submetidas a estresse abiótico por alumínio?

Experimentos em placas sob condições ótimas (meio com pH 5,7, sem alumínio) observou-se um crescimento radicular menor nas linhas mutantes em relação ao observado em plântulas WT (Figura 11A). Tal resultado sugere uma relevância do transportador APC1 para o crescimento radicular de plântulas, que mesmo em condições ideais, parece não conseguir ser compensada pela presença de outros transportadores mitocondriais de adenilatos, como os AACs, que dentre todos, possui AAC1 e AAC2 como as isoformas mais abundantes (FUCHS et al., 2020). Resultados prévios também corroboram com a importância de APC1 nessas mesmas condições (NERI-SILVA, 2021). Nesse estudo, verificou-se diferenças marcantes para o crescimento da raiz de plantas mutantes ao longo de 15 dias após a germinação em meio sem adição de sacarose. É possível que essa redução no crescimento radicular observado em plântulas de linhas mutantes ocorra devido a uma menor eficiência na mobilização do ATP da mitocôndria para o citosol quando há ausência da atividade do transportador APC1. Neste cenário o ATP não consegue chegar a outras organelas e no citosol de forma suficiente para dar suporte às reações de síntese necessárias ao crescimento da planta (Figura 15A). Outra possibilidade estaria relacionada a uma menor importação de Pi pela mitocôndria na ausência do transportador, o que poderia refletir em uma menor produção de ATP, uma vez que, teríamos menos fosfato inorgânico para converter moléculas de AMP e ADP para ATP

(IGAMBERDIEV & KLECZKOWSKI, 2015; ZHU et al., 2012) (Figura 15B). Contudo, é importante ressaltar que existem transportadores de fosfato inorgânico mitocondriais (PiC ou MPT) que estão diretamente envolvidos nos níveis internos de Pi nas mitocôndrias (ZHU et al., 2012). Dessa forma, ainda não é claro o quanto o transportador APC1 seria de fato relevante para a manutenção desses níveis internos de fosfato e por conseguinte na produção de ATP.

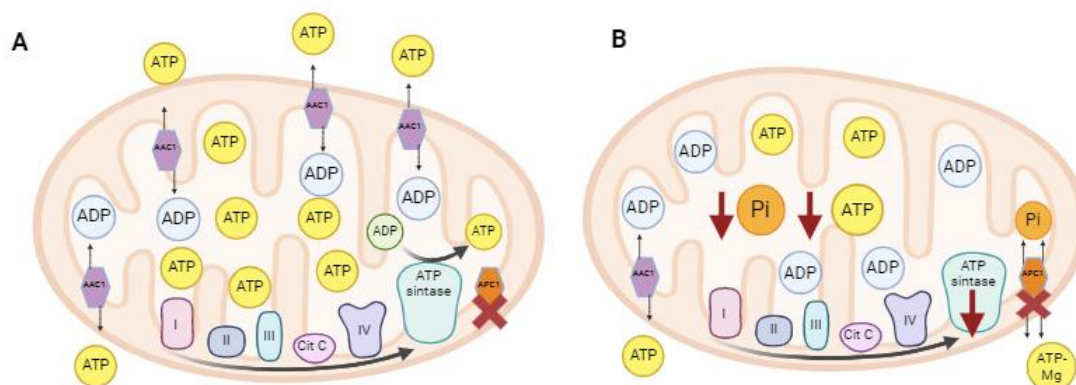


Figura 15. Representação esquemática de possíveis mecanismos envolvendo transportadores de adenilatos no suprimento de energia pela mitocôndria na ausência do transportador APC1. Em A, haveria um acúmulo de ATP na matriz mitocondrial em função dos outros transportadores de adenilatos não estarem suprindo o transporte de ATP na ausência do APC1. Neste caso, as mitocôndrias teriam o ATP disponível na matriz mitocondrial, mas este não estaria sendo devidamente mobilizado. Em B considera-se que a deficiência em APC1 acarretaria num menor importe de Pi para a matriz mitocondrial, o que impactaria negativamente na produção de ATP. Nessa hipótese espera-se que o fator limitante para o crescimento das plantas seja a quantidade de ATP produzido pela mitocôndria e não a sua mobilização.

Verificou-se para as plantas expostas a condições de pH ácido sem a adição do alumínio, um crescimento menor das linhas mutantes em comparação com o WT ao longo do tempo (Figura 11B). O comportamento observado pode estar relacionado com a capacidade do transportador APC1 de realizar o transporte de ATP de forma eletricamente neutra quando associado ao magnésio (MONNÉ & PALMIERI, 2014). Uma vez que o pH ácido afeta a capacidade de trocas catiônicas nas raízes (NUNES-NESI et al., 2014) e se relaciona com o potencial elétrico de membranas celulares (LYU & LAZÁR, 2017), a maioria dos transportadores de adenilatos que dependem de

um gradiente eletroquímico para realizar o transporte de ATP vão ter seu funcionamento afetado. Contudo, APC1, ao associar o ATP com Mg^{2+} , torna a troca de substrato eletricamente neutra e, portanto, independente do potencial de membrana ($\Delta\psi$) e do pH (MONNÉ & PALMIERI, 2014), permitindo que a planta enfrente essa situação adversa.

Ao analisar as linhas deficientes na atividade de APC1 no meio com pH 4,0 acrescido de alumínio, observou-se um menor crescimento radicular para todos os genótipos (Figura 11C). Apesar da ausência de diferenças claras entre as linhagens estudadas, o comportamento observado nos tratamentos anteriores sugere um papel importante do APC1 em respostas a estresses por alumínio, uma vez que as linhagens mutantes tem seu crescimento menos impactado do que o WT na presença do alumínio, o contrário do que observamos em pH 5,7 e pH 4,0 (Figura 12). O atraso no desenvolvimento, que só ocorre a partir do dia cinco, (Figura 11C) associado aos resultados obtidos quando comparamos o crescimento das linhas em pH 4,0 com e sem a adição do alumínio (Figura 12) demonstram como a presença do íon afeta o crescimento radicular. Tais observações parecem apontar que as plantas deficientes para a proteína APC1 de alguma forma tornaram-se menos sensíveis à presença de alumínio quando comparadas com o tipo selvagem. Como se sabe, o principal alvo da toxicidade do alumínio é o ápice radicular e os principais efeitos desse tipo de estresse se traduzem em uma inibição do alongamento e do crescimento celular (PANDA et al., 2009). Desse modo há uma redução no crescimento da raiz, que fica atrofiada, e isso reflete de forma negativa na absorção de água e nutrientes pela planta (PANDA et al., 2009). Atualmente, são conhecidos dois mecanismos de defesa: mecanismo de exclusão e mecanismo de tolerância, através dos quais as plantas conseguem resistir frente a essa condição adversa (NUNES-NESI et al., 2014). No mecanismo de exclusão, o alumínio ativa um canal de ânions na membrana e estimula a secreção de ácidos orgânicos; a presença destes no meio vai então prevenir a entrada do alumínio na raiz (NUNES-NESI et al., 2014). Já no mecanismo de tolerância, uma vez que o alumínio esteja dentro da célula, ele vai ser quelado no citosol por ácidos orgânicos e então compartimentalizado em organelas como vacúolos (NUNES-NESI et al., 2014). No presente estudo, uma possibilidade seria a de que as plantas mutantes estariam acumulando malato (como foi observado anteriormente em condições ótimas) e por isso estariam apresentando uma menor sensibilidade ao alumínio ao exsudar esse ácido orgânico, ou então ao quelar este íon no citosol e o

compartimentalizar. Além disso, se considerarmos que as linhas mutantes de fato apresentam níveis maiores de malato associados a uma menor produção de NADH é possível que a falta de atividade da proteína APC1 acabe sendo “compensada”; assim o acúmulo de NADH previsto em decorrência do não funcionamento do transportador estaria sendo compensado por uma menor produção de NADH pelo ciclo TCA e com isso a produção de ácidos orgânicos seria mantida. Uma forma interessante de ajudar na validação desses pressupostos seria através de um ensaio que quantificasse os ácidos orgânicos tanto nas plântulas submetidas ao estresse quanto no meio de cultivo.

Os testes histoquímicos apontaram presença de alumínio nas raízes de plantas submetidas ao tratamento em pH 4,0 + Alumínio, bem como, presença de espécies reativas de oxigênio mais marcante nos tratamentos em pH 4,0 e pH 4,0 + Alumínio, quando comparados ao tratamento em pH 5,7 (Figuras 13 A e B). As plantas mutantes parecem apresentar uma coloração mais intensa que o WT quando observamos os níveis de EROs em pH 4 e na presença de alumínio. Esses fatores em conjunto corroboram a presença de alumínio e do pH ácido como fatores estressantes e permitem um vislumbre dos impactos do APC1 sobre a respiração mitocondrial. Na presença de alumínio, principalmente, há uma maior formação de espécies reativas de oxigênio aumentando os danos oxidativos e coibindo a respiração mitocondrial (NUNES-NESI et al., 2014). Estudos anteriores relacionaram a produção de EROs induzidas pela presença de alumínio a danos nos complexos I e III na cadeia transportadora de elétrons através da interação do alumínio com a proteína ferro-enxofre (Fe-S) (LI & XING, 2011). Portanto, se considerarmos que o transportador APC1 impacta no funcionamento da cadeia transportadora de elétrons, isso estaria de acordo com uma formação de EROs mais acentuada nas plantas que carecem dessa proteína transportadora. Entretanto, por se tratar de análises qualitativas estes testes não deixam clara a diferença no acúmulo de alumínio e de espécies reativas de oxigênio entre as linhas. Desse modo, sugere-se que testes quantitativos seriam uma melhor opção para estudos futuros, de modo a se obter maiores informações acerca de uma possível associação entre a menor susceptibilidade a este tipo de estresse e a produção de EROs em plantas com deficiência do transportador APC1.

5. CONCLUSÕES

Em conjunto, os resultados obtidos sugerem que em condições ótimas o transportador APC1 possui um papel relevante no desenvolvimento de plântulas e no crescimento da parte aérea durante a fase vegetativa. APC1 também parece ser importante na fase reprodutiva, especialmente, para a formação de sementes e produção. Em relação a sua função no metabolismo, a inatividade da proteína APC1 acarreta aumento nos níveis de malato em folhas, o que parece indicar um desbalanço no funcionamento do ciclo TCA quando a exportação de ATP não é adequada.

Sob condições de estresse abiótico as linhagens deficientes na função de APC1 demonstraram ser menos sensíveis ao estresse por alumínio do que o tipo selvagem. Também foi possível observar a importância do transportador em condições de estresse por acidez do meio. Nesta condição a deficiência na atividade de APC1 suprimiu o crescimento radicular das plântulas mutantes quando comparadas com o tipo selvagem, que possui o transportador ativo. Tais resultados reforçam a relevância do transporte eletricamente neutro de ATP em condições de pH acidificado catalisado por APC1.

Novos estudos fazem-se necessários para compreender melhor as funções do transportador APC1 sob condições de estresse abiótico. Entre as análises sugeridas está o estudo das outras isoformas de APCs (*APC2* e *APC3*) em condições ótimas e de estresse, além das interações com outros transportadores mitocondriais de adenilatos como AACs e ADNT1. Em conjunto, essas informações contribuirão para melhor compreender as funções específicas dos transportadores APCs e AACs no desenvolvimento de *A. thaliana* e nos mecanismos de respostas a estresses abióticos.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, W. L.; NUNES-NESE, A.; FERNIE, A. R. (2011). Fumarate: Multiple functions of a simple metabolite. **Phytochemistry**, 72: 838-843.
- ARAÚJO, W. L.; NUNES-NESE, A.; OSORIO, S.; USADEL, B.; FUENTES, D.; NAGY, R.; BALBO, I.; LEHMANN, M.; STUART-WITKOWSKI, C.; TOHGE, T.; MARTINOIA, E.; JORDANA, X.; DAMATTA, F. M.; FERNIE, A. R. (2011). Antisense inhibition of the Iron-Sulphur subunit of succinate dehydrogenase enhances photosynthesis and growth in tomato via an organic acid-mediated effect on stomatal aperture. **The Plant Cell**, 23: 600-627.
- AYRES, M.; AYRES JUNIOR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. (2007). BioEstat 5.3: aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biomédicas. Sociedade Civil Mamirauá: Belém, Pará-Brasil. 324.
- BRADFORD, M. M (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72: 248–254.
- CROSS, J. M.; VON KORFF, M.; ALTMANN, T.; BARTZETKO, L.; SULPICE, R.; GIBON, Y.; PALACIOS, N.; STITT, M. (2006). Variation of enzyme activities and metabolite levels in 24 *Arabidopsis* accessions growing in carbon-limited conditions. **Plant Physiology**, 142: 1574–88.
- DA FONSECA-PEREIRA, P.; NERI-SILVA, R.; CAVALCANTI, J. H. F.; BRITO, D. S.; WEBER, A. P. M.; ARAÚJO, W. L.; NUNES-NESE, A. (2018). Data-Mining Bioinformatics: Connecting Adenylate Transport and Metabolic Responses to Stress. **Trends in Plant Science**, 23(11): 961-974.
- DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J.B (1983). A plant DNA miniprep: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**. 1 (4): 19-21.

FAO, ITPS (2015). Status of the world's soil resources (SRW) – Main Report. Food and Agriculture Organization of the United Nations and Intergovernmental Technical Panel on Soils, Rome, Italy, 122-124.

FERNIE, A.R.; MARTINOIA, E (2009). Malate. Jack of all trades or master of a few? **Phytochemistry**, 70: 828-832.

FERNIE, A. R.; ROESSNER, U.; GEIGENBERGER, P (2001). The sucrose analog palatinose leads to a stimulation of sucrose degradation and starch synthesis when supplied to discs of growing potato tubers. **Plant Physiology**, 125: 1967–77.

FIERMONTE, G.; DE LEONARDIS, F.; TODISCO, S.; PALMIERI, L.; LASORSA, F. M.; PALMIERI, F. (2004). Identification of the mitochondrial ATP-Mg/Pi transporter: bacterial expression, reconstitution, functional characterization, and tissue distribution. **The Journal of Biological Chemistry**, 279: 30722-30730.

FUCHS, P.; RUGEN, N.; CARRIE, C.; ELSASSER, M.; FINKEMEIER, I.; GIESE, J.; HILDEBRANDT, T. M.; KUHN, K.; MAURINO, V. G.; RUBERTI, C.; SCHALLENBERG-RUDINGER, M.; STEINBECK, J.; BRAUN, H. P.; EUBEL, H.; MEYER, E. H.; MULLER-SCHUSSELE, S. J.; SCHWARZLADER, M. (2020). Single organelle function and organization as estimated from *Arabidopsis* mitochondrial proteomics, **The Plant Journal**, 101 (2): 420-441.

FUENTES, D.; MENESES, M.; NUNES-NESE, A.; ARÁUJO, W. L.; TAPIA, R.; GÓMEZ, I., HOLUIGUE, L.; GUTIÉRREZ, R. A.; FERNIE, A. R.; JORDANA, X. (2011). A deficiency in the flavoprotein in the *Arabidopsis* mitochondrial complex II results in elevated photosynthesis and better growth in nitrogen-limiting conditions. **Plant Physiology**, 157: 1114-1127.

GARDESTROM, P; IGAMBERDIEV, A. U (2016). The origin of cytosolic ATP in photosynthetic cells. **Plant Physiology**, 157: 367-379.

- GEIGENBER, P.; RIEWE, D.; FERNIE, A. R (2010). The central regulation of plant physiology by adenylates. **Trends in Plant Science**, 15: 98-105.
- IGAMBERDIEV, A. U.; KLECZKOWSKI, L. A (2015). Optimization of ATP-Synthase function in mitochondria and chloroplasts via the adenylate kinase equilibrium. **Frontiers in Plant Science**, 6: 10.
- JUNGE, W.; NELSON, N (2015). ATP synthase. **Annual Review of Biochemistry**, 84: 631-57.
- KONG, X.; SUN, L.; ZHOU, Y.; ZHANG, M.; LIU, Y.; PAN, J.; LI, D. (2011). ZmKK4 regulates osmotic stress through reactive oxygen species scavenging in transgenic tobacco. **The Plant Cell**, 30: 2097-2104.
- LI, Z.; XING, D (2011). Mechanistic study of mitochondria-dependent programmed cell death induced by aluminum phytotoxicity using fluorescence techniques. **Journal of Experimental Botany**, 62 (1): 331-343.
- LISEC, J.; SCHAUER, N.; KOPKA, J.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A. R. (2006). Chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. **Nature Protocols**, 1: 387-396.
- LIU, J. P.; MAGALHAES, J. V.; SHAFF, J.; KOCHIAN, L. V (2009). Aluminum-activated citrate and malate transporters from the MATE and ALMT families function independently to confer *Arabidopsis* aluminum tolerance. **The Plant Journal**, 57: 389-399.
- LYU, H; LAZÁR, D (2017). Modeling the light-induced electric potential difference ($\Delta\psi$), the pH difference (ΔpH) and the proton motive force across the thylakoid membrane in C3 leaves. **Journal of Theoretical Biology**, 413: 11-23.
- MA, J. F.; RYAN, P. R.; DELHAIZE, E (2001). Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. **Trends in Plant Science**, 6: 273–278.

- MILLAR, A. H.; WHELAN, J.; SOOLE, K. L.; DAY, D. A. (2011). Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants. **Annual Review of Plant Biology**, 62: 79-104.
- MONNÉ, M.; MINIERO, D. V.; OBATA, T.; DADDABO, L.; PALMIERI, L.; VOZZA, A.; NICOLARDI, M. C.; FERNIE, A. R.; PALMIERI, F. (2015). Functional characterization and organ distribution of three mitochondrial ATP-Mg/Pi carriers in *Arabidopsis thaliana*. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1847: 1220-1230.
- MONNÉ, M.; PALMIERI, F. (2014). Antiporters of the Mitochondrial Carrier Family. **Current Topics in Membranes**, 73: 289-320.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15: 473-497.
- NAKABAYASHI, K. et al (2005). Genome-wide profiling of restored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. **The Plant Journal**, 41: 697-709.
- NERI-SILVA, R. (2021). Physiological and metabolic characterization of adenylates carriers in *Arabidopsis thaliana*. Tese de doutorado. Programa de pós-graduação em Fisiologia Vegetal, UFV.
- NERI-SILVA, R. et al (2023). On the significance of ADNT1 carrier in *Arabidopsis thaliana* under waterlogging conditions. **Biomolecules**, 13(5): 731.
- NUNES-NESE, A.; CARRARI, F.; GIBBON, Y.; SULPICE, R.; LYTOVCHENKO, A.; FISAHN, J.; GRAHAM, J.; RATCLIFFE, R. G.; SWEETLOVE, L.J.; FERNIE, A.R. (2007). Deficiency of mitochondrial fumarate hydratase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. **The Plant Journal**, 50: 1093–1106.

- NUNES-NESEI, A.; BRITO, D. S.; INOSTROZA-BLANCHETEAU, C.; FERNIE, A. R.; ARAÚJO, W. L. (2014). The complex role of mitochondrial metabolism in plant aluminum resistance. **Trends in Plant Science**, 19: 399-407.
- NUNES-NESEI, A.; CAVALCANTI, J. H. F.; FERNIE, A. R. (2020). Characterization of in vivo function(s) of members of the plant mitochondrial carrier family. **Biomolecules**, 10(9): 1226.
- OLMOS, J. I. L.; CAMARGO, M.N (1976). Ocorrência de alumínio tóxico nos solos do Brasil, sua caracterização e distribuição. **Ci Cult**, 28: 171-180.
- PALMIERI, F (2004). The mitochondrial transporter family (SLC25): Physiological and pathological implications. **Pflugers Arch Eur J Physiol**, 447: 689-709.
- PALMIERI, F.; PIERRI, C. L.; DE GRASSI, A.; NUNES-NESEI, A.; FERNIE, A. R. (2011). Evolution, structure and function of mitochondrial carriers: A review with new insights. **The Plant Journal**, 66: 161-181.
- PALMIERI, L.; SANTORO, A.; CARRARI, F.; BLANCO, E.; NUNES-NESEI, A.; ARRIGONI, R.; GENCHI, F.; FERNIE, A. R.; PALMIERI, F. (2008). Identification and characterization of ADNT1 a novel mitochondrial adenine nucleotide transporter from *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, 148: 1797-1808.
- PANDA, S. K.; BALUSKA, F.; MATSUMOTO, H (2009). Aluminum stress signaling in plants. **Plant Signaling and Behavior**, 4 (7): 592-597.
- SADE, H.; MERIGA, B.; SURAPU, V.; GADI, J.; SUNITA, M. S. L.; SURAVAJHALA, P.; KISHOR, P. B. K. (2016). Toxicity and tolerance of aluminum in plants: tailoring plants to suit to acid soils. **BioMetals**, 29 (2), 187–210.
- SCHMID, M.; DAVISON, T. S.; HENZ, S. R.; PAPE, U. J.; DEMAR, M.; VINGRON, M.; SCHOLKOPF, B.; WEIGEL, D.; LOHMANN, J. U. (2005). A

gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. **Nature Genetics**, 37 (5): 501-506.

SCHIPPERS, J. H. M.; NUNES-NESI, A.; APETREI, R.; HILLE, J.; FERNIE, A. R.; DIJKWEL, P. P. (2008). The *Arabidopsis* onset of leaf death5 mutation of quinolinate synthase affects nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis and causes early ageing. **Plant Cell**, 20, 2909-2925.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature methods**, 9 (7): 671-675.

SOUZA, L. T. De.; CAMBRAIA, J.; RIBEIRO, C.; OLIVEIRA, J. A.; SILVA, L. C. (2016). Effects of aluminum on the elongation and external morphology of root tips in two maize genotypes. **Bragantia**, 75: 19-25.

SWEETLOVE, L. J.; BEARD, K. F. M; NUNES-NESI, A.; FERNIE, A. R.; RATCLIFFE, R. G. (2010). Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle. **Trends in Plant Science**, 15 (8): 462-470.

TSUTSUI, H.; SATRÚSTEGUI, J.; DEL ARCO, A (2017). PKAMA-ITACHI vectors for highly efficient CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Physiology**, 58: 46-56.

XU, P.; YANG, Y.; ZHANG, G.; CHEN, W.; ZHANG, C.; ZHANG, L.; ZOU, S.; MA, Z. (2008). Expression of the nuclear gene TaFAd is under mitochondrial retrograde regulation in anthers of male sterile wheat plants with *timopheevii* cytoplasm. **Journal of Experimental Botany**, 59: 1375-1381.

YAN, L.; RIAZ, M.; LIU, J.; YU, M.; CUNCANG, J. (2021). The aluminum tolerance and detoxification mechanisms in plants; recent advances and prospects, **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, 52 (9), 1491-1527.

ZHANG, Y.; FERNIE, A. R (2018). On the role of tricarboxylic acid cycle in plant productivity. **Journal of Integrative Plant Biology**, 60(12): 1199-1216.

ZHU, W.; MIAO, Q.; SUN, D.; YANG, G.; WU, C.; HUANG, J.; ZHENG, C. (2012). The mitochondrial phosphate transporters modulate plant responses to salt stress via affecting ATP and gibberellin metabolism in *Arabidopsis thaliana*. **PLoS One**, 7 (8): e43530.