

KALLYNE AMBRÓSIO BARROS

**PAPEL DO TRANSPORTADOR VACUOLAR DE MALATO E SUA FUNÇÃO
NO MESOFILO: UMA RELAÇÃO ESTREITA COM O METABOLISMO
PRIMÁRIO**

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
2015**

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

T

B277p
2015 Barros, Kallyne Ambrósio, 1991-
Papel do transportador vacuolar de malato e sua função no mesófilo : uma relação estreita com o metabolismo primário / Kallyne Ambrósio Barros. – Viçosa, MG, 2015.
x, 39f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Wagner Luiz Araújo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.30-39.

1. Plantas - Metabolismo. 2. Ácidos orgânicos. 3. Estômatos. 4. Regulação de expressão gênica. 5. Fisiologia vegetal. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22 ed. 572.472

KALLYNE AMBRÓSIO BARROS

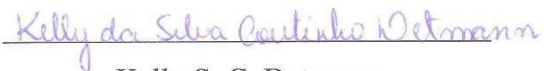
**PAPEL DO TRANSPORTADOR VACUOLAR DE MALATO E SUA FUNÇÃO
NO MESOFILO: UMA RELAÇÃO ESTREITA COM O METABOLISMO
PRIMÁRIO**

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*.

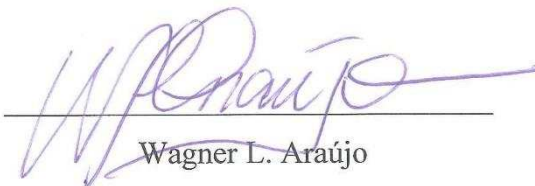
APROVADA: 29 de julho de 2015



Dimas M. Ribeiro



Kelly S. C. Detmann



Wagner L. Araújo

(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por me proporcionar momentos maravilhosos ao lado dos meus pais, irmãos, amigos e familiares. Especialmente aos meus pais, que são exemplo de dedicação e nunca mediram esforços para que meus sonhos se realizassem. Aos meus irmãos que sempre renovaram os ânimos. Ao Alberto que, mesmo fisicamente distante, está sempre perto acompanhando e motivando.

Agradeço também a todos os amigos de Viçosa, aos que estiveram sempre ao lado no laboratório, auxiliando nas análises, dividindo conhecimento, contando a vida ou aos que simplesmente pela companhia de todos os dias tornaram Viçosa um ambiente agradável. Aos amigos da República Carroça que me acolheram e me fizeram sentir em casa.

Agradeço aos membros da banca que deram suas contribuições a essa dissertação, aos professores que auxiliaram durante a execução e aos que ministraram aulas durante o curso. Em especial ao Wagner, que além de orientador é um amigo para muitas horas.

A alguns amigos agradeço e não posso deixar de citá-los: David, não só por me socorrer no momento mais dramático do mestrado, mas também por dividir experiências e pela amizade; Kelly, por ser uma amiga sempre presente dentro e fora do laboratório; Dora, pela amizade e inúmeras horas de “notícias que vão mudar o seu dia” e à LÍlian, pela amizade de longa data, compartilhando os momentos mais tensos e os mais felizes.

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa pelo apoio e infraestrutura, ao Programa de Pós Graduação em Fisiologia Vegetal pelo suporte e, por fim, ao CNPq pela concessão da bolsa.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	vii
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
3. MATERIAIS E MÉTODOS	5
3.1. Material vegetal e condições de crescimento	5
3.2. Análises de parâmetros de crescimento	6
3.3. Análises de parâmetros fotossintéticos	7
3.4. Extração e quantificação de pigmentos fotossintetizantes	8
3.5. Determinação dos níveis de metabólitos	8
3.6. Extração de enzimas envolvidas no metabolismo do carbono	9
3.7. Extração, derivatização e obtenção de perfil metabólico via GC-MS	9
3.8. Delineamento experimental e análises estatísticas	9
4. RESULTADOS	10
4.1. Confirmação da inserção de T-DNA no gene AttDT e seleção de linhas mutantes	10
4.2. Caracterização do crescimento de plantas com perda do transportador AttDT	11
4.3. Parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila a	12
4.4. Efeitos no metabolismo primário pela ausência do transportador AttDT	15
4.5. Alterações da atividade enzimática em plantas attdt	19
4.6. Variação de metabólitos determinados por GC-MS em plantas attdt	20
5. DISCUSSÃO	25
5.1. Crescimento e trocas gasosas alteradas em resposta à ausência de AttDT	25
5.2. Menores teores de malato no mesofilo afetam g_s	26
5.3. Perfil de aminoácidos é alterado em conjunto a intermediários do ciclo TCA	28
6. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS	30
7. REFERÊNCIAS	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Identificação molecular dos genótipos tipo selvagem (WT-like) e linhas mutantes com inserção de T-DNA (attdt1 e attdt2)	11
Figura 2	Fenótipo aparente em plantas com quatro semanas de idade	12
Figura 3	Teores de clorofila total a + b e razão clorofila a/b de linhas mutantes attdt	15
Figura 4	Teores de nitrato, aminoácidos e proteínas totais de linhas mutantes attdt	16
Figura 5	Teores de glicose, frutose, sacarose e amido de linhas mutantes attdt	17
Figura 6	Teores de malato, fumarato de linhas mutantes attdt	17
Figura 7	Teores de NAD, NADH, razão NAD/NADH, NADP, NADPH e razão NADP/NADPH em linhas mutantes attdt	18
Figura 8	Valores relativos de aminoácidos em linhas mutantes attdt	22
Figura 9	Valores relativos de açúcares e açúcares álcoois em linhas mutantes attdt	23
Figura 10	Valores relativos de ácidos orgânicos em linhas mutantes attdt	24
Figura 11	Valores relativos de mio inositol, putrescina, ácido salicílico, ácido chiquímico e espermidina em linhas mutantes attdt	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros de crescimento e morfológicos em plantas mutantes attdt	12
Tabela 2	Variáveis instantâneas de trocas gasosas e variáveis derivadas da análise de fluorescência da clorofila a em plantas attdt	13
Tabela 3	Parâmetros fotossintéticos derivados de curvas de luz de plantas attdt	14
Tabela 4	Caracterização fotossintética de plantas attdt	14
Tabela 5	Atividade enzimática em plantas attdt no meio do período luminoso	20

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
1/φ	Eficiência no uso da luz
ABCB	ATP-binding cassette B
ADP-glicose	Glicose adenina difosfato
AF	Área foliar
AFE	Área foliar específica
AGPase	ADP-glicose pirofosforilase
ALMT	Aluminum-activated malate transporter
A _N	Taxa de assimilação líquida de CO ₂
ANOVA	Análise de variância
AOX	Oxidase alternativa
A _{RFA}	Taxa de assimilação líquida de CO ₂ saturada pela luz
ATP	Adenosina trifosfato
AttDT	Arabidopsis thaliana tonoplast dicarboxylate transporter
AtpOMT1	Plastidic 2-oxaloacetate/malate transporter
AtQUAC1	Quick-activating anion channel 1
bp	Pares de bases
°C	Graus Celsius
C	Carbono
C ₃	Metabolismo de plantas com fixação de CO ₂ em moléculas de 3 carbonos
Ca	Cálcio
C _a	CO ₂ de referência atmosférico
CAM	Metabolismo ácido das crassuláceas
C _c	Concentração cloroplastídica de CO ₂
C _i	Concentração subestomática de CO ₂
Cl ⁻	Íon cloreto
CO ₂	Dióxido de carbono
CS	Citrato sintase
DE	Densidade estomática
DFD	Densidade de fluxo de fótons
DIC	Delineamento inteiramente casualizado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
E	Transpiração
EM	Enzima málica
ETC	Cadeia transportadora de elétrons

ETF/ETFQO	Electron-transfer flavoprotein/electron-transfer flavoprotein:ubiquinone oxidoreductase
EUA	Eficiência instantânea do uso da água
FSII	Fotossistema II
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
G6PDH	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa
g_m	Condutância mesofílica
g_s	Condutância estomática
HK	Hexocinase
I_c	Irradiância de compensação
IRGA	Infrared gas analyzer
I_s	Irradiância de saturação
J_{flu}	Taxa de transporte de elétrons estimada por parâmetros de fluorescência
$J_{máx}$	Taxa de transporte de elétrons estimada por parâmetros de trocas gasosas
K^+	Cátion de potássio
MATE	Multidrug and toxic compound extrusion
MDH	Malato desidrogenase
MF	Massa fresca
Mg	Magnésio
min	Minuto
mm^2	Milímetros quadrados
mM	Milimolar
mOD	Mili optical density
MS_1	Massa seca no tempo 1
MS_2	Massa seca no tempo 2
MSR	Massa seca da roseta
MT	Massa túrgida de folha
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidado
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NF	Número de folhas
nm	Nanômetro
NO_3^-	Nitrato

OST1	Open stomata 1
P	P-valor
P-ATPase	Bomba de prótons dependente de ATP tipo P
PCR	Polimerase chain reaction
PDH	Piruvato desidrogenase
PEPCase	Fosfoenolpiruvato quinase
PFK	Fosfofrutoquinase
PGK	3-fosfogliceratoquinase
pH	Potencial hidrogeniônico
PK	Piruvato quinase
R _d	Respiração noturna
RFA	Radiação fotossinteticamente ativa
ROS	Espécie reativa de oxigênio
R _p	Fotorrespiração
Rubisco	D-ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase
RuBP	Ribulose-1,5-bifosfato
SPS	Sintase da sacarose fosfato
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
Susy	Sacarose sintase
t ₁	Tempo inicial
t ₂	Tempo final
TCA	Ciclo dos ácidos tricarbóxicos
TCR	Taxa de crescimento relativo
T-DNA	Ácido desoxirribonucleico de transferência
TPI	Triose fosfato isomerase
TRA	Teor relativo de água
V-ATPase	Bomba de prótons dependente de ATP tipo V
V _{cmáx}	Velocidade máxima de carboxilação
V _{máx}	Velocidade máxima da reação enzimática na fase linear
V-PPase	Bomba de prótons dependente de pirofosfato tipo V
V _{sel}	Velocidade de reação enzimática em meio seletivo
WL	Tipo selvagem após processo de transformação sem inserção de T-DNA
WS	Ecótipo Wassilewskija de Arabidopsis thaliana
Zn	Zinco

RESUMO

BARROS, Kallyne Ambrósio, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Papel do transportador vacuolar de malato e sua função no mesófilo: uma relação estreita com o metabolismo primário.** Orientador: Wagner L. Araújo.

Diversos mecanismos foram aprimorados durante a evolução das plantas de modo a se obter uma resposta adequada às variações ambientais, principalmente no que respeita os mecanismos relacionados ao controle dos movimentos estomáticos. Nesse contexto, o vacúolo parece exercer um papel preponderante na tolerância a vários estresses em função da sua plasticidade em acumular solutos para manutenção do turgor e integridade celular ou mesmo para estabilizar compostos tóxicos. Dada a relevância dos estômatos para a fixação de CO₂, adicionada à atuação dos ácidos orgânicos no controle dos movimentos estomáticos e o papel do vacúolo como acumulador de solutos, este trabalho buscou investigar como a perda funcional do transportador vacuolar de malato (AttDT) impacta *Arabidopsis thaliana*, de modo a caracterizá-las e entender como o transportador, em conjunto com ácidos orgânicos, afetam o metabolismo primário e os movimentos estomáticos. Reduções nas taxas fotossintéticas associadas com menores condutâncias estomática e mesofílica foram observadas em mutantes *attdt*. Entretanto, incrementos nas taxas respiratórias, sem alteração nos níveis totais de clorofilas, açúcares, proteínas e aminoácidos foram observados. De modo a suprir a demanda energética e assim garantir a manutenção do crescimento, como observado em plantas *attdt*, substratos alternativos parecem estar sendo utilizados, culminando com um funcionamento não cíclico do ciclo dos ácidos tricarbóxicos (TCA), visto que succinato, fumarato e malato foram reduzidos ao passo que incrementos nos níveis de citrato, simultaneamente à alterações no perfil de aminoácidos, especialmente aspartato e glutamina, foram evidentes. Embora o crescimento não tenha sido drasticamente afetado, cumpre mencionar que plantas com perda do transportador AttDT apresentam fenótipo metabólico que se assemelham grandemente ao de plantas sob estresse, principalmente por seca. Coletivamente, os resultados obtidos indicam que AttDT é um transportador de fundamental importância para manutenção dos níveis adequados de ácidos orgânicos entre os compartimentos celulares, e que a sua perda funcional ocasiona uma reprogramação metabólica e afeta diretamente o metabolismo primário, especialmente a respiração e o catabolismo de aminoácidos.

ABSTRACT

BARROS, Kallyne Ambrósio, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2015. **On the role of the vacuolar malate transporter and its function in mesophyll cells: a close link to primary metabolism.** Adviser: Wagner L. Araújo.

Several mechanisms were improved during the course of plant evolution to obtain an adequate response to environmental variations, particularly mechanisms related to the control of stomatal movements. Accordingly, the vacuole seems to play an important role in plant stress tolerance, due to its plasticity to accumulate solutes maintaining both cell integrity and turgor or further stabilizing toxic compounds. Given the pivotal importance of stomata to CO₂ fixation, in addition to the role of organic acids in controlling stomatal movements coupled with the key role of vacuole in the accumulation of solutes, this study investigated the functional role of the vacuolar malate transporter, AtMDT, in order to characterize and understand how the absence of this carrier, together with organic acids, affect both the primary metabolism and stomatal movements. Reductions of photosynthesis rates coupled with decrease on both mesophyll and stomatal conductance were observed in mutant *atmdt*. However, enhanced respiratory rates without impacting the total levels of chlorophyll, sugars, proteins and amino acids were observed. In order to supply the energy demand to maintain growth that was not altered in *atmdt* plants, it seems that alternative substrates are used. This is likely leading to a non-cyclic function of the TCA cycle, as succinate, malate and fumarate were reduced whereas increase of citrate levels was observed, simultaneously to changes in the amino acid profile, especially aspartate and glutamine. Interestingly, plants lacking AtMDT display a metabolic phenotype that resembles that of plants under stress, mainly drought, although growth has not been affected. Taken together, the results obtained here indicates that AtMDT is an important carrier allowing the maintenance of suitable levels of organic acids between cellular compartments, directly affecting the primary metabolism, especially respiration and amino acids.

1. INTRODUÇÃO

As plantas, organismos sésseis, apresentam inúmeras adaptações morfológicas, metabólicas e fisiológicas para suportar as condições ambientais às quais estão constantemente submetidas. Nesse contexto, durante sua evolução, as plantas, que inicialmente surgiram em um ambiente aquático com posterior transição para o ambiente terrestre, tiveram que suportar, como uma das primeiras limitações, a redução na disponibilidade de água (Ou et al., 2014). Ainda que de certo modo questionável, em um primeiro momento, o surgimento de poros em órgãos aéreos pareceu fornecer uma vantagem adaptativa na otimização da fotossíntese, no que diz respeito ao ganho de carbono (C). Posteriormente, durante a transição para o ambiente terrestre, em função da limitação por nutrientes e disponibilidade de água, um mecanismo eficiente de controle de fechamento desses poros culminaria com uma vantagem adaptativa, particularmente quando as células não mantivessem o seu turgor devido à perda de água (Chater et al., 2013). Dessa forma, é plausível sugerir que não apenas um, mas diversos sinais tenham sido fundamentais para o desenvolvimento de um controle efetivo dos movimentos dos estômatos durante o processo evolutivo. Nesse contexto, a grande diversidade de metabólitos que funcionam como osmólitos ou de genes responsivos a estresses, bem como em termos de complexidade da sinalização para respostas adequadas aos estresses múltiplos (bióticos e/ou abióticos) (Chater et al., 2013; Ou et al., 2014), faz com que a regulação dos movimentos estomáticos tenha papel preponderante na resposta a vários estresses.

O poro estomático se abre em resposta às reduções no potencial osmótico e, conseqüentemente, no potencial hídrico das células-guarda, o que culmina na entrada de água nessas células e no subseqüente aumento no volume dessas células. De modo oposto, para que ocorra o fechamento estomático faz-se necessário a saída de osmólitos das células-guarda, com o conseqüente aumento no potencial hídrico, o que leva ao efluxo de água e, por conseqüência, ao fechamento dos estômatos (Schroeder et al., 2001; Kim et al., 2010; Kollist et al., 2014).

Embora o fluxo de osmólitos, em particular K^+ , Cl^- , malato e sacarose, entre as células-guarda e as células epidérmicas no seu entorno seja reconhecidamente importante durante os movimentos estomáticos, pouco se sabe acerca do papel do metabolismo dos ácidos orgânicos (i.e. malato e fumarato) durante tais movimentos.

Cabe salientar que a importância desses ácidos orgânicos na modulação da resposta estomática foi recentemente sugerida (Ferne and Martinoia, 2009; Meyer et al., 2010; Araújo et al., 2011; Araújo et al., 2011). Desse modo, níveis de malato e fumarato atuam como um sensor da concentração de CO₂, englobando também a atividade de enzimas do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) e demais enzimas associadas a esse processo. Provavelmente, o aumento da concentração de CO₂ atuaria de modo a inibir as reações de descarboxilação do ciclo TCA, restringindo assim o fluxo metabólico através da piruvato desidrogenase e da enzima málica dependente de NAD. Como consequência, um acúmulo antecipado de malato e piruvato no apoplasto pode acontecer, ocasionando uma reduzida abertura estomática. Por outro lado, baixas concentrações de CO₂ favoreceriam as reações de carboxilação e promoveriam um aumento do fluxo da conversão de malato a piruvato e também de piruvato a acetil-CoA, possibilitando uma diminuição na concentração apoplástica de malato e piruvato e ocasionando um aumento da abertura estomática (Lawson et al., 2014).

Experimentos realizados com fragmentos epidérmicos demonstraram que o mesófilo é capaz de enviar sinais para célula guarda de modo a controlar os movimentos estomáticos. Nesse contexto, tem-se observado que em fragmentos epidérmicos isolados a sensibilidade de resposta parece ser reduzida. Assim, trabalhos distintos demonstram não existir efeito ou mesmo um atraso na resposta de abertura/fechamento estomático sob condições de luz vermelha e concentrações de CO₂ em fragmentos epidérmicos quando comparados a folhas intactas (Lee and Bowling, 1992; Olsen and Juntila, 2002; Roelfsema et al., 2002; Young et al., 2006; Mott et al., 2008). Embora diferenças na resposta estomática tenham sido observadas, muitos estudos ainda utilizam epiderme destacada ou células-guarda isoladas para compreender as respostas estomáticas em função da concentração de metabólitos ou hormônios (Lawson et al., 2014; Daloso et al., 2015). Cabe ressaltar também que embora a resposta de abertura e fechamento estomático em *Arabidopsis thaliana* seja bem caracterizada sob uma condição ambiental única, seja esta steady state ou estressante, foi recentemente demonstrado também que essas respostas podem variar de acordo com a espécie e com o conjunto de estresses ao qual a planta é submetida, especialmente quando os estresses aos quais essas plantas forem submetidas exigirem respostas opostas (Merilo et al., 2014).

A importância do fluxo de íons K⁺ e de outros osmólitos pela membrana plasmática de células-guarda durante a abertura e fechamento estomático é amplamente reconhecida (Szczerba et al., 2009; Jeanguenin et al., 2011; Osakabe et al., 2013;

Hamamoto and Uozumi, 2014). No entanto, o papel do transporte realizado nas membranas do tonoplasto durante os movimentos estomáticos tem sido amplamente negligenciado. É sabido que cerca de 90% dos solutos transientes durante o movimento estomático é acumulado no vacúolo (Schumacher, 2014). Tal fato demanda um extenso remodelamento de transportadores na membrana do tonoplasto para que haja manutenção do pH vacuolar (Martinoia et al., 2007; Schumacher, 2014). Para tanto, as plantas utilizam três tipos de bomba de prótons para manutenção do pH: tipo P dependente de ATP (P-ATPase), tipo V dependente de ATP (V-ATPase) e tipo V dependente de pirofosfato (V-PPase). No entanto, somente a presença dessas proto-ATPases não seria suficiente para gerar um gradiente protônico capaz de garantir a manutenção do pH, mas muito provavelmente capaz apenas de ocasionar despolarização da membrana devido ao gradiente elétrico formado. Sendo assim, a presença de transportadores de ânions e cátions nas membranas parece imprescindível (Martinoia et al., 2007; Szczerba et al., 2009; Schumacher, 2014). Assim, é plausível sugerir que a presença desses transportadores explicaria, ao menos parcialmente, o porque de alguns tipos celulares serem capazes de suportar concentrações altas de um soluto específico (e.g. Mg e Ca em folhas e Zn em raízes), valores de pH muito alcalinos, como encontrados em pétalas de petúnia, ou ácidos, como observado em células suculentas de citrus (Conn et al., 2012). Além disso, a presença desses transportadores auxilia as plantas no que diz respeito à capacidade de suportar estresses, como anteriormente demonstrado pelo remodelamento do proteoma vacuolar para acúmulo de dicarboxilatos e açúcares solúveis durante estresse por frio (Schulze et al., 2012) e a tolerância a metais, pesados ou não, complexando-os no vacúolo com ácidos orgânicos (Haydon and Cobbett, 2007).

O vacúolo ocupa cerca de 80% do volume celular e acumula diversos compostos orgânicos e inorgânicos, apresentando, assim, função primordial para diversos processos incluindo metabolismo energético, acúmulo de reservas e nutrientes, regulação do turgor celular, detoxificação, reciclagem de metabólitos e organelas bem como em interações ecológicas (Neuhaus, 2007; Martinoia et al., 2012; Trentmann and Haferkamp, 2013). Dentre os diversos compostos acumulados nos vacúolos celulares os ácidos orgânicos se destacam, principalmente em plantas com metabolismo CAM e C₃, nas quais se observam altas concentrações nas folhas e variações ao longo do dia superiores a 300 mM (Martinoia et al., 2012). Embora esse acúmulo de ácidos

orgânicos no vacúolo seja reconhecido, especialmente dicarboxilatos, os transportadores responsáveis por esse acúmulo e seus papéis ainda não foram totalmente elucidados.

Até o presente momento, quatro classes de transportadores envolvidos no transporte de ácidos orgânicos foram descritas em plantas (Meyer et al., 2010; Kang et al., 2011; Martinoia et al., 2012). Os transportadores da família MATE (multidrug and toxic compound extrusion) foram descobertos inicialmente em bactérias e são responsáveis pela exportação de agentes microbianos em vias de detoxificação. Em plantas, esses transportadores estão ligados a diversos processos como detoxificação, formação de raízes laterais, sinalização dependente de ácido salicílico e transporte de metabólitos secundários como antocianinas e nicotina (Li et al., 2002; Nawrath et al., 2002; Marinova et al., 2007). Entretanto, um transportador da família MATE, AtMATE/AtDTX42 (At1g51340) presente na membrana plasmática, exporta citrato para o meio extracelular como forma de conferir tolerância ao Al^{3+} (Magalhaes et al., 2007). Ademais, transportadores da família ALMT (aluminium-activated malate transporter), composta por 14 membros, estão presentes em diversos tecidos e apresentam atividade governada por alumínio. Apesar de esses transportadores terem algumas funções previamente conhecidas e estarem presentes tanto na membrana plasmática como no tonoplasto, análises de perfil transcricional demonstram que funções ainda não reconhecidas podem ser também exercidas por esses transportadores em diferentes tecidos e estádios da planta (Meyer et al., 2010). De maneira específica, transportadores AtALMT1, localizados na membrana plasmática (Hoekenga et al., 2006), e AtALMT9, presentes no tonoplasto (Kovermann et al., 2007), estariam envolvidos diretamente nos movimentos estomáticos mediante o transporte de malato nas células-guarda. Adicionalmente, o transportador AtABCB14 da família de genes ABC (ATP-binding cassette) está envolvido na regulação do movimento estomático dependente de CO_2 . A função desse transportador seria mediar o acúmulo de malato no interior das células-guarda, possibilitando que esse ácido orgânico atue como um regulador osmótico e induza a entrada de água nas células-guarda e, conseqüentemente, a abertura estomática (Lee et al., 2008). Não obstante, o transportador de dicarboxilatos, AttDT – tonoplast dicarboxylate transporter, localizado no tonoplasto (Emmerlich et al., 2003), foi também previamente caracterizado.

O acúmulo de malato mediado por AttDT, diferentemente da situação observada para o gene homólogo em humanos, não é dependente de Na^+ mas sim do gradiente eletroquímico formado entre vacúolo e citosol (Emmerlich et al., 2003). De maneira

interessante, plantas de *Arabidopsis thaliana* com reduzida expressão deste transportador apresentaram menor teor e influxo de malato e fumarato nos vacúolos bem como incremento das taxas respiratórias (Emmerlich et al., 2003). Em adição, a função do malato como contra-íon ao K^+ na regulação do pH celular foi investigada mediante a atividade desses transportadores em resposta ao estresse induzido por diferentes valores de pH e observou-se aumento do conteúdo de citrato nos vacúolos assim como uma correlação positiva entre a acidificação do meio e expressão do gene *AttDT* (Hurth et al., 2005). Curiosamente, tais mutantes apresentaram um fenótipo bastante similar ao tipo selvagem em condições ótimas de crescimento. Registre-se, no entanto, que os mecanismos pelos quais plantas com redução na expressão desses transportadores mantem seu crescimento inalterado no que diz respeito a possíveis alterações nas taxas fotossintéticas, abertura estomática, assim como a atividade do ciclo do TCA e demais metabólitos de modo a equilibrar o pH celular não foram ainda totalmente esclarecidos.

Em função do exposto acima, buscou-se investigar em mutantes para o transportador *AttDT* os possíveis mecanismos pelos quais as plantas mantêm o crescimento similarmente ao tipo selvagem. Os resultados obtidos demonstram um remodelamento do metabolismo primário em células do mesofilo, especialmente em relação aos intermediários do ciclo do TCA e aqueles que podem fornecer elétrons alternativamente à cadeia transportadora de elétrons (ETC).

2. OBJETIVOS

Caracterizar fisiologicamente e metabolicamente plantas com reduzida expressão do gene *AttDT* em *Arabidopsis thaliana*, de modo a investigar o papel desempenhado pelos ácidos orgânicos no movimento estomático, como também, a influência do transportador vacuolar de dicarboxilatos sobre o metabolismo primário.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material vegetal e condições de crescimento

Sementes de *Arabidopsis thaliana* de linhas mutantes para o gene *AttDT* (*attdt1* e *attdt2*) AT5G47560 foram gentilmente cedidas pelo Professor Enrico Martinoia (Universität Zürich, Institut für Pflanzenbiologie, Zuriq, Suíça) e seu respectivo wild

type-like (WL) provenientes do ecótipo Wassilewskija (WS). Plantas do tipo wild type-like são aquelas que passaram pelo mesmo procedimento de transformação e recuperação, no entanto não houve inserção de T-DNA. As sementes foram propagadas e novamente genotipadas para que a homozigose fosse confirmada. Os primers utilizados para seleção via PCR (polimerase chain reaction) foram os mesmos descritos por Emmerlich et al. (2003).

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 repetidamente (6x) em água estéril. Após a esterilização, as sementes foram inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultivo MS 1/2x (Murashige and Skoog, 1962) suplementado com 1% de sacarose (p/v) e armazenadas em condições de escuro a 4 °C durante 4 dias, para homogeneização da germinação. Posteriormente, as placas foram mantidas em sala de crescimento durante 10 dias a 22 °C, fotoperíodo 8/16 (luz/escuro) e irradiância de 150 $\mu\text{mol s}^{-1}$, para germinação das sementes. Após esse período as plântulas foram transplantadas para vasos de 0,08 dm³ contendo substrato comercial padrão e mantidas em câmara de crescimento sobre as mesmas condições até 4-5 semanas. Amostras de roseta inteira foram coletadas em 5 diferentes horários ao longo do dia (início do período luminoso, meio do período luminoso, final do período luminoso, meio do período escuro e final do período escuro, respectivamente 0, 4, 8, 16, 24 h), congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer a -80°C, para posteriores análises de metabólitos e atividade enzimática.

3.2. Análises de parâmetros de crescimento

Foi realizada a quantificação da massa fresca e massa seca da roseta, área foliar (AF), área foliar específica (AFE), número de folhas e taxa de crescimento relativo (TCR). Para tanto, cinco rosetas foram destacadas e imediatamente pesadas para obtenção da massa fresca e posteriormente armazenada em estufa a 65 °C, a fim de obter o peso seco.

Folhas totalmente expandidas foram digitalizadas e AF foi estimada. A AFE foi estimada através da fórmula:

$$AFE \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1} = \frac{AF}{\text{massa seca foliar}}$$

A TCR foi determinada com base na massa seca, conforme (Boyes et al., 2001) e, a coleta MS_1 (massa seca inicial) foi realizada 20 dias após transplântio e 35 dias após transplântio para obtenção de MS_2 (massa seca final). A TCR foi calculada conforme a fórmula (Hunt et al., 2002), em que: MS_1 = massa seca inicial; MS_2 = massa seca final; t_1 = tempo inicial; t_2 = tempo final.

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

O teor relativo de água (TRA) foi determinado utilizando-se folhas inteiras as quais foram imediatamente pesadas para obtenção da massa fresca (MF). Em seguida, acondicionadas em placas de Petri, com papel filtro, contendo 10 mL de água deionizada. O período de reidratação foi de 4 h. Após esse período, as folhas foram novamente pesadas para obtenção da massa túrgida (MT) e posteriormente armazenadas em estufa a 60°C, até atingirem peso constante, obtendo-se assim massa seca (MS). De acordo com (Barrs and Weatherley, 1962), o TRA foi calculado da seguinte forma:

$$TRA (\%) = \frac{MF - MS}{MT - MS}$$

Para a estimativa da densidade estomática (DE) impressões com resina dental como molde (Berger & Altmann, 2000) foram tomadas da superfície abaxial da nona folha totalmente expandida. Posteriormente, foram confeccionadas lâminas temporárias com cópias das impressões para captura de imagens por câmera digital (AxioCam MRc) acoplada ao microscópio Zeiss (modelo AX10, Jena, Alemanha) e posterior contagem de estômatos e determinação da área capturada. A densidade estomática foi determinada em pelo menos 10 diferentes campos de 0,04 mm² por folha a partir das imagens obtidas com auxílio do software Axiovision 4.8.

3.3. Análises de parâmetros fotossintéticos

A taxa de assimilação líquida de CO₂ (A_N), condutância estomática (g_s), concentrações subestomáticas de CO₂ (C_i) e taxa de transpiração instantânea (E) foram medidas em um sistema de fluxo aberto de trocas gasosas (LI-6400XT, LI-COR, Lincoln, NE, EUA). Em todas análises, as condições ambientais da câmara do IRGA (infrared gas analyzer) foram mantidas a 22°C, o déficit de pressão de vapor entre 1,2 e 1,8 kPa, ao passo que a quantidade de luz azul aplicada foi de 10% da radiação

fotossinteticamente ativa (RFA) para maximizar a abertura estomática. Parâmetros de fluorescência foram determinados simultaneamente às medições de trocas gasosas utilizando o sistema de trocas gasosas acima mencionado, equipado a uma câmara integrada de fluorescência (LI-6400-40, LI-COR). A eficiência fotoquímica do fotossistema II foi determinada através da medição de fluorescência em estado estacionário e fluorescência máxima utilizando um pulso de luz saturante de $8.000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Genty et al., 1989). As curvas de resposta à luz (A_N/RFA) foram realizadas através do aumento da densidade de fluxo de fótons (DFF) de 0 a $1000 \mu\text{mol (fótons) m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A concentração de CO_2 de referência (C_a) foi fixada em $400 \mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$. As respostas de assimilação líquida de CO_2 (A_N) para a concentração interna de CO_2 (curva A_N/C_i) foram determinadas a $700 \mu\text{mol (fótons) m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a $22 \text{ }^\circ\text{C}$. As medições começaram a $350 \mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$, e uma vez que o estado estacionário foi alcançado, a concentração de CO_2 foi gradualmente reduzida para $50 \mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$ e depois aumentada gradualmente até $1600 \mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$ (Long and Bernacchi, 2003). A taxa máxima de carboxilação (V_{cmax}) e a taxa de transporte de elétrons (J_{max}) foram calculadas a partir das curvas A_N/C_i utilizando um modelo previamente descrito (Sharkey et al., 2007). A respiração no escuro (R_d) foi estimada no início do período claro em folhas adaptadas por pelo menos uma hora ao escuro, sendo utilizado o mesmo sistema de trocas gasosas citado anteriormente. A taxa de fotorrespiração (R_p) foi calculada de acordo com modelo descrito previamente (Valentini et al., 1995) e a condutância mesofílica (g_m) de acordo com o recomendado previamente (Ethier and Livingston, 2004).

3.4. Extração e quantificação de pigmentos fotossintetizantes

Pigmentos fotossintetizantes foram determinados na fração etanólica solúvel (Fernie et al., 2001). As concentrações de clorofila a, clorofila b, clorofilas totais e razão clorofila a/b foram determinadas fotometricamente como descrito previamente (Porra et al., 1989).

3.5. Determinação dos níveis de metabólitos

Os teores de glicose, frutose e sacarose (Fernie et al., 2001); aminoácidos totais e NO_3^- (Sienkiewicz-Porzucek et al., 2008); malato e fumarato (Nunes-Nesi et al., 2007), NAD(H) e NADP(H) (Schippers et al., 2008) foram determinados na fração etanólica

solúvel, obtida na extração para pigmentos. Na fração insolúvel foram determinados o conteúdo de proteínas (Bradford, 1976) e de amido (Fernie et al., 2001).

3.6. Extração de enzimas envolvidas no metabolismo do carbono

O extrato para determinação da atividade enzimática foi preparado como descrito previamente (Gibon et al., 2004) a partir de amostras coletadas no meio do período luminoso. A atividade das enzimas envolvidas no metabolismo do carbono foi estimada através da obtenção do V_{\max} realizando-se leitura a 340 nm por minuto e a absorbância obtida em mOD min^{-1} . As seguintes enzimas foram avaliadas: D-ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco), ADP-glicose pirofosforilase (AGPase), Sintase da sacarose (SuSy), Sacarose-fosfato sintase (SPS), Fosfofrutoquinase (PFK), Hexocinase (HK), Enolase, Aldolase, Transaldolase, Fosfoglicerolquinase (PGK), Invertase ácida, Invertase alcalina, Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase dependente de NAD (NAD-GAPDH) e NADP (NADP-GAPDH), Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), Triose fosfato isomerase (TPI), Piruvato quinase (PK) e Citrato sintase (CS).

3.7. Extração, derivatização e obtenção de perfil metabólico via GC-MS

Para a determinação de metabólitos, tais como aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares, entre outros, foram utilizados procedimentos anteriormente descritos (Lisec et al., 2006). O sistema GC-MS foi utilizado conforme descrito por (Roessner et al., 2001) e (Lisec et al., 2006). A identificação e anotação dos metabólitos seguiram recomendações descritas para perfil metabólico (Fernie et al., 2011) por análises com o pacote TargetSearch para o software R (Cuadros-Inostroza et al., 2009). Para os cálculos, os resultados obtidos foram normalizados por arabitol (como controle interno), e posteriormente também pela massa fresca da amostra. Ademais, para que variações entre os genótipos pudessem ser visualizadas mais facilmente, os valores foram relativizados em relação ao WL, garantindo que todas as repetições tivessem seus valores divididos pela média encontrada para o respectivo metabólito em plantas WL, o que possibilita a manutenção da variação entre as amostras e a aplicação de testes estatísticos.

3.8. Delineamento experimental e análises estatísticas

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com cinco repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância ANOVA (P

< 0,05) e a comparação entre médias realizado pelo teste Tukey. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS). Os gráficos foram produzidos utilizando o software SigmaPlot 12.0.

4. RESULTADOS

4.1. Confirmação da inserção de T-DNA no gene *AttDT* e seleção de linhas mutantes

Para investigar o papel que o transporte de ácidos orgânicos desempenha no movimento das células estomáticas duas linhagens independentes (*attdt1* and *attdt2*) que contem elementos de T-DNA inseridos no gene *AttDT* em *Arabidopsis thaliana* foram utilizadas. Essas plantas transgênicas foram previamente descritas em condições ótimas de crescimento demonstrando estarem envolvidas no controle dos movimentos estomáticos (Emmerlich et al., 2003). Sendo assim, PCR utilizando par de primers desenhados especificadamente para cobrir os sítios de inserção de T-DNA foram utilizados para investigar a interrupção do gene *AttDT* (Figura 1A). As inserções de T-DNA foram identificadas no primeiro íntron e segundo éxon na linha mutante *attdt1* e *attdt2*, respectivamente (Figura 1A). Utilizando o conjunto de primers específicos para o gene *AttDT* (5'-GGTCTTACACCGAATATTTTCGTCATATG-3' para primer *AttDT1* e 5'-AATCAATTGTGTACATGGTCTTGTGCTTG-3' para primer *AttDT2*), que resulta em um fragmento amplificado de PCR de 2714 bp, foi possível detectar a integridade do gene *AttDT* em linhagens do tipo selvagem (WL); contudo produtos de amplificação não foram observados nas linhas *attdt1* e *attdt2*, respectivamente (Figura 1B). Para mutantes da linha *attdt1* foram utilizados os primers *AttDT1* e JL202 (sendo a sequência utilizada a sequência 5'-CATTTTATAATAACGCTGCGGACATCTAC-3'), resultando em um fragmento de 1360 bp, e para a linha *attdt2* foram utilizados os primers *AttDT2* e JL202, resultando em um fragmento de 759 bp (Figura 1B). O gene *GAPDH* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, AT1G12900) foi utilizado como controle para demonstrar a integridade da preparação de DNA. Assim, linhas em homozigose foram confirmadas para cada um dos mutantes por PCR e denominadas *attdt1* e *attdt2*, respectivamente. Uma vez estabelecida e confirmada a identidade molecular dessas linhas independentes, essas plantas foram cultivadas juntamente com os respectivos controles (WL) (vide condições de cultivo em Material e Métodos). Nessas condições nenhum fenótipo aberrante visível foi observado durante o crescimento vegetativo e

reprodutivo desses mutantes quando comparados com suas respectivas linhas WL (Figura 2).

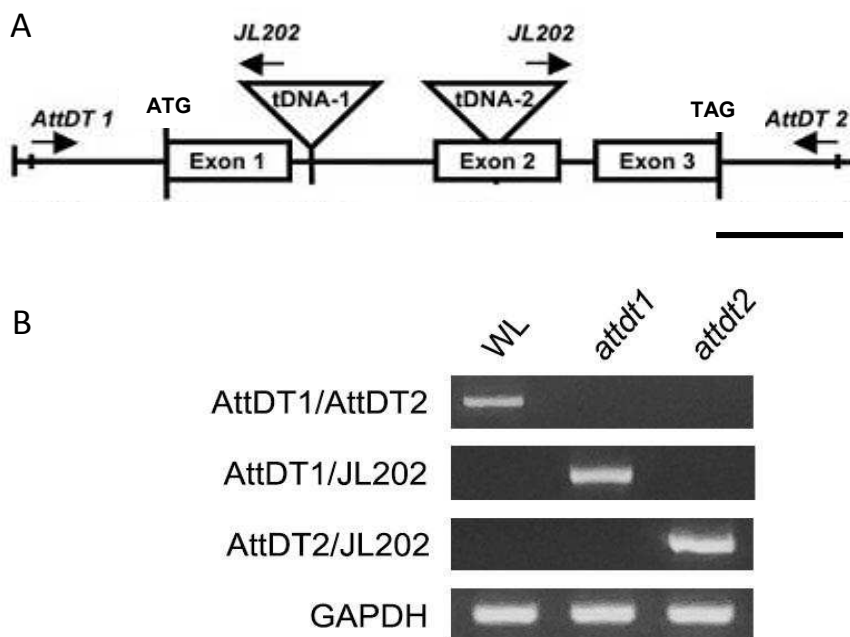


Figura 1 – Identificação molecular dos genótipos tipo selvagem (WT-like) e linhas mutantes com inserção de T-DNA (*attdt1* e *attdt2*). A: Estrutura genômica de *Attdt*. Setas indicam a posição dos primers usados para genotipagem para análise por PCR das plantas mutantes e WL. Caixas indicam éxons; B: Análise de PCR utilizando os conjuntos de primers indicados à esquerda demonstrando ausência de bandas para o gene *attdt* nas linhas mutantes *attdt1* e *attdt2* e confirmando genótipo selvagem pela ausência de bandas com inserção de T-DNA. Barra representa aproximadamente 200 bp; ATG: códon de início; TAG: códon de parada da transcrição; GAPDH: gene da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e WL: wild type-like.

4.2. Caracterização do crescimento de plantas com perda do transportador *Attdt*

Ainda que as plantas mutantes não apresentassem fenótipo aparente aberrante quando comparadas ao tipo selvagem (Figura 2), diferenças nos parâmetros de crescimento avaliados foram observadas (Tabela 1). O número de folhas (NF) foi reduzido nas linhas mutantes sem, no entanto, alterar a área foliar específica (AFE) e a massa seca de roseta (MSR). Foi observado também tendência de redução da área de roseta (AR), embora significativa apenas para *attdt1*. As taxas de crescimento relativo em plantas *attdt1* e *attdt2* também não diferiram do fenótipo selvagem (WL) quando avaliadas entre 20 e 35 dias após o transplante (TCR). Houve uma tendência no aumento do teor de relativo de água (TRA) em plantas mutantes, confirmado significativamente apenas para a linha *attdt2*. Ademais, não foram observadas diferenças na densidade estomática (DE) entre os genótipos (Tabela 1).

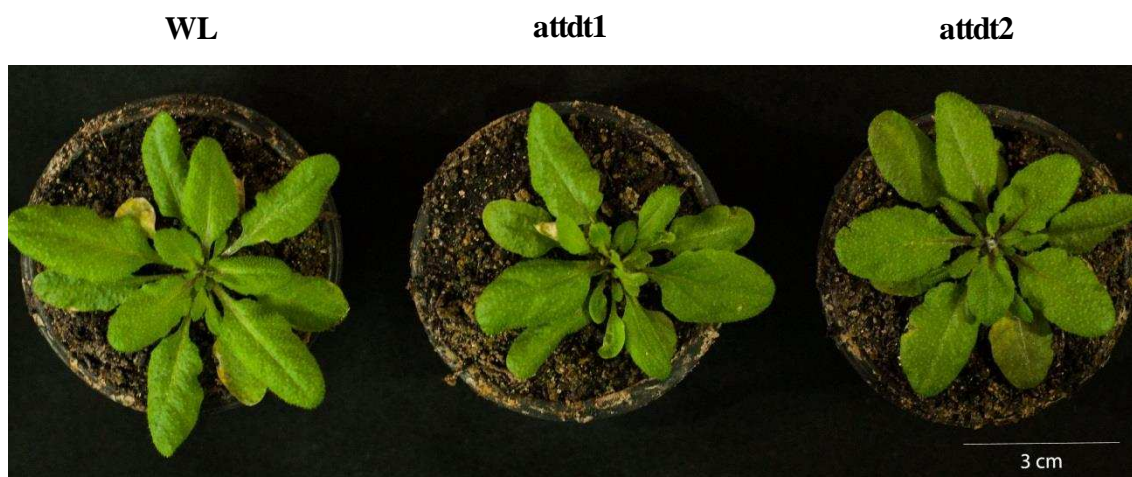


Figura 2. Fenótipo aparente em plantas com quatro semanas de idade. WL: wild type-like.

Tabela 1: Alterações nos parâmetros de crescimento e morfológicos em plantas mutantes attdt. Valores representam as médias \pm DP (n = 4). Os valores que diferem significativamente ($P < 0,05$) do tipo selvagem (WL) pelo teste Tukey estão em negrito.

Parâmetros*	WL	attdt1	attdt2
NF	15 \pm 1,15	11,5 \pm 0,57	11,25 \pm 0,95
AR (cm ²)	20,45 \pm 4,14	15,6 \pm 1,11	17,825 \pm 2,47
AFE (cm ² .g ⁻¹)	335,29 \pm 72,48	314,63 \pm 14,87	307,66 \pm 8,94
MSR (g)	0,0583 \pm 0,014	0,048 \pm 0,006	0,0671 \pm 0,009
TCR (mg.g ⁻¹ .dia ⁻¹)	2,38 \pm 0,35	2,64 \pm 0,39	2,12 \pm 0,21
TRA (%)	89,32 \pm 4,11	92,23 \pm 0,92	95,41 \pm 1,12
DE (estômatos.cm ⁻²)	20267,6 \pm 1233,2	19539,1 \pm 1865,5	20002,7 \pm 1582,2

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

4.3. Parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila a

Para confirmar a hipótese de que a perda funcional do canal de dicarboxilatos AttDT levaria a um prejuízo no controle dos movimentos estomáticos, parâmetros de trocas gasosas foram avaliados. De maneira geral, os genótipos mutantes apresentaram reduções em A_N , g_s e E (Tabela 2), ao passo que a respiração no escuro (R_d) foi maior nos genótipos attdt, concomitantemente, com uma menor eficiência instantânea do uso da água (EUA). Por outro lado, utilizando-se dos dados de fluorescência, a fotorrespiração e a taxa de transporte de elétrons (J_{flu}) foram estimadas sendo significativamente menor apenas para a linha attdt1 (Tabela 2).

Embora a eficiência máxima de captura do fotossistema II (FSII) representada pela razão F_v/F_m tenha sido significativamente menor nas plantas mutantes, tal variação foi bastante pequena (em média de 0,02 unidades), devendo ter pouca, se alguma,

implicação biológica (Tabela 2). Da mesma maneira, as variações observadas para a eficiência de captura de energia pelos centros de reação do FSII (F_v'/F_m') foram pequenas, mas estatisticamente significantes.

Tabela 2: Variáveis instantâneas de trocas gasosas e variáveis derivadas da análise de fluorescência da clorofila a em plantas attdt. Valores representam as médias \pm DP (n=4). Os valores que diferem significativamente do tipo selvagem ($P < 0,05$) pelo teste Tukey estão em negrito.

Parâmetros*	WL	attdt1	attdt2
A_N ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	11,45 \pm 2,10	8,73 \pm 0,71	7,10 \pm 1,37
g_s ($\text{mol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	0,228 \pm 0,038	0,128 \pm 0,007	0,173 \pm 0,023
E ($\text{mmol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	2,68 \pm 0,29	1,10 \pm 0,16	2,07 \pm 0,13
EUA (A_N/g_s)	47,23 \pm 2,42	47,98 \pm 1,76	36,73 \pm 6,92
R_d ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	0,88 \pm 0,05	1,09 \pm 0,09	1,39 \pm 0,08
R_p ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	2,38 \pm 0,33	1,80 \pm 0,14	2,49 \pm 0,15
F_v/F_m	0,774 \pm 0,003	0,759 \pm 0,003	0,753 \pm 0,003
F_v'/F_m'	0,518 \pm 0,021	0,482 \pm 0,020	0,555 \pm 0,011
J_{flu} ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	81,1 \pm 10,4	44,6 \pm 2,9	66,7 \pm 6,1

* A_N : Fotossíntese líquida; E : transpiração, g_s : condutância estomática; EUA: eficiência do uso da água; R_p : fotorrespiração; R_d : respiração noturna; 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.

De modo a caracterizar fotossinteticamente os genótipos em estudo, as respostas da A_N à irradiância (curva A_N/RFA) e à concentração interna de CO_2 (curva A_N/C_i) foram investigadas. As curvas A_N/RFA foram obtidas e ajustadas pelo modelo de hipérbole não-retangular, possibilitando a obtenção de alguns parâmetros (Tabela 3). De forma geral, tanto a irradiância de compensação (I_c) como a irradiância de saturação (I_s) foram similares para os genótipos analisados, com valores médios em torno de 12 e 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, respectivamente. Da mesma forma, a taxa de assimilação líquida de carbono saturada pela luz (A_{RFA}) e a eficiência do uso da luz, determinada a partir do inverso do rendimento quântico aparente ($1/\phi$) foram semelhantes, com valores significativamente maiores observados somente para attdt2 (aproximadamente 20 %).

Tabela 3: Parâmetros fotossintéticos derivados de curvas de luz de plantas attdt. Valores representam as médias \pm DP (n=4). Os valores que diferem significativamente dos tipos selvagem ($P < 0,05$) pelo teste Tukey estão em negrito.

Parâmetros*	WL	attdt1	attdt2
A_{RFA} ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	7,54 \pm 0,50	8,39 \pm 1,72	9,49 \pm 0,29

I_c ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	$12,95 \pm 1,91$	$12,10 \pm 2,61$	$11,50 \pm 0,70$
I_s ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	$387,97 \pm 104,29$	$439,60 \pm 56,03$	$322,98 \pm 32,80$
$1/\phi$ (μmol fótons. mol^{-1} CO_2)	$10,65 \pm 0,38$	$10,69 \pm 0,72$	$12,38 \pm 0,44$

* 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.

Adicionalmente, a partir das curvas A_N/C_i foi possível calcular curvas A_N/C_c e estimar outros parâmetros (Tabela 4). De modo geral, diferenças significativas entre os genótipos, no que se refere a concentração subestomática de CO_2 (C_i) e a concentração cloroplastídica de CO_2 (C_c) não foram observadas entre os genótipos. Verifica-se ainda que g_m foi reduzida em ambas as linhas mutantes apresentando valores, em média, 40% menor em relação ao WL. A velocidade máxima de carboxilação, em base C_i ou C_c ($V_{\text{cmax_}C_i}$ ou $V_{\text{cmax_}C_c}$, respectivamente) não apresentou variação entre os genótipos. Por outro lado, a capacidade máxima de transporte de elétrons em base C_i ou C_c ($J_{\text{max_}C_i}$ ou $J_{\text{max_}C_c}$, respectivamente) foi reduzida nas plantas attdt em média 25% em relação ao WL. Ademais, a semelhança nas razões $J_{\text{max_}C_i} : V_{\text{cmax_}C_i}$ e $J_{\text{max_}C_c} : V_{\text{cmax_}C_c}$, 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.

Tabela 4: Caracterização fotossintética de plantas attdt. Valores representam as médias \pm DP (n=4). Os valores que diferem significativamente ($P < 0,05$) pelo teste Tukey estão em negrito.

Parâmetros*	WL	attdt1	attdt2
C_i ($\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{mol}^{-1}$)	$314,17 \pm 5,14$	$310,37 \pm 2,14$	$336,14 \pm 11,39$
C_c ($\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{mol}^{-1}$)	$479,32 \pm 81,14$	$491,56 \pm 53,74$	$462,95 \pm 45,95$
g_m ($\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{bar}^{-1}$)	$0,055 \pm 0,011$	$0,035 \pm 0,008$	$0,030 \pm 0,007$
$V_{\text{cmax_}C_i}$ ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	$29,66 \pm 6,12$	$34,32 \pm 2,70$	$21,34 \pm 3,32$
$V_{\text{cmax_}C_c}$ ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	$22,87 \pm 5,48$	$23,41 \pm 3,33$	$20,54 \pm 6,80$
$J_{\text{max_}C_i}$ ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	$88,68 \pm 9,70$	$61,77 \pm 12,04$	$60,77 \pm 6,10$
$J_{\text{max_}C_c}$ ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	$98,11 \pm 7,71$	$81,15 \pm 11,44$	$68,48 \pm 7,35$
$J_{\text{max_}C_i} : V_{\text{cmax_}C_i}$	$2,53 \pm 0,13$	$2,31 \pm 0,16$	$2,30 \pm 0,14$
$J_{\text{max_}C_c} : V_{\text{cmax_}C_c}$	$3,58 \pm 0,38$	$4,09 \pm 0,80$	$3,27 \pm 0,67$

* 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 elétrons em base C_i ou C_c .

4.4. Efeitos no metabolismo primário pela ausência do transportador AttdT

Tendo em vista as variações observadas em função da maior taxa respiratória e um menor fluxo de elétrons, investigaram-se potenciais alterações metabólicas com o

intuito de melhor compreender possíveis relações entre aquelas alterações e o metabolismo de forma geral. Em geral, não se observaram variações significativas na concentração de pigmentos bem como na razão clorofila a/b (Figura 3).

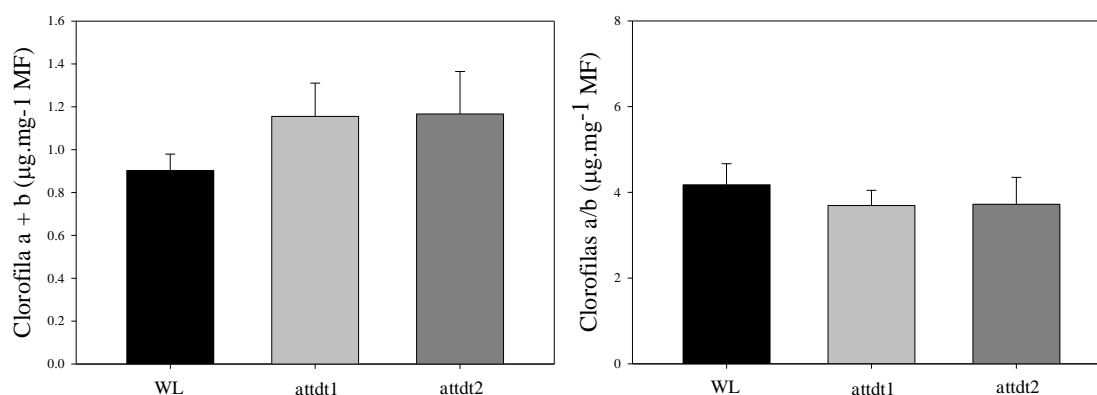


Figura 3. Teores de clorofila total a + b (A) e razão clorofila a/b (B) de linhas mutantes attdt. Valores obtidos de plantas com quatro semanas de idade, coletadas no meio do período luminoso. Barras representam médias \pm DP (n=4).

Diferenças significativas em relação aos níveis de nitrato no início e meio do período luminoso para a linha attdt2 foram observadas (Figura 4A). Em adição, as concentrações foliares de aminoácidos (Figura 4B) e proteínas (Figura 4C) foram muito semelhantes entre os genótipos em estudo.

O padrão de síntese e degradação de glicose, frutose e sacarose ao longo do dia, e amido ao meio do período luminoso, se mostrou bem similar entre os genótipos com pouca ou nenhuma variação entre os mesmos (Figura 5).

Cabe mencionar que o padrão diurno das concentrações de malato e fumarato foi bem distinto nas linhas mutantes com valores menores em relação ao tipo selvagem ao longo de todo o dia (Figuras 6A e 6B), observando-se assim uma redução de aproximadamente 65% e 40% para os teores de malato e fumarato, respectivamente. Embora haja diferenças nos teores desses ácidos orgânicos, o comportamento diurno observado foi bastante semelhante entre os genótipos, havendo uma tendência de acúmulo ao final do período luminoso, com o consumo durante o período escuro, ainda que em menores amplitudes.

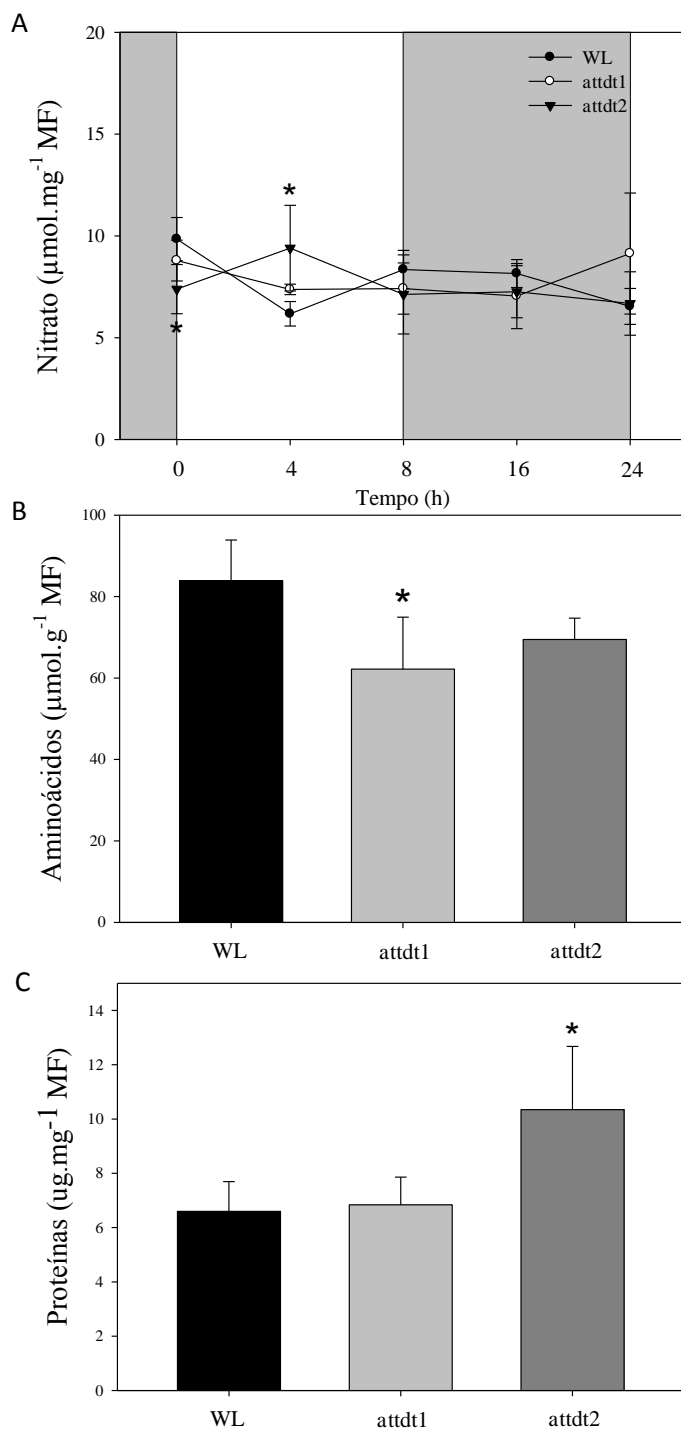


Figura 4. Teores de nitrato (A), aminoácidos (B) e proteínas totais (C) de linhas mutantes attdt. Valores obtidos de plantas com quatro semanas de idade, coletadas no meio do período luminoso para proteínas e coletadas em 5 horários ao longo do dia para nitrato. Barras representam médias \pm DP (n=4). Área cinza representa o período de escuro. Asteriscos (*) indicam valores significativos pelo teste Tukey a $P < 0.05$.

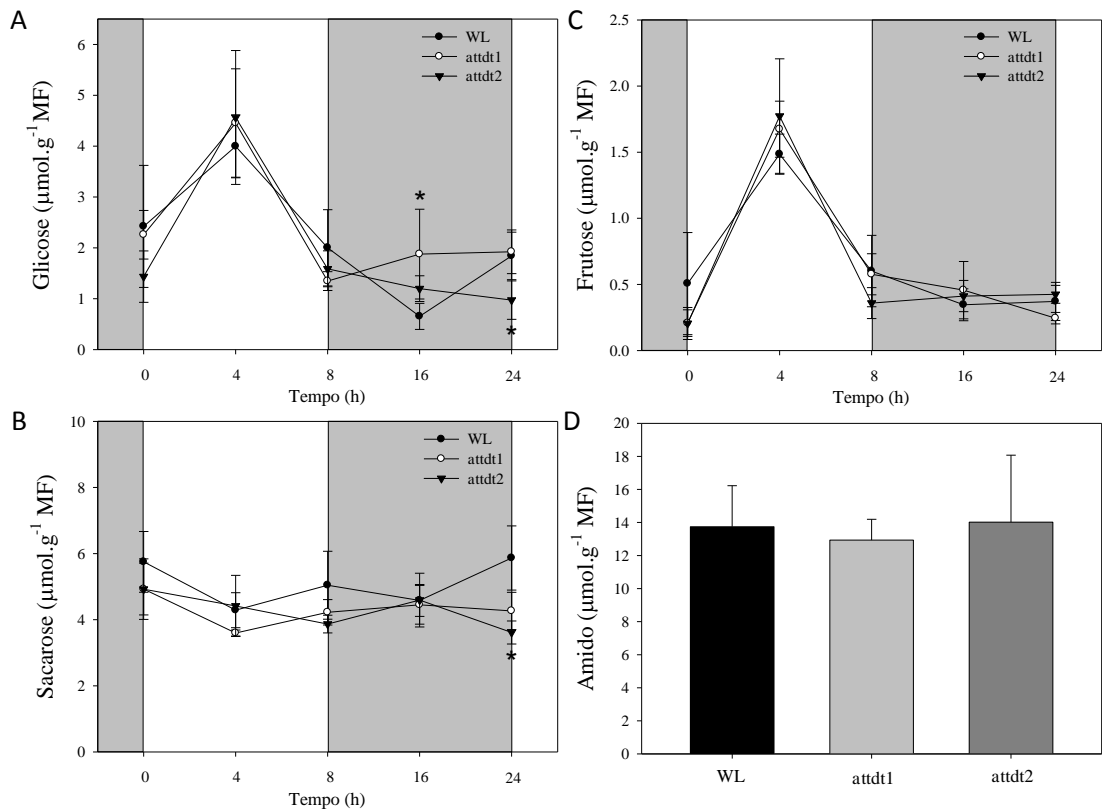


Figura 5. Teores de glicose (A), frutose (B), sacarose (C) e amido (D) de linhas mutantes attdt. Valores obtidos de plantas com quatro semanas de idade, coletadas em 5 horários ao longo do dia para glicose frutose e sacarose e ao meio do período luminoso para amido. Barras representam médias \pm DP (n=4). Área cinza representa o período de escuro. Asteriscos (*) indicam valores significativos pelo teste Tukey a $P < 0.05$.

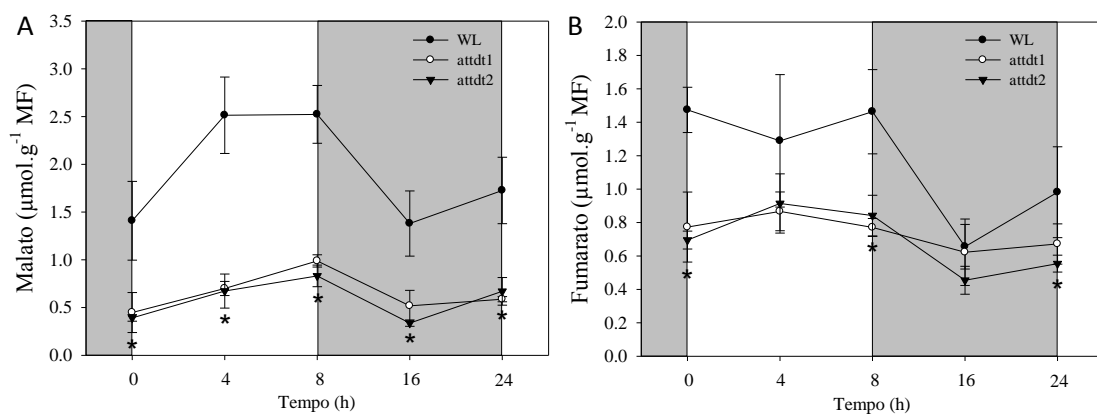


Figura 6. Teores de malato (A) e fumarato (B) de linhas mutantes attdt. Valores obtidos de plantas com quatro semanas de idade, coletadas em 5 horários ao longo do dia. Barras representam médias \pm DP (n = 4). Área cinza representa o período de escuro. Asteriscos (*) indicam valores significativos pelo teste Tukey a $P < 0.05$.

Os teores de NAD(P)(H) fornecem informações importante a respeito do estado redox celular. Nesse contexto, não se observaram diferenças entre os genótipos no que respeita as coenzimas oxidadas (NAD e NADP), sendo estes substratos importantes para enzimas que catalisam reações de fotossíntese e respiração (Figura 7A e D). No entanto, quando avaliadas as coenzimas reduzidas (NADH e NADPH) observou-se uma tendência de aumento para NADH, estatisticamente apenas em attdt2 (Figura 7B e E). O aumento nos níveis de NADH é possivelmente uma consequência das maiores taxas respiratórias das plantas mutantes. Embora uma evidente tendência de maiores razões para NADP/NADPH diferenças estatísticas não foram observadas (Figura 7F).

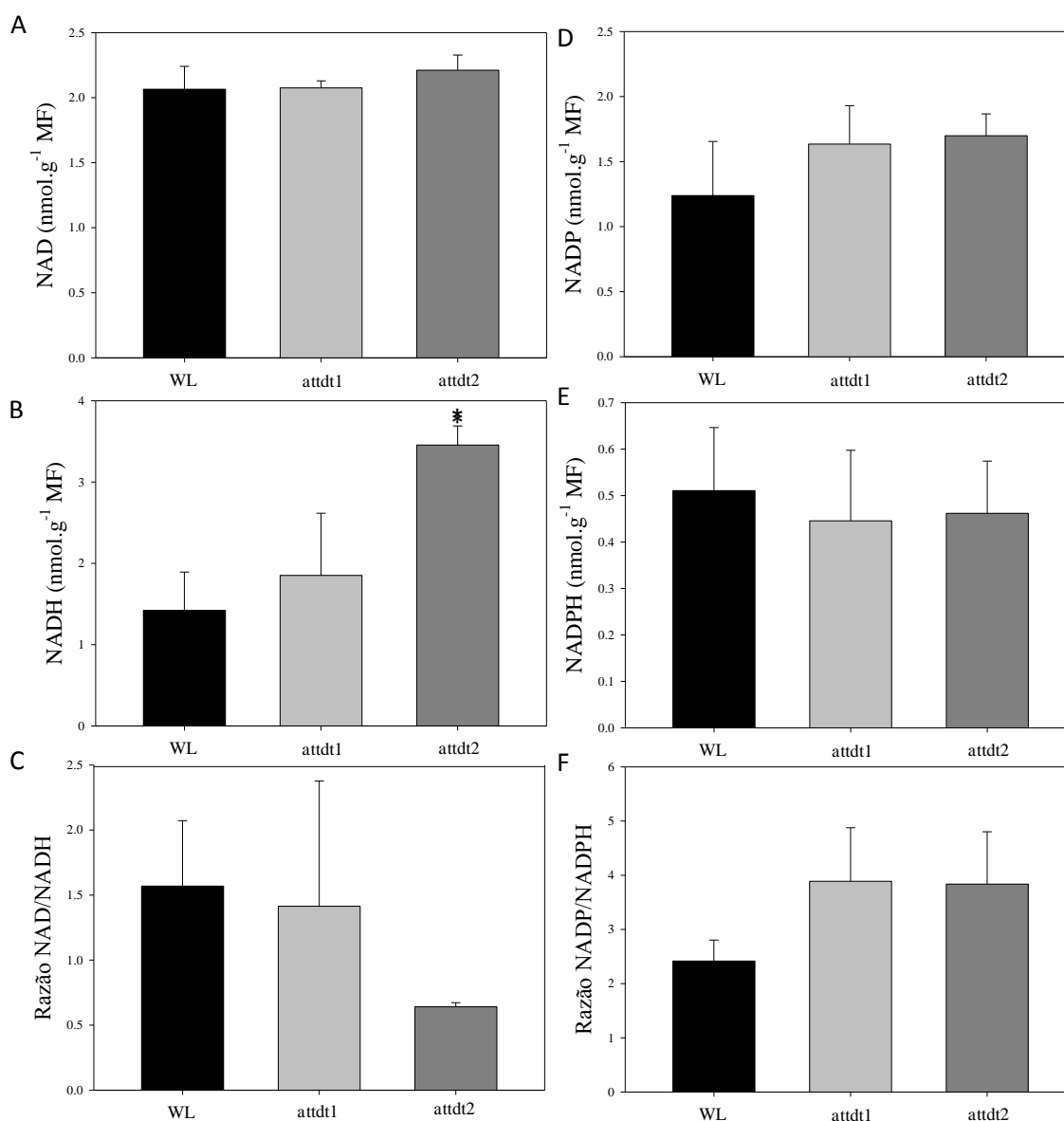


Figura 7. Teores de NAD (A), NADH (B), razão NAD/NADH (C), NADP (D), NADPH (E) e razão NADP/NADPH (F) em linhas mutantes attdt. Valores obtidos de plantas com quatro semanas de idade, coletadas ao meio do período luminoso. Barras representam médias \pm DP (n = 4). Asteriscos (*) indicam valores significativos pelo teste Tukey a $P < 0.05$.

4.5. Alterações da atividade enzimática em plantas attdt

De modo a entender melhor vias potencialmente alteradas em plantas attdt, a atividade catalítica máxima de importantes enzimas relacionadas com a fotossíntese, síntese e degradação de sacarose e amido, glicólise e ciclo dos ácidos tricarbóxicos (TCA) foram avaliadas (Tabela 5). Embora variações na fotossíntese tenham sido observadas os passos iniciais da fotossíntese parecem não estar sendo prejudicados, visto que não houveram alterações na atividade da Rubisco, seja em atividade máxima, em meio seletivo ou seu estado de ativação. A reação seguinte no ciclo de Calvin catalisada pela PGK, em que há conversão de 3-fosfoglicerato em 1,3-bifosfoglicerato, teve sua atividade aumentada significativamente, em média 60% para as plantas attdt. Não houveram alterações significativas na atividade das enzimas NADP-GAPDH e TPI. A atividade da aldolase, que converte dihidroxicetona-fosfato e eritrose-4-fosfato em sedoheptulose-1,7-bifosfato nas reações de regeneração do ciclo de Calvin, também teve tendência de aumento, estatisticamente significativa apenas para a linha attdt2.

A atividade da transaldolase, reponsável pela conversão de gliceraldeído-3-fosfato e sedoheptulose-7-fosfato em frutose-6-fosfato e eritrose-4-fosfato pela via das pentoses fosfatadas, também não sofreu alteração. Contudo, a atividade da G6PDH, que catalisa a reação de glicose-6-fosfato a 6-fosfogluconato liberando NADPH, na via oxidativa das pentoses fosfato, teve sua atividade aumentada (significativamente apenas em attdt2).

Analisando a sintase de sacarose-fosfato (SPS) registrou-se reduções significativas na atividade apenas quando em meio seletivo, sendo esta atividade reduzida em aproximadamente 38% nos genótipos mutantes, sem, no entanto, alterar atividade máxima ou estado de ativação. Não foi observada alteração da atividade da Susy, bem como da AGPase. Entretanto, reduções na atividade das invertases ácida e alcalina, que degradam sacarose, foram observadas em plantas attdt quando comparadas ao WL; assim, em média, a atividade de invertase ácida foi 30% menor, sendo que a invertase alcalina foi estatisticamente diferente apenas na linha attdt2, com redução de aproximadamente 60%.

As enzimas HK, PFK e NAD-GAPDH, relacionadas com a via glicolítica, não apresentaram variação significativa entre os genótipos. A enzima PK, que realiza a reação de fosfoenolpiruvato a piruvato, liberando uma molécula de ATP, mostrou uma maior atividade (em média 60%) nas plantas mutantes. A atividade das enzimas enolase, que catalisa 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato, e CS , acetil-coA e oxaloacetato a

citrato, liberando NADH e CO₂ não apresentaram variação significativa entre os genótipos.

Tabela 5: Atividade enzimática em plantas attdt no meio do período luminoso. Valores representam as médias \pm DP (n = 4). Os valores que diferem significativamente (P<0,05) pelo teste Tukey estão em negrito.

Enzimas*	WL	attdt1	attdt2
	$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ MF		
Rubisco V _{máx} *	0,285 \pm 0,146	0,307 \pm 0,042	0,267 \pm 0,093
Rubisco V _{sel} *	0,256 \pm 0,036	0,169 \pm 0,079	0,260 \pm 0,035
Rubisco (% ativação)*	77,72 \pm 30	53,36 \pm 31,4	69,17 \pm 31,2
PGK	10,524 \pm 2,621	14,520 \pm 1,447	18,360 \pm 1,201
NADP-GAPDH	0,265 \pm 0,033	0,305 \pm 0,035	0,289 \pm 0,073
TPI	143,728 \pm 16,968	146,291 \pm 5,486	161,091 \pm 6,811
Aldolase	0,542 \pm 0,088	0,676 \pm 0,112	0,837 \pm 0,139
Transaldolase	2,309 \pm 0,513	2,230 \pm 0,311	1,568 \pm 0,268
G6PDH	0,191 \pm 0,027	0,225 \pm 0,017	0,270 \pm 0,032
SPS V _{máx} *	0,667 \pm 0,239	0,480 \pm 0,073	0,464 \pm 0,094
SPS V _{sel} *	0,548 \pm 0,122	0,331 \pm 0,030	0,353 \pm 0,052
SPS (% ativação)*	93,086 \pm 42,498	70,733 \pm 17,448	78,178 \pm 18,135
Susy	0,236 \pm 0,035	0,234 \pm 0,012	0,246 \pm 0,043
AGPase	0,014 \pm 0,002	0,011 \pm 0,001	0,010 \pm 0,005
Invertase ácida	47,083 \pm 2,385	32,215 \pm 5,441	34,940 \pm 3,385
Invertase alcalina	57,657 \pm 4,179	48,858 \pm 17,650	22,969 \pm 0,730
HK	12,965 \pm 0,832	12,639 \pm 1,421	15,559 \pm 2,013
PFK	1,619 \pm 0,141	1,342 \pm 0,295	1,763 \pm 0,542
NAD-GAPDH	0,906 \pm 0,139	1,116 \pm 0,314	0,969 \pm 0,150
PK	0,106 \pm 0,018	0,162 \pm 0,039	0,181 \pm 0,019
Enolase	8,263 \pm 1,168	7,807 \pm 0,603	7,924 \pm 0,106
CS	0,069 \pm 0,045	0,098 \pm 0,074	0,046 \pm 0,033

*V_{máx}: dado em função de meio de reação com condições não limitantes; V_{sel}: dado em função de meio de reação seletivo, com condições limitantes; % ativação: estado de ativação dado em razão da atividade em meio seletivo por meio de atividade máxima. NAD-GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase dependente de NAD; PGK: fosfoglicerolquinase; TPI: triose fosfato isomerase; G6PDH: glicose-6-fosfato desidrogenase, SPS: Sacarose-fosfato sintase; SuSy: sintase da sacarose; AGPase: ADP-glicose pirofosforilase; HK: hexocinase; PFK: fosfofrutoquinase; NADP-GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase dependente de NAD; PK: piruvato quinase e CS: citrato sintase

4.6. Variação de metabólitos determinados por GC-MS em plantas attdt

Buscando investigar melhor as respostas metabólicas que pudessem explicar, ao menos em parte, as diferenças até então encontradas entre as linhas attdt e WL, procedeu-se à determinação do perfil metabólico via GC-MS. Foram detectados 52

metabólitos separados em 4 grupos, sendo 23 agrupados como aminoácidos, 13 como açúcares e açúcares álcoois, 10 como ácidos orgânicos e 5 como outros (compostos de classes diferentes das citadas anteriormente).

De modo geral, os aminoácidos apresentaram valores relativos maiores para as linhas mutantes, sendo confirmadas diferenças significativas para ácido aspártico, isoleucina e tirosina (Figura 8). Entretanto, glicina apresentou valores menores que o WL em plantas attdt. Foram observadas diferenças significativas para outros aminoácidos, mas em apenas para a linha attdt2, sendo que alanina, beta alanina, asparagina, glutamina, leucina, lisina, ornitina, treonina e valina tiveram os valores relativos significativamente maiores em relação ao WL. Os demais aminoácidos não apresentaram diferenças estatísticas.

Os valores relativos encontrados para os açúcares e açúcares álcoois não apresentaram um padrão claro sendo que a maioria não diferiu em relação ao WL, ainda que valores significantes para pelo menos uma das linhas mutantes tenham sido encontrados em alguns casos (Figura 9). Maltose apresentou valores menores em relação ao WL para ambas as plantas attdt. A linha attdt1 apresentou valores significativamente menores em relação ao WL para β -glicose e glicolato e maiores para glicose-6-fosfato. A linha attdt2 apresentou valores maiores para galactinol e glicerol em relação ao WL.

Em relação aos ácidos orgânicos, observou-se que os intermediários do ciclo TCA apresentaram as maiores diferenças (Figura 10). De maneira particular os níveis de citrato, foram em média 3,5 vezes maior em plantas attdt. Isocitrato apresentou valores significativamente maiores para plantas mutantes, entretanto, malato e succinato apresentaram valores menores em relação ao WL, redução essa de aproximadamente 50% para ambos os metabólitos. Fumarato diferiu significativamente apenas para as plantas attdt1. Os demais ácidos orgânicos não apresentaram diferenças entre os genótipos.

Foram identificados também compostos relacionados ao metabolismo secundário, sendo que estes não apresentaram, de maneira geral, diferenças entre os genótipos (Figura 11). Apenas foi observado valor relativo significativamente maior para mio-inositol e menor para ácido chiquímico em plantas attdt1. Putrescina, ácido salicílico e espermidina não apresentaram diferenças estatísticas entre os genótipos.

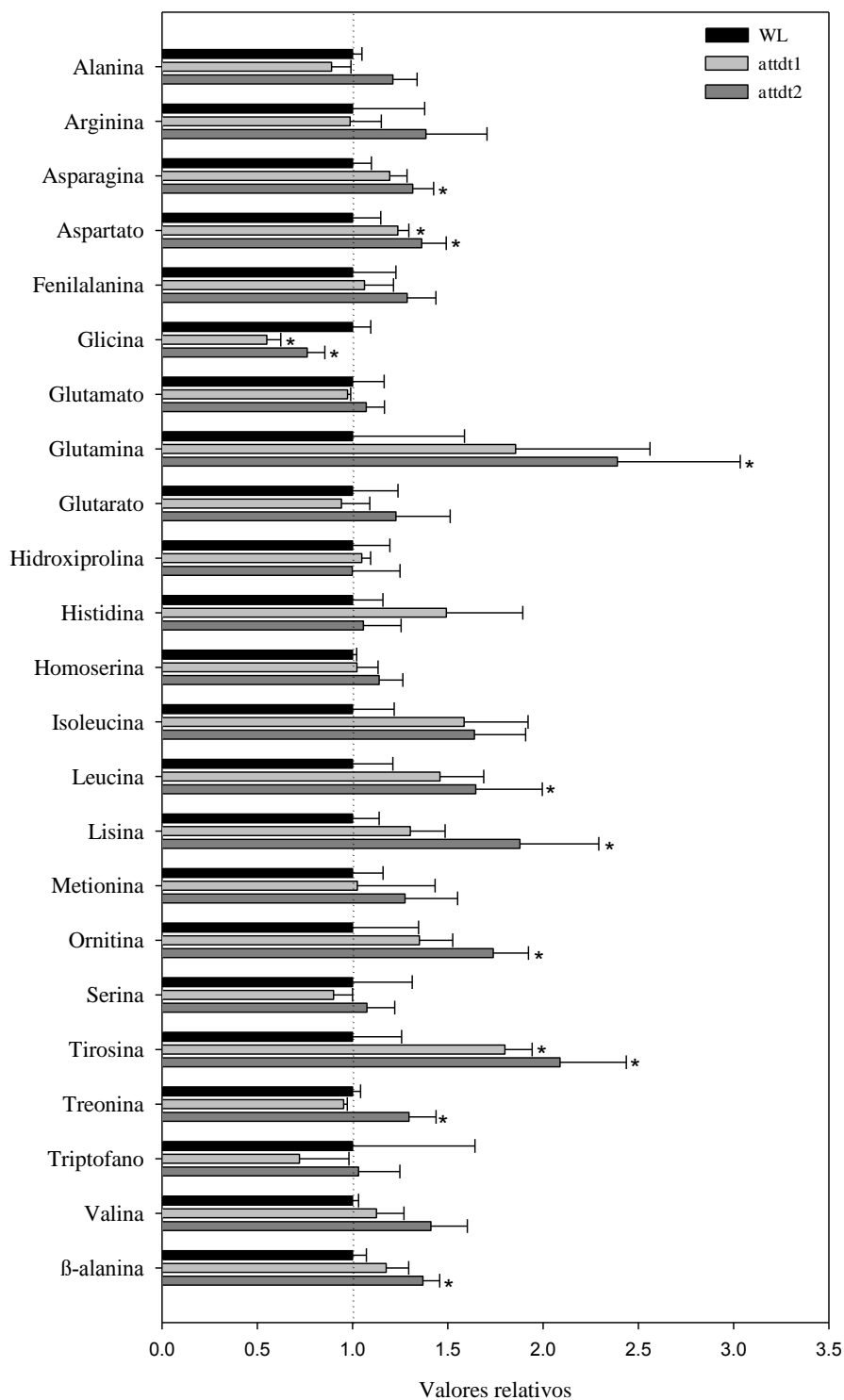


Figura 8. Valores relativos de aminoácidos em linhas mutantes attdt. Valores obtidos de plantas com quatro semanas de idade, coletadas no meio do período luminoso. Barras representam valores relativos em relação ao WL \pm DP (n = 4). Asteriscos (*) indicam valores significativos pelo teste Tukey a P<0.05.

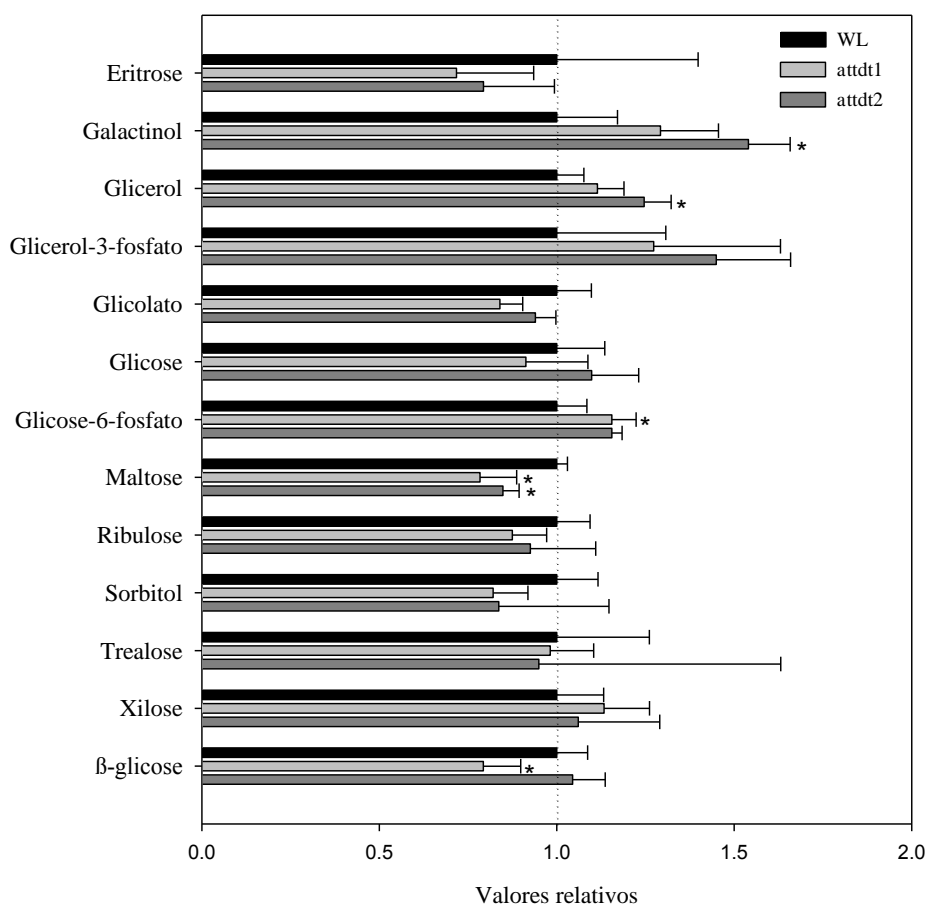


Figura 9. Valores relativos de açúcares e açúcares álcoois em linhas mutantes attdt. Valores obtidos de plantas com quatro semanas de idade, coletadas no meio do período luminoso. Barras representam valores relativos em relação ao WL \pm DP (n = 4). Asteriscos (*) indicam valores significativos pelo teste Tukey a $P < 0.05$.

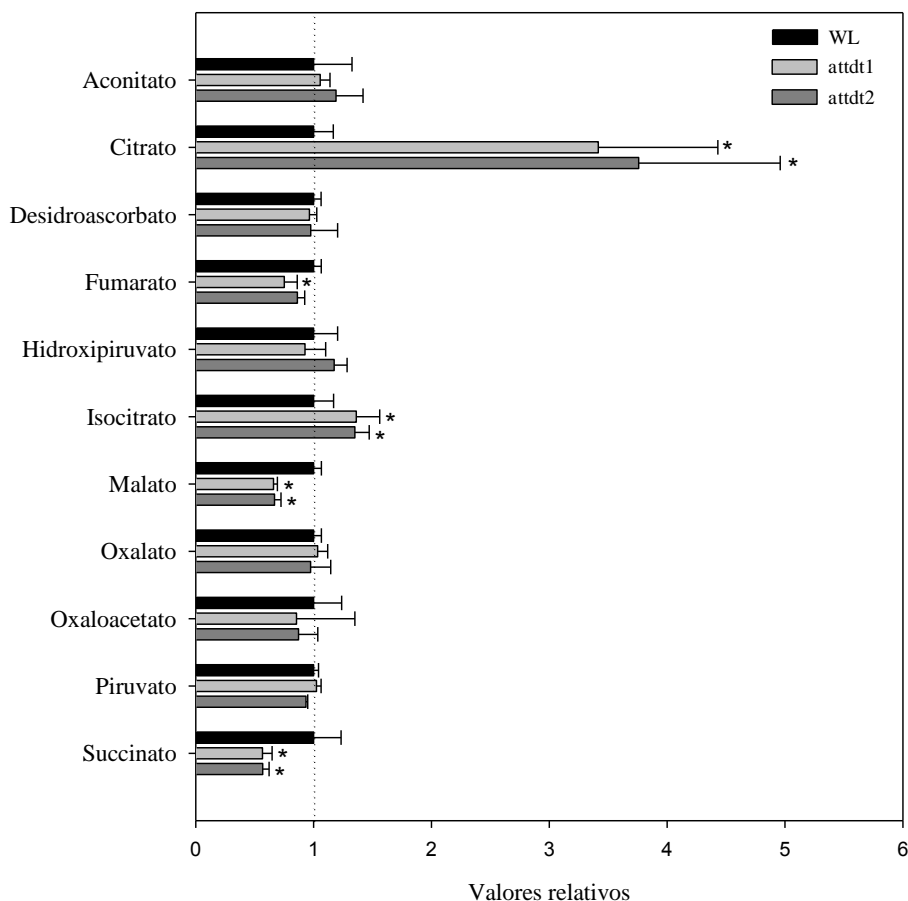


Figura 10. Valores relativos de ácidos orgânicos em linhas mutantes attdt. Valores obtidos de plantas com quatro semanas de idade, coletadas no meio do período luminoso. Barras representam valores relativos em relação ao WL \pm DP (n = 4). Asteriscos (*) indicam valores significativos pelo teste Tukey a P<0.05.

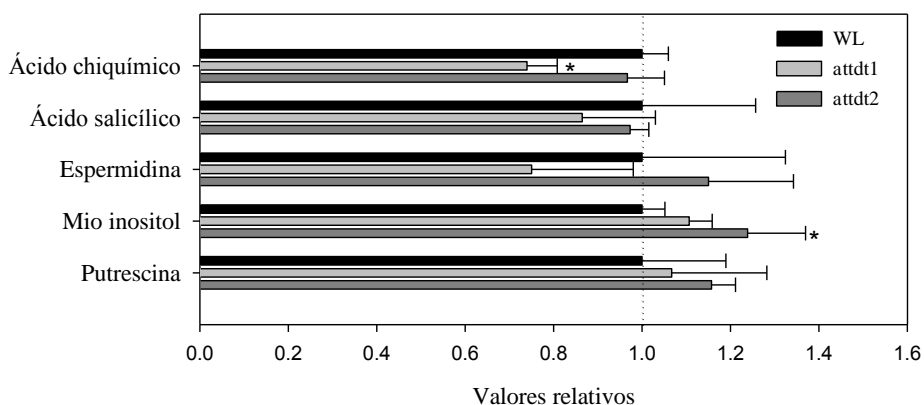


Figura 11. Valores relativos de mio inositol, putrescina, ácido salicílico, ácido chiquímico e espermidina em linhas mutantes attdt. Valores obtidos de plantas com quatro semanas de idade, coletadas no meio do período luminoso. Barras representam valores relativos em relação ao WL \pm DP (n = 4). Asteriscos (*) indicam valores significativos pelo teste Tukey a P<0.05.

5. DISCUSSÃO

De modo a entender como a ausência do transportador vacuolar de malato estaria associada à manutenção do crescimento com simultânea alteração drástica nos níveis de malato e fumarato e incrementos nas taxas respiratórias, como previamente relatado (Emmerlich et al., 2003; Hurth et al., 2005), esse trabalho buscou investigar detalhadamente mutantes para esse transportador através da combinação de análises morfológicas, trocas gasosas, quantificação de metabólitos, além de avaliar atividade enzimática. Os resultados obtidos demonstram que a ausência do transportador culminou em diminuição das taxas fotossintéticas com a concomitante redução de condutâncias estomática e mesofílica (Tabela 2 e 4) a despeito da manutenção na densidade estomática (Tabela 1), sem, no entanto alterar os teores de açúcares (Figura 5) e a atividade de diversas enzimas (Tabela 5). Ademais, um remodelamento do metabolismo primário, principalmente de ácidos orgânicos e aminoácidos, foi observado em plantas *attdt*, o que ocorreu muito provavelmente em função do funcionamento não cíclico do ciclo TCA com a simultânea indução de vias alternativas da respiração mitocondrial, possivelmente envolvida nas respostas observadas de modo a manter o crescimento nessas plantas.

5.1. Crescimento e trocas gasosas alteradas em resposta à ausência de *AttDT*

Embora a ausência funcional do transportador *AttDT* não afete drasticamente o crescimento em *A. thaliana* (massa seca da roseta), a arquitetura da roseta foi modificada, como notada pela diminuição do número de folhas e área total (Tabela 1). Ainda que o ganho de massa seca e a taxa de crescimento relativo não sejam alterados, a ausência de *AttDT* causou impactos indiretos sobre a morfologia da roseta. Adicionalmente, e considerando a semelhança na densidade estomática, a análise dos dados obtidos nas trocas gasosas sugerem que, em plantas com perda do transportador, situação fisiológica semelhante a estresse hídrico (Carmo-Silva et al., 2012) possa estar acontecendo, uma vez que a fotossíntese líquida se mostrou menor em relação ao WL, simultaneamente a uma maior taxa respiratória com condutâncias estomática e mesofílica reduzidas. Cumpre mencionar que as condutâncias (g_s e g_m) podem variar de maneira independente, visto que variações em g_m podem ocorrer mesmo sob condições ambiente de CO_2 (Tazoe et al., 2013) limitando, conseqüentemente, a disponibilidade de CO_2 nos sítios de carboxilação da Rubisco culminando em redução das taxas

fotossintéticas (Flexas et al., 2012; Kaldenhoff, 2012; Cano et al., 2014), como aqui observado. Não obstante, esperar-se-ia reduções em C_i e C_c e também do estado de ativação da Rubisco, o que, curiosamente, não foi observado nas plantas attdt (Tabela 4 e 5). Tomados em conjunto, esses resultados indicam que a manutenção do crescimento nessas plantas deve ter ocorrido as expensas de mecanismos outros, como descritos abaixo.

Outros fatores, não estomáticos, como a regeneração de ribulose-1,5-bifosfato (RuBP) (Tezara et al., 1999), inibição da atividade da Rubisco (Carmo-Silva et al., 2012), e decréscimo nos níveis de ATP e atividade de ATP-sintase (Tezara et al., 1999; Tezara et al., 2002) podem também limitar a fotossíntese. Os resultados ora obtidos indicam que embora reduções no fluxo de elétrons pela cadeia transportadora de elétrons do cloroplasto (J_{flu}) tenham sido observados, parâmetros de irradiância de saturação, compensação e eficiência no uso luz não foram alterados (Tabela 3). Desse modo, esperar-se-ia que os produtos da fotossíntese, bem como atividade enzimática, estivessem reduzidos, como normalmente observado em plantas sob limitada disponibilidade hídrica ou alta salinidade (Nazar et al., 2011; Dinakar et al., 2012), o que não foi observado aqui, indicando uma reprogramação metabólica. Ademais, a manutenção na atividade da Rubisco (Tabela 5), em conjunto com os teores de açúcares (Figura 5 e 9), de clorofilas totais e a razão clorofila a/b (Figura 3), reforçam a hipótese de que as limitações sobre a fotossíntese líquida nessas plantas seja devido primariamente por razões difusivas e não estejam associadas a danos causados aos fotossistemas ou à capacidade de assimilação da Rubisco, de modo que a manutenção no crescimento nessas plantas tenha sido governada, muito provavelmente, pelas altas taxas de respiração noturna.

5.2. Menores teores de malato no mesófilo afetam g_s

Como anteriormente mencionado, os ácidos orgânicos vêm sendo apontados como um dos principais reguladores do mecanismo pelo qual as células-guarda ajustam os seus movimentos (Ferne and Martinoia, 2009; Meyer et al., 2010; Araújo et al., 2011; Araújo et al., 2011; Meyer et al., 2011). Assim, durante a abertura estomática o malato proveniente do apoplasto seria acumulado nas células guarda, sendo o seu transporte mediado pelo transportador AtABCB14 (Lee et al., 2008). Ademais, o malato poderia atuar não apenas como osmorregulador, mas também como metabólito de sinalização, aumentando, por exemplo, a sensibilidade do canal vacuolar AtALMT9, responsável

pelo acúmulo de cloreto, outro importante íon regulador dos movimentos estomáticos (De Angeli et al., 2013). Em adição, o próprio metabolismo do malato, em que a sua descarboxilação pela ação da malato desidrogenase (MDH), formando oxalacetato ou pela formação direta de piruvato, mediado pela enzima málica, foi demonstrado como de fundamental importância na regulação do fechamento dos estômatos (Penfield et al., 2012).

Os resultados aqui obtidos confirmam as reduções nos níveis foliares de malato em plantas attdt, como previamente observado (Emmerlich et al., 2003) e fornecem evidência circunstancial que o padrão diurno de síntese e consumo desse ácido orgânico não tenha sido sobremodo alterado. Ainda que os mecanismos responsáveis pela alteração dos níveis de malato não sejam totalmente claros, uma vez que a redução pode ser causada pelo alto consumo (Lehmann et al., 2015) ou por redução da síntese (Nunes-Nesi et al., 2005), em plantas attdt parece que essas duas situações possam ser possíveis, embora o alto consumo garantiria, ao menos parcialmente, uma provável explicação para a manutenção do crescimento nessas plantas. Não obstante, uma outra alternativa capaz de explicar os menores teores de malato foliar possa estar associada ao transporte de 2-oxoglutarato ou oxaloacetato e malato no cloroplasto, que poderia ocasionar o influxo de malato citosólico em troca de 2-oxoglutarato ou oxaloacetato estromal, culminando em alterações no perfil de aminoácidos, principalmente aspartato e glutamato (Kinoshita et al., 2011). Em adição, plantas com inserção de T-DNA no gene *AtpOMT1* (plastidic 2-oxaloacetate/malate transporter) apresentaram acúmulo de glutamina juntamente com aumento dos teores de nitrato foliares (Kinoshita et al., 2011), o que também foi observado em plantas attdt.

Cumprir mencionar, no entanto, que reduções como as acima mencionadas, podem ter também consequências diretas sobre g_s , uma vez que menores teores citosólicos de malato poderiam implicar em menores teores de malato também no apoplasto, devido à tendência de equilíbrio entre os meios (Hedrich et al., 2001). Assim, menores g_s observadas seriam possivelmente devidas à menor disponibilidade de malato apoplástico proveniente do mesofilo. É importante mencionar também que o malato pode ser oriundo do próprio metabolismo da célula guarda, mediante degradação do amido nessas células (Vavasseur and Raghavendra, 2005). Nesse contexto, o sinal mesofílico associado à baixa concentração de malato parece ser preponderante à produção de malato nas células guarda per se, explicando, ao menos parcialmente, as menores condutâncias. Adicionalmente, plantas com reduzida expressão do

transportador *atqua1* (quick-activating anion channel 1), na membrana plasmática, ou de seu ativador OST1 (open stomata 1), uma proteína quinase rsponsiva à ácido abscísico, apresentaram maiores g_s e teores de malato foliar, sendo esse transportador associado ao efluxo de malato no vacúolo (Medeiros, 2013; Imes et al., 2013). Por associação oposta, dados os menores teores de malato e menores g_s e g_m , é provável que o transportador *AttDT* possa estar envolvido largamente na abertura estomática, promovendo, assim, o influxo de malato não apenas no vacúolo, mas também indiretamente nas células guarda. Considerando que alterações em g_s e g_m foram observadas sem alterações na densidade estomática e tanto na taxa de crescimento relativo quanto na massa seca (Tabela 1), é plausível sugerir que mecanismos outros, incluindo uma reprogramação metabólica e mecanismos moleculares, possam estar envolvidos na resposta à ausência do transportador *AttDT*.

5.3. Perfil de aminoácidos é alterado em conjunto a intermediários do ciclo TCA

O acúmulo de citrato, acompanhado de aumento nos níveis de isocitrato e glutamina além da redução dos níveis de succinato, fumarato e malato foram observados em plantas *attdt* (Figuras 8 e 10). Cabe mencionar que o acúmulo de citrato no vacúolo parece ser inibido por concentrações de malato, principalmente devido às evidências de que esses ácidos sejam transportados pelo mesmo transportador (Oleski et al., 1987; Rentsch and Martinoia, 1991). Não obstante, a magnitude do acúmulo de citrato parece ser dependente do potencial elétrico do tonoplasto e de sua concentração citosólica, e por consequencia do seu metabolismo, sendo o ciclo TCA a única fonte de síntese, o que indicaria que o acúmulo de citrato é regulado, primariamente, pela respiração mitocondrial (Etienne et al., 2013). Ademais, a reconfiguração metabólica observada em plantas *attdt* sugere um funcionamento não cíclico do ciclo TCA, de modo que rotas alternativas sejam ativadas em resposta a ausência funcional de *attdt* de forma a suprir a demanda de intermediários metabólicos, com a produção de energia, o que explicaria, ao menos em parte, a manutenção do crescimento. Cumpre mencionar também que diversas rotas alternativas são possíveis, incluindo bypasses citosólicos, mitocondriais e cloroplastídicos (Sweetlove et al., 2010). Os resultados obtidos sugerem que a produção de citrato elevada é possivelmente proveniente de um maior direcionamento do fluxo da glicólise para o ciclo TCA, mediante aumento das atividades das enzimas PGK e PK (Tabela 5). Tal afirmativa é corroborada pelos níveis de piruvato, oxaloacetato e acetil-CoA que estariam, em sua maioria, contribuindo

diretamente para a formação de citrato que, por sua vez, culminaria com a produção de 2-oxoglutarato, utilizado a posteriori na assimilação do nitrogênio formando, ao final, glutamina. Considerando os níveis similares de piruvato e oxaloacetato entre plantas mutantes e WL e a ausência de alterações na atividade da enzima CS é possível sugerir que o próprio piruvato estaria formando oxaloacetato via ação da piruvato carboxilase e acetil-CoA pela piruvato desidrogenase (PDH) (Etienne et al., 2013). Isso ocorreria, muito provavelmente, em resposta aos incrementos na atividade da enzima PK, que forma piruvato, embora os metabólitos das reações seguintes não apresentam diferenças (Figura 9 e Tabela 5). Cabe ressaltar também que malato poderia atuar sobre os níveis de NADH mitocondrial, mediante uma alta atividade da NAD-MDH, aliviando assim os efeitos inibitórios sobre o complexo PDH (Igamberdiev et al., 2014), o que também poderia explicar a redução nos níveis de malato. Ademais, a manutenção nos níveis de NAD e NADH entre os genótipos (Figura 7A e B), sugere também que a atividade da PDH não está sendo afetada.

Não apenas aminoácidos derivados de oxaloacetato e 2-oxoglutarato (i. e. aspartato e glutamina) apresentaram aumento nas plantas attdt (Figura 8), mas também diversos outros aminoácidos que derivam das reações de transaminação (Ishihara et al., 2015). Em conjunto com os maiores teores de nitrato nas folhas de plantas attdt ao meio do período luminoso (Figura 4), os resultados sugerem que tais plantas estejam assimilando mais nitrogênio que plantas WL e que a demanda por esqueletos de carbono seja maior, o que direcionaria o fluxo para formação de 2-oxoglutarato, que faz uma associação estreita entre o pool de aminoácidos e o ciclo TCA (Araújo et al., 2014; Ishihara et al., 2015). Ademais, aminoácidos poderiam servir como doadores de elétrons alternativos à cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias via sistema de transferência de elétrons ETF/ETFQO (electron-transfer flavoprotein/electron-transfer flavoprotein:ubiquinone oxidoreductase) (Araújo et al., 2010; Araújo et al., 2011; Kirma et al., 2012), suprimindo a demanda energética e garantindo a manutenção do crescimento em plantas attdt.

Curiosamente, aumentos nos níveis de aminoácidos em conjunto com a diminuição de intermediários do ciclo TCA foi também observado em plantas sob estresse por selenito. A presença de selenito ocasiona um estímulo das vias anti-oxidativas dada a capacidade desse composto em formar espécies reativas de oxigênio (ROS), concomitantemente ao aumento da respiração, atividade da oxidase alternativa (AOX) e da via das pentoses fosfato (Dimkovikj and Van Hoewyk, 2014). Ademais, a atividade

da G6PDH, enzima chave da via das pentoses fosfato, foi aumentada em plantas attdt (Tabela 5); entretanto, metabólitos relacionados à fotorrespiração (i.e. hidroxipiruvato e glicolato) e ao estresse oxidativo (i.e. desidroascorbato) não foram alterados (Figura 9 e 10). Nesse contexto, as maiores taxas respiratórias observadas em plantas attdt devem ser causadas por motivos outros, não necessariamente relacionados à tolerância a estresse oxidativo. Assim, embora a atividade anti-oxidativa não tenha sido abordada neste trabalho, em função dos resultados obtidos é plausível sugerir que mecanismos anti-oxidativos não estejam alterados. Esse fato à parte, plantas attdt parecem simular metabolicamente uma situação de estresse por seca. Além de redução das taxas fotossintéticas e condutâncias essas plantas foram também caracterizadas por aumentos nos níveis de metabólitos relacionados com proteção osmótica (glicerol e galactinol), metabólitos esses especificamente envolvidos na tolerância a estresse por frio, alta salinidade e seca (Taji et al., 2002). Cumpre mencionar também que os níveis de malato podem atuar também no controle do pH, mediante a sua síntese via atividade acoplada de fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPCase) e malato desidrogenase (MDH) em condições de alto pH citosólico, via degradação pela enzima málica em condições de baixo pH citosólico (Martinoia et al., 2007), ou também atuando na ativação de mecanismos de tolerância a estresse por alumínio (Kovermann et al., 2007; Meyer et al., 2011). Ademais, AttDT teve sua expressão fortemente correlacionada com alteração do pH do meio (Hurth et al., 2005). Tomados em conjunto, os resultados obtidos indicam que plantas attdt possam apresentar desempenho melhor quando sob condição de estresses (i.e., limitação hídrica e alumínio), uma vez que mecanismos de resposta à esses estresses parecem estar previamente ativos. Ademais, considerando a manutenção do crescimento mesmo sob baixas condutâncias e, conseqüentemente, menores perdas de água por transpiração, é plausível sugerir uma melhor performance desses genótipos sob limitada disponibilidade hídrica. Espera-se que também em condições de estresses que alterem o pH e potencial redox celular, como observado em situações de hipoxia (Irfan et al., 2010; Xu et al., 2015), plantas attdt tenham seu fenótipo drasticamente alterado.

6. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

Embora o crescimento tenha sido pouco ou nada afetado, a ausência do transportador AttDT afeta diretamente o metabolismo primário, ocasionando alterações

em parâmetros de trocas gasosas bem como nos níveis de ácidos orgânicos e aminoácidos sem afetar pigmentos e proteínas. Em adição, esse transportador parece ser essencial para a manutenção das concentrações adequadas de ácidos orgânicos, especialmente malato, no citosol. Estudos de fluxo metabólico com plantas attdt podem auxiliar a elucidar como ocorre a diminuição dos níveis de malato foliar, bem como a síntese de aminoácidos e sua real função como fonte alternativa de energia, garantindo a manutenção do crescimento nessas plantas. Ademais, análises de expressão de transportadores específicos de célula guarda podem trazer informações adicionais sobre como o funcionamento dos estômatos é efetivamente afetado quando o acúmulo de malato (e por extensão fumarato) é alterado. Importante mencionar também que, submeter plantas attdt a estresses diversos, especialmente estresses que envolvam alteração no pH citosólico, pode auxiliar no entendimento da função do transportador na tolerância a estresses, fornecendo explicações várias em pesquisas envolvendo tolerâncias a estresses em plantas de interesse agrônômico com implicações biotecnológicas e na agricultura em geral.

7. REFERÊNCIAS

- Araújo WL, Ishizaki K, Nunes-Nesi A, Larson TR, Tohge T, Krahnert I, Witt S, Obata T, Schauer N, Graham IA, Leaver CJ, Fernie AR** (2010) Identification of the 2-hydroxyglutarate and isovaleryl-CoA dehydrogenases as alternative electron donors linking lysine catabolism to the electron transport chain of Arabidopsis mitochondria. *Plant Cell* **22**: 1549-1563
- Araújo WL, Martins AO, Fernie AR, Tohge T** (2014) 2-Oxoglutarate: linking TCA cycle function with amino acid, glucosinolate, flavonoid, alkaloid, and gibberellin biosynthesis. *Frontiers in Plant Science* **5**: 552
- Araújo WL, Nunes-Nesi A, Fernie AR** (2011) 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** (2011) Antisense inhibition of the iron-sulphur subunit of succinate dehydrogenase enhances photosynthesis and growth in tomato via an organic acid-mediated effect on stomatal aperture. *Plant Cell* **23**: 600-627
- Araújo WL, Tohge T, Ishizaki K, Leaver CJ, Fernie AR** (2011) Protein degradation – an alternative respiratory substrate for stressed plants. *Trends in Plant Science* **16**: 489-498
- Barrs HD, Weatherley PE** (1962) A re-examination of relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Australian Journal of Biological Sciences* **15**: 413-428
- Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis KR, Görlach J** (2001) Growth stabased phenotypic analysis of Arabidopsis a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell* **13**: 1499-1510
- Bradford MM** (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
- Cano FJ, LÓpez R, Warren CR** (2014) Implications of the mesophyll conductance to CO₂ for photosynthesis and water-use efficiency during long-term water stress and recovery in two contrasting Eucalyptus species. *Plant, Cell & Environment* **37**: 2470-2490
- Carmo-Silva AE, Gore MA, Andrade-Sanchez P, French AN, Hunsaker DJ, Salvucci ME** (2012) Decreased CO₂ availability and inactivation of Rubisco limit photosynthesis in cotton plants under heat and drought stress in the field. *Environmental and Experimental Botany* **83**: 1-11
- Chater C, Gray JE, Beerling DJ** (2013) Early evolutionary acquisition of stomatal control and development gene signalling networks. *Current Opinion in Plant Biology* **16**: 638-646

- Conn SJ, Berninger P, Broadley MR, Gilliam M** (2012) Exploiting natural variation to uncover candidate genes that control element accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **193**: 859-866
- Cuadros-Inostroza Á, Caldana C, Redestig H, Kusano M, Lisek J, Peña-Cortés H, Willmitzer L, Hannah MA** (2009) TargetSearch - a bioconductor package for the efficient preprocessing of GC-MS metabolite profiling data. *BMC Bioinformatics* **10**: 428
- Daloso DM, Antunes WC, Pinheiro DP, Waquim JP, Araújo WL, Loureiro ME, Fernie AR, Williams TCR** (2015) Tobacco guard cells fix CO₂ by both Rubisco and PEPcase whilst sucrose acts as a substrate during light induced stomatal opening. *Plant, Cell & Environment*: doi: 10.1111/pce.12555
- De Angeli A, Zhang J, Meyer S, Martinoia E** (2013) AtALMT9 is a malate-activated vacuolar chloride channel required for stomatal opening in *Arabidopsis*. *Nature communications* **4**: 1804
- Dimkovikj A, Van Hoewyk D** (2014) Selenite activates the alternative oxidase pathway and alters primary metabolism in *Brassica napus* roots: evidence of a mitochondrial stress response. *BMC Plant Biology* **14**: 259
- Dinakar C, Djilianov D, Bartels D** (2012) Photosynthesis in desiccation tolerant plants: Energy metabolism and antioxidative stress defense. *Plant Science* **182**: 29-41
- Emmerlich V, Linka N, Reinhold T, Hurth MA, Traub M, Martinoia E, Neuhaus HE** (2003) The plant homolog to the human sodium/dicarboxylic cotransporter is the vacuolar malate carrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 11122-11126
- Ethier GJ, Livingston NJ** (2004) On the need to incorporate sensitivity to CO₂ transfer conductance into the Farquhar–von Caemmerer–Berry leaf photosynthesis model. *Plant, Cell & Environment* **27**: 137-153
- Etienne A, Génard M, Lobit P, Mbeguié-A-Mbéguié D, Bugaud C** (2013) What controls fleshy fruit acidity? A review of malate and citrate accumulation in fruit cells. *Journal of Experimental Botany* **64**: 1451-1469
- Fernie AR, Aharoni A, Willmitzer L, Stitt M, Tohge T, Kopka J, Carroll AJ, Saito K, Fraser PD, DeLuca V** (2011) Recommendations for reporting metabolite data. *Plant Cell* **23**: 2477-2482
- 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** (2012) Mesophyll diffusion

conductance to CO₂: an unappreciated central player in photosynthesis. *Plant Science* **193**: 70-84

Genty B, Briantais J-M, Baker NR (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochemistry et Biophysics Acta* **990**: 87-92

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

Hamamoto S, Uozumi N (2014) Organelle-localized potassium transport systems in plants. *Journal of Plant Physiology* **171**: 743-747

Haydon MJ, Cobbett CS (2007) Transporters of ligands for essential metal ions in plants. *New Phytologist* **174**: 499-506

Hedrich R, Neimanis S, Savchenko G, Felle HH, Kaiser WM, Heber U (2001) Changes in apoplastic pH and membrane potential in leaves in relation to stomatal responses to CO₂, malate, abscisic acid or interruption of water supply. *Planta* **213**: 594-601

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 9738-9743

Hunt R, Causton D, Shipley B, Askew A (2002) A modern tool for classical plant growth analysis. *Annals of Botany* **90**: 485-488

Hurth MA, Suh SJ, Kretschmar T, Geis T, Bregante M, Gambale F, Martinoia E, Neuhaus HE (2005) Impaired pH Homeostasis in Arabidopsis lacking the vacuolar dicarboxylate transporter and analysis of carboxylic acid transport across the tonoplast. *Plant Physiology* **137**: 901-910

Igamberdiev AU, Lernmark U, Gardeström P (2014) Activity of the mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex in plants is stimulated in the presence of malate. *Mitochondrion* **19**: 184-190

Imes D, Mumm P, Böhm J, Al-Rasheid KAS, Marten I, Geiger D, Hedrich R (2013) Open stomata 1 (OST1) kinase controls R-type anion channel QUAC1 in Arabidopsis guard cells. *Plant Journal* **74**: 372-382

Irfan M, Hayat S, Hayat Q, Afroz S, Ahmad A (2010) Physiological and biochemical changes in plants under waterlogging. *Protoplasma* **241**: 3-17

Ishihara H, Obata T, Sulpice R, Fernie AR, Stitt M (2015) Quantifying protein synthesis and degradation in Arabidopsis by dynamic ¹³CO₂ labeling and analysis of enrichment in individual amino acids in their free pools and in protein. *Plant Physiology* **168**: 74-93

- Jeanguenin L, Alcon C, Duby G, Boeglin M, Chérel I, Gaillard I, Zimmermann S, Sentenac H, Véry AA** (2011) AtKc1 is a general modulator of Arabidopsis inward Shaker channel activity. *Plant Journal* **67**: 570-582
- Kaldenhoff R** (2012) Mechanisms underlying CO₂ diffusion in leaves. *Current Opinion in Plant Biology* **15**: 276-281
- Kang J, Park J, Choi H, Burla B, Kretschmar T, Lee Y, Martinoia E** (2011) Plant ABC Transporters. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists* **9**: e0153
- 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. *Annual Review of Plant Biology* **61**: 561-591
- Kinoshita H, Nagasaki J, Yoshikawa N, Yamamoto A, Takito S, Kawasaki M, Sugiyama T, Miyake H, Weber AP, Taniguchi M** (2011) The chloroplastic 2-oxoglutarate/malate transporter has dual function as the malate valve and in carbon/nitrogen metabolism. *Plant Journal* **65**: 15-26
- Kirma M, Araújo WL, Fernie AR, Galili G** (2012) The multifaceted role of aspartate-family amino acids in plant metabolism. *Journal of Experimental Botany* **63**: 4995-5001
- Kollist H, Nuhkat M, Roelfsema MRG** (2014) Closing gaps: linking elements that control stomatal movement. *New Phytologist* **203**: 44-62
- 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 Journal* **52**: 1169-1180
- Lawson T, Simkin AJ, Kelly G, Granot D** (2014) Mesophyll photosynthesis and guard cell metabolism impacts on stomatal behaviour. *New Phytologist* **203**: 1064-1081
- Lee J, Bowling DJF** (1992) Effect of the mesophyll on stomatal opening in *Commelina communis*. *Journal of Experimental Botany* **43**: 951-957
- Lee M, Choi Y, Burla B, Kim Y-Y, Jeon B, Maeshima M, Yoo J-Y, Martinoia E, Lee Y** (2008) The ABC transporter AtABCB14 is a malate importer and modulates stomatal response to CO₂. *Nature Cell Biology* **10**: 1217-1223
- Lehmann MM, Rinne KT, Blessing C, Siegwolf RT, Buchmann N, Werner RA** (2015) Malate as a key carbon source of leaf dark-respired CO₂ across different environmental conditions in potato plants. *Journal of Experimental Botany*: erv279
- Li L, He Z, Pandey GK, Tsuchiya T, Luan S** (2002) Functional cloning and characterization of a plant efflux carrier for multidrug and heavy metal detoxification. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 5360-5368
- Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR** (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols* **1**: 387

- Long SP, Bernacchi CJ** (2003) Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. *Journal of Experimental Botany* **54**: 2393-2401
- Magalhaes JV, Liu J, Guimaraes CT, Lana UG, Alves VM, Wang Y-H, Schaffert RE, Hoekenga OA, Piner MA, Shaff JE** (2007) A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. *Nature Genetics* **39**: 1156-1161
- Marinova K, Pourcel L, Weder B, Schwarz M, Barron D, Routaboul J-M, Debeaujon I, Klein M** (2007) The Arabidopsis MATE transporter TT12 acts as a vacuolar flavonoid/H⁺-antiporter active in proanthocyanidin accumulating cells of the seed coat. *Plant Cell* **19**: 2023-2038
- Martinoia E, Maeshima M, Neuhaus HE** (2007) Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. *Journal of Experimental Botany* **58**: 83-102
- Martinoia E, Meyer S, De Angeli A, Nagy R** (2012) Vacuolar transporters in their physiological context. *Annual Review of Plant Biology* **63**: 183-213
- Medeiros D** (2013). Implicações fisiológicas e metabólicas da perda funcional do canal de ácidos orgânicos AtALMT12 em *Arabidopsis thaliana*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.
- Merilo E, Jõesaar I, Brosché M, Kollist H** (2014) To open or to close: species-specific stomatal responses to simultaneously applied opposing environmental factors. *New Phytologist* **202**: 499-508
- Meyer S, De Angeli A, Fernie AR, Martinoia E** (2010) Intra- and extra-cellular excretion of carboxylates. *Trends in Plant Science* **15**: 40-47
- 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 Journal* **67**: 247-257
- Mott KA, Sibbersen ED, Shope JC** (2008) The role of the mesophyll in stomatal responses to light and CO₂. *Plant, Cell & Environment* **31**: 1299-1306
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473-497
- Nawrath C, Heck S, Parinthawong N, Métraux J-P** (2002) EDS5, an Essential component of salicylic acid-dependent signaling for disease resistance in *Arabidopsis*, is a member of the MATE transporter family. *Plant Cell* **14**: 275-286
- Nazar R, Iqbal N, Syeed S, Khan NA** (2011) Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under salt stress by enhancing nitrogen and sulfur assimilation and antioxidant metabolism differentially in two mungbean cultivars. *Journal of Plant Physiology* **168**: 807-815
- Neuhaus HE** (2007) Transport of primary metabolites across the plant vacuolar membrane. *FEBS Letters* **581**: 2223-2226

- 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 fumarate hydratase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. *Plant Journal* **50**: 1093-1106
- Nunes-Nesi A, Carrari F, Lytovchenko A, Smith AMO, Ehlers Loureiro M, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ, Fernie AR** (2005) Enhanced photosynthetic performance and growth as a consequence of decreasing mitochondrial malate dehydrogenase activity in transgenic tomato plants. *Plant Physiology* **137**: 611-622
- Oleski N, Mahdavi P, Bennett AB** (1987) Transport properties of the tomato fruit tonoplast II. Citrate Transport. *Plant Physiology* **84**: 997-1000
- Olsen JE, Junttila O** (2002) Far red end-of-day treatment restores wild type-like plant length in hybrid aspen overexpressing phytochrome A. *Physiologia Plantarum* **115**: 448-457
- Osakabe Y, Arinaga N, Umezawa T, Katsura S, Nagamachi K, Tanaka H, Ohiraki H, Yamada K, Seo S-U, Abo M** (2013) Osmotic stress responses and plant growth controlled by potassium transporters in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**: 609-624
- Ou X, Gan Y, Chen P, Qiu M, Jiang K, Wang G** (2014) Stomata prioritize their responses to multiple biotic and abiotic signal inputs. *PLoS ONE* **9**: e101587
- Penfield S, Clements S, Bailey KJ, Gilday AD, Leegood RC, Gray JE, Graham IA** (2012) Expression and manipulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 identifies a role for malate metabolism in stomatal closure. *Plant Journal* **69**: 679-68
- 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. *Biochemistry et Biophysics Acta* **975**: 384-394
- Rentsch D, Martinoia E** (1991) Citrate transport into barley mesophyll vacuoles—comparison with malate-uptake activity. *Planta* **184**: 532-537
- Roelfsema MRG, Hanstein S, Felle HH, Hedrich R** (2002) CO₂ provides an intermediate link in the red light response of guard cells. *Plant Journal* **32**: 65-75
- Roessner U, Luedemann A, Brust D, Fiehn O, Linke T, Willmitzer L, Fernie AR** (2001) Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. *Plant Cell* **13**: 11-29
- Schippers JHM, Nunes-Nesi A, Apetrei R, Hille J, Fernie AR, Dijkwel PP** (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

- Schroeder JI, Allen GJ, Hugouvieux V, Kwak JM, Waner D** (2001) Guard cell signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**: 627-658
- Schumacher K** (2014) pH in the plant endomembrane system: an import and export business. *Current Opinion in Plant Biology* **22**: 71-76
- Sharkey TD, Bernacchi CJ, Farquhar GD, Singsaas EL** (2007) Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C₃ leaves. *Plant Cell Environmental* **30**: 1035-1040
- Sienkiewicz-Porzucek A, Nunes-Nesi A, Sulpice R, Lisec J, Centeno DC, Carillo P, Leisse A, Urbanczyk-Wochniak E, Fernie AR** (2008) Mild reductions in mitochondrial citrate synthase activity result in a compromised nitrate assimilation and reduced leaf pigmentation but have no effect on photosynthetic performance or growth. *Plant Physiology* **147**: 115-127
- Szczerba MW, Britto DT, Kronzucker HJ** (2009) K⁺ transport in plants: Physiology and molecular biology. *Journal of Plant Physiology* **166**: 447-466
- Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2002) Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **29**: 417-426
- Tazoe Y, von Caemmerer S, Evans J** (2013) Measurement of mesophyll conductance in tobacco, *Arabidopsis* and wheat leaves with tunable diode laser absorption spectroscopy. In *Photosynthesis Research for Food, Fuel and the Future*. Springer Berlin Heidelberg, pp 751-755
- Tezara W, Mitchell V, Driscoll SP, Lawlor DW** (2002) Effects of water deficit and its interaction with CO₂ supply on the biochemistry and physiology of photosynthesis in sunflower. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1781-1791
- Tezara W, Mitchell VJ, Driscoll SD, Lawlor DW** (1999) Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature* **401**: 914-917
- Trentmann O, Haferkamp I** (2013) Current progress in tonoplast proteomics reveals insights into the function of the large central vacuole. *Frontiers in Plant Science* **4**: 34
- 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 & Environment* **18**: 631-640
- Vavasseur A, Raghavendra AS** (2005) Guard cell metabolism and CO₂ sensing. *New Phytologist* **165**: 665-682
- Xu M, Ma H, Zeng L, Cheng Y, Lu G, Xu J, Zhang X, Zou X** (2015) The effect of waterlogging on yield and seed quality at the early flowering stage in *Brassica napus* L. *Field Crops Research* **180**: 238-245

Young JJ, Mehta S, Israelsson M, Godoski J, Grill E, Schroeder JI (2006) CO₂ signaling in guard cells: Calcium sensitivity response modulation, a Ca²⁺-independent phase, and CO₂ insensitivity of the *gca2* mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 7506-7511