

AMANDA LIMA BATISTA

**IMPORTÂNCIA FISIOLÓGICA DOS TRANSPORTADORES MITOCONDRIAIS DE  
ADENILATOS AACs EM *Arabidopsis thaliana***

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2019

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

T

B333i  
2019  
Batista, Amanda Lima, 1994-  
Importância fisiológica dos transportadores mitocondriais  
de adenilatos AACs em *Arabidopsis thaliana* / Amanda Lima  
Batista. – Viçosa, MG, 2019.  
ix, 45 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Adriano Nunes Nesi.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 34-37.

1. *Arabidopsis thaliana* - Metabolismo. 2. Mitocôndria.  
3. Respiração. 4. Redox. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-Graduação  
em Fisiologia Vegetal. II. Título.

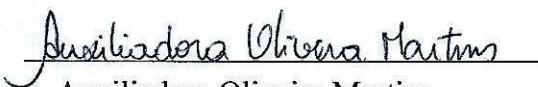
CDD 22. ed. 583.64

AMANDA LIMA BATISTA

**IMPORTÂNCIA FISIOLÓGICA DOS TRANSPORTADORES MITOCONDRIAIS DE  
ADENILATOS AACs EM *Arabidopsis thaliana***

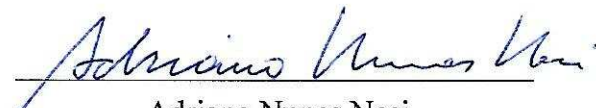
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 11 de março de 2019.

  
Auxiliadora Oliveira Martins

  
William Batista Silva

  
Wagner Luiz Araújo

  
Adriano Nunes Nesi  
(Orientador)

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Juvenal e Márcia,  
pelo amor incondicional, exemplo e apoio sempre presente*

*À minha avó Orlandi,  
pelo abraço acalentado e pela confiança depositada*

*Ao meu noivo Vinicius,  
pelo amor, força, companheirismo e ajuda preciosa*

*Às minha irmãs Vanessa e Yasmin,  
pelo carinho, parceria e afago nas fases difíceis*

## DEDICO

*“Agrada-te do SENHOR, e ele satisfará os desejos do teu coração. Entrega o teu caminho ao SENHOR, confia nele, e o mais ele fará.”*

*Salmos 37.4-5*

*“Acaso, pode uma mulher esquecer-se do filho que ainda mama, de sorte que não se compadeça do filho do seu ventre? Mas ainda que esta viesse a se esquecer dele, eu, todavia, não me esquecerei de ti. Eis que nas palmas das minhas mãos te gravei; os teus muros estão continuamente perante mim.”*

*Isaías 49.15-16*

*“Instruir-te-ei e te ensinarei o caminho que deves seguir; e, sob as minhas vistas, te darei conselho.”*

*Salmos 32.8*

## AGRADECIMENTO

Toda honra, toda glória e ações de graças sejam dadas a Deus, o criador da vida, o provedor da inteligência, o consolador nas dificuldades sempre presentes, que me instruiu, me ensinou o caminho em que andar e que me aconselhou sob suas vistas.

Sou grata aos meus pais, Juvenal e Márcia pelo amor genuíno que transborda ao ponto de senti-lo sempre, mesmo a 700 km de distância, pelo apoio em cada decisão tomada e confiança que sempre dispensaram sobre mim. À minha avó Orlandi pelo seu carinho e abraço acalentado que aperta meu coração de tantas saudades. Agradeço as minhas irmãs Vanessa e Yasmin pela força, torcida e por sempre estarem disponíveis para ouvir os desabafos frequentes. Ao meu noivo Vinicius que nunca mediu esforços para estender a mão, inclusive na realização dos experimentos desse trabalho, pelo seu companheirismo em todos os momentos e pelo encorajamento nos momentos difíceis. Aos meus familiares que sempre estão de braços abertos cheios de amor e consideração, preocupação e carinho. Ao Tiago e a Dinorah pela amizade e por ser família, com toda consideração e atenção dispensada a mim. À família PIBI e IBMV pelas orações e pelo sustento e fortalecimento da minha vida espiritual. Ao Pastor Elífio pelo cuidado e conselhos ao longo das tomadas de decisões.

Agradeço ao professor Adriano pela receptividade em me orientar desde o início e apoio ao longo da realização desse trabalho, possibilitando a oportunidade de aprender e trabalhar na ciência, confiando e acreditando nessa pesquisa. Agradeço aos meus supervisores e amigos Elias, Paula e o Jorge por toda ajuda no planejamento dos experimentos, as ideias e esforços investidos nesse trabalho, além dos desabafos e compartilhamento de experiências pessoais que foram e que são importantes pra mim, que vou levar comigo. Ao professor Wagner Araújo pelo tempo disponibilizado e contribuições feitas no trabalho. Aos outros membros do laboratório Unidade de Crescimento de Plantas que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, em especial a Carol, Danielle Brito, Dora, Helen, Marcelo e Roberto, que participaram na companhia de madrugadas, disponibilizaram materiais utilizados, auxílio na obtenção de resultados e conversas e conselhos preciosos dados. Aos membros da banca, professor Adriano e Wagner, pós-doutorandos Dora e William por aceitarem o convite e aos outros professores do curso por todas as sugestões propostas e ensinamentos durante esse período.

Agradeço a Universidade Federal de Viçosa (UFV), em especial ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal por fornecer todas as condições necessárias para o desenvolvimento dessa dissertação e na aquisição de conhecimentos científicos preciosos com

a mais alta qualidade de ensino. Agradeço também à Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), ao *Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology*, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da pesquisa e, especialmente, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por financiar a bolsa que possibilitou a realização desse trabalho.

Obrigada a todos que se envolveram em minha vida nesse período, estando ou não envolvidos diretamente com esse trabalho, mas que de forma especial foram instrumento utilizados por Deus para que eu chegasse até aqui com as convicções que tenho hoje e que contribuíram na jornada dessa vida rumo ao amadurecimento.

*Que a paz de Cristo seja o juiz em seu coração, visto que vocês foram chamados para viver em paz, como membros de um só corpo. E sejam agradecidos. Habite ricamente em vocês a palavra de Cristo; ensinem e aconselhem-se uns aos outros com toda a sabedoria e cantem salmos, hinos e cânticos espirituais com gratidão a Deus em seu coração. Tudo o que fizerem, seja em palavra seja em ação, façam-no em nome do Senhor Jesus, dando por meio dele graças a Deus Pai.*

*Colossenses 3:15-17*

*Porque se um cair, o outro levanta o seu companheiro; mas ai do que estiver só; pois, caindo, não haverá outro que o levante.*

*Eclesiastes 4:10*

*E sabemos que todas as coisas contribuem juntamente para o bem daqueles que amam a Deus, daqueles que são chamados segundo o seu propósito.*

*Romanos 8:28*

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	viii
1 - INTRODUÇÃO .....	1
2 - MATERIAL E MÉTODOS .....	5
2.1 - Material vegetal .....	5
2.2 - Condições de crescimento .....	5
2.3- Construção do alinhamento de sequências de aminoácidos .....	6
2.4 - Análises de expressão gênica .....	6
2.5 - Análises de tecidos autotróficos .....	7
2.6 - Parâmetros biométricos .....	7
2.7 - Determinação de metabólitos .....	7
2.8 - Experimento de luz e escuro contínuo.....	8
2.9 - Análises de tecidos heterotróficos .....	9
2.10 - Análises estatísticas .....	9
3 - RESULTADOS.....	10
3.1 - Padrão diferencial de expressão entre órgãos e estágios do desenvolvimento... 10	
3.2 - Isolamento de mutantes com inserção de T-DNA nos genes AACs..... 11	
3.3 - Parâmetros de crescimento e trocas gasosas..... 12	
3.4 - Avaliação do metabolismo ao longo do dia .....	14
3.5 - Avaliação da condição redox das plantas .....	20
3.6 – Avaliação do metabolismo em condição de luz e escuro contínuos..... 21	
3.7 - Análises em tecidos heterotróficos .....	24
4 - DISCUSSÃO.....	27
5 – CONCLUSÕES .....	33
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
7 - FIGURAS E TABELAS SUPLEMENTARES .....	38

## RESUMO

BATISTA, Amanda Lima, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2019. **Importância fisiológica dos Transportadores Mitocondriais de Adenilatos AACs em *Arabidopsis thaliana*.** Orientador: Adriano Nunes Nesi.

A mitocôndria é a organela responsável pela maior parte do fornecimento do ATP necessário para os processos metabólicos de manutenção do crescimento e respostas a vários estresses. O transporte de adenilatos (AMP, ADP e ATP) através da membrana mitocondrial interna é mediado por proteínas carreadoras especializadas, dentre as quais se encontram os carreadores do tipo antiporte ADP/ATP (AAC), que exportam o ATP para o citosol e, simultaneamente, importam o ADP para a matriz mitocondrial. Em *Arabidopsis thaliana*, são encontradas as isoformas *AAC1*, *AAC2* e *AAC3*, cujos papéis fisiológicos ainda permanecem desconhecidos. Neste trabalho, avaliou-se em *Arabidopsis thaliana* o papel dos transportadores mitocondriais de ADP/ATP, denominados *AtAAC1*, *AtAAC2* e *AtAAC3*. Para tal, foram utilizadas linhagens mutantes homozigotas com baixa expressão obtidas por inserção do T-DNA. Estas plantas foram caracterizadas a nível fisiológico e bioquímico. A análise do padrão de expressão dos genes AACs em plantas selvagens em condições ideais de cultivo demonstrou que de fato eles provavelmente desempenham papéis fisiológicos distintos em função do tecido e estágio do desenvolvimento. O gene *AAC1* se apresentou como a isoforma mais abundante, independente do tecido e estágio do desenvolvimento. O *AAC2* e o *AAC3* tiveram expressão mais relevante em tecidos relacionados à fase reprodutiva, tais como grãos de pólen, flores e siliques. Análise da expressão demonstrou que, na ausência do gene *AAC2*, ocorre regulação positiva dos demais transportadores de adenilatos da célula. Os mutantes para os genes *AAC1*, *AAC2* e *AAC3* exibiram maiores taxas de respiração noturna em relação a plantas WT sem apresentarem alterações na assimilação líquida de carbono e no crescimento. Adicionalmente, a quantificação metabólica nas plantas mutantes das três isoformas apontou tendência de maior acúmulo nos teores de aminoácidos, proteínas, glicose, frutose, sacarose e amido ao longo do período luminoso e alto consumo dos mesmos durante o período noturno. Também foram observadas maiores razões de poder redutor  $[NAD(P)H/NAD(P)^+]$  em mutantes para o gene *AAC1*, *AAC2* e *AAC3* comparado ao WT. Tomados em conjunto, os resultados sugerem que, esses transportadores ADP/ATP estão envolvidos principalmente no metabolismo do processo respiratório, balanço redox e concentrações de metabólitos nitrogenados e carbonados. Assim, pode-se sugerir que a dinâmica distribuição das moléculas de adenilato, promovida por estes transportadores, tenha

papeis relevantes na sincronia entre o metabolismo diurno e noturno em plantas, contribuindo assim para a manutenção do *steady-state* celular, por mecanismos que precisam ser investigados. Para tal, é necessário, aprofundar a compreensão do papel destes transportadores nos tecidos vegetais e condições adversas bem como o papel de enzimas chave que atuam no processo.

## ABSTRACT

BATISTA, Amanda Lima, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2019. **Physiological significance of Mitochondrial Adenylate Carriers AACs in *Arabidopsis thaliana***. Advisor: Adriano Nunes Nesi.

Mitochondria is the organelle responsible for most of the ATP supply needed for the metabolic processes of maintaining growth and responding to various stresses. The transport of adenylates (AMP, ADP and ATP) through the internal mitochondrial membrane is mediated by specialized carrier proteins, among which are carriers ADP / ATP antiport carrier (AAC), which export the ATP to the cytosol and simultaneously , import the ADP into the mitochondrial matrix. In *Arabidopsis thaliana*, the isoforms *AAC1*, *AAC2* and *AAC3* are found, whose physiological roles remain unknown. In this work, the role of ADP / ATP mitochondrial transporters, called *AtAAC1*, *AtAAC2* and *AtAAC3*, was evaluated in *Arabidopsis thaliana*. For this, homozygous mutant lines with low expression obtained by insertion of the T-DNA were used. These plants were characterized at the physiological and biochemical level. Analysis of the expression pattern of AAC genes in wild plants under optimal culture conditions has shown that in fact they probably play distinct physiological roles depending on the tissue and stage of development. The *AAC1* gene presented as the most abundant isoform, independent of tissue and stage of development. *AAC2* and *AAC3* had more relevant expression in tissues related to the reproductive phase, such as pollen grains, flowers and silica. Analysis of the expression demonstrated that, in the absence of the *AAC2* gene, positive regulation of the other adenylate transporters of the cell occurs. Mutants for the *AAC1*, *AAC2* and *AAC3* genes exhibited higher rates of nocturnal respiration over WT plants without showing changes in net carbon uptake and growth. In addition, metabolic quantification in mutant plants of the three isoforms indicated a tendency of greater accumulation in the amino acid, protein, glucose, fructose, sucrose and starch contents throughout the light period and high consumption during the night period. Reducing power ratios  $[NAD(P)H/NAD(P)^+]$  were also observed in mutants for the *AAC1*, *AAC2* and *AAC3* gene compared to WT. Taken together, the results suggest that these ADP / ATP transporters are mainly involved in respiratory process metabolism, redox balance and concentrations of nitrogenous and carbonate metabolites. Thus, it may be suggested that the dynamic distribution of the adenylate molecules, promoted by these transporters, has relevant roles in the synchrony between diurnal and nocturnal metabolism in plants, thus contributing to the maintenance of cell steady state, by mechanisms that need to be investigated. To this end, it is

necessary to deepen the comprehension of the role of these carriers in plant tissues and adverse conditions as well as the role of key enzymes that act in the process.

## 1 - INTRODUÇÃO

As mitocôndrias são organelas com papel fundamental no processo respiratório e suprimento de energia celular. Além disso, contribui para o fornecimento de precursores metabólicos para inúmeros processos essenciais de biossíntese e fixação de nitrogênio, bem como participação indispensável na fotorrespiração em plantas C<sub>3</sub> e no equilíbrio do status redox celular (Sweetlove et al., 2007; O'Leary et al., 2018). Em função da natureza hidrofóbica das membranas mitocondriais, proteínas de transporte especializadas são necessárias para mediar a passagem de metabólitos através da membrana interna que delimita a organela (Palmieri et al., 2008).

A família de carreadores mitocondriais (MCF) é um conjunto de proteínas que desempenham a função de mediar o transporte de metabólitos através das membrana fosfolipídicas. Elas são amplamente estudadas e caracterizadas como as principais proteínas de membrana que catalisam o transporte específico de vários substratos em plantas (Picault et al., 2004; Haferkamp and Schmitz-Esser, 2012; Lee and Millar, 2016). Proteínas MCFs estão presentes em todas as células eucarióticas, abrangendo 35 genes identificados em *Saccharomyces cerevisiae*, cerca de 50 genes em *Homo sapiens* e 58 genes em *Arabidopsis thaliana* (Picault et al., 2004; Palmieri et al., 2011). Todos os membros da família de transportadores mitocondriais MCF contêm seis hélices a transmembrana e cinco segmentos hidrofílicos que podem ser divididos em três domínios. Cada domínio consiste em duas  $\alpha$ -hélices transmembrana separadas por um *loop* extramembranar hidrofílico extenso. Os três domínios estão ligados por pequenos segmentos hidrofílicos (Millar and Heazlewood, 2003; Picault et al., 2004).

Embora as proteínas MCF estejam localizadas principalmente na membrana mitocondrial interna, membros do grupo também ocorrem em plastídios, peroxissomos e retículo endoplasmático desempenhando papel tão importante quanto às proteínas mitocondriais (Palmieri et al., 2008; Palmieri et al., 2011). Um exemplo de MCF extra-mitocondrial é o transportador de adenilatos localizado na membrana do retículo endoplasmático em *A. thaliana* (ER-ANT1), caracterizado como essencial para o crescimento, acúmulo de lipídios, proteínas relacionados ao ER e importante no metabolismo fotorrespiratório (Leroch et al., 2008; Hoffmann et al., 2013).

Dentre os diversos substratos transportados pelas MCFs, os adenilatos (AMP, ADP e ATP) são metabólitos demandados em diferentes organelas e, portanto, precisam ser

distribuídos entre os compartimentos celulares para cumprirem suas múltiplas funções biológicas. Tais compostos estão envolvidos em processos metabólicos fundamentais, compreendendo síntese de ácidos nucleicos, atividade enzimática atuando como cofatores (Missihoun et al., 2018), transdução de sinais intra e extracelulares (Cao et al., 2014; Pétriacq et al., 2016) e fornecimento de energia para a célula (Geigenberger et al., 2010).

A adenosina trifosfato (ATP) é a principal molécula energética utilizada no metabolismo de todos os seres vivos. Essa energia metabólica, grandemente fornecida pela quebra das ligações fosfoéster do ATP, é demandada para manter os processos metabólicos de manutenção do crescimento e respostas a vários estresses (Geigenberger et al., 2010; Fonseca-pereira et al., 2018). Os principais locais de síntese de ATP em células vegetais são no cloroplasto durante o dia, via etapa fotoquímica do processo fotossintético e, principalmente, via fosforilação oxidativa mitocondrial através da atividade da ATP Sintase, que converte ADP e fosfato inorgânico (Pi) em ATP na matriz mitocondrial, com relevância maior durante a noite (Fernie et al., 2004; O'Leary et al., 2018).

Para a partição eficiente da energia no interior da célula entre diversos processos metabólicos, proteínas transportadoras específicas catalisam o transporte destes compostos através da membrana interna da mitocôndria, fazendo a conexão entre a região de produção de energia e o citosol (Geigenberger et al., 2010; Haferkamp; Schmitz-Esser, 2012; Hoffmann et al., 2013; Fonseca-Pereira et al., 2018). Adicionalmente, através do transporte de diversas moléculas entre os compartimentos, as proteínas de carreamento permitem a manutenção do equilíbrio entre os níveis de ATP, ADP e AMP necessário para a otimização da síntese de ATP (Roberts et al., 1997; Gout et al., 2014), bem como para a regulação metabólica em células vegetais e manutenção do *steady-state* celular ( Igamberdiev; Kleczkowski, 2009; Geigenberger; Riewe; Fernie, 2010; Fonseca-Pereira et al. 2018).

O transporte de adenilatos através da membrana mitocondrial interna é mediado por proteínas carreadoras especializadas, dentre as quais se encontram os carreadores do tipo antiporte ADP/ATP (AAC). O grupo das proteínas transportadoras AACs é altamente conservado em células eucarióticas e desempenha importante função no balanço energético entre mitocôndrias e citosol, sendo responsável pela troca do ATP produzido dentro da matriz mitocondrial pelo ADP citosólico (Gnipová et al., 2015). Esses transportadores possuem estrutura e função altamente relacionadas aos seus ortólogos de leveduras e animais (Fontanesi et al., 2004; Haferkamp; Schmitz-Esser, 2012).

Em *Saccharomyces cerevisiae*, estão presentes os genes *AAC1-3*, sendo que somente a disfunção na expressão de *AAC2* resulta em alteração no crescimento quando as linhagens mutantes são submetidas a condições de fontes de carbono não-fermentáveis (Drgoň et al., 1992). Em *Homo sapiens*, mutações associadas à principal isoformas AAC, o gene *ANT1*, desencadearam desordens mitocondriais caracterizadas por deleções do DNA mitocondrial. Além disso, geraram miopatia mitocondrial devido a estagnação da ATP Sintase, causada pelo esgotamento do ADP da matriz mitocondrial, posteriormente resultando em aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (Palmieri et al., 2005; Echaniz-Laguna et al., 2012). Acarretaram também em anomalias na atividade da DNA polimerase mitocondrial e dobramento incorreto de proteínas (Fontanesi et al., 2004; Dallabona et al., 2017). Em *Trypanosoma brucei*, em baixa expressão do gene *AAC*, foi constatado que outra proteína pudesse estar compensando sua atividade, sendo as proteínas APCs fortes candidatas a transportadores alternativos (Stael et al., 2011; Peña-Díaz et al., 2012).

Em *A. thaliana*, o transporte de adenilatos através da membrana mitocondrial interna é realizada por três grupos de proteínas: (i) os APCs 1-3 (*Adenine nucleotide/Phosphate Carriers 1-3*) que importam nucleotídeos de adenina para a matriz mitocondrial e exportam Pi para o citosol (Lorenz et al., 2015); (ii) o ADNT1 (*Adenine Nucleotide Transporter1*) que catalisa a exportação de ATP para o citosol e importação de AMP para a matriz mitocondrial (Palmieri et al., 2008); e os AACs 1-3 (*ADP/ATP Carrier 1-3*) que catalisam a importação de ADP em troca de ATP (Palmieri et al., 2011; Fonseca-pereira et al., 2018).

A maior parte dos transportadores putativos em plantas parece ser expressa em baixos níveis de acordo com Picault et al. (2004) que considera o número de ESTs (do inglês: *Expressed Sequence Tag*) como estimativas brutas da abundância de transcritos. Dos 58 transportadores MCF, apenas 11 apresentam pelo menos 10 ESTs. Três desses são proteínas transportadoras de adenilatos, ADNT1 (At4g01100), AAC1 (At3g8580) e AAC2 (At5g13490), sendo que duas delas são pertencentes ao grupo dos AACs, com o AAC1 sendo o transportador com maior número de ESTs (Picault et al., 2004). Mesmo sendo os transportadores mais abundantes de acordo com nível de expressão, até então somente o ADNT1 foi caracterizado funcionalmente, o qual demonstra ter importância no crescimento de raízes e no processo respiratório (Palmieri et al., 2008).

Assim, mesmo sendo as mais expressas do grupo, poucos são os trabalhos que investigam a razão biológica dos organismos eucarióticos possuírem repetidas isoformas para

as proteínas AACs, sugerindo semelhanças e possíveis redundâncias de funções bioquímicas entre elas. Outra questão pertinente a ser investigada é se a expressão dessas isoformas é específica em determinados tecidos ou fases do desenvolvimento da planta ou ainda sob exposição a determinadas condições ambientais.

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo caracterizar o papel fisiológico dos transportadores mitocondriais de adenilatos AAC1, AAC2 e AAC3 em *A. thaliana*, avaliando os padrões de expressão desses genes em diferentes tecidos e fases de desenvolvimento. Além disso, compreender como e em que nível o transporte de ADP/ATP mediado pelos transportadores AACs possui papel relevante para processos fisiológicos e metabólicos em condições normais e sob estresse em *A. thaliana*, a partir do isolamento de linhas mutantes homozigotas com baixa expressão dos genes *AAC1*, *AAC2* e *AAC3*.

## 2 - MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 - Material vegetal

Foram utilizadas nos experimentos linhagens de *A. thaliana* do tipo selvagem, ecotipo Columbia (Col-0) e plantas homocigotas com inserção de T-DNA com reduzida expressão dos três genes que codificam para transportadores mitocondriais de ADP/ATP, AAC1 (At3g8580), AAC2 (At5g13490) e AAC3 (At4g28390). Os mutantes para os genes AAC1 (*aac1*), AAC2 (*aac2*) e AAC3 (*aac3*) foram obtidos da coleção SALK\_134240C, SALK\_207505C e SAIL\_623\_DO4, respectivamente. Tais plantas mutantes homocigotas foram selecionadas por meio de reações de PCR, utilizando iniciadores que anelam especificamente em cada gene e no T-DNA (*AtAAC1: forward* 5'-CGTAACACATGGGAGAACAATAGAGAAA-3', *reverse* 5'-TAAACTAAAGTCAACAGATCCAAACGATTTTGA-3'; *AtAAC2: forward* 5'-AACTACTACTTCTCCTGTGTTTGTCCAA-3'; *reverse* 5'-GAAACTGCAAAAAAAAAATGGAGAAAAAAAAACAAAAGC-3'; *AtAAC3: forward* 5'-TTTGGGTCCATTTAGAAGAAGTCAAGAC-3'; *reverse* 5'-GTTTCGAGCAAAACAATCACTGATTCCTT-3'; T-DNA *primer* LBb1.3: 5'-ATTTTGCCGATTTTCGGAAC-3'; T-DNA *primer* LB3 *for sail line* 5'-TAGCATCTGAATTTTCATAACCAATCTCGATACAC-3') (Figura Suplementar 1A). O programa para o termociclador incluiu 40 ciclos de três etapas: (a) desnaturação a 95 °C por 45 segundos, (b) anelamento a 58 °C por 45 segundos e (c) extensão a 72 °C por um minuto e 25 segundos. O gel com as bandas referentes aos produtos de PCR pode ser visualizado na Figura Suplementar 1B .

### 2.2 - Condições de crescimento

Sementes de todos os genótipos foram superficialmente esterilizadas com álcool a 70% durante um minuto e lavadas com água Mili-Q autoclavada. Posteriormente colocadas em solução de hipoclorito a 2% e continuamente agitadas durante quinze minutos, e então lavadas novamente com água Mili-Q autoclavada. Após a esterilização, foram germinadas em meio MS (Murashige and Skoog, 1962) com metade da força iônica, suplementado com 1% (p/v) de sacarose. As placas com as sementes foram submetidas ao processo de estratificação por um período de três dias a 4 °C no escuro e, posteriormente, mantidas em câmara de crescimento à 22 ± 2 °C, umidade relativa de 60%, irradiância de 150 μmol de fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e

fotoperíodo de 8 h de luz e 16 h de escuro, durante dez dias. Posteriormente, as plântulas foram transplantadas para potes plásticos de 0.1-L de capacidade em substrato comercial (Tropstrato HT®) e mantidas nas mesmas condições por um período de cinco semanas, quando foram realizadas as avaliações fisiológicas e bioquímicas. Para as análises bioquímicas as rosetas foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a freezer -80 °C até a realização das avaliações. Para as avaliações dos tecidos heterotróficos, após a estratificação, as placas de *petri* foram mantidas em sala de crescimento a  $22 \pm 2$  °C, umidade relativa de 60%, irradiância de  $150 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e fotoperíodo de 8 h de luz e 16 h de escuro, durante dez dias e posteriormente transplantadas para substrato até a produção de sementes.

### **2.3- Construção do alinhamento de sequências de aminoácidos**

Alinhamentos múltiplos de sequências proteicas dos transportadores de adenilato foram realizados através da base de dados GenBank (NCBI-NIH, Estados Unidos). Foi utilizada a ferramenta “BLAST” (do inglês: *Basic Local Alignment Search Tool*) fornecida pelo NCBI (do inglês: *National Center for Biotechnology Information*) para comparação de similaridades entre as sequências de aminoácidos entre os genes analisados.

### **2.4 - Análises de expressão gênica**

Para a análise da expressão gênica foi utilizada a técnica de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR). Foi realizada a extração do RNA total de plântulas e folhas maduras utilizando-se o reagente TRIzol® (Invitrogen™) conforme indicações do fabricante. Em seguida o RNA total foi submetido a tratamento com DNase/RNase-free (Invitrogen™) e quantificado em espectrofotômetro a 260 nm. Aproximadamente 1  $\mu\text{g}$  de RNA isolado foram utilizados para sintetizar a fita de DNA complementar (cDNA) com o kit ImProm-II(TM) Reverse Transcription System (Promega, Brasil) e Oligo (dT)<sub>15</sub>, seguindo as recomendações descritas no mesmo. As reações de qRT-PCRs foram realizadas utilizando-se o equipamento 7300 Real Time System (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) e o *kit* de amplificação Power SYBR® Green PCR Master Mix (Life Technologies/Applied Biosystem) nas recomendações do produto. Foram utilizados *primers* dos genes que codificam proteínas transportadoras de adenilato estudada descritos na Tabela Suplementar 1, sendo usada o gene constitutivamente expresso actina (At2g37620) como controle endógeno para normalização dos valores da expressão gênica. Os primers usados foram desenhados usando o programa de código aberto QuantPrime-qPCR (Arvidsson et al., 2008) e são descritos na Tabela

Suplementar 1. Foram utilizadas quatro plantas por genótipo e as amostras foram amplificadas em duplicata com as seguintes etapas: 94 °C por 10 min, seguidos de 40 ciclos de 94 °C por 15 s, 58 °C por 15 s e 72 °C por 15 s.

## 2.5 - Análises de tecidos autotróficos

Os parâmetros de trocas gasosas foram avaliados nas plantas com cinco semanas de idade, após 30 minutos iniciado período luminoso através de um analisador de gases a infravermelho em sistema aberto (IRGA – *Infrared Gas Analyzer*), modelo LI 6400XT (LI-COR, Lincoln, NE, EUA), com fluorômetro acoplado (LI-6400-40, LI-COR Inc.) e com fluxo contínuo de ar no sistema de  $300 \mu\text{mol s}^{-1}$ . Curvas de resposta de taxa de assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  ( $A$ ) em relação a radiação fotossinteticamente ativa ( $A/RFA$ ) foram obtidas utilizando-se uma câmara foliar de  $2 \text{ cm}^2$ , temperatura de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , concentração ambiente de  $\text{CO}_2$  ( $C_a$ ) dentro da câmara de  $400 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  e variações da  $RFA$  na sequência: 1000, 1200, 1000, 800, 600, 400, 300, 150, 50, 25, 10 e  $0 \mu\text{mol fôtons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . As variáveis derivadas das curvas  $A/RFA$  foram estimadas a partir de ajustes da curva de resposta à luz.

As taxas de respiração foram determinadas durante o período de escuro, após o período de 30 minutos aclimação da planta a condição. Para essas avaliações foram avaliadas dez plantas por genótipo.

## 2.6 - Parâmetros biométricos

Plantas crescidas nas condições mencionadas no item 3.2 foram coletadas com cinco semanas de idade para avaliação dos parâmetros de crescimento, sendo eles a massa seca da roseta (MSR), massa seca do sistema radicular (MSSR), razão raiz/parte aérea (RPA), número de folhas (NF), área foliar total (AFT), área foliar específica (AFE), área foliar da roseta (AFR) e área foliar específica da roseta (AFER). A AFT e AFR foi determinada pela digitalização de imagem, onde a imagem do material vegetal foi digitalizada com auxílio de um scanner (*HP Scanjet G2410 1200X1200*) e as imagens obtidas foram processadas a partir do software imageJ. A AFE e AFER foram obtidas pela fórmula:  $\text{AFE(ou AFER)} = \text{AFT(ou AFR)} / \text{MSR}$ .

## 2.7 - Determinação de metabólitos

Cinco rosetas inteiras de cada linhagem foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido às 0h, 4h e 8h, correspondendo ao início, meio e fim do período

luminoso, e às 16h e 0h que representam o meio e final do período de escuro e armazenadas a -80 °C até as análises. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas e alíquotas de aproximadamente 20 mg de matéria fresca foram submetidas à extração metanólica conforme descrito por Lisec et al. (2006). Utilizando-se um leitor de microplacas (OptiMax Tunable Microplate Reader) foi quantificado na fração solúvel os teores de clorofilas, nitrato (Sulpice et al., 2009), glicose, frutose e sacarose (Fernie et al., 2001), aminoácidos solúveis totais (Sienkiewicz-porzucek et al., 2010) e ácidos orgânicos como malato e fumarato (Nunes-Nesi et al., 2007). Já na fração insolúvel foram determinados os teores de amido (Fernie et al., 2001) e proteína (Bradford, 1976). A taxa de síntese de sacarose e amido foram calculadas pela diferença líquida do conteúdo do composto no final da noite (0h) e no final do dia (8h) em razão do tempo (em horas) desse período. A taxa de degradação foi calculada a partir da diferença líquida no conteúdo do composto no final do dia (8h) e no final da noite (0h) em razão do tempo (em horas) desse período.

Para quantificação de nucleotídeos de piridina foram realizadas alíquotas de aproximadamente 20 mg de amostras foliares foram coletadas no meio do período de luz para quantificação dos nucleotídeos  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADH}$ ,  $\text{NADP}^+$  e  $\text{NADPH}$  de acordo com o protocolo descrito por (Gibon et al., 1997). Foram utilizadas cinco plantas por genótipo em todas as análises.

## **2.8 - Experimento de luz e escuro contínuo**

Para este experimento foi utilizado o procedimento detalhado no item 3.2, com plantas WT, *aac1*, *aac2* e *aac3* com cinco semanas a partir da germinação. Para o controle do experimento, rosetas de cinco plantas de cada genótipo foram coletadas no meio do período luminoso (4h). Depois, algumas plantas foram mantidas a luz contínua à irradiância de 150  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e outras mantidas a pleno escuro, na mesma câmara de crescimento. Para o experimento de luz contínua, rosetas de cinco plantas diferentes foram coletadas em intervalos de 28 e 52 horas após a exposição nessa condição. No escuro, cinco rosetas diferentes foram coletadas após quatro e oito dias após submissão da condição. Quanto a coleta dos materiais, após terem sido coletados foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C até as análises bioquímicas.

## 2.9 - Análises de tecidos heterotróficos

A viabilidade do grão de pólen foi avaliada pela metodologia proposta por, Lorenzon e Almeida (1996), tendo comutado o comprimento do tubo polínico a partir da digitalização de imagem e auxílio do *software* ImageJ. Foi computado comprimento das síliquas produzidas por cada um dos genótipos, bem como o número, comprimento e largura de sementes por síliquas através do auxílio do *software* ImageJ. Também foi avaliada a massa de mil sementes. Foram utilizadas seis repetições biológicas para a realização dessa caracterização.

Sementes das plantas *aac1*, *aac2*, *aac3* e *WT* foram esterilizadas e plaqueadas para germinar em meio MS (Murashige and Skoog, 1962) com metade da força iônica, suplementado com 1% de sacarose e mantidas sob mesmas condições descritas no item 3.2 por 72 horas. Posteriormente, foram avaliadas a percentagem de germinação, o índice de velocidade de germinação (IVG), o tempo médio de germinação (TMG) e velocidade média de germinação (VMG) utilizando oito repetições com 50 sementes para cada um dos genótipos. As variáveis foram calculadas segundo Bruginski et al. (2009) com as seguintes fórmulas:

- Germinação: calculada pela fórmula  $\text{Germinação} = (N/100) \times 100$ , em que: N = número de sementes germinadas ao final do teste. Unidade: %.

- IVG: calculado pela fórmula  $\text{IVG} = \sum (n_i/t_i)$ , em que:  $n_i$  = número de sementes que germinaram no tempo 'i';  $t_i$  = tempo após instalação do teste. Unidade: adimensional.

- TMG: calculado pela fórmula  $\text{TMG} = (\sum n_i t_i) / \sum n_i$ , em que:  $n_i$  = número de sementes germinadas por dia;  $t_i$  = tempo de incubação. Unidade: dias.

- VMG: calculada pela fórmula  $\text{VMG} = 1/t$  em que: t = tempo médio de germinação. Unidade:  $\text{dias}^{-1}$ .

Para analisar o crescimento radicular, foram germinadas de seis a oito sementes de cada um dos genótipos em placas verticais mantidas em mesmas condições já descritas no presente item. O comprimento das raízes foi calculado a cada dois dias num período total de dez dias, iniciando após o período de estratificação e exposição à luz, baseado em Palmieri (2008). Foram utilizadas 7 placas como repetição para cada genótipo.

## 2.10 - Análises estatísticas

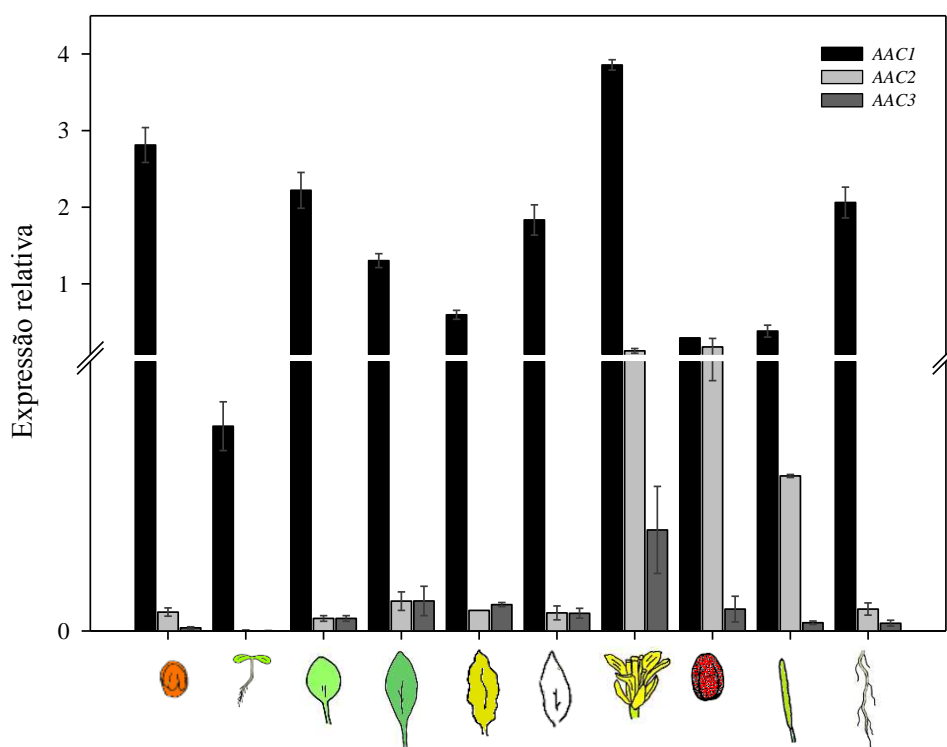
Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância, com repetições referentes a cada análises considerando o delineamento inteiramente casualizado. Os resultados entre os genótipos foram comparados por teste *t* de Student utilizando o algoritmo

contido no *software* Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Seattle, WA, EUA), sendo considerados significantes os valores com  $P < 0,05$ .

### 3 - RESULTADOS

#### 3.1 - Padrão diferencial de expressão entre órgãos e estágios do desenvolvimento

O genoma de *A. thaliana* codifica 58 proteínas carreadoras do tipo MCF, onde uma análise filogenética classificou os genes *AAC1*, *AAC2* e *AAC3* como membros do MCF, agrupando-os no mesmo táxon que os genes *ER-ANT1* e *PM-ANT1* (localizados no retículo endoplasmático e membrana plasmática, respectivamente) (Picault et al., 2004). Entre os transportadores AACs, o *AAC1* apresenta maior similaridade entre as sequências de aminoácidos com *AAC2* do que com *AAC3*, com 86,53% e 74,94% de similaridade, respectivamente. Entre o *AAC2* e *AAC3* são apresentados 74,62% de similaridade na sequência de aminoácidos (Tabela Suplementar 2).



**Figura 1.** Padrão de expressão dos transportadores de adenilatos *AAC1*, *AAC2* e *AAC3* em plantas de *A. thaliana* do tipo selvagem (Col 0) em diferentes órgãos e estágios de desenvolvimento. Os órgãos e estágios de desenvolvimento foram respectivamente sementes com dois dias de idade depois de embebidas, plântula com quatro dias após a germinação, folha jovem (15 dias), folha madura (um mês), folha senescente (dois meses), nervura (um mês), flor (dois meses), pólen maduro (dois meses), síliqua (dois meses) e raiz (um mês). Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de três amostras independentes

Para avaliar o padrão de expressão dos genes *AAC1*, *AAC2* e *AAC3* em *A. thaliana*, plantas WT cultivadas em condições ideais de crescimento tiveram seus níveis de transcrição analisados em vários órgãos e estágios de desenvolvimento por meio da técnica de RT-PCR quantitativo, utilizando a expressão do gene da actina endógena como referência interna. Nos diferentes órgãos analisados, o gene *AAC1* foi distintamente o mais expresso em todas as situações, independente do tipo de órgão e do estágio de desenvolvimento (Figura 1).. Verificou-se que os genes *AAC2* e *AAC3* são expressos em níveis relativamente mais baixos em tecidos vegetativos, porém são regulados positivamente na fase reprodutiva nos tecidos florais, siliquas e grão de pólen (Figura 1).

Os padrões de expressão verificados estão de acordo com os resultados observados em trabalhos anteriores, onde o perfil de expressão gênica por microarranjo disponíveis publicamente (Figura suplementares 2, 3 e 4) (Winter et al., 2007).

### **3.2 - Isolamento de mutantes com inserção de T-DNA nos genes AACs.**

Com o objetivo de avaliar o papel fisiológico dos transportadores AACs, foram selecionadas linhagens homozigotas de *A. thaliana* com única inserção de T-DNA para os genes *AAC1*, *AAC2* e *AAC3*. As linhagens isoladas para os genes *AAC1*, *AAC2* e *AAC3* foram obtidos da coleção SALK\_134240C, SALK\_207505C e SAIL\_623\_DO4, com inserção de T-DNA na região promotora, no íntron e no éxons, respectivamente (Figura 2A). Nas linhagens mutantes genotipadas e isoladas para o gene *AAC1* (*aac1*), *AAC2* (*aac2*) e *AAC3* (*aac3*) foram encontrados apenas 47%, 0,15% e 0,15%, respectivamente, da expressão observada no genótipo selvagem (WT), respectivamente (Figura 2B).

Selecionadas as linhagens mutantes homozigotas, foi verificado o nível de expressão dos outros transportadores de adenilatos nos mutantes e compará-las ao status de expressão do WT. A princípio foi realizada a análise de expressão para os transportadores localizados somente na mitocôndria (Figura 2C) e, posteriormente, para os transportadores de adenilatos não-mitocondriais, localizados nos plastídios, peroxissomo e retículo endoplasmático (Figura 2D). Tanto nos transportadores localizados na mitocôndria como os das outras organelas foi possível observar variações no padrão de expressão em plantas mutantes em comparação com plantas tipo selvagem. Na linhagem *aac2*, houve aumento significativo na expressão de todos os transportadores avaliados em relação ao padrão de expressão observado nos demais genótipos. Logo, em situações de baixa expressão do transportador AAC2, verificou-se um

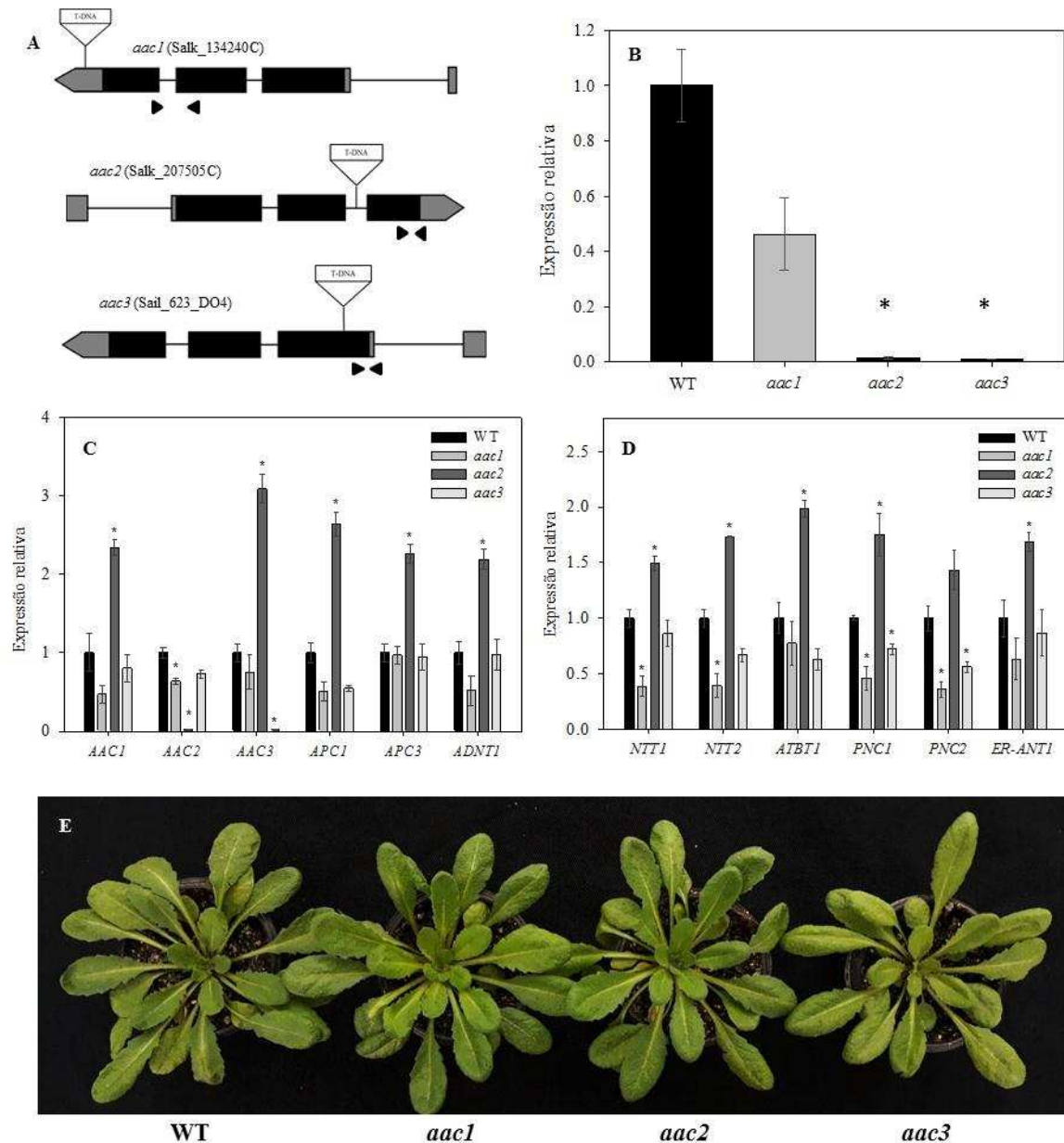
aumento no nível de expressão dos outros transportadores de adenilatos da célula, sugerindo um efeito compensatório adotado pela planta ao nível de expressão. Na linhagem *aac3* foram observadas alterações significativas no nível de expressão somente para os transportadores de adenilato localizados no peroxissomo, PNC1 e PNC2. Já na linhagem *aac1*, não houve variações significativas na expressão entre os transportadores localizados na mitocôndria. Entretanto, a maioria dos transportadores de adenilatos com localização não-mitocondrial NTT1, NTT2, PNC1 e PNC2 teve seu nível de expressão significativamente diminuída em plantas mutantes para *AAC1*.

### 3.3 - Parâmetros de crescimento e trocas gasosas

Selecionadas as linhagens mutantes, as plantas WT, *aac1*, *aac2* e *aac3* foram cultivadas e avaliadas na quinta semana de cultivo. Embora as linhagens mutantes isoladas tenham confirmada baixa expressão dos seus respectivos transportadores, elas não apresentaram fenótipo visivelmente anormal ou diferente nesta idade em comparação com o WT (Figura 1E). A análise mais detalhada dos parâmetros de crescimento confirmou que o crescimento das plantas mutantes não apresentam diferenças significativas em relação ao WT (Tabela 1).

Foi realizada avaliação de curva de resposta da fotossíntese à luz, na qual as plantas foram submetidas variação de radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de 0 a 1200  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , à 400  $\mu\text{mol}$  de  $\text{CO}_2$  sob um fluxo constante no sistema de 300  $\mu\text{mol} \text{s}^{-1}$ . Nessa avaliação não foi encontrada diferença significativa na assimilação de  $\text{CO}_2$  entre as linhagens mutantes e WT em nenhuma das irradiâncias avaliadas (Figure 3A).

As demais análises de trocas gasosas foram realizadas sob condição de 400  $\mu\text{mol}$  de  $\text{CO}_2$  com PAR de 150  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , condição na qual as plantas foram submetidas durante o seu crescimento no período das cinco semanas. Referente a  $g_s$ ,  $C_i$ ,  $C_i/C_a$ ,  $ETR$  e  $E$ , não foram encontradas diferenças significativas entre as linhagens mutantes e o tipo selvagem (Figura 3B,C,D,E,F e G). No entanto, houve aumento na taxa de respiração noturna ( $R_d$ ) para as linhagens *aac1*, *aac2* e *aac3*, em 9,06%, 13,54% e 20,28% em relação aos valores apresentados pelo WT, respectivamente (Figura 3H).



**Figura 2.** Isolamento e caracterização genética de linhagens mutantes por inserção de T-DNA para os transportadores de adenilato AAC1, AAC2 e AAC3 em *Arabidopsis thaliana*. A, representação esquemática do gene *AtAAC1* (At3g08580), *AtAAC2* (At5g13490) e *AtAAC3* (At4g28390) indicando os respectivos locais de inserção do T-DNA. As caixas representam os éxons e as setas pretas indicam as posições dos primers usados na técnica RT-PCR quantitativo para seleção das plantas mutantes. B, expressão de *AAC1*, *AAC2* e *AAC3* em folhas de *A. thaliana* do tipo selvagem (WT) e nas respectivas linhagens mutante. C, expressão dos transportadores de adenilatos mitocondriais nos genótipos avaliados no trabalho (WT, *aac1*, *aac2* e *aac3*). D, expressão dos transportadores de adenilatos não-mitocondriais nos genótipo avaliados no trabalho (WT, *aac1*, *aac2* e *aac3*). E, fenótipo das rosetas dos genótipos de *A. thaliana* com cinco semanas de idade com reduzida expressão dos transportadores de adenilato em relação ao WT. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de quatro plantas e os asteriscos indicam diferenças significativas pelo teste *t* de Student ( $P < 0,05$ ) em comparação com o WT. As plantas avaliadas possuíam cinco semanas de idade no momento da coleta. **Transportadores:** \**AAC1*: ADP/ATP carrier 1, *AAC2*: ADP/ATP

*carrier 2*, AAC3: *ADP/ATP carrier 3*, APC1: *Adenine nucleotide/Phosphate Carrier 1*, APC3: *Adenine nucleotide/Phosphate Carrier 3*, ADNT1: *Adenine Nucleotide Transporter 1*, NTT1: *nucleotide transporter 1*, NTT2: *nucleotide transporter 2*, ATBT1: *Arabidopsis Brittle 1*, PCN1: *Peroxisomal adenine nucleotide carrier 1*, PCN2: *Peroxisomal adenine nucleotide carrier 2*, ER-ANT1: *Endoplasmic Reticulum Adenylate Transporter1*.

**Tabela 1.** Parâmetros de crescimento de plantas de *A. thaliana* com baixa expressão dos genes *AAC1*, *AAC2* e *AAC3*. As plantas avaliadas possuíam cinco semanas de idade.

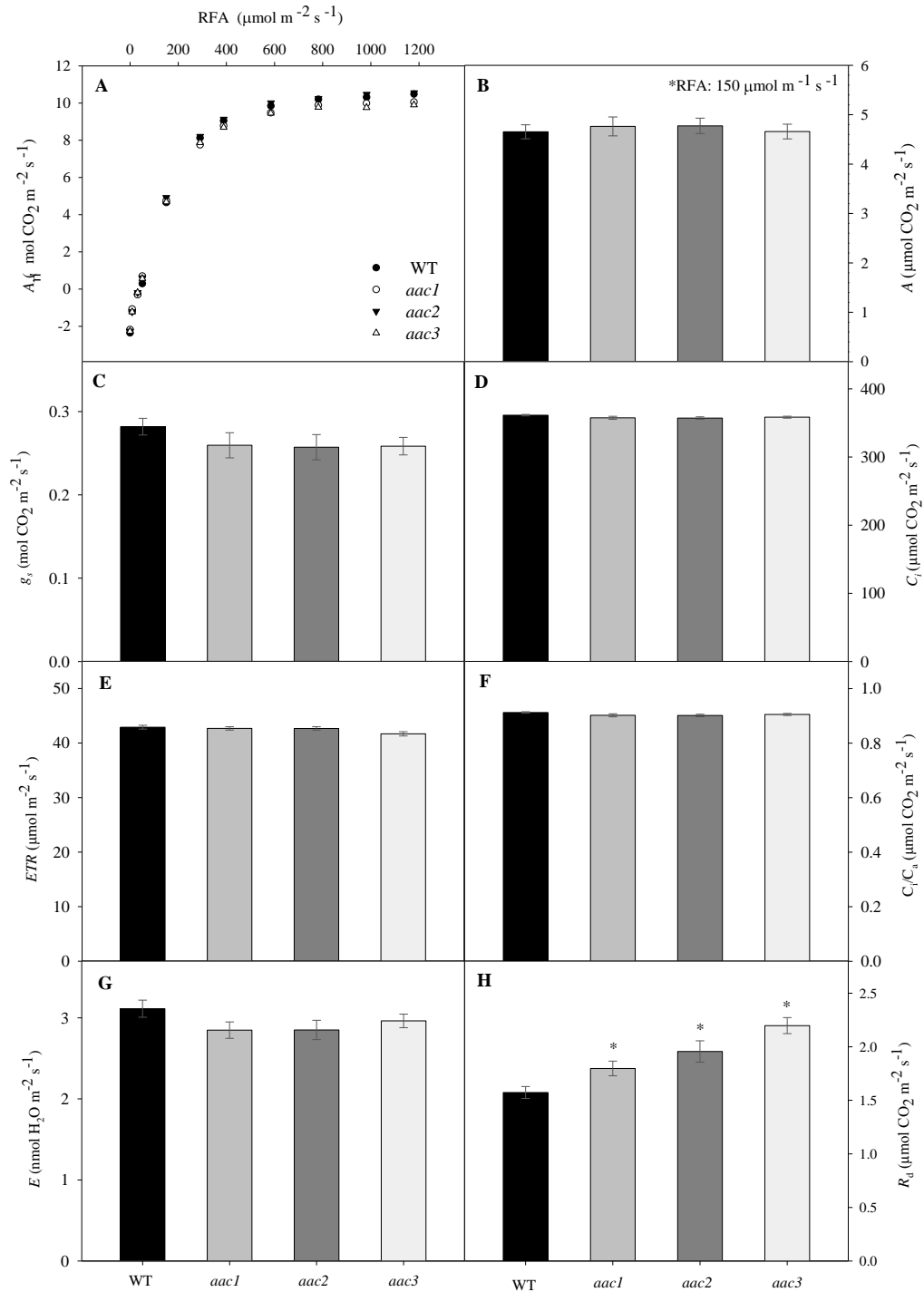
PARÂMETROS	WT	<i>aac1</i>	<i>aac2</i>	<i>aac3</i>
MSR	0,125 ± 0,006	0,135 ± 0,005	0,128 ± 0,006	0,116 ± 0,003
MSSR	0,015 ± 0,001	0,017 ± 0,001	0,017 ± 0,001	0,014 ± 0,001
RPA	0,104 ± 0,003	0,114 ± 0,003	0,120 ± 0,005	0,1105 ± 0,002
NF	30,50 ± 2,850	28,50 ± 0,544	28,00 ± 1,490	24,50 ± 0,470
AFT	58,70 ± 2,910	65,91 ± 2,360	65,00 ± 2,270	58,72 ± 1,610
AFE	46,63 ± 1,974	48,691 ± 1,627	50,14 ± 1,580	51,25 ± 0,970
AFR	55,36 ± 2,600	55,95 ± 1,710	56,37 ± 1,560	54,40 ± 1,110
AFER	43,97 ± 2,011	41,33 ± 1,306	43,90 ± 1,330	46,71 ± 0,955

Os valores representam a média ± erro padrão de seis amostras independentes. **Abreviações:** \*MSR: massa seca da roseta (g), MSSR: massa seca do sistema radicular (g), RPA: razão raiz/parte aérea, NF: número de folhas, AFT: área foliar total (cm<sup>2</sup>), AFE: área foliar específica (m<sup>2</sup> kg<sup>-1</sup>), AFR: área foliar da roseta (cm<sup>2</sup>), AFER: área foliar específica da roseta (m<sup>2</sup> kg<sup>-1</sup>).

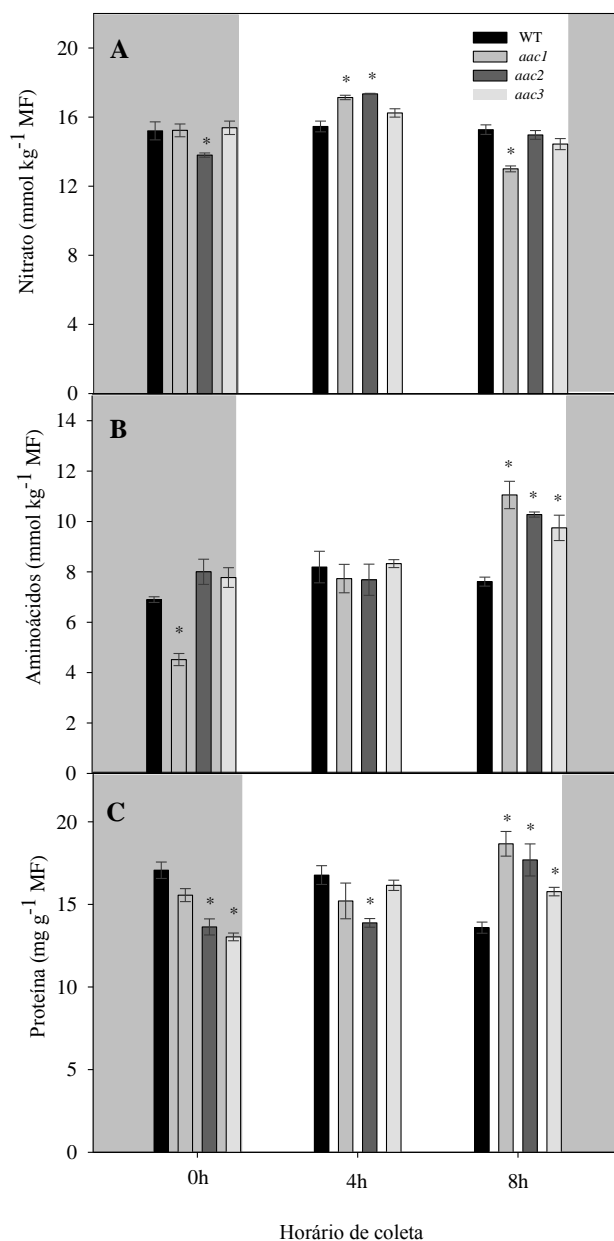
### 3.4 - Avaliação do metabolismo ao longo do dia

Para avaliar os efeitos resultantes da baixa da expressão dos transportadores AACs no metabolismo, foram quantificados pigmentos ao meio do dia (4h) e compostos associados ao metabolismo do nitrogênio (Figura 4) e do carbono (Figura 5) ao longo do dia, em condições ideais de crescimento.

Quanto aos pigmentos quantificados, maiores níveis de clorofila *a* foram encontrados em plantas *aac2* e *aac3* (Figura suplementar 5A) enquanto que a concentração de clorofila *b* tendeu a aumentar para todos os genótipos mutantes, sendo significativa apenas para *aac3* (Figura suplementar 5B). Assim, foi possível observar menores valores na razão clorofila *a/b* para os mutantes das três linhagens (Figura suplementar 5D) e tendência de aumento nos níveis totais de clorofila *a* e *b* para os três mutantes em relação ao WT.



**Figura 3.** Efeito da redução da expressão de *AAC1*, *AAC2* e *AAC3* nos parâmetros de trocas gasosas em folhas de plantas de *A. thaliana* com cinco semanas de idade. A, curva de resposta da fotossíntese líquida ( $A$ ) à intensidade de radiação fotossinteticamente ativa (RFA) em plantas submetidas a 400 ppm de  $\text{CO}_2$ . B, taxa de assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  ( $A$ ) em função da unidade de área foliar. C, condutância estomática ( $g_s$ ). D, concentração interna de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ). E, taxa de transporte de elétrons no PSII ( $ETR$ ). F, razão entre as concentrações de  $\text{CO}_2$  intercelular da folha e a do ar ( $C_i/C_a$ ). G, transpiração ( $E$ ). H, respiração no escuro ( $R_d$ ). Valores representam a média  $\pm$  erro padrão de dez plantas individuais. Asteriscos indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ), segundo o teste  $t$  de Student, em comparação com o tipo selvagem (WT).



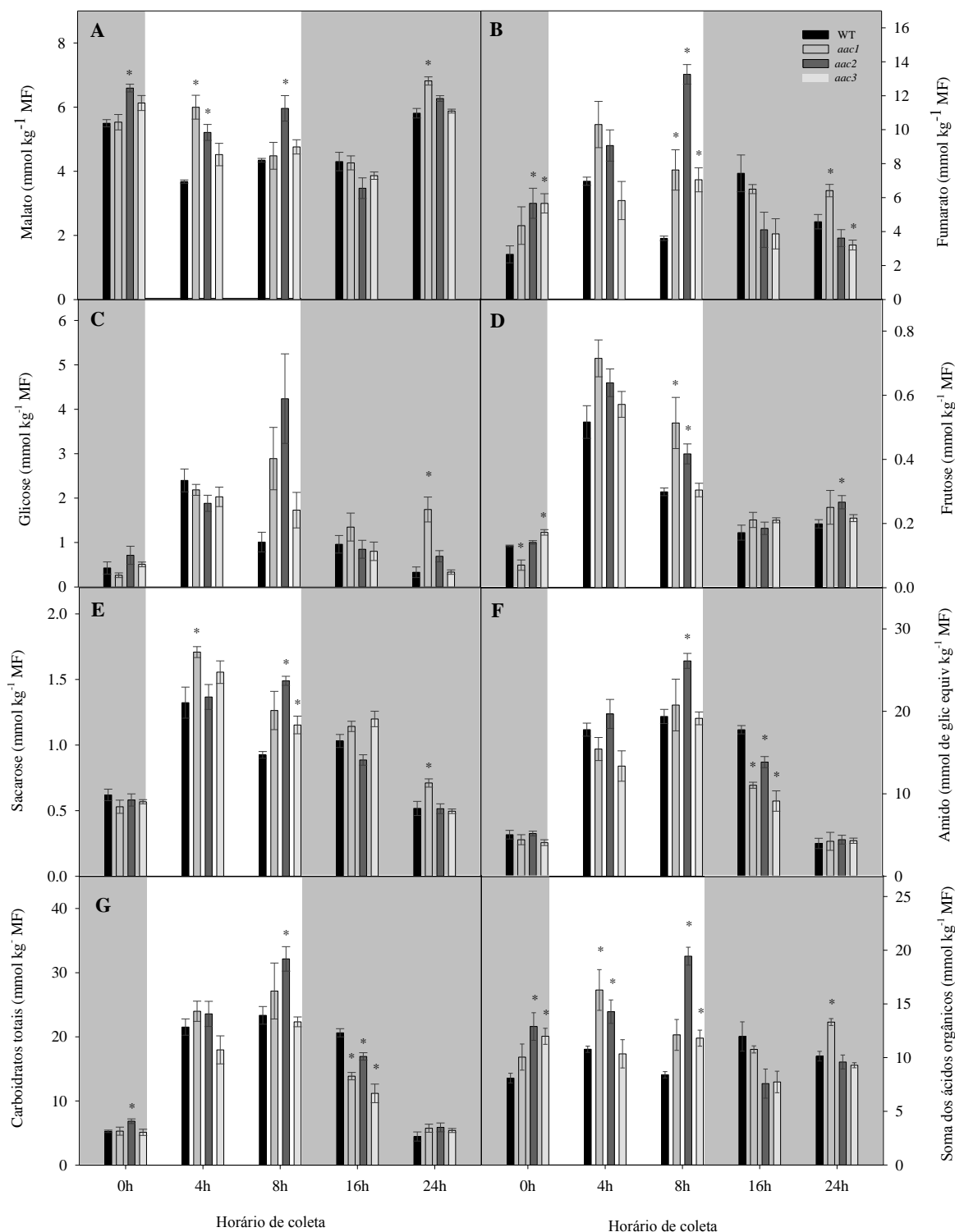
**Figura 4.** Quantificação de metabólitos em folhas de *A. thaliana* com expressão reduzida de *AAC1*, *AAC2* e *AAC3*, cinco semanas após a germinação. A, nitrato B, aminoácidos. C, proteína. Valores representam a média  $\pm$  erro padrão de cinco plantas. Asteriscos indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ), segundo o teste *t* de Student, em comparação com o tipo selvagem (WT). A área cinza do gráfico representa o período de escuro. MF: massa fresca.

Entre os outros compostos associados ao metabolismo do nitrogênio, foi possível observar que, ao meio do dia, as linhas *aac1* e *aac2* exibiram alta concentração de nitrato em relação ao WT, o qual é catabolizado até o final do dia (Figura 4A). Esse consumo de nitrato é acompanhado concomitantemente com aumento significativo nos teores de aminoácidos e

proteínas nas três linhagens mutantes em relação ao WT, resultando no acúmulo dessas moléculas no final do dia (8h) (Figura 4B e C). Esse comportamento sugere que o nitrato foi utilizado na síntese de aminoácidos e proteínas. Observando a avaliação do final da noite (0h), é possível observar teores similares e até menores desses compostos, sugerindo um alto consumo de aminoácidos e proteínas durante a noite.

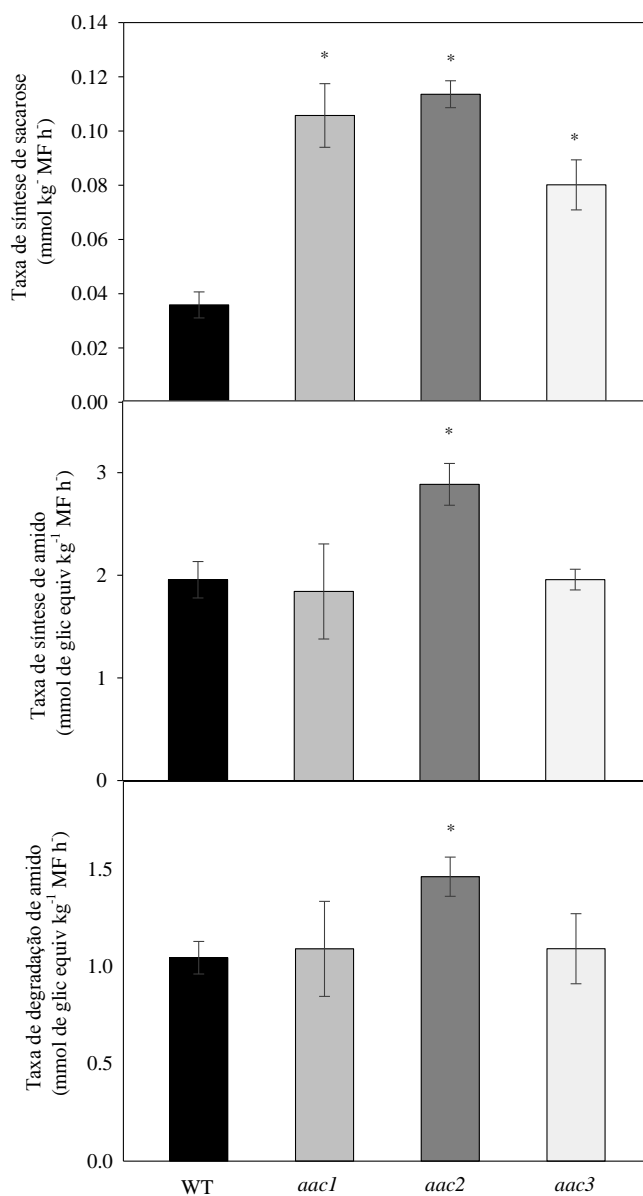
Maiores alterações observadas entre as plantas mutantes e o WT ocorreram em relação aos compostos associados ao metabolismo do carbono. Diferenças maiores na concentração de malato foram encontradas durante o período luminoso, sugerindo acúmulo de ácidos orgânicos ao longo desse período em plantas mutantes para AAC1 e AAC2 (Figura 5A). Nas concentrações de fumarato, foram observados maiores acúmulos ao final do período luminoso entre as plantas mutantes *aac1* e *aac2*, e grande consumo desse composto durante a noite, destacando maiores efeitos no genótipo *aac2* e menores efeitos em plantas *aac3* (Figura 5B). Uma visão geral da flutuação das concentrações de ácidos orgânicos, em função do período de coleta, pode ser observada na Figura 5H. Observando a soma de malato e fumarato, é possível estabelecer um padrão em que, durante o período luminoso, o mutante *aac2* principalmente, aumenta consideravelmente a concentração desses compostos, o qual é consumido rapidamente durante o período de escuro.

Quanto aos outros compostos associados ao metabolismo do carbono, foi possível observar diferenças na concentração de carboidratos não-estruturais entre as plantas mutantes e WT entre os diferentes pontos de coleta. Foi constatado aumento nos níveis de glicose, frutose, sacarose e amido ao longo do período luminoso acarretando no acúmulo dos mesmos no final do dia e rápido consumo durante a noite (Figura 5C, D, E e F). No caso do amido, somente o *aac2* apresentou acúmulos significativos durante o dia. Porém, no meio da noite (16h), os mutantes das três isoformas apresentaram menores concentrações de amido. No final da noite (24h) e no início do dia (0h) os mutantes das três isoformas apresentaram concentrações de amido similares as do selvagem, sugerindo que durante a noite os mutantes tiveram uma maior e mais rápida degradação do amido. Uma visão geral das flutuações das concentrações de carboidratos totais, em função do período de coleta, pode ser observada na Figura 5G. Observando a soma de glicose, frutose, sacarose e amido, é possível constatar um padrão onde mutante *aac2* apresenta altos teores desses carboidratos durante o período luminoso, o qual é consumido rapidamente durante o período de escuro.



**Figura 5.** Quantificação de metabólitos em folhas de *A. thaliana* com expressão reduzida de *AAC1*, *AAC2* e *AAC3*, em plantas com cinco semanas de idade. A, malato. B, fumarato. C, glicose. D, frutose. E, sacarose. F, amido. G, carboidratos totais referente à soma dos valores de glicose, frutose, sacarose e amido. H, soma de malato e fumarato. Valores representam a média  $\pm$  erro padrão de cinco plantas. Asteriscos indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ), segundo o teste *t* de Student, em comparação com o tipo selvagem (WT). A área cinza do gráfico representa o período de escuro. MF: massa fresca.

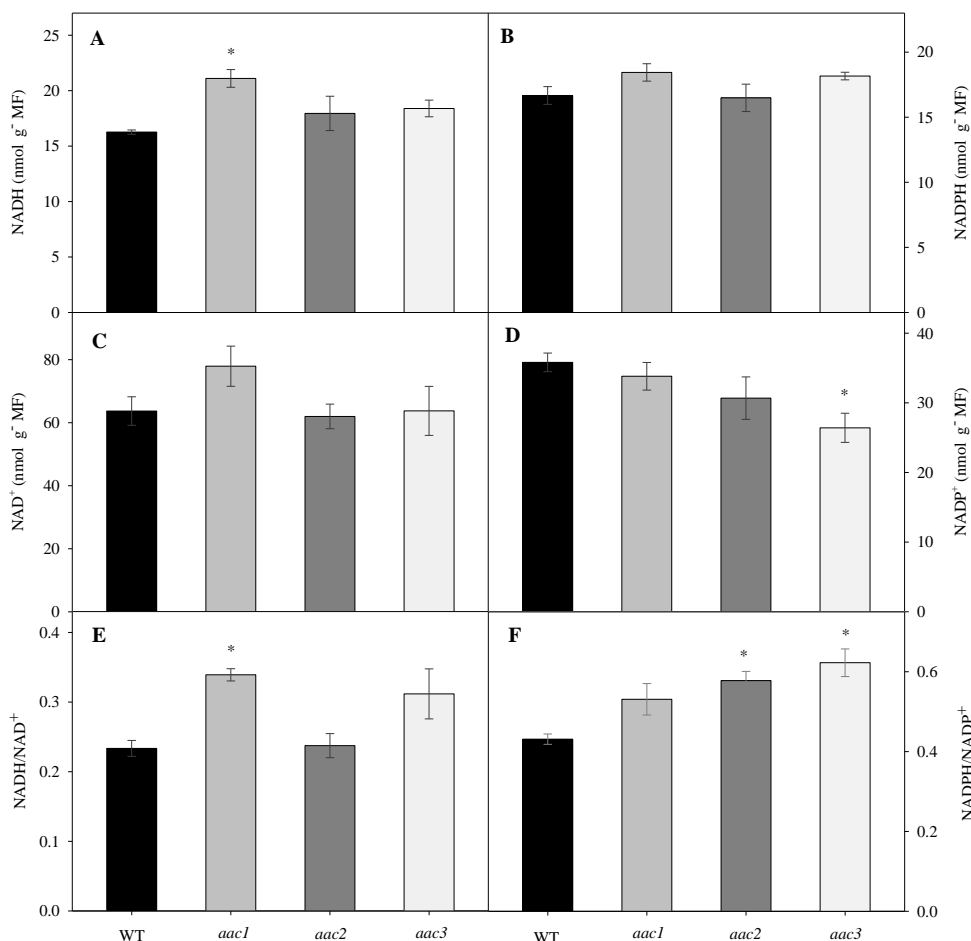
Dados os resultados da taxa de síntese de sacarose, foi possível constatar maior taxa de síntese nas três linhagens mutantes *aac1*, *aac2* e *aac3*, acrescidos em 195%, 215% e 123% em relação ao WT (Figura 6A). Já as taxas de síntese e degradação do amido apresentaram aumento significativo na linhagem *aac2* em relação ao WT, com acréscimo de 47,8% na taxa de síntese e 39,8% na degradação (Figura 6B e C).



**Figura 6-** Taxas de síntese e degradação de sacarose e amido em folhas de *A. thaliana* com expressão reduzida de *AAC1*, *AAC2* e *AAC3*, em plantas com cinco semanas de idade. A, taxa de síntese de sacarose. B, taxa de síntese de amido. C, taxa de degradação de amido. Valores representam a média  $\pm$  erro padrão de cinco plantas individuais. Asteriscos indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ), segundo o teste *t* de Student, em comparação com o tipo selvagem (WT). MF: massa fresca.

### 3.5 - Avaliação da condição redox das plantas

Sabendo da importância que o balanço entre as formas reduzidas e oxidadas dos nucleotídeos de piridina exercem no funcionamento da célula e que medidas centrais de status redox celular são as razões de  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  e  $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ , foram quantificadas as concentrações de  $\text{NADH}$ ,  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADPH}$ ,  $\text{NADP}^+$  e suas razões. A linhagem *aac1* apresentou um aumento significativo na concentração de  $\text{NADH}$  (Figura 7A) e na razão  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  em relação ao WT (Figura 7E). Com relação às concentrações de  $\text{NADPH}$  (Figura 7B) não foram observadas diferenças significativas entre as linhas mutantes e o WT. Já nas concentrações de  $\text{NADP}^+$  (Figura 7D) apresentaram uma tendência de diminuição nas linhas mutantes. Aumentos significativos na  $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$  foram observados para os mutantes *aac2* e *aac3* (Figura 7F).



**Figura 7.** Quantificação de nucleotídeos de piridina em folhas de *A. thaliana* com expressão reduzida de *AAC1*, *AAC2* e *AAC3*, em plantas com cinco semanas de idade coletadas no meio do período de luz. A,  $\text{NADH}$ . B,  $\text{NADPH}$ . C,  $\text{NAD}^+$ . D,  $\text{NADP}^+$ . E,  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ . F,  $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ . Valores representam a média  $\pm$  erro padrão de cinco plantas. Asteriscos indicam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) segundo o teste *t* de Student, em comparação com o tipo selvagem (WT). MF: massa fresca.

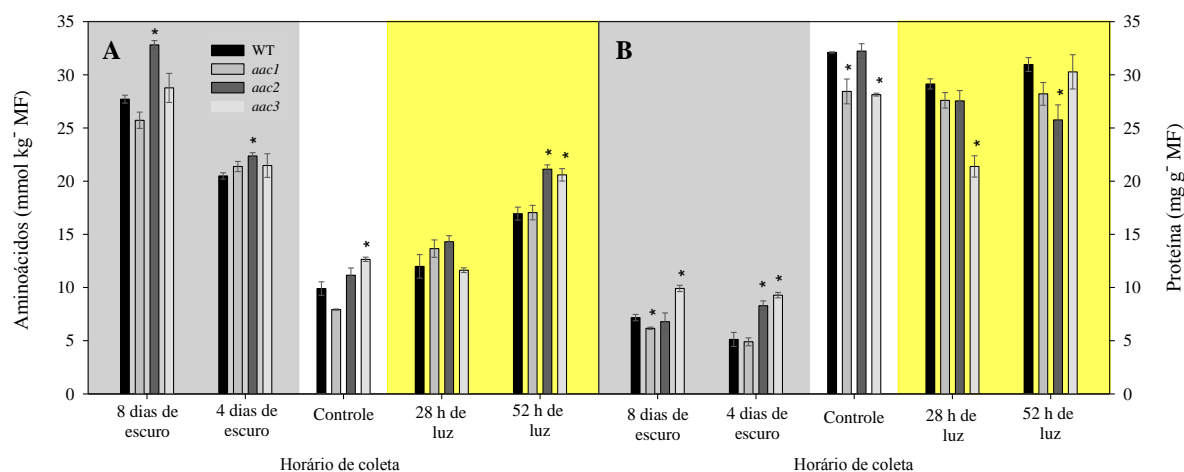
### 3.6 – Avaliação do metabolismo em condição de luz e escuro contínuos

Como observado no experimento sob condições ideais de cultivo, as plantas mutantes apresentaram um padrão na flutuação das concentrações dos compostos associados ao metabolismo do carbono, principalmente, em função do período de coleta. A fim de aprofundar o entendimento dos dados obtidos, foi proposto um experimento onde as plantas mutantes e o tipo selvagem foram submetidos a duas condições independentes, luz e escuro contínuos.

A concentração de clorofila *a* apresentou maiores valores em plantas e *aac3* (Figura suplementar 5A), enquanto que a concentração de clorofila *b* não alterou significativamente comparada ao WT (Figura suplementar 5B). De forma similar, não observou-se alterações na soma das clorofilas, nem na razão das clorofila *a* e *b* (Figura suplementar 5C e D)

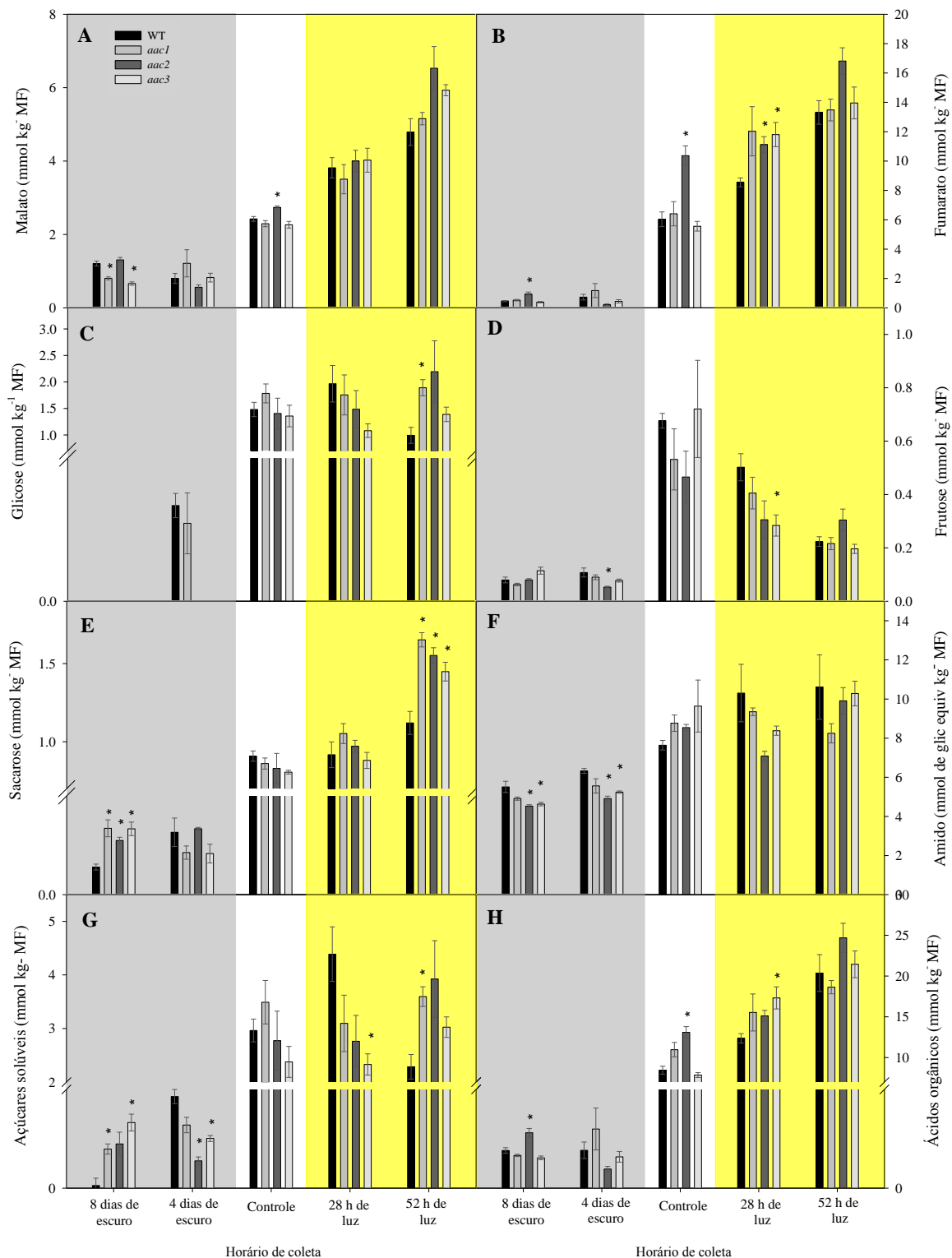
Entre os compostos associados ao metabolismo do nitrogênio, as linhagens mutantes *aac2* e *aac3* apresentaram acúmulo na concentração de aminoácidos ao longo das 52 horas de luz contínua. Em adição, foi observado aumento na concentração dos aminoácidos ao longo dos oito dias na condição de escuro, mas apenas para o mutante *aac2* (Figura 8A). Concomitantemente, os teores de proteínas sofreram maiores alterações entre mutantes e WT no período de escuro. Nessa condição, os mutantes *aac2* e *aac3* apresentaram tendência de acumular mais proteínas comparado ao tipo selvagem ao longo dos oito dias na condição imposta (Figura 8B).

As maiores alterações foram observadas entre as plantas com baixa expressão dos transportadores AACs e WT em relação aos compostos associados ao metabolismo do carbono. Quanto ao malato, ainda que a variação das concentrações não tenha sido estatisticamente diferente, é possível observar tendência de acúmulo do composto nos mutantes, principalmente *aac2* na condição de exposição à luz contínua. No escuro, é interessante observar menores concentrações do composto nos genótipos *aac1* e *aac3*, em relação ao WT (Figura 9A). Quanto ao fumarato, foram observados maiores níveis em plantas *aac2* em relação a plantas tipo selvagem no escuro (Figura 9B). Essa descrição observada de forma geral na Figura 9H, com o comportamento das flutuações da soma das concentrações de malato e fumarato.



**Figura 8.** Quantificação de metabólitos em folhas de *A. thaliana* com expressão reduzida de *AAC1*, *AAC2* e *AAC3*, em plantas com cinco semanas de idade e posteriormente expostas a condições de 28 horas de luz contínua, 52 horas de luz contínua, quatro dias de pleno escuro e oito dias de pleno escuro. As amostras foram coletadas no mesmo período do dia. A, aminoácidos. B, proteína. Valores representam a média  $\pm$  erro padrão de cinco plantas. Asteriscos indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ), segundo o teste *t* de Student, em comparação com o tipo selvagem (WT). A área branca do gráfico representa a condição controle referente à coleta realizada antes da submissão do tratamento luminoso, a amarela é referente às condições de luz contínua e a cinza é referente às condições de pleno escuro. MF: massa fresca.

Dentre os carboidratos, variações mais evidentes são vistas na quantificação de sacarose e amido. Em plena luz, as plantas mutantes das três linhagens se caracterizam por maior acúmulo de sacarose. No escuro (após oito dias), é possível visualizar que a concentração de sacarose continua elevada em plantas mutantes em relação as plantas WT (Figura 9E). Por outro lado, não foram observadas diferenças nos conteúdos de amido durante o período luminoso entre plantas mutantes e WT. Entretanto, no período escuro, plantas mutantes *aac1* e *aac3* apresentaram menores teores de amido, sugerindo uma maior degradação do amido nessas linhas comparado ao tipo selvagem (Figura 9F). Esses dados inferem que o excesso de sacarose entre os mutantes observada aos oito dias de escuro não era devido ao baixo consumo desse composto durante a noite, mas possivelmente, devido da alta degradação do amido, que disponibiliza grande quantidade de sacarose nessa condição, talvez mediante a uma alta demanda celular. Essa descrição pode ser observada de forma geral na Figura 9H, com o comportamento das flutuações da soma das concentrações da glicose, frutose, sacarose e amido.



**Figura 9.** Quantificação de metabólitos em folhas de *A. thaliana* com expressão reduzida de *AAC1*, *AAC2* e *AAC3*, em plantas com cinco semanas de idade e posteriormente expostas a condições de 28 horas de luz contínua, 52 horas de luz contínua, quatro dias de pleno escuro e oito dias de pleno escuro. As amostras foram coletadas no mesmo período do dia. A, malato. B, fumarato. C, glicose. D, frutose. E, sacarose. F, amido. G, carboidratos totais referentes a soma dos valores de glicose, frutose, sacarose e amido. H, soma dos valores de malato e fumarato. Valores representam a média  $\pm$  erro padrão de cinco plantas. Asteriscos indicam

diferença significativa ( $P < 0,05$ ), segundo o teste  $t$  de Student, em comparação com o tipo selvagem. A área branca do gráfico representa a condição controle referente à coleta realizada antes da submissão do tratamento luminoso, a amarela é referente às condições de luz contínua e a cinza é referente às condições de pleno escuro. MF: massa fresca.

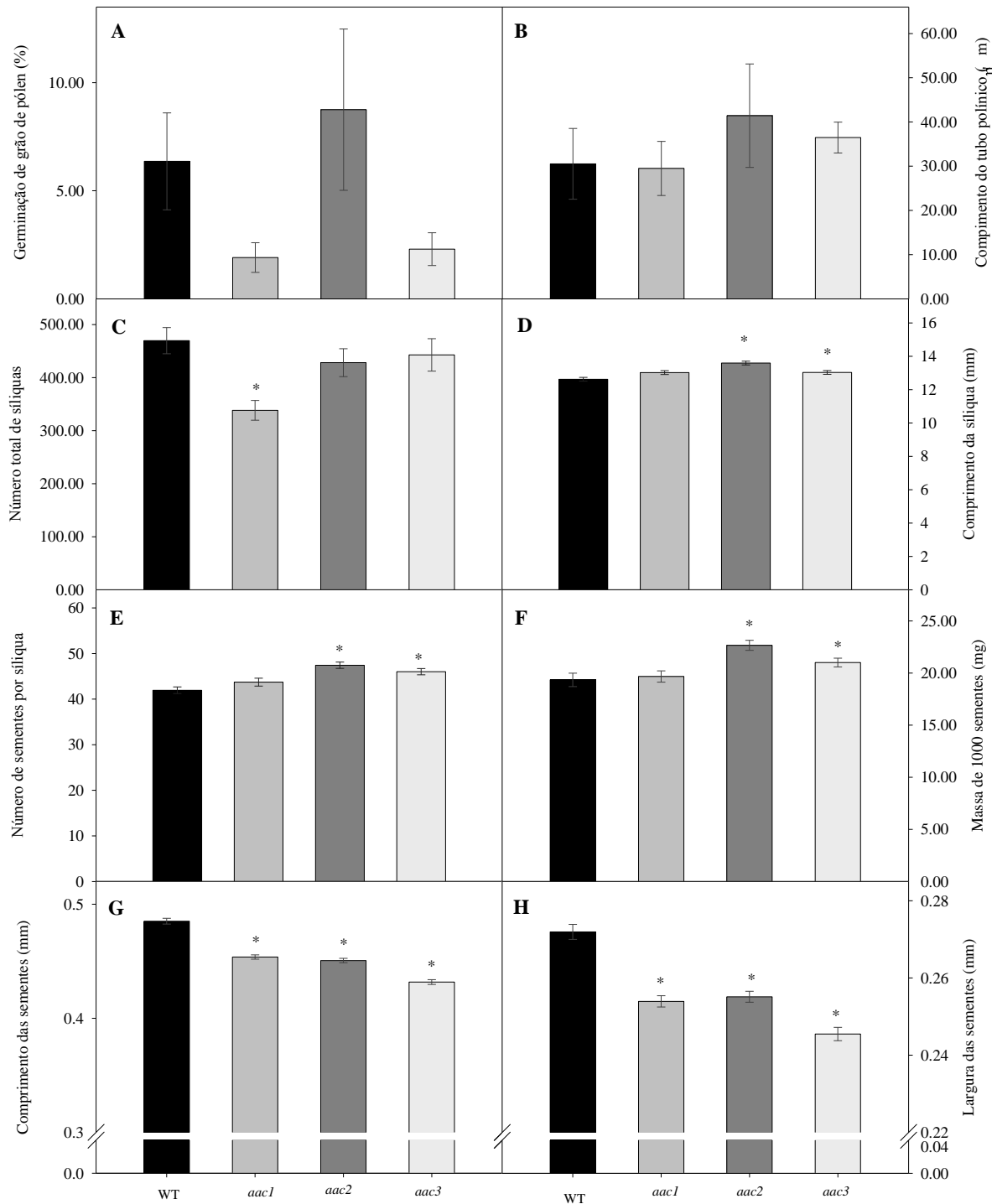
### 3.7 - Análises em tecidos heterotróficos

Com base nos resultados obtidos nas análises de expressão diferencial dos transportadores AACs em diferentes órgãos e estágios de desenvolvimento, foi possível constatar alta expressão dos transportadores AAC2 e AAC3 em órgãos e tecidos associados ao estágio reprodutivo da planta, sugerindo que esses transportadores exercem papel importante nessa fase. Com o objetivo de conferir o efeito da baixa expressão dos transportadores AACs nesses tecidos, parâmetros de caracterização da fase reprodutiva e desenvolvimento de sementes foram avaliados.

Foram realizadas análises de germinação de grãos de pólen e comprimento do tubo polínico entre as plantas mutantes o controle. Para ambas as análises, germinação de pólen e comprimento do tubo polínico, não foram observadas alterações significativas entre o tipo selvagem e as linhagens mutantes (Figura 10A e B).

Plantas com baixa expressão do transportador AAC1 produziram um menor número de siliquas por planta, 27,8% a menos que o WT (Figura 10C). Em relação ao comprimento das siliquas, o número de sementes por síliqua e à massa de 1000 sementes, foram observadas alterações nos genótipos *aac2* e *aac3*, os quais foram significativamente superiores quando comparados ao WT (Figura 10D, E e F). Além disso, as plantas mutantes apresentaram menores valores das dimensões aferidas das sementes, sendo elas o comprimento e a largura, que foram estatisticamente diferentes das observadas nas plantas WT, sugerindo que as sementes das linhagens mutantes são menores que as do WT (Figura 10G e H).

Foi verificada a porcentagem de germinação em função do tempo (dias) dos genótipos estudados em duas condições diferentes em relação à concentração de sacarose adicionada ao meio de cultura usado como substrato para as sementes. Foi observado que no meio sem sacarose o genótipo *aac3* apresentou maior germinação (Figura suplementar 7A e B), sem apresentar diferenças estatísticas nos parâmetros IVG, TMG e VMG (Tabela suplementar 3). Já no meio com 1% de sacarose, não houve alteração entre as linhagens mutantes e o WT (Figura suplementar 7C e D), sem apresentar diferenças estatísticas nos parâmetros IVG, TMG e VMG (Tabela suplementar 3).



**Figura 10.** Parâmetros relacionados a fase reprodutiva de plantas WT e com expressão reduzida de *AAC1*, *AAC2* e *AAC3*. A, número total de síliquas. B, comprimento da síliqua. C, número de sementes por síliqua. D, massa de 1000 sementes. E, comprimento das sementes. F, largura das sementes. G, germinação do grão de pólen. H, comprimento do tubo polínico. Valores representam a média  $\pm$  erro padrão de seis plantas. Asteriscos indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ), segundo o teste  $t$  de Student, em comparação com o tipo selvagem (WT).

Também foi avaliado o crescimento radicular dos genótipos estudados em função do tempo (dias) em três condições diferentes em relação à concentração de sacarose adicionada ao meio de cultura usado como substrato para as sementes. Na condição sem sacarose, não houve diferenças estatísticas entre os mutantes e o WT, mas houve um leve aumento no comprimento das raízes dos genótipos mutantes (Figura suplementar 8A e B). Não houve alterações no crescimento radicular na condição com 0% de sacarose (Figura suplementar 8C e D). No meio com 2% de sacarose também não houve alterações significativas, porém observa-se tendência de menor crescimento radicular entre os mutantes em comparação com o WT (Figura suplementar 8D e E).

#### 4 - DISCUSSÃO

Os resultados das análises qRT-PCR indicam que o gene *AAC1* é a isoforma dominante entre os AACs em *A. thaliana*, independente do tecido e estágio do desenvolvimento. Essa observação é consistente com os dados de expressão gênica publicamente disponíveis (Winter et al., 2007) (Figura Suplementar 2). Como já caracterizado em outros estudos, AAC1 é a mais abundante das proteínas transportadoras mitocondriais, apresentando mais de 300 ESTs, três vezes o número do Transportador de Fosfato 1 (do inglês *Phosphate Carrier 1* [PiC1 ; At5g14040]), o segundo membro mais abundante registrado (Millar and Heazlewood, 2003; Picault et al., 2004; Haferkamp, 2007). Portanto, pode-se sugerir que o transportador AAC1 cumpre a função principal na transferência de energia das mitocôndrias para o citosol em *A. thaliana* (Haferkamp, 2007) e talvez por esse motivo, no presente trabalho, não foi possível isolar um mutante *knockout* capaz de se desenvolver até a fase reprodutiva.

Os genes *AAC2* e *AAC3* apresentam níveis de expressão consideravelmente inferiores aos do *AAC1*, com picos de expressão em tecidos relacionados à fase reprodutiva como encontrados nas flores, pólen e siliquas, corroborando com Haferkamp (2007) e com os dados de expressão (Figuras suplementares 3 e 4, respectivamente). Ainda que não tenha o nível de expressão comparado ao gene *AAC1*, o *AAC2* também está entre os 11 transportadores mitocondriais que apresentam pelo menos 10 ESTs (do inglês: *Expressed Sequence Tag*) sendo, portanto, um dos transportadores MCFs mais expressos (Picault et al., 2004). Essa variação no padrão de expressão entre órgãos e estágios do desenvolvimento sugere que esses transportadores exerçam o papel fisiológico de forma não redundante.

Teoricamente, a diminuição na expressão dos transportadores AACs, ao reduzir a quantidade destes transportadores, contribui para uma menor capacidade de distribuição do ATP da matriz mitocondrial para o citosol. Dessa forma o processo pelo qual o ATP é exportado da mitocôndria para o citosol e o ADP é importado para a matriz mitocondrial ocorre em menores proporções limitando a atividade da ATP Sintase. O *turnover* de adenilato limita a via respiratória, em função da restrição no fornecimento de adenilatos (O'Leary and Plaxton, 2017; O'Leary et al., 2018). Quando ocorre de forma lenta, pode acarretar em alterações no *steady-state* energético (Geigenberger et al., 2010), contribuindo assim para a redução da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria (mCTE). Essa redução da mCTE promove aumento no poder redutor da organela, que quando não regenerado à sua forma oxidada, pode comprometer o balanço redox no compartimento. Considerando que,

principalmente durante o dia, a mitocôndria esta envolvida com a dissipação de redutores provenientes de outros processos metabólicos como fotossíntese e fotorrespiração (Scheibe and Dietz, 2012; Liang et al., 2015; Selinski and Scheibe, 2018), o *turnover* reduzido dos adenilatos pode contribuir para uma sobrecarga na atividade mitocondrial e um comprometimento dela no período luminoso (Zhang et al., 2012; Liang et al., 2015). Assim, a hipótese em que a baixa expressão dos transportadores AACs acarreta no aumento do poder redutor celular no período luminoso, pode ser corroborada com os resultados apresentados na Figura 7, onde a razão NADPH/NADP<sup>+</sup> é maior nas linhagens *aac2* e *aac3*, e NADH/NAD<sup>+</sup> é maior em *aac1*.

Considerando a menor capacidade de distribuição do ATP/ADP como um fator que promove o estresse oxidativo no sistema, pode-se sugerir que a proteína AAC2 tenha um importante papel na distribuição de energia no estresse, uma vez que o gene é *up-regulado* nessa condição (Fonseca-pereira et al., 2018). O transportador AAC2 também é caracterizado por apresentar menor afinidade aos substratos ATP/ADP e maiores valores de *V<sub>máx</sub>*, comparado ao transportador AAC1 (Haferkamp et al., 2002). Assim o AAC2 pode agir como transportador de menor afinidade, que é requerido em situação de maior razão ATP/ADP na matriz mitocondrial. Sendo assim, pode-se inferir que o transportador AAC2 atue na complementação da atividade do AAC1 quando há excesso de energia na mitocôndria. No caso da ausência desse transportador, a alta razão ATP/ADP na matriz mitocondrial não seria redistribuída de forma dinâmica, sendo necessário que os outros transportadores de adenilatos compensassem essa função, com o propósito de evitar alteração no *steady-state* energético celular. Essa hipótese justifica o aumento significativo encontrado na expressão, tanto dos transportadores de adenilato mitocondriais, como nos não-mitocondriais na linhagem *aac2*, favorecendo assim a exportação de ATP da mitocôndria e a importação dessa molécula em outras organelas, respectivamente, contribuindo para um *turnover* dinâmico de adenilatos.

Apesar de constatada baixa expressão dos genes *AAC1*, *AAC2* e *AAC3* nas linhas mutantes isoladas, a diminuição da expressão dos transportadores AACs na mitocôndria não teve efeito letal nos mutantes para nenhuma das isoformas. Isso pode ser explicado pelo fato de existirem as outras isoformas AACs na ausência a isoformas suprimida, bem como a existência de outros transportadores de adenilato na mitocôndria que podem assumir o papel da isoformas suprimida, compensando a falta do transportador. Em *T. brucei*, por exemplo, proteínas APC's demonstraram compensar o transporte de adenilatos em baixa expressão do gene AAC (Stael et al., 2011; Peña-Díaz et al., 2012).

Ainda que o efeito da baixa da expressão das proteínas AACs favoreça o estresse oxidativo do sistema, não houve alteração nos parâmetros de trocas gasosas sugerindo que a eficiência fotossintética não foi afetada pela redução na expressão individual de transportadores AACs. Uma possível explicação para esse resultado são os diversos mecanismos de regeneração dos aceptores de elétrons essenciais na fase fotoquímica. Dentre esses mecanismos, existe a migração do excesso do poder redutor proveniente dos cloroplastos para a mitocôndria via “lançadeiras de malato” durante o período luminoso. O malato proveniente dos plastídios pode ser importado pela mitocôndria e oxidado a oxaloacetato, gerando NADH nesse processo e contribuindo para o aumento de poder redutor no compartimento (Noguchi and Yoshida, 2008; Scheibe and Dietz, 2012; O’Leary et al., 2018; Selinski and Scheibe, 2018). Esses mecanismos constituem uma vantagem fundamental em termos de flexibilidade metabólica em situações em que a oferta de poder redutor é maior que a demanda para seu uso (O’Leary et al., 2018). No presente estudo, as linhagens mutantes apresentaram tendência de acúmulo de malato durante o período luminoso, que pode ser resultante da dissipação energética a partir do malato, acompanhado pela possível baixa taxa de consumo desse metabólito pela mitocôndria, uma vez que o efeito da redução das proteínas transportadoras AACs possivelmente favorece um desbalanço redox na organela e consequentemente uma sobrecarga na atividade mitocondrial.

Não foi possível verificar alterações nos parâmetros de crescimento entre os mutantes e o tipo selvagem. No entanto, foi observada maior respiração noturna entre os mutantes. Considerando que a respiração noturna é responsável por grande parte do fornecimento de esqueleto de carbono e alta produção energética, essa via metabólica possibilita atender as demandas necessárias nos processos de manutenção, resultando em altas taxas de crescimento dos tecidos (Ainsworth and Long, 2005; Markelz et al., 2014). Assim, pode-se inferir que maiores taxas respiratórias entre os mutantes durante a noite pode compensar o crescimento vegetativo e outras demandas, possivelmente comprometido durante o período luminoso, acarretando na similaridade fenotípica entre os mutantes AACs e o WT. Além disso, visto que as plantas mutantes tendem a apresentar estresse oxidativo, complexos proteicos desacopladores de energia podem estar sendo regulados positivamente e estarem atuando na membrana interna da mitocôndria, desvinculando a alta taxa respiratória da produção energética (Vishwakarma et al., 2015). Esse mecanismo pode ser realizado através da atividade da Oxidase Alternativa (AOX) que reduz o  $O_2$  à  $H_2O$  com menor bombeamento de

prótons para o espaço intermembrana da mitocôndria, contribuindo assim para uma redução na produção de ATP via processo respiratório (Vishwakarma et al., 2015).

Nas avaliações metabólicas, foi possível constatar padrões na flutuação das concentrações dos compostos quantificados mediante aos cinco pontos de coleta, deixando evidente diferentes comportamentos do metabolismo durante o período luminoso e o escuro. Com o propósito de confirmar os padrões e intensificar os fenótipos observados, foi realizado o experimento onde as plantas mutantes e WT foram submetidas sob condições independentes de luz contínua e pleno escuro. Os resultados foram condizentes com os obtidos previamente no experimento sob condições normais.

Quanto aos compostos relacionados ao nitrogênio, verificou-se uma alta concentração de nitrato ao meio dia para os mutantes das três isoformas de AACs em relação ao WT. Esse excesso de nitrato foi consumido ao longo do dia, concomitantemente com aumentos significativos na quantidade de aminoácidos e proteínas, inferindo que esse nitrato foi utilizado para a síntese dessas outras moléculas. Durante o dia, o poder redutor fornecido pela fotossíntese e fotorrespiração às mitocôndrias pode substituir a necessidade de formação de redutores através do ciclo TCA, tornando-o principal fornecedor de esqueleto de carbono para síntese de outras moléculas (Sweetlove et al., 2010; Tcherkez et al., 2012). Considerando que os mutantes AACs tenderam a possuir maior poder redutor, essa condição possibilita que o ciclo TCA atenda demandas ainda maiores de esqueleto de carbono para vias de biossíntese de aminoácidos e proteínas (Noguchi and Yoshida, 2008; Liang et al., 2015; O'Leary et al., 2018), o que corrobora com as altas concentrações desses compostos observadas nas plantas mutantes AACs.

Além do metabolismo do nitrogênio, alterações foram observadas nos níveis de compostos associados ao metabolismo do carbono. Os mutantes com baixa expressão para os transportadores AACs, principalmente o *aac2*, apresentaram maiores concentrações de carboidratos não-estruturais ao final do período de luz, principalmente da sacarose. Esse resultado sugere que esse açúcar pode ter sido consumido em menor quantidade ou sintetizado em maior quantidade, ou ainda que ambos os processos estivessem acontecendo durante o período luminoso. Dentre os fatores que podem acarretar na diminuição da respiração diurna, vale destacar a regulação pós-traducional de enzimas importantes da respiração. O Complexo Piruvato Desidrogenase (PDC) (Tovar-Méndez et al., 2003) e Glicose-6-fosfato Desidrogenase plastidial (Wenderoth et al., 1997), por exemplo, podem ser inibidas pela luz e

pelo aumento de poder redutor sendo esses, portanto, fatores importantes no processo respiratório. Considerando que o possível aumento da razão ATP/ADP pode inibir a mCTE e gerar acúmulo de redutores na matriz mitocondrial em plantas com baixa expressão dos AAC, essas enzimas podem ter sido inibidas, acarretando no aumento da concentração de substrato/intermediários das reações da via respiratória, fazendo com que a sacarose não estivesse sendo consumida na mesma velocidade como em condições normais, favorecendo seu acúmulo (O'Leary et al., 2018). Além dessa regulação, diversos produtos da respiração, quando acumulados, tem a capacidade inibir enzimas da glicólise e do ciclo TCA (O'Leary and Plaxton, 2017; O'Leary et al., 2018), contribuindo para também para o consumo mais lento da sacarose e outros intermediários metabólicos utilizados na respiração, como malato, fumarato, glicose e frutose, que também tenderam a acumular em maior quantidade nos mutantes avaliados. Esses resultados corroboram a hipótese que, durante o dia, a respiração é dificultada em função da baixa expressão dos transportadores AACs.

Por outro lado, o trabalho realizado por Liang et al. (2015), com *A. thaliana* mutantes que exibiam altos níveis energéticos na forma de ATP, no cloroplasto durante o dia, e na mitocôndria durante a noite, demonstraram maiores concentrações de sacarose durante o período luminoso, dada pela maior atividade da sacarose fosfato sintase (SPS) promovida pelo excesso de ATP. Essa possibilidade pode ser sustentada para o presente trabalho considerando que o estresse oxidativo pode estimular a expressão dos transportadores de adenilato da célula, contribuindo para exportação do ATP da mitocôndria, o qual pode atuar na atividade da SPS, promovendo assim alta síntese de sacarose.

Curiosamente, ao longo do período de escuro, os açúcares acumulados durante o dia foram catabolizados de modo que, no início do dia, as concentrações dos carboidratos não-estruturais foram similares ou até menores que às do tipo selvagem (Figura 5 e 9). No escuro, as condições redox da célula são mais favoráveis à homeostase, uma vez que a fase fotoquímica da fotossíntese nem a fotorrespiração não mais contribui com poder redutor para a mitocôndria. Além disso, no escuro as proteínas da mCTE são maximizadas, bem como a maior capacidade de algumas enzimas do ciclo TCA, fazendo da mitocôndria a principal fornecedora de ATP para a célula nesse período (Lee et al., 2010; Liang et al., 2015; O'Leary et al., 2018). Isso sugere que essa concentração extra de açúcares permitiu que mais substrato estivesse disponível à noite, induzindo uma maior respiração noturna mitocondrial, como foi constatado nos mutantes estudados (Figura 3H).

Assim, numa visão geral, os transportadores de adenilato AAC1-3 contribuem para um fornecimento da energia para os demais compartimentos celulares, promovendo o *turnover* dinâmico dos adenilatos. Essa renovação dinâmica de ATP e ADP contribui para o *steady-state* celular, de modo auxiliar na manutenção do estado redox do sistema. Ainda poucas abordagens foram realizadas para avaliar o efeito de pools alterados de adenilato nas plantas, fazendo-se necessários experimentos mais aprofundados para auxiliar no esclarecimento desse campo de estudo.

## 5 – CONCLUSÕES

O transportador mitocondrial de adenilato AAC1 é a isoformas é dominante entre os AACs em *A. thaliana*, independente do tecido e estágio do desenvolvimento. AAC2 e o AAC3 são expressos em baixos níveis em nos tecidos e ao longo das fases do desenvolvimento, sendo regulados positivamente em tecidos relacionados a fase reprodutiva, como grão de pólen, flor e siliqua. A diminuição da expressão dos genes *AAC1*, *AAC2* e *AAC3* não tem efeito letal nos mutantes para nenhuma das isoformas, provavelmente pelo efeito de compensação da atividade suprimida dos AACs assumido pelos outros transportadores de adenilato existentes na mitocôndria. Nem o crescimento e nem o processo fotossintético é comprometido nas plantas mutantes isoladas no trabalho. Porém as plantas mutantes para as três isoformas apresentam maiores taxas de respiração noturna. Além da respiração, o metabolismo das plantas mutantes exibem alterações nos padrões de comportamento no período diurno e noturno. Durante o dia ocorre aumento de poder redutor nas formas de NADPH e NADH. Da mesma forma, ocorre acúmulo de compostos nitrogenados e carbonados, o qual são rapidamente consumido durante a noite. Dessa forma, o excesso de substrato acumulado durante o dia, provavelmente impulsiona maiores taxas de respiração durante a noite. Assim, maiores taxas respiratórias entre os mutantes durante o escuro podem compensar o crescimento vegetativo, possivelmente comprometido durante o período luminoso, ou ainda ser resultado de maior dissipação do excesso energético pela AOX. Assim, os transportadores AACs promovem uma dinâmica partição de adenilatos que contribue para sincronismo entre o metabolismo diurno e noturno, favorecendo a manutenção do estado redox e *steady-state* celular.

## 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

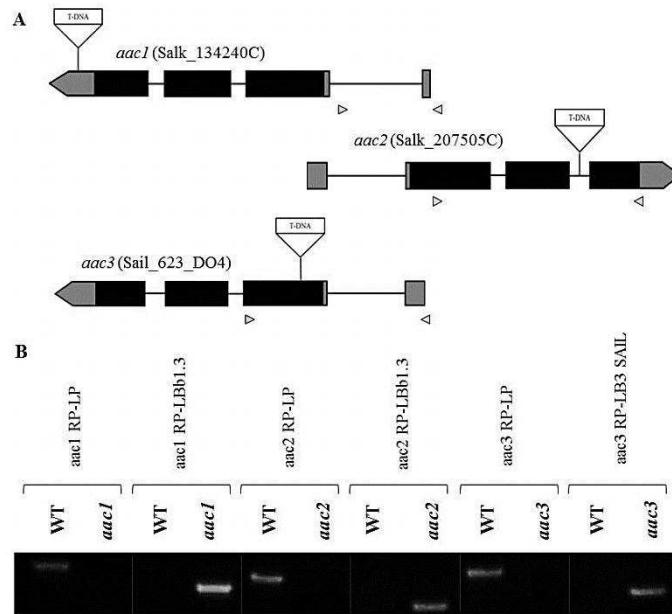
- Ainsworth EA, Long SP** (2005) What have we learned from 15 years of free-air CO<sub>2</sub> enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO<sub>2</sub>. *New Phytol* **165**: 351–372
- Araújo WL, Nunes-Nesi A, Fernie AR** (2014) On the role of plant mitochondrial metabolism and its impact on photosynthesis in both optimal and sub-optimal growth conditions. *Photosynth Res* **119**: 141–156
- Arvidsson S, Kwasniewski M, Riaño-Pachón DM, Mueller-Roeber B** (2008) QuantPrime - A flexible tool for reliable high-throughput primer design for quantitative PCR. *BMC Bioinformatics* **9**: 1–15
- Bradford MM** (1976) Sistema séptico domiciliario | Rotomoldeo en Colombia Tanques Plasticos En Colombia Rotoplast. *Anal Biochem* **72**: 248–254
- Bruginski D, Carvalho D, Inacio R, Carvalho N De** (2009) Qualidade fisiológica de sementes de guanxuma em influência do envelhecimento acelerado e da luz. *Acta Sci Agron* **31**: 489–494
- Cao Y, Tanaka K, Nguyen CT, Stacey G** (2014) Extracellular ATP is a central signaling molecule in plant stress responses. *Curr Opin Plant Biol* **20**: 82–87
- Dallabona C, Baruffini E, Goffrini P, Lodi T** (2017) Dominance of yeast aac2R96H and aac2R252G mutations, equivalent to pathological mutations in ant1, is due to gain of function. *Biochem Biophys Res Commun* **493**: 909–913
- Drgoň T, Šabová L, Gavurniková G, Kolarov J** (1992) Yeast ADP/ATP carrier (AAC) proteins exhibit similar enzymatic properties but their deletion produces different phenotypes. *FEBS Lett* **304**: 277–280
- Echaniz-Laguna A, Chassagne M, Ceresuela J, Rouvet I, Padet S, Acquaviva C, Nataf S, Vinzio S, Bozon D, de Camaret BM** (2012) Complete loss of expression of the ANT1 gene causing cardiomyopathy and myopathy. *J Med Genet* **49**: 146–150
- Fernie AR, Carrari F, Sweetlove LJ** (2004) Respiratory metabolism: Glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 254–261
- 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 heterotrophic cells. *Planta* **212**: 250–263
- Fonseca-Pereira, Paula da, Neri-Silva, R., Cavalcanti, J. H. F., Brito, D. S., Weber, A. P. M., Araújo, W. L., & Nunes-Nesi A** (2018) Data-Mining Bioinformatics: Connecting Adenylate Transport and Metabolic Responses to Stress. *Trends Plant Sci* **214**: 25–34
- Fonseca-pereira P, Neri-silva R, Cavalcanti JHF, Brito DS, Weber APM, Araújo WL, Nunes-nesi A** (2018) Data-Mining Bioinformatics : Connecting Adenylate Transport and Metabolic Responses to Stress. *Trends Plant Sci* **xx**: 1–14
- Fontanesi F, Palmieri L, Scarcia P, Lodi T, Donnini C, Limongelli A, Tiranti V, Zeviani M, Ferrero I, Viola AM** (2004) Mutation in AAC2, equivalent to human adPEO-associated ANT1 mutations, lead to defective oxidative phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae* and affect mitochondrial DNA stability. *Hum Mol Genet* **13**: 923–934

- Geigenberger P, Riewe D, Fernie AR** (2010) The central regulation of plant physiology by adenylates. *Trends Plant Sci* **15**: 98–105
- Gibon Y, Bessieres MA, Larher F** (1997) Is glycine betaine a non-compatible solute in higher plants that do not accumulate it ? 329–340
- Gnipová A, Šubrtová K, Panicucci B, Horváth A, Lukeš J, Zíková A** (2015) The ADP/ATP carrier and its relationship to oxidative phosphorylation in ancestral protist *trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell* **14**: 297–310
- Gout E, Rebeille F, Douce R, Bligny R** (2014) Interplay of Mg<sup>2+</sup>, ADP, and ATP in the cytosol and mitochondria: Unravelling the role of Mg<sup>2+</sup> in cell respiration. *Proc Natl Acad Sci* **111**: E4560–E4567
- Haferkamp I** (2007) The diverse members of the mitochondrial carrier family in plants. *FEBS Lett* **581**: 2375–2379
- Haferkamp I, Hackstein JHP, Voncken FGJ, Schmit G, Tjaden J** (2002) Functional integration of mitochondrial and hydrogenosomal ADP/ATP carriers in the *Escherichia coli* membrane reveals different biochemical characteristics for plants, mammals and anaerobic chytrids. *Eur J Biochem* **269**: 3172–3181
- Haferkamp I, Schmitz-Esser S** (2012) The Plant Mitochondrial Carrier Family: Functional and Evolutionary Aspects. *Front Plant Sci* **3**: 1–19
- Hoffmann C, Plochanski B, Haferkamp I, Leroch M, Ewald R, Bauwe H, Riemer J, Herrmann JM, Neuhaus HE** (2013) From Endoplasmic Reticulum to Mitochondria: Absence of the Arabidopsis ATP Antiporter Endoplasmic Reticulum Adenylate Transporter1 Perturbs Photorespiration. *Plant Cell* **25**: 2647–2660
- Igamberdiev AU, Kleczkowski LA** (2009) Metabolic systems maintain stable non-equilibrium via thermodynamic buffering. *BioEssays* **31**: 1091–1099
- Lee CP, Eubel H, Millar AH** (2010) Diurnal Changes in Mitochondrial Function Reveal Daily Optimization of Light and Dark Respiratory Metabolism in Arabidopsis . *Mol Cell Proteomics* **9**: 2125–2139
- Lee CP, Millar AH** (2016) The Plant Mitochondrial Transportome: Balancing Metabolic Demands with Energetic Constraints. *Trends Plant Sci* **21**: 662–676
- Leroch M, Neuhaus HE, Kirchberger S, Zimmermann S, Melzer M, Gerhold J, Tjaden J** (2008) Identification of a Novel Adenine Nucleotide Transporter in the Endoplasmic Reticulum of Arabidopsis. *Plant Cell Online* **20**: 438–451
- Liang C, Zhang Y, Cheng S, Osorio S, Sun Y, Fernie AR, Cheung CYM, Lim BL** (2015) Impacts of high ATP supply from chloroplasts and mitochondria on the leaf metabolism of Arabidopsis thaliana. *Front Plant Sci* **6**: 1–17
- Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR** (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nat Protoc* **1**: 387–396
- Markelz RJC, Vosseller LN, Leakey ADB** (2014) Developmental stage specificity of transcriptional, biochemical and CO<sub>2</sub> efflux responses of leaf dark respiration to growth of Arabidopsis thaliana at elevated [CO<sub>2</sub>]. *Plant, Cell Environ* **37**: 2542–2552
- Millar AH, Heazlewood JL** (2003) Genomic and Proteomic Analysis of Mitochondrial Carrier Proteins in Arabidopsis 1. **131**: 443–453

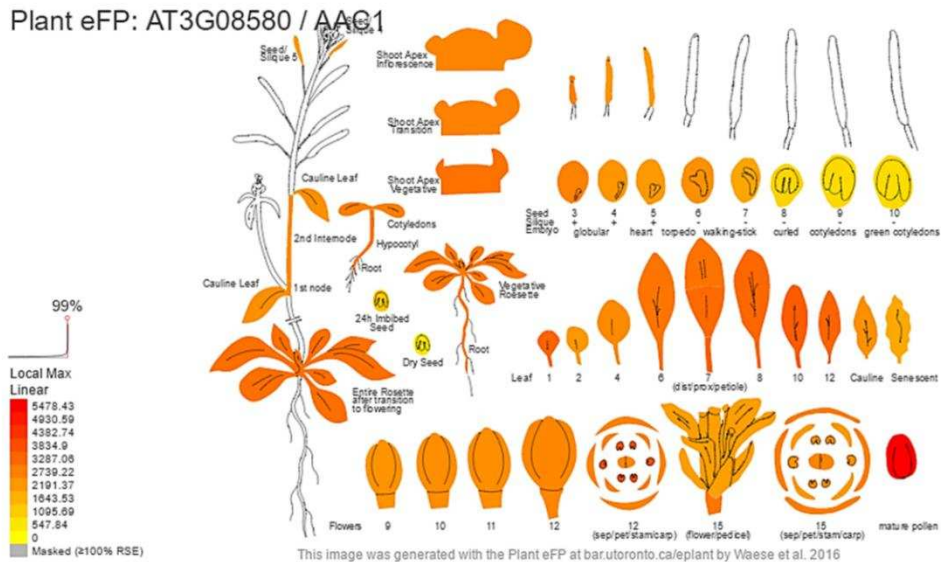
- Missihoun TD, Kotchoni SO, Bartels D** (2018) Aldehyde Dehydrogenases Function in the Homeostasis of Pyridine Nucleotides in *Arabidopsis thaliana*. *Sci Rep* **8**: 4–11
- Murashige T, Skoog F** (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* **15**: 473–497
- Noguchi K, Yoshida K** (2008) Interaction between photosynthesis and respiration in illuminated leaves. *Mitochondrion* **8**: 87–99
- Nunes-Nesi A, Carrari F, Gibon Y, Sulpice R, Lytovchenko A, Fisahn J, Graham J, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ, Fernie AR** (2007) Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. *Plant J* **50**: 1093–1106
- O’Leary BM, Asao S, Harvey Millar A, Atkin OK** (2018) Core principles which explain variation in respiration across biological scales. *New Phytol.* doi: 10.1111/nph.15576
- O’Leary BM, Plaxton WC** (2017) Mechanisms and functions of post-translational enzyme modifications in the organization and control of plant respiratory metabolism. *Plant Respir Metab fluxes carbon Balanc* 261–284
- Palmieri F, Pierri CL, De Grassi A, Nunes-Nesi A, Fernie AR** (2011) Evolution, structure and function of mitochondrial carriers: A review with new insights. *Plant J* **66**: 161–181
- Palmieri L, Alberio S, Pisano I, Lodi T, Meznaric-Petrusa M, Zidar J, Santoro A, Scarcia P, Fontanesi F, Lamantea E, et al** (2005) Complete loss-of-function of the heart/muscle-specific adenine nucleotide translocator is associated with mitochondrial myopathy and cardiomyopathy. *Hum Mol Genet* **14**: 3079–3088
- Palmieri L, Santoro A, Carrari F, Blanco E, Nunes-Nesi A, Arrigoni R, Genchi F, Fernie AR, Palmieri F** (2008) Identification and Characterization of ADNT1, a Novel Mitochondrial Adenine Nucleotide Transporter from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **148**: 1797–1808
- Pétriacq P, Tcherkez G, Gakière B** (2016) Pyridine nucleotides induce changes in cytosolic pools of calcium in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav* **11**: 1–3
- Picault N, Hodges M, Palmieri L, Palmieri F** (2004) The growing family of mitochondrial carriers in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* **9**: 138–146
- Roberts J, Aubert S, Gout E, Bligny R, Douce R** (1997) Cooperation and competition between adenylate kinase, nucleoside diphosphokinase, electron transport, and ATP synthase in plant mitochondria studied by <sup>31</sup>P-nuclear magnetic resonance. *Plant Physiol* **113**: 191–199
- Scheibe R, Dietz KJ** (2012) Reduction-oxidation network for flexible adjustment of cellular metabolism in photoautotrophic cells. *Plant, Cell Environ* **35**: 202–216
- Selinski J, Scheibe R** (2018) Malate valves: Old shuttles with new perspectives. *Plant Biol* 0–2
- Sienkiewicz-porzucek A, Sulpice R, Osorio S, Krahnert I, Leisse A** (2010) Mild Reductions in Mitochondrial NAD- Dependent Isocitrate Dehydrogenase Activity Result in Altered Nitrate Assimilation and Pigmentation But Do Not Impact Growth. doi: 10.1093/mp/ssp101
- Sulpice R, Pyl E-T, Ishihara H, Trenkamp S, Steinfath M, Witucka-Wall H, Gibon Y, Usadel B, Poree F, Piques MC, et al** (2009) Starch as a major integrator in the

- regulation of plant growth. *Proc Natl Acad Sci* **106**: 10348–10353
- Sweetlove LJ, Beard KFM, Nunes-Nesi A, Fernie AR, Ratcliffe RG** (2010) Not just a circle: Flux modes in the plant TCA cycle. *Trends Plant Sci* **15**: 462–470
- Sweetlove LJ, Fait A, Nunes-Nesi A, Williams T, Fernie AR** (2007) The mitochondrion: An integration point of cellular metabolism and signalling. *CRC Crit Rev Plant Sci* **26**: 17–43
- Tcherkez G, Boex-Fontvieille E, Mahé A, Hodges M** (2012) Respiratory carbon fluxes in leaves. *Curr Opin Plant Biol* **15**: 308–314
- Tovar-Méndez A, Miernyk JA, Randall DD** (2003) Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity in plant cells. *Eur J Biochem* **270**: 1043–1049
- Vishwakarma A, Tetali SD, Selinski J, Scheibe R, Padmasree K** (2015) Importance of the alternative oxidase (AOX) pathway in regulating cellular redox and ROS homeostasis to optimize photosynthesis during restriction of the cytochrome oxidase pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Ann Bot* **116**: 555–569
- Wenderoth I, Scheibe R, Von Schaewen A** (1997) Identification of the cysteine residues involved in redox modification of plant plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase. *J Biol Chem* **272**: 26985–26990
- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson G V, Provart NJ** (2007) An ““ Electronic Fluorescent Pictograph ”” Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. 1–12
- Zhang Y, Yu L, Yung KF, Leung DY, Sun F, Lim BL** (2012) Over-expression of AtPAP2 in *Camelina sativa* leads to faster plant growth and higher seed yield. *Biotechnol Biofuels* **5**: 1–10

## 7 - FIGURAS E TABELAS SUPLEMENTARES

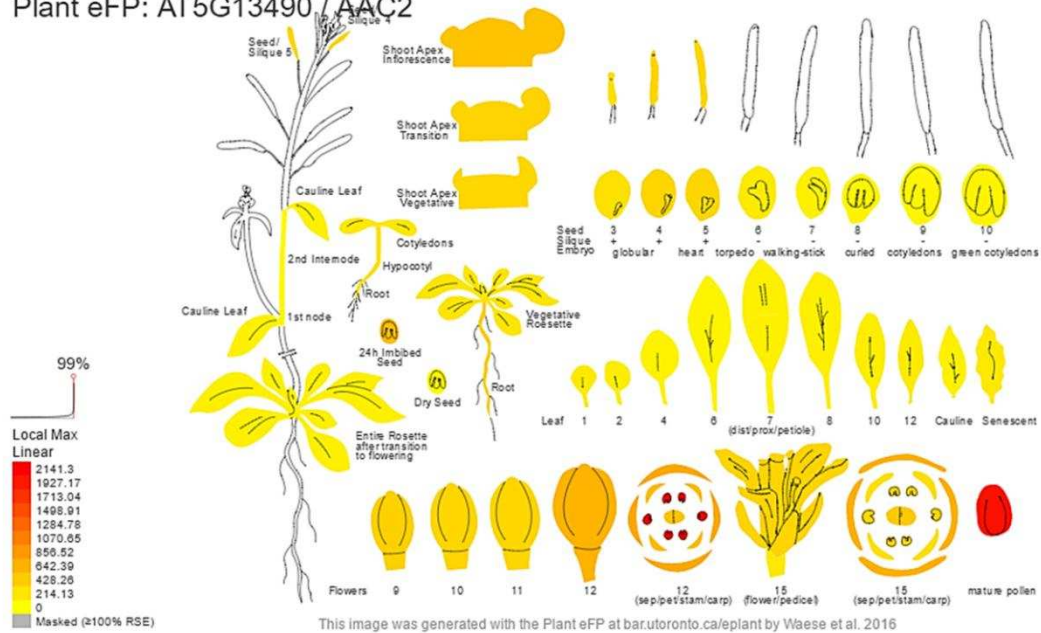


**Figura 1-** Genotipagem das plantas mutantes homozigotas com inserção de T-DNA para os genes AAC1, AAC2 e AAC3. A, representação esquemática do gene *AtAAC1* (At3g08580), *AtAAC2* (At5g13490) e *AtAAC3* (At4g28390) indicando os respectivos locais de inserção do T-DNA. As caixas pretas representam os éxons e as setas cinzas indicam as posições dos primers usados na técnica PCR para genotipagem para seleção das plantas mutantes homozigotas. B, As bandas em gel de agarose 1% correspondentes aos produtos da reação de PCR, utilizando-se *primers* indicados no item 2.1.



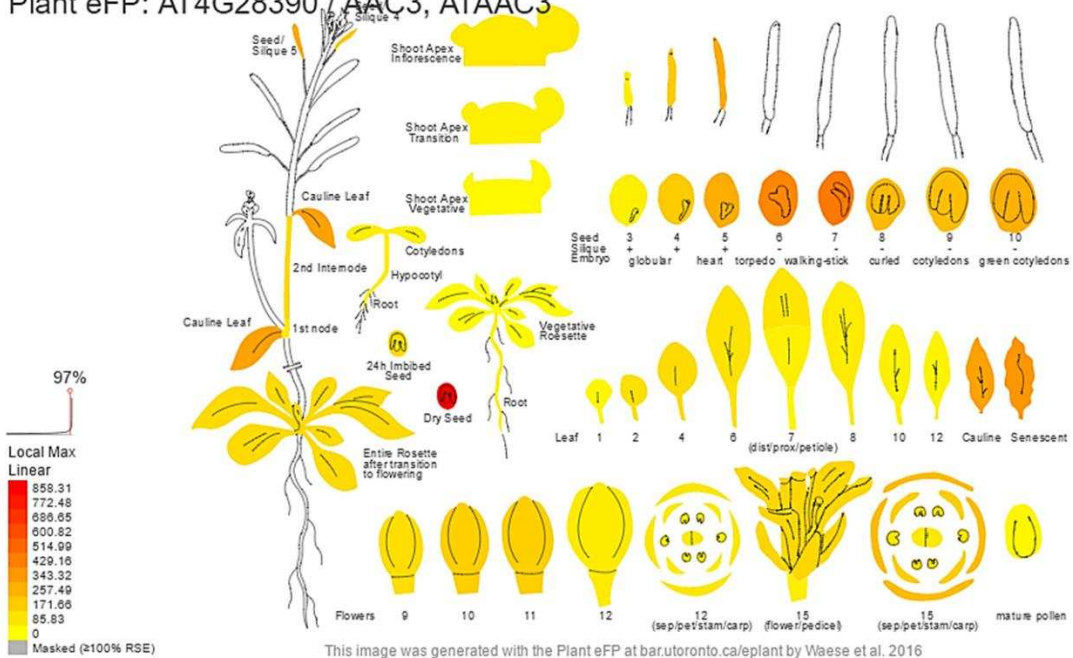
**Figura suplementar 2-** Análise *in silico* do gene *AAC1* em diferentes tecidos. Fonte: Arabidopsis eFP Browser <<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>>

Plant eFP: AT5G13490 / AAC2

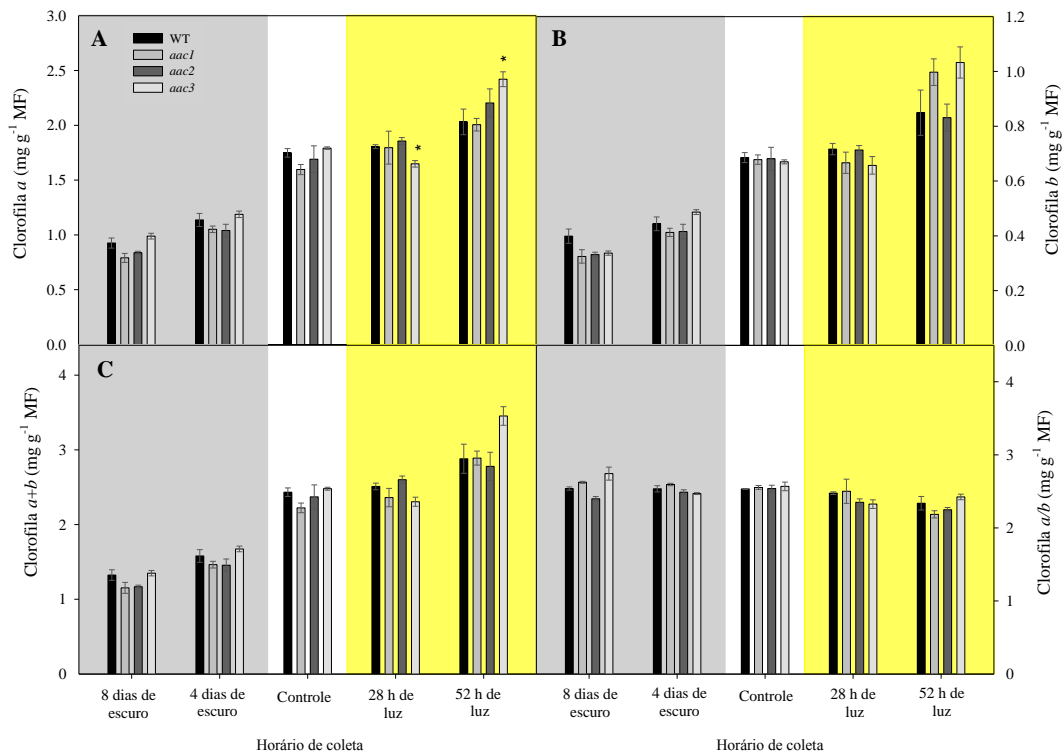
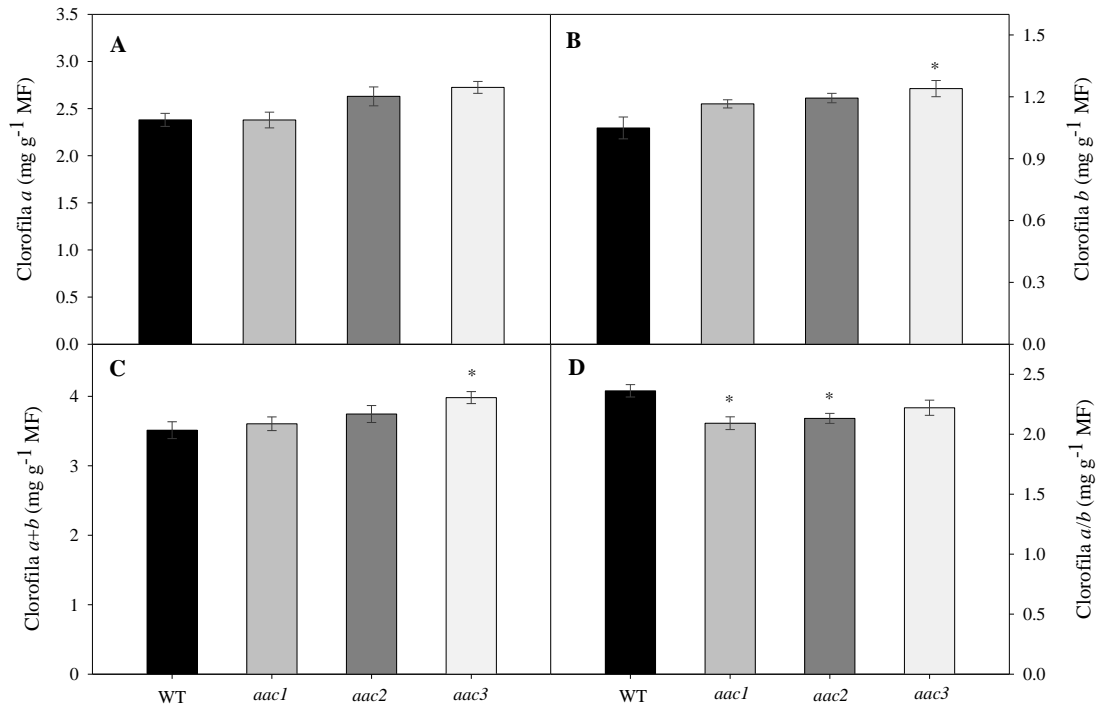


**Figura suplementar 3-** Análise *in silico* do gene AAC2 em diferentes tecidos. Fonte: Arabidopsis eFP Browser <<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>>

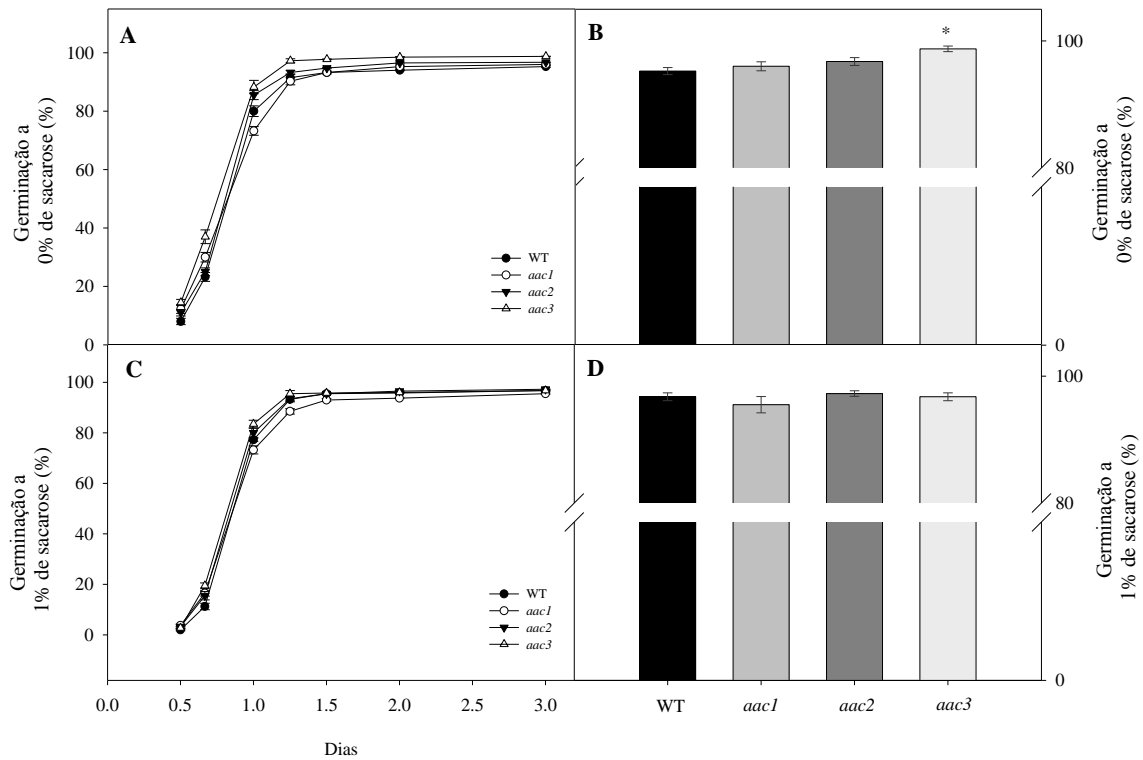
Plant eFP: AT4G28390 / AAC3, ATAAC3



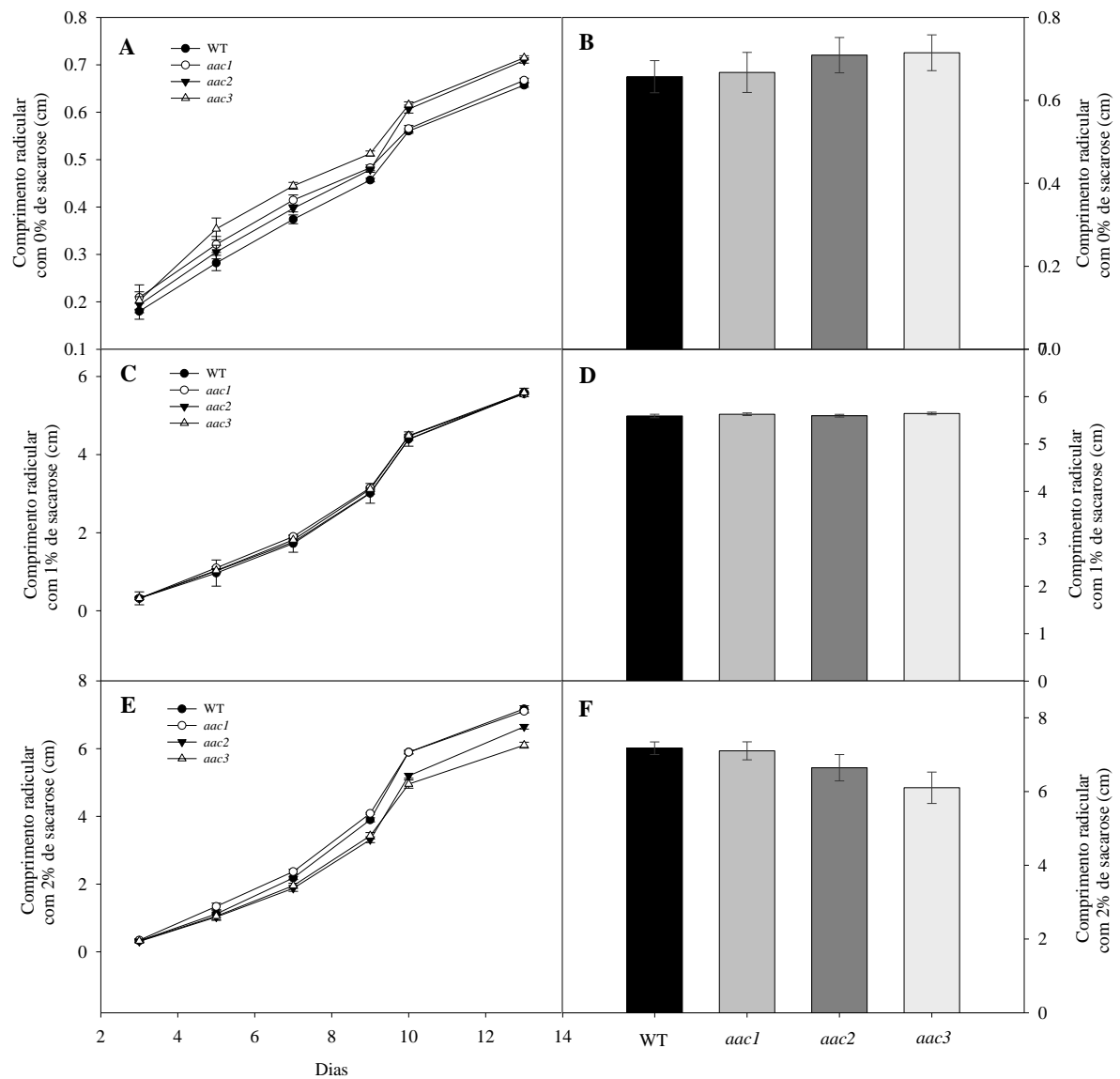
**Figura suplementar 4-** Análise *in silico* do gene AAC3 em diferentes tecidos. Fonte: Arabidopsis eFP Browser <<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>>



**Figura suplementar 6.** Quantificação de clorofilas em folhas de *A. thaliana* com expressão reduzida de *AAC1*, *AAC2* e *AAC3*, em plantas com cinco semanas de idade e posteriormente expostas a condições de 28 horas de luz contínua, 52 horas de luz contínua, quatro dias de pleno escuro e oito dias de pleno escuro. As amostras foram coletadas no mesmo período do dia. A, clorofila *a*. B, clorofila *b*. C, conteúdo de clorofila *a* + *b*. D, razão clorofila *a/b*. Valores representam a média  $\pm$  erro padrão de cinco plantas individuais e os asteriscos indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ), segundo o teste *t* de Student, em comparação com o tipo selvagem. A área branca do gráfico representa à condição controle referente à coleta realizada antes da submissão do tratamento luminoso, a amarela é referente às condições de luz contínua e a cinza é referente às condições de pleno escuro. MF: massa fresca.



**Figura Suplementar 7-** Germinação de sementes de *A. thaliana* com expressão reduzida de *AAC1*, *AAC2* e *AAC3*. Percentual de germinação em meio MS com 0% (A) e 1% (C) de sacarose ao longo de três dias. Percentual de germinação em meio MS com 0% (B) e 1% (D) de sacarose ao final da avaliação. Valores representam a média  $\pm$  erro padrão de dez placas, cada uma com 50 sementes por genótipo e os asteriscos indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ), segundo o teste *t* de Student, em comparação com o tipo selvagem. MS: Murashige e Skoog.



**Figura suplementar 8-** Avaliação do crescimento radicular a partir de sementes de *A. thaliana* com expressão reduzida de *AAC1*, *AAC2* e *AAC3*. Comprimento radicular avaliado num período de 13 dias com sementes cultivadas em meio MS contendo 0% (A), 1% (C) e 2% (E) de sacarose. Comprimento radicular ao final do período de avaliação de sementes cultivadas em meio MS contendo 0% (B), 1% (D) e 2% (F) de sacarose. Valores representam a média  $\pm$  erro padrão de oito placas, cada uma com cinco sementes por genótipo e os asteriscos indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ), segundo o teste *t* de Student, em comparação com o tipo selvagem. MS: Murashige e Skoog.

**Tabela Suplementar 1-** Primers utilizados nas análises de RT-PCR realizadas neste estudo

<b>Gene</b>	<b>Locus</b>	<b>Forward primer</b>	<b>Reverse primer</b>
<i>AAC1</i>	At3g08580	5'-CTCCTCACTGGTGACTTACAGGAC-3'	5'-TTGTACTTGACAGCTTCACCAGAC-3'
<i>AAC2</i>	At5g13490	5'- CTCATTTCTTCTTCTTCGCTCA-3'	5'- AGCTCAAGAGTTGGCCAGAA-3'
<i>AAC3</i>	At4g28390	5'- GTGTTGGGTAAGAAGTATGGCT-3'	5'- AGAACTAAGACAAAGGGCCACA-3'
<i>APC1</i>	At5g61810	5'-GGAGCCAGGTCCTTTGATACAAC-3'	5'-TCAGAAACTCTTGGCCCATGC-3'
<i>APC3</i>	At5g07320	5'-CGAGATGGGCGTGTTGATTACC-3'	5'-AATGCCGGCCTTAACAAGAGC-3'
<i>ADNT1</i>	At4g01100	5'-TGGAAGGCTAACTGTCCAGACC-3'	5'-TGGAAGCCAACCACGGTACAAG-3'
<i>NTT1</i>	At1g80300	5'-TGTGTATGTCGGTGCCCTTCAG-3'	5'-GCAGCTTTGCCTTTAACCTTGG-3'
<i>NTT2</i>	At1g15500	5'-TACTCGCAGCAGTGTACGTTGG-3'	5'-GCAGCTTTGCCTTTAACCTTGG-3'
<i>ATBT1</i>	At4g32400	5'-CTCGCCTTACAATTCAGAGAGGTG-3'	5'-AGAGTTCTGTGGGTCCTTCCTC-3'
<i>PNC1</i>	At3g05290	5'-ATCCAGCAATCAGGTGCAAGG-3'	5'-TTCTCCATATGGCATAACACAACCC-3'
<i>PNC2</i>	At5g27520	5'-TCTCTGCCTTTATGGCGTTTGTG-3'	5'-GCTTGAATCATAACCTTGCACCTG-3'
<i>ER-ANT1</i>	At5g17400	5'-TGGAGAGGAAACCAAGCCAATGTC-3'	5'-TGCAAAGTTGGAAGCCTGTGTAGG-3'
<i>ACT</i>	At2g37620	5'-CTTGCACCAAGCAGCATGAA -3'	5'-CCGATCCAGACACTGTACTTCCTT-3'

*AAC1*: ADP/ATP carrier 1, *AAC2*: ADP/ATP carrier 2, *AAC3*: ADP/ATP carrier 3, *APC1*: Adenine nucleotide/Phosphate Carrier 1, *APC3*: Adenine nucleotide/Phosphate Carrier 3, *ADNT1*: Adenine Nucleotide Transporter 1, *NTT1*: nucleotide transporter 1, *NTT2*: nucleotide transporter 2, *ATBT1*: Arabidopsis Brittle 1, *PCN1*: Peroxisomal adenine nucleotide carrier 1, *PCN2*: Peroxisomal adenine nucleotide carrier 2, *ER-ANT1*: Endoplasmic Reticulum Adenylate Transporter1, *ACT*: Actin.

**Tabela Suplementar 2-** Similaridade (em porcentagem) entre sequências de aminoácidos deduzidos de todas as proteínas transportadoras de adenilatos contidas na célula vegetal, até então descritas em *Arabidopsis thaliana*.

(%)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<b>1 -AAC1</b>	100,00														
<b>2 -AAC2</b>	86,53	100,00													
<b>3 -AAC3</b>	74,94	74,62	100,00												
<b>4 -APC1</b>	27,30	27,05	28,25	100,00											
<b>5 -APC2</b>	29,54	28,32	29,29	67,62	100,00										
<b>6 -APC3</b>	26,84	27,21	27,78	80,83	74,33	100,00									
<b>7 -ADNT1</b>	26,54	26,89	27,71	36,31	34,58	35,49	100,00								
<b>8 -NTT1</b>	-	-	-	-	-	-	47,37*	100,00							
<b>9 -NTT2</b>	-	-	-	-	-	-	47,37*	89,42	100,00						
<b>10 -TAAC/PAPST1</b>	30,00	29,39	31,43	30,22	36,69	30,97	31,73	-	-	100,00					
<b>11 -ATBT1</b>	28,72	27,30	29,89	35,02	32,85	35,14	34,47	-	-	33,45	100,00				
<b>12 -PNC1</b>	23,23	22,64	22,52	24,91	26,53	23,37	22,73	-	-	27,81	22,07	100,00			
<b>13 -PNC2</b>	24,24	22,97	22,90	24,05	24,57	24,05	25,74	-	-	24,08	21,62	86,73	100,00		
<b>14 -ER-ANT1</b>	61,77	61,09	63,79	28,21	28,62	26,64	28,66	-	-	30,79	28,09	24,88	25,56	100,00	
<b>15 -PM-ANT1</b>	40,40	39,40	39,27	30,26	25,48	27,39	30,47	35,48*	26,56*	28,00	25,68	20,58	21,41	37,25	100,00

AAC1 (AT3G08580): ADP/ATP carrier 1, AAC2 (AT5G13490): ADP/ATP carrier 2, AAC3 (At4g28390): ADP/ATP carrier 3, APC1 (At5g61810) : Adenine nucleotide/Phosphate Carrier 1, APC2 (At5g51050): Adenine nucleotide/Phosphate Carrier 2, APC3 (At5g07320): Adenine nucleotide/Phosphate Carrier 3, ADNT1(At4g01100): Adenine Nucleotide Transporter 1, NTT1(At1g80300): nucleotide transporter 1, NTT2 (At1g15500): nucleotide transporter 2, TAAC/PAPST1 (At5g01500): PAPS/PAP carrier in plastids and an ATP/ADP carrier in the thylakoid membrane, ATBT1(At4g32400): Arabidopsis Brittle 1 PCN1 (At3g05290): Peroxisomal adenine nucleotide carrier 1, PCN2 (At5g27520): Peroxisomal adenine nucleotide carrier 2, ER-ANT1(At5g17400): Endoplasmic Reticulum Adenylate Transporter1, PM-ANT1(At5g56450): Plasma Membrane Adenylate Transporter. O símbolo ‘\*’ representa similaridades com valor de cobertura menor que 20. O símbolo ‘-’ representa similaridade não detectada.

**Tabela suplementar 3.** Parâmetros relacionados à avaliação da germinação de plantas de *A. thaliana* com baixa expressão dos genes *AAC1*, *AAC2* e *AAC3* em meio MS contendo 0% e 1% de sacarose. As avaliações foram realizadas num período de três dias, a contar posteriormente ao período de estratificação, onde as sementes foram submetidas ao escuro numa temperatura de 4°C durante três dias

0% sacarose				
PARÂMETROS	WT	<i>aac1</i>	<i>aac2</i>	<i>aac3</i>
<b>IVG</b>	46,58 ± 1,44	46,6 ± 2,00	45,76 ± 0,81	43,87 ± 1,67
<b>TMG</b>	0,94 ± 0,03	0,93 ± 0,04	0,92 ± 0,01	0,87 ± 0,03
<b>VMG</b>	1,07 ± 0,04	1,08 ± 0,05	1,09 ± 0,02	1,15 ± 0,05
1% sacarose				
PARÂMETROS	WT	<i>aac1</i>	<i>aac2</i>	<i>aac3</i>
<b>IVG</b>	50,02 ± 1,15	49,84 ± 1,19	47,33 ± 1,45	49,20 ± 1,95
<b>TMG</b>	1,00 ± 0,02	1,00 ± 0,03	0,94 ± 0,02	0,99 ± 0,03
<b>VMG</b>	0,99 ± 0,03	0,99 ± 0,04	1,05 ± 0,03	1,01 ± 0,05

Os valores representam a média ± erro padrão de oito placas independentes contendo 50 sementes de cada genótipo; valores em negrito apresentam diferenças significativas pelo teste *t* de Student ( $P < 0,05$ ) em comparação com o tipo selvagem (WT). **Abreviações:** \*IVG: índice de velocidade de germinação (adimensional). TMG: tempo médio de germinação (dias). VMG: velocidade média de germinação (dias). MS: Murashige e Skoog.