



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



## **Proteínas desacopladoras mitocondriais e transportadores de dicarboxilatos em plantas: estudos funcionais e fisiológicos.**

**Mariana de Lara Campos Arcuri**

**Botucatu – SP**

**2021**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“Júlio de Mesquita Filho”  
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Proteínas desacopladoras mitocondriais e transportadores de dicarboxilatos em plantas: estudos funcionais e fisiológicos.

**M.Sc. Mariana de Lara Campos Arcuri**

**Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia**

Tese apresentada ao Instituto  
de Biociências, Câmpus de Botucatu,  
UNESP, para obtenção do título de Doutora  
no Programa de Pós- Graduação  
em Ciências Biológicas (Genética).

**BOTUCATU – SP**

**2021**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Arcuri, Mariana de Lara Campos.

Proteínas desacopladoras mitocondriais e transportadores de dicarboxilatos em plantas : estudos funcionais e fisiológicos / Mariana de Lara Campos Arcuri. - Botucatu, 2021

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu  
Orientador: Ivan de Godoy Maia  
Capes: 20203004

1. Plantas - Melhoramento genético. 2. Transportadores de ácidos dicarboxílicos. 3. Proteínas de desacoplamento mitocondrial. 4. Homeostase.

Palavras-chave: Caracterização molecular; Carreadores de dicarboxilato; Expressão relativa; Homeostase mitocondrial; Proteínas desacopladoras.

## **Agradecimentos**

À Deus, por iluminar meu caminho e me amparar em momentos difíceis.

Aos meus pais, pela dedicação, amor e inspiração, com quem compartilho o mérito de toda e qualquer conquista, “pais, os amo!”.

Ao Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia, pela orientação, dedicação e paciência.

Às pessoas que passaram por minha vida e que, de alguma forma, me auxiliaram na construção do meu ser, no entanto, em especial, ao Alexandre Bortoloto, LÊ, sem o qual o caminho teria sido mais árduo, o agradecerei eternamente por fazer parte da minha história.

Aos colegas de departamento e laboratório pelo convívio e aprendizado. Cabe menção a contribuição da Dra. Alessandra Vasconcellos Nunes-Laitz, não somente na condução do estudo, mas em minhas formações profissional e pessoal, a ela agradeço a parceria, tempo e inspiração. Aos alunos de iniciação científica, agradeço a confiança e oportunidade de co-orientá-los.

Aos demais amigos, os quais seria inviável nominá-los e, aqui, incluo os caninos, por, por vezes, me confortarem apenas com o olhar. Agradeço, também, pelos puxões de orelha que me concederam novas perspectivas e diretrizes.

Ao meu irmão e demais familiares, estendo aos familiares não sanguíneos.

A todos os colaboradores que contribuíram com este trabalho.

Finalmente, às minhas crianças, alunos da rede estadual de ensino, que diariamente me inspiraram a preservar a essência do cientista que elas genuinamente apresentam. Estendo o agradecimento aos colegas de profissão e demais funcionários das Escolas Estaduais pelas quais passei por suas orientações durante minha introdução à docência na rede básica de ensino, com especial menção à D. Neide e ao professor Nei por abraçarem meus projetos mirabolantes.

Ao CNPq (Processo 141321/2018-0), pelo apoio financeiro.

## RESUMO

As proteínas desacopladoras mitocondriais (UCPs) e os carreadores de dicarboxilatos (DIC) pertencem à família dos transportadores mitocondriais cujas funções são determinantes na manutenção da homeostase mitocondrial. As UCPs estão presentes na membrana mitocondrial interna e atuam dissipando o gradiente eletroquímico de prótons produzido durante a respiração. As DICs, por sua vez, são responsáveis pelo influxo de dicarboxilatos através da membrana mitocondrial interna a expensas de fosfato inorgânico e elementos derivados de enxofre. Três genes codificadores de UCPs (*AtUCP1-3*) e três de DICs (*AtDIC1-3*) foram identificados no genoma de *Arabidopsis thaliana*. No presente estudo, a função *in planta* destes carreadores foi investigada. A caracterização de mutantes de inserção de T-DNA para os genes *AtUCP1* e *AtUCP2* revelou uma redução no número de folhas no mutante *atucp2* e um claro comprometimento do desenvolvimento reprodutivo das linhagens mutantes. Corroborando tal observação, um drástico efeito nos níveis de expressão de fatores de transcrição associados ao desenvolvimento dos órgãos reprodutivos foi evidenciado nos mutantes. Adicionalmente, a atividade do gene repórter *GUS* sobre controle das regiões promotoras dos genes alvos se revelou intimamente associada aos órgãos reprodutivos. Análises de marcação de espécies reativas de oxigênio (EROS) e de expressão relativa de genes marcadores da função mitocondrial, incluindo a oxidase alternativa, demonstraram que a homeostase mitocondrial foi afetada nos mutantes *atucp1-2* durante o desenvolvimento vegetativo e reprodutivo. Em paralelo, a caracterização de linhagens contendo inserções de T-DNA nos genes *AtDIC1-3* revelou incrementos na área foliar e biomassa, aumento do acúmulo de EROs e alterações na germinação. Em contrapartida, a superexpressão do gene *AtDIC2* promoveu um acometimento nos parâmetros fenotípicos supracitados com evidente redução no acúmulo de biomassa quando comparado ao controle Col-0. Do ponto de vista fisiológico, a capacidade fotossintética revelou-se elevada nos referidos mutantes, fato evidenciado pelas altas taxas de assimilação de carbono e capacidade de re-oxidação da clorofila. Uma possível expressão compensatória do gene *AtDIC2* foi observada nos mutantes *atdic1* e *atdic3*. Análises do perfil metabólico de tais mutantes indicaram um maior acúmulo de carboidratos (37,6%), lipídeos (13,4%), ácidos orgânicos (11,8%) e aminoácidos (10,5%). Rotas de resposta aos estresses oxidativo e hídrico, como as vias do metabolismo de ascorbato e da prolina, respectivamente, também se mostraram alteradas. Uma alteração significativa no metabolismo de fenilalanina que, entre outros processos, está relacionada com a resposta aos estresses mecânico e biótico também foi constatada. Quando analisada de forma integrada com os níveis

de chiquimato, esses dados sugerem uma alteração no ponto de convergência entre os metabolismos primário e secundário.

**Palavras chave:** proteínas desacopladoras, carreadores de dicarboxilato, caracterização molecular, expressão relativa, homeostase mitocondrial.

## ABSTRACT

Mitochondrial uncoupling proteins (UCPs) and dicarboxylate carriers (DIC) are proteins belonging to the mitochondrial carriers family (MCF) that play a crucial role in the maintenance of mitochondrial homeostasis. The mitochondrial uncoupling proteins (UCPs) are present in the inner mitochondrial membrane, where they dissipate the electrochemical gradient of protons produced during respiration. DICs, in turn, promote the influx of dicarboxylates across the inner mitochondrial membrane at expenses of inorganic phosphate and sulfur-derived elements. Three genes encoding UCPs (*AtUCP1-3*) and three encoding DICs (*AtDIC1-3*) were identified in the genome of *Arabidopsis thaliana*. In this study, the function of these genes was investigated *in planta*. The characterization of T-DNA insertion mutants for the *AtUCP1* and *AtUCP2* genes revealed a reduction in the number of leaves in the *atucp2* mutant as well as an impairment of reproductive development in both *atucp1* and *atucp2* mutant lines. In agreement, the mutant lines exhibited a drastic effect on the expression levels of transcription factors associated with the development of reproductive organs. Additionally, the activity of the GUS reporter gene under control of the *AtUCP1* and *AtUCP2* promoter regions suggested a close association between these isoforms and the reproductive development. Analyzes of reactive oxygen species (ROS) labeling and relative expression of mitochondrial function marker genes, including alternative oxidase, demonstrated that mitochondrial homeostasis was affected in *atucp1-2* mutants during vegetative and reproductive development. In parallel, the characterization of strains containing T-DNA insertions in *AtDIC1-3* genes revealed a significant increase in leaf area and biomass, higher accumulation of ROS and also alterations in seed germination in the mutants. By contrast, the *AtDIC2* overexpression lines exhibited an impairment on the phenotypic parameters showing a clear reduction in biomass accumulation when compared to Col-0. At physiological level, the mutant lines presented high rates of carbon assimilation and the re-oxidation capacity of chlorophyll thus, suggesting an improvement in the photosynthetic capacity of these mutants. A possible compensatory expression of the *AtDIC2* was observed in the *atdic1* and *atdic3* mutants. Analyzes of the metabolic profile of such mutants indicated a greater accumulation of carbohydrates (37.6%), lipids (13.4%), organic acids (11.8%) and amino acids (10.5%). Analyzes of the metabolic profiles of such mutants revealed that pathways responsive to oxidative and hydric stresses, such as the arcorbate and proline pathways, respectively, were altered. A significant alteration in the metabolism of phenylalanine that, among other processes, is related to the plant's response to mechanical and biotic stresses was also observed. When observed in an integrated way with the

shikimate levels, this data suggests an alteration in the convergence point between primary and secondary metabolisms.

**Key words:** uncoupling proteins, dicarboxylate carriers, molecular characterization, relative expression, mitochondrial homeostasis



## Sumário

<b>1. Introdução</b>	9
1.1 As proteínas desacopladoras mitocondriais	11
1.2 Os carreadores de dicarboxilatos (DICs)	14
<b>2. Objetivos</b>	19
<b>3. Capítulo I – Artigo “<i>Knockdown of Mitochondrial Uncoupling Proteins 1 and 2 (AtUCP1 and 2) in Arabidopsis thaliana Impacts Vegetative Development and Fertility</i>”.</b>	20
<b>4. Capítulo II – Os carreadores de dicarboxilato (DICs)</b>	40
4.1 Materiais e Métodos	40
4.1.1 Validação do padrão de expressão órgão/tecido-específico de <i>AtDIC1-3</i>	40
4.1.2 Análise de perda de função em mutantes de inserção <i>atdic1-3<sup>-/-</sup></i>	40
4.1.3 Análise de ganho de função em linhagens de <i>A. thaliana</i> superexpressoras	49
4.2 Resultados e Discussão	52
4.2.1 Validação dos padrões de expressão de <i>AtDIC1-3</i>	52
4.2.2 Avaliação funcional dos mutantes de inserção <i>atdic1-3</i>	53
4.2.3 Análises dos efeitos da inserção <i>in planta</i>	54
4.2.4 Análises de ganho de função em <i>Arabidopsis thaliana</i>	71
4.3. Considerações finais	75
4.4 Referências bibliográficas	77

## 1. Introdução

As mitocôndrias são organelas essenciais ao metabolismo aeróbico de organismos eucariotos. Apesar de implicadas em diversas funções celulares, essas organelas são amplamente conhecidas como geradoras da energia necessária ao metabolismo celular, uma vez que centralizam eventos envolvidos no catabolismo de precursores energéticos provenientes do citosol. No entanto, o papel das mitocôndrias na manutenção de outras vias em diversos compartimentos celulares através do fornecimento de substratos reitera a magnitude de tais organelas na homeostase celular.

Segundo a teoria endossimbionte, a origem das mitocôndrias está relacionada a um processo de endossimbiose entre um organismo procarioto aeróbico de vida livre e um organismo procarioto hospedeiro (Scheffler, 2008). Durante a co-evolução do organismo simbiote com a célula hospedeira primitiva, muitos genes do DNA endossimbionte foram perdidos. Essa perda, no entanto, caracterizou-se pela transferência de alguns dos genes deletados do DNA endossimbionte para o DNA nuclear da célula hospedeira, o que transformou a mitocôndria em uma organela semiautônoma dependente de diversos produtos codificados no núcleo. Do ponto de vista evolutivo, de maneira compensatória, a adição de sequências sinalizadoras de atividade mitocondrial para as proteínas codificadas por tais genes nucleares tornou-se necessária uma vez que, apesar da origem extra-mitocondrial, essas proteínas passaram a compor o proteoma da organela (Scheffler, 2008).

Dada sua função central, produção de ATP através da fosforilação oxidativa, cuja base é o ciclo do ácido cítrico em que há a formação de moléculas aceptoras de elétrons a partir da oxidação de nutrientes, faz-se necessário o constante fluxo de precursores energéticos e moléculas intermediárias. Devido ao seu duplo-envoltório composto por duas membranas (interna e externa), a mitocôndria precisa de transportadores específicos para viabilizar o fluxo de moléculas entre o seu espaço interno e o citosol, aspecto que confere diferentes propriedades de permeabilidade às suas membranas. Tais transportadores (revistos em Palmieri, 2013; Ruprecht e Kunji 2020), originados de mutações de transportadores pré-existent nas membranas da organela ancestral ou, ainda, da seleção de organelas contendo moléculas derivadas que passaram a desempenhar função correlacionada com transporte de substratos, permitiram a intensa comunicação entre os compartimentos intra e extra-mitocondriais. Cabe ressaltar que a habilidade regulatória da expressão destes transportadores permite, também,

ajustes metabólicos precisos dependendo da demanda celular. Esse aspecto conferiu às mitocôndrias a capacidade de atuar em diversos processos metabólicos.

Em condições metabólicas normais, o piruvato proveniente da glicólise citosólica deve ser transportado para o compartimento intra-mitocondrial onde, após sua oxidação, será transformado em Acetil-CoA e, assim, integrará o ciclo de Krebs (revisto em Zhao et al., 2019). No entanto, várias vias oxidativas podem conduzir à formação de Acetil-CoA, como a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos provenientes da hidrólise de lipoproteínas e/ou triacilgliceróis, ou ainda, através da oxidação de aminoácidos. A versatilidade de recursos para produção de energia e, ainda, a habilidade de responder à oferta de moléculas precursoras está intimamente relacionada com o controle do fluxo de nutrientes citoplasmáticos através de transportadores cuja expressão pode ser regulada de maneira transcricional em virtude do órgão/tecido ou do estímulo externo. Da mesma maneira que o influxo de nutrientes citosólicos é primordial para o metabolismo da organela, o efluxo de moléculas energéticas também é relevante e se dá por meio transportadores que precisam se ajustar às necessidades celulares. Através da atividade das proteínas desacopladoras, por exemplo, as mitocôndrias também regulam a produção de energia dissipando-a na forma de calor (Nicholls e Rial, 1999). Além do metabolismo energético, as mitocôndrias podem reger outras vias. Por exemplo, em casos de condição de excesso de carboidratos, a acetil-CoA derivada da oxidação de piruvato é devolvida ao citosol onde será direcionada para a síntese de triacilgliceróis, molécula mais energética que a glicose. Dentre os eventos com os quais as mitocôndrias relacionam-se direta ou indiretamente, destaca-se o fornecimento de intermediários para a gliconeogênese na ausência de açúcares. Seu metabolismo pode, também, sinalizar a morte celular devido a geração e eventual acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) e/ou nitrogênio (ERNs) (revisto em Zhao et al., 2019). . O aumento rápido e abrupto na produção e acúmulo de EROs e ERNs mitocondriais confere às mitocôndrias a capacidade de regular a expressão de vários genes nucleares, mecanismo conhecido como regulação retrógrada que pode ser, ainda, independente de espécies reativas (Hartl e Finkemeier, 2012; Umbach *et al.*, 2012).

O metabolismo energético mitocondrial envolve a ação conjunta do ácido cítrico, da cadeia respiratória e da fosforilação oxidativa. A diversidade e a magnitude das vias bioquímicas que ocorrem na mitocôndria, ou com as quais elas estão relacionadas, demandam o acesso a substratos e produtos, sendo o transporte destes compostos crucial para a manutenção da homeostase tanto mitocondrial, quanto celular e do organismo como um todo.

Durante a fosforilação oxidativa, a cadeia transportadora de elétrons produz EROs constantemente. As mitocôndrias vegetais são dotadas de sistemas considerados dissipativos, as vias da oxidase alternativa (AOX) e da NADH desidrogenase (NADH-D), sendo a primeira reportada na literatura como marcador de distúrbios no metabolismo mitocondrial, uma vez que atua na regulação do acúmulo de EROs mitocondriais e, por consequência, na comunicação retrógrada e na manutenção da homeostase mitocondrial (Moller, 2001; Vanlerberghe, 2013). As EROs mais comuns são o superóxido ( $O^{\cdot-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxil (OH) (Mittler *et al.*, 2002). Condições exógenas como o estresse ambiental provocam um aumento rápido nos níveis de EROs o que, dependendo da concentração, pode causar dano ou ser usado na sinalização.

Um terceiro sistema dissipador de energia presente nos vegetais, as chamadas proteínas desacopladoras mitocondriais (*uncoupling proteins*; UCPs), atuam no controle da produção e acúmulo de EROs mitocondrial exercendo, portanto, um papel central na proteção mitocondrial e celular, em especial em condição de estresse oxidativo (Jarmuszkiewicz *et al.*, 1998; Almeida *et al.*, 1999; Maxwell *et al.*, 1999; Brandalise *et al.*, 2003).

### **1.1 As proteínas desacopladoras mitocondriais**

As membranas do duplo envoltório das mitocôndrias variam não somente em composição lipídica, sendo a externa mais rica em lipídeos que a interna, mas também em termos de permeabilidade e presença de elementos transportadores transmembrana. A permeabilidade da membrana interna, por exemplo, é extremamente restrita a fim de minimizar a dissipação de energia gerada durante a formação do gradiente eletroquímico de prótons. Segundo a teoria quimioosmótica de Mitchell (em Morelli *et al.*, 2019), a baixa permeabilidade da membrana mitocondrial interna elucidada a natureza do transporte de íons: o simporte (em que há um fluxo unidirecional de íons) e o antiporte que, por sua vez, pode ser neutro (transporta íons de mesma carga em direções opostas da membrana) ou eletrogênico (transporta íons de cargas diferentes em direções opostas da membrana, gerando um gradiente eletroquímico). Em 1967, Mitchell e Moyle relataram como ânions atuavam sobre o comportamento do gradiente de pH em células hepáticas de ratos e com base nisso, evidenciaram a existência de sistemas de transporte de ânions acoplados ao movimento de prótons, possibilitando a identificação da família de cotransportadores de ânions acoplados a metabólitos. A literatura aponta, ainda, a capacidade de algumas proteínas de membrana em desempenhar papel de canal iônico como é o caso, por exemplo, das UCPs (Maack e O'Rourke, 2007; O'Rourke, 2007). Tais esclarecimentos não

somente elucidaram o conteúdo acerca dos transportadores mitocondriais como também os intensificaram.

Os transportadores que catalisam o transporte de diferentes solutos através das membranas mitocondriais, processo essencial para conectar o metabolismo interno da mitocôndria com o ambiente celular (revisto em Palmieri *et al.*, 2011), pertencem à família dos carreadores mitocondriais (MCF). Os membros dessa família têm ampla distribuição entre os eucariotos, e embora não sejam restritos às mitocôndrias, a maioria está presente na membrana mitocondrial interna (Sze *et al.*, 2014). Na organela, por sua vez, representam a única família de carreadores presente (Sze *et al.*, 2014). Apesar de apresentar especificidade variada a substratos, os membros desta família compartilham propriedades físico-químicas como, por exemplo, massa molecular variável entre 30 e 35 kDa, e uma configuração estrutural tripartida derivada de eventos de duplicação em *tandem* de sequências de aproximadamente 100 resíduos de aminoácidos cada, assumindo, assim, uma conformação com seis domínios trans-membrana (Sze *et al.*, 2014). Em 1997, Nelson e colaboradores identificaram o motivo conservado presente nas três repetições, o que permitiu expandir o conhecimento e o número de membros da família MCF. Essa é composta por 35 e 53 membros em levedura (Palmieri *et al.*, 1996) e em mamíferos (Palmieri, 2013), respectivamente. No genoma humano foram identificadas 48 sequências codificadoras de MCF (também conhecida como *solute carrier 25 family; SLC25*) das quais 30 foram identificadas (Casimir *et al.*, 2009). Por outro lado, aproximadamente 58 proteínas funcionalmente relacionadas a estes carreadores foram evidenciadas nos vegetais (Picault *et al.*, 2004). As plantas apresentam um maior número de genes parálogos, indicando que, possivelmente, a duplicação ou preservação dos genes tenha sido mais intensa nos vegetais devido à sua condição restrita de desenvolvimento (Palmieri *et al.*, 2011). Em 1982, a primeira sequência e estrutura resolvida de um MCF, mais especificamente de um translocador de ATP/ADP bovino, foram publicadas por Saraste e Walker.

As UCPs, membros da MCF, são responsáveis por desacoplar a cadeia transportadora de elétrons durante a fosforilação oxidativa, isto é, são capazes de dissipar o gradiente de prótons na forma de calor, sendo esta atividade relacionada à presença de ácidos graxos e sensível a nucleotídeos purínicos (Nicholls, 1974; Nicholls e Rial, 1999). A primeira UCP identificada em espécies vegetais foi uma proteína com atividade similar à UCP1 de mamíferos (Ricquier e Kader, 1975) encontrada em batata (Vercesi *et al.*, 1995). Em um primeiro momento, a proteína identificada foi denominada PUMP (*plant uncoupling mitochondrial protein*), porém, alguns anos depois, essa denominação caiu em desuso sendo substituída por pUCP (*plant UCP*) e,

posteriormente, por UCP. Desde então, vários homólogos passaram a ser identificados em uma vasta gama de espécies vegetais.

Inicialmente, a literatura relatava a existência de uma família de UCPs em *Arabidopsis thaliana* composta por seis membros (denominadas *AtPUMPI-6*). No entanto, após análises bioquímicas robustas, Palmieri e colaboradores (2006) propuseram a recategorização de três destes seis membros (*AtPUMP4-6*), que foram então incluídos na família dos carreadores de dicarboxilato (*AtDICI-3*). Assim, apenas três genes codificadores de UCPs estão definitivamente presentes no genoma de *Arabidopsis* (*AtUCPI-3*) (Borecký *et al.*, 2006; Palmieri *et al.*, 2008). Outros genes homólogos já foram descritos em outras espécies vegetais, como, por exemplo, *SfUCP* em repolho, *WhUCP* em trigo, *OsUCP* em arroz e *ZmPUMP* em milho (Ito *et al.*, 1999; Murayama e Handa, 2000 ; Watanabe *et al.*, 2002; Brandalise *et al.*, 2003).

Devido à ampla presença de UCPs entre os eucariotos, diversas funções foram propostas para essas proteínas como, por exemplo, regulação do potencial da membrana mitocondrial, regulação do metabolismo energético na mitocôndria, redução do acúmulo de EROs e manutenção da homeostase redox. Adicionalmente, apresentam capacidade de promover o influxo de carboxilatos, além de influenciar no fluxo do ciclo do ácido cítrico (Jezek *et al.*, 1997; Considine *et al.*, 2003; Popov *et al.*, 2011; Vercesi *et al.*, 2006; Smith, 2004). Dados adicionais da literatura sugerem que as UCPs exercem um importante papel nas vias de resposta celular ao estresse oxidativo mitocondrial devido sua capacidade de atuar sobre as taxas respiratórias e, por consequência, sobre os níveis de geração de EROs, indicando que estas possam modular a produção de radicais livres em condições de estresse (Houron-Cabassa *et al.*, 2002; em Pastore *et al.*, 2007).

Estudos funcionais empregando mutantes de inserção para o gene *UCPI* de *Arabidopsis* (*atucp1*) revelaram que a redução da expressão da referida isoforma acomete a taxa de assimilação de carbono e induz um estresse fotossintético local e discreto sem afetar a resposta a estresses abióticos (Sweetlove *et al.*, 2006) Em contrapartida, a expressão constitutiva do gene *AtUCPI* em plantas transgênicas de tabaco conduz a um ganho de tolerância ao estresse oxidativo exógeno, assim como aos estresses salino e osmótico (Brandalise *et al.*, 2003; Begcy *et al.*, 2011). Paralelamente, Chen e colaboradores (2014) demonstraram que o gene *LeUCP* de tomate é essencial para manter o equilíbrio redox e a atividade de enzimas antioxidantes em resposta ao estresse oxidativo, reduzindo assim a produção e acúmulo de EROs.

Diante da potencial relevância das proteínas desacopladoras vegetais e a brevidade das informações funcionais referentes às mesmas, em especial das outras isoformas presentes em *Arabidopsis*, o presente trabalho visou elucidar o papel biológico destas proteínas na referida planta modelo. Os resultados deste trabalho foram publicados no periódico *Plant & Cell Physiology* sob o título “*Knockdown of Mitochondrial Uncoupling Proteins 1 and 2 (AtUCP1 and 2) in Arabidopsis thaliana Impacts Vegetative Development and Fertility*” e o artigo encontra-se disponível no primeiro capítulo desta tese.

## 1.2 Os carreadores de dicarboxilatos (DICs)

Os carreadores de dicarboxilato (DIC) promovem o influxo de dicarboxilatos através da membrana mitocondrial interna a expensas de fosfato inorgânico e elementos derivados de enxofre (Coty e Pedersen, 1975). Os dicarboxilatos são importantes substratos e intermediários do ciclo de Krebs, podendo ainda atuar em outros processos metabólicos como, por exemplo, na síntese de aminoácidos e nucleotídeos e na gliconeogênese. Em células de mamíferos, os DICs desempenham um importante papel na gliconeogênese, na síntese de ureia e no metabolismo do enxofre (Krämer e Palmieri, 1992), enquanto que em levedura, aparentemente, desempenham um papel anaplerótico (Palmieri *et al.*, 1999). Em células de mamíferos, este carreador é o membro 10 da família SLC25A (denominado SLC25A10) sendo responsável pelo transporte de malato e succinato em troca de fosfato inorgânico. Mizuarai e colaboradores (2005) demonstraram que o gene *SLC25A10* é ubiquamente expresso e seu produto fornece malato citosólico para carreadores de citrato atuando, portanto, em vias de síntese *de novo* de ácidos graxos.

Análises bioquímicas e computacionais realizadas por Iacopetta e colaboradores (2011) evidenciaram a preferência por diferentes substratos entre membros dos carreadores de dicarboxilatos de *Drosophila melanogaster* e a existência de uma possível especialização funcional entre eles foi proposta. Neste contexto, a especificidade e/ou preferência por substratos é variável entre os organismos e muito se discute sobre a capacidade dos DICs em transportar glutatona reduzida. Kamga e colaboradores (2010) verificaram a cooperação entre DICs e carreadores de oxaloglutarato (OGCs) no transporte de glutatona reduzida para o interior de mitocôndrias de neurônios de ratos. Neste caso, o *knockdown* de DIC reduziu os níveis de captação de glutatona e promoveu uma alteração do *status* eletroquímico do compartimento intra-mitocondrial. No entanto, Lee e colaboradores (2015), ao fusionar DICs e OGCs de *Lactococcus lactis* e realizar testes funcionais em lipossomos, demonstraram que tais

carreadores são incapazes de transportar glutatona. Neste caso, os autores verificaram que, mesmo em ampla faixa de pH, os níveis de glutatona permaneceram estáveis entre os compartimentos.

Os transportadores DICs, dentre eles o SLC25A10 de humanos, são amplamente estudados na área médica, e estão associados a diversos distúrbios metabólicos. Em 1991, por exemplo, Kaplan e colaboradores associaram o quadro de diabetes *mellitus* tipo 2 aos níveis de expressão de alguns transportadores mitocondriais, entre eles o SLC25A10 que se mostrou induzido. Já em 2013, Wilkins e colaboradores, ao promover o *knockdown* do gene *SLC25A10* em neurônios cerebelares de ratos, observaram um agravamento do quadro oxidativo das células. A literatura relata ainda a associação entre os níveis de expressão de *SLC25A10* e a capacidade proliferativa de tumores em células adenocarcinômicas do epitélio basal de alvéolos. Neste exemplo, o *knockdown* do referido carreador empregando interferência por RNA levou a uma diminuição das taxas proliferativas, conduzindo o tumor a um quadro menos maligno e mais suscetível ao estresse oxidativo e, assim, à terapia (Zhou *et al.*, 2015). Estudos adicionais evidenciaram a indução da expressão de *SLC25A10* em células tumorais (Su *et al.*, 2007; Okayama *et al.*, 2012).

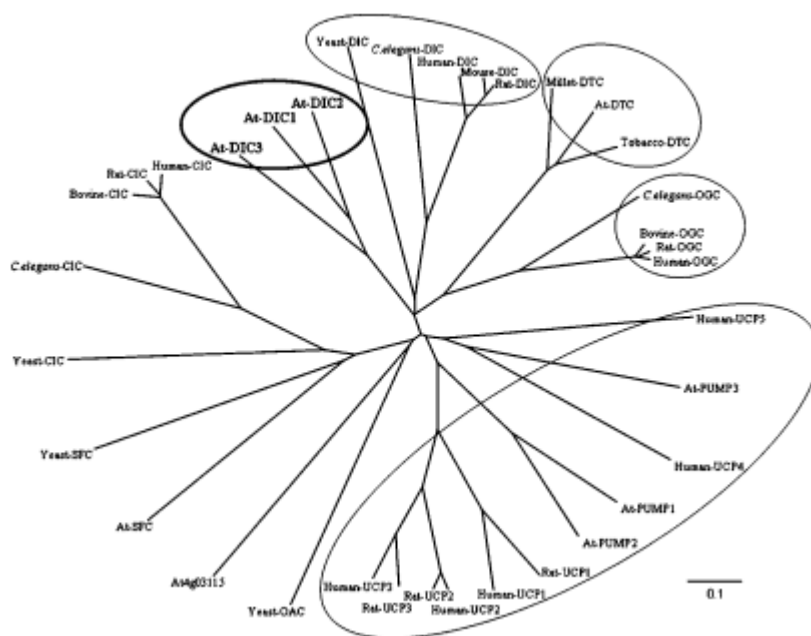
Em mitocôndrias vegetais, evidências experimentais indicam que os carreadores de dicarboxilatos podem participar de diversos processos metabólicos que incluem a síntese primária de aminoácidos (assimilação de amônia), o metabolismo de ácidos graxos (mobilização durante a germinação), a gliconeogênese e a síntese de isoprenóides (Brustovetsky *et al.*, 1994; Samartsev *et al.*, 1997). Em vegetais, apesar de pouco estudados, os DICs podem ainda estar envolvidos no transporte de agentes redutores através da membrana mitocondrial interna (*shuttle malato-aspartato*), acionando, assim, a cadeia transportadora de elétrons (Hanning *et al.*, 1999). Destaca-se, ainda, o intenso papel anaplerótico já que a inibição desses carreadores compromete a oxidação de malato e succinato em mitocôndrias vegetais (Wiskich, 1975; Day e Hanson, 1997). Do ponto de vista molecular, no único trabalho disponível na literatura, Palmieri e colaboradores (2008) caracterizaram três genes codificadores de DIC (nomeados *AtDIC1-3*) na planta modelo *A. thaliana*, os quais foram inicialmente designados como membros da família UCP (Borecký *et al.*, 2006). De maneira semelhante aos DICs não vegetais, *AtDIC1-3* apresentam afinidade por uma variedade de substratos: malato, succinato, oxaloacetato, fosfato, sulfato e tiosulfato. No entanto, diferentemente de DICs de mamíferos, nos vegetais eles também são capazes de transportar 2-oxoglutarato, porém com baixa eficiência. A alta afinidade por malato e baixa eficiência no



transporte de fosfato aproxima, do ponto vista bioquímico, os DICs vegetais àqueles presentes em levedura e *Caenorhabditis elegans*. A promiscuidade de substratos transportados pelos DICs vegetais sugere ainda a existência de possível redundância funcional entre as isoformas de DICs e outros carreadores mitocondriais vegetais, como, por exemplo, os carreadores de succinato/fumarato e carreadores de di-tricarboxilatos (Palmieri *et al.*, 2008).

Os genes *AtDIC1* e *AtDIC2* apresentam fases abertas de leitura de 942 pares de base (pb) que codificam proteínas de 313 aminoácidos com massa molecular estimada de 33,4 e 32,9 kDa, respectivamente. Estas compartilham 70% de identidade. Por outro lado, a proteína codificada por *AtDIC3* possui 337 aminoácidos e massa molecular estimada de 36,1 kDa, compartilhando entre 55 e 60% de identidade com as demais isoformas. Essa queda de identidade se deve a pequenas inserções posteriores ao 36º resíduo de aminoácido no sentido N-terminal de *AtDIC3*. Quanto à organização genômica, o gene *AtDIC3* distingue-se dos demais, pois é o único que possui um íntron canônico do tipo 2. O grau de identidade compartilhado entre as isoformas *AtDIC1-3* reflete na especificidade de substratos por elas transportados *i.e.* *AtDIC1* e *AtDIC2* transportam preferencialmente malato e succinato à expensas de fosfato e sulfato, enquanto *AtDIC3* revela uma especialização no transporte de oxaloacetato à expensas de tiosulfato (Palmieri *et al.*, 2008). Palmieri e colaboradores (2008) observaram ainda um padrão ubíquo de expressão para os genes *AtDIC1* e *AtDIC2*, no entanto, divergente quanto à sua preferência por órgãos/tecidos. O gene *AtDIC1* é mais expresso em raiz e caule enquanto que o gene *AtDIC2* apresenta expressão enriquecida também em folha. O gene *AtDIC3*, por sua vez, apresenta expressão exclusiva em botões florais e sílicas, sendo de difícil detecção. Em conjunto, esses dados sugerem uma possível especificidade funcional.

Filogeneticamente, *AtDIC1-3* estão proximamente relacionadas entre si, porém, quando comparadas às sequências de DICs não-vegetais, segregam-se formando um *cluster* isolado (Figura 1). Este dado sugere que os DICs vegetais tenham se originado de um evento de duplicação de um gene ancestral comum (Catoni *et al.*, 2003; Palmieri *et al.*, 2008). Curiosamente, como já mencionado, as isoformas presentes em *Arabidopsis* estão filogeneticamente relacionadas às proteínas mitocondriais desacopladoras, sendo inicialmente classificadas como tal por Borecký e colaboradores (2006). Entretanto como já realçado anteriormente, do ponto de vista funcional os substratos transportados pelas *AtDICs* se assemelham em parte àqueles transportados pelas DICs de animais e leveduras (Palmieri *et al.*, 2008).



**Figura 1.** Árvore filogenética dos carreadores de dicarboxilato de diferentes organismos (Palmieri *et al.*, 2008)

Em relação ao provável papel fisiológico, apesar da falta de estudos, uma possível função na manutenção da homeostase celular sob condições adversas pode ser vislumbrada, já que alguns dados evidenciam que os genes *AtDIC1-3* têm a sua expressão modulada por estresses (Palmieri *et al.*, 2008). Segundo dados de RNA-Seq, os genes *AtDIC1* e *AtDIC2* são responsivos a diferentes condições de estresses abióticos, sendo a expressão de *AtDIC1* reprimida em condições de anóxia e hipóxia e induzida pelo estresse salino, enquanto que a expressão de *AtDIC2* é reprimida pela exposição à luz ultravioleta e induzida por agentes oxidantes como, por exemplo, o peróxido de hidrogênio. Em um estudo mais recente, Van Aken e colaboradores (2016) demonstraram que os genes *AtDIC1-3* figuram entre os genes altamente induzidos em resposta ao estímulo mecânico, com especial destaque ao gene *AtDIC2*, cuja expressão é induzida 91 vezes. Esses resultados são corroborados por dados da literatura que relatam a notoriedade dos referidos genes entre aqueles com expressão enriquecida em condições de estresse mecânico (Lee *et al.*, 2005). A expressão de *AtDIC1-2* mostra-se atrelada, ainda, em resposta a estresses bióticos. Czobor e colaboradores (2019), por exemplo, detectaram um rápido aumento da expressão dos referidos genes em resposta ao tratamento com o elicitor bacteriano HrpZ<sub>pto</sub> derivado de *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. Neste caso, uma indução da expressão dos genes *AtAOX1a* e *AtAOX1d* também foi observada, o que promoveu um acúmulo exacerbado de EROs, especialmente peróxido de hidrogênio.

Dada a sua bem documentada implicação em processos metabólicos essenciais e potencial relação com mecanismos de tolerância a determinados estresses, os DICs representam um importante alvo de estudo com grande potencial de aplicação biotecnológica, especialmente nos vegetais. Em contrapartida, a falta de dados moleculares e a incipiência de informações sobre o papel fisiológico dos DICs nos vegetais apontam para a necessidade de estudos mais aprofundados. Neste contexto, o presente trabalho buscou caracterizar molecular e funcionalmente a família dos carreadores de dicarboxilatos de *Arabidopsis* visando um maior entendimento da função *in planta* desses carreadores. Os resultados obtidos indicam para a possibilidade de manipulação genética dos genes correspondentes visando a aquisição de desempenho e/ou de tolerância aos estresses ambientais.

## 2. Objetivos

O presente trabalho pretendeu empreender o estudo funcional dos genes que codificam, respectivamente, as proteínas desacopladoras (*AtUCP1-2*) e os carreadores de dicarboxilato (*AtDIC1-3*) na planta modelo *A. thaliana*. Para tal, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- Analisar a expressão dos genes *AtUCP1-3* e *AtDIC1-3* em resposta a estresses bióticos e abióticos;
- Avaliar os padrões de expressão de *AtDIC1-3* durante o desenvolvimento vegetal;
- Investigar a funcionalidade e a redundância funcional destes genes empregando mutantes de inserção de T-DNA (*atucp1-2* e *atdic1-3*) bem como linhagens superexpressoras de *AtDIC2*;
- Determinar o perfil metabólico de plantas com expressão alterada dos genes alvos.

**3. Capítulo I – Artigo “*Knockdown of Mitochondrial Uncoupling Proteins 1 and 2 (AtUCP1 and 2) in Arabidopsis thaliana Impacts Vegetative Development and Fertility*”.**

No presente capítulo disponibilizamos o artigo que relata a caracterização molecular e funcional dos genes *AtUCP1* e *AtUCP2* e seus impactos sobre o desenvolvimento vegetativo e na fertilidade vegetal publicado na revista *Plant & Cell Physiology* em 28 de julho de 2021.

## Knockdown of Mitochondrial Uncoupling Proteins 1 and 2 (AtUCP1 and 2) in *Arabidopsis thaliana* Impacts Vegetative Development and Fertility

Mariana de Lara Campos Arcuri<sup>1,†</sup>, Alessandra Vasconcellos Nunes-Laitz<sup>1,3,†</sup>, Rômulo Pedro Macêdo Lima<sup>1</sup>, Pedro Barreto<sup>2</sup>, Andressa Nagatani Marinho<sup>1</sup>, Paulo Arruda<sup>2</sup> and Ivan G. Maia<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Químicas e Biológicas, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, R. Prof. Dr. Antônio Celso Wagner Zanin, 250, Botucatu, SP 186 18-689, Brazil

<sup>2</sup>UNICAMP, Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Av. Cândido Rondon, 400, Campinas, SP 13083-875, Brazil

<sup>3</sup>Present Address: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia, Campus Colorado do Oeste, Colorado do Oeste, Brazil.

<sup>†</sup>These authors contributed equally to the work.

\*Corresponding author: E-mail, [ivan.maia@unesp.br](mailto:ivan.maia@unesp.br)

(Received 21 January 2021; Accepted 27 July 2021)

Mitochondrial uncoupling proteins (UCPs) are mitochondrial inner membrane proteins that dissipate the proton electrochemical gradient generated by the respiratory chain complexes. In plants, these proteins are crucial for maintaining mitochondrial reactive oxygen species (ROS) homeostasis. In this study, single T-DNA insertion mutants for two (*AtUCP1* and *AtUCP2*) out of the three UCP genes present in *Arabidopsis thaliana* were employed to elucidate their potential roles in planta. Our data revealed a significant increase in the Adenosine triphosphate (ATP)/Adenosine diphosphate (ADP) ratios of both mutants, indicating clear alterations in energy metabolism, and a reduced respiratory rate in *atucp2*. Phenotypic characterization revealed that *atucp1* and *atucp2* plants displayed reduced primary root growth under normal and stressed conditions. Moreover, a reduced fertility phenotype was observed in both mutants, which exhibited an increased number of sterile siliques and a lower seed yield compared with wild-type plants. Reciprocal crosses demonstrated that both male fertility and female fertility were compromised in *atucp1*, while such effect was exclusively observed in the male counterpart in *atucp2*. Most strikingly, a pronounced accumulation of hydrogen peroxide in the reproductive organs was observed in all mutant lines, indicating a disturbance in ROS homeostasis of mutant flowers. Accordingly, the *atucp1* and *atucp2* mutants exhibited higher levels of ROS in pollen grains. Further, alternative oxidase 1a was highly induced in mutant flowers, while the expression profiles of transcription factors implicated in gene regulation during female and male reproductive organ/tissue development were perturbed. Overall, these data support the important role for *AtUCP1* and *AtUCP2* in flower oxidative homeostasis and overall plant fertility.

**Keywords:** *Arabidopsis thaliana* • Mitochondria  
• Mitochondrial uncoupling protein • Plant fertility • UCP

### Introduction

Uncoupling proteins (UCPs) belong to the superfamily of mitochondrial carrier proteins (Haferkamp and Schmitz-Esser 2012). UCPs are located in the inner mitochondrial membrane and catalyze a proton conductance that dissipates the electrochemical gradient established by the respiratory chain, thus affecting the yield of ATP synthesis (Nicholls 2001). In plants, these proteins are involved in mitochondrial energy flow regulation and have been suggested to play a critical role in mitigating reactive oxygen species (ROS) production by the mitochondrial electron transport chain (Kowaltowski et al. 1998, Brandalise et al. 2003, Vercesi et al. 2006).

Analyses of the UCP coding genes in different plant species revealed the existence of small gene families (Borecký et al. 2006). Preliminary data from the model species *Arabidopsis thaliana*, for example, revealed the presence of six UCP family members (*AtUCP1-6*) (Borecký et al. 2006). A subsequent study, however, has demonstrated that the products of three of them, namely *AtUCP4-6*, display hallmark properties of mitochondrial dicarboxylate carriers, and the corresponding genes were therefore renamed *AtDIC1-3* (Palmieri et al. 2008). Notwithstanding, the biological significance of the presence of at least three different genes in *Arabidopsis* has been yet to be elucidated, and until now, the *AtUCP1* gene is the best characterized member of this family. In this context, disruption of *AtUCP1* resulted in an altered photorespiration and a reduced photosynthetic carbon assimilation rate (Sweetlove et al. 2006). Accordingly, recent lines of evidence have also implicated *AtUCP1* and *AtUCP2* in the transport of aspartate and glutamate, thus supporting a role for these proteins in the export of reducing equivalents from the mitochondria in photorespiration (Monné et al. 2018). Despite these results, the *in vivo* relevance of the *AtUCP2* and *AtUCP3* isoforms remains unclear.

Previous data derived from studies on *AtUCP1* have also pointed to the involvement of UCPs in plant stress responses, especially those associated with ROS generation (Kowaltowski et al. 1998, Brandalise et al. 2003, Smith et al. 2004). Consistent with this, an increase in drought and salt stress tolerance was evident in tobacco plants overexpressing *AtUCP1* (Begcy et al. 2011). The observed tolerance was correlated with reduced ROS accumulation in the transgenic plants as a result of increased *AtUCP1*-mediated mitochondrial uncoupling. Complementary findings have also shown that *AtUCP1* overexpression induces mitochondrial biogenesis and leads to an overall up-regulation of genes involved in energy metabolism, redox homeostasis and stress responses (Barreto et al. 2014, Laitz et al. 2015). Based on these and other observations, it is now accepted that UCP activity has important consequences not only in mitochondrial but also in chloroplast and cytosolic metabolism. Intriguingly, UCP-mediated ROS attenuation seems to be critical not only for abiotic stress tolerance but also to plant response to biotic stresses. It has been reported, for example, that Arabidopsis lines with decreased *AtUCP1* and *AtUCP2* expression are more susceptible to virus infection (Pu et al. 2016), while transgenic plants overexpressing a tomato UCP (LeUCP) are more tolerant to the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* (Chen et al. 2013).

Despite these demonstrated *in vivo* effects, it is still obscure as to whether the acquisition of stress tolerance requires the concerted action of the different *AtUCP* isoforms. It is possible that these isoforms act redundantly or additively during an imposed stress. In this regard, the fact that an Arabidopsis insertion mutant for *AtUCP1* (*atucp1*) was insensitive to different abiotic stress, despite an observed outcome on photosynthetic performance (Sweetlove et al. 2006), could be indicative of a compensatory effect. It should be emphasized that *AtUCP1* and *AtUCP2* are most closely related sharing 72% amino acid identity, and despite being ubiquitously expressed, their expression levels vary considerably among different organs/tissues (Borecký et al. 2006, Palmieri et al. 2008, Nogueira et al. 2011). In this context, *AtUCP2* is most stable and least abundantly expressed than *AtUCP1* (Nogueira et al. 2011). Intriguingly, although *AtUCP2* has been reported as localized in mitochondria (Monné et al. 2018), its exclusive mitochondrial location is still a matter of debate (Parsons et al. 2012). On the other hand, *AtUCP3* is the least related isoform sharing 35% and 37% amino acid identity with *AtUCP1* and *AtUCP2*, respectively.

Here, in order to get further insights into the roles of UCP in planta, we isolated and characterized T-DNA insertion mutants for *AtUCP2* and, in parallel, further investigated the previously described *atucp1* mutant, which has been functionally complemented (Sweetlove et al. 2006). By analyzing the associated whole plant phenotypes, we provide compelling evidence that wild-type (WT) *AtUCP1* and *AtUCP2* expression levels are required to sustain early development and overall plant fertility. The observed impairment in plant fertility was accompanied by an increase in ROS accumulation in flowers and pollen grains. Overall, our molecular, physiological and metabolic data

support a relevant metabolic role for *AtUCP* during early and reproductive development.

## Results

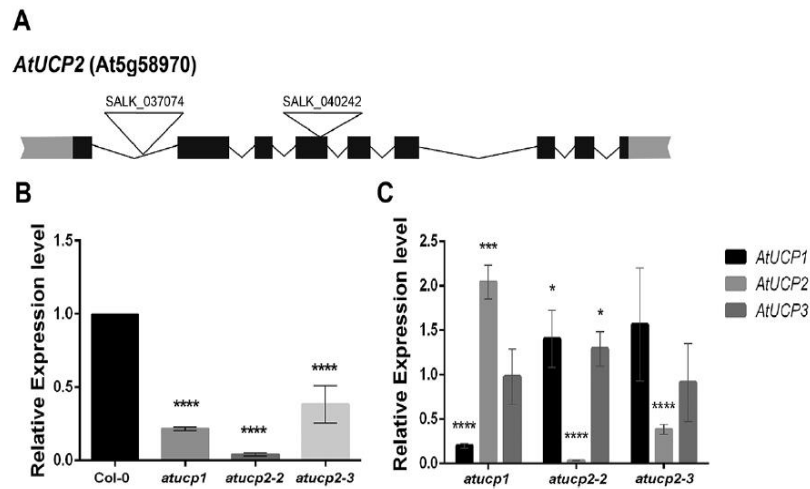
### Molecular characterization of the *atucp* T-DNA insertion mutants

To address the functional roles of quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR), two commercially available T-DNA insertion lines, i.e. SALK\_037074 and SALK\_040242, were used. Line SALK\_037074 (termed *atucp2-2* due to the existence of a previously reported *atucp2* mutant; Monné et al. 2018) harbors a T-DNA insertion in the first intron of *AtUCP2* (position 559), while line SALK\_040242 (namely *atucp2-3*) has a T-DNA insertion in the fourth exon (position 1346; Fig. 1A). The T-DNA insertion sites were confirmed by sequencing of the PCR products generated using *AtUCP2*-specific primers and a T-DNA left border primer. Homozygous plants were obtained for each mutant line (Supplementary Fig. S1).

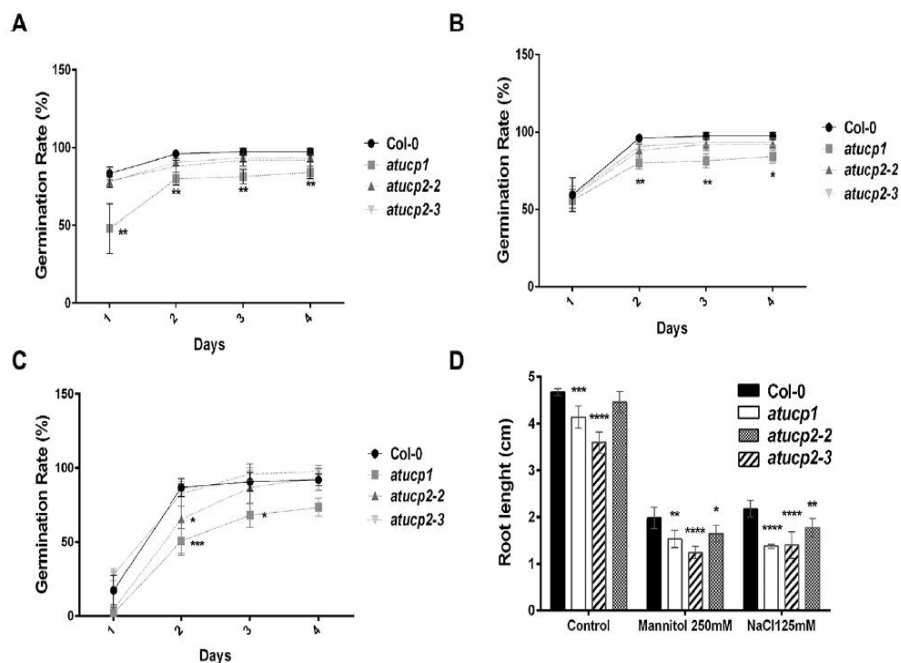
As determined by RT-qPCR, *AtUCP2* transcript levels in the *atucp2-2* and *atucp2-3* mutant lines were reduced by 97% and 62%, respectively, compared to WT levels (Fig. 1B). Comparatively, we detected an 80% reduction in *AtUCP1* expression in the *atucp1* mutant (Fig. 1B) characterized previously (Sweetlove et al. 2006). Therefore, an important reduction in target gene expression was observed in the newly identified *atucp2* mutant lines. To determine whether the reduced expression of the target genes in the mutant lines could be compensated by the other isoforms, the expression levels of the three *AtUCP* genes in each mutant background were evaluated. A significant increase in the transcript levels of *AtUCP2* was observed in *atucp1*, suggesting a compensation for the reduced expression of *AtUCP1* (Fig. 1C). Moreover, significant increases in *AtUCP1* and *AtUCP3* expressions were observed in *atucp2-2*, which has a higher level of *AtUCP2* knockdown (Fig. 1C). Therefore, under normal growth conditions, a compensatory induction of the different UCP family members is observed in plants harboring T-DNA insertions in *AtUCP1* and *AtUCP2*, suggesting partial redundant functions.

### Impact of the reduced expression of *AtUCP1* and *AtUCP2* on plant development

UCP activity has been previously suggested to be fundamentally important in organs/tissues and growth stages with high energy demand (Nogueira et al. 2011). Taking into consideration that *AtUCP1* overexpression enhanced seed germination under abiotic stress (Begcy et al. 2011), the *atucp1* and *atucp2* mutants were firstly investigated to detect altered patterns of seed germination under normal and stressed conditions. Under normal growth conditions [Murashige and Skoog (MS/2) medium], a significant lower germination rate was observed in *atucp1* seeds on day 1 compared to WT and the *atucp2* mutants (Fig. 2A).

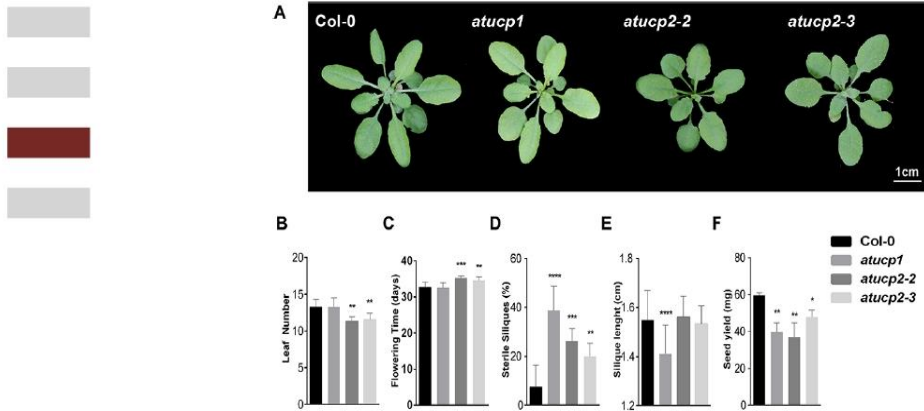


**Fig. 1** Molecular characterization of the *atucp2* mutants. (A) Schematic representation of the exon–intron structure of the *AtUCP2* gene depicting the relative position of the T-DNA insertions (triangles). The black boxes and lines represent exons and introns, respectively. (B) Relative expression of *AtUCP1* and *AtUCP2* in the corresponding homozygous mutant lines showing significantly reduced transcript abundance compared with WT. Three-week-old seedlings were employed. (C) Relative expression of the *AtUCP* family members in seedlings of the investigated genotypes grown under control conditions. WT expression was used as calibrator and arbitrarily set to 1. Asterisks denote significant differences between WT and mutants (\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  and \*\*\*\* $P < 0.0001$ ). Error bars, mean  $\pm$  SD.



**Fig. 2** Effects of *AtUCP1* and *AtUCP2* knockdown in early development. Germination rates of WT, *atucp1*, *atucp2-2* and *atucp2-3* seeds over a 4-d incubation period on (A) MS/2 medium; (B) MS/2 supplemented with 250 mM mannitol and (C) MS/2 with 125 mM NaCl. Percentages of seed germination are means ( $\pm$ SD) of three independent plates using 30 seeds per genotype per plate. Three biological replicates using independent seed lots were employed. (D) Primary root length of seedlings of the investigated genotypes grown under control and stressed conditions (mannitol and NaCl) for 10 d. Asterisks denote significant differences between WT and mutants (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  and \*\*\*\* $P < 0.0001$ ).





**Fig. 3** Phenotypic characterization of the *atucp1* and *atucp2* mutants. (A) Representative images of the WT, *atucp1*, *atucp2-2* and *atucp2-3* plants (3 weeks old). The traits represented graphically are as follows: leaf number (B) and time for flowering (days) (C) (both measured when plants started to flower); percentage of sterile siliques (D) and silique length (cm) (E) (both measured 10 d after flowering); and seed yield (mg) (F). Bars are means ( $\pm$ SD) of eight biological replicas. For silique length evaluation, 10 siliques were measured for each biological replica. Asterisks denote significant differences between WT and mutants (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  and \*\*\*\* $P < 0.0001$ ).

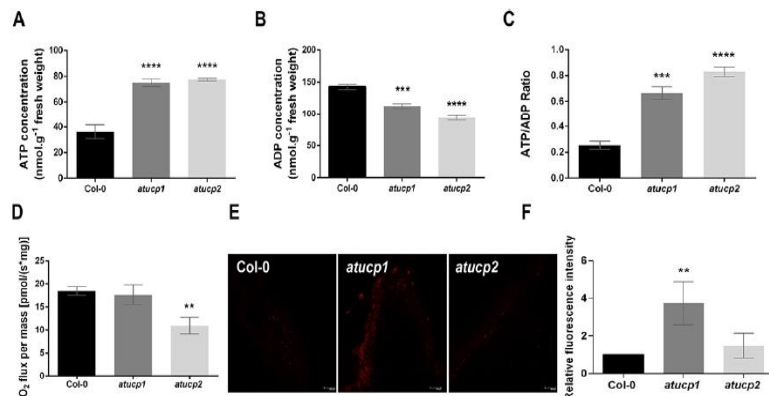
On days 2, 3 and 4, the germination rate was still significantly reduced in *atucp1* seeds compared to the other genotypes. Interestingly, the knockdown of *AtUCP1* also reduced the germination rate of *atucp1* seeds under stress. When submitted to osmotic stress (250 mM mannitol), from day 2 onward, the *atucp1* seeds displayed a significant decrease in germination compared to the WT and *atucp2* mutants (Fig. 2B). The *atucp1* and *atucp2-2* mutants also exhibited lower seed germination rates under salt stress than WT and *atucp2-3* on day 2 (Fig. 2C). The worst germination performance of the *atucp1* seeds under normal and stressed conditions suggests a relevant role for these isoforms during early development.

To further address the effect of *AtUCP1* and *AtUCP2* knockdown in early seedling growth and stress sensitivity, root elongation assays were performed under normal growth conditions or in the presence of mannitol (250 mM) and NaCl (125 mM). It should be highlighted that salt and osmotic stresses are known to induce ROS production and cause secondary oxidative stress (Gill and Tuteja 2010, Yang and Guo 2018). Under control conditions, the *atucp1* and *atucp2-2* mutants displayed a significant decrease in primary root length compared to WT, indicating that gene knockdown slowed primary root growth (Fig. 2D). Albeit not statistically significant, a similar trend toward a reduction in root length was observed in *atucp2-3*, a feature that could be attributed to the lower levels of gene knockdown found in this mutant. On the other hand, the imposition of osmotic and salt stresses resulted in a significant reduction in the primary root length of all mutant seedlings compared to WT (Fig. 2D). These results suggest greater stress sensitivity during post-germination growth in *atucp1* and *atucp2-2*, which has the strongest level of *AtUCP2* knockdown.

Despite the aforementioned phenotypes, the reduced expression of *AtUCP1* and *AtUCP2* had no obvious effect on vegetative growth (Fig. 3A). Under the employed growth conditions, the single mutants exhibited normal vegetative growth compared to the WT, and no abnormalities could be observed in the morphology of roots and leaves. However, *atucp2-2* plants were relatively smaller than WT, *atucp1* and *atucp2-3* plants (Fig. 3A). In this regard, both *atucp2-2* and *atucp2-3* displayed a significant decrease (15% and 13%, respectively) in the number of rosette leaves compared to WT and *atucp1* (Fig. 3B), suggesting that *AtUCP2* is necessary to sustain vegetative growth.

#### *atucp1* and *atucp2* mutants show reduced fertility and seed yield

Given that *AtUCP1* overexpression enhanced seed size and yield in tobacco (Barreto et al. 2017), we additionally evaluated possible alterations during the reproductive stage of the corresponding mutants (Fig. 3). Compared to WT, both *atucp2-2* and *atucp2-3* flowered significantly later (2.7 and 2 d, respectively) than WT and *atucp1* (Fig. 3C). Apart from that, all mutants also displayed an increase in the number of sterile siliques compared to WT [*atucp1* (5-fold), *atucp2-2* (3.5-fold) and *atucp2-3* (2.6-fold)], along with a significant reduction in silique length in *atucp1* (Fig. 3D, E). As expected, the detected increase in the number of sterile siliques in all mutants led to a significant reduction in seed yield as compared with the WT control (Fig. 3F). When taken together, the observed phenotypes indicate that WT expression levels of *AtUCP1* and *AtUCP2* seem to be required to maintain the overall plant fertility. Considering that the phenotypes of *atucp2-2* and *atucp2-3*, although similar,



**Fig. 4** Consequences of the reduced expression of *AtUCP1* and *AtUCP2* in mitochondrial function. (A) ATP and (B) ADP levels determined using entire plants (3 weeks old) from WT and *atucp1* and *atucp2* mutants. (C) ATP/ADP ratios. The data are representative of three biological replicates ( $n = 3$ ). (D)  $O_2$  consumption rate in detached leaves from WT and *atucp1* and *atucp2* mutant plants (3 weeks old).  $O_2$  uptake was measured in liquid medium in the dark and under stirring. (E) Mitochondrial superoxide accumulation in leaves of WT Col-0 and *atucp* mutants detected using MitoSOX Red. Representative confocal images from three independent assays are shown. (F) Superoxide production determined by MitoSOX Red fluorescence intensity relative to WT Col-0 (set to 1). Asterisks denote significant differences between WT and mutants (\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  and \*\*\*\* $P < 0.0001$ ). Error bars, mean  $\pm$  SD.

were clearly more exacerbated in the *atucp2* line, which has the strongest level of *AtUCP2* knockdown, we decided to use this line in subsequent analyses (hereafter referred to *atucp2*).

### Reduced expression of *AtUCP1* and *AtUCP2* impacts mitochondrial function and metabolites

A classical effect of altered UCP contents in mammals and plants, specially UCP1, is a disruption of mitochondrial homeostasis (Kowaltowski et al. 1998, Brandalise et al. 2003). We therefore asked whether the knockdown of *AtUCP1* and *AtUCP2* would have an impact on the mitochondrial energy generation by measuring ATP content and  $O_2$  consumption in the investigated mutants. In comparison with WT, significantly lower ADP and higher ATP concentrations were observed in plants from the *atucp1* and *atucp2* mutants (Fig. 4A, B). Consequently, as should be expected from the knockdown of an UCP, a significant increase in the ATP/ADP ratio was detected in both mutants (Fig. 4C). To assess possible alterations in respiratory metabolism, the  $O_2$  consumption of leaf samples from WT and mutants was monitored. Under normal growth conditions, the  $O_2$  consumption rate of *atucp2* was significantly reduced compared to WT and *atucp1*, indicating alterations of the respiratory activities (Fig. 4D). In agreement with this possibility, when looking at the expression of marker genes indicative of the mitochondrial status, a significant increase in the transcript abundances of *AtAOX1a* and *AtVDAC1* was detected in plants of all mutants compared with WT, while no changes in *AtCOX2* and *AtCOX15* were observed (Supplementary Fig. S2A). The up-regulation of *AtAOX1a*, which is generally detected in response to respiratory deficiencies (Radin et al.

2015), reflects an induced alternative respiratory pathway in the mutants. Considering the observed effects of *AtUCP* knockdown on germination, we also monitored the expression of *AtAOX1a* and *AtUCP1*, *AtUCP2* and *AtUCP3* during germination under normal growth conditions (Supplementary Fig. S2B). As observed in 3-week-old plants, *AtAOX1a* had significantly increased transcript levels in both mutant backgrounds compared with the WT, particularly at 3 and 4 days after stratification (DAS). On the other hand, *AtUCP1* and *AtUCP2* transcript levels were decreased in the *atucp2* and *atucp1* backgrounds, respectively, while *AtUCP3* was up-regulated at all time points in *atucp1* and at 3 DAS in *atucp2*. These results emphasize the importance of *AtAOX1a* up-regulation as part of an acclimatory response in the mutants and indicate that the increased expression of *AtUCP3* during mutant seed germination is insufficient to rescue the lower germination phenotype observed in *atucp1*.

Taking into account that *AtUCP1* significantly attenuates ROS production when overexpressed in transgenic tobacco plants (Brandalise et al. 2003, Barreto et al. 2014), we sought to evaluate whether the knockdown of *AtUCP1* and *AtUCP2* was associated with increased mitochondrial-produced superoxide in whole tissue. To this end, detached leaves from WT and mutant plants were subjected to MitoSOX Red staining as described by Barreto et al. (2014). Superoxide labeling was significantly more pronounced in the *atucp1* mutant compared with WT Col-0 (4.7-fold increase), whereas a non-significant increase (1.5-fold) was observed in *atucp2* (Fig. 4E, F). These results indicate that mitochondrial ROS generation was aggravated by the knockdown of *AtUCP1* and suggest a more prominent role for *AtUCP1* in the control of ROS production during the vegetative phase.

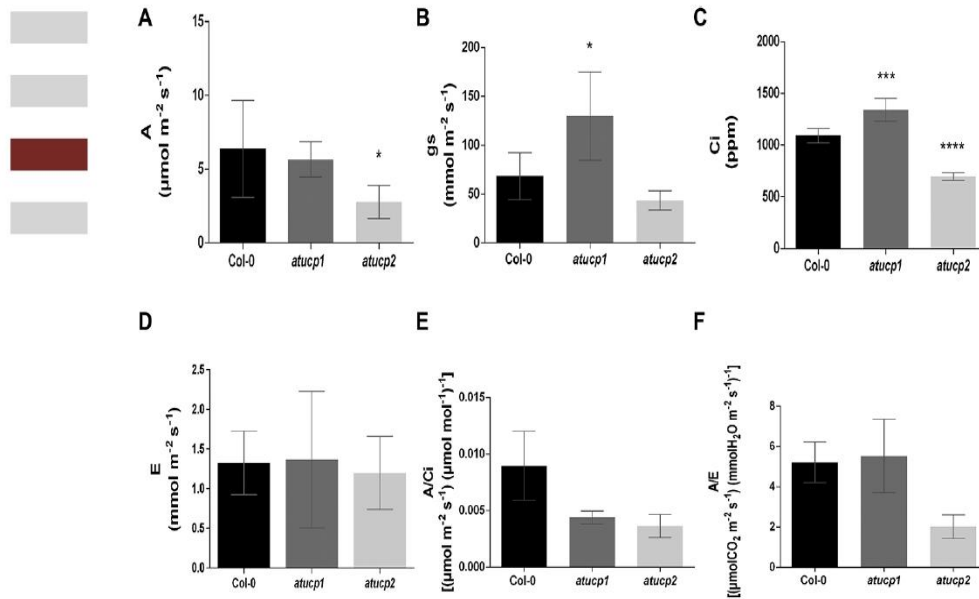


Fig. 5 Gas-exchange analyses of WT, *atucp1* and *atucp2* plants (3 weeks old). (A) Net photosynthetic rate (A); (B) stomatal conductance ( $g_s$ ); (C) intercellular  $\text{CO}_2$  concentration (C<sub>i</sub>); (D) transpiration rate (E); (E) A/C<sub>i</sub> ratio and (F) A/E ratio. Data are presented as mean  $\pm$  SE (n = 5). Asterisks denote significant differences between WT and mutants (\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  and \*\*\*\* $P < 0.0001$ ).

We next evaluated the main metabolic alterations linked to the reduced expression of *AtUCP1* and *AtUCP2* in mutant plants (Supplementary Table S2). According to the metabolic profiling data obtained, few metabolites presented a significant variation between mutants and WT. Moreover, only a small fraction of the identified metabolites, mainly amino and organic acids, were in common among the investigated genotypes. This is consistent with the results of Sweetlove et al. (2006) that detected little variation in the abundance of metabolites between the *atucp1* mutant and WT plants. In our analysis, significant increases in Gly (1.7-fold and 1.6-fold, respectively) and xanthine (2.5-fold and 1.4-fold, respectively) levels were observed in *atucp1* and *atucp2* compared to the WT. In addition to Gly, the Asp and Ala levels were almost 1.8-fold and 1.7-fold higher in the *atucp1* mutant than in WT, while the sucrose content increased 1.8-fold. On the other hand, the *atucp2* mutant displayed significant increases in ethanol (1.9-fold) and fumarate (2.2-fold) and a reduction in glucose levels (55%). These results reinforce previous observations that *AtUCP* activity is important in a much broader cellular context that involves mitochondrial and chloroplastic metabolism in addition to changes in the cytosol.

#### Effects of *AtUCP* knockdown on photosynthetic capacity

Previous studies have demonstrated that insertional mutation of *AtUCP1* compromises the photosynthetic efficiency and

alters plant metabolic profile possibly due to a restriction in photorespiration (Sweetlove et al. 2006, Monné et al. 2018). We therefore decided to investigate to what extent the knockdown of *AtUCP2* could impact photosynthetic efficiency. To this end, gas-exchange measurements were performed in WT and mutant (*atucp1* and *atucp2*) plants. The obtained results revealed that the tested *atucp* mutants exhibited a decrease in net photosynthetic rates (A) in comparison to the WT, but the detected differences were statistically significant only for *atucp2* (Fig. 5A). This might be a consequence of the decrease in leaf number (15%) detected in this mutant (Fig. 3B). In parallel, a slight reduction in  $g_s$  was observed in *atucp2* plants compared to the WT (Fig. 5B), suggesting that the detected decrease in the photosynthetic rate of *atucp2* could be a consequence of reduced stomatal conductance. In contrast, a significant increase in  $g_s$  was detected in *atucp1*, which is not consistent with a previous report showing no alterations in  $g_s$  and  $C_i$  in this single mutant (Sweetlove et al. 2006). Under ambient  $\text{CO}_2$  concentrations,  $C_i$  differed significantly between mutants and WT, being higher in *atucp1* and lower in *atucp2* (Fig. 5C). A non-significant trend toward a decrease in transpiration rate (E) (Fig. 5D) and in carboxylation efficiency (A/C<sub>i</sub>) (Fig. 5E) was observed in all mutants compared with WT. Alterations in A/C<sub>i</sub> might indicate the occurrence of biochemical limitations to photosynthesis. On the other hand, there were no statistical differences in water use efficiency (A/E) between WT and mutants (Fig. 5F).

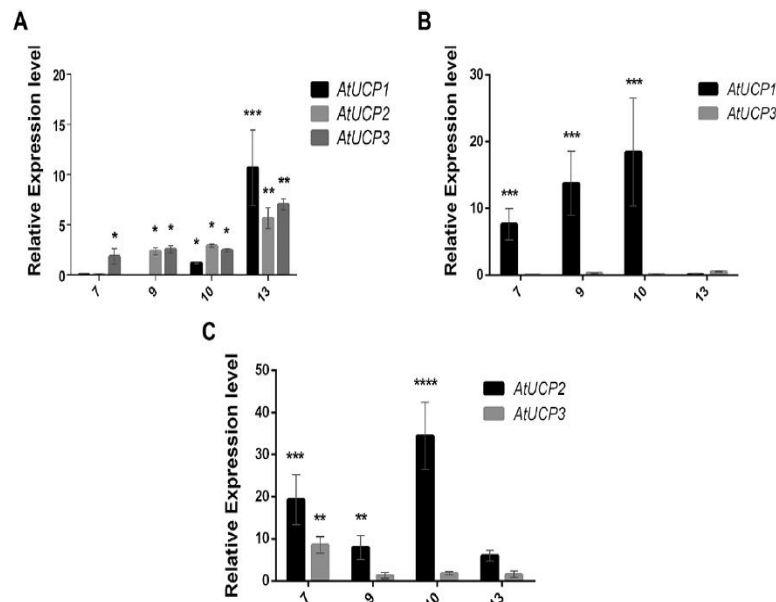


Fig. 6 Relative expressions of *AtUCP1*, *AtUCP2* and *AtUCP3* in Arabidopsis flowers at different developmental stages (stages 7, 9, 10 and 13). Flowers were collected from WT-Col-0 (A), *atucp1* (B) and *atucp2* (C). Expression levels were normalized to *AtGAPDH* expression. A pool of WT flowers at the mentioned developmental stages was used as the calibrator and arbitrarily set to 1. Asterisks denote significant differences between WT and mutants (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  and \*\*\*\* $P < 0.0001$ ). Error bars, mean  $\pm$  SD.

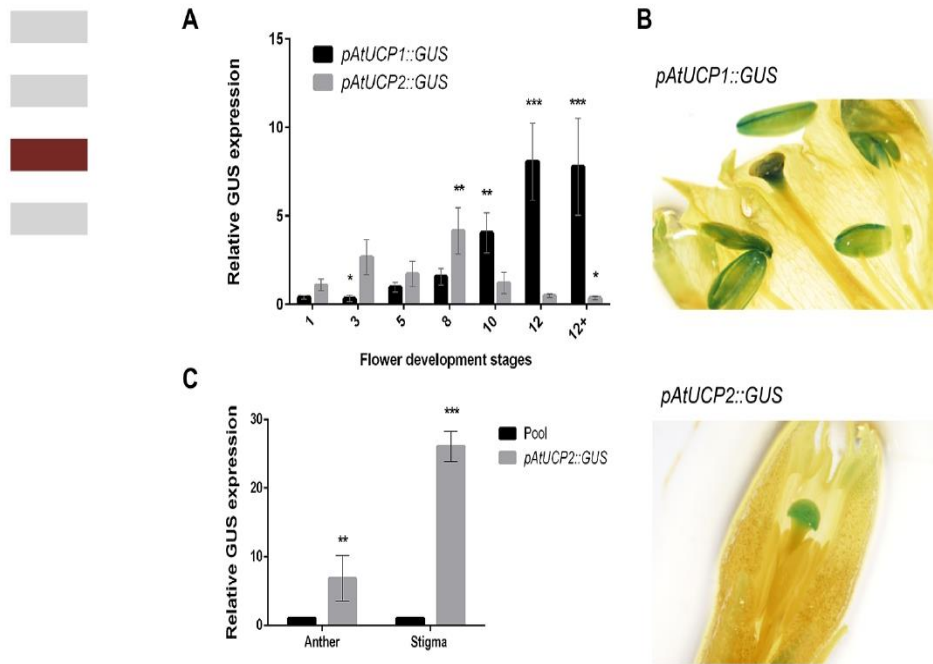
### Expression of the *AtUCP* family members during flower development

To further substantiate the functional association of *AtUCP* with plant fertility as indicated by the aforementioned phenotypic results, the patterns of *AtUCP1*, *AtUCP2* and *AtUCP3* expressions during early, intermediate and late stages of WT flower development (stages 7, 9, 10 and 13) (Smyth et al. 1990) were examined. It should be emphasized that the *AtUCP3* gene was included in this analysis to detect any possible transcriptional compensation during flowering. Although all tested genes reached the maximum expression mainly in flowers at the later stage (stage 13), their temporal expression patterns were relatively different (Fig. 6A). In this context, the expression of *AtUCP2* and *AtUCP3* partially overlaps, with *AtUCP3* being detected from stage 7 onward and *AtUCP2* only after this stage. In contrast, *AtUCP1* expression was barely detected at early and intermediate stages. These results suggest that the expression of the *AtUCP* family members in flowers is under developmental control.

We also assessed whether the knockdown of *AtUCP1* and *AtUCP2* had any influence on the expression of the other *AtUCP* family members in flowers. Compared to the WT, transcript abundances of *AtUCP1* and *AtUCP2* were strongly increased in *atucp1* and *atucp2* flowers, respectively, while *AtUCP3* was almost unaltered in these mutants (Fig. 6B, C). Interestingly, the temporal expression pattern of the target genes was greatly

altered, and an anticipation to early and intermediate stages compared with the WT is observed. Overall, these results indicate the existence of a compensatory expression in mutant flowers.

The association of *AtUCP1* and *AtUCP2* expressions with reproductive organ/tissues was further investigated using previously generated transgenic tobacco plants harboring p*AtUCP1*::GUS or p*AtUCP2*::GUS reporter fusions (Fig. 7). In a first moment, aiming to detect the peak of promoter activity, we monitored the GUS expression at selected stages of tobacco flower development using RT-qPCR. As shown in Fig. 7A, the peaks of GUS expression under the control of the *AtUCP1* and *AtUCP2* promoters were observed in floral stages 12 (open flower with dehisced anthers) and 8 (green petals slightly open), respectively (Koltunow et al. 1990). Afterward,  $\beta$ -glucuronidase (GUS) activity was assayed histochemically in those flower stages in which peak expression levels of the reporter were observed (Fig. 7B). In stage 12 flowers from p*AtUCP1*::GUS plants, GUS activity was detected in anthers and pollen as well as in stigma. In good agreement, according to the Arabidopsis eFP Browser 2.0, *AtUCP1* is highly expressed in the stamen of Arabidopsis flowers at stage 12 and in mature pollen. On the other hand, in p*AtUCP2*::GUS plants, GUS activity was mainly observed in the stigma of stage 8 flowers, and no staining in anthers could be detected. However, contrasting with the histochemical analysis, GUS transcripts could be detected in anthers



**Fig. 7** Histochemical localization and relative expression of *GUS* under the control of the *AtUCP1* and *AtUCP2* promoters. (A) Relative *GUS* expression in transgenic tobacco flowers at different developmental stages (1–12+). The *NtEF1* gene was employed as the endogenous control. (B) Histochemical localization of *GUS* activity in tobacco flowers in which peak expression levels of *GUS* were observed (stage 12 in upper panel and stage 8 in lower panel). Representative images from different tested lines are depicted; (C) relative expression of *GUS* in anthers and stigma obtained from *pAtUCP2::GUS* flowers at stage 8. A pool of anthers and stigma was used as the calibrator and arbitrarily set to 1. Asterisks denote significant differences between control and individual samples (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ ). Error bars, mean  $\pm$  SD.

by RT-qPCR, indicating that the *AtUCP2* promoter indeed has some activity in anthers (Fig. 7C). Among different possibilities, this low expression could be attributed to promoter length or to the use of a heterologous system. Overall, these results confirm the spatial association of *AtUCP1* and *AtUCP2* expressions with reproductive organs/tissues that could be implicated in the altered fertility phenotypes.

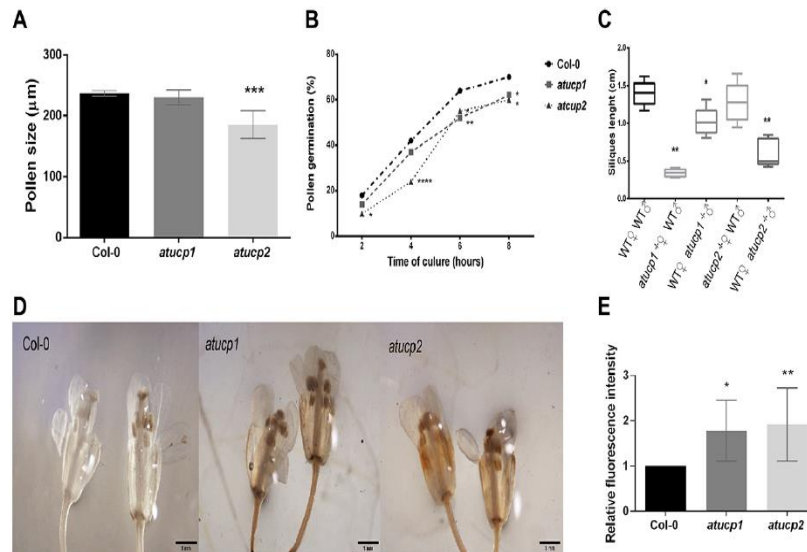
#### *atucp1* and *atucp2* mutants show male- and female-associated impairments and high accumulation of ROS in flowers and pollen grains

To explore the underlying causes of the observed reduced fertility phenotype (Fig. 3), we decided to assess the pollen viability of the *atucp1-2* mutants using Acetocarmine staining. A slight decrease in pollen viability of all mutants compared to WT (97% of viable pollen;  $n = 100$ ) was observed, with *atucp1* being less affected than *atucp2* (90% and 84% of viable pollen, respectively) (Supplementary Table S3). In addition, analysis of mature pollen grains by scanning electron microscopy (SEM) revealed no obvious alterations on the external morphology, but pollen size was significantly decreased in *atucp2* compared with the WT and *atucp1* (Fig. 8A).

Interestingly, in vitro germination of pollen grains from *atucp1* and *atucp2* mutants was clearly impaired, with significant differences compared to WT being observed at 4 (exclusively for *atucp2*), 6 and 8 h after placement on the germination media (Fig. 8B).

To gain further insights, reciprocal crosses between the investigated *atucp1* and *atucp2* mutants and Col-0 were performed, and silique size alterations were evaluated. As can be seen in Fig. 8C, when pollen from *atucp1* and *atucp2* was used to pollinate emasculated Col-0 flowers, the resulting siliques were significantly reduced in length compared with the WT. Conversely, when the *atucp2* mutant was employed as female and Col-0 as pollen donor, the resulting siliques were found to be indistinguishable from WT in length, a feature that was not observed in *atucp1*. In the latter case, a rather significant reduction in silique length was observed, indicating that the knockdown of *AtUCP1* also compromises female fertility. This result is supported by the detected significantly low stigma receptivity (30%) of the *atucp1* flowers compared with WT (100%), while *atucp2* (80%) was not significantly affected (Supplementary Table S3).

Given that UCP has been implicated in the control of ROS homeostase (Kowaltowski et al. 1998, Brandalise et al. 2003), we



**Fig. 8** Effects of the reduced expression of *AtUCP1* and *AtUCP2* in pollen, flowers and siliques. (A) Size of pollen grains collected from WT and *atucp1* and *atucp2* mutants ( $n = 5$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ); (B) Germination kinetics of pollen from WT and mutants. Five hundred pollen grains per genotype were counted. Each point is presented as mean  $\pm$  SE (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\*\* $P < 0.0001$ ). (C) Length (cm) of the siliques from reciprocal crosses between WT and mutants. Ten crosses were performed for each combination. The asterisks denote significant difference (\* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ ), according to Student's *t*-test, in comparison to the crosses using the WT control (WT). Bar = 1 cm. (D) DAB staining of flowers (stage 10) from WT and *atucp1* and *atucp2* mutants showing high levels of  $H_2O_2$  in reproductive organs. (E) ROS production in pollen grains determined by DCF fluorescence intensity relative to WT Col-0 (set to 1). Asterisks denote significant difference (\* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ ). Error bars, mean  $\pm$  SD.

hypothesized that ROS levels might also be increased in mutant flowers due to the reduced expression of *AtUCP*. To investigate this possibility, entire flowers (stage 10) from WT and *atucp* mutants were stained with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) to detect endogenous hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) accumulation. As could be observed in **Fig. 8D**, a clear increase in  $H_2O_2$  levels (brown precipitate) was mainly observed in the stigma and anthers of *atucp1* and *atucp2* compared with WT. Moreover, a higher accumulation of ROS, monitored by the fluorescence emitted by oxidized 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCF), was observed in pollen grains collected from *atucp1* and *atucp2* anthers (1.77- and 1.9-fold increase, respectively) compared with the WT (**Fig. 8E**). Overall, these results are suggestive of increased oxidative stress in these reproductive organs and are in line with the observed reduced fertility phenotypes of both mutants.

Interestingly, a clear increase in the transcript levels of *AtAOX1a* was observed in flowers from *atucp1* and *atucp2*, with peak expression at stage 9 (**Supplementary Fig. S2C, D**). In the case of *atucp2*, *AtAOX1a* expression was still significantly induced at stages 10 and 13. Overall, these results suggest that AOX induction could be part of the strategy of metabolic adjustment of *atucp1* and *atucp2* to cope ROS accumulation in flowers.

### Expression of transcription factors controlling reproductive development is altered in the *atucp1* and *atucp2* mutants

To better substantiate that the knockdown of *AtUCP1* and *AtUCP2* is impacting reproductive organ/tissue development, the transcriptional response of key genes previously linked to male and female reproductive development was evaluated in WT and mutant flowers at the same developmental stages investigated earlier. Firstly, the relative expression of the transcription factors (TFs) DYSFUNCTIONAL TAPETUM 1 (*AtDYT1*), which is implicated in early tapetal development, and ABORTED MICROSPORES (*AtAMS*), which acts in tapetum maturation and pollen development (Wilson et al. 2011), was determined. *DYT1* is reported to be highly expressed in flower buds from transgenic tobacco plants overexpressing *AtUCP1*, whereas *AMS* expression in these plants was unaltered or reduced compared to WT plants (Barreto et al. 2016). The abundance of *AtAMS* transcripts was strongly and progressively reduced in *atucp2* flowers compared with the WT (**Fig. 9B**), while such a significant reduction was exclusively observed at stages 10 and 13 in *atucp1* (**Fig. 9A**). On the other hand, compared with the WT, a significant decrease in *AtDYT1* transcript abundance was only detected at stage 7 in *atucp1* and from stages 7 to 9 in *atucp2* (**Fig. 9A, B**). Intriguingly, the *AtDYT1*

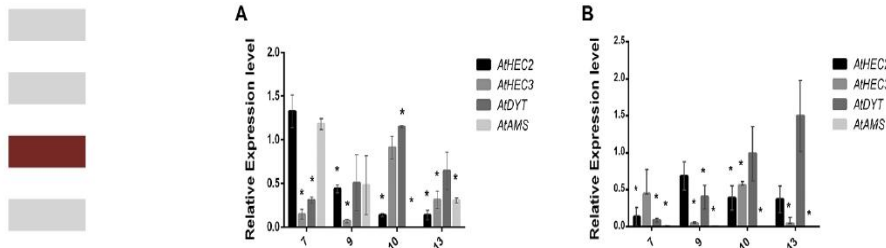


Fig. 9 Relative expression of the flowering-related TFs *AtHEC2-3*, *AtDYT* and *AtAMS* in *atucp1* (A) and *atucp2* (B) mutant flowers at different stages of development (stages 7, 9, 10 and 13). Expression levels were normalized to *AtGAPDH* expression. Relative expression is referred to the expression of the target genes in WT flowers of the corresponding stages, which was used as the calibrator (arbitrarily set to 1). Asterisks denote significant differences between WT and mutants (\* $P < 0.05$ ). Error bars, mean  $\pm$  SD.

transcript level was significantly increased in stage 10 flowers from *atucp1* compared with the WT.

We also evaluated the expression of the basic helix-loop-helix TFs HECATE2 and HECATE3 (*AtHEC2* and *AtHEC3*) that are involved in transmitting tract and stigma development (Gremski et al. 2007). Overall, the expression of *AtHEC2* and *AtHEC3* was rather low in the mutants compared with the WT (Fig. 9A, B). In the case of *AtHEC2*, a decrease in its expression was observed from stage 7 onward in *atucp1*, whereas such a significant decrease was specifically detected at floral stages 7 and 10 in *atucp2*. On the contrary, *AtHEC3* expression was clearly reduced in stages 7, 9 and 13 in *atucp1* and from stages 9 to 13 in *atucp2*. Collectively, these results indicate that *AtUCP* knockdown impacts the expression of TF implicated in male and female reproductive development, which could be linked to an altered mitochondrial metabolism and ROS balance in mutant flowers.

### Discussion

*AtUCP2* and *AtUCP3* are members of the UCP family in *A. thaliana* whose founding member is *AtUCP1*. For this reason, most of our knowledge about UCP function in plants was derived from genetic and biochemical studies employing this first discovered member as a model. By contrast, the physiological relevance of the other two members is still not yet fully defined and understood. In this regard, based on their ubiquitous and almost constitutive expression during Arabidopsis development, it has been suggested that these isoforms could play basal metabolic roles compared to *AtUCP1*, which is more highly expressed and exhibits organ/tissue- and stage-specific expression modulation (Nogueira et al. 2011). In order to fill some of these gaps in our knowledge, here we identified and characterized T-DNA insertion mutants for *AtUCP2* and performed a comparative analysis with the previously studied *atucp1* mutant (Sweetlove et al. 2006).

According to previous studies, important effects on energy production are expected to occur in response to disturbances in UCP expression. Such an effect is clearly observed in *AtUCP1*-overexpressing transgenic plants that display increased

uncoupling respiration and decreased cellular ATP levels (Barreto et al. 2014). In addition, overexpression or silencing of *AtUCP1* has been shown to alter chloroplastic gene expression and photosynthesis (Sweetlove et al. 2006, Laitz et al. 2015, Barreto et al. 2016). In line with these reports, the *atucp1* and *atucp2* mutants studied here displayed higher levels of cellular ATP content, increased ATP/ADP ratios and perturbations in photosynthetic metabolism. In addition, the knockdown of *AtUCP1* expression also correlated well with an increase in mitochondrial ROS accumulation in leaf tissues. The pronounced elevation in cellular ATP levels detected in these mutants is likely a consequence of a decreased mitochondrial uncoupling. In fact, previous data have shown that a loss of UCP-catalyzed proton leak is observed in isolated mitochondria from *atucp1* (Sweetlove et al. 2006). In an earlier study, Barreto et al. (2016) reported that *AtUCP1* overexpression promotes an imbalance between ATP production and oxygen consumption that leads to enhanced fermentative glycolysis. In this context, a significant decrease in respiratory  $O_2$  uptake was observed in *atucp2* compared with WT and *atucp1*. In a similar way, mitochondria of brown adipose tissue from *UCP1* knockout mice have decreased oxygen consumption rates compared with mitochondria from WT mice (Dlasková et al. 2010).

When assessing the metabolic alterations, the effect of *AtUCP1* and *AtUCP2* knockdown was reflected by the significantly increased levels of Gly, suggesting perturbations in photorespiratory carbon flux. Consistent with this, *AtUCP1*- and *AtUCP2*-mediated transport is thought to supply reducing equivalents to sustain photorespiration (Monné et al. 2018). However, in contrast with our results, Sweetlove et al. (2006) observed a significant decrease in Gly content in *atucp1*, which was attributed to a fine-tuning response to a low flux through the upstream steps of photorespiration. This and other observed discrepancies (as in *g\_s* and *C\_i* values) likely resulted from differences in the overall metabolic and physiological status of the collected material (e.g. intact plants vs. rosette leaves). Interestingly, impairments in mitochondrial function provoked, for example, by the knockout of *AOX1a* or silencing of the mitochondrial ATP synthase  $\delta$ -subunit, also result in considerable high contents of Gly (Giraud et al. 2008, Geisler

et al. 2012). Another important outcome of *AtUCP1* and *AtUCP2* knockdown was the accumulation of xanthine, which could be a consequence of a disturbed purine catabolism. This is consistent with the evidenced role of *AtUCP1* in balancing the energy partitioning between nitrogen and carbon metabolism (Gandin et al. 2014). On the other hand, the *atucp2* mutant accumulated high levels of fumarate and ethanol, which is compatible with an enhanced fermentative glycolysis and well correlated with the significant decrease in glucose levels detected in this mutant.

Previous studies have proposed that UCP activity is required in organs/tissues and growth stages with a high-energy demand (Borecký et al. 2006, Nogueira et al. 2011). *AtUCP* genes show, for example, increased expression levels during seed germination, thus giving support to a potential physiological role for these proteins in early development (Borecký et al. 2006, Nogueira et al. 2011). In agreement with this, the knocking down of *AtUCP1* produced a negative effect on seed germination under normal and stressed conditions. Such an effect was also observed in the *atucp2-2* mutant under salt stress. Moreover, the *atucp1* and *atucp2* mutants were clearly affected in primary root growth, a phenotype that was even more pronounced when the mutants lines were subjected to abiotic stress. The molecular mechanism underlying such inhibition remains to be explored, but, taking into consideration the well-documented role of plant UCPs in preventing mitochondrial ROS-induced oxidative damage under abiotic stress (Brandalise et al. 2003, Begcy et al. 2011, Chen et al. 2014), it could be attributed to an excess of ROS accumulation in roots. Moreover, the most pronounced inhibition of root elongation observed in the *atucp1* and *atucp2* mutants under stress suggests that a concerted action of *AtUCP1* and *AtUCP2* seems to be required to face abiotic stress during early seedling development. It should be emphasized that *atucp2* was the only mutant that displayed an obvious impairment in leaf number and a significant lower photosynthetic capacity.

It is well established that mitochondria play a fundamental role in plant fertility, with reduced fertility being a common phenotype of respiratory-impaired mutants (Busi et al. 2011, Geisler et al. 2012, Dahan et al. 2014). In this context, pollen development relies on a high-energy supply, and disruption of proper mitochondrial function has been often correlated with reduced pollen viability (Chen et al. 2019). Here, when focusing on the reproductive stage, we observed a reduced fertility phenotype associated with *atucp1* and *atucp2*. Interestingly, even though *AtUCP1* and *AtUCP2* knockdown negatively affected the expression of TFs (*AtDYT1* and *AtAMS*) involved in tapetum and pollen development, pollen viability was only partially affected in these mutants (10% and 16% of non-viable pollen), suggesting a normal process of pollen development and maturation. This seems to suggest that the observed reduced fertility phenotype might be linked, at least partially, to a defect in post-maturation events such as pollen germination or pollen tube growth. In fact, significant reductions in pollen germination were observed in *atucp1* and *atucp2*, which

highlight the importance of concerted UCP activity to sustain pollen growth. Intriguingly, reciprocal crosses have additionally demonstrated that *AtUCP1* knockdown is also associated with defects in female fertility, a feature not observed in the *atucp2* mutant. Consistent with this observation, the promoter of *AtUCP1* was able to drive the *GUS* expression in the stigma and anthers of tobacco flowers. Surprisingly, *GUS* activity was by contrast detected in situ only in the stigma of tobacco flowers bearing the *AtUCP2* promoter, while reporter activity in anthers was only evidenced by RT-PCR, suggesting a lower level of expression.

The knockdown of *AtUCP1* and *AtUCP2* expression also correlated well with an increase in ROS accumulation in flowers (mainly in anthers and stigma) and pollen grains pointing to the occurrence of oxidative stress in these plants. As already mentioned, there are compelling reports showing that, by catalyzing mild uncoupling of the mitochondria, UCPs play a protective role against ROS (Kowaltowski et al. 1998, Brandalise et al. 2003, Smith et al. 2004). In fact, *AtUCP1* overexpression was reported to lower  $H_2O_2$  levels in tobacco flower buds, which in turn enhanced seed yield (Barreto et al. 2017). Numerous lines of evidence indicate that ROS plays a pivotal role in the programmed cell death (PCD) of the tapetum in Arabidopsis (McInnis et al. 2006, Martin et al. 2014, Xie et al. 2014). It was demonstrated that defects in tapetum ROS scavenging impair pollen development due to premature tapetal cell death, while a reduction in ROS levels during the anther development is correlated with a delay in tapetal PCD. However, in disagreement with this possibility, no differences in tapetum PCD were detected when anthers from WT and *AtUCP1*-overexpression tobacco flowers were compared (Barreto et al. 2017).

On the other hand, constitutive accumulation of ROS in the stigma, especially  $H_2O_2$ , was postulated to be part of a signaling network that stimulates pollen germination and/or pollen tube growth (McInnis et al. 2006). Taking this into account, we speculate that the detected higher ROS accumulation in *atucp1* and *atucp2* flowers and pollen grains could be disturbing the ROS homeostasis required for a proper stigma–pollen interaction during pollination. In support of this idea, Gao et al. (2016) have shown that both mitochondria and peroxisomes are sources of ROS production in mature pollen, which in turn regulates pollen–stigma interactions during pollination. Therefore, although the elevated ROS accumulation provides a reasonable explanation for the reduced fertility of the *atucp1* and *atucp2* mutants, further studies must be conducted to elucidate this point.

Interestingly, an induced expression of *AtAOx1a* was observed in seedlings and flowers of the investigated mutants, suggesting an up-regulation of alternative pathways in these plants. In line, despite an unexpected decrease in AOX protein levels, an increase in the external NAD(P)H dehydrogenase protein content was previously observed in *atucp1* (Sweetlove et al. 2006). The stimulation of alternative respiratory pathways is a major hallmark of mitochondrial respiration deficiencies and is generally associated with the over-reduction of the electron



transport chain and intracellular ROS accumulation (Dahan et al. 2014). In plants, AOX represents an additional non-phosphorylating bypass of the mitochondrial electron transport chain, and its role in maintaining ROS homeostasis is well documented (Clifton et al. 2006). It seems therefore that the *atucp1* and *atucp2* mutants, which are probably suffering oxidative stress, attempt to alleviate the impacts of the reduced expression of *AtUCP* through the activation of AOX in seedlings and flowers. An increase in AOX capacity has been reported in seedlings and flower buds from plants with alterations in respiratory activities (Geisler et al. 2012, Dahan et al. 2014, Kühn et al. 2015). Another interesting feature in this respect concerns the up-regulation of *AtVDAC1* transcript levels in seedlings of the *atucp1-2* mutants. Voltage-dependent anion channels are mitochondrial outer membrane proteins implicated in maintaining the steady state of mitochondrial transmembrane potential and in regulating respiration pathways and ATP levels at different stages of development (Yang et al. 2011, Pan et al. 2014). Its induction in mutant seedlings probably reflects the abnormal functioning of the mitochondria due to *AtUCP* knockdown.

Here, we provide compelling evidence that UCP activity and associated mitochondrial metabolic adjustments are required for proper plant fertility and early growth development. Our results also indicate that proper *AtUCP* expression is required to prevent disturbances in mitochondrial ROS metabolism, which in turn is important to sustain full fertility in Arabidopsis. As already observed in *AtUCP1*-overexpressing tobacco plants (Barreto et al. 2014, 2016), an imbalance between ATP production and oxygen consumption is observed in mutants pointing to the existence of a compensatory mechanism that deserves further investigation.

The almost similar behavior and metabolic phenotypes of *atucp1* and *atucp2* observed here are consistent with the hypothesis that both genes share some degree of functional redundancy. As already mentioned, apart from promoting high electron transport flux for metabolic purposes as classical UCPS (Maia et al. 1998, Vercesi et al. 2006), both proteins are able to transport aspartate and glutamate, which would be useful to the export of reducing equivalents from the mitochondria in photorespiration (Monné et al. 2018). It is also relevant to point out that *AtUCP1* and *AtUCP2* share 72% amino acid identity and a number of similar transport properties (Monné et al. 2018). In this scenario, the use of double mutants with different gene sets should help to further understand the role of these proteins.

## Materials and Methods

### Plant material and growth conditions

Single *A. thaliana* mutants (SALK\_037074 and SALK\_040242) with T-DNA insertions within the *AtUCP2* (At5g58970) gene were obtained from the Arabidopsis Biological Resource Center. The T-DNA mutant (SAIL\_536\_C01; ABRC stock #CS874648) for *AtUCP1* (At3g54110) was previously described (Sweetlove et al. 2006). All mutants were in the Columbia ecotype Col-0 background. Plants were grown in plastic pots filled with a mixture of soil-vermiculite (2:1) and kept in a growth chamber (Model CPM6050 Conviron, Pembina, ND,

USA) with a 16-h day/8-h night photoperiod cycle, 21/18 ± 1°C day/night temperatures and light intensity of 100 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. For the germination assays, WT and mutant seeds (*n* = 30/genotype/dish) were surface-sterilized and sown on dishes containing one-half-strength MS/2 (Murashige and Skoog 1962) agar (0.8%) medium supplemented or not with 125 mM NaCl or 250 mM mannitol, respectively. After 3 d of stratification at 4°C, the dishes were transferred to the growth chamber, and seed germination (based on radicle protrusion) was scored daily (10 d). Three independent assays using different seed lots were performed. For root elongation measurements, 7-day-old seedlings (*n* = 5/genotype) were grown vertically on Petri dishes (three per treatment) containing MS/2-0.8% agar medium supplemented or not with 125 mM NaCl or 250 mM mannitol, respectively. These concentrations were determined in preliminary assays and are considered to be moderate. After 10 d under the described growth conditions, digital images were captured and the primary root length was determined using ImageJ software. The germination assays for gene expression analysis were performed using three biological replicates essentially as described by Matioli et al. (2011). Briefly, seeds (50 mg) from WT Col-0 and mutant lines were surface-sterilized and incubated in 50 ml of MS/2 medium for 72 h at 4°C in darkness to break dormancy. Subsequently, the seedlings were grown under long-day photoperiod and constant agitation (67 rpm) and sampled at different time points (1, 2, 3 and 4 DAS) for subsequent total RNA extraction and RT-qPCR analysis. Untreated seedlings grown in MS/2 and sampled at the same time points were used as controls. Flowers at early, intermediate and late stages of development (stages 7, 9, 10 and 13) (Smyth et al. 1990) were harvested from adult plants.

### Molecular characterization of *atucp* mutants and phenotyping

Screening of homozygous lines for each mutant was performed by genomic PCR using a combination of *AtUCP2*-specific and T-DNA left border (SALK LBb1.3) primers (Supplementary Table S1). The identity of the mutated gene and T-DNA insertion sites was confirmed by sequencing the PCR products encompassing the T-DNA flanking sequences. During phenotypic examination, the homozygous knockdown lines and the WT were photographed prior to flowering, and the following parameters were scored (an average of eight plants per genotype): leaf number, time to flowering, number of sterile siliques and silique length. The sterile siliques were quantified from the first 10 developed siliques. Ten siliques per plant were measured to calculate the average silique length. Seed yield was recorded by weighting seeds harvested from 60 siliques per plant (*n* = 3/genotype). Pollen viability was analyzed using 1.2% Acetocarmine staining essentially as described by Ressler and Gregory (1979). After staining, viability was rated by the manual counting of viable and non-viable pollen grains (*n* = 100). Stigma receptivity (*n* = 10 flowers/genotype) was investigated using the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> method essentially as described by Dafni et al. (2005). For morphological characterization, pollen grains from WT and *atucp1-2* mutants flowers (*n* = 3 plants/genotype) were collected, suspended in water, allowed to settle onto poly-L-lysine-coated glass cover slips and then fixed in a mixture of 1% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde for 24 h at 4°C. Dehydration was carried out in graded ethanol series, and samples were dried in a critical point dryer (CPD 030) using CO<sub>2</sub> as the intermediate. The dried samples were silver-coated for 60 s and observed with SEM (Quanta 200, FEI Company, Hillsboro, OR, USA). The open-source Fiji platform focused on biological-image processing ImageJ (US National Institutes of Health) was used to determine the pollen size. Representative SEM images from five independent pollen replicates were used to determine the pollen size. In vitro pollen germination was performed on agar (1%) plates containing 5 mM 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (pH 5.8), 1 mM KCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.8 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.5 mM boric acid, 16.6% (w/v) sucrose, 3.65% (w/v) sorbitol and 10 μg ml<sup>-1</sup> myo-inositol. Pollen grains (50 per flower) were obtained from 10 anther-dehiscent flowers collected at random from 10 different plants. A total of 500 pollens per genotype was scored at 2, 4, 6 and 8 h after incubation for calculation of germination percentage.

### RNA extraction and cDNA preparation

Total RNA from seedlings and from Arabidopsis and tobacco flowers at different developmental stages was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. RNA was examined for integrity by agarose–formaldehyde gel electrophoresis, and its concentration was determined in a ultraviolet light spectrophotometer. Before complementary DNA (cDNA) synthesis, extracted RNA was treated with RNase-free DNaseI (Fermentas, Waltham, MA, USA) to remove any genomic DNA contamination. First-strand cDNA was synthesized from 2 µg of total RNA using the High Capacity cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), according to the manufacturer's directions.

### Relative expression analysis using qPCR

The transcript accumulation of *AtUCP1*, *AtUCP2* and *AtUCP3* and of a set of selected genes (Supplementary Table S1) in WT and *atucp1* and *atucp2* mutant lines was determined using quantitative PCR (qPCR). The qPCR assays were run on a Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) employing the following cycling parameters: 95°C for 10 min, followed by 40 cycles at 94°C for 15 s, 60°C for 60 s. Each qPCR (10 µl) consisted of 6 µl of GoTaq Colorless qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), 1 µl of cDNA (1/10 dilution) and 0.4 µM of forward and reverse primers, respectively. All reactions were carried out in triplicate. Relative expression was calculated using the Delta-Delta cycle threshold method (Livak and Schmittgen 2001) and analyzed using the DataAssist software v.3.01 (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). *ATGAPDH* and *40S ribosomal protein S16* (Czechowski et al. 2005) were used as reference genes in all reactions (Supplementary Table S1).

### ADP and ATP measurements and O<sub>2</sub> consumption

ADP and ATP levels were determined using the ATP assay kit (Invitrogen, Waltham, MA, USA) and a GloMax-Multi Detection System (Promega, Madison, WI, USA) essentially as described by Laitz et al. (2015). For that, entire plants (3 weeks old) from WT and mutant lines ( $n = 20$ /genotype), sampled at the midpoint of the illuminated period, were used. The ATP content data were subjected to analysis of variance using a  $P < 0.05$  significance level. Oxygen consumption was measured using an Oxygraph-2k (Oroboros, Innsbruck, Austria). For that, leaves at the same position in the rosette were harvested from 3-week-old plants ( $n = 3$  per genotype) that were maintained in the dark for at least 1 h at room temperature. Approximately 10 mg of the fresh detached leaves were sectioned, and the longitudinal and transverse sections were transferred to 2.1 ml of air-saturated MS medium. The oxygen consumption per mass was monitored in the dark at 25°C with continuous stirring (80 rpm). Data were sampled in consecutive 120 stable points (1/s) discarding the first 2 min.

### Gas-exchange measurements

Gas-exchange parameters were measured in entire plants (3 weeks old) from WT and mutant lines ( $n = 6$ /genotype) using an infrared gas analyzer in an open system (LCI-portable, ADC system, England). All measurements were performed between 9 and 10 o'clock (3 h after lights on) under the following conditions: ambient CO<sub>2</sub> concentration of  $398 \pm 6 \mu\text{mol mol}^{-1}$ , temperature of  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  and 58% relative humidity. The following parameters were measured: net photosynthetic rate (*A*), intercellular CO<sub>2</sub> concentration (*C<sub>i</sub>*), stomatal conductance (*g<sub>s</sub>*) and transpiration rate (*E*). The instantaneous carboxylation efficiency (*A/C<sub>i</sub>*) and water-use efficiency (*A/E*) were calculated thereafter.

### Metabolic profiling

Metabolites were isolated as described by Barreto et al. (2016), with minor modifications, using whole plants (3 weeks old) harvested at the midpoint of the photoperiod. A total of 100 mg of frozen tissue was pulverized in liquid nitrogen, incubated with 1 ml of extraction solution (chloroform:methanol:water; 2:4:1) for 30 min on ice and homogenized for an additional 15 min. Phase separation

was accomplished by the addition of 1 ml of water and centrifugation for 5 min at 12,200×g. Subsequently, the methanol:water phase was collected and dried in a vacuum centrifuge for 8 h. Metabolite profiling was carried out using a 1H-nuclear magnetic resonance spectrometer as described by Barreto et al. (2016). The Chenomx NMR Suite 7.6 software was used for spectral phase and baseline corrections and for metabolite identification and quantification. Five biological replicates for each genotype were used.

### ROS detection

Mitochondrial O<sub>2</sub><sup>-</sup> accumulation in WT and mutant lines under normal conditions was assessed using MitoSOX Red (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) as described by Barreto et al. (2014). To this end, detached young leaves from 3-week-old plants ( $n = 5$ ) were submerged in MS/2, incubated in 5 µM of MitoSOX Red for 25 min in the dark and then washed with liquid MS/2. Light intensity and fluorescence emission were detected at 488/585–615 nm (Em/Ex) using a Leica TCS SP5 SPS laser scanning confocal microscope equipped with a 10× objective. Staining was quantified using ImageJ software, and arbitrary units of fluorescence equivalent to mitochondrial superoxide production was attributed. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in Arabidopsis flowers (stage 10) was assessed using DAB essentially as described by Daudi and O'Brien (2012). ROS detection in pollen grains was performed using the generic ROS sensor CM-H<sub>2</sub>DCFDA [5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate; Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA] essentially as reported by Gao et al. (2016). Briefly, the pollen grains were harvested from five anthers per plant ( $n = 5$ /genotype) and incubated in a hybridization buffer (20 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid buffer and 10 µM CM-H<sub>2</sub>DCFDA pH 7.2) for 5 min at room temperature. After washing with buffer, the stained pollen grains were observed under a Nikon Eclipse 80i microscope equipped with a 20× objective and exposure time of 800 ms. Relative fluorescence intensities were quantified using ImageJ. Data were subjected to Dunnett's multiple comparisons test with a 95% confidence interval.

### Tobacco plants harboring promoter–GUS fusions and histochemical analysis

Transgenic tobacco lines (*Nicotiana tabacum* SR1) harboring promoter::β-glucuronidase (GUS) fusions were generated previously (R.D. Fávoro unpublished). Briefly, the 5'-flanking regions (1.0 kb) of *AtUCP1* and *AtUCP2* were amplified by PCR from Arabidopsis genomic DNA using gene-specific primers (Supplementary Table S1). The amplified fragments were gel purified, sequenced and cloned into the binary vector pCambia-1381z (Cambia). The recombinant vectors were introduced into *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404, which was then used to transform tobacco leaf discs (Horsch et al. 1985). Promoter activity in flowers was assessed by histochemical GUS staining essentially as described by Jefferson et al. (1987). Stained samples were washed in ethanol 70% for chlorophyll removal and photographed. The relative GUS expression in tobacco flowers at different developmental stages (Koltunow et al. 1990) and in anthers and stigma collected from *atucp2* flowers was determined using RT-qPCR as described before (primers in Table S1). For that, a tobacco elongation factor gene (*NEF1*) was employed as the endogenous control.

### Supplementary Data

Supplementary data are available at PCP online.

### Data Availability

The data underlying this article are available within the article and in its online supplementary material.

### Funding

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2017/25139-2 to I.G.M., 18/19021-1 to R.P.M.L.); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (to A.N.M., I.G.M. and M.L.C.A.); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (to R.P.M.L.).

### Acknowledgements

We would like to acknowledge Dr. Alicia J. Kowaltowski (Instituto de Química – USP) for allowing us to use her laboratory facilities and equipment. We also thank Camille Caldeira and Felipe Giroto Campos for technical assistance during O<sub>2</sub> consumption measurements and gas-exchange analyses, respectively.

### Disclosures

The authors have no conflicts of interest to declare.

### References

- Barreto, P., Okura, V., Pena, I.A., Maia, R., Maia, I.G. and Arruda, P. (2016) Overexpression of mitochondrial uncoupling protein 1 (UCP1) induces a hypoxic response in *Nicotiana tabacum* leaves. *J. Exp. Bot.* 67: 301–307.
- Barreto, P., Okura, V.K., Neshich, I.A., Maia, I.D.G. and Arruda, P. (2014) Overexpression of UCP1 in tobacco induces mitochondrial biogenesis and amplifies a broad stress response. *BMC Plant Biol.* 28: 144.
- Barreto, P., Yassitepe, J.E.C.T., Wilson, Z.A. and Arruda, P. (2017) Mitochondrial uncoupling protein 1 overexpression increases yield in *Nicotiana tabacum* under drought stress by improving source and sink metabolism. *Front Plant Sci* 1: 1836.
- Begcy, K., Mariano, E.D., Mattiello, L., Nunes, A.V., Mazzafera, P., Maia, I.G., et al. (2011) An Arabidopsis mitochondrial uncoupling protein confers tolerance to drought and salt stress in transgenic tobacco plants. *PLoS One* 6: e23776.
- Borecký, J., Nogueira, F.T., de Oliveira, K.A., Maia, I.G., Vercesi, A.E. and Arruda, P. (2006) The plant energy-dissipating mitochondrial systems: depicting the genomic structure and the expression profiles of the gene families of uncoupling protein and alternative oxidase in monocots and dicots. *J. Exp. Bot.* 57: 849–864.
- Brandalise, M., Maia, I.G., Borecký, J., Vercesi, A.E. and Arruda, P. (2003) Overexpression of plant uncoupling mitochondrial protein in transgenic tobacco increases tolerance to oxidative stress. *J. Bioenerg. Biomembr.* 35: 203–209.
- Busi, M.V., Gomez-Lobato, M.E., Rius, S.P., Turowski, V.R., Casati, P., Zabaleta, E.J., et al. (2011) Effect of mitochondrial dysfunction on carbon metabolism and gene expression in flower tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant* 4: 127–143.
- Chen, P.Y., Wu, C.C., Lin, C.C., Jane, W.N. and Suen, D.F. (2019) 3D imaging of tapetal mitochondria suggests the importance of mitochondrial fission in pollen growth. *Plant Physiol.* 180: 813–826.
- Chen, S., Liu, A., Ji, D., Lin, X., Liu, Z., Xia, X., et al. (2014) Silencing of tomato mitochondrial uncoupling protein disrupts redox poise and antioxidant enzymes activities balance under oxidative stress. *J. Plant Biol.* 57: 9–19.
- Chen, S., Liu, A., Zhang, S., Li, C., Chang, R., Liu, D., et al. (2013) Overexpression of mitochondrial uncoupling protein conferred resistance to heat stress and *Botrytis cinerea* infection in tomato. *Plant Physiol. Biochem.* 73: 245–253.
- Clifton, R., Millar, A.H. and Whelan, J. (2006) Alternative oxidases in Arabidopsis: a comparative analysis of differential expression in the gene family provides new insights into function of non-phosphorylating pathways. *Biochim. Biophys. Acta* 1757: 730–741.
- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M.K. and Scheible, W.R. (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 139: 5–17.
- Dafni, A., Kevan, P.G. and Husband, B.C. (2005) Practical Pollination Biology. Enviroquest, Ontario.
- Dahan, J., Tcherkez, G., Macherel, D., Benamar, A., Belcram, K., Quadrado, M., et al. (2014) Disruption of the CYTOCHROME C OXIDASE DEFICIENT1 gene leads to cytochrome c oxidase depletion and reorchestrated respiratory metabolism in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 166: 1788–1802.
- Daudi, A. and O'Brien, J.A. (2012) Detection of hydrogen peroxide by DAB staining in Arabidopsis leaves. *Bio-protocol* 2: e263.
- Dlasková, A., Clarke, K.J. and Porter, R.K. (2010) The role of UCP 1 in production of reactive oxygen species by mitochondria isolated from brown adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta* 1797: 1470–1476.
- Gandin, A., Denysyuk, M. and Cousins, A.B. (2014) Disruption of the mitochondrial alternative oxidase (AOX) and uncoupling protein (UCP) alters rates of foliar nitrate and carbon assimilation in Arabidopsis thaliana. *J. Exp. Bot.* 65: 3133–3142.
- Gao, X.Q., Liu, C.Z., Li, D.D., Zhao, T.T., Li, F., Jia, X.N., et al. (2016) The Arabidopsis KINβγ subunit of the SnRK1 complex regulates pollen hydration on the stigma by mediating the level of reactive oxygen species in pollen. *PLoS Genet.* 12: e1006228.
- Geisler, D.A., Pöpke, C., Obata, T., Nunes-Nesi, A., Matthes, A., Schneitz, K., et al. (2012) Downregulation of the δ-subunit reduces mitochondrial ATP synthase levels, alters respiration, and restricts growth and gametophyte development in Arabidopsis. *Plant Cell* 24: 2792–2811.
- Gill, S.S. and Tuteja, N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 8: 909–930.
- Giraud, E., Ho, L.H., Clifton, R., Carroll, A., Estavillo, G., Tan, Y.F., et al. (2008) The absence of ALTERNATIVE OXIDASE 1a in Arabidopsis results in acute sensitivity to combined light and drought stress. *Plant Physiol.* 147: 595–610.
- Gremski, K., Ditta, G. and Yanofsky, M.F. (2007) The HECATE genes regulate female reproductive tract development in Arabidopsis thaliana. *Development* 134: 3593–3601.
- Haferkamp, I. and Schmitz-Esser, S. (2012) The plant mitochondrial carrier family: functional and evolutionary aspects. *Front Plant Sci* 3: 2.
- Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N.L., Eichholtz, D.A., Rogers, S.G. and Fraley, R. (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229–1231.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W. (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3901–3907.
- Koltunow, A.M., Truettner, J., Cox, K.H., Wallroth, M. and Goldberg, R.B. (1990) Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development. *Plant Cell* 2: 1201–1224.
- Kowaltowski, A.J., Costa, A.D. and Vercesi, A.E. (1998) Activation of the potato plant uncoupling mitochondrial protein inhibits reactive oxygen species generation by the respiratory chain. *FEBS Lett.* 425: 213–216.
- Kühn, K., Obata, T., Feher, K., Bock, R., Fernie, A.R. and Meyer, E.H. (2015) Complete mitochondrial complex I deficiency induces an up-regulation of respiratory fluxes that is abolished by traces of functional complex I. *Plant Physiol.* 168: 1537–1549.
- Laitz, A.V.N., Acencio, M.L., Budzinski, I.G., Labate, M.T., Lemke, N., Ribolla, P.E.M., et al. (2015) Transcriptome response signatures

- associated with the overexpression of a mitochondrial uncoupling protein (AtUCP1) in tobacco. *PLoS One* 10: e0130744.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta-Delta C(T)) method. *Methods* 5: 402–408.
- Maia, I.G., Benedetti, C.E., Leite, A., Turcinelli, S.R., Vercesi, A.E. and Arruda, P. (1998) AtPUMP: an Arabidopsis gene encoding a plant uncoupling mitochondrial protein. *FEBS Lett.* 429: 403–406.
- Martin, M.V., Distéfano, A.M., Bellido, A., Córdoba, J.P., Soto, D., Pagnussat, G.C., et al. (2014) Role of mitochondria during female gametophyte development and fertilization in *A. thaliana*. *Mitochondrion* 19: B: 350–356.
- Matioli, C.C., Tomaz, J.P., Duarte, G.T., Prado, F.M., Del Bem, L.E., Silveira, A.B., et al. (2011) The Arabidopsis bZIP gene AtbZIP63 is a sensitive integrator of transient abscisic acid and glucose signals. *Plant Physiol.* 157: 692–705.
- McInnis, S.M., Desikan, R., Hancock, J.T. and Hiscock, S.J. (2006) Production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species by angiosperm stigmas and pollen: potential signalling crosstalk? *New Phytol.* 172: 221–228.
- Monné, M., Daddabbo, L., Gagneul, D., Obata, T., Hielscher, B., Palmieri, L., et al. (2018) Uncoupling proteins 1 and 2 (UCP1 and UCP2) from Arabidopsis thaliana are mitochondrial transporters of aspartate, glutamate, and dicarboxylates. *J. Biol. Chem.* 293: 4213–4227.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473–497.
- Nicholls, D.G. (2001) A history of UCP1. *Biochem. Soc. Trans.* 29: 751–755.
- Nogueira, F.T., Sasaki, F.T. and Maia, I.G. (2011) Arabidopsis thaliana uncoupling proteins (AtUCPs): insights into gene expression during development and stress response and epigenetic regulation. *J. Bioenerg. Biomembr.* 43: 71–79.
- Palmieri, L., Picault, N., Arrigoni, R., Besin, E., Palmieri, F. and Hodges, M. (2008) Molecular identification of three Arabidopsis thaliana mitochondrial dicarboxylate carrier isoforms: organ distribution, bacterial expression, reconstitution into liposomes and functional characterization. *Biochem. J.* 410: 621–629.
- Pan, X., Chen, Z., Yang, X. and Liu, G. (2014) Arabidopsis voltage-dependent anion channel 1 (AtVDAC1) is required for female development and maintenance of mitochondrial functions related to energy-transaction. *PLoS One* 9: e106941.
- Parsons, H.T., Christiansen, K., Knierim, B., Carroll, A., Ito, J., Batth, T.S., et al. (2012) Isolation and proteomic characterization of the Arabidopsis Golgi defines functional and novel components involved in plant cell wall biosynthesis. *Plant Physiol.* 159: 12–26.
- Pu, X.J., Li, Y.N., Wei, L.J., Xi, D.H. and Lin, H.H. (2016) Mitochondrial energy-dissipation pathway and cellular redox disruption compromises Arabidopsis resistance to turnip crinkle virus infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 473: 421–427.
- Radin, I., Mansilla, N., Röde, G. and Steinebrunner, I. (2015) The Arabidopsis COX11 homolog is essential for Cytochrome c Oxidase activity. *Front. Plant Sci.* 6: 1091.
- Ressler, P.M. and Gregory, W.C. (1979) A cytological study of three diploid species of genus *Arachis* L. *Heredity* 70: 13–16.
- Smith, A., Ratcliffe, R.G. and Sweetlove, L.J. (2004) Activation and function of mitochondrial uncoupling protein in plants. *J. Biol. Chem.* 279: 51944–51952.
- Smyth, D.R., Bowman, J.L. and Meyerowitz, E.M. (1990) Early flower development in Arabidopsis. *Plant Cell* 2: 755–767.
- Sweetlove, L.J., Lytovchenko, A., Morgan, M., Nunes-Nesi, A., Taylor, N.L., Baxter, C.J., et al. (2006) Mitochondrial uncoupling protein is required for efficient photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 19587–19592.
- Vercesi, A.E., Borecký, J., Maia, I.G., Arruda, P., Cuccovia, I.M. and Chaimovich, H. (2006) Plant uncoupling mitochondrial proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 383–404.
- Wilson, Z.A., Song, J., Taylor, B. and Yang, C. (2011) The final split: the regulation of anther dehiscence. *J. Exp. Bot.* 62: 1633–1649.
- Xie, H.T., Wan, Z.Y., Li, S. and Zhang, Y. (2014) Spatiotemporal production of reactive oxygen species by NADPH oxidase is critical for tapetal programmed cell death and pollen development in Arabidopsis. *Plant Cell* 26: 2007–2023.
- Yang, X.Y., Chen, Z.W., Xu, T., Qu, Z., Pan, X.D., Qin, X.-H., et al. (2011) Arabidopsis kinesin KP1 specifically interacts with VDAC3, a mitochondrial protein, and regulates respiration during seed germination at low temperature. *Plant Cell* 23: 1093–1106.
- Yang, Y. and Guo, Y. (2018) Elucidating the molecular mechanisms mediating plant salt-stress responses. *New Phytol.* 217: 523–539.

Supplementary material (Article)

Supplementary Table S1. List of primers used in this study

Primers*	Sequences (5' – 3')
<i>Salk_LB1.3</i>	ATTTTGCCGATTTCGGAA
<i>Sail_LB3</i>	TAGCATCTGAATTTTCATAACCAATCTCGATACAC
<i>AtUCP1_F</i>	GACGAAGATGTGAAGTAGACC
<i>AtUCP1_R</i>	TCAGTTTCTTTTGGACGCATCG
<i>AtUCP2_F</i>	AAGAGGGTCTATCTAATGACG
<i>AtUCP2_R</i>	GCCACAAACCAATAAATAGAA
<i>AtUCP3_F</i>	ACTCTTTCTGATTGTAGGA
<i>AtUCP3_R</i>	GACTTTAAAGCCCAATATTAT
<i>qAtUCP1_F</i>	GATGGTGGCGGCTGGTA
<i>qAtUCP1_R</i>	CGCCGACGCAAGCAG
<i>qAtUCP2_F</i>	CATAACAATGGCGGATTTCAAA
<i>qAtUCP2_R</i>	CGCTGCAAATGAAGGTTTCA
<i>qAtUCP3_F</i>	GGAGCCGAGTGACCAGAGAA
<i>qAtUCP3_R</i>	CGCAGAGAGTGAAGCAAGCA
<i>qAtGAPDH_F</i>	GCCAAGGCTGGGATTGC
<i>qAtGAPDH_R</i>	GTCGTACCATGACACCAACTTCA
<i>qAt40S_F</i>	CGACTCTCTGCGTTAGGTTTCA
<i>qAt40S_R</i>	GGGTTTCTCCTTGCTTTTGCT
<i>qGUS_F</i>	TTGCCAACGAACCGGATAC
<i>qGUS_R</i>	GCCAGTGGCGCGAAATATT
<i>qNtEF_F</i>	TCTGATCCATTGGATGCTGG
<i>qNtEF_R</i>	TTCAAACCCTTCCTCTTGGG
<i>qAtHEC2_F</i>	GCTCGATGAGGCTATCCATTAC
<i>qAtHEC2_R</i>	ACACCCTTTTCTCCATATCCT
<i>qAtHEC3_F</i>	AGAGGAACTCGGTGCTATGAAG
<i>qAtHEC3_R</i>	GAAGCCGTATCCATTTTAGTGC
<i>qAtAMS_F</i>	GTGACATCCAGCAAAAGGGTTC
<i>qAtAMS_R</i>	TGAGGCAAGAAATTGAGTCGGA
<i>qAtDYT1_F</i>	GGTGGAGGAAGCAGATTTCAAG
<i>qAtDYT1_R</i>	TCTCTCTTAGCTCTCTCTGCT
<i>qAtAOx1a_F</i>	CCGATTTGTTCTTCCAGAGG
<i>qAtAOx1a_R</i>	GCGCTCTCTCGTACCATTTC
<i>qAtCOX2_F</i>	TGATGCTGTACCTGGTCGTT
<i>qAtCOX2_R</i>	TGGGGGATTAATTGATTGGA
<i>qAtCOX15_F</i>	AGTGGTTTAGAGGAGCCACCG
<i>qAtCOX15_R</i>	TCAGCTGGTGGTTCAGGCAT
<i>qAtVDAC1_F</i>	TGAGGTCAATCTTCAGCTTCAA
<i>qAtVDAC1_R</i>	TTTCCAGACTTGGTGTCAAATG

\* F - forward and R – reverse

**Supplemental Table S2. Metabolic profiles of *atucp1-3* mutant plants (3-week-old).\***

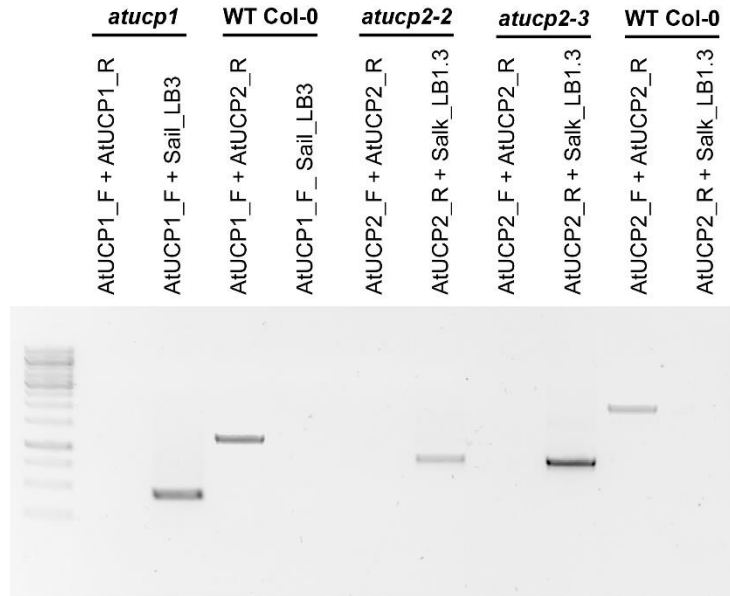
pH Peak	Metabolite	WT-1	WT-2	WT-4	Média	SD	<i>ucp1-1</i>	<i>ucp1-2</i>	<i>ucp1-4</i>	Média	SD	RELATIVE (UCP1/WT)	P-VALUE	<i>ucp2-1</i>	<i>ucp2-2</i>	<i>ucp2-3</i>	Média	SD	RELATIVE UCP2/WT	P-VALUE
8.4	Formate	3,83	3,93	4,43	4,06	0,32	6,24	5,57	5,97	5,93	0,34	1,46	0,001	5,21	5,66	5,08	5,32	0,30	1,31	0,004
7.9 - Left	Xanthine	13,4	24,3	20,9	19,51	5,60	72,9	33,8	36,5	47,75	21,86	<b>2,45</b>	<b>0,074</b>	29,6	25,1	28,8	27,83	2,36	<b>1,43</b>	<b>0,054</b>
7.9 - Right	Xantosine	4,16	4,09	4,28	4,18	0,10	5,42	4,7	4,22	4,78	0,60	1,14	0,112	3,89	4,13	4,04	4,02	0,12	0,96	0,079
6nd Right	Anserine	2,44	1,9	2,24	2,19	0,27	3,1	3,51	3,56	3,39	0,25	<b>1,55</b>	<b>0,003</b>	2,67	2,61	2,94	2,74	0,18	1,25	0,026
6.5	Fumarate	0,77	0,74	1,16	0,89	0,23	1,22	0,74	0,64	0,87	0,31	0,97	0,461	2,12	1,49	2,21	1,94	0,39	<b>2,18</b>	<b>0,012</b>
5.4	Sucrose	5,02	8,36	5,32	6,23	1,85	7,97	14,3	11,8	11,36	3,19	<b>1,82</b>	<b>0,045</b>	9,31	6,73	9,49	8,51	1,54	1,37	0,090
5.2	Glucose	20,3	23	13,5	18,94	4,88	31,6	12,5	9,24	17,79	12,09	0,94	0,445	12,6	5,58	12,8	10,31	4,10	<b>0,54</b>	<b>0,040</b>
4.0	Asparagine	23,4	20,4	21,2	21,66	1,57	40,9	39,7	34,1	38,22	3,60	1,76	0,004	20,9	20,3	20,3	20,50	0,34	0,95	0,164
4.0	Serine	14,1	18,4	13	15,13	2,86	24,4	24,20	20,5	22,45	2,82	1,48	0,045	14,3	13,3	14,4	14,01	0,59	0,93	0,285
2.5-2.4	Glutamine	16	16,4	16,9	16,45	0,45	20,8	21,9	20,1	20,93	0,92	1,27	0,003	15,8	14,4	15,7	15,30	0,81	0,93	0,059
3.7	EthyleneGlycol	172	172	163	171	5,20	244	226	208	226,00	18,00	1,34	0,012	173	178	173	174	2,89	1,03	0,097
3.6	Glycine	1,68	2,33	2,23	2,08	0,35	2,87	3,96	3,67	3,50	0,56	<b>1,68</b>	<b>0,014</b>	2,85	3,93	2,94	3,24	0,60	<b>1,56</b>	<b>0,029</b>
3.3	Methanol	3,26	134	74	70,48	65,53	94	35	8,66	45,89	43,70	0,65	0,311	62	84	61	69,00	13,00	0,98	0,486
3.2	Choline	2,94	4,19	3,73	3,62	0,63	8,56	3,01	2	4,52	3,53	1,25	0,352	3,7	2,66	3,76	3,37	0,62	0,93	0,327
2.4	Succinate	0,63	0,8	0,79	0,74	0,10	0,96	0,77	0,69	0,81	0,14	1,09	0,267	0,78	0,78	0,84	0,80	0,03	1,08	0,197
2.4	Pyruvate	0,93	0,77	0,92	0,87	0,09	1,07	0,87	1,01	0,98	0,10	1,13	0,118	1,03	1,25	0,97	1,08	0,15	1,24	0,059
2.4-2.3	Glutamate	13,9	21,8	19,8	18,50	4,10	24,1	23,4	20,3	22,57	2,00	1,22	0,112	16,6	16,5	18,4	17,18	1,05	0,93	0,318
1.9	Acetate	3,53	3,73	3,67	3,64	0,10	5,3	4,71	4,5	4,84	0,41	1,33	0,016	3,72	4,35	3,69	3,92	0,37	1,08	0,163
1.5	Alanine	2,39	2,35	2,59	2,44	0,13	4,31	4,55	3,7	4,19	0,44	<b>1,71</b>	<b>0,007</b>	2,76	2,99	2,99	2,91	0,13	1,19	0,006
1.3	Lactate	5,5	2,25	3,29	3,68	1,66	6	3,56	3,18	4,25	1,53	1,15	0,343	3,86	5,63	4	4,50	0,98	1,22	0,256
1.2	Ethanol	1,12	1,33	1,45	1,30	0,17	1,4	1,25	1,33	1,33	0,08	1,02	0,409	2,12	2,93	2,23	2,43	0,44	<b>1,87</b>	<b>0,017</b>
1.0	Valine	0,93	0,9	0,67	0,83	0,14	1,13	1,34	1,1	1,19	0,13	1,43	0,017	1,09	0,91	1,06	1,02	0,10	1,22	0,073

\*Entire plants were used  
 \* Nanomolar (nM) concentration in sample  
 \*\*Significant changes compared with WT are in bold

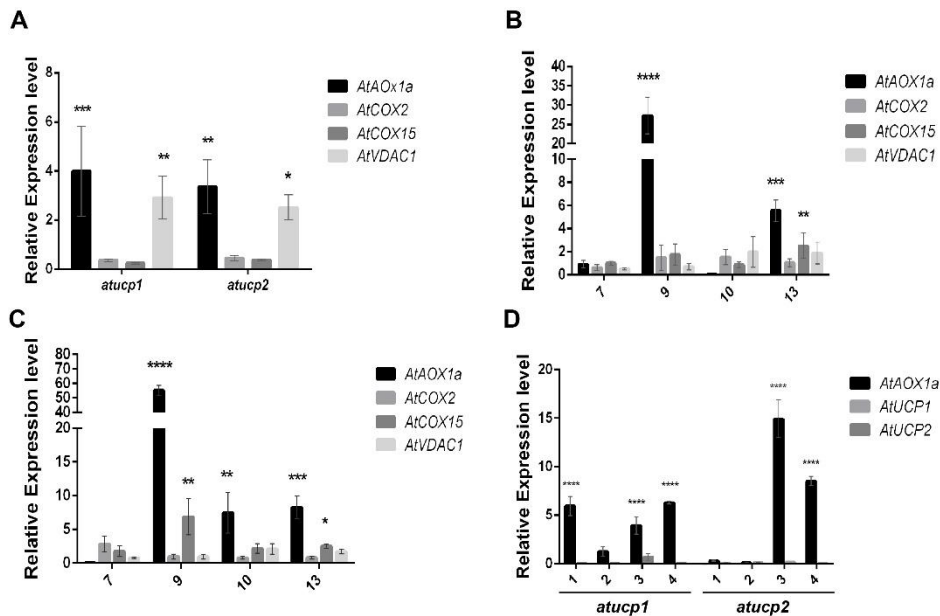
**Supplemental Table S3. Stigma receptivity and pollen viability of WT-Col-0 and mutants.**

	Stigma		Pollen viability**	
	Percentage	<i>p</i> -value	Percentage	Adjusted <i>p</i> -value
<b>Col-0</b>	100		96,30	
<b><i>atucp1</i></b>	<b>30</b>	0,0202	<b>89,60</b>	0,0035
<b><i>atucp2</i></b>	<b>80</b>	0,7176	<b>84,30</b>	< 0,0001

(\*) Mann-Whitney test with a 95% CI (a two-tailed test was performed). For statistical analyzes, the levels of stigma receptivity detected by the hydrogen peroxide method were expressed in numerical values (0 when no bubbles and 1 when one or more bubbles were observed). (\*\*) Dunnett's multiple comparisons test with a 95% CI. Bold values denote statistical significance.



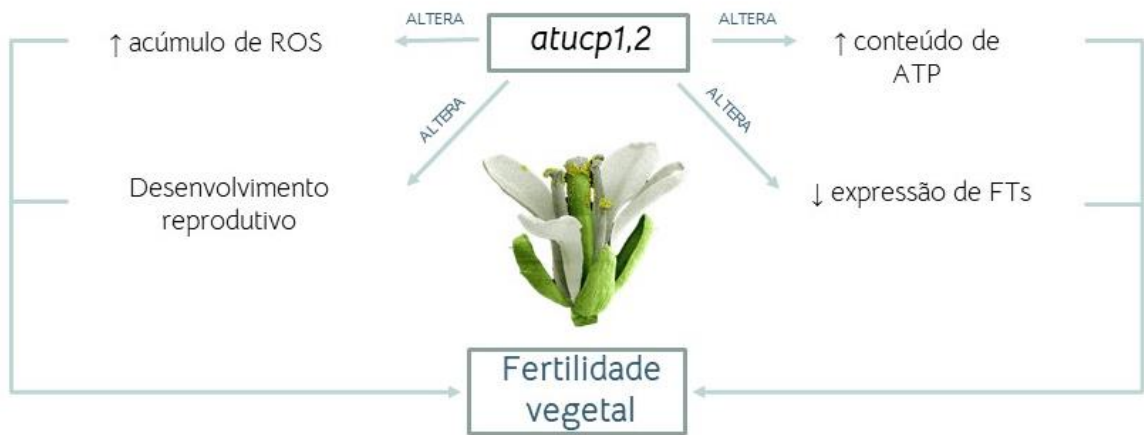
**Fig. S1.** Genotyping of the *atucp2-2* and *atucp2-3* homozygous lines by genomic PCR amplification. Amplification was performed using gene-specific (depicted at the top) and LB primers as depicted in Methods. The previously characterized *atucp1* mutant and WT-Col-0 were used as control.



**Fig. S2.** Relative expression of *AtUCP1* to 3 and genes encoding proteins associated with mitochondrial function in 3-week-old plants (A), germinating seeds at 1, 2, 3 and 4 DAS (B) and flowers (C and D) from the *atucp1* and *atucp2* mutants. Flowers at different developmental stages (stages 7, 9, 10 and 13) were collected from *atucp1* (B) and *atucp2* (C), respectively. In all cases, WT expression was used as calibrator and arbitrarily set to 1. Asterisks denote significant differences between WT and mutants (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  and \*\*\*\* $p < 0.0001$ ). Error bars, mean  $\pm$  S.D.

### Considerações finais

Os resultados obtidos no presente capítulo e suas implicações estão sumarizados na Figura 2.



**Figura 2.** Imagem que sumariza o capítulo I.



## 4. Capítulo II – Os carreadores de dicarboxilato (DICs)

Neste capítulo serão apresentados os dados referentes ao estudo dos carreadores de dicarboxilato de *Arabidopsis*.

### 4.1 Materiais e Métodos

#### 4.1.1 Validação do padrão de expressão órgão/tecido-específico de *AtDIC1-3*

##### 4.1.1.1 Material Vegetal e condições de crescimento

Sementes de *A. thaliana* Col-0 foram germinadas em recipientes plásticos contendo substrato composto (90% turfa de *Sphagnum* e 10% vermiculita), sendo inicialmente intumescidas e estratificadas a 4°C por 3 dias, na ausência de luz, para que houvesse a quebra de dormência. Posteriormente, os recipientes foram transferidos para uma câmara climatizada com fotoperíodo de 16 horas/dia de luz artificial, temperatura de 20°C ( $\pm$  1°C).

Amostras de diferentes órgãos em diferentes estágios de desenvolvimento foram coletados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido para posterior extração de RNA total e análise de expressão relativa de *AtDIC1-3* por RT-qPCR. São elas: sementes germinadas, *seedlings*, folhas de roseta vegetativa (estágio 3.5), caule, flores nos estágios 9 e 15 (de acordo com a classificação proposta por Boyes e colaboradores, 2008), e sílicas.

##### 4.1.1.2 Extração de RNA total e RT-qPCR

Três plantas foram reunidas em pools e o RNA total de cada *pool* foi extraído utilizando-se o reagente *Trizol* (Thermo Fischer Scientific) seguindo-se o protocolo proposto pelo fabricante. Os precipitados de RNA de cada amostra foram ressuspensos em água ultrapura tratada com DEPC (diethylpirocarbonato) e devidamente quantificados, sendo estes armazenados em *ultrafreezer* a -80°C. A integridade das amostras foi verificada em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. Tendo a qualidade atestada, prosseguiu-se com o tratamento com DNase afim de remover qualquer vestígio de DNA genômico presente na amostra e, para tal, utilizou-se o kit *RQ1 DNase* (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante. Os RNAs tratados foram imediatamente utilizados para a síntese de cDNA utilizando o kit *High Capacity Reverse Transcription Kit* (Thermo Fischer Scientific) que emprega oligonucleotídeos randômicos. As amostras de cDNA foram, então, tratadas com RNaseA-DNase Free conforme as orientações do fabricante e, assim, diluídas dez vezes. O

padrão de concentração entre as amostras foi verificado utilizando-se aparelho de espectrofotometria *Nanodrop* (ND-1000, Thermo Fischer Scientific).

A expressão relativa dos genes alvos foi determinada por PCR em tempo real (qPCR) empregando o cDNA obtido na etapa anterior. Utilizou-se o kit *GoTaq® qPCR Master Mix* (Promega) conforme recomendações do fabricante, ajustando-se o volume final da reação para 10 µl. Os oligonucleotídeos gene-específicos (*AtDIC1-3*) foram desenhados usando o programa “*Primer Express*” (Applied Biosystems) (Tabela 1). O aparelho ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) foi utilizado como plataforma para a qPCR. O método de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak e Schmittgen, 2001), no qual a expressão relativa do gene alvo é calculada com base na expressão de um gene normalizador de caráter constitutivo, ainda, em comparação a grupo controle, foi empregado. O gene *AtGAPDH* foi usado como normalizador endógeno e uma *pool* de todas amostras de *A. thaliana* Col-0 foi eleito como calibrador.

**Tabela 1.** Lista de oligonucleotídeos utilizados na análise de expressão relativa.

Oligonucleotídeo	Locus ID	Sequência
<i>qAtDIC1 F</i>	AT2G22500	5' CGACCCACCCGCTTGAT 3'
<i>qAtDIC1 R</i>		5' GCTGGTCGGAGATTGGTTTG 3'
<i>qAtDIC2 F</i>	AT4G24570	5' TCGTTGAAGGTGGGATTGC 3'
<i>qAtDIC2 R</i>		5' CTTGATTAGATCGAGAGGGTGAGT 3'
<i>qAtDIC3 F</i>	AT5G09470	5' AATCTTCCCGTGAAACCTTACC 3'
<i>qAtDIC3 R</i>		5' AAGGAAATGCTGCCGATGAGA 3'
<i>qAtGAPDH F</i>	AT1G13440	5' GCCAAGGCTGGGATTGC 3'
<i>qAtGAPDH R</i>		5' GTCGTACCATGACACCAACTTCA 3'

#### 4.1.2 Análise de perda de função em mutantes de inserção *atdic1-3<sup>-/-</sup>*

##### 4.1.2.1 Material Vegetal e condições de crescimento

Os diferentes mutantes de inserção de T-DNA usados neste estudo foram obtidas junto ao banco *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC; <http://www.arabidopsis.org/>). Para tal, foram adquiridas sementes de *A. thaliana* Col-0 contendo inserções nos genes *AtDIC1*

(At2g22500) (SALK\_090789 e SALK\_067118), *AtDIC2* (At4g24570) (SAIL\_1267\_F09) e *AtDIC3* (At5g09470) (SALK\_001547 e SALK\_087822C). Adicionalmente, sementes de *A. thaliana Col-0* selvagem foram utilizadas como controle.

As sementes foram germinadas em recipientes plásticos contendo substrato composto (90% turfa de *Sphagnum* e 10% vermiculita), sendo inicialmente intumescidas e estratificadas a 4°C por 3 dias, na ausência de luz, para que houvesse a quebra de dormência. Posteriormente, os recipientes foram transferidos para uma câmara climatizada com fotoperíodo de 16 horas/dia de luz artificial, temperatura de 20°C ( $\pm$  1°C). Após 10 dias, as plântulas foram individualizadas e identificadas, sendo mantidas nas mesmas condições por mais 20 dias quando, então, foram amostradas folhas de cada exemplar visando a extração de DNA genômico para proceder-se a genotipagem.

#### **4.1.2.2 Extração do DNA genômico**

O DNA genômico foi extraído empregando o método de CTAB como descrito por Doyle e Doyle (1987) com modificações. Cerca de 100 mg de tecido foliar das respectivas linhagens mutantes foram macerados em nitrogênio líquido com posterior solubilização em 500  $\mu$ l do tampão de extração CTAB (CTAB 2% - PVP2%) contendo 0,2% de  $\beta$ - Mercaptoethanol. Em seguida, adicionou-se 500  $\mu$ l de CIA (clorofórmio-álcool isoamílico na proporção 24:1) e, após a homogeneização das amostras, realizou-se uma centrifugação a 12.000 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi recuperado e transferido para um novo microtubo e ao qual foi acrescentado 500  $\mu$ l de isopropanol gelado (-20°C). Após incubação por duas horas a -20°C, realizou-se uma nova centrifugação a 13.200 rpm por 30 min a 14°C. O precipitado foi lavado com 500  $\mu$ l de etanol 70% e novamente centrifugado a 10.000 rpm por 5 min. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspensionado em 200  $\mu$ l de água ultrapura. O DNA genômico extraído foi quantificado em aparelho de espectrofotometria *Nanodrop* (ND-1000, Thermo Fischer Scientific).

#### **4.1.2.3 Confeção de oligonucleotídeos para genotipagem**

Os oligonucleotídeos foram desenhados utilizando-se a ferramenta *T-DNA Primer Design* que possibilita a sua confecção de forma específica e ideal para a identificação de indivíduos homocigotos (disponível em <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>) (Tabela 2). A ferramenta supracitada considera, além da localização da inserção, a predição dos tamanhos dos produtos a serem observados, visando facilitar a distinção entre aqueles associados à

amplificação da inserção de T-DNA e os do DNA genômico desprovido de inserção. Adicionalmente, as sequências dos oligonucleotídeos obtidos foram verificadas em *software* de predição de qualidade (*PerlPrimer*) e, ainda, alinhadas com o genoma de *Arabidopsis* empregando a ferramenta *BLAST* disponível no *Arabidopsis Information Resource* (TAIR; <http://www.arabidopsis.org>), afim de checar possíveis pareamentos inespecíficos.

**Tabela 2.** Lista de oligonucleotídeos utilizados na genotipagem de linhagens *atdic1-3<sup>-/-</sup>*.

Oligonucleotídeo	Sequência
atdic1_Salk090789 F	5' ACAAGAAAGCATCCCATGTG 3'
atdic1_Salk090789 R	5' CTATTTTGC GCACAAGGAAAG 3'
atdic1_Salk067118_F	5' ATGGTCGTTTACCGTTGACTG 3'
atdic1_Salk067118_R	5' ATATTTTGCTGGTGGCAGTTG 3'
atdic2_Sail1267_F09 F	5' GGCGGATCCATGGGAGTCAAAGTTTCGTT 3'
atdic2_Sail1267_F09 R	5' AGGAGACAGAGGCAGAGGATC 3'
atdic3_Salk001547 F	5' AGAACCAGAAGAGCCAGAAGG 3'
atdic3_Salk001547 R	5' GGGTAATAAGGAAATGCTGCC 3'
atdic3_Salk087822_F	5' TTATTTTGGGCCATGTCTCAG 3'
atdic3_Salk087822_R	5' CCGTCGCAGAACTACAAGAG 3'
SAIL_LB	5' TAGCATCTGAATTTTCATAACCAATCTCGATAC 3'
SALK_LBb1.3	5' ATTTTGCCGATTTTCGGAAC 3'

#### 4.1.2.4 Genotipagem

A genotipagem visando identificar os indivíduos homocigotos foi realizada por PCR utilizando-se o kit *GoTaq Master Mix* (Promega). A reação foi composta por 1 µl do DNA genômico extraído (aproximadamente 20 ng), 0,3 µl de um dos oligonucleotídeos gene-específico (10 mM) e 0,3 µl do oligonucleotídeo específico para a borda do T-DNA, respeitando-se os respectivos T-DNAs inseridos nas diferentes linhagens (*SALK LBb1.3* para *atdic1* e *atdic3*, e *SAIL.LB* para *atdic2*). O volume final da reação foi ajustado para 10 µl com água ultrapura. As condições da PCR foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 33 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 61°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, e extensão final a 72°C por 5 minutos. A mesma reação foi empreendida utilizando-se o outro oligonucleotídeo gene-específico combinado com o oligonucleotídeo específico para a borda do T-DNA em questão. O DNA genômico de

arabidopsis (Col-0) selvagem foi usado como controle. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo.

#### **4.1.2.5 Localização da inserção do T-DNA**

A fim de determinar o local de inserção dos T-DNAs nos genes alvos nas respectivas linhagens, os produtos de amplificação obtidos na genotipagem por PCR de DNA genômico (item anterior) foram extraídos do gel e purificados. Para isso, utilizou-se o kit *GenElute Gel Extraction* (Sigma) conforme as recomendações do fabricante. Os produtos purificados foram devidamente quantificados em aparelho de espectrofotometria *Nanodrop* (ND-1000, Thermo Fischer Scientific) e utilizados nas reações de sequenciamento empregando os oligonucleotídeos gene-específicos (*AtDIC1-3*) e os oligonucleotídeos T-DNAs específicos (*SALK.LBb1.3: AtDIC1,3* e *SAIL.LB: AtDIC2*). Um sequenciador automático de DNA modelo ABI Prism 377 (Applied Biosystems) foi utilizado. As sequências obtidas foram então alinhadas com as sequências genômicas de *AtDIC1-3* disponíveis no banco TAIR.

#### **4.1.2.6 Análise de expressão de *AtDIC1-3* em linhagens *atdic1-3*<sup>-/-</sup>**

Os efeitos da inserção do T-DNA na expressão dos genes alvos foram investigados por RT-qPCR empregando RNA total extraído de folhas coletadas de plantas (20 dias) das linhagens *atdic1-3*<sup>-/-</sup> (n=3/genótipo), respectivamente. O RNA total de *pools* de amostras foliares foi extraído e tratado conforme descrito no item 4.1. Os RNAs tratados foram imediatamente utilizados para a síntese de cDNA utilizando o kit *High Capacity Reverse Transcription Kit* (Thermo Fischer Scientific) empregando oligonucleotídeos randômicos conforme descrito no item 4.1.1.2 supracitado.

A expressão relativa dos genes alvos nos mutantes de inserção bem como de outros carreadores correlatos (*AtSFC* e *AtDTC*) foi determinada (Tabela 3) utilizando-se o kit *GoTaq® qPCR Master Mix* (Promega) conforme recomendações do fabricante, ajustando-se o volume final da reação para 10 µl. Os oligonucleotídeos gene-específicos (*AtDIC1-3*) adotados são aqueles apontados na Tabela 1. O gene *AtGAPDH* foi usado como normalizador endógeno e amostras de *A. thaliana* (Col-0) foram eleitas como calibrador. Uma vez determinada a expressão dos genes alvos nos seus respectivos mutantes *atdic1-3*<sup>-/-</sup>, análises de expressão dos genes *AtDIC1-3* nos diferentes genótipos foram realizadas a fim de detectar possíveis efeitos de expressão compensatória.

**Tabela 3.** Lista de oligonucleotídeos utilizados na análise de expressão relativa de genes pertencentes à MCF.

Oligonucleotídeo	Locus ID	Sequência
<i>qAtSFCl_F</i>	AT5G01340.1	5' CGGCGCTTACAAAGGAATCG 3'
<i>qAtSFCl_R</i>		5' ATCCCATCCGAAGCGTGTAC 3'
<i>qAtDTC_F</i>	AT5G01340.1	5' ATGTGGTCTGACAGCTGGTG 3'
<i>qAtDTC_R</i>		5' AAGCGCATGGAAAGCATTGG 3'

#### 4.1.2.7 Caracterização fenotípica

Os fenótipos resultantes da perda de função foram avaliados como descrito (Weigel e Glazebrook, 2002). Em paralelo, o comportamento de tais plantas frente aos estresses osmótico e salino foi investigado conforme descrito por Begcy e colaboradores (2011). Para tal, foram realizados testes de germinação e de crescimento de raízes em condições de estresse bem como análises de desenvolvimento de plantas mutantes *atdic1-3<sup>-/-</sup>*.

Para avaliar o efeito da inserção de T-DNA nos genes alvos sobre a aquisição ou perda de tolerância aos estresses abióticos, análises de crescimento radicular foram empregadas. Para tal, as sementes de cada linhagem em estudo e do controle selvagem foram esterilizadas e germinadas em placas de Petri contendo meio MS suplementado com sacarose (3g.L<sup>-1</sup>) meia força (MS/2, isto é, com concentrações de sais e sacarose reduzidas à metade) (Murashige e Skoog, 1962) contendo 0,8% de Phytigel (Sigma). Dez dias após a semeadura, as plântulas (n=5/genótipo) foram transferidas para placas contendo meio MS/2 sem (controle) ou com a adição de manitol (200 mM) e NaCl (100 mM), respectivamente. As placas foram, então, mantidas em posição vertical em câmara de crescimento para favorecer o alongamento das raízes. O comprimento da raiz principal foi aferido dez dias após a realização do tratamento, sendo o ensaio conduzido em triplicata e, para tal, registrou-se o experimento em fotografias e utilizou-se o *software* de análise de imagem *ImageJ* (Schindelin *et al.*, 2012).

Os testes de germinação foram realizados dispendo 30 sementes de cada linhagem em estudo e do controle selvagem em placa de Petri contendo meio MS/2 adicionado, ou não (controle), de manitol (200 mM) e NaCl (100 mM), respectivamente. As sementes foram inicialmente desinfestadas em etanol 70% por 1 min, hipoclorito de sódio 70% por 10 minutos com posterior lavagem (5x) com água Milli-Q autoclavada e mantidas por 72 h no escuro a 4°C

para a quebra de dormência. As placas foram então transferidas para câmara climatizada e a germinação (determinada pela emissão da radícula) foi acompanhada ao longo de duas semanas sendo calculados os índices de germinação e velocidade de germinação. O ensaio foi realizado em triplicata para tratamento estatístico dos resultados. O índice de velocidade de germinação (IVG) foi calculado pela fórmula  $IVG = \sum (ni/ti)$ , em que  $ni$  corresponde ao número de sementes que germinaram no tempo “ $i$ ” cujos valores foram somados individualmente sendo os experimentos conduzidos em triplicatas.

Num primeiro momento, os efeitos fenotípicos associados foram avaliados ao longo do desenvolvimento vegetativo de indivíduos *atdic1-3<sup>-/-</sup>*. Para tal, sementes das referidas linhagens homozigotas, bem como sementes selvagens (Col-0), foram germinadas em substrato composto (90% turfa de *Sphagnum* e 10% vermiculita), sendo inicialmente intumescidas e estratificadas a 4°C por 3 dias, na ausência de luz. Transcorridos dez dias pós-semeadura, as plântulas foram individualizadas ( $n = 15$ ) e mantidas em câmaras climatizadas com fotoperíodo de 16 horas/dia de luz artificial e temperatura de 20°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ). Com periodicidade constante ao longo de dez dias, os indivíduos foram registrados por fotografia e, através do *software* de análise de imagem *ImageJ* (Schindelin *et al.*, 2012), acompanhou-se o desenvolvimento da área foliar das diferentes linhagens. Em paralelo, aferiu-se a relação de acúmulo de biomassa (fresca e seca) referente à parte aérea. Como parâmetros do desenvolvimento reprodutivo, mensurou-se o tempo de floração, comprimento das sílicas e produção de sementes das respectivas linhagens mutantes e os valores obtidos foram comparados com os valores de plantas selvagem (Col-0).

#### **4.1.2.8 Análises fisiológicas**

Para as análises fisiológicas e subsequentes, foram empregadas as linhagens cujo evento de inserção de T-DNA revelou impacto mais pronunciado na expressão dos genes alvos. Diante disso, para a avaliação das trocas gasosas foram utilizadas plantas com 40 dias ( $n=5$ ) e um analisador de gás infravermelho IRGA (ACD, modelo LCPro SD) com fluxo de ar de 300 mL  $\text{min}^{-1}$  e fonte de luz acoplada de 1200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Os seguintes parâmetros foram avaliados: concentração interna de carbono ( $C_i$ ) ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), condutância estomática ( $g_s$ ) ( $\text{mol de H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), transpiração ( $E$ ) ( $\text{mmol de H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e taxa de fotossíntese líquida ( $A$ ) ( $\mu\text{mol de CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). A partir de tais dados foram calculadas a eficiência instantânea no uso da água (EiUA) pela razão entre a fotossíntese líquida e a transpiração ( $A/E$ ) e a eficiência instantânea de carboxilação (EiC) mensurada a partir da relação entre a fotossíntese líquida e a concentração interna de carbono ( $A/C_i$ ).

Adicionalmente, o consumo de O<sub>2</sub> foi medido usando o respirômetro Oxygraph-2k (Oroboros, Innsbruck, Áustria) disponível no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP). Para tal, plantas inteiras (03 semanas) do controle selvagem (Col-0) e das linhagens mutantes *atdic1-3* (n=3/ genótipo) foram incubadas em temperatura ambiente e no escuro por 1 h. Posteriormente, aproximadamente 10 mg de folhas frescas foram seccionadas e os cortes longitudinais e transversais foram devidamente pesados e submergidos em 2,1 mL de meio MS (pH 5,8) saturado de ar e, então, o consumo de oxigênio por massa foi monitorado a 25°C e agitação constante de 80 rpm. As medidas foram amostradas em 120 pontos estáveis consecutivos (1/segundo) desprezando-se os primeiros dois minutos.

#### **4.1.2.9 Análises de expressão relativa dos genes *AtDIC1-3* em condições de estresse abiótico**

A expressão dos genes *AtDIC1-3* foi avaliada em resposta aos estresses salino (NaCl) e osmótico (manitol), respectivamente, empregando protocolo previamente descrito (Matiolli *et al.*, 2011). Para tal, aproximadamente 10 mg de sementes desinfestadas do controle selvagem (Col-0) bem como dos mutantes de inserção foram usados. As sementes foram inicialmente incubadas em meio MS/2 líquido por 72 h no escuro a 4°C para a quebra de dormência, sendo então mantidas sob agitação (67 rpm) a 20°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) e luz artificial constante por 7 dias. Após esse período, as plântulas foram transferidas para novo meio MS/2 líquido adicionado de NaCl (100 mM) ou manitol (200 mM). As amostras foram coletadas em diferentes tempos (6, 12 e 24 h) para posterior extração de RNA total e análise por RT-qPCR conforme descrito anteriormente. Paralelamente, amostras de plantas crescidas em condições normais (MS/2 sem adição de agente estressante) foram coletadas nos referidos tempos e estas foram consideradas grupo controle. A quantificação da expressão relativa foi realizada de acordo com o descrito no item 4.1.2.2.

#### **4.1.2.10 Análise de expressão relativa de genes marcadores de função mitocondrial**

A fim de verificar possíveis distúrbios provocados pelo nocaute dos genes em estudo no funcionamento da mitocôndria, análises de expressão relativa de genes considerados marcadores de função mitocondrial (*AtAOX1A*, *AtCOX15* e *AtVDAC1*) foram realizadas empregando as amostras obtidas no item anterior. Oligonucleotídeos gene-específicos foram desenhados conforme descrito no item 4.1.2.2 realizando-se pequenos ajustes manuais na sequência visando garantir sua especificidade, a qual foi verificada por alinhamentos com o genoma de *Arabidopsis* através da ferramenta *BLAST* disponível no banco de dados



<http://www.arabidopsis.org> (Tabela 4). O método matemático adotado para calcular os níveis de expressão foi em concordância ao descrito anteriormente (item 4.1.1.2).

**Tabela 4.** Lista de nucleotídeos utilizados na análise de expressão de genes marcadores mitocondriais.

Oligonucleotídeo	Locus ID	Sequência
<i>qAtAoxIAF</i>	AT3G22370	5' CCGATTTGTTCTTCCAGAGG 3'
<i>qAtAoxIAR</i>		5' GCGCTCTCTCGTACCATTTC 3'
<i>qAtCOX15F</i>	AT5G56090	5' AGTGGTTTAGAGGAGCCACCG 3'
<i>qAtCOX15R</i>		5' TCAGCTGGTGGTTCAGGCAT 3'
<i>qAtVDACF</i>	AT3G01280	5' TGAGGTCAATCTTCAGCTTCAA 3'
<i>qAtVDACR</i>		5' TTTCCAGACTTGGTGTCAAATG 3'

#### 4.1.2.11 Detecção de espécies reativas de oxigênio

Para a detecção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), plântulas das linhagens *atdic1-3<sup>-/-</sup>* com três semanas após a germinação foram submetidas à reação com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) conforme descrito (Daudia e O'Brien, 2012).

#### 4.1.2.12 Determinação do perfil metabólico e análises dos dados

Visando a determinação do perfil metabólico, sementes do controle selvagem (Col-0) e de linhagens mutantes *atdic1-3* foram germinadas em substrato e mantidas nas condições de cultivo habituais. Amostras de roseta vegetativa (n=5/genótipo) com 40 dias (fenótipo mais exacerbado) foram coletadas, imediatamente congeladas em líquido e, posteriormente, maceradas em condições estéreis. A 50 mg do macerado fino foram então adicionados 1000 µL de solução de extração de metabólitos (4°C) [90% (v v) metanol, suplementado com 2 mg/ml de ribitol e 6 mg/ml de ácido adípico como padrões internos]. As amostras foram imediatamente submetidas à vórtex e agitadas em 1.400 rpm durante 20 min a 75°C, sendo em seguida mantidas em gelo e submetidas a três pulsos de um minuto cada em sonicador 40Hzs-1. Os detritos celulares foram removidos por centrifugação a 12000 rpm por 5 min a 4°C. As amostras foram filtradas (filtros de com 0,2 µm de diâmetro) e 900 µL do sobrenadante filtrado foi transferido para um vial de vidro âmbar com capacidade de 1,5 mL. As amostras foram em seguida submetidas à drenagem usando um SpeedVac.

As análises de perfil metabólico foram realizadas em um equipamento Pegasus® BT GC-TOFMS disponível na Escola Superior de Agricultura “Luíz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (USP). Brevemente, as amostras foram derivatizadas em duas etapas, a primeira adicionando-se 30 µL de metoxiamina (15 µg/ µL em piridina) por 16 h em temperatura ambiente, no escuro e, posteriormente, adicionando-se MSTFA (N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide) com 1% TMCS (trimethylchlorosilane). Após incubação em temperatura ambiente por 1 h, adicionou-se 30 µL de solução padrão de alcanos C8-C20 40 ng cada por µL de hexano. Finalizada a preparação das amostras, estas foram injetadas no equipamento supracitado.

A normalização dos dados obtidos foi realizada empregando *script* do R *Studio*. Resumidamente, empregou-se o *Total ion count* como método de normalização, onde cada um dos metabolitos de uma amostra é normalizado (dividido) em função de todas as intensidades observadas de todos os metabolitos no conjunto amostral. O *script* prevê, ainda, a remoção de metabolitos que pós-normalização, revelaram-se zerados entre todas as amostras. As análises foram inicialmente realizadas em triplicatas técnicas e as quadruplicatas mais fidedignas estatisticamente na sua repetição técnica mais suportada foram selecionadas para a análise de dados.

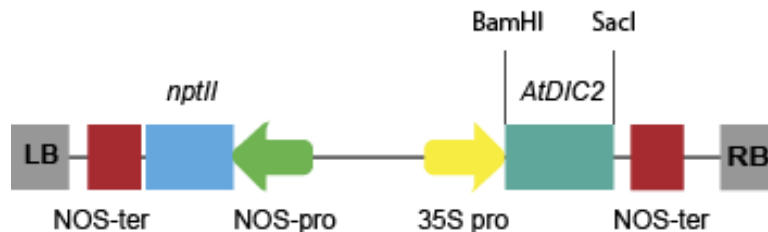
O servidor MetaboAnalyst foi empregado nas análises estatísticas das análises de intensidades relativas e de vias metabólicas (disponível em <https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/ModuleView.xhtml>). Para a análise global de metabolitos, nenhum filtro ou normalização foram aplicados, sendo os dados submetidos à transformação logarítmica (log2) e escalonamento de Pareto. No que se refere às análises de vias metabólicas alteradas, as configurações adotadas foram as padrões e os metabolitos submetidos como entrada foram aqueles cujas abundâncias revelaram-se diferenciais pela ANOVA realizada na análise anterior.

### **4.1.3 Análise de ganho de função em linhagens de *A. thaliana* superexpressoras**

#### **4.1.3.1 Construção dos cassetes de superexpressão**

Devido a ausência de uma segunda linhagem mutante para o gene *AtDIC2* decidiu-se pela geração de linhagens transgênicas de arabisopsis com superexpressão deste gene. Para a obtenção do cassete de superexpressão, a região codificadora de *AtDIC2* foi amplificada e

clonada em vetor binário pBI121 (Clontech), permanecendo assim, sob controle do promotor 35S do vírus do mosaico da couve flor (*CaMV*) e do terminador da *nopalina sintetase* (NOS) (Figura 3). O cDNA foi amplificado por RT-PCR empregando RNA total extraído de caule e oligonucleotídeos gene-específicos adicionados dos sítios para as enzimas de restrição *BamHI* e *SacI* (*AtDIC2 BamHI F* 5' GGCGGATCCATGGGAGTCAAAAAGTTTCGTT 3' e *AtDIC2 SacI R* 5' GGCGAGCTCTCAAAAATCTCGAAGCAG 3'), respectivamente. Após a ligação do cDNA no vetor binário digerido pelas referidas enzimas (gerando o cassete 35S::*AtDIC2*), células competentes da cepa *DH5a* de *Escherichia coli*, preparadas conforme protocolo descrito (Sambrook *et al.*, 2001), foram transformadas empregando choque térmico. Após a transformação, as bactérias foram plaqueadas em placas de Petri contendo meio Luria-Bertani (LB) sólido (0,1% p/v de triptona, 0,05% p/v de extrato de levedura, 0,1 % p/v de NaCl e 0,15% p/v de Select Agar em água deionizada, pH 7,0) adicionado de 100 µg/ml de canamicina. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 16 h. A transformação foi confirmada por PCR de colônia, e os produtos foram analisados por eletroferese em gel de agarose 1%. Após a confirmação, o DNA plasmidial foi extraído por lise alcalina (Sambrook e Russel, 2001), sequenciado e, então, inserido em agrobactéria visando a inserção em planta.



**Figura 3.** Representação esquemática do cassete de expressão *p35S::AtDIC2*. As caixas em cinza representam as bordas direita (RB) e esquerda (LB) do cassete de expressão. *nptII* (*neomycin phosphotransferase II*) - gene que confere resistência à canamicina. NOS-pro e NOS-ter - promotor e terminador NOS (*nopaline synthase*), respectivamente.

#### 4.1.3.2 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

A produção das células competentes e transformação de *A. tumefaciens* cepas GV 3101 foi baseada no protocolo descrito por Lacorte & Romano (1998). Após a transformação, análises de PCR de colônia empregando oligonucleotídeos específicos para a região codificadora do gene *AtDIC2* foram realizadas a fim de confirmar a transformação das agrobactérias com o plasmídeo recombinante.

#### 4.1.3.3 Transformação de arabidopsis por imersão floral

Plantas de *A. thaliana* (Col-0) foram transformadas empregando a técnica de imersão floral como descrito (Zhang *et al.*, 2006). Para tal, 100 µl de um pré-inóculo obtido a partir de uma colônia isolada de *A. tumefaciens* cepa GV 3101 transformada com o cassete de expressão *35S:AtDIC1-3* foram inoculados em 500 ml de meio LB líquido acrescido de canamicina. Os inóculos foram, então, incubados por um período de 16-24 h a 28°C, até que fosse atingida uma absorbância (600 nm) de aproximadamente 1,5~2,0. O meio foi, então, centrifugado a 4000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Após a centrifugação, as bactérias foram ressuspensas em um volume de solução de sucrose. A esta solução foi adicionado surfactante (SilwetL-77) na concentração de 0,02% do volume, sendo a solução homogeneizada e transferida para um béquer. Em seguida, as partes aéreas contendo os botões florais de arabidopsis foram submersas na suspensão bacteriana por 30 segundos sob leve agitação e com o auxílio de micropipetador, 1µl da suspensão de células foi cuidadosamente colocado sobre os botões florais. As plantas foram drenadas por 5 segundos e cobertas com filme plástico para manutenção da umidade, sendo em seguida transferidas para câmara climatizada com fotoperíodo de 16 h de luz artificial e temperatura entre 20°C ( $\pm$  1°C). No dia seguinte, a cobertura foi removida, e após 30 dias, as sementes foram coletadas para seleção dos transformantes. A seleção foi realizada no período pós-germinação utilizando como parâmetro o tamanho do hipocótilo das plântulas conforme descrito por Harrison e colaboradores (2006). Por essa metodologia, os transformantes são identificados através de seus hipocótilos alongados em adição à seleção por resistência ao antibiótico.

#### 4.1.3.4 Genotipagem

Plantas T<sub>2</sub> derivadas do *screening* inicial descrito no item anterior foram obtidas e tiveram seu DNA genômico extraído conforme descrito no item 4.1.2.2. Posteriormente, a genotipagem foi realizada por PCR utilizando-se o kit *GoTaq Master Mix* (Promega). A reação foi composta por 1 µl do DNA genômico extraído (aproximadamente 20 ng), 0,3 µl de oligonucleotídeo gene-específico reverso supracitado (10 mM) e 0,3 µl do oligonucleotídeo específico para a região promotora CAMV35S (5'-ACAATCCCCTATCCTTC-3'). O volume final da reação foi ajustado para 10 µl com água ultrapura. As condições da PCR foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 33 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, e extensão final a 72°C por 5 minutos. Amostras de DNA de *A. thaliana* Col-0 não transformada foram empregadas

como controle negativo. Os produtos das reações foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

#### **4.1.3.5 Análise do nível de expressão de *AtDIC2* e seleção de linhagens**

Visando verificar os níveis de expressão de *AtDIC2* nas linhagens positivas para a inserção do cassete de expressão, amostras de folha foram coletadas de plântulas e o RNA total extraído conforme descrito no item II.1.1.2. A expressão relativa de *AtDIC2* foi determinada por PCR em tempo real (qPCR). O método de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak e Schmittgen, 2001), onde o gene *AtGAPDH* foi usado como normalizador endógeno e amostras de *A. thaliana* Col-0 foram eleitas como calibrador.

#### **4.1.3.6 Análises funcionais**

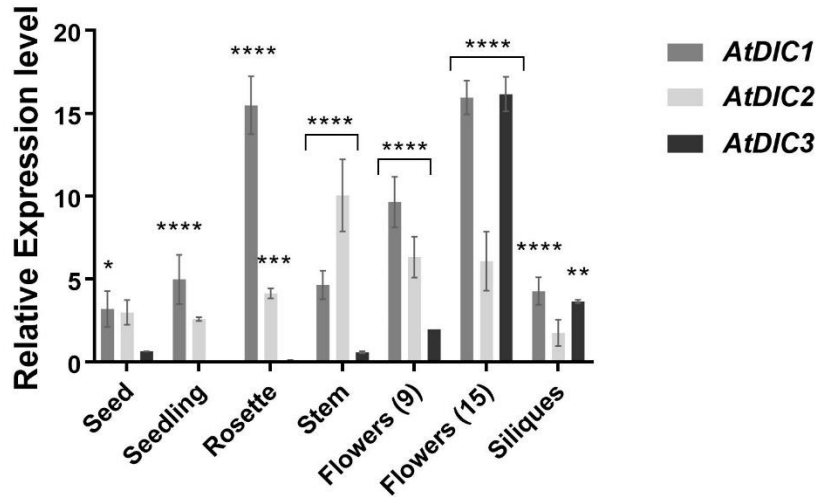
Os parâmetros descritos no item 4.1.2.7 foram igualmente avaliados nas linhagens selecionadas conforme descrito no item anterior.

## **4.2 Resultados e Discussão**

### **4.2.1 Validação dos padrões de expressão de *AtDIC1-3***

Palmieri e colaboradores (2008) rastrearam os perfis de expressão órgão/tecido específica de *AtDIC1-3* em dados de transcriptoma (*microarray*) e os validaram por RT-qPCR. No entanto, algumas divergências quanto aos padrões de expressão do gene *AtDIC3* foram encontradas. Os autores atribuem uma expressão preferencial em raiz e caule à *AtDIC1* e em raiz, caule e folha à *AtDIC2*, porém, não obtiveram êxito na detecção da expressão de *AtDIC3*. Este gene foi inicialmente relatado como sendo expresso especificamente em flores e sílicas. Considerando tais divergências e objetivando atestar o padrão de expressão dos referidos genes, uma análise de RT-qPCR foi realizada empregando amostras de cDNA obtidas a partir de um *set* mais completo de órgãos/tecidos de *A. thaliana* (Col-0). Segundo os resultados obtidos (Figura 4), o gene *AtDIC1* apresentou um padrão de expressão ubíquo, sendo detectado em todos os órgãos/tecidos amostrados, e mais intensamente em roseta, botões florais em estágio inicial de desenvolvimento (estágio 9; Boyes *et al.*, 2008) e em flores pós-antese (estágio 15; Boyes *et al.*, 2008). Já o gene *AtDIC2*, apesar de expresso em baixos níveis em todos os órgãos/tecidos analisados, revelou-se mais intensamente expresso em regiões de internós do caule, o que corrobora dados prévios de transcriptoma (Klepikova *et al.*, 2016). A expressão do

gene *AtDIC3* é, de fato, mais basal e de difícil detecção. No entanto, sua expressão foi detectada em botões florais em estágios iniciais de desenvolvimento (estágio 9) e de maneira significativa em flores pós-antese e sílicas, sugerindo, portanto, uma função especializada durante a fase reprodutiva. Esses resultados sugerem a existência de especificidade funcional e favorecem a hipótese de que essas isoformas atuariam de forma não redundante.

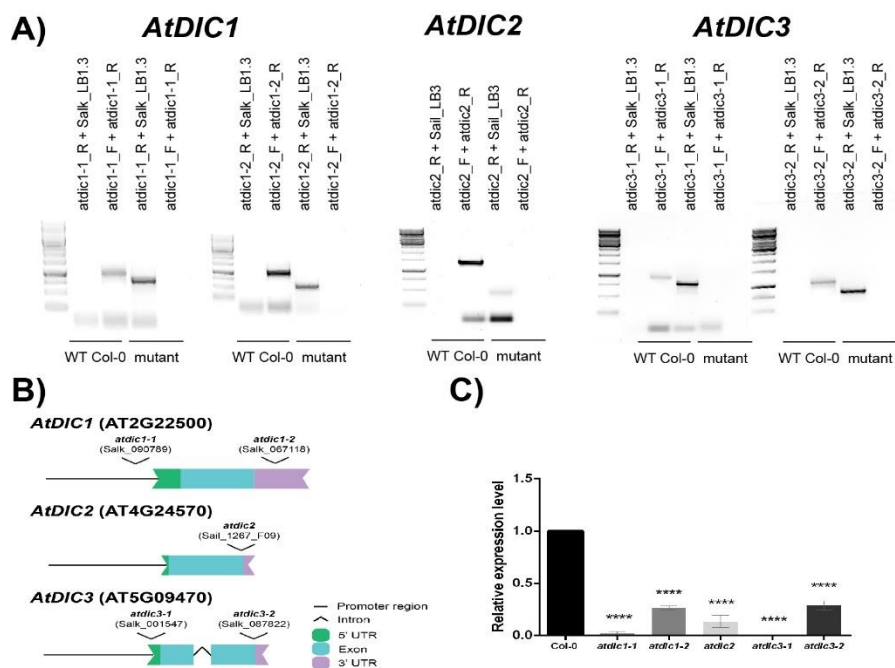


**Figura 4.** Padrão de expressão órgão/tecido-específico dos genes *AtDIC1-3* em *A. thaliana* (Col-0). A expressão em um *pool* de órgãos/tecidos amostrados foi usada como calibrador (adotada como sendo igual a 1). Os asteriscos indicam níveis de expressão com diferença estatística em relação ao selvagem (Col-0) com \**p-value*<0,05, \*\**p*<0,01, \*\*\**p*<0,001 e \*\*\*\**p*<0,0001, respectivamente.

#### 4.2.2 Avaliação funcional dos mutantes de inserção *atdic1-3*

##### Genotipagem e localização da inserção de T-DNA

Sementes de linhagens contendo inserção de T-DNA nos genes alvos [*AtDIC1* (AT2G22500), *AtDIC2* (AT4G24570) e *AtDIC3* (AT5G09470)] foram adquiridas junto ao banco ABRC. A fim de confirmar se tais linhagens apresentavam a inserção de T-DNA e, ainda, selecionar os indivíduos homocigotos, realizou-se a genotipagem por PCR de DNA genômico empregando-se oligonucleotídeos gene-específicos e outro dirigido para a borda do T-DNA correspondente. Como resultado, linhagens homocigotas para os genes *AtDIC1* (SALK\_090789 e SALK\_067118), *AtDIC2* (SAIL\_1267\_F09) e *AtDIC3* (SALK\_001547 e SALK\_087822), respectivamente, foram obtidas (Figura 5A).



**Figura 5.** Genotipagem dos mutantes de inserção *atdic1-3* para confirmação da homozigose. (A) Produtos de amplificação dos genes alvo (*AtDIC1-3*) empregando DNA genômico extraído de plantas mutantes e do tipo selvagem (WT Col-0). Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. (B) Localização da inserção de T-DNA nos genes alvos. (C) Efeito da inserção de T-DNA na expressão dos genes alvos, *AtDIC1-3*. A expressão em plantas selvagens (Col-0) foi usada como calibrador (adotada como sendo igual a 1). (\*\*\*\*) indicam níveis de expressão com diferença estatística em relação ao selvagem com  $p\text{-value} < 0,0001$ .

Os produtos de PCR obtidos no item anterior foram submetidos a sequenciamento a fim de determinar o local de inserção do T-DNA nos genes alvos em cada linhagem mutante. Os genes *AtDIC1* e *AtDIC2* são compostos por regiões não traduzidas posicionadas tanto em 5' quanto em 3' e por um único éxon, enquanto que o gene *AtDIC3* é constituído por dois éxons intercalados por uma região intrônica do tipo II (Figura 5B; Palmieri *et al.*, 2008). De acordo com os resultados de sequenciamento, no mutante SALK\_090789 (*atdic1-1*) o T-DNA está inserido na região promotora [-289 pares de base (pb) a partir do sítio de início da transcrição] enquanto o mutante SALK\_067118 (*atdic1-2*) apresenta a inserção localizada na região codificadora (+1542 pb a partir do sítio de início da transcrição). No mutante SAIL\_1267\_F09

(*atdic2*), a inserção localiza-se na porção final da região codificadora (+1055 pb a partir do sítio de início da transcrição). Já nos mutantes SALK\_001547 (*atdic3-1*) e SALK\_087822 (*atdic3-2*), o T-DNA está inserido na região promotora proximal e codificadora terminal (-167 pb e +1390 pb a partir do sítio de início da transcrição, respectivamente) (Figura 3B).

### **Verificação dos efeitos das inserções de T-DNA na expressão dos genes alvos**

A expressão relativa dos genes alvos nos mutantes de inserção *atdic1-3* foi avaliada empregando RT-qPCR. Os resultados obtidos revelaram uma redução drástica nos níveis de transcritos dos genes alvos nos três mutantes avaliados (Figura 5C). O mutante *atdic1-1* apresentou uma redução de 97,9% na expressão do gene *AtDIC1* quando comparado com *Arabidopsis Col-0*. Da mesma maneira, os mutantes *atdic2* e *atdic3-1* apresentaram 90,1% e 99,9% de redução na expressão dos genes *AtDIC2* e *AtDIC3*, respectivamente, em relação a expressão observada em *Col-0*. Em contrapartida, as linhagens *atdic1-2* e *atdic3-2* manifestaram um efeito mais brando nos níveis de expressão dos genes alvos, alcançando 73% e 71% de redução, respectivamente.

### **Análises dos efeitos da inserção *in planta***

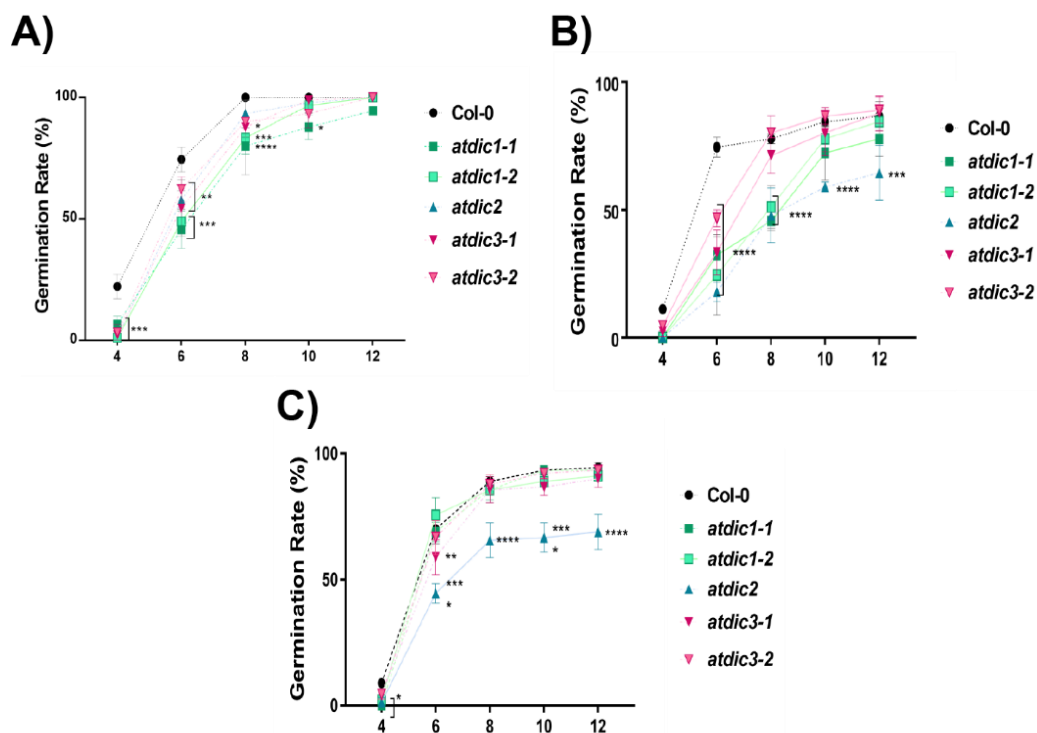
#### **Efeitos na Germinação**

Dados públicos de expressão em larga escala disponíveis no BAR ([bar.utoronto.ca](http://bar.utoronto.ca)) demonstram que os genes *AtDIC1* e *AtDIC2* são altamente expressos nas fases tardias da germinação e em cotilédones, dados parcialmente corroborados pela análise de expressão órgão/tecido específica obtida no presente trabalho (Figura 4). Neste contexto, postula-se que esses carreadores, especialmente *AtDIC1*, possam desempenhar um papel importante na mobilização de lipídeos de reserva durante a germinação, já que são capazes de transportar succinato e malato (Palmieri *et al.*, 2008). Assim, a fim de investigar essa possibilidade, testes de germinação de sementes em condições normais (meio MS/2) e sob estresse abiótico (MS/2 adicionado de NaCl ou manitol) foram realizados.

Os resultados obtidos revelam que, em condições normais de crescimento, todos os mutantes apresentaram um acometimento da germinação nas fases iniciais (entre 4 e 6 dias) com atraso na emissão de radícula em comparação com o controle *Col-0* (Figura 6A). Porém, 8 dias após a semeadura, este efeito foi atenuado e uma recuperação, em comparação ao controle



selvagem (Col-0), foi observada (Figura 6A). Esses resultados são compatíveis com um papel relevante destes carreadores na fase inicial da germinação. Já sob imposição de estresses osmótico ou salino, o maior efeito sobre a germinação das sementes foi observado no mutante *atdic2* com uma redução de 22,22% e 41,11% nas taxas de germinação em presença de manitol ou NaCl, respectivamente, sendo seguido pelos mutantes *atdic1-1* e *atdic1-2* (Figura 6B e 6C). O mutante *atdic2* é, portanto, o genótipo mais sensível em comparação aos demais. Esses resultados sugerem que a *AtDIC2* possui um papel metabólico relevante durante a germinação, especialmente em condições de estresse. Como já mencionado, uma intensa indução da expressão deste gene em estágios tardios da germinação em condições normais já foi relatada (Narsai *et al.*, 2011).



**Figura 6.** Índices de germinação (emergência da radícula) de *atdic1-3<sup>-/-</sup>* em condições controle (A), estresse osmótico (B) e salino (C). Os dados são as médias de três experimentos independentes usando 30 sementes/linhagem. Os asteriscos indicam diferença estatística em relação ao selvagem (Col-0) com (\*) *p-value*<0,05, (\*\*) *p-value*<0,01, (\*\*\*) *p-value*<0,001 e (\*\*\*\*) *p-value*<0,0001.

As velocidades de germinação das sementes das linhagens supracitadas também se revelaram comprometidas (Tabela 4). Em condições controle, as velocidades de germinação

dos mutantes *atdic1-1*, *atdic1-2* e *atdic2* foram prejudicadas em, aproximadamente, 15%. Por outro lado, as linhagens *atdic3* foram menos afetadas apresentando velocidades de germinação estatisticamente similares à do controle selvagem. Isso se deve muito provavelmente a potencial funcionalização deste gene no desenvolvimento reprodutivo. As taxas de germinação revelaram-se atenuadas, porém conservadas nas linhagens *atdic1-2* e *atdic3-2* quando comparadas às linhagens *atdic1-1* e *atdic3-1* (Tabela 4)

**Tabela 4.** Índice de velocidade da germinação das linhagens de mutantes de inserção *atdic1-3* em condições controle, de estresse osmótico e estresse salino. Os números destacados em negrito denotam significância estatística com um valor  $p < 0,05$ .

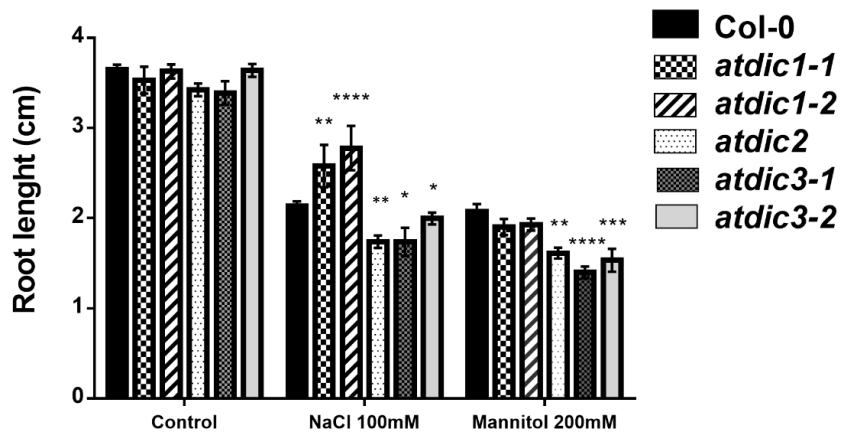
	<b>Controle</b>	<b>Manitol</b>	<b>NaCl</b>
Col-0	16,83	14,11	14,70
<i>atdic1-1</i>	<b>14,17</b>	<b>9,87</b>	14,14
<i>atdic1-2</i>	<b>14,22</b>	<b>10,27</b>	14,22
<i>atdic2</i>	<b>14,31</b>	<b>7,44</b>	<b>10,35</b>
<i>atdic3-1</i>	<b>14,52</b>	<b>11,02</b>	13,23
<i>atdic3-2</i>	14,76	<b>12,49</b>	13,24

### **Efeito no alongamento de raízes**

Dada a sugerida associação funcional entre os carreadores de dicarboxilato e o desenvolvimento vegetal, em especial nas fases iniciais, a responsividade destes aos estresses (Palmieri *et al.* 2008) e a expressão induzida de *AtDIC2* em tecidos como columela, córtex e câmbio vascular (Iyer-Pascuzzi *et al.*, 2011), procurou-se, num segundo momento, investigar o efeito das mutações nos genes alvos sobre o desenvolvimento das raízes em condições normais ou sob estresse abiótico (osmótico e salino).

Curiosamente, nenhuma alteração no comprimento da raiz primária foi observada nos mutantes de inserção quando comparados com o genótipo selvagem (Col-0) em condições normais de crescimento. No entanto, em condições de estresse osmótico ou salino, observa-se um claro encurtamento da raiz primária em *atdic2*, *atdic3-1* e *atdic3-2*, sugerindo que os referidos genes sejam fundamentais na resposta a tais estresses nesta fase de desenvolvimento (Figura 7), o que se faz coerente com dados disponíveis na literatura nos quais as expressões de

*AtDIC2* e *AtDIC3* em amostras radiculares eram alteradas diante de variações de pH (*AtDIC2*), deficiência de selênio (*AtDIC2,3*) e na presença de NO<sub>2</sub> (*AtDIC3*) (Iyer-Pascuzzi *et al.*, 2011; Kilian *et al.*, 2007). Os resultados observados estão em conformidade com dados de transcriptoma disponíveis no banco de dados BAR (bar.utoronto.ca), que apontam um intenso e rápido aumento nos níveis de transcritos dos genes *AtDIC1-3* diante da imposição de estresses abióticos, especialmente, salino e osmótico. Salienta-se, ainda, que *AtDIC3* é o gene cuja expressão revela-se mais permanentemente induzida em virtude de estresse salino (Kilian *et al.*, 2007). Esse dado, associado ao fato de *atdic3-1* ser um mutante nocaute, corrobora o encurtamento exacerbado da raiz primária neste mutante. Por outro lado, o aumento significativo no comprimento da raiz principal observado nos mutantes *atdic1* sob estresse salino pode estar associado a um efeito de expressão compensatória do gene *AtDIC2* como será discutido posteriormente. Cabe ressaltar ainda que *AtDIC1* e *AtDIC2* são responsivos a diferentes tipos de estresses abióticos, sendo *AtDIC1* altamente induzido na presença de estresse salino e *AtDIC2* em resposta ao estresse oxidativo.



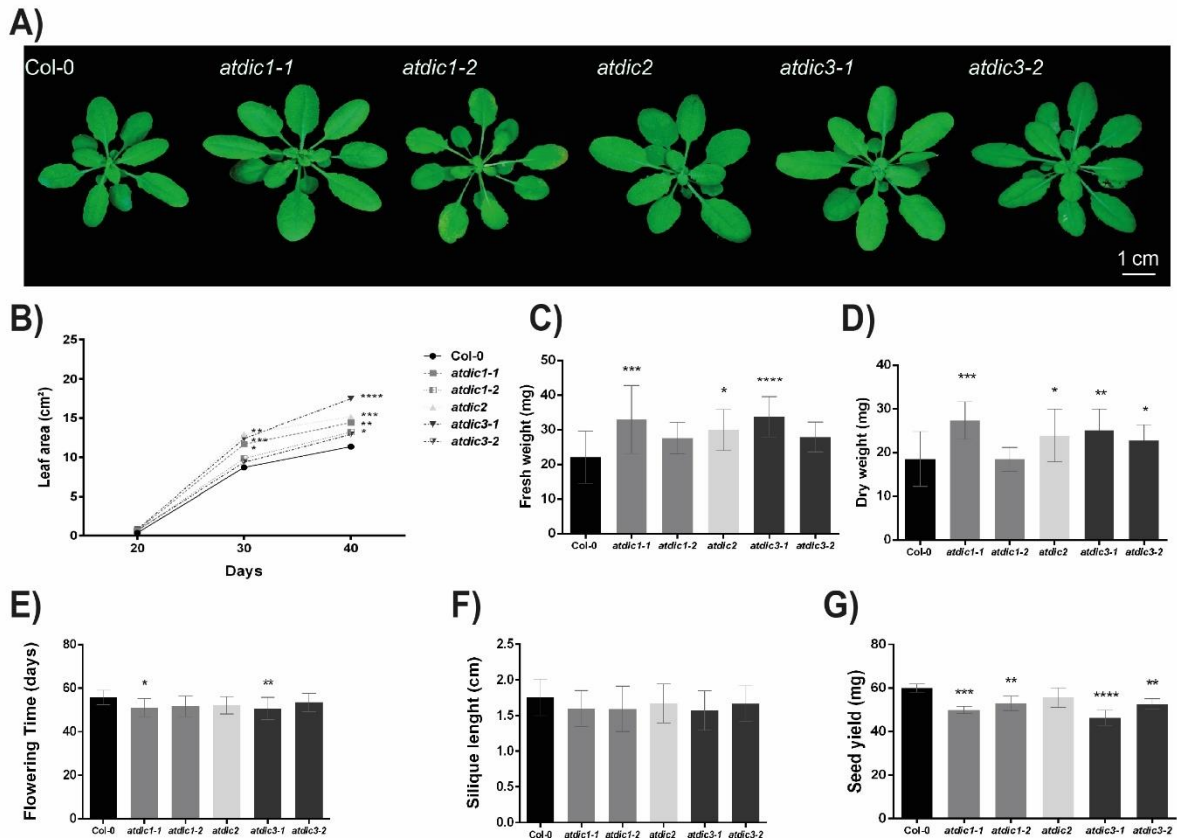
**Figura 7.** Comprimento das raízes primárias nos mutantes *atdic*. O comprimento da raiz principal foi mensurado 20 dias após a germinação em placas contendo meio MS/2 Adicionado, ou não (condição controle), de manitol e NaCl, respectivamente. Os dados correspondem às médias e o desvio padrão de três experimentos independentes usando cinco plântulas/genótipo. Os asteriscos indicam diferença estatística em relação ao selvagem (Col-0) com (\*) *p*-value < 0,05, (\*\*) *p*-value < 0,01, (\*\*\*) *p*-value < 0,001 e (\*\*\*\*) *p*-value < 0,0001.

## Efeitos no desenvolvimento vegetativo e reprodutivo

Adicionalmente, o desenvolvimento vegetativo dos mutantes *atdic1-3* foi avaliado através da quantificação da área foliar e mensuração do acúmulo de biomassa (fresca e seca) da parte aérea (roseta). Cabe destacar que a área foliar está intimamente relacionada com o metabolismo energético. Como é possível constatar nas figuras 8A e 8B, todos as linhagens mutantes apresentaram uma área foliar superior ao genótipo selvagem Col-0, sendo esta diferença visível a partir dos 30 dias pós-semeadura. Essa disparidade foi intensificada ao longo do tempo, tornando-se ainda mais evidente e estatisticamente significativa aos 40 dias pós-semeadura em fotoperíodo 16h/8h refletindo diretamente em sua biomassa, tanto fresca quanto seca, sendo os efeitos mais acentuados observados nos mutantes *atdic1-1* e *atdic3-1* (Figuras 8C e 8D). Nota-se ainda uma tendência de aumento de biomassa em *atdic2*, mas este, no entanto, não se revelou estatisticamente significativo em relação ao controle (Col-0). Esses resultados evidenciam um desenvolvimento vegetativo mais acentuado nos mutantes em comparação ao selvagem. Dando suporte a esses dados, Chaves e colaboradores (2019) observaram efeitos fenotípicos similares em linhagens cuja expressão do transportador de NAD mitocondrial foi comprometida, reiterando a importância da homeostase dos níveis de NAD mitocondrial no desenvolvimento vegetativo. Igualmente, tomates deficientes na expressão de malato desidrogenase mitocondrial exibem maior acúmulo de biomassa em sua parte aérea, incluindo-se os frutos (Nunes-Nesi *et al.*, 2005) Em contrapartida, dados da literatura relatam uma correlação positiva entre os níveis de expressão de *DICs* e o crescimento e proliferação celular em levedura e células tumorais (Palmieri *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2015).

Por outro lado, quando avaliados os parâmetros associados ao desenvolvimento reprodutivo, alguns efeitos mais discretos, porém estatisticamente significativos, foram observados. Nota-se uma tendência de antecipação da floração em 3 e 4 dias nos mutantes *atdic1-1* e *atdic3-1*, respectivamente (Figura 8E), e, adicionalmente, um moderado prejuízo no comprimento das sílicas, especialmente no mutante *atdic1-1* (Figura 8F). É importante notar, ainda, que embora se observe uma atenuação dos parâmetros supracitados, os efeitos na produção de sementes foram exacerbados, especialmente nos mutantes *atdic1-1* e *atdic3-1* (Figura 6G). A relação do *status* mitocondrial com o desenvolvimento reprodutivo vem sendo amplamente discutida, sugerindo que níveis de mitoROS e ATP sejam potenciais reguladores nos referidos estágios (Arcuri *et al.*, 2021). Dessa forma, assumindo-se o potencial papel anapleurótico dos *DICs* em arábido propostos por Palmieri e colaboradores (2008) e a íntima relação estabelecida entre o CAC e a fosforilação oxidativa, é plausível especular-se que a

interferência na expressão de *AtDIC1-3* afete a homeostase mitocondrial e, assim, exerça efeitos sobre o desenvolvimento reprodutivo.



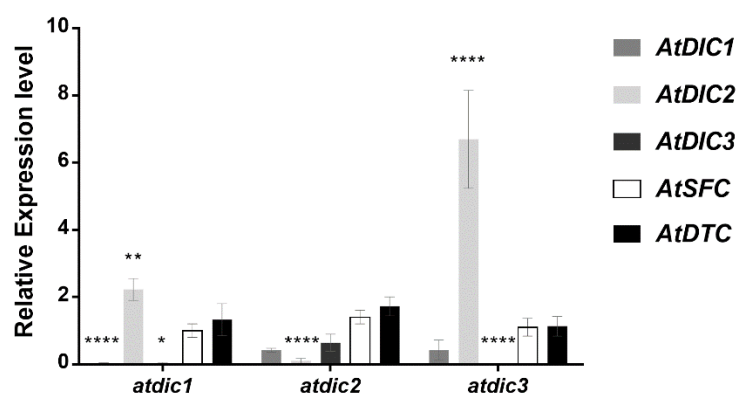
**Figura 8.** Avaliação fenotípica dos mutantes de inserção *atdic1-3*. Em (A) são apresentadas imagens representativas dos mutantes *atdic1-3* e do genótipo selvagem (Col-0). A área foliar foi avaliada ao longo do tempo (B) e as biomassas fresca (C) e seca (D) aos 40 dias pós-semeadura. Os parâmetros de desenvolvimento reprodutivo, tempo de floração (E), comprimento das sílicas (F) e produção de sementes (G) foram igualmente avaliados. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao selvagem Col-0 (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

Cabe ressaltar que os fenótipos se revelaram conservados em relação aos diferentes genótipos, sendo igualmente observados entre as distintas linhagens mutantes testadas. Por outro lado, estes foram mais brandos nas linhagens *atdic1-2* e *atdic3-2*, nas quais uma redução mais discreta na expressão dos genes alvos foi constatada. Por esta razão, as análises a seguir concentraram-se nas linhagens *atdic1-1*, *atdic2* e *atdic3-1*, sendo que, para fins estéticos, serão adotadas as nomenclaturas *atdic1* e *atdic3* para as linhagens SALK\_090789 e SALK\_001547, respectivamente.

## Expressão compensatória

A fim de verificar se os fenótipos observados, em especial aqueles relacionados ao aumento de biomassa, estavam associados a uma possível expressão compensatória, a expressão dos genes *AtDIC1-3* nos respectivos mutantes foi avaliada por PCR em tempo real. Para acessar informações sobre possível compensação transcricional de outros carreadores com afinidade pelo transporte de dicarboxilatos, os níveis de expressão do transportador de succinato/fumarato (*AtSFC*) e do carreador de di-tricarboxilatos (*AtDTC*) foram avaliados em paralelo.

Como pode ser constatado na Figura 9, apenas o gene *AtDIC2* teve sua expressão induzida nos genótipos em que a expressão das outras isoformas foi alterada, sendo esta mais significativa no mutante *atdic3*. Cabe ressaltar que o referido mutante é o que apresentou maior redução de expressão do gene alvo, podendo ser considerado um mutante nocaute, seguido por *atdic1* (Figura 5). O mutante *atdic2* não apresentou qualquer efeito de expressão compensatória estatisticamente significativo, muito provavelmente devido aos níveis residuais de expressão do gene *AtDIC2* (~10%) observado neste mutante. Os níveis de expressão de *AtSFC* e *AtDTC* também foram minimamente alterados em relação ao selvagem, não apresentando significância estatística. Tal análise permitiu compreender que, apesar do reduzido nível de expressão dos DICs nos mutantes analisados, outros membros da MCF com afinidade pelo transporte de dicarboxilatos não são recrutados para efeito compensatório. Cabe ressaltar ainda que a ausência de expressão compensatória não corrobora a hipótese de redundância funcional entre as isoformas, o que está em conformidade com Palmieri e colaboradores (2008) que, com base na identidade de sequência, nos padrões de expressão e na afinidade destes transportadores por diferentes substratos, sugerem a existência de uma especialização funcional das diferentes isoformas. Esses dados também indicam que a redução na expressão do gene *AtDIC2* não pode ser compensada pelos outros dois genes presentes em *Arabidopsis* e sugerem um papel mais generalista para essa isoforma.



**Figura 9.** Evidência de expressão compensatória dos genes *AtDIC1-3*, *AtSFC* e *AtDTC* nos mutantes de inserção *atdic1-3*. A expressão em plantas selvagens (Col-0) foi usada como calibrador (adotada como sendo igual a 1). Asteriscos denotam níveis de expressão com diferença estatística em relação ao selvagem (Col-0) sendo: (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$  e (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$ .

A compensação da expressão reduzida de *AtDIC1* e *AtDIC3* pela indução de *AtDIC2* pode estar associada à relação filogenética estabelecida entre este gene e os demais e dá suporte aos dados de tolerância ao estresse salino observados nos mutantes *atdic1* e *atdic3* durante a germinação (Figura 6C) e estágios iniciais do desenvolvimento radicular (Figura 7).

### Avaliações fisiológicas

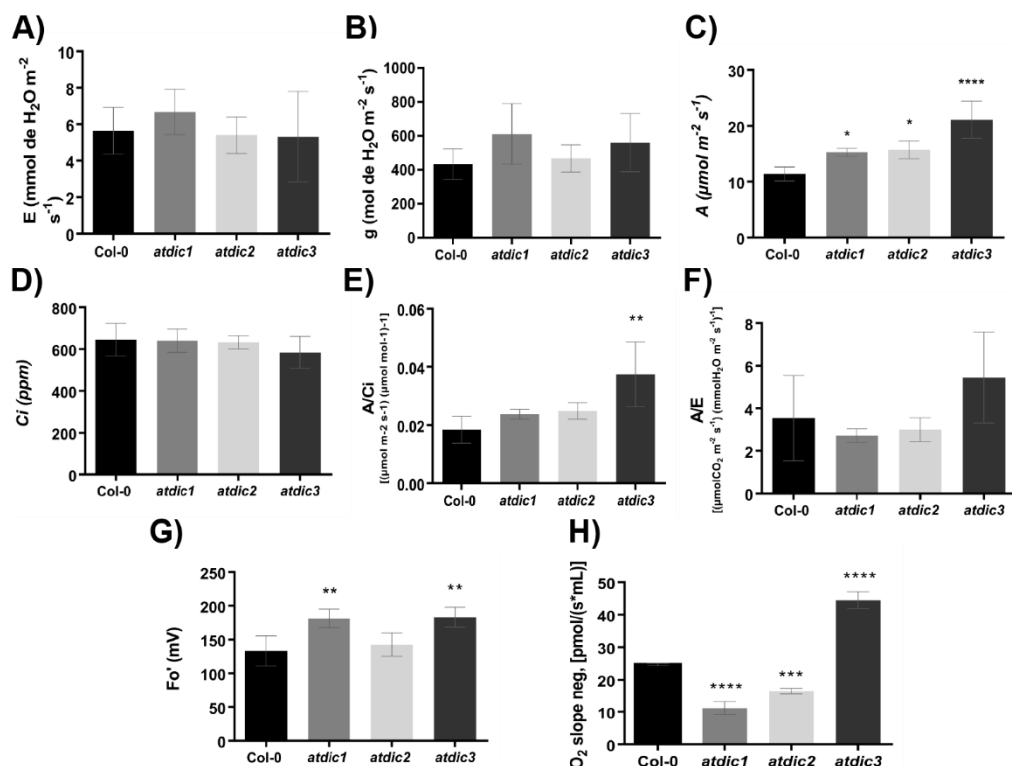
Como sugerido por Noctor e colaboradores (2007), o metabolismo mitocondrial tem, como principal função, regular o balanço redox e exerce papel crucial na eficiência fotossintética (Noctor *et al.*, 2003). Neste sentido, para avaliar os efeitos da expressão reduzida dos genes alvos a nível fisiológico, os seguintes parâmetros foram avaliados: a transpiração ( $E$ ), condutância estomática ( $g$ ), taxa de assimilação ( $A$ ), fração de carbono na cavidade subestomática ( $C_i$ ), eficiência de carboxilação ( $A/C_i$ ), eficiência instantânea do uso da água ( $A/E$ ), capacidade de re-oxidação da clorofila ( $Fo'$ ) e consumo de  $O_2$  (fluxo de  $O_2$ ).

Quando comparados ao selvagem (Col-0), os mutantes *atdic* não apresentaram alterações significativas quanto a transpiração e na eficiência instantânea do uso da água (Figuras 10A e 10F). No entanto, ao se avaliar as taxas de assimilação, nota-se que foram superiores ao controle (Col-0) com sólido suporte estatístico. Concomitantemente, também é possível verificar uma

tendência de aumento da condutância estomática, embora, neste caso, sem suporte estatístico. O ganho de eficiência fotossintética também é observado em plantas deficientes em acotinase e malato-desidrogenase mitocondrial, reiterando, assim, a contribuição do metabolismo mitocondrial para a fotossíntese (Carrari *et al.*, 2003; Nunes-Nesi *et al.*, 2005). É importante salientar que dados de transcriptoma de células-guarda e mesófilo foliar apontam uma alta expressão de *AtDIC2* nas referidas estruturas e, ainda, uma considerável indução nos estágios iniciais da diferenciação das células-guarda (Yang *et al.*, 2008; Adrian *et al.*, 2015). A literatura discorre sobre a relação estabelecida entre a condutância estomática e as taxas de assimilação bem como sobre seus impactos sobre a eficiência fotossintética. Dados demonstram que o fluxo de malato nas células-guarda regula a atividade de canais iônicos nas membranas, impactando o funcionamento estomático (Lee *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2010). Neste contexto, Medeiros e colaboradores (2017) observaram que um mutante de inserção para o gene *AtQUAC1*, que codifica um canal iônico capaz de transportar malato nas células-guarda dos estômatos, tiveram um considerável aumento nas taxas de assimilação e na condutância estomática, justificando o aumento de biomassa observado fenotipicamente. Efeitos similares foram observados em plantas deficientes em succinato desidrogenase cultivadas em restrição de nitrogênio, onde o acúmulo de succinato e um ganho de eficiência fotossintética são igualmente verificados (Fuentes *et al.*, 2011). A alta afinidade dos *AtDIC1* e *AtDIC2* pelo transporte de malato e succinato evidenciada por Palmieri e colaboradores (2008) é um potencial fator a se considerar como justificativa para os efeitos fisiológicos aqui observados. Além disso, os mutantes *atdic1* e *atdic3* exibiram um aumento considerável na capacidade re-oxidativa da clorofila (Figura 10G), reafirmando uma putativa eficiência fotossintética melhorada.

Curiosamente, as taxas respiratórias divergiram entre as linhagens mutantes, sendo inferiores nos mutantes *atdic1* e *atdic2* e drasticamente superiores nos mutantes *atdic3* (Figura 10H). Um aumento das taxas respiratórias em decorrência da interferência na expressão de DIC mediado por shRNA foi verificado por Kamga e colaboradores (2010) em neurônios de ratos. Neste mesmo estudo, os autores identificaram uma importante alteração nos conteúdos de glutatona, sugerindo a correlação destes.





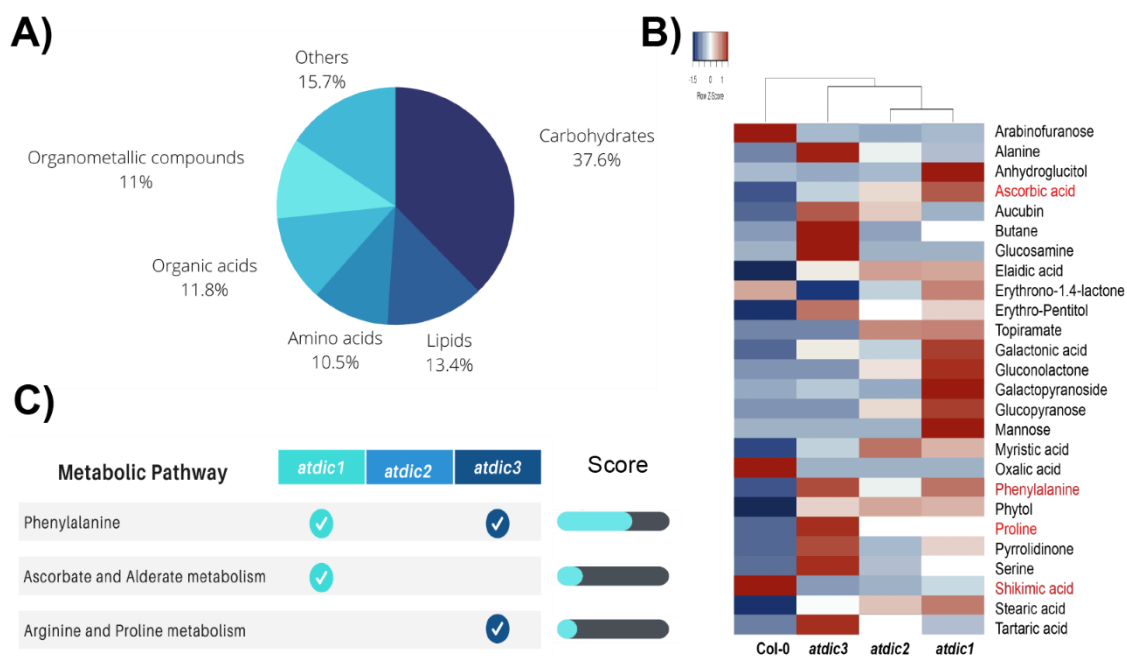
**Figura 10.** Efeitos da expressão reduzida dos genes *AtDICs* sobre os parâmetros fisiológicos. Em (A) transpiração ( $E$ ); (B) condutância estomática ( $g$ ); (C) taxa de assimilação ( $A$ ); (D) fração de carbono intracelular ( $C_i$ ); (E) taxa de carboxilação ( $A/C_i$ ), (F) eficiência instantânea do uso da água ( $A/E$ ); (G) fluorescência variável ( $F_o'$ ) e (H) consumo de  $O_2$ . Os asteriscos denotam significância estatística em relação ao selvagem (Col-0) sendo: (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$  e (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$ .

### Determinação do perfil metabólico no contexto de deficiência de DICs

Ao total, 102 metabólitos foram identificados pós-normalização no conjunto amostral, sendo que, dentre estes, o grupo mais representativo foi o de carboidratos e derivados, seguido por lipídeos, ácidos orgânicos, compostos organometálicos e aminoácidos (Figura 11A). Análises estatísticas criteriosas retornaram 26 metabólitos diferencialmente abundantes em relação ao controle selvagem (Col-0) e que se encontram dispostos em gráfico de gradiente (mais abundantes representados em vermelho; Figura 11B). A *clusterização* euclidiana empregada na confecção do gráfico permitiu visualizar uma segregação dos perfis metabólicos, sendo que *atdic1* e *atdic3* apresentam perfis mais relacionados ao acúmulo de açúcares e aminoácidos, respectivamente. No caso de *atdic3*, níveis aproximadamente 3 vezes superiores de serina, alanina e prolina foram detectados quando comparados com *atdic1* e *atdic2*. Ao

investigar-se alterações de vias metabólicas, as que se manifestaram mais alteradas foram as vias de metabolismo da fenilalanina, ascorbato e prolina, apresentando *scores* 0,55, 0,23 e 0,18, respectivamente (Figura 11C). Os principais componentes das vias da fenilalanina e prolina encontram-se perturbados em *atdic1* e *atdic3*, enquanto que os metabólitos associados à via do ascorbato encontram-se alterados majoritariamente em *atdic1*.

Alguns aspectos que merecem menção são as bem estabelecidas relações do metabolismo da fenilalanina com a fixação de carbono proveniente da via do ácido chiquímico e, portanto, na síntese de lignina e vias de resposta a estresses bióticos, aos quais os genes *AtDIC1* e *AtDIC2* são reportados como sendo amplamente responsivos. Dependendo da espécie, as quantidades de carbono fixado através de vias relacionadas aos aminoácidos aromáticos variam de 20 a 50% (Weiss, 1986; Corea *et al.*, 2012; Maeda e Dudareva, 2012 em Tohge *et al.*, 2013). A fenilalanina proveniente da via do ácido chiquímico está correlacionada, ainda, com a síntese de vários compostos secundários como alcalóides, fenilpropanóides (precursores da lignina), tanino, antocianinas, entre outros, que exercem papéis substanciais nas respostas vegetais a estresses bióticos e abióticos (Hamberger *et al.*, 2006; Maeda e Dudareva, 2012). Corea e colaboradores (2012) empregando triplo e quádruplo mutantes para os genes que codificam a arogenato desidratase, enzima final da via de da síntese de fenilalanina, verificaram que, além da deficiência de síntese de fenilalanina, ocorreu um severo prejuízo no conteúdo de lignina que comprometeu o acúmulo de biomassa nos referidos mutantes. Cabe ressaltar que a compensação da expressão reduzida de *AtDIC1* e *AtDIC3* pela indução de *AtDIC2* justificaria parcialmente a observação de que as alterações no metabolismo da fenilalanina estejam associadas aos mutantes *atdic1* e *atdic3*.



**Figura 11.** Perfil metabólico dos mutantes de inserção *atdic1-3*. Em (A) consta a representação gráfica dos metabólitos totais identificados pós-normalização. Já (B) apresenta abundância dos metabólitos diferenciais enquanto em (C) dispõem-se as vias metabólicas alteradas com suporte estatístico. Os metabólitos destacados em vermelho compõem as referidas vias.

Já a via do ascorbato e alderato, que se revelou alterada no mutante *atdic1* (Figura 11C), é descrita como sendo envolvida na detoxicação celular em resposta ao estresse oxidativo. Para proteger as células de danos causados por EROs, as plantas acumulam uma gama de mecanismos implicados no combate ao estresse oxidativo que inclui desde antioxidantes (ascorbato, glutatona e tocoferol) e enzimas de vias tradicionais como catalases, peroxidases e superóxido dismutases, até enzimas de vias alternativas como, por exemplo, a oxidase alternativa e NAD(P) desidrogenase. Estas promovem a regulação da homeostase redox celular conferindo uma tolerância a estresses abióticos (Moller, 2001; Foyer e Noctor, 2005; Foyer e Noctor, 2011; Millar *et al.*, 2011; Vanlerberghe, 2013). O ascorbato é produzido na membrana mitocondrial interna e seus níveis, quando elevados, promovem um aumento de tolerância a estresses em arabis e tabaco (Wang *et al.*, 2010; Yin *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2013; Bu *et al.*, 2016; Acosta-Gamboa *et al.*, 2020). Em contrapartida, em contextos de deficiência de ascorbato, plantas de arabis revelaram-se mais sensíveis aos estresses salino, de calor e de baixa e alta luminosidades (Huang *et al.*, 2005, Zhang *et al.*, 2012; Tóth *et al.*, 2011; Tóth *et al.*, 2009; Giacomelli *et al.*, 2007). Em consonância, os mutantes *atdic1* exibiram maior

tolerância aos estresses abióticos induzidos no presente estudo, abordando diferentes fases do desenvolvimento (germinação e desenvolvimento radicular primordial).

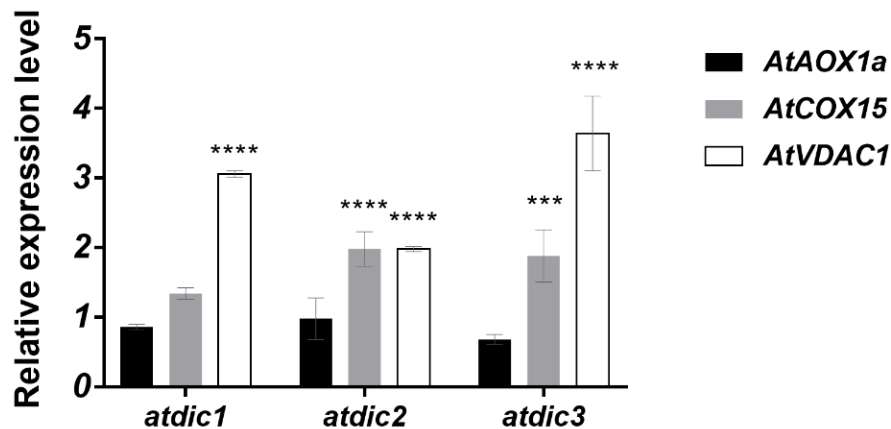
O mutante *atdic3* apresentou, ainda, maior acúmulo de prolina (Figura 11C), aminoácido geralmente associado à resposta vegetal ao déficit hídrico. Em cultivares de trigo resistentes à seca, por exemplo, o conteúdo de prolina, bem como sua utilização, foram superiores quando comparados a cultivares não resistentes (Nayyar e Walia, 2003). Em arroz, Hsu e colaboradores (2003) identificaram altos níveis de prolina quando da indução de déficit hídrico. Neste caso, os autores atribuem o acúmulo exacerbado de prolina aos altos níveis de seus precursores: glutamato, ornitina e arginina. A conversão de arginina em ornitina e sua destinação ao catabolismo de prolina também promovem a produção de ureia. De acordo com Bohner e colaboradores (2015), folhas em senescência exportam ureia como uma forma de remobilização de nitrogênio. Embora ainda de forma incipiente, o acúmulo de aminoácidos, especialmente de prolina, vem sendo descrito em folhas individualizadas de arroz e em plantas inteiras de *arabidopsis* e tabaco sob senescência induzida pelo escuro, sugerindo a importância das vias metabólicas a ela associadas durante a senescência foliar (Wang *et al.*, 1982; Mondal *et al.*, 1985, Launay *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2017). Neste contexto, Chrobock e colaboradores (2016) identificaram um acúmulo de prolina em estágios iniciais da senescência acompanhado de um aumento nos níveis de transcritos dos genes *AtDIC1-3* nos estágios adjacentes. Esses dados são compatíveis com o desenvolvimento precoce e acentuado observado durante a caracterização fenotípica dos mutantes *atdic1-3*, em especialmente *atdic3*.

Diante do perfil metabólico delineado no presente estudo, reitera-se a implicação funcional dos genes *AtDIC1-3* nas respostas aos estresses bióticos e abióticos, especialmente de *AtDIC2*, bem como na aceleração do desenvolvimento, novamente refutando a hipótese de redundância funcional das isoformas.

### **Análise de expressão relativa de genes marcadores de função mitocondrial**

A fim de evidenciar possíveis alterações na função mitocondrial provocada pela redução da expressão dos genes alvos nos mutantes *atdic1-3*, os perfis de expressão de genes selecionados (*AtAOX1a*, *AtCOX15* e *AtVDAC1*) cujos produtos estão implicados no metabolismo/função mitocondrial foram investigados por PCR em tempo real.

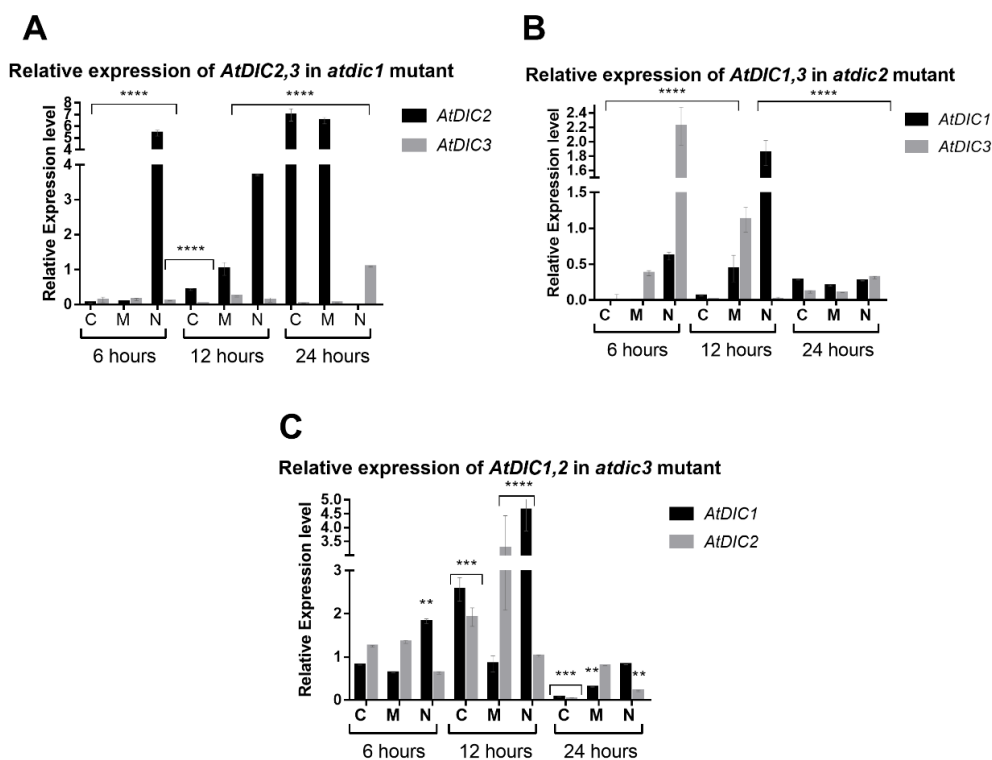
Neste caso, um aumento na expressão dos genes *AtCOX15* (*cytochrome C-oxidase 15*) e *AtVDAC1* (*voltage-dependent anion channel-1*) foi observado em todos os mutantes analisados (Figura 12). Cabe destacar que os canais iônicos voltagem-dependentes (VDACs) estão associados com a membrana mitocondrial externa e apresentam papel importante no metabolismo energético sendo capazes de transportar íons, ATP e NADPH (Tan e Colombini, 2007; Blachly-Dysone e Forte, 2001). Mutantes de inserção *atvdac1* apresentam comprometimento da síntese de ATP e redução no potencial da membrana mitocondrial (Pan *et al.* 2014). Por outro lado, a expressão dos genes *AtAOX1a* (*Alternative oxidase 1a*) foi reprimida nos mutantes *atdic1* e *atdic2* (Figura 12). Cabe ressaltar que a AOX é normalmente induzida em condições nas quais o fluxo de elétrons pela cadeia respiratória está comprometido (Maxwell *et al.*, 1999; Vanlerberghe *et al.*, 2013), o que parece não ser o caso nos mutantes *atdic1* e *atdic2*. Esses resultados sugerem que a redução na expressão dos genes *AtDIC1-3* e a falta de compensação por estes e outros carreadores membros da MCF desencadeia uma resposta mitocondrial associada com o metabolismo energético que pode ser atribuída a deficiências no fluxo de substratos respiratórios como é o caso do succinato.



**Figura 12.** Expressão relativa de genes marcadores de função mitocondrial (*AtAOX1a*, *AtCOX15* e *AtVDAC1*) nos mutantes *atdic1-3*. A expressão em plantas selvagens (Col-0) foi usada como calibrador (adotada como sendo igual a 1). Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao selvagem (\*\*\*)  $p < 0,001$  e \*\*\*\*)  $p < 0,0001$ .

### Análises de expressão relativa dos genes *AtDIC1-3* em condições de estresse abiótico

Dados disponíveis na literatura evidenciam a correlação entre os genes *DICs* em diferentes organismos e a manutenção da homeostase redox e energética em condições de estresses abióticos, em especial o estresse oxidativo (Palmieri *et al.*, 1999; Kanga *et al.*, 2010; Wilkins *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2015). Neste contexto, Palmieri e colaboradores (2008), baseados em dados prévios de transcriptoma (Kilian *et al.*, 2007), relatam que os genes *AtDIC1-3* respondem distintamente a diferentes tipos de estresses. A expressão de *AtDIC1*, por exemplo, mostra-se altamente induzida pelo estresse salino, mas reprimida por anóxia e hipóxia enquanto que a expressão de *AtDIC2* é induzida em condições de estresse oxidativo, mas reprimida em estresse desencadeado por exposição à luz ultravioleta. Diante dessas evidências, a expressão relativa dos genes *AtDIC1-3* nos genótipos mutantes (*atdic1-3*) foi avaliada por RT-qPCR a fim de verificar possíveis efeitos de expressão compensatória frente à indução de estresses abióticos (Figura 13).



**Figura 13.** Expressão relativa dos genes *AtDIC1-3* nos mutantes de inserção *atdic1-3* em condições controle (C) e sob estresse osmótico (M: manitol 200 mM) ou salino (N: NaCl 100mM). As amostras foram coletadas em diferentes tempos após a imposição do estresse (06,

12 e 24 horas). A expressão em plantas selvagens (Col-0) foi usada como calibrador (adotada como sendo igual a 1). Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao selvagem (\*\* $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

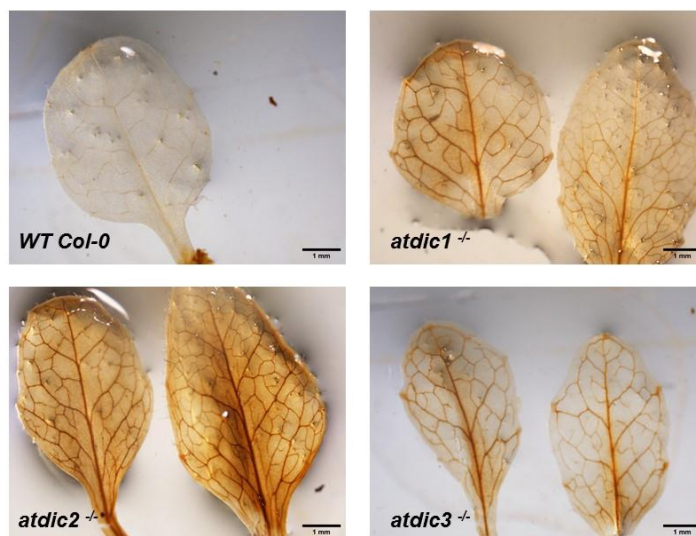
Os resultados obtidos confirmam a indução de *AtDIC1* pelo estresse salino em todos os genótipos analisados, com pico de expressão 12 h após a imposição do referido estresse, o que corrobora os dados de transcriptoma (Kilian *et al.*, 2007) relatados por Palmieri e colaboradores (2008). No mutante *atdic1*, um efeito compensatório exacerbado e precoce na expressão de *AtDIC2* foi observado em resposta ao estresse salino, sendo o pico de expressão detectado 6 h após a imposição do estresse. A expressão de *AtDIC2* também foi induzida de maneira compensatória pelo estresse osmótico nos mutantes *atdic1* e *atdic3*, sendo o mesmo observado para *AtDIC3* no mutante *atdic2*. Os dados obtidos indicam, também, a sensibilidade do mutante *atdic3* a ambos os estresses abióticos, refletida na intensa compensação de seu *knockout* pela indução da expressão das outras isoformas. Desta forma, os resultados obtidos corroboram os dados de transcriptoma nas condições de estresses abióticos em estudo (Kilian *et al.*, 2007). A divergência dos perfis transcricionais das isoformas *AtDIC1-3* em condições de estresses abióticos, novamente, fornecem indícios para o estabelecimento da hipótese de funcionalização das mesmas.

### **Deteção do acúmulo de espécies reativas de oxigênio**

Considerando que o metabolismo energético mitocondrial é a principal fonte de geração de EROs e que em mamíferos os transportadores DICs estão associados funcionalmente com a manutenção da homeostase redox (Kamga *et al.*, 2010), procurou-se avaliar se os mutantes *atdic1-3* apresentam algum comprometimento no metabolismo oxidativo. Para tal, o acúmulo de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) foi determinado pelo método de detecção *in situ* por adição de 3,3'-diaminobenzidine (DAB). Este procedimento baseia-se na propriedade do  $H_2O_2$  em oxidar DAB tornando-o acastanhado e insolúvel sendo, portanto, um potencial indicativo de presença deste radical.

Através do referido método, verificou-se que, qualitativamente, há um maior acúmulo de  $H_2O_2$  nos mutantes de inserção *atdic1-3* em comparação ao selvagem Col-0 (Figura 14), sendo o mutante *atdic2*, seguido de *atdic1*, os mais afetados (Figura 14). A literatura relata a importância da rota dissipativa mediada pela oxidase alternativa, em especial AOX1a, no

controle da formação EROs e na manutenção da homeostase mitocondrial (Vassileva *et al.*, 2009; Yoshida *et al.*, 2011).



**Figura 14.** Detecção de acúmulo de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em folhas dos mutantes *atdic1-3* empregando DAB. Três folhas/indivíduo e três indivíduos/genótipo foram avaliados. Imagens representativas são apresentadas.

#### 4.2.3 Análises de ganho de função em *Arabidopsis thaliana*

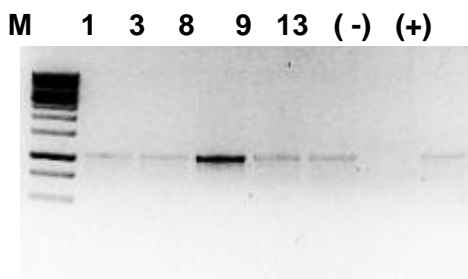
O gene *AtDIC2* foi o escolhido para investigar os efeitos do ganho de função dos DICs *in planta*. Essa escolha foi determinada pelos seguintes fatores: ausência de um segundo mutante de inserção para esse gene, por se tratar da isoforma mais filogeneticamente relacionada com as demais e representar a mais recrutada nos ensaios de compensação e, ainda, pelo fato de sua expressão ser altamente responsiva a uma grande variedade de estresses. Para tal, a região codificadora do referido gene foi amplificada e clonada no vetor binário pBI121 sob controle do promotor 35SCaMV (gerando o cassete *p35S::AtDIC2*) para posterior transformação de *Arabidopsis* empregando *Agrobacterium*.

#### Genotipagem e rastreio de linhagens transformadas

Após a transformação por imersão floral, os transformantes foram selecionados pelo alongamento dos hipocótilos (Harrison *et al.*, 2006) em meio de cultura MS/2 suplementado de



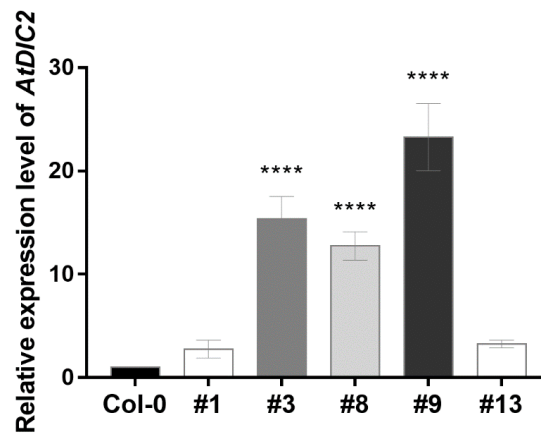
canamicina. As plantas pré-selecionadas foram então genotipadas por PCR de DNA genômico empregando um oligonucleotídeo reverso gene-específico e um oligonucleotídeo específico para o promotor CAMV35S. DNA genômico extraído de plantas selvagens (Col-0) foi usado como controle. Ao total, 5 linhagens contendo a inserção foram selecionadas para confirmação da superexpressão de *AtDIC2* (Figura 15).



**Figura 15.** Amplificação da região codificadora de *AtDIC2* em transformantes selecionados pelo alongamento de hipocótilo. Os eventos selecionados na genotipagem molecular foram mantidos ( $T_2$ ) para posterior avaliação do perfil transcricional. M - marcador de peso molecular (1kb); 1, 3, 8, 9 e 13 – eventos de transformação; (-) controle negativo (WT Col-0) e (+) controle positivo (DNA plasmidial contendo 35S:*AtDIC2*).

### **Quantificação dos níveis de expressão de *AtDIC2***

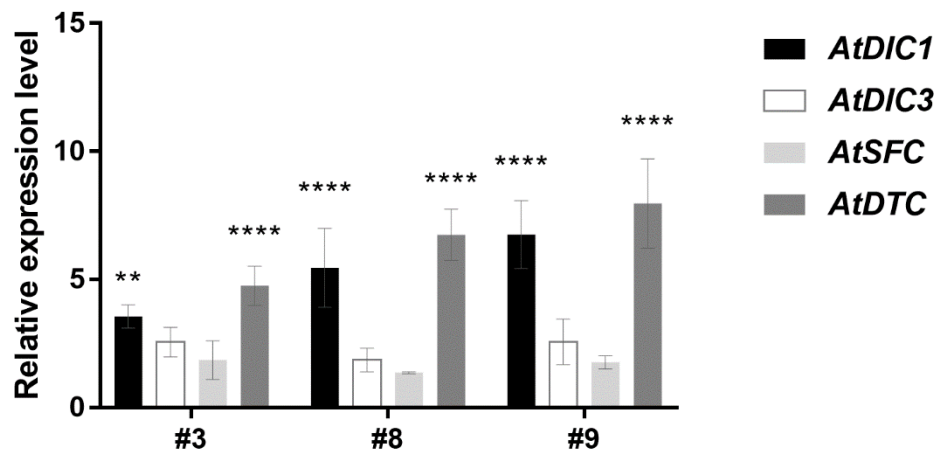
Os eventos selecionados anteriormente foram preservados e plantas derivadas das respectivas linhagens ( $T_2$ ) foram empregadas em análises de quantificação da expressão relativa de *AtDIC2* visando atestar a superexpressão. Como pode ser observado na Figura 16, as linhagens 3, 8 e 9 foram as que apresentaram maiores níveis de expressão de *AtDIC2* e, portanto, foram selecionadas para as análises de caracterização fenotípica.



**Figura 16.** Expressão relativa de *AtDIC2* nas linhagens superexpressoras *AtDIC2*. A expressão em plantas selvagens (Col-0) foi usada como calibrador (adotada como sendo igual a 1). Os asteriscos (\*\*\*\*) indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao selvagem  $p$ -value < 0,0001.

### Caracterização molecular das linhagens superexpressoras de *AtDIC2*

Num primeiro momento, procuramos avaliar os efeitos da superexpressão de *AtDIC2* no acúmulo de transcritos de outros carreadores com afinidade pelo transporte de dicarboxilatos (*AtDIC1*, *AtDIC3*, *AtSFC* e *AtDTC*) (Figura 17). Nas três linhagens avaliadas, a superexpressão de *AtDIC2* promoveu um aumento significativo no acúmulo de transcritos de *AtDIC1* e *AtDTC*. Por outro lado, não foram observadas alterações nos níveis de expressão de *AtDIC3* e *AtSFC*. Esses dados reforçam a proximidade funcional de *AtDIC1* e *AtDIC2*, isoformas com relação filogenética mais estreita (Palmieri *et al.*, 2008).



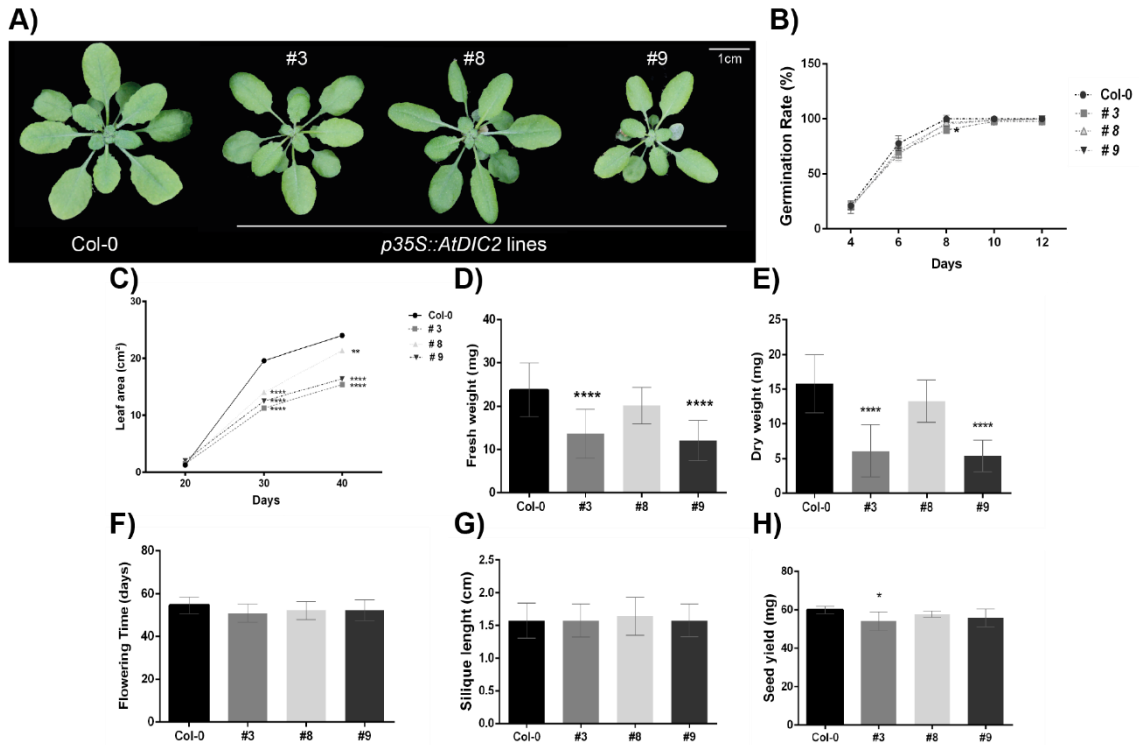
**Figura 17.** Expressão relativa de genes com afinidade pelo transporte de dicarboxilatos (*AtDIC1*, *AtDIC3*, *AtSFC* e *AtDTC*) nas linhagens superexpressoras *AtDIC2* (#3, #8 e #9). A expressão em plantas selvagens (Col-0) foi usada como calibrador (adotada como sendo igual a 1). Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao selvagem (\*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

### Caracterização fenotípica de plantas portando a construção *p35S::AtDIC2*

Vislumbrando elucidar as possíveis alterações fenotípicas associadas com a superexpressão de *AtDIC2*, os mesmos parâmetros investigados na caracterização dos mutantes de inserção foram analisados nas linhagens superexpressoras supracitadas (#3, #8 e #9).

Poucas alterações foram verificadas durante a germinação, havendo um leve retardo nos estágios iniciais que foi rapidamente restaurado (Figura 18B). Contrariamente ao observado nas linhagens mutantes *atdic*, a área foliar e as biomassas fresca e seca foram significativamente menores quando comparadas às plantas selvagens (Col-0) (Figuras 18A, 18C, 18D e 18E). Estes dados reiteram a caracterização fenotípica previamente apresentada (Figura 6) e sugerem que a deficiência de DICs aciona mecanismos de tolerância enquanto que a expressão exacerbada (no caso em específico da *AtDIC2*) conduz as plantas a um estado de economia de performance. É importante destacar que a expressão de *AtDIC2* nas plantas superexpressoras alcançou níveis superiores aos observados no efeito compensatório (Figura 9) e promoveu uma indução na expressão de *AtDIC1* e *AtDTC* (Figura 17), o que evidencia um distúrbio no fluxo de dicarboxilatos nas linhagens superexpressoras, comprometendo seu desenvolvimento

vegetativo. Em relação ao desenvolvimento reprodutivo, nenhuma diferença significativa em relação ao controle selvagem foi observada nos parâmetros tempo de florescimento e comprimento de sílicas (Figuras 18F e 18G). Por outro lado, a produção de sementes foi levemente afetada de maneira negativa na linhagem #3 (Figura 18H).

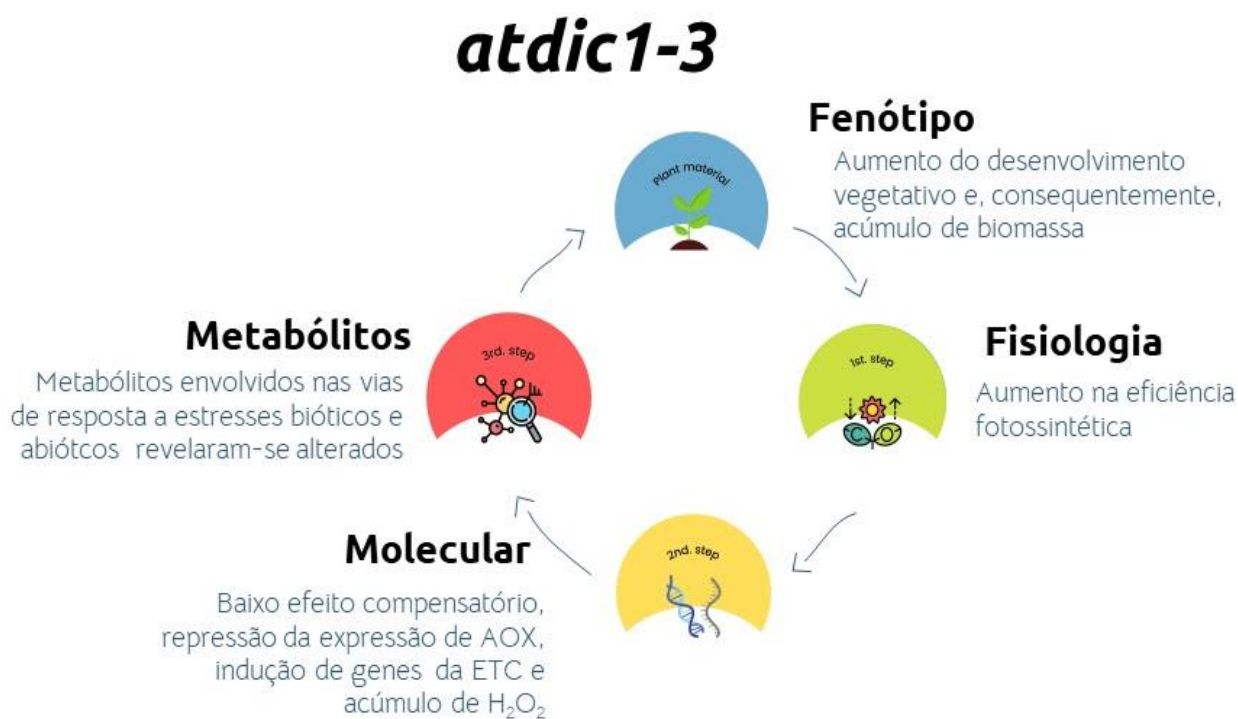


**Figura 18.** Avaliação fenotípica das linhagens superexpressoras *AtDIC2* (eventos 3, 8 e 9). Em (A) são apresentadas imagens representativas dos eventos superexpressores e do genótipo selvagem (Col-0) 40 dias pós-semeadura. Já em (B) os dados de germinação em condições fisiológicas estão dispostos. A área foliar foi avaliada ao longo do tempo (C) e as biomassas fresca (D) e seca (E) aos 40 dias pós-semeadura. Os parâmetros de desenvolvimento reprodutivo, tempo de floração (F), comprimento das sílicas (G) e produção de sementes (H) foram igualmente avaliados. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao selvagem Col-0 (\*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

### 4.3 Considerações Finais

Os resultados obtidos no presente capítulo e suas implicações estão sumarizados na Figura 19. Os dados gerados nos permitem considerar que:

- Os genes *AtDIC1-3* apresentam padrões de expressão distintos, variando não somente quanto à sua órgão/tecido especificidade mas, também, aos níveis de transcritos acumulados;
- Do ponto de vista fenotípico, a redução dos níveis de expressão de *AtDIC1-3* promoveu um aumento da área foliar, bem como de biomassa fresca e seca acumulada enquanto que a superexpressão de *AtDIC2* promoveu um comprometimento destes parâmetros.
- Fisiologicamente, o presente estudo evidenciou a estreita relação entre os DICs e o metabolismo plastidial, uma vez que, linhagens mutantes revelaram um ganho de desempenho fotossintético que reflete diretamente no fenótipo observado;
- Os dados obtidos nos testes de germinação sinalizam para uma forte associação entre os genes em estudo e o processo germinativo;
- A redução da expressão de *AtDIC1-3* também altera o *status* mitocondrial, reafirmando a relação entre os referidos genes e o metabolismo energético.
- Dados obtidos nas análises funcionais somados aos perfis metabólicos dos mutantes de inserção sugerem um papel determinante destes carreadores na aquisição de tolerância a uma gama de estresses abióticos;
- A expressão de *AtDIC1-3* indica que estes carreadores são requisitados durante a resposta aos estresses abióticos, sendo *AtDIC1* mais relacionada ao estresse salino e *AtDIC2* ao estresse osmótico.
- O perfil metabólico dos mutantes reitera a relação destes genes com as respostas aos estresses, em especial biótico, oxidativo e osmótico.



**Figura 19.** Representação esquemática dos principais resultados obtidos no capítulo II.

#### 4.4 Referências bibliográficas

- Acosta-Gamboa LM, Suxing L, Jarrod W C, Zachary CC, Raquel T, Jessica PYC, Argelia L. (2020) Characterization of the response to abiotic stresses of high ascorbate Arabidopsis lines using phenomic approaches. *Plant Physiol. Biochem.* 51:500-515.
- Adrian J, Chang J, Ballenger CE, Bargmann BO, Alassimone J, Davies KA, et al. (2015). Transcriptome dynamics of the stomatal lineage: birth, amplification, and termination of a self-renewing population. *Dev. Cell* 33:107–118.
- Almeida AM, Jarmuszkiewicz HK, Arruda P, Vercesi AE, Sluse FE (1999) Cyanide-resistant, ATP-synthesis sustained and uncoupling protein-sustained respiration during postharvest ripening of tomato fruit. *Plant Physiol.* 119:1323-1329.
- Anders S, Huber W. (2010) Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology*, 11:R106.
- Arcuri MLC, Nunes-Laitz AV, Lima RPM, Barreto P, Marinho AN, Arruda P, Maia IG. (2021) Knockdown of Mitochondrial Uncoupling Proteins 1 and 2 (AtUCP1 and 2) in Arabidopsis thaliana Impacts Vegetative Development and Fertility. *Plant Cell Physiol.* 62:1630-1644.
- Blachly-Dyson E, Forte M (2001) VDAC channels. *IUBMB Life* 52:113–118.
- Begcy K, Mariano ED, Matiello L, Nunes AV, Mazzafera P, Maia IG, Menossi M. (2011) An Arabidopsis mitochondrial uncoupling protein confers tolerance to drought and salt stress in transgenic tobacco plants. *PLoS ONE* 6(8):e23776.
- Bohner A, Kojima S, Hajirezaei M, Melzer M, von Wirén N. (2015) Urea retranslocation from senescing Arabidopsis leaves is promoted by DUR3-mediated urea retrieval from leaf apoplast. *Plant J.* 81(3):377-87.
- Borecký J, Nogueira FTS, de Oliveira KAP, Maia IG, Vercesi AE, Arruda P. (2006) The plant energy-dissipating mitochondrial systems: depicting the genomic structure and expression profiles of the gene families of uncoupling protein and alternative oxidase in monocots and dicots. *J. Exp. Bot.* 57:849-864.
- Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NR, Davis KR, Görlach J (2001) Growth Stage–Based Phenotypic Analysis of Arabidopsis: A Model for High Throughput Functional Genomics in Plants. *Plant Cell* 13:1499–1510.
- Brandalise M, Maia IG, Borecky J, Vercesi AE, Arruda P. (2003) ZmPUMP encodes a maize mitochondrial uncoupling protein that is induced by oxidative stress. *Plant Sci.* 165:329-335.

- Brustovetsky N, Klingenberg M. (1994) The reconstituted ADP/ATP carrier can mediate H<sup>+</sup> transport by free fatty acids, which is further stimulated by mersalyl. *J. Biol. Chem.* 269: 27329–27336.
- Bu Y, Sun B, Zhou A, Zhang X, Takano T, Liu S. (2016) Overexpression of AtOxR gene improves abiotic stresses tolerance and vitamin C content in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Biotechnol.* 16(1):69.
- Carrari F, Nunes-Nesi A, Gibon Y, Lytovchenko A, Loureiro ME, Fernie AR. (2003) Reduced expression of aconitase results in an enhanced rate of photosynthesis and marked shifts in carbon partitioning in illuminated leaves of wild species tomato. *Plant Physiol.* 133(3):1322–1335.
- Casimir M, Lasorsa FM, Rubi B, Caille D, Palmieri F, Meda P, Maechler P. (2009) Mitochondrial glutamate carrier GC1 as a newly identified player in the control of glucose-stimulated insulin secretion. *J. Biol. Chem.* 284(37):25004–25014.
- Catoni E, Schwab R, Hilpert M, Desimone M, Schwacke R, Flügge UI, Schumacher K, Frommer WB. (2003) Identification of an *Arabidopsis* mitochondrial succinate-fumarate translocator, *FEBS Lett.* 534(1-3):87–92.
- Chaves IS, Feitosa-Araújo E, Florian A, et al. (2019) The mitochondrial NAD<sup>+</sup> transporter (NDT1) plays important roles in cellular NAD<sup>+</sup> homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 100(3):487–504.
- Chen S, Liu A, Ji D, Lin X, Liu Z, Xia X, Liu D, Ahammed GJ. (2014) Silencing of tomato mitochondrial uncoupling protein disrupts redox poise and antioxidant enzymes activities balance under oxidative stress. *J. Plant Biol.* 57:9–19.
- Chrobok D, Law SR, Brouwer B, Lindén P, Ziolkowska A, Liebsch D, Narsai R, Szal B, Moritz T, Rouhier N, Whelan J, Gardeström P, Keech O. (2016) Dissecting the Metabolic Role of Mitochondria during Developmental Leaf Senescence. *Plant Physiol.* 172(4):2132–2153.
- Consodine MJ, Daley DO, Whelan J. (2001) The expression of alternative oxidase and uncoupling protein during fruit ripening in mango, *Plant Physiol.* 126:1619–1629.
- Corea ORA, Ki C, Cardenas CL, Kim SJ, Brewer SE, Patten AM, et al. (2012) Arogenate dehydratase isoenzymes profoundly and differentially modulate carbon flux into lignins. *J. Biol. Chem.* 287:11446–11459.
- Coty WA, Pedersen PL. (1975) Phosphate transport in rat liver mitochondria. Kinetics, inhibitor sensitivity, energy requirements, and labeled components *Mol. Cell. Biochem.* 9: 109–124.



- Czobor Á, Hajdinák P, Németh B, Piros B, Németh Á, Szarka A. (2019) Comparison of the response of alternative oxidase and uncoupling proteins to bacterial elicitor induced oxidative burst. *PLoS One*. 14(1):e0210592.
- Daudi A, O'Brien JA (2012). Detection of Hydrogen Peroxide by DAB Staining in Arabidopsis Leaves. *Bio-protocol* 2(18):e263.
- Day DA, Hanson JB. (1997) Effect of phosphate and uncouplers on substrate transport and oxidation by isolated corn mitochondria. *Plant Physiol*. 59:139–144.
- Doyle JJ and Doyle JL. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull*. 19:11-15.
- Fiermonte G, Palmieri L, Dolce V, Lasorsa FM, Palmieri F, Runswick MJ, Walker JE. (1998) The sequence, bacterial expression, and functional reconstitution of the rat mitochondrial dicarboxylate transporter cloned via distant homologs in yeast and *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem*. 273(38):24754-9.
- Fuentes D, Meneses M, Nunes-Nesi A, Araújo WL, Tapia R, Gómez I, Holuigue L, Gutiérrez RA, Fernie AR, Jordana X. (2011) A deficiency in the flavoprotein of Arabidopsis mitochondrial complex II results in elevated photosynthesis and better growth in nitrogen-limiting conditions. *Plant Physiol*. 157(3):1114-1127.
- Foyer CH, Noctor G. (2005), Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ*. 28:1056-1071.
- Foyer CH, Noctor G. (2011) Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiol*. 155(1):2-18.
- Giacomelli L, Masi A, Ripoll DR, Lee MJ, van Wijk KJ. (2007) Arabidopsis thaliana deficient in two chloroplast ascorbate peroxidases shows accelerated light-induced necrosis when levels of cellular ascorbate are low. *Plant Mol. Biol*. 65:627–644.
- Harrison SJ, Mott EK, Parsley K et al. (2006) A rapid and robust method of identifying transformed Arabidopsis thaliana seedlings following floral dip transformation. *Plant Methods* 2:19.
- Hamberger B., Ehrling J., Barbazuk B., Douglas C. J. (2006). Comparative genomics of the shikimate pathway in Arabidopsis, Populus trichocarpa and Oryza sativa: shikimate pathway gene family structure and identification of candidates for missing links in phenylalanine biosynthesis. *Recent Adv. Phytochem*. 40:85–11310.
- Hanning I, Baumgarten K, Schott K and Heldt HW. (1999) Oxaloacetate transport into plant mitochondria. *Plant Physiol*. 119:1025–1031.

- Hartl M, Finkemeier I. (2012) Plant mitochondrial retrograde signaling: post-translational modifications enter the stage. *Front. Plant Sci.* 23:253.
- Horsch RB, Fry J, Hoffmann N, Neidermeyer J, Rogers SG, Fraley RT (1989) Leaf disc transformation. Em: Gelvin S.B., Schilperoort R.A., Verma D.P.S. (eds) *Plant Molecular Biology Manual*. Springer, Dordrecht, 63–71.
- Houron-Cabassa C, Mesneau A, Miroux B, Roussaux J, Ricquier D, Zachowski A, Moreau F. (2002) Alteration of plant mitochondrial proton conductance by free fatty acids. Uncoupling protein involvement, *J. Biol. Chem.* 277:41533-41538.
- Hsu S, Hsu Y, Kao C. (2003) The Effect of Polyethylene Glycol on Proline Accumulation in Rice Leaves. *Biol. Plant.* 46:73–78.
- Huang SG, Klingenberg M. (1996) Chloride channel properties of the uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria: a patch-clamp study. *Biochemistry* 35:16806–16814.
- Huang C, He W, Guo J, Chang X, Su P, Zhang L (2005) Increased sensitivity to salt stress in an ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant. *J. Exp. Bot.* 56:3041–3049.
- Huypens P, Pillai R, Sheinin T, Schaefer S, Huang M, Odegaard ML, Ronnebaum SM, Wettig SD, Joseph JW. (2011) The dicarboxylate carrier plays a role in mitochondrial malate transport and in the regulation of glucose-stimulated insulin secretion from rat pancreatic beta cells. *Diabetologia* 54(1):135-45.
- Iacopetta D, et al., (2011) A novel subfamily of mitochondrial dicarboxylate carriers from : Biochemical and computational studies. *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics* 1807:251-261.
- Ito K. (1999) Isolation of two distinct cold-inducible cDNAs encoding plant uncoupling proteins from spadix of skunk cabbage (*Symplocarpus foetidus*). *Plant Sci.* 149:167-173.
- Iyer-Pascuzzi AS, Jackson T, Cui H, Petricka JJ, Busch W, Tsukagoshi H, Benfey PN. (2011) Cell Identity Regulators Link Development and Stress Responses in the *Arabidopsis* Root. *Developmental Cell* 21:770-782.
- Jarmuszkiewicz W, Sluse-Goffart CM, Vercesi AE et al. (2001) Alternative Oxidase and Uncoupling Protein: Thermogenesis Versus Cell Energy Balance. *Biosci. Rep.* 21:213–222.
- Ježek P, Costa ADT, Vercesi AE. (1997) Reconstituted plant uncoupling mitochondrial protein allows for proton translocation via fatty acid cycling mechanism. *J. Biol. Chem.* 272: 24272-24278.
- Johnson RN, Chapell JB. (1973) The Transport of Inorganic Phosphate by the Mitochondrial Dicarboxylate Carrier. *Biochem. J.* 134:769–774.

- Kakhniashvili D, Mayor JA, Gremse DA, Xu Y, Kaplan RS. (1994) Identification of a novel gene encoding the yeast mitochondrial dicarboxylate transport protein via overexpression, purification, and characterization of its protein product. *Biochim. Biophys. Acta* 1190(2):213-216.
- Kamga CK, Zhang SX, Wang Y. (2010) Dicarboxylate carrier-mediated glutathione transport is essential for reactive oxygen species homeostasis and normal respiration in rat brain mitochondria. *American Journal of Physiology. Cell Physiol.* 299(2):C497-C505.
- Kaplan RS, Mayor JA, Blackwell R, Wilson GL, Schaffer SW. (1991) Functional levels of mitochondrial anion transport proteins in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Mol. Cell. Biochem.* 107(1):79-86.
- Kilian J, Whitehead D, Horak J, Wanke D, Weinl S, Batistic O, D'Angelo C, Bornberg-Bauer E, Kudla J. and Harter K. (2007), The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *Plant J.* 50:347-363.
- Kim TH, Böhmer M, Hu H, Nishimura N, Schroeder JI. (2010) Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO<sub>2</sub>, and Ca<sup>2+</sup> signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61:561-591.
- Klepikova AV, Kasianov AS, Gerasimov ES, Logacheva MD and Penin AA. (2016) A high resolution map of the *Arabidopsis thaliana* developmental transcriptome based on RNA-seq profiling. *Plant J.* 88:1058-1070.
- Krämer R, Palmieri F (1992) *Metabolite Carriers in Mitochondria*. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 359-384.
- Laitz AVN, Acencio ML, Budzinski IGF, Labate MTV, Lemke N, Ribolla PEM, Maia IG (2015) Transcriptome response signatures associated with the overexpression of a mitochondrial uncoupling protein (AtUCP1) in tobacco. *PLoS One* 10:e0130744.
- Lançar-Benba J, Foucher B, Saint-Macary M. (1998) Purification of the rat-liver mitochondrial dicarboxylate carrier by affinity chromatography on immobilized malate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 273(38):24754-24759.
- Launay A, Cabassa-Hourton C, Eubel H, Maldiney R, Guivarc'h A et al. (2019) Proline oxidation fuels mitochondrial respiration during dark-induced leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 70(21):6203-6214.

- Lee D, Polisensky DH, Braam J. (2005) Genome-wide identification of touch and darkness-regulated Arabidopsis genes: a focus on calmodulin-like and XTH genes. *New Phytol.* 165: 429–444.
- Lee M, Choi Y, Burla B, Kim YY, Jeon B, Maeshima M, Yoo JY, Martinoia E, Lee Y. (2008) The ABC transporter AtABCB14 is a malate importer and modulates stomatal response to CO<sub>2</sub>. *Nat. Cell Biol.* 10(10):1217-23.
- Booty LM, King MS, Thangaratnarajah C, Majd H, James AM, Kunji ER, Murphy MP (2015) The Mitochondrial Dicarboxylate and 2-Oxoglutarate Carriers Do Not Transport Glutathione. *FEBS Lett.* 589:621–628.
- Li W, Zhang H, Li X et al. (2017) Integrative metabolomic and transcriptomic analyses unveil nutrient remobilization events in leaf senescence of tobacco. *Sci. Rep.* 7:12126.
- Liu W, An HM, Yang M. (2013) Overexpression of *Rosa roxburghii* l-galactono-1,4-lactone dehydrogenase in tobacco plant enhances ascorbate accumulation and abiotic stress tolerance. *Acta Physiol. Plantarum* 35:1617–1624.
- Livak KJ, Schmittgen TD. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.
- Long R et al. (2014) CORM-3, a water soluble CO-releasing molecule, uncouples mitochondrial respiration via interaction with the phosphate carrier. *Biochim. Biophys. Acta* 1837(1):201-209.
- Maack C, O'Rourke B. (2007) Excitation-contraction coupling and mitochondrial energetics. *Basic Res. Cardiol.* 102(5):369-392.
- Maeda H, Yoo H, Dudareva N. (2011) Prephenate aminotransferase directs plant phenylalanine biosynthesis via arogenate. *Nat. Chem. Biol.* 7:19–21.
- Matiolli CC, Tomaz JP, Duarte GT, et al. (2011) The Arabidopsis bZIP gene AtbZIP63 is a sensitive integrator of transient abscisic acid and glucose signals. *Plant Physiol.* 157(2):692–705.
- Maxwell DP, Wang Y, McIntosh L. (1999) The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(14):8271–8276.
- Medeiros DB, Barros KA, Jessica Aline S. Barros JAS, Omena-Garcia RP, Arrivault S, Sanglard LMVP, Detmann KC, Silva WB, Daloso DM, DaMatta FM, Nunes-Nesi A, Fernie AR, Araújo WL. (2017) Impaired Malate and Fumarate Accumulation Due to the Mutation of the Tonoplast Dicarboxylate Transporter Has Little Effects on Stomatal Behavior. *Plant Physiol.* 175:1068–1081.

- Millar AH, Whelan J, Soole KL, Day DA. (2011) Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62:79–104.
- Millenaar F, Lambers H. (2003) The alternative oxidase: in vivo regulation and function. *Plant Biology* 5:2–15.
- Mittler R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7(9):405-10.
- Mizuarai S, Miki S, Araki H, Takahashi K, Kotani H. (2005) Identification of Dicarboxylate Carrier Slc25a10 as Malate Transporter in de Novo Fatty Acid Synthesis. *J Biol. Chem.* 280(37):32434-324341.
- Moller IM. (2001) Plant mitochondria and oxidative stress: Electron Transport, NADPH Turnover, and Metabolism of Reactive Oxygen Species. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52:561-591.
- Mondal WA, Dey BB, Choudhuri MA. (1985) Proline accumulation as a reliable indicator of monocarpic senescence in rice cultivars. *Experientia* 41:46–348.
- Morelli AM, Ravera S, Calzia D and Panfoli I. (2019) An update of the chemiosmotic theory as suggested by possible proton currents inside the coupling membrane. *Open Biol.* 9(4):180221.
- Mortazavi, A et al. (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-seq. *Nature Method* 5(7):621-628.
- Murashige T, Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Murayama S, Handa H. (2000) Isolation and characterization of cDNAs encoding mitochondria uncoupling proteins in wheat: wheat UCP genes are not regulated by low temperature, *Mol. Gen. Genet.* 264:112-118.
- Narsai R, Law SR, Carrie C, Xu L, Whelan J (2011) In-Depth Temporal Transcriptome Profiling Reveals a Crucial Developmental Switch with Roles for RNA Processing and Organelle Metabolism That Are Essential for Germination in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 157(3):1342-1362.
- Nayyar H, Walia D. (2003) Water Stress Induced Proline Accumulation in Contrasting Wheat Genotypes as Affected by Calcium and Abscisic Acid. *Biol. Plant.* 46:275–279.
- Nelson DR, Felix CM, Swanson JM. (1998) Highly conserved charge-pair networks in the mitochondrial carrier family. *J. Mol. Biol.* 277(2):285-308.

- Nicholls DG. (1974) Hamster brown-adipose-tissue mitochondria. The chloride permeability of the innermembrane under respiring conditions, the influence of purine nucleotides. *Eur. J. Biochem.* 49:585–593.
- Nicholls DG, Rial E (1999) A history of the first uncoupling protein, UCP1. *J. Bioenerg. Biomembr.* 31:399-406.
- Noctor G, Dutilleul C, Paepe R De, Foyer CH. (2003) Use of mitochondrial electron transport mutants to evaluate the effects of redox state on photosynthesis, stress tolerance and the integration of carbon/nitrogen metabolism. *J. Exp. Bot.* 55:49–57. Noctor G, De Paepe R, Foyer CH. (2007). Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. *Trends Plant Sci.* 12, 125–134.
- Nunes-Nesi A, Carrari F, Lytovchenko A, Smith AM, Loureiro ME, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ, Fernie AR. (2005) Enhanced photosynthetic performance and growth as a consequence of decreasing mitochondrial malate dehydrogenase activity in transgenic tomato plants. *Plant Physiol.* 137(2):611-22.
- Okada SF, O'Neal WK, Huang PB, Nicholas RA, Ostrowski LE, Craigen WJ, Lazarowski ER, Boucher RC. (2004) Voltage-dependent anion channel-1 (VDAC-1) contributes to ATP release and cell volume regulation in murine cells. *J. Gen. Physiol.* 124:513–526.
- Okayama H, Kohno T, Ishii Y, Shimada Y, Shiraishi K, Iwakawa R, Furuta K, Tsuta K, Shibata T, Yamamoto S, Watanabe S, Sakamoto H, Kumamoto K, et al. (2012) Identification of Genes Upregulated in ALK-Positive and EGFR/KRAS/ ALK-Negative Lung Adenocarcinomas. *Cancer Res.* 72:100–111.
- O'Rourke B. (2007) Mitochondrial ion channels. *Annu. Rev Physiol.* 69:19–49.
- Palmieri P, Prezioso G, Quagliariello E, Klingenberg M. (1971), Kinetic Study of the Dicarboxylate Carrier in Rat Liver Mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 22:66–74.
- Palmieri L, Palmieri F, Runswick MJ, Walker JE (1996) Identification by bacterial expression and functional reconstitution of the yeast genomic sequence encoding the mitochondrial dicarboxylate carrier protein. *FEBS Lett.* 399:299–302.
- Palmieri L, Vozza A, Hönlinger A, Dietmeier K, Palmisano A, Zara V, Palmieri F. (1999) The mitochondrial dicarboxylate carrier is essential for the growth of *Saccharomyces cerevisiae* on ethanol or acetate as the sole carbon source. *Mol. Microbiol.* 31:569-577.
- Palmieri L, Picault N, Arrigoni R, Besin E, Palmieri F, Hedges M (2008) Molecular identification of three *Arabidopsis thaliana* mitochondrial dicarboxylate carrier isoforms: organ

distribution, bacterial expression, reconstitution into liposomes and functional characterization. *Biochem. J.* 410(3):621-629.

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(1):161-181.

Palmieri F. (2013) The mitochondrial transporter family SLC25: identification, properties and physiopathology. *Mol. Aspects Med.* 34:465–484.

Pastore D, Trono D, Laus MN, di Fonzo N, Flagella Z. (2007) Possible plant mitochondria involvement in cell adaptation to drought stress. A case study: durum wheat mitochondria. *J. Exp. Bot.* 58:195-210.

Pan X, Chen Z, Yang X, Liu G. (2014) Arabidopsis voltage-dependent anion channel 1 (AtVDAC1) is required for female development and maintenance of mitochondrial functions related to energy-transaction. *PLoS One.* 9(9):e106941.

Picault N, Hodges M, Palmieri L, Palmieri F. (2004) The growing family of mitochondrial carriers in Arabidopsis. *Trends Plant Sci.* 9:138–146.

Popov VN, Eprintsev AT, Maltseva EV (2011) Activation of genes encoding mitochondrial proteins involved in alternative and uncoupled respiration of tomato plants treated with low temperature and reactive oxygen species. *Russian J. Plant Physiol* 58:914-920.

Quinlan AR, Hall IM. (2010) BEDTools: A Flexible Suite of Utilities for Comparing Genomic Features. *Bioinformatics* 26 (6): 841–842.

Ricquier D, Kader JC. (1976) Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium-dodecyl sulfate-polyarylamide gel electrophoretic study. *Biochem. Biophys.* 73:577–83.

Ruprecht JJ, Kunji ERS. (2020) The SLC25 Mitochondrial Carrier Family: Structure and Mechanism. *Trends Biochem. Sci.* 45(3):244-258.

Samartsev VN, Smirnov AV, Zeldi IP, Markova OV, Mokhova EN, Skulachev VP. (1997) Involvement of aspartate/glutamate antiport in fatty acid-induced uncoupling of liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1319:251–257.

Sambrook J, Russell D (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Saraste M, Walker JE. (1982) Internal sequence repeats and the path of polypeptide in mitochondrial ADP/ATP translocase. *FEBS Lett.* 144(2):250-254.

Scheffler, I. E. *Mitochondria*. 2nd Ed, Willey, 2008.

Schindelin J, Arganda-Carreras I and Frise E et al. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9(7):676-682.

- Schwarländer M, Finkemeier I (2013) Mitochondrial energy and redox signaling in plants. *Antioxid. Redox Signal* 18:2122-2144.
- Siedow JN, Umbach AL. (2000) The mitochondrial cyanide-resistant oxidase: structural conservation amid regulatory diversity. *Biochim. Biophys. Acta* 1459: 432–439.
- Smith AM, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ. (2004) Activation and function of mitochondrial uncoupling protein in plants. *J. Biol Chem.* 279:51944-51952.
- Sweetlove LJ, Lytovchenki A, Morgan M, Nunes-Nesi A, Taylor NL, Baxter CJ, Eickmeier I, Fernie AR (2006) Mitochondrial uncoupling protein is required for efficient photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:19587-19592.
- Su LJ, Chang CW, Wu YC, Chen KC, Lin CJ, Liang SC, Lin CH, Whang-Peng J, Hsu SL, Chen CH, Huang CYF. (2007) Selection of DDX5 as a novel internal control for Q-RT-PCR from microarray data using a block bootstrap re-sampling scheme. *BMC Genomics* 8:40.
- Sze H, Murphy AS, Geisler M (2014) Evolution of transporters in plants. *Frontiers Research Topics* 4:547.
- Tan WZ, Colombini M (2007) VDAC closure increases calcium ion flux. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr* 1768:2510–2515.
- Tohge T, Watanabe M, Hoefgen R, Fernie AR. (2013) Shikimate and phenylalanine biosynthesis in the green lineage. *Front. Plant Sci.* 4:62.
- Tóth SZ, Puthur JT, Nagy V, Garab G. (2009) Experimental evidence for ascorbate-dependent electron transport in leaves with inactive oxygen-evolving complexes. *Plant Physiol.* 149: 1568–1578.
- Tóth SZ, Nagy V, Puthur JT, Kovács L, Garab G. (2011) The physiological role of ascorbate as photosystem II electron donor: protection against photoinactivation in heat-stressed leaves. *Plant Physiol.* 156: 382–392.
- Umbach AL, Zarkovic J, Yu J, Ruckle ME, McIntosh L et al. (2012) Comparison of Intact *Arabidopsis thaliana* Leaf Transcript Profiles during Treatment with Inhibitors of Mitochondrial Electron Transport and TCA Cycle. *PLoS One* 7(9):e44339.
- Vašková J, Firment J, Vaško L. (2017) Nuclear Encoded Mitochondrial Proteins in Metabolite Transport and Oxidation Pathway Connecting Metabolism of Nutrients. *Intech Open*. DOI: 10.5772/intechopen.72937.
- Vassileva V, Simova-Stoilova L, Demirevska K, Feller U. (2009) Variety-specific response of wheat (*Triticum aestivum* L.) leaf mitochondria to drought stress. *J. Plant Res.* 122: 445–454.



- van Aken O, Clercq ID, Anetaivanova, SR., van Breusegem F, Millar H, Whelan J (2016) Mitochondrial and Chloroplast Stress Responses Are Modulated in Distinct Touch and Chemical Inhibition Phases. *Plant Physiol.* 171:2150–2165.
- Vanlerberghe GC. (2013) Alternative oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 14(4):6805–6847.
- Vercesi AE, Martins IS, Silva MAP, Leite HMF, Cuccovia IM, Chaimovich H (1995) PUMPing plants. *Nature* 375:24.
- Vercesi A, Borecký J, Maia IG, Arruda P, Cuccovia IM, Chaimovich H. (2006) Plant uncoupling mitochondrial proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:385-404.
- Wang CY, Cheng SH, Kao CH. (1982) Senescence of rice leaves. VII. Proline accumulation in senescing excised leaves. *Plant Physiol.* 69:1348–1349.
- Wang Z, Xiao Y, Chen W, Tang K, Zhang I. (2010) Increased vitamin C content accompanied by an enhanced recycling pathway confers oxidative stress tolerance in *Arabidopsis*. *J. Integr. Plant Biol.* 52:400–409.
- Watanabe A, Hirai A. (2002) Two uncoupling protein genes of rice (*Oryza sativa* L.): molecular study reveals the defects in the pre-mRNA processing for the heat-generating proteins of the subtropical cereal. *Planta* 215:90-100.
- Weigel D, Glazebrook J (2002) *Arabidopsis: a laboratory manual*. New York, CSHL Press. 354.
- Weiss U. (1986) Early Research On The Shikimate Pathway: Some Personal Remarks And Reminiscences. In: Conn E.E. (eds) *The Shikimic Acid Pathway. Recent Advances in Phytochemistry (Proceedings of the Phytochemical Society of North America)*, vol 20. Springer, Boston, MA.
- Wiskich JT. (1975) Phosphate-dependent Substrate Transport into Mitochondria: Oxidative Studies. *Plant Physiol.* 56(1):121-125.
- Wilkins HM, Kirchhof D, Manning E, Joseph JW, Linseman DA. (2013) Mitochondrial glutathione transport is a key determinant of neuronal susceptibility to oxidative and nitrosative stress. *J. Biol. Chem.* 288(7):5091–5101.
- Xia J, Wishart DS. (2016) Using MetaboAnalyst 3.0 for Comprehensive Metabolomics Data Analysis. *Curr. Protoc. Bioinformatics* 55:14.10.1-14.10.

- Yamaguchi H, Jelokhani-Niaraki M, Kodama H. (2004) Second transmembrane domain of human uncoupling protein 2 is essential for its anion channel formation. *FEBS Lett.* 577:299–304.
- Yang, Y, Costa A., Leonhardt N. et al. (2008) Isolation of a strong *Arabidopsis* guard cell promoter and its potential as a research tool. *Plant Methods* 4:6.
- Yin L, Wang S, Eltayeb AE, Uddin MI, Yamamoto Y, Tsuji W, Takeuchi Y, Tanaka K. (2010) Overexpression of dehydroascorbate reductase, but not monodehydroascorbate reductase, confers tolerance to aluminum stress in transgenic tobacco. *Planta* 231:609–621.
- Yoshida K, Watanabe CK, Hachiya T, et al. (2011) Distinct responses of the mitochondrial respiratory chain to long- and short-term high-light environments in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 34:618–628.
- Young MJ, Bay DC, Hausner G, Court DA (2007) The evolutionary history of mitochondrial porins. *BMC Evol. Biol* 7:31.
- Zhang, X. et al. (2006) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nat. Protocols* 1:641–646.
- Zhang Z, Wang J, Zhang R, Huang R. (2012) The ethylene response factor AtERF98 enhances tolerance to salt through the transcriptional activation of ascorbic acid synthesis in *Arabidopsis*. *Plant J.* 71:273–287.
- Zhao RZ, Jiang S, Zhang L, Yu ZB (2019) Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *Int. J. Mol. Med.* 44: 3-15.
- Zhou X, Paredes JA, Krishnan S, Curbo S, Karlsson A. (2015) The mitochondrial carrier SLC25A10 regulates cancer cell growth. *Oncotarget* 6(11):9271–9283.
- Zhurussova, A. et al., (2015) Tumor Microenvironment Promotes Dicarboxylic Acid Carrier-Mediated Transport of Succinate to Fuel Prostate Cancer Mitochondria. *Am. J. Cancer Res.* 5:1665–1679.